

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOX-BEHNKEN DENEYSEL TASARIM YÖNTEMİ
UYGULANARAK TURUNÇGİLLERİN ANTİOKSİDAN
AKTİVİTELERİ İÇİN EKSTRAKSİYON YÖNTEMİNİN
OPTİMİZASYONU

NURCİHAN TAN ERKOÇ

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Biyokimya Programı

Danışman

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Haziran, 2021

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOX-BEHNKEN DENEYSEL TASARIM YÖNTEMİ UYGULANARAK
TURUNÇGİLLERİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ İÇİN
EKSTRAKSİYON YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

Nurcihan TAN ERKOÇ tarafından hazırlanan tez çalışması 15.06.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL, Danışman

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Özlem SAÇAN, Üye

İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi

Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Sevim TUNALI, Üye

İstanbul-Cerrahpaşa Üniversitesi

Doç. Dr. Şule DİNÇ ZOR, Üye

Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘Box- Behnken Deneysel Tasarım Yöntemi Uygulanarak Turunçgillerin Antioksidan Aktiviteleri için Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğ r kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Nurcihan TAN ERKOÇ

 mza

Biricik eşim, oğlum

ve

Canım aileme,

TEŞEKKÜR

Tez konuma ait tüm çalışmalarında hiçbir desteğini esirgemeyen ömür boyu hakkını üzerimde taşıyacağım saygıdeğer ve çok kıymetli tez danışmanım Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL'e ve eğitim sürecime katkı sağlayan tüm hocalarıma, analizlerim süresince her zaman her konuda yardımcı olan Prof. Dr. Güzin ALPDOĞAN ve Doç. Dr. Şule DİNÇ ZOR'a çok kıymetli hoca arkadaşlarım Arş. Gör. Ümran DURU KAMACI ve Arş. Gör. Mesut BİLGİ'ye, Biyokimya Programı lisansüstü öğrencileri Alihan KOCABAŞ, Merve BAT ve Doruk AKDOĞAN'a ; kıymetli jüri üyelerim Prof. Dr. Özlem SAÇAN, Prof. Dr. Sevim TUNALI, Prof. Dr. Melda ALTIKATOĞLU YAPAÖZ, Doç. Dr. Şule DİNÇ ZOR'a ve Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Bölümü'ne çok teşekkür ederim.

Ayrıca bu zorlu ve uzun süreçte sabırla yanımda olan sevgili eşime, bu süreci tamamlayabilmem için ben olmadığımda oğlumla sevgi ve şevkatle ilgilenen aileme, beni her daim kocaman kucaklayan canım oğluma sonsuz minnettarlığımı sunarım.

Nurcihan TAN ERKOÇ

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	x
TABLO LİSTESİ	xii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	2
1.3 Hipotez	3
2 KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Serbest Radikaller	4
2.1.1 Serbest Radikal Oluşumu	5
2.1.2 Serbest Radikal Türleri	5
2.2 Oksidatif Stres	9
2.3 Antioksidanlar	11
2.3.1 Antioksidanların Sınıflandırılması	12
2.3.2 Antioksidanların Doğal Kaynaklardan Ekstraksiyonu	30
2.3.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	37
2.4 DeneySEL Tasarım	49
2.4.1 Faktöriyel Tasarımlar (Factorial Design)	50
2.4.2 Cevap Yüzey Tasarımlar (Response Surface Method, RSM)	52
2.5 Turunçgiller ve Özellikleri	55
2.5.1 Türkiye’de Turunçgil Üretimi	57
2.5.2 Turunçgillerin Anatomik Yapısı	59
2.5.3 Turunçgillerin İçerdikleri Biyoaktif Bileşikler	60
2.5.4 Atık Turunçgil Kabuklarının Özellikleri ve Kullanım Alanları	61
2.5.5 Turunçgillerle Yapılan Önceki Çalışmalar	64
3 MATERYAL VE YÖNTEM	66
3.1 Kullanılan Materyal ve Cihazlar	66
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar	66

3.1.2	Kullanılan Cihazlar.....	68
3.2	Turunçgillerin Temini ve Analize Hazırlanması	69
3.2.1	Turunçgillerin Temin Edilmesi ve Hazırlanması	69
3.2.2	Turunçgil Kabuğu Ekstrelerinin Hazırlanması.....	70
3.3	Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	72
3.3.1	DPPH [•] (1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikali Yakalama Aktivitesi Tayini	72
3.3.2	Toplam Fenolik Madde Tayini.....	74
3.3.3	Toplam Flavonoid Miktarı Tayini	75
3.3.4	İndirgeme Gücü Tayini.....	75
3.3.5	Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini	76
3.3.6	NO (Nitrik Oksit) Yakalama Aktivitesi Tayini	77
3.3.7	β -Karoten Ağartma Testi.....	78
3.3.8	DMPD ⁺ (N,N'-dimetil-p-fenilendiamin diklorür) Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini.....	78
3.3.9	ABTS ⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini.....	79
3.4	DeneySEL Tasarım.....	79
4	ARAŞTIRMA BULGULARI	81
4.1	Mandalina Kabuğu Ekstreleri.....	81
4.1.1	Mandalina Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları	81
4.1.2	Mandalina Kabuğu Ekstrelerinin DeneySEL Tasarım Sonuçları.....	91
4.2	Limon Kabuğu Ekstreleri	97
4.2.1	Limon Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	97
4.2.2	Limon Kabuğu Ekstrelerinin DeneySEL Tasarım Sonuçları	105
4.3	Portakal Kabuğu Ekstreleri	110
4.3.1	Portakal Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları	110
4.3.2	Portakal Kabuğu için DeneySEL Tasarım Sonuçları	119
5	SONUÇ VE ÖNERİLER	126
	KAYNAKÇA	127
	TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	138

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
g	Gram
μ	Mikro
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μM	Mikromolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
M	Molar
nm	Nanometre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
δ	Sigma
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
ALB	Albümin
ANOVA	Varyans analizi
ASE	Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
BBD	Box-Behnken tasarımı
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	Katalaz
CCD	Merkezi Kompozit Tasarımlar
CL	Kemülimünesans
DCFH-DA	Diklorofloresin-diasetat
DG	Dodesil-gallat
DMPD	N,N-dimetil-p-fenilendiamin
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	1,1-difenil-2-pikril-hidrazil
EDTA	Etilendiamin tetra-asetik asit
EPR	Elektron-paramanyetik rezonans
ET	Elektron transferi
FIA	Akış enjeksiyon analizi
FRAP	Fe(III) İyonu İndirgeme Kapasitesi
GPx	Glutasyonperoksidaz
GR	Glutasyonredüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
HAT	Hidrojen atomu transferi
HHPE	Yüksek hidrostatik basınç ekstraksiyonu
MAE	Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MDA	Malondialdehit
MF	Mikroakışkan analizi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OG	Oktil gallat

ORAC	Oksijen radikali absorplama kapasitesi
PE	Fikoeritrin
PG	Propil gallat
PLE	Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
RNT	Reaktif azot türleri
ROT	Reaktif oksijen türleri
RSM	Cevap yüzey tasarımlar
SFE	Süperkritik akışkan ekstraksiyonu
SOD	Süperoksit dismutaz
TBHQ	Ter-bütilhidroquinon
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TOSC	Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi
TRAP	Toplam Radikal Tutma Kapasitesi
TRPZ	Tripridil-tirazin
UAE	Ultrases destekli ekstraksiyon

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	Çeşitli reaksiyonlarla ROT oluşumu	8
Şekil 2.2	Oksidatif Stresin sebepleri, hedef molekülleri, etkilediği organlar ve oksidatif strese karşı koyan antioksidanlar	10
Şekil 2.3	Antioksidanların sınıflandırılması	13
Şekil 2.4	Glutasyon'un kimyasal yapısı	16
Şekil 2.5	Glutasyonun antioksidan etkilerinin şematik gösterimi	16
Şekil 2.6	Melatonin'in kimyasal yapısı	17
Şekil 2.7	Ürik Asit'in kimyasal yapısı	17
Şekil 2.8	Bilirubin'in kimyasal yapısı	18
Şekil 2.9	Albüminin antioksidan mekanizması	19
Şekil 2.10	Koenzim Q10'in kimyasal yapısı	19
Şekil 2.11	A Vitamini (Retinol)'ün kimyasal yapısı	20
Şekil 2.12	Askorbik Asit'in kimyasal yapısı	20
Şekil 2.13	Çeşitli tokoferol türevlerinin kimyasal yapısı	22
Şekil 2.14	Temel karotenlerin kimyasal yapısı	22
Şekil 2.15	Temel ksantofillerin kimyasal yapısı	23
Şekil 2.16	Bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları	25
Şekil 2.17	<i>Trans</i> -resveratrol ve <i>trans</i> -resveratrol glukozit kimyasal yapıları	26
Şekil 2.18	Tanninlerin kimyasal yapıları	27
Şekil 2.19	Bazı doğal antioksidanların etki mekanizmaları	28
Şekil 2.20	Sentetik antioksidanların kimyasal yapısı	29
Şekil 2.21	Sokslet ekstraksiyon cihazı	32
Şekil 2.22	Ultrases dalgalarının ekstraksiyon örneğine etkisi	34
Şekil 2.23	CUPRAC reaksiyonu	43
Şekil 2.24	Miller vd. tarafından geliştirilen iki aşamalı TEAC yöntemi	44
Şekil 2.25	Re vd. tarafından geliştirilen tek aşamalı TEAC yöntemi	44
Şekil 2.26	TPTZ kompleksinin FRAP yönteminde indirgenmesi	45
Şekil 2.27	DPPH radikalinin indirgenmesi reaksiyonu	46
Şekil 2.28	DeneySEL tasarımın sınıflandırılması	50

Şekil 2.29 Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) ve Box-Behnken Tasarımının 3 seviyeli bir tasarım için şematik gösterimi	54
Şekil 2.30 Turunçgillerden bazılarının dünyaca üretim miktarlarının yıllara göre dağılımı	56
Şekil 2.31 Bazı turunçgil türlerinin ülkelere göre üretim miktarları	57
Şekil 2.32 Bazı turunçgil türlerinin meyve, çekirdek, su ve kabuk kısımları	59
Şekil 2.33 Turunçgillerin anatomik yapısı	60
Şekil 3.1 Turunçil kabuklarının hazırlık aşamaları	70
Şekil 3.2 Hazırlanan ekstraktlar	71
Şekil 3.3 DPPH yakalama aktivitesi tayininde renk değişimi	73
Şekil 3.4 Ekstrelerin ve NaNO_2 'nin reaktifler eklendikten sonraki görüntüsü	74
Şekil 3.5 İndirgeme gücü tayininde renk değişimi	76
Şekil 3.6 Ekstrelerin ve standartların reaktifler eklendikten sonraki görüntüsü ..	77
Şekil 4.1 Pirokateşol standart grafiği	82
Şekil 4.2 Kateşin standart grafiği	83
Şekil 4.3 Troloks standart garifiği	90
Şekil 4.4 a)Y ₁ , b)Y ₂ , c)Y ₃ , d)Y ₄ cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi	94
Şekil 4.5 İstenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri	96
Şekil 4.6 Standart Pirokateşol grafiği	98
Şekil 4.7 Kateşin standart grafiği	99
Şekil 4.8 Troloks standart grafiği	104
Şekil 4.9 a)Y ₁ , b)Y ₂ , c)Y ₃ , d)Y ₄ ve e)Y ₅ cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi	108
Şekil 4.10 İstenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri	109
Şekil 4.11 Pirokateşol standart grafiği	111
Şekil 4.12 Kateşin standart grafiği	112
Şekil 4.13 Troloks standart garifiği	118
Şekil 4.14 a)Y ₁ , b)Y ₂ ve c)Y ₃ cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi	122
Şekil 4.15 d)Y ₄ , e)Y ₅ ve f)Y ₆ cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi	123

Şekil 4.16 Y_1 , Y_2 ve Y_3 için yapılan optimizasyonda istenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri.....	124
Şekil 4.17 Y_3 , Y_4 ve Y_5 için yapılan optimizasyonda istenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri.....	125

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Serbest radikallerin sınıflandırılması	5
Tablo 2.2 Lipit peroksidasyon mekanizması	11
Tablo 2.3 Ekstraksiyon yöntemlerinin kıyaslanması	37
Tablo 2.4 Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin sınıflandırılması	38
Tablo 2.5 Faktöriyel, Merkezi kompozit (CCD) ve Box-Behnken tasarımlarda deney sayılarının kıyaslanması	54
Tablo 2.6 Türkiye’de turuncgil dikim alanı, üretim, verim ve ağaç sayısı	58
Tablo 2.7 Turuncgillerin içerdikleri biyoaktif bileşikler	61
Tablo 2.8 Turuncgillerin içerdikleri flavonoid, fenolik asit ve uçucu bileşikler	63
Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar	66
Tablo 3.2 Box-Behnken Tasarımı şartlarına uygun seçilen ekstraksiyon değişkenleri ve seviyeleri	71
Tablo 3.3 Deney sayısı ve ekstraksiyon şartları	71
Tablo 3.4 Ekstraksiyon verimleri	72
Tablo 4.1 Mandalina kabuğu ekstrelerinin DPPH radikal yakalama aktivitesi	81
Tablo 4.2 Mandalina kabuğu ekstrelerinin toplam fenolik madde miktarı sonuçları	83
Tablo 4.3 Mandalina kabuğu ekstrelerinin toplam flavonoid miktarı sonuçları	84
Tablo 4.4 Mandalina kabuğu ekstrelerinin indirgeme gücü sonuçları	85
Tablo 4.5 Mandalina kabuğu ekstrelerinin metal şelatlama aktivitesi sonuçları	86
Tablo 4.6 Mandalina kabuğu ekstrelerinin NO yakalama aktivitesi sonuçları	87
Tablo 4.7 Mandalina kabuğu ekstrelerinin β -Karoten ağartma aktivitesi sonuçları	88
Tablo 4.8 Mandalina kabuğu ekstrelerinin DMPD ⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları	89
Tablo 4.9 Mandalina kabuğu ekstrelerinin ABTS ⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları	90
Tablo 4.10 Mandalina kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları	92
Tablo 4.11 Limon kabuğu ekstrelerinin DPPH [•] radikal yakalama aktivitesi sonuçları	97

Tablo 4.12 Limon kabuğu ekstreleri için toplam fenolik madde miktarı sonuçları	98
Tablo 4.13 Limon kabuğu ekstreleri için toplam flavonoid miktarı sonuçları	99
Tablo 4.14 Limon kabuğu ekstreleri için toplam indirgeme gücü sonuçları	100
Tablo 4.15 Limon kabuğu ekstreleri için metal şelatlama aktivitesi sonuçları	101
Tablo 4.16 Limon kabuğu ekstreleri için NO yakalama aktivitesi sonuçları	102
Tablo 4.17 Limon kabuğu ekstreleri için β - Karoten Ağartma testi sonuçları	103
Tablo 4.18 Limon kabuğu ekstreleri için DMPD ⁺ radikal yakalama aktivitesi	103
Tablo 4.19 Limon kabuğu ekstreleri için ABTS ⁺ radikal yakalama aktivitesi	105
Tablo 4.20 Limon Kabuğu Ekstreleri için ANOVA test sonuçları	106
Tablo 4.21 Portakal kabuğu ekstreleri için DPPH radikal yakalama aktivitesi sonuçları	110
Tablo 4.22 Portakal kabuğu ekstreleri için toplam fenolik madde miktarı sonuçları	111
Tablo 4.23 Portakal kabuğu ekstreleri için toplam flavonoid madde miktarı sonuçları	113
Tablo 4.24 Portakal kabuğu ekstreleri için indirgeme gücü sonuçları	113
Tablo 4.25 Portakal kabuğu ekstreleri için metal şelatlama aktivitesi sonuçları	114
Tablo 4.26 Portakal kabuğu ekstreleri için NO yakalama aktivitesi sonuçları	115
Tablo 4.27 Portakal kabuğu ekstreleri için β - Karoten Ağartma testi sonuçları	116
Tablo 4.28 Portakal kabuğu ekstreleri için DMPD ⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları	117
Tablo 4.29 Portakal kabuğu ekstreleri için ABTS ⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları	118
Tablo 4.30 Portakal kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları	120
Tablo 5.1 Elde edilen optimum ekstraksiyon şartları	126
Tablo 5.2 Sonuçların benzer çalışmalarla kıyaslanması	127

Box-Behnken Deneysel Tasarım Yöntemi Uygulanarak Turunçgillerin Antioksidan Aktiviteleri İçin Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

Nurcihan TAN ERKOÇ

Doktora Tezi

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Mandalina, portakal, limon, greyfurt, turunç, kumkuat, bergamot, şadok gibi meyvelerin oluşturduğu turunçgiller insan sağlığı için sayısız faydaları olan besin kaynaklarındandır. Yapılan çalışmalar içerdikleri yüksek miktarda vitamin, flavonoid ve karotenoid miktarları ile bilinen turunçgillerin antioksidan, antikanserojen, antienflamatuvar, antidiyabetik ve yağlanma önleyici etkilerinin olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada turunçgil ailesi üyelerinden sıklıkla gıda atığı olarak ayrılan limon, mandalina ve portakal kabuklarının antioksidan özellikleri incelenerek atık ürünlerden fayda sağlamak ve raf ömrü uzatan gıda katkı maddelerine doğal ürün alternatifleri bulmak hedeflenmiştir. Antioksidan çalışmalarında ekstraktların hazırlanması için ekstraksiyon şartlarını etkileyen parametrelerden süre, çözücü miktarı, çözücü oranı için yapılacak incelemelerde, maliyet ve çevreye etkileri açısından üstünlükleri ile bilinen ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi (UAE) seçilmiştir. Ekstraksiyonu etkileyen önemli parametrelerden süre (2, 6, 10 dak), çözücü oranı (%100aseton, %50 aseton, %100 su) ve çözücü miktarı (10, 15, 20 mL) üç farklı seviyede incelenmiş ve UAE koşullarının optimum değerleri bir

optimizasyon yöntemi olan Box-Behnken Tasarımı (BBD) ile belirlenmiştir. Elde edilen deneysel çalışma sonuçları ve istatistiksel veriler varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirmiş, böylece her turunçgil kabuğu için pozitif etki taşıyan tüm antioksidan parametrelerin maksimum değerde olduğu bir ekstraksiyon optimizasyonu yapılmıştır. Sonuçlar, tüm ekstraktlar için antioksidan aktivitenin yüksek olduğu çok kısa süreli ekstraksiyon işlemi ile sonuç veren, az miktarl kimyasal çözücü kullanımı ile çevreye duyarlı ve ekonomik süreçleri içeren optimizasyon şartları olabileceğini göstermiştir. Özellikle gıda ve ilaç endüstrisinde çeşitli amaçlarla kullanımlarına sıklıkla başvurulmuş sentetik antioksidanların miktarlarının azaltılması ya da yerini tamamen doğal ürünlere bırakması adına yapılacak çalışmalar için zaman kazandıran ve yol gösterici veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Box-Behnken tasarımı, turunçgil, ultrases destekli ekstraksiyon

Optimization of Extraction Method for Antioxidant Activities of Citrus Fruits by Applying Box-Behnken Experimental Design Method

Nurcihan TAN ERKOÇ

Doctor of Philosophy Thesis

Department of Chemistry

Advisor: Prof. Dr. Ayşegül PEKSEL

Citrus fruits which are formed by fruits such as tangerine, orange, lemon, lime, grapefruit, kumquat, bergamot and shaddock are one of the nutritional sources with numerous benefits for human health. Studies have shown that citrus fruits, known for their high amounts of vitamins, flavonoids and carotenoids, have antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antidiabetic and anti-lubricant effects.

In this study, the antioxidant properties of lemon, mandarin and orange shells, which are separated as food waste, were examined to benefit from waste products and to find natural product alternatives to food additives that extend shelf life. Ultrasound assisted extraction method (UAE), known for its advantages in terms of extraction time, solvent quantity, cost and environmental effects, was used for preparation of extracts in antioxidant studies. A Box-Behnken Design (BBD) was employed to investigate the effects of sonication time (2, 6, 10 min), ratio of acetone in extraction solvent (0, 50, 100%) and volume of solvent (10, 15, 20 mL) on antioxidant capacity of the peel. The experimental study results and statistical data obtained were evaluated by analysis of variance (ANOVA), so that an extraction

optimization with maximum value of all antioxidant parameters, which had a positive effect for each citrus peel was performed.

Thus, an extraction optimization in which all antioxidant parameters are of maximum value was made and the studies to be done in this area were expected to provide convenience. The results showed that for all extracts, there may be optimization conditions that include environmentally sensitive, economical process with the use of small amount chemical solvents.

Keywords: Antioxidant, Box-Behnken design, citrus fruit, ultrasound assisted extraction

YILDIZ TECHNICAL UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF SCIENCE AND ENGINEERING

1.1 Literatür Özeti

Organizmada normal metabolik yolların işleyişi sırasında veya çevresel ajanlar (pestisitler, aromatik hidrokarbonlar, toksinler vb.), stres, radyasyon gibi çeşitli dış faktörlerin etkisi ile serbest radikaller meydana gelmektedir (İşbilir, 2008). Serbest radikaller dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid peroksit türevleri gibi reaktif moleküllerdir. Düşük konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türleri hücre içi sinyalizasyon ve homeostazı düzenleyen faydalı bir etki gösterirken, yüksek konsantrasyonları protein, lipid ve DNA hasarında büyük rol oynar. İnsan vücudunda bulunan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), Glutasyonperoksidaz (GPx), Glutasyonredüktaz (GR), Glutasyon-S-transferaz (GST) ve Glutasyon (GSH) gibi bazı metabolizma bileşikleri Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'nin nötralizasyonunu sağlayan antioksidan savunma sistemleridir.

Metabolizmada ROT ve antioksidan savunma sistemleri bir denge içerisinde çalışmaktadır. ROT ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin ROT tarafına kayması oksidatif strese neden olmaktadır. Endojen ROT, mitokondri, peroksizom ve sitokrom p-450 gibi bazı organellerin çalışma faaliyetleri sonunda oluşan yan ürünlerdir. Eksojen ROT ise kirleticiler, tütün, zararlı dumanlar, ilaçlar, radyasyon, ksenobiyotikler gibi çevresel faktörler ve strese bağlı meydana gelir (Prasad vd., 2017).

Antioksidanlar, herhangi bir molekülün oksidatif hasarını geciktiren, önleyen veya ortadan kaldıran bileşikler olarak tanımlanırlar (Akhtar vd., 2017). Bu bakımdan antioksidanlar serbest radikal oluşumu ve zincir reaksiyonlarını metabolizma için önemli moleküllerin tahribatından önce sonlandıran sistemlerdir.

Vücut direncini arttıran, metabolizmanın dengeli bir şekilde çalışmasına yardımcı olan antioksidan yapılar antienflamatuvar, antikanserojenik ve antiaterosklerotik etki taşırlar ve serbest radikal etkilerinin neden olduğu koroner rahatsızlıklar, diyabet, akut böbrek yetmezliği, karaciğer hasarı, doku hasarı, serebrovasküler hastalıklar, katarakt, Parkinson, otoimmün hastalıklar ve çeşitli kanser türlerinin oluşmasını engeller. Tüm bu önemli etkileri sebebi ile antioksidanların tanımlanması, etkileri ve doğal kaynaklarından ekstraksiyonları ile analizleri uzun yıllardır çalışılmaktadır.

Turunçgiller, diğer meyve ve sebzelere kıyasla içerdikleri yüksek flavanon miktarlarıyla bilinmektedirler (Wang vd., 2017). Mandalina, limon, portakal, turunç, greyfurt gibi narenciye çeşitlerinden oluşan turunçgiller insan sağlığı için sayısız faydaları olan besin kaynaklarından (Rafiq vd., 2018; Zhang ve Zhou, 2019). Bu besinlerin kabukları aslında önemli nutrasötik kaynaklar olmalarına rağmen genellikle çöpe atılmaktadır. Bu biyoaktif kalıntılar yeni nutrasötikler olarak kullanılmak için oldukça ucuz ve çevre dostudur.

Meyve suyu endüstrisinde oldukça fazla miktarda turunçgil kabuğu atığı meydana gelmektedir. Turunçgil atıklarının ucuz biyoaktif ürünler olarak sanayide, çeşitli aroma maddeleri, doğal renk maddeleri gibi ürünlere dönüştürülerek kullanım alanı bulunduğu bilinmektedir (Diab, 2016).

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde endüstriyel proseslerde gıda maddelerinin depolanma stabilitelerini artırmak için çoğunlukla BHA, BHT ve PG gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak, antioksidan olarak kullanılan kimyasalların muhtemel toksisiteleri nedeniyle, son yıllarda ilgi doğal antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır (Vareltzis vd., 1997). Bu amaçla yapılan çalışmalarda özellikle gıdalardaki yağ ve protein oksidasyonunu önlemesi açısından antioksidan kullanımı avantajlıdır ve bu ürünlerin doğal antioksidanlar olması daha sağlıklı katkı maddeleri ile daha ekonomik yollar bulunmasını sağlayacaktır.

Bu tez kapsamında özellikle meyve suyu ve meyveli ürün üretim tesislerinde gıda atık ürünü olarak ayrılan turuncgil kabuklarının antioksidan özelliklerinin incelenmesi ile atık ürünlerden fayda sağlamak hedeflendi.

Bu amaçla yapılan çalışmada doğal kaynaklardan antioksidanların elde edilmesi için kullanılan ekstraksiyon yöntemleri arasında daha az sürelerde, daha az çözücü kullanımı ile yüksek antioksidan verimlerinin elde edildiği bilinen Ultrases Destekli Ekstraksiyon (UAE) yönteminin optimizasyonu yapıldı.

1.3 Hipotez

Çalışmada limon, portakal, mandalina kabuklarının antioksidan etkilerinin incelenmesi için hazırlanan ekstraktlarda ekstraksiyonu etkileyen parametrelerden süre (2, 6, 10 dak), çözücü oranı (%100 aseton, %50 aseton, %100 su) ve çözücü miktarı (10, 15, 20 mL) üç farklı seviyede incelendi. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinden 1,1"-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH[•]) radikali, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (ABTS^{•+}) radikali, N,N"-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD^{•+}) radikali yakalama etkileri, nitrikoksit yakalama aktivitesi, indirgeme gücü, metal iyonlarını şelatlama aktivitesi, β -karoten ağartma gücü, toplam fenolik ve flavonoid madde miktarı tayini yöntemleri kullanıldı. Bu antioksidan aktivite özelliklerinin en yüksek olduğu UAE koşullarının optimum değerleri deneysel tasarım yöntemi ile belirlendi.

Elde edilen ekstraksiyon şartları ile hazırlanacak olan atık ekstraktlarının çeşitli endüstri alanlarında kullanılan sentetik antioksidanlara alternatif doğal ürünler olarak kullanım alanı bulabileceği düşünüldü.

KURAMSAL TEMELLER

Fotosentetik organizmalar ve aerobik canlıların incelenmesi ile moleküler oksijen (O_2) ve ROT'lar, yaklaşık 2.45 milyon yıl önce tanınmıştır (Sanchez, 2017). Fotosentez esnasında bitkiler tarafından üretilen oksijen molekülü, yaşam için kritik öneme sahiptir. Hücre büyümesi sırasında oksijen tüketimi bir dizi ROT oluşmasına yol açar (Sacan ve Yanardag, 2010). Biyolojik süreçlerde hayati rol oynaması ile bilinen oksijen, oksidatif stresin de etkisiyle metabolik olaylar sırasında vücudun bazı moleküllerini, süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipit peroksit türevleri gibi serbest radikallere dönüştürebilmektedir. Dolayısıyla moleküler oksijen ROT'un oluşmasına ve tüm canlı hücrelerinde hasara sebep olabilmektedir (Chand vd., 2017; Sanchez, 2017).

Antioksidan maddeler çok düşük konsantrasyonlarda bile radikalik reaksiyonları ya da radikalik türlerin etkisini önleyebilme özelliği taşırlar. Bu sebeple kozmetik, gıda, ilaç ve plastik endüstrilerinde kullanımı fazlaca avantaj sağlar. Bunun yanında spesifik bazı antioksidanların antikanserojenik, antimutajenik, antialerjik ve yaşlanma karşıtı önemli biyolojik aktiviteleri olduğu bilinmektedir (Guimaraes vd., 2007).

2.1 Serbest Radikaller

Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak da bilinen serbest radikaller oksijen içeren maddelerin ve çeşitli oksijen metabolitlerinin bir sınıfı olup tüm peroksit ve oksijensiz radikal gruplarını kapsayan, dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, kısa ömürlü moleküllerdir (Chen vd., 2017). Serbest radikal grubunun en bilinen üyeleri olarak süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($\cdot OH$), singlet oksijen (1O_2) ve radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ile peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) sayılabilir.

Serbest radikaller normal konsantrasyonlarda hücre büyümesi, farklılaşması ve kontrolünü sağlayan önemli sinyal iletim yollarında ikincil haberciler olarak görev

yaparlar. Ancak bazen serbest radikallere metabolize olan toksinler, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede fazlaca ROT oluşabilir. Bu aşamada hücrede antioksidan-serbest radikal dengesinin bozulması ile Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, çeşitli akciğer hastalıkları, felç, hipertansiyon, alerji, astım, septik şok, inflamasyon ve çeşitli kanser türleri gibi klinik süreçler ortaya çıkar (Chand vd., 2017).

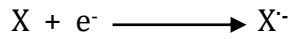
2.1.1 Serbest Radikal Oluşumu

Serbest radikaller çeşitli fiziksel ve kimyasal etkilerle sürekli olarak çok miktarda ve çeşitlilikte oluşmaktadır. Serbest radikaller üç şekilde meydana gelmektedir:

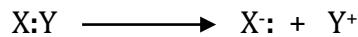
- a) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Bağı kırılması sırasında bağı meydana getiren iki elektrondan herbirinin ayrı ayrı atomlar üzerinde kalmasıdır.



- b) Normal bir moleküle elektron aktarımı ile: Radikalik özelliği bulunmayan bir moleküle bir elektron aktarımı ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron kalmasıdır.



- c) Bağların heterolitik kırılması ile: Bu radikal oluşumu kovalent bağı meydana getiren her iki elektronunda atomlardan birinde kalmasıdır.



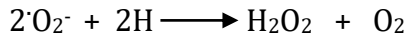
2.1.2 Serbest Radikal Türleri

Metabolizmada hücreler enerji elde etmek üzere oksijen kullandıklarında mitokondrilerde serbest radikaller meydana gelir. Hücresel redoks ürünleri olan bu moleküller başlıca reaktif oksijen türleri (ROT) ve reaktif azot türleri (RNT) dir (Sisein, 2014). Bu reaktif türleri Tablo 2.1’de gösterildiği gibi sınıflandırmak mümkündür.

Tablo 2.1 Serbest radikallerin sınıflandırılması (Halliwell 2001; Sisein 2014)

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Reaktif Oksijen Türleri (ROT)	
Süperoksit anyon (O_2^-)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil ($\cdot\text{OH}$)	Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$)
Alkoksil ($\text{RO}\cdot$)	Hipoklorik asit (HClO)
Peroksil ($\text{ROO}\cdot$)	Ozon (O_3)
Reaktif Azot Türleri (RNT)	
Nitrikoksit ($\text{NO}\cdot$)	Peroksinitrit ($\text{OONO}\cdot$)
Azotdioksit ($\text{NO}_2\cdot$)	

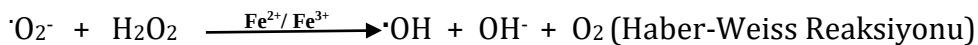
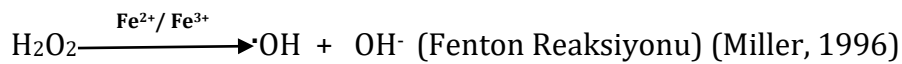
➤ **Süperoksit Anyon Radikali (O_2^-)**, moleküler oksijenin indirgenmiş formudur. Süperoksit anyonu metabolizmada hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$) gibi türlerin oluşumunda önemli rol almaktadır.



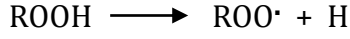
Hücre ortamda O_2^- , solunum zincirinin bir aşaması olan oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondrilerde oluşur. Süperoksit dismutaz (SOD) tarafından yürütülen bir reaksiyonla kendisinden daha az reaktif olan hidrojen peroksit (H_2O_2)'e dönüştürülür (Gate vd., 1999; Signorella vd., 2018).

➤ **Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)**, hidroksit iyonunun nötral halidir. Reaktivitesi oldukça yüksek olduğundan hücrede oluşuktan hemen sonra reaksiyona girmektedir.

Hücrede H_2O_2 'nin Fe^{2+} iyonunun katalizasyonu ile homolitik kırılması yoluyla gerçekleşen Fenton Reaksiyonu ya da O_2^- 'in eser elementler varlığında H_2O_2 ile reaksiyonu (Haber-Weiss) sonucu $\cdot\text{OH}$ meydana gelmektedir.



➤ **Peroksil (ROO•) ve Alkoksil (RO•) Radikalleri**, çok iyi oksidasyon ajanlarıdır. Sıklıkla alkil peroksitlerin (ROOH) ayrışması reaksiyonlarında meydana gelirler. UV ışık ya da geçiş metalleri varlığında peroksitler peroksil ve alkoksil radikalleri vermek üzere ayrışırlar.



➤ **Hidrojen Peroksit (H₂O₂)**, ROT'lar arasında en düşük reaktiviteye sahip moleküllerden olmasına rağmen metal iyonları ve süperoksit radikali varlığında hidroksil radikali oluşturur.



Canlılarda süperoksit anyonu, hipoklorik asit ya da kloroaminler ile reaksiyona girerek singlet oksijen oluşturduğu da bilinmektedir. Hemoglobin, miyogloblin gibi hem-proteinlerinin yapısını bozabilir.

➤ **Singlet Oksijen (¹O₂)**, de H₂O₂ gibi reaktif bir tür olmamasına karşın reaktif oksijen türlerini oluşturma özelliği taşımaktadır. Hücre ve dokularda süperoksit anyonu, hipoklorik asit ya da kloroaminlerin hidrojen peroksit ile reaksiyonları sonucu meydana gelir.



➤ **Hipoklorik asit (HOCl)**, güçlü bir serbest radikal olmamasına karşın iyi bir oksidasyon ve klorlama ajanıdır. Metabolizmada klorohidrin molekülü oluşturarak hücre membranına zarar verir ve lizis ve hücre ölümüne sebep olabilir.

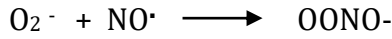
➤ **Ozon (O₃)**, *in-vivo* ortamda üretilmemekte olup atmosferde bulunan zararlı güneş ışınlarına karşı bir kalkan görevi görür. Biyomolekülleri doğrudan ya da serbest radikaller aracılığı ile oksidasyon ya da peroksidasyona uğrattığı bilinmektedir.

➤ **Nitrikoksit (NO•)**, nörotransmisyon, kan basıncı regülasyonu, savunma mekanizmaları, düz kas gevşemesi ve bağışıklık düzenleme gibi çok çeşitli fizyolojik süreçlerde oksitleyici özellik gösteren önemli bir biyolojik sinyal molekülüdür. Ancak hem su hem de lipit ortamında çözünebilmesi sebebi ile sitoplazma ve plazma

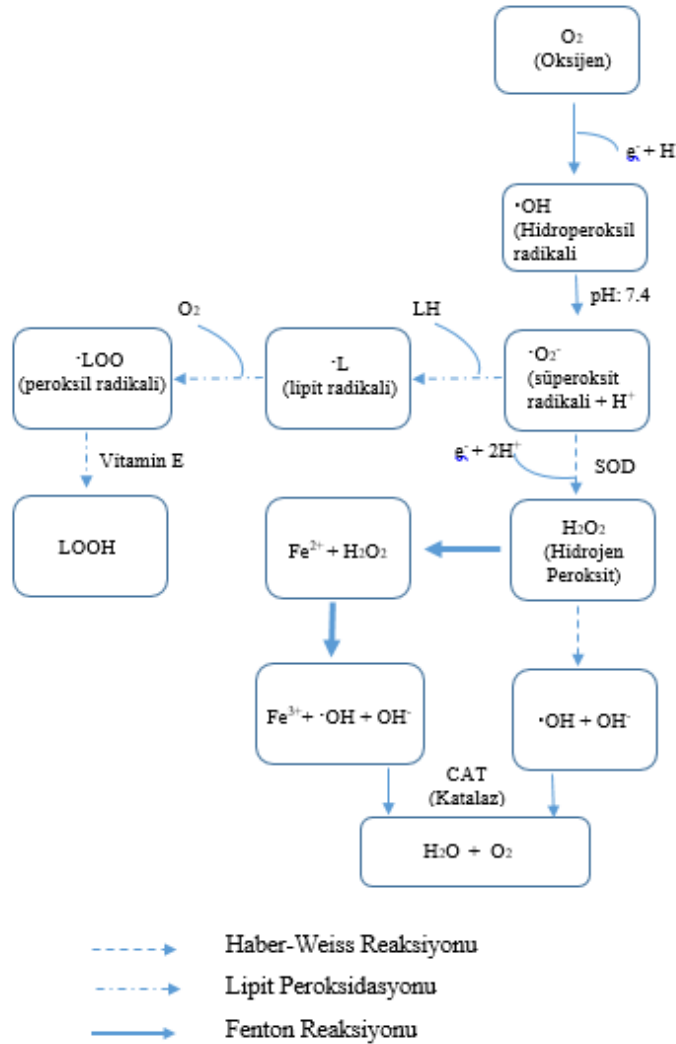
membranlarından kolayca difüze olmakta ve merkezi sinir sistemini etkileyebilmektedir.

➤ **Azotdioksit (NO₂)**, hava kirliliği ve sigara dumanı sebebi ile oluşan peroksil radikali ile azotmonooksitin reaksiyonu ile meydana gelir. Bu molekül serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır.

➤ **Peroksinitrit (OONO⁻)**, nitrikoksit ve süperoksit anyonunun reaksiyonu ile meydana gelir.



Düşük konsantrasyonlu lipoprotein (LDL) oksidasyonu ve doku tahribatına neden olan sitotoksik bir türdür.

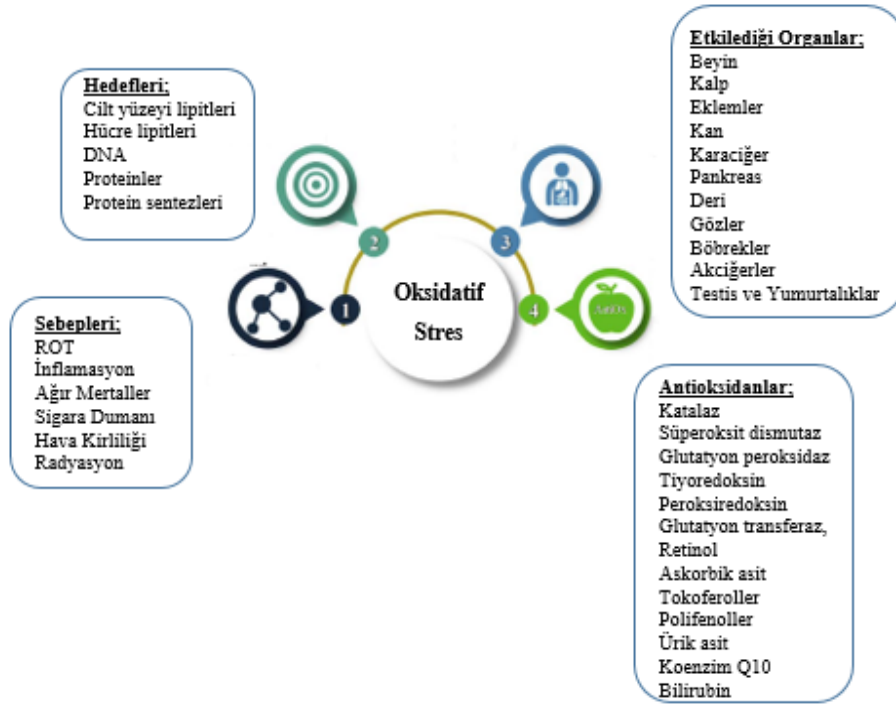


Şekil 2.1 Çeşitli reaksiyonlarla ROT oluşumu (Neha vd., 2019)

2.2 Oksidatif Stres

Güçlü reaktif özellikleri ile bilinen serbest radikaller tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşirler. Hücrenin savunma mekanizmaları aracılığı ile etkileri ortadan kaldırılmazsa biyolojik moleküller ile reaksiyona girerek yeni radikalik türlerin oluştuğu zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Normal biyolojik süreçler çerçevesinde organizma patolojik süreçlerde üretilen serbest radikalleri doğal savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırır ve böylece ROT'ların oluşumu antioksidan savunma sistemleri tarafından engellenir. Ancak bazen serbest radikallere dönüşen toksinler, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Bu aşamada hücrede antioksidan-serbest radikal dengesinin radikaller tarafına kayması ile '**Oksidatif Stres**' meydana gelir.

Kalp damar hastalıkları, diyabet, sindirim sistemi bozuklukları, astım, tansiyon ve kanser gibi birçok hastalığın meydana gelmesinde hücresel hasara yol açan oksidatif stresin etkili olduğu bilinmektedir (Şekil 2.2) (Nijhawana vd., 2019; Sarangarajan vd., 2017).



Şekil 2.2 Oksidatif Stresin sebepleri, hedef molekülleri, etkilediği organlar ve oksidatif strese karşı koyan antioksidanlar (Carochoa vd., 2018)

Hücrede oksidatif stresin etkisi ile lipid peroksidasyonu, DNA ve protein oksidasyonu reaksiyonları meydana gelmektedir.

Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin polialkil zincirindeki metilen karbonundan bir $\cdot\text{OH}$ aracılığı ile hidrojen koparılması ile başlamaktadır.

Eşleşmemiş elektronlara sahip olan yağ asidi aerobik koşullarda O_2 ile reaksiyona girerek peroksil radikallerini oluşturur ve oluşan bu ürün diğer peroksil radikalleri ve membran proteinlerine karşı son derece reaktif özellik göstermektedir. Bu radikaller bir diğer yağ asidinden hidrojen kopararak lipit hidroperoksitler oluşturmak suretiyle zincir lipit peroksidasyonunu indüklemektedir. Lipit peroksidasyonu sonucu oldukça reaktif bir tür olan malondialdehit (MDA) meydana gelir. Oluşan MDA; protein, nükleik asit ve fosfolipitlerin serbest amino grupları ile reaksiyona girerek immün sistemde aksamalara ve çeşitli otoimmün yanıtların oluşmasına sebep olur (Tablo 2.2) (Gate vd., 1999).

Tablo 2.2 Lipit peroksidasyon mekanizması

Başlangıç:	$LH + \cdot OH \longrightarrow L\cdot + H_2O$
Yayılma:	$L\cdot + O_2 \longrightarrow LOO\cdot$ $LOO\cdot + LH \longrightarrow LOOH + L\cdot$
Hidroperoksitlerin ayrışması ile MDA oluşumu	$LOOH \longrightarrow LOO\cdot \longrightarrow MDA$

LH: Çoklu doymamış yağ asidi, L·: alkil radikal, LOOH: lipit hidroperoksit, LO·: alkil radikal

DNA oksidasyonunda guanin bazının ·OH ile oksidasyonundan oluşan 8-hidroksi-2-deoksigunaozin (8-OHdG) DNA molekülünü değiştirir ve mutajenez ve karsinogeneze yol açar.

Protein oksidasyonunda ise hipoklorik asit gibi oksidatif moleküller metal katalizli oksidatif reaksiyonlarda tirozin amino asidini 3-klorotirozine, histidin amino asidini 2-oksohistidine dönüştürür. Bu dönüşüm sinyal iletim sistemleri, taşıma mekanizması ve enzim aktivitelerinde istenmeyen değişimlere neden olur.

2.3 Antioksidanlar

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda bile serbest radikalleri yakalayarak ya da oksidatif reaksiyonları önleyerek oksidatif strese neden olan reaktif türlerin etkisini yok eden moleküllerdir (Sarangarajan vd., 2017). Bu moleküller serbest radikallerin etkilerini;

- Peroksidasyonu başlatan türleri yakalayarak,
- Reaktif türleri üreten ya da peroksitleri parçalayan metal iyonlarını şelatlayarak,
- Peroksitlerin oluşumunu engellemek üzere ortamdaki ·O₂·'leri yakalayarak,
- Otoksidatif zincir reaksiyonlarını kırarak ya da
- Mevcut O₂ konsantrasyonunu azaltarak gidermektedir (Oroian ve Escriche, 2015).

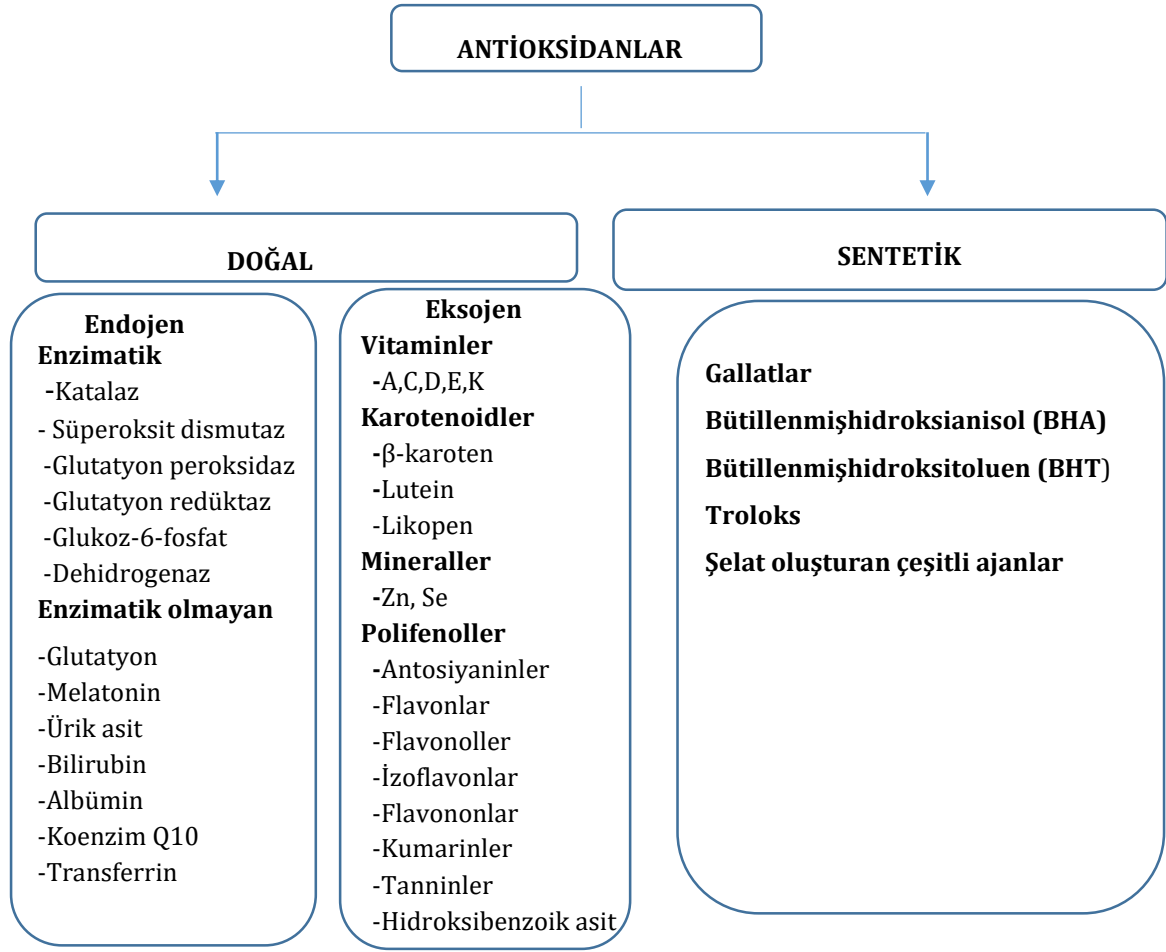
İnsanlar önemli bir metabolizma düzenleyicisi olan antioksidanları endojen olarak vücutlarında sentezledikleri gibi eksojen olarak gıdalar aracılığı ile dışardan da alabilmektedir (Hamlaoui vd., 2018). Son yıllarda özellikle besinler aracılığı ile alınması için antioksidanların diyetle eklenmesi önem kazanmıştır. Antioksidan özellikli gıdalara bakıldığında çilek, kiraz, narenciye, kivi, kuru erik gibi birçok

meyve ile zeytin, domates, ıspanak, bakliyatlar, soğan, sarımsak, zeytin yağı, biberiye, zerdeçal, kekik gibi sayısız farklı türü saymak mümkündür (Moure vd., 2001). Bu gıdaların içerdikleri fenol, polifenol, vitamin, karoten, flavonoid gibi birçok molekülün antioksidan özelliklerine etki ettiği bilinmektedir.

Oksidasyonu engelleme ve durdurma yetenekleri sebebi ile özellikle gıda endüstrisinde hem doğal kaynaklardan elde edilen hem de sentetik olarak üretilen antioksidan türlerin kullanımı oldukça yaygındır. Gıdaların işlenmesi, paketlenmesi ve depolanması sırasında meydana gelebilecek istenmeyen tat, aroma, tekstür ve renk değişikliklerinin önlenmesinin yanında besin değerinin de bu süreçlerden etkilenmemesi için antioksidanların kullanımı kaçınılmaz olmuştur.

2.3.1 Antioksidanların Sınıflandırılması

Sağladıkları faydalar sebebi ile uzun yıllardır araştırmalara konu olan antioksidanları çeşitli şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Temel olarak antioksidanlar Doğal ve Sentetik Antioksidanlar olmak üzere iki ana sınıfta incelenebilir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 Antioksidanların sınıflandırılması (Carocho vd., 2013; Mironczuk-Chodakowska vd., 2017; Ighodaro ve Akinloye, 2018; Shahidi ve Ambigaipalan, 2015)

2.3.1.1 Doğal Antioksidanlar

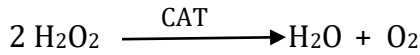
Doğal antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere iki sınıfta incelenirler. Endojen antioksidanlar ROT'lerine karşı güçlü ve sürekli bir önlem sağlayamadığında organizma eksojen antioksidanlara ihtiyaç duymaktadır. Eksojen antioksidanlar, antioksidan aktiviteyi sağlayan molekülleri içeren besin takviyeleri ya da farmasötiklerdir (Brewer, 2011).

a)Endojen Antioksidanlar

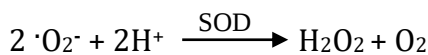
Metabolizmada üretilebilen endojen antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilirler.

➤**Enzimatik Antioksidanlar**, metabolizmada enzimatik savunma hattını oluştururlar.

Katalaz (CAT) (EC 1.11.1.6): birer ferriprotoporfirin içeren her biri 60 kDa'lık dört alt birimden oluşan 240 kDa tetramerik bir proteindir. Temel olarak peroksizomlarda bulunan bu enzimin memelilerde mitokondri ve endoplazmik retikulumlarda bulunmadığı bilinmektedir. Neredeyse oksijen kullanan tüm dokularda yaygın olarak bulunan bu enzim kofaktör olarak demir ya da mangan kullanır. Özellikle süperoksit dismutaz (SOD) tarafından oluşturulan ve bir radikal olmamasına rağmen metal iyonları varlığında tehlikeli radikalik türleri meydana getiren H₂O₂'nin su ve moleküler oksijene parçalanması reaksiyonunu katalize eder (Ighodaro ve Akinloye, 2018).

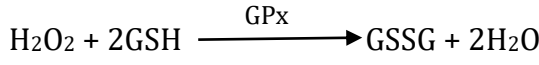


Süperoksit dismutaz (SOD) (EC 1.15.1.1): hücredeki ROT'ne karşı oluşturulan savunma hattının ilk bileşeni olan en güçlü antioksidandır. Metaloenzim sınıfında olan SOD aktivitesi için kofaktör olarak demir, çinko, bakır ve mangan içerebilir. Taşıdığı kofaktör çeşitine göre sınıflandırılan enzimin demir içeren türevi Fe-SOD, prokaryotlarda ve bazı bitki kloroplastlarında; Mn-SOD, prokaryotlarda ve ökaryot mitokondrilerinde; Cu/Zn-SOD ise temel olarak ökaryotlarda sitoplazmada bulunurken bir miktar da kloroplast ve peroksizomlarda konumlanmıştır (Ighodaro ve Akinloye, 2018). Bu enzim ROT'den süperoksit radikalini ($\cdot\text{O}_2^-$) hidrojen peroksit (H₂O₂) ve moleküler oksijene (O₂) katalize etmekte görev alır (Chafik vd., 2019). Oluşan H₂O₂ daha sonra diğer enzimatik savunma sistemleri tarafından ortamdan uzaklaştırılır.

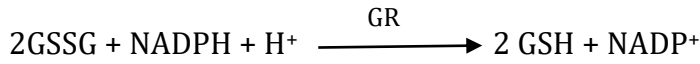


Glutatyon Peroksidaz (GPx) (EC 1.11.1.9): temel olarak hücre sitoplazmasında ve mitokondrisinde buluna bu enzim H₂O₂ ve lipid hidroperoksitleri metabolize ederek hücrede hasara sebep olabilecek türlerin oluşumunu engeller. Elektron kaynağı

olarak glutatyonu (GSH) kullanır. Bu enzimin aktif bölgesinde bir mikrobesein kofaktörü olan Selenyum (Se) içeren türü (Se-GPx), H₂O₂ ve organik hiperoksitlere karşı etkili iken Se içermeyen bir diğeri türü (GST) ise daha çok organik hidroperoksitlere karşı etkilidir.

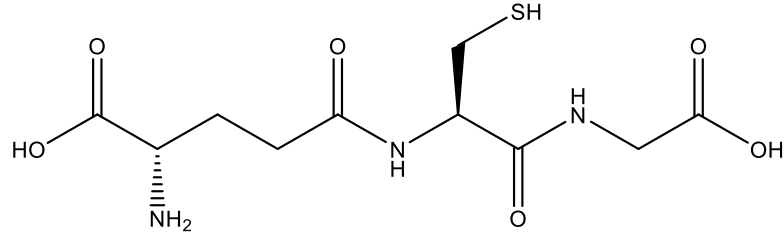


Glutasyon Redüktaz (GR) (EC 1.6.4.2): enzimi GPx tarafından oluşturulan okside glutatyonu (GSSG) NADPH kullanarak tekrar Glutasyona (GSH) dönüştürür. İndirgenmiş form ROT'nin hücresel kontrolünde anahtar rol oynar (Farina ve Aschner, 2019).



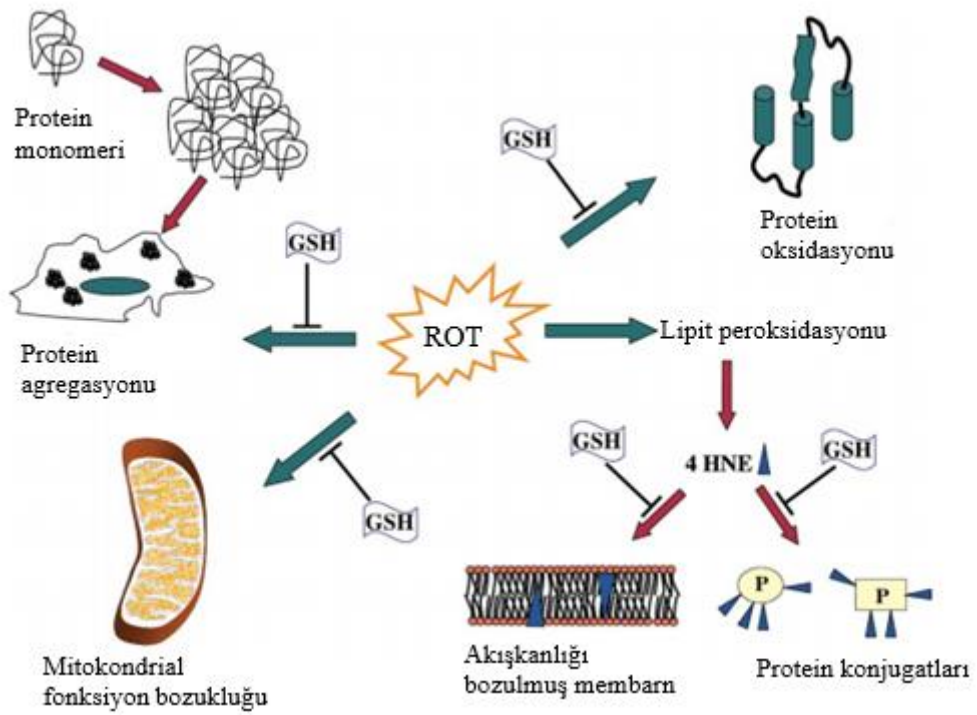
➤ **Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**, glutasyon, melatonin, ürik asit, bilirubin, albümin, koenzim Q10 gibi türlerdir.

Glutasyon (GSH): hidrojen ya da elektron vericisi olarak hücreyi serbest radikal etkilerinden koruyan endojen bir tripeptittir (Carocho vd., 2013). Hücrede milimolar konsantrasyonlarda bulunan GSH (Şekil 2.4) önemli bir sülfidril antioksidandır (Farina ve Aschner, 2019). Normal hücresel koşullarda indirgenmiş formda bulunan bu düzenleyici molekül çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondrilerde dağılmış haldedir. Kırmızı kan hücrelerinin % 99 oranında glutasyon içerdiği bilinirken bu oran kan plazmasında % 1 dir (Mironczuk-Chodakowska vd., 2017). Glutasyonilasyon olarak bilinen bir süreç ile proteinlere kovalent bağlanarak hücresel savunma sisteminin sayısız enziminin koenzimi olarak görev alır. Doğrudan serbest radikal yakalama etkisi göstermenin yanı sıra hidrojen peroksit, lipid hidroperoksit ve elektrofilik bileşenlerin detoksifikasyonunda GPx gibi enzimlerin substratı da olabilir (Masella vd., 2005). Yapısındaki tiyol grupları sayesinde hem ksenobiyotikler hem de endojen oksidanların zararlı etkilerini azaltır.



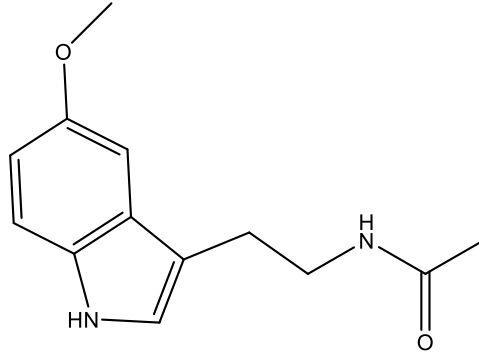
Şekil 2.4 Glutatyon'un kimyasal yapısı (Masella vd., 2005).

Şekil 2.5'te glutatyonun ROT'nin meydana getirdiği çeşitli etkileri nasıl giderdiği şematize edilmiştir.



Şekil 2.5 Glutatyonun antioksidan etkilerinin şematik gösterimi (Bharath vd., 2002)

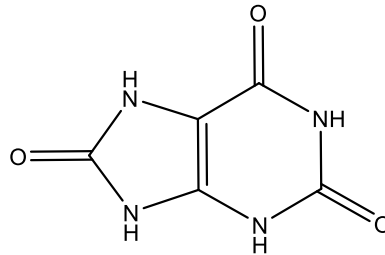
Melatonin (*N-asetil-5-metoksitriptamin*); peroksil ve hidroksil radikallerinin nötralizasyonunu sağlayan etkili bir ROS yakalayıcısıdır. İlk kez epifiz bezinin bir salgı ürünü olarak keşfedilen melatonin (Şekil 2.6) (Pang vd., 2018), GPx, SOD gibi enzimatik antioksidanları aktive eder ve oksidatif stres sırasında katalaz aktivitesinin düşmesini engeller (Özdiñ vd., 2016).



Şekil 2.6 Melatonin'in kimyasal yapısı (Pang vd., 2018)

Melatonin, oksidatif fosforilasyon etkinliğini arttıran, ROT'ni detoksifiye eden, pro-inflamatuvar stokinleri azaltan, hücre membranını stabilize eden, antioksidan enzimleri uyaran önemli mekanizmaları barındırmaktadır (Reiter, 2003).

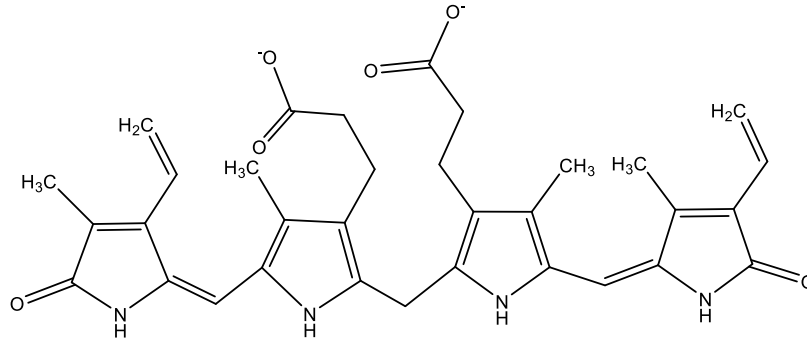
Ürik asit: insanlarda purin nükleotid metabolizmasının son ürünüdür. Böbrek filtrasyonundan sonra ürik asidin %90'ı vücutta kullanılmak üzere geri emilir. Ürik asidin (Şekil 2.7) hemoglobinin peroksitlerle reaksiyonu sonucu oluşan okso-hem oksidanlarının aşırı üretimini önlediği bilinmektedir. Ayrıca güçlü bir hidroksil radikal ve singlet oksijen yakalayıcı olarak bilinen ürik asit, peroksidasyon yoluyla eritrositlerin de parçalanmasını önler (Carocho vd., 2013). Yoğun fiziksel egzersiz sırasında oluşan oksidatif stres etkilerini azaltma konusunda anahtar rol oynadığı bilinmektedir (Mironczuk-Chodakowska vd., 2017).



Şekil 2.7 Ürik Asit'in kimyasal yapısı (Carocho vd., 2013)

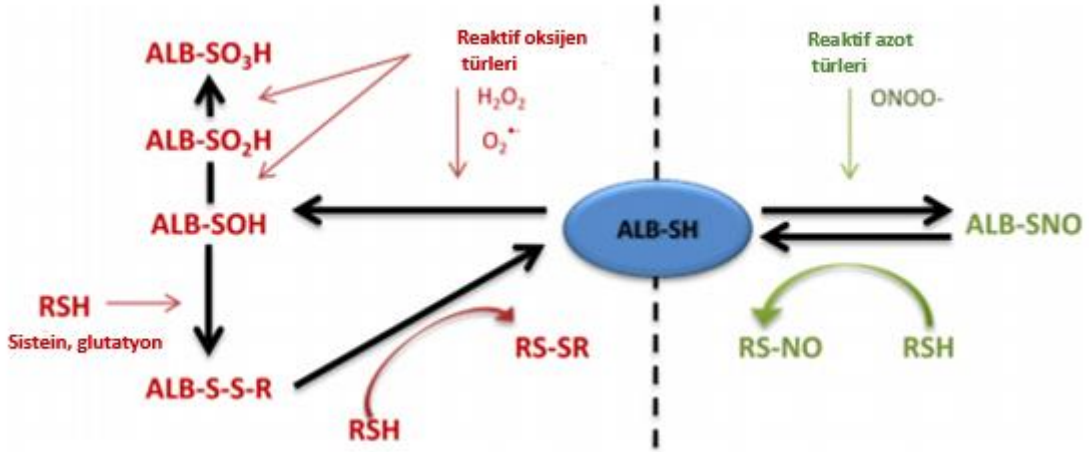
Bilirubin: başlıca hemoglobin olmak üzere mononükleer fagosit sistemin oluşturduğu diğer hem proteinlerinin bir bozunma ürünüdür. Eritrositlerin çözünmesinin ardından hemoglobinin hem kalıntısı parçalanarak hem-oksijenaz aracılığı ile biliverdin meydana getirir ve daha sonra biliverdin-redüktaz biliverdini indirger. Bu süreçle oluşan bilirubinin (Şekil 2.8) özellikle sulu lipid tabakaları gibi

polar ortamlarda peroksil radikalinin zararlı etkisi üzerine antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir. Genel olarak albümine bağlı 1 mol bilirubinin 2 mol serbest hidrojen peroksit radikalini yok eder (Yao vd., 2019). Bazı karaciğer hastalıklarında safranın tıkanması ile kanda bilirubin seviyesinin arttığı görülmektedir, bu nedenle bilirubin seviyesi karaciğer fonksiyonu için bir belirteç görevi üstlenmektedir (Mironczuk-Chodakowska vd., 2017).



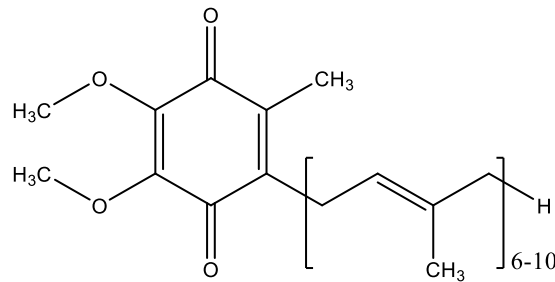
Şekil 2.8 Bilirubin'in kimyasal yapısı (Yao vd., 2019).

Albümin (ALB); metabolizmada birçok önemli fonksiyona sahiptir ve başlıca görevi farklı vücut bölgeleri arasındaki sıvı dengesini sağlayarak ozmatik basıncı düzenlemektir (Mironczuk-Chodakowska vd., 2017). Ayrıca, metal iyonları, yağ asitleri, bilirubin ve ilaçlar gibi küçük metabolitleri taşıyabilmektedir. Temel molekül bağlama ve taşıma görevlerinin yanında metabolizmada meydana gelen oksidatif stres üzerine antioksidan etki göstermektedir. Plazmada oksidatif strese bağlı meydana gelen molekülleri bağlayarak zararlı etkilerini yok eder (Şekil 2.9) (Rondeau ve Bourdon, 2011).



Şekil 2.9 Albüminin antioksidan mekanizması (Mironczuk-Chodakowska vd., 2018)

Koenzim Q10; solunum zincirinde ve bazı hücrel metabolizma olaylarında rol oynayan tüm hücre ve membranlarda bulunan önemli bir yapıdır. Ubikinon ya da ubikinol olarak da bilinen bu molekül (Şekil 2.10) lipit peroksil radikallerinin oluşumunu önleyerek antioksidan etki göstermektedir. Metabolizmadaki bir diğer önemli işlevinin de E vitamini yenileme özelliği olduğu bilinmektedir (Carocho vd., 2013). Ubisemikuinon (CoQ10H) olarak bilinen radikalik formu moleküler oksijen ve diğer serbest radikaller ile reaksiyona girerek antioksidan etki gösterir. Buna ek olarak yükseltgenmiş α -tokoferölü indirgeyerek antioksidan savunmaya katkı sağlayabilmektedir. Sağlıklı bireylerde kandaki Koenzim Q10 miktarı 0.50-1.91 $\mu\text{mol/L}$ olmalıdır ve miktarının azalması hipertansiyon, koroner arter hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi istenmeyen durumlarla ilişkilendirilmektedir (Mironczuk-Chodakowska vd., 2017).



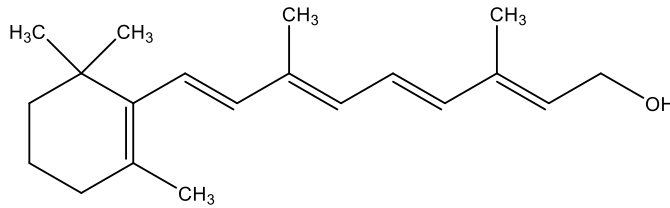
Şekil 2.10 Koenzim Q10'in kimyasal yapısı (Carocho vd., 2013)

b)Eksojen Antioksidanlar

Eksojen antioksidanlar grubu başlıca vitaminler, karotenoidler, mineraller ve polifenollerini içermektedir.

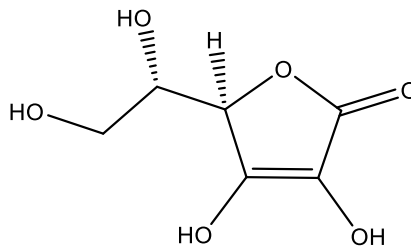
➤**Vitaminler;** Antioksidan özellik gösteren vitaminlerin başında A, C ve E vitaminleri gelmektedir.

A Vitamini (Retinol); diyetle dahil edilmesi gereken önemli vitamin türlerindedir. Yağda çözünen vitaminin (Şekil 2.11) eksikliği ve gelişmede aksaklıklara ve çeşitli görme bozukluklarına neden olabilir. Başlıca besin kaynakları süt, karaciğer, balık, turuncu ve sarı meyve ve sebzeler, yeşilliklerdir (Eggersdorfer ve Wyss, 2018). Kemik gelişiminde etkili olduğu, bağırsak ortamının normal şartlarının korunmasını sağladığı, güçlü bir bağışıklığın oluşumuna katkı sağladığı ve antioksidan fonksiyonlara destek olduğu bilinmektedir (Liang vd., 2019).



Şekil 2.11 A Vitamini (Retinol)'ün kimyasal yapısı (Liang vd., 2019)

C Vitamini (Askorbik Asit); insan diyetinde önemli bir yer kaplayan suda çözünen esansiyel besinler arasındadır, eksikliğinde diş eti kanaması ve skorbit gibi hastalıklar görülmektedir. Prolin hidroksilasyonunda önemli bir kofaktör olan askorbik asit (Şekil 2.12) sulu çözeltilerde güçlü bir indirgeme ajanıdır (Ballaz ve Rebec, 2019). Bu özelliği ile reaktif oksijen ve reaktif azot türlerini yakalama kapasitelerinin yüksek olduğu bilinmektedir (Oroian ve Escriche, 2015).

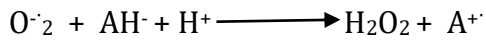
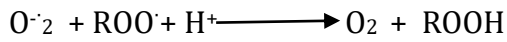


Şekil 2.12 Askorbik Asit'in kimyasal yapısı (Oroian ve Escriche, 2015)

1986 yılında Benedich ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar ile antioksidan aktivite mekanizması açıklanan bu asidik vitaminin nötral pH'ta askorbat anyonu (AH⁻) olarak bulunduğu bilinmektedir. Bu bileşik dehidroaskorbik asit (A) ve askorbil radikalinin (A[•]) oluştuğu geri dönüşümlü bir reaksiyona uğrar. Askorbil radikali reaktif özellik göstermemekle beraber diğer serbest radikallerle reaksiyona girebilir ve serbest radikal reaksiyonlarının yayılmasını durdurabilir (Benedich, 1986).

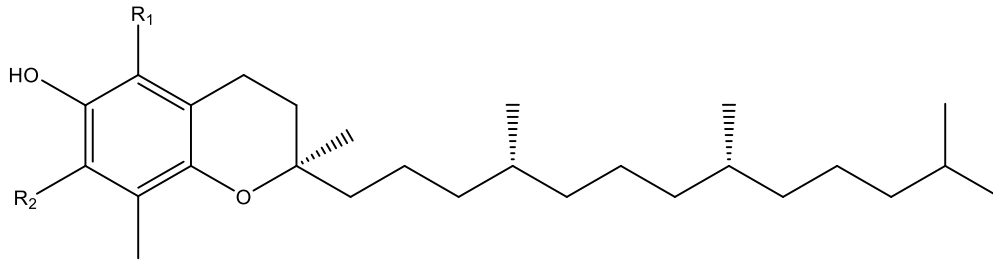


Askorbik asitin peroksil radikalleri üzerine etkisi ise aşağıdaki reaksiyon dizisi ile açıklanmıştır.



E Vitamini; tüm biyolojik aktif tokoferoller, tokotrienoller ve onların çeşitli türevlerini kapsayan önemli bir türdür. Çokça gıdaya katkı besin maddesi olarak eklenmesinin yanında şampuan ve cilt ürünlerinde de kullanılan E vitaminin sayısız faydalarından birisi de antioksidan özellik taşımasıdır (Vrolijk vd., 2015).

E vitamini dört adet tokoferol ve 4 adet tokotrienolden oluşmakta (Şekil 2.13) ve antioksidan özelliğini peroksil radikal yakalama reaksiyonlarında zincir kırma reaksiyonlarında göstermektedir. Özellikle hücre membranlarını reaktif oksijen türleri ve lipit peroksidasyonundan korumaktadır. Bu işlevi sayesinde önemli bir anti-kanser ajanı olduğu bilinmektedir (Dipasquale vd., 2020).

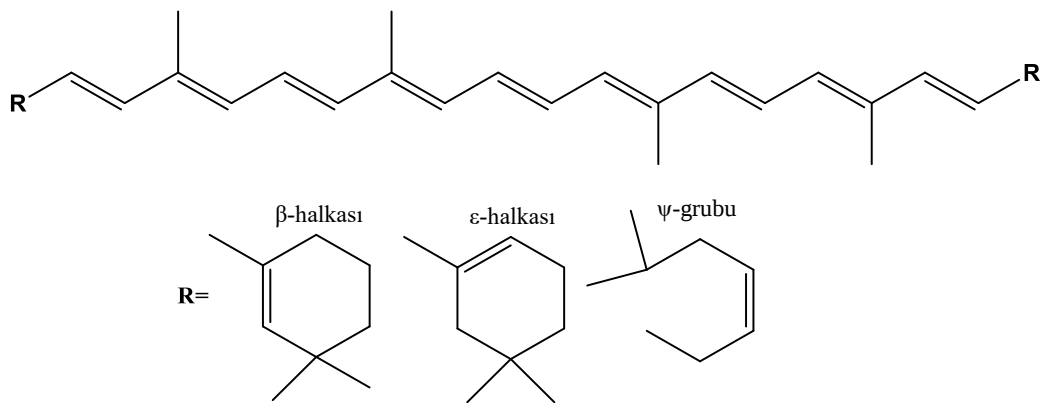


Tokoferol Çeşiti	R ₁	R ₂
α-tokoferol	CH ₃	CH ₃
β-tokoferol	CH ₃	H
γ-tokoferol	H	CH ₃
δ-tokoferol	H	H

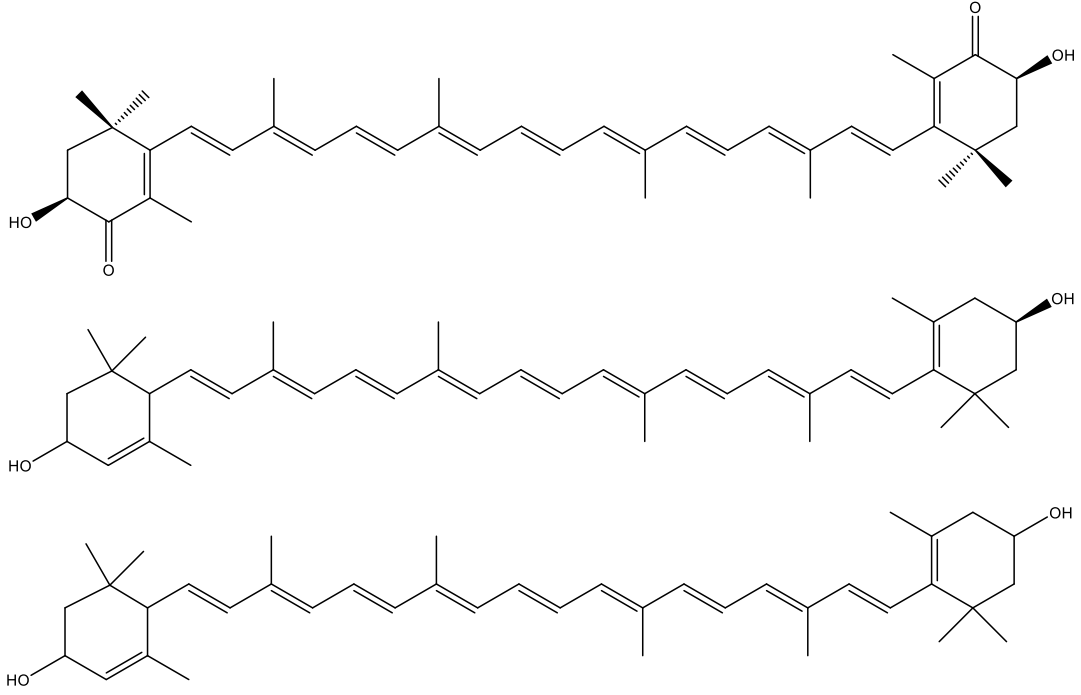
Şekil 2.13 Çeşitli tokoferol türevlerinin kimyasal yapısı (Dipasquale vd., 2020)

➤ **Karotenoidler;** karotenler ve ksantofiller olmak üzere iki ana grupta incelenen yağda çözünen doğal pigmentlerdir (Ribeiro vd., 2018). Yaklaşık 600 farklı karotenid olduğu bilinmekle beraber temel karoten yapıları Şekil 2.14'te gösterilmiştir (Kirschweng vd., 2017).

Karoten grubun en önemli temsilcileri likopen, α-, β-, γ-, δ-karoten, fitofluen ve torulen (Kirschweng vd., 2017); ksantofil grubunun ise lutein, zeaksantin, astaksantin ve kantaksantindir (Şekil 2.15) (Ribeiro vd., 2018).



Şekil 2.14 Temel karotenlerin kimyasal yapısı (Kirschweng vd., 2017)



Şekil 2.15 Temel ksantofillerin kimyasal yapısı (Kirschweng vd., 2017)

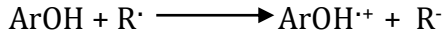
Karoteinoidler besinler aracılığı ile alındıklarında karotenoid miktarı, oksijen basıncı ve diğer antioksidanların miktarlarına bağlı olarak çeşitli ROT ve RNT ile reaksiyona girmektedirler. Bir A vitamini öncülü olan β -karotenin singlet oksijen etkisini azaltan ve lipit oksidasyonunu önleyen en güçlü antioksidanlardan olduğu bilinmekle beraber likopenin de peroksil yakalama aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür (Oroian ve Escriche, 2015).

►**Polifenoller;** hidroksibenzoikasitler, hidroksisinamik asitler, antosiyaninler, proantosiyanidinler, flavonlar, flavonoller, flavanonlar, izoflavonlar, stilbenler, tanninler, ligninler gibi çok çeşitli bileşik grubundan oluşan bir sınıftır. Meyve ve sebzelerde, çay, çikolata ve kakolu ürünlerde bolca bulunduğu bilinen fenolik bileşiklerin yaklaşık 8000 farklı çeşidi olduğu bilinmektedir (Masella vd., 2005; Oroian ve Escriche, 2015). Yapılan çalışmalar polifenol alımının kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve nörodejeneratif hastalıkların riskini azalttığını göstermektedir (Cong vd., 2017). Bu yararlı etkilerini oksidatif stres koşullarına karşı koyarak gösterdikleri de bilinmektedir (Lagha-Benamrouche ve Madani, 2013; Masella vd., 2005; Xi, 2014).

Polifenollerin antioksidan aktivite mekanizmaları incelenecek olursa; öncelikle elektron aktarımı yolu ile serbest radikalleri etkisiz hale getirirler. Hidrojen atomu transfer mekanizmasına bağlı olarak antioksidan bileşik, radikale hidrojen aktarımı yapar.

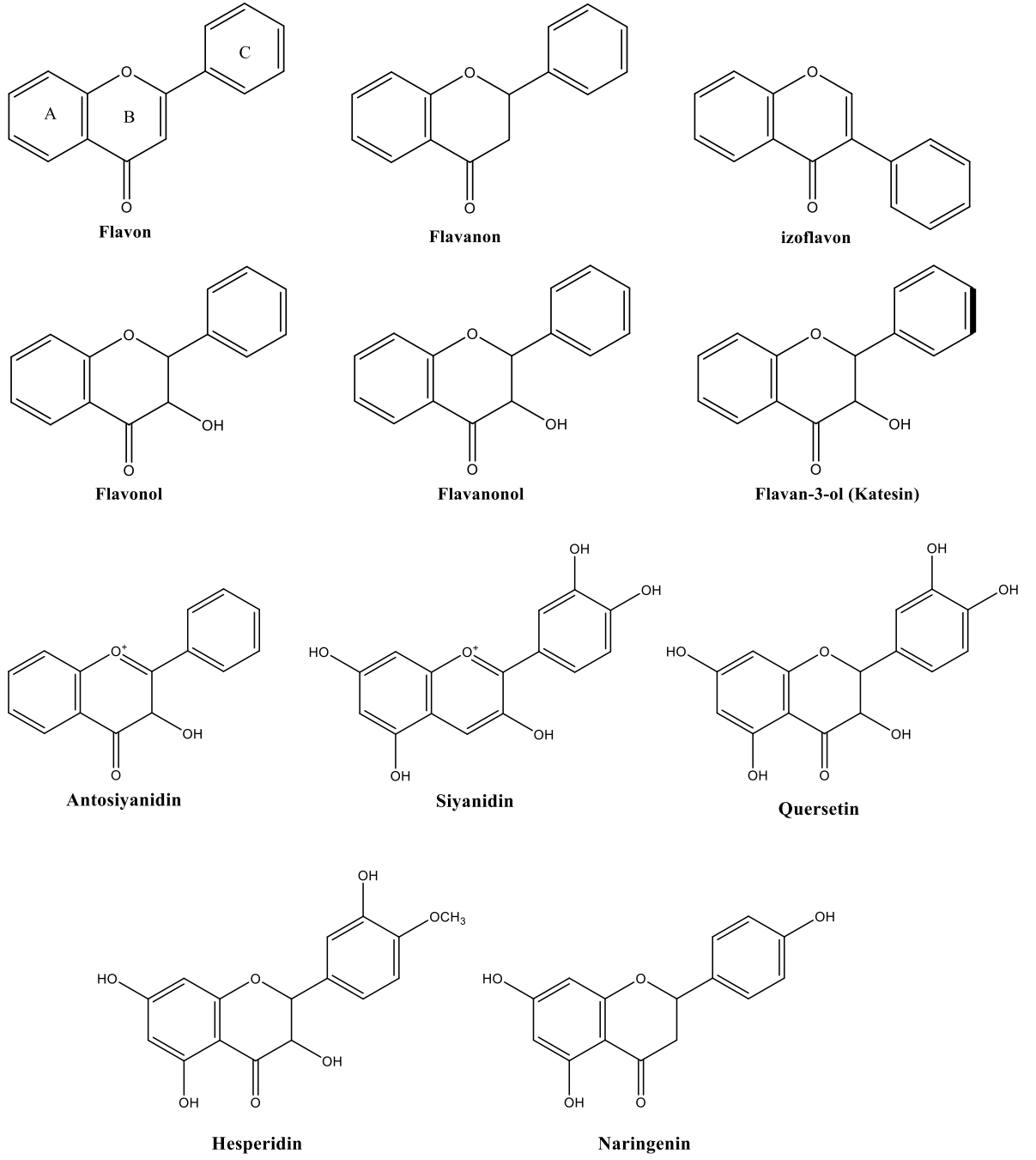


Bir diğer mekanizmada oksidanın antioksidana elektron aktarımı yapması söz konusudur.



Her iki mekanizmanın ürünlerine bakıldığında reaktif olmayan yapıların (RH), oksitlenmiş radikal türlerinin ($\text{ArO}^\cdot$), kation radikallerinin ($\text{ArOH}^{\cdot+}$) ve enerji olarak kararlı (R^-) türlerin oluştuğu görülmektedir (Leopaldini vd., 2011; Oroian ve Escriche, 2015; Olszowy, 2019). Polifenollerin kimyasal yapılarına bakıldığında sahip oldukları halka yapısındaki hidroksil gruplarının sayısı ve yerleşim yerlerinin antioksidan kapasite yeteneklerini etkilediği bilinmektedir. Özellikle *orto*-pozisyonundaki hidroksil gruplarının radikal nötralizasyonundan sonra oluşan bileşiklerin kararlılığına etkisi büyüktür (Cuvelier vd., 1992). Ayrıca artan hidroksil grubu sayısının da antioksidan kapasite ile doğru orantılı olduğu bilinmektedir.

Polifenoller flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olarak iki ana grupta incelemek mümkündür. Flavonoid grubu; flavonoller, flavononlar, flavonlar, flavanoller, flavanonlar, antosiyanidinler ve izoflavonoidleri içerirken, flavonoid olmayanlar ise hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinamik asit türleri, stilbenler, kumarinler, lignanlar ve tanninleri içermektedir. Polifenollerin önemli bir sınıfı olan flavonoidler genellikle flavan adı verilen iki aromatik halkadan oluşmuş bir merkez (A ve B) ile bu merkeze bağlı bir piran halkası (C) içermektedir (Şekil 2.16). Flavonoidler B halkasının farklı kimyasal yapılarda olmasına ilişkin flavononlar, flavonlar, flavonoller gibi farklı şekillerde çeşitlenmektedir (Debelo vd., 2019; Shahidi ve Ambigaipalan, 2015).

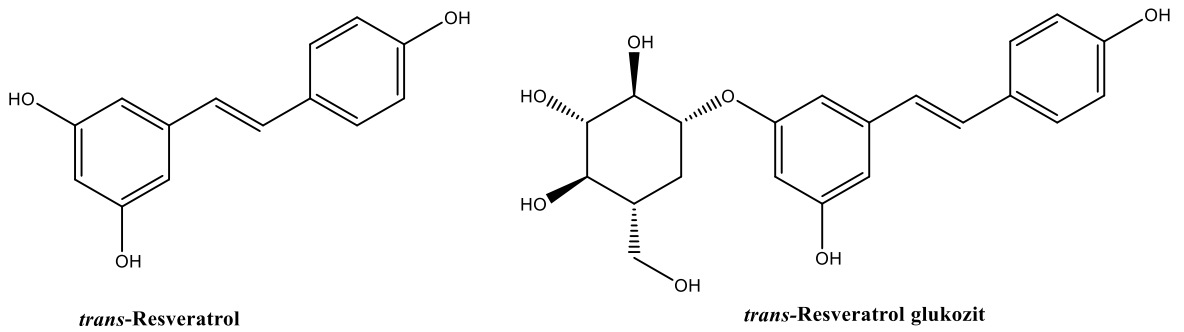


Şekil 2.16 Bazı flavonoidlerin kimyasal yapıları (Shahidi ve Ambigaipalan 2015)

Flavonoid olmayan grupta fenolik asitler sınıfı çok çeşitli görevler üstlenen biyoaktif bileşiklerden meydana gelir. Çoğu insan diyetinin ayrılmaz parçasıdır ve tıbbi preparatlar olarak da kullanılmaktadır. Bitkilerde özellikle bu gruba ait hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinamik asit türleri yaygındır. En yaygın sinamik asitlerden olan *p*-kumarik, kafeik ve ferulik asitler basit kuinik asit ya da glukoz esterleri olarak gıdalarda bulunurlar. Fenolik asitler yapılarında bulunan reaktif fenol halkaları

sebebi ile antioksidan özellik göstermektedir. Antioksidan özellikleri için genellikle hidrojen verici ya da radikal süpürücü etkiler taşımaktadırlar (Shadidi and Wanasundara, 1992).

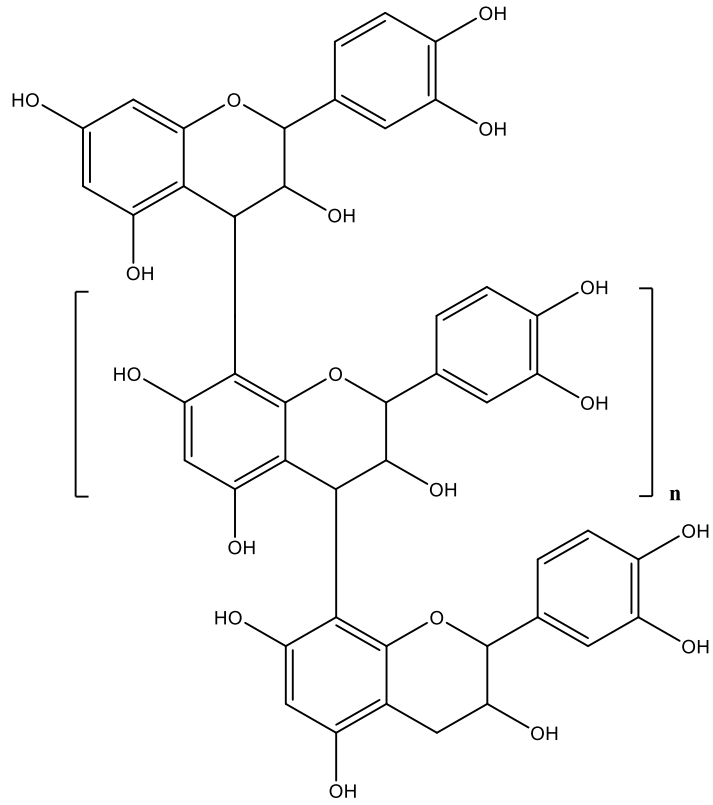
Stilbenler olarak bilinen grup ise özellikle antioksidatif, antikanserojenik ve antitümör özellikler taşımaktadır. Diyetle alınan en önemli stilben türevlerinden olan resveratrol kırmızı şarap ve fıstıkta bolca bulunurken daha az miktarlarda kırmızilahana, çilek, ıspanak ve bazı otlarda da bulunur. Özellikle *trans*-resveratrol (Şekil 2.17) bileşiğinin, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hayvansal hastalıkları geciktirme ve engelleme yeteneği sebebi ile büyük ilgi görmektedir.



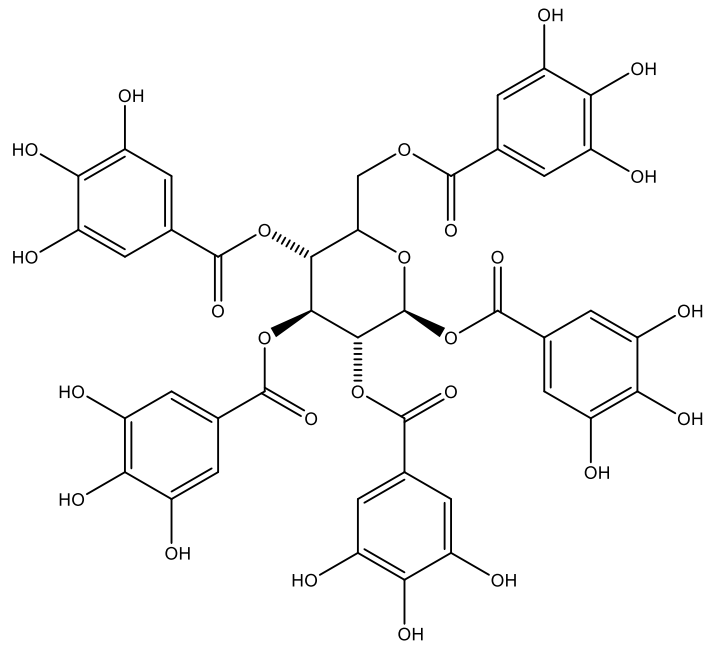
Şekil 2.17 *Trans*-resveratrol ve *trans*-resveratrol glukozit kimyasal yapıları (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015)

Tanninler yapılarına göre kondense ve hidroliz edilebilir tanninler (Şekil 2.18) olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Kondense tanninler özellikle oligomerler ve flavan-3-ols gibi flavonoid polimerleri iken hidroliz edilebilir tanninler glikolize gallik asit türevleridir. Tanninlerin lipid peroksidasyonunu ve *in-vitro* lipoksijenazları inhibe ettiği ayrıca hidroksil, superoksit ve peroksil gibi hücrel pooksidan radikalleri yakalama etkisi gösterdiği bilinmektedir.

Bazı önemli doğal antioksidanların etki mekanizmaları Şekil 2.19'da gösterilmiştir.

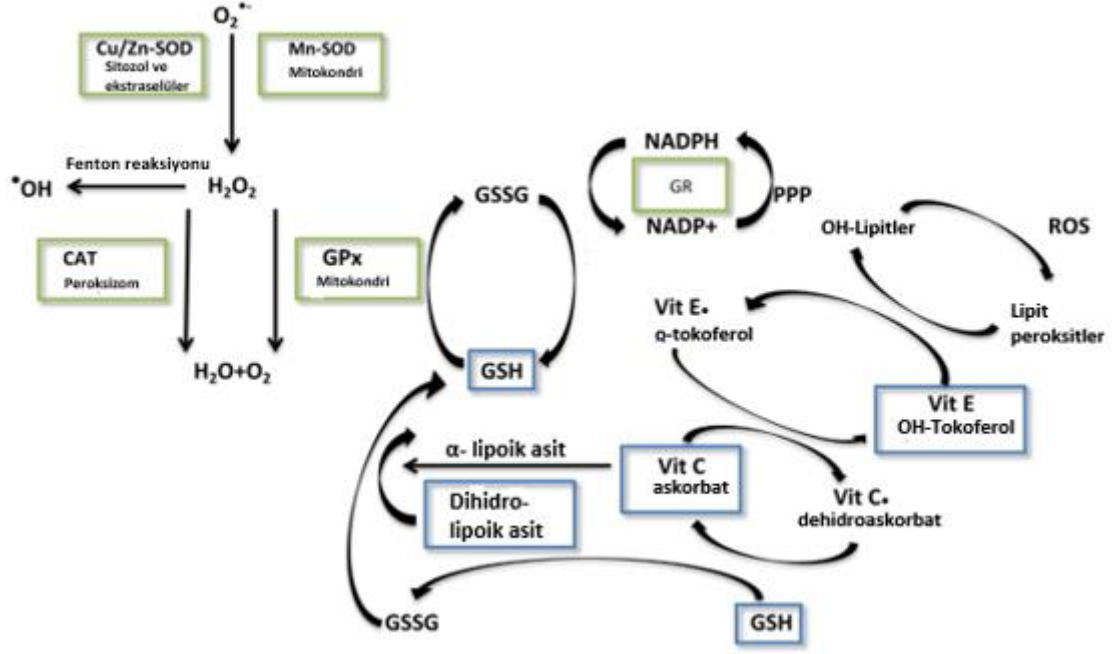


Kondense Tannin



Hidroliz edilebilir Tannin

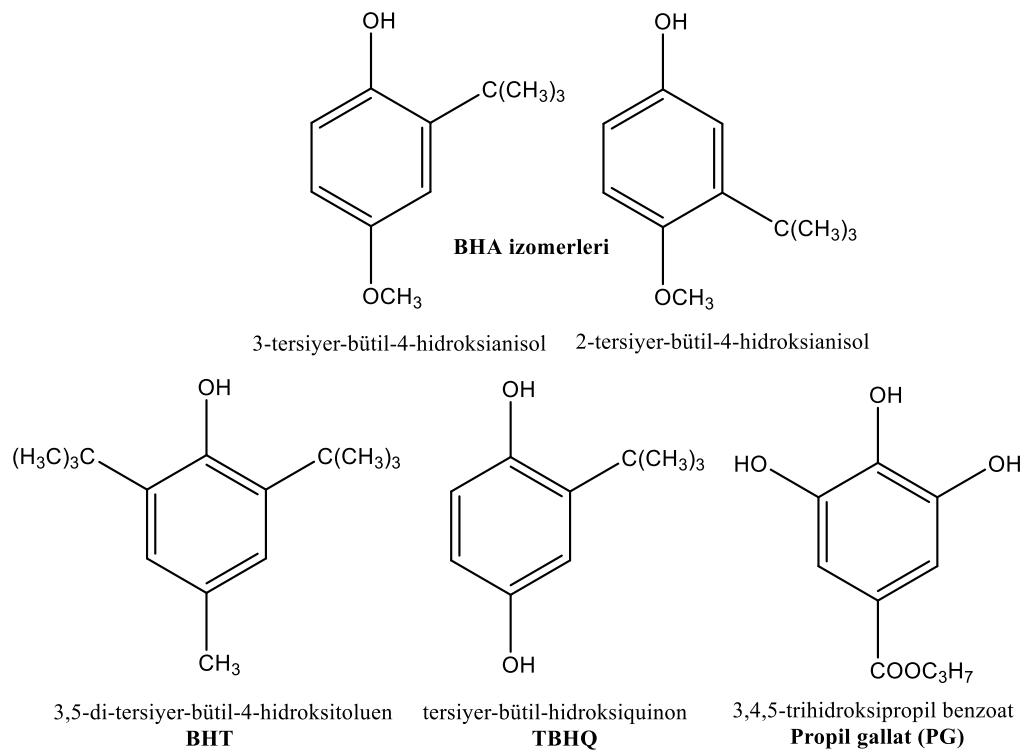
Şekil 2.18 Tanninlerin kimyasal yapıları (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015)



Şekil 2.19 Bazı doğal antioksidanların etki mekanizmaları (Mironczuk-Chodakowska vd., 2018)

2.3.1.2 Sentetik Antioksidanlar

Genellikle petrol bazlı ürünlerden elde edilen sentetik antioksidanlar, düşük maliyetli, işlenmesi kolay, verimli, saflık derecesi yüksek, kolay bulunabilir ve mevzuata uygun miktarlarda kullanıldığında zararsız bileşiklerdir (Sharma vd., 2019). Propil gallat (PG-E310), ter-bütillhidroquinon (TBHQ-E319), bütillenmiş-hidroksianisol (BHA-E320) ve bütillenmiş-hidroksitoluen (BHT-E321) endsütride en yaygın kullanılan sentetik antioksidan türleri olmakla beraber ek olarak oktil gallat (OG-E311) ve dodesil-gallat (DG-E312) da kullanılan türlerdir (Şekil 2.20) (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015). Bu bileşikler lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını önlemek gibi çeşitli antioksidan etkileri sebebi ile tat, renk ve koku değişimlerini engelleyerek raf ömrünü uzatan koruyucular olarak özellikle gıda endüstrisinde önemli bir kullanım alanı bulmuştur.



Şekil 2.20 Sentetik antioksidanların kimyasal yapısı (Shahidi ve Ambigaipalan, 2015)

edilebileceği gibi ambalaj malzemesine emülsiyon olarak da eklenebilir (Dziezak, 1986; Shahidi ve Wanasundara, 1992).

TBHQ; özellikle doymamış yağ asitleri olan bitkisel yağlarda, yenilebilir hayvansal yağlar ve et ürünlerinde kullanılan etkili bir sentetik üründür. Demir varlığında bile renk bozulmasını önleyen bu bileşik, eklendiği gıdanın koku ve aromasının korunmasında da önemli rol üstlenir (Kashanian ve Dolatabadi, 2009).

PG; uzun yıllardır kozmetik sektöründe, gıda ambalaj malzemelerinde, yağ içeren mayonez fırınlanmış ürünler gibi gıdalarda, basınca duyarlı yapıştırıcılarda kullanılmaktadır (Zurita vd., 2007). Ancak yapılan incelemeler PG ve onun bir parçalanma ürünü olan gallik asidin karaciğer toksisitesini arttırıcı ve kanserojen özellikli olduğunu göstermiştir (Eler vd., 2009).

Sentetik antioksidanların taşıdığı bu zararlı etkiler sebebi ile serbest radikallere etki ederek hastalıklardan koruma görevi üstlenen bitkisel antioksidanlar daha çok tercih edilmektedir. Günümüzde sağlık dostu olmaları nedeni ile doğal ürünlere karşı artan ilgi sebebi ile her alanda sentetik ürünlerin yerine kullanılabilecek doğal alternatiflerin bulunması için yoğun çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla gıda endüstrisinde de sentetik katkı maddelerinin yerini alabilecek doğal ürünlerin bulunmasının önemi giderek artmaktadır.

2.3.2 Antioksidanların Doğal Kaynaklardan Ekstraksiyonu

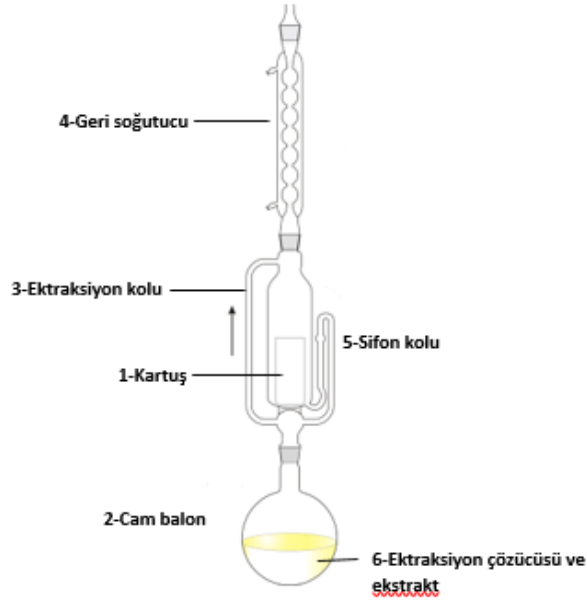
Doğal antioksidanların bulunması ve kullanılması amacı ile uzun yıllardır çeşitli gıda ürünleri ve bitkisel kaynaklarla çalışılmaktadır. Bu kaynakların antioksidan etkilerini tayin etme aşamasında toplam antioksidan kapasiteleri ya da farklı bireysel antioksidan özellikleri ayrıntılı olarak incelenmektedir. Tüm bu nicel yöntemlerin uygulanabilmesi için öncelikle çoğu analitik işlemin vazgeçilmez bir basamağı olan ekstrakt hazırlama işleminin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla günümüzde sıklıkla kullanılan Sokslet, maserasyon ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemlerin dışında çeşitli teknolojilerin kullanıldığı ultrases destekli ekstraksiyon (ultrasound-assisted extraction; UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (microwave-assisted extraction; MAE), süperkritik akışkan ekstraksiyonu (supercritical fluid extraction; SFE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu

(accelerated solvent extraction; ASE) ya da basınçlı sıvı ekstraksiyonu (pressurized liquid extraction; PLE) ve yüksek hidrostatik basınç ekstraksiyonu (high hydrostatic pressure extraction; HHPE) gibi birçok yöntem saymak mümkündür (Cong vd., 2017; Oroian ve Escriche, 2015).

2.3.2.1 Sokslet (Soxhlet) Ekstraksiyonu

1879 yılında F. Soxhlet tarafından bulunan bu yöntem hala yaygın olarak tercih edilen ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Sokslet ekstraksiyonu katı numuneler için özel bir cihazda (Şekil 2.21) uygulanan temel bir yöntemdir.

Bu yöntem için kullanılacak örnek kurutulup küçük parçalar halinde öğütüldükten sonra ekstraksiyon kartuşuna konulur (1) ve kartuş cihazda ekstraksiyon koluna yerleştirilir. Cam balona (2) ekstraksiyon çözücü konulup ısıtıcı ile ısıtılarak işlem başlatılır. Buharlaşılan çözücü ya da çözücü karışımı ekstraksiyon kolundan (3) geçerek geri soğutucuya (4) ulaşır ve geri soğutucudan yoğunlaşan çözücü ekstraksiyon koluna gelerek kartuş içerisine konulan örnek içeriğindeki maddeleri çözer ve cihazın sifon (5) kısmından cam balona geri döner. Ekstraktlar (6) çözücü balonu içerisindeki kalırken, temiz çözücü tekrar tekrar buharlaşır ve sürekli bir ekstraksiyon sağlanır.



Şekil 2.21 Sokslet ekstraksiyon cihazı

Ekstraksiyon işlemleri genellikle 6 ile 24 saat arasında sürmektedir. Ekstraksiyon çözücü olarak genellikle metanol, etanol, aseton gibi organik çözücüler ile bunların çeşitli oranlardaki karışımları kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça fazla miktarda çözücü kullanımı gerektirir. Antioksidan kapasite tayin işlemlerinde ucuz, yeniden kullanılabilir ve toksik özelliği az olan etanolün kullanımı yaygındır. Özellikle çeşitli oranlarda hazırlanmış sulu etanol çözeltilerinin farklı polariteye sahip fenolik içerikleri ayırmada etkili olduğu bilinmektedir (Durling vd., 2007).

Düşük maliyetli bir harcama ile kolayca uygulanabilen bu yöntem özellikle örneğin sürekli taze çözücü ile temas halinde olması sebebi ile avantaj sağlamaktadır. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında uzun zaman gerektirmesi ve kullanılan çözücü miktarının fazla olması bu yönetimin dezavantajlarındadır.

2.3.2.2 Maserasyon Ekstraksiyonu

Bitkisel kaynaklardan biyoaktif bileşiklerin ekstrakte edilmesinde sıkça kullanılan geleneksel yöntemlerden biri de maserasyon ekstraksiyonudur (Safdar vd., 2017).

Bu yöntemde ekstraksiyon, seçilen uygun çözücü içerisinde genellikle oda sıcaklığı ile reflüks sıcaklığı arasında bir sıcaklıkta karıştırma işlemi kullanılarak ya da kullanılmadan yapılabilen basit bir uygulamadır (Zwinglwstein vd., 2020).

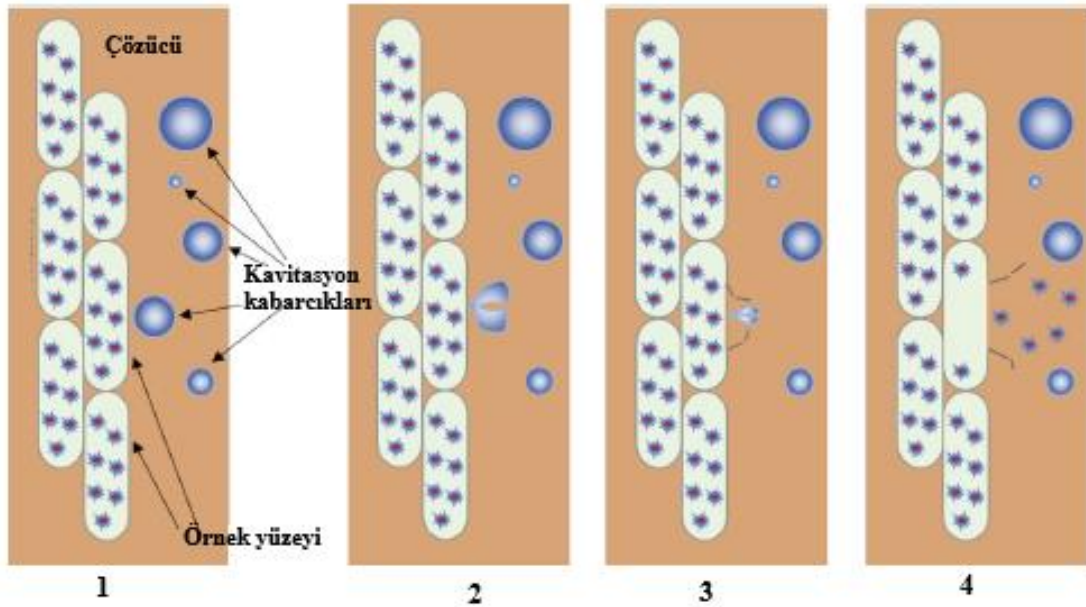
Bu geleneksel yöntemin en büyük dezavantajı birkaç saat ile başlayıp bazen günler süren ekstraksiyon sürelerinin olmasıdır (Panja, 2018).

2.3.2.3 Ultrases Destekli Ekstraksiyon (UAE)

Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanışlı ve ekonomik olması sebebi ile kimya, gıda ve eczacılık alanlarında sıklıkla tercih edilen yöntemlerden biridir (Xing vd., 2019). Özellikle yüksek ekstraksiyon verimi yanında zaman, kullanılan çözücü miktarı ve enerji açısından tasarruf sağlaması bu yöntemin en önemli tercih edilme sebeplerindendir. Ayrıca bu yöntem hiçbir toksik etkisi olmayan ultrases dalgalarının kullanıldığı tamamen çevre dostu bir uygulamadır (Martinez-Patino vd., 2019). Tüm bu avantajları sebebi ile UAE teknolojisi biyomalzemeler, polisakkaritler, uçucu yağlar, proteinler, peptitler, biyoaktif moleküller, fenolik maddeler, karotenoidler gibi çok çeşitli molekül grupları için kullanılmaktadır (Zwinglwstein vd., 2020).

Sağlıklı genç insanlar için ses frekansının üst limiti 20 kHz dir. Bu nedenle ekstraksiyon için kullanılan ultrases cihaz frekansları 20 kHz ile 2 MHz arasındadır. Ses dalgalarının sıvı çözücüler, yumuşak dokular ve bitki parçaları gibi örnekler üzerine önemli bir etkisi vardır (Panja, 2018). Bu ekstraksiyon işleminde ortamda milyonlarca mikroskobik kavitasyon kabarcığı oluşur ve bu kabarcıklar oluşan basınç ve sıcaklık etkisi ile enerji salınımı yapar. Bu mekanizma kavitasyon etkisi olarak isimlendirilmektedir. Kavitasyon mekanizması 4 adımdan oluşmaktadır. Birinci adımda; örneğin matriks yüzeyine etkiyen ultrases dalgaları etkisi ile kavitasyon kabarcıkları meydana gelir. İkinci adımda; oluşan kavitasyon kabarcıkların ortam basınç ve sıcaklığının etkisi ile çökerek mikrojetler oluşturur. Üçüncü adımda mikrojetler aracılığı ile matris yüzeyi yırtılır ve örnek içeriğindeki

aktif bileşenler ile çözücü direkt temas haline geçer. Son adımda ise bu aktif bileşenler çözücüye geçmektedir (Şekil 2.22) (Panja, 2018). UAE'da ekstraksiyon süresinin genellikle 1 saatten az olduğu görülmektedir (Safdar vd., 2017). Aynı şartlarda gerçekleştirilen Sokslet ekstraksiyonu ile kıyaslandığında zamandan edilen tasarruf ile beraber kullanılan çözücü miktarının son derece azaldığı dikkat çekmektedir. Bu yöntemde ekstraksiyonun; süre, sıcaklık, ultrases dalga frekansı, örnek ve çözücü özelliklerinden etkilendiği bilinmektedir (Cong vd., 2017). Araştırmalar bu etkiler üzerine de yoğunlaşmış durumadır. Ekstraksiyon verimini arttırmayı amaçlayan birçok çalışmada bahsedilen etkilerin optimizasyonu sağlanmaya çalışılmaktadır.



Şekil 2.22 Ultrases dalgalarının ekstraksiyon örneğine etkisi (Panja, 2018)

2.3.2.4 Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Mikrodalga 300-300000 MHz arasında değişen yüksek frekansa sahip bir elektromanyetik dalgadır (Debelo vd., 2019). Günümüzde özellikler polifenollerin geri kazanımı için kullanılan etkili yöntemlerden biridir (Panja, 2018). MAE yöntemi çözücü içerisinde bulunan örnekten istenilen bileşiklerin ayrılması için doğrudan mikrodalga enerjisini kullanır. Mikrodalga gücü, ekstraksiyon süresi, çözünürlük, dielektrik sabiti ve çözücü özelliği gibi faktörler yöntemin önemli parametreleridir. Dielektrik sabiti yüksek çözücülerin fazla miktarda mikrodalga enerjisi

absorplaması nedeni ile bu parametrelerden en önemlisinin çözücü özellikleri olduğu söylenebilir (Cong vd., 2017). Dielektrik sabiti yüksek olan polar çözücülerin mikrodalga etkisi ile kısa sürede ısınması söz konusudur ve çözücünün kuvvetli ısınma özelliği burada örneğin bozulmasına neden olacaktır. Yöntemde kapalı kapların kullanımının ekstraksiyon süresini azaltırken ekstraksiyon verimini arttırdığı bilinmektedir. Bu yöntem hem çözücü ile hem de çözücü kullanılmadan yapılan ekstraksiyon işlemlerine olanak tanımaktadır (Oroian ve Escriche, 2015).

2.3.2.5 Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SFE)

SFE, kullanılan etkili ekstraksiyon yöntemleri arasında çevre dostu özelliğe sahip bir alternatiftir. Diğer çözücü ekstraksiyonlarında kullanılanların aksine bu yöntemde süperkritik ekstraksiyon sıvıları kullanılır. En yaygın kullanılan süperkritik akışkan CO₂ olmakla beraber süperkritik etan, bütan, pentan, amonyak, triflorometan ve su da kullanılabilir (Cong vd., 2017). Süperkritik akışkan, aynı anda hem gaz hem sıvı özelliklerini taşıyan tek bir faz halinde bulunur. Bu özelliği sayesinde akışkan katı örnek üzerinde bir gaz gibi yayılırken örnek içerisindeki aktif maddeleri de bir sıvı gibi çözme özelliği sağlamaktadır (Panja, 2018).

Klasik bir SFE işleminde seçilen örnek, süperkritik akışkan üretimi, basınç, sıcaklık ve akış hızı kontrolü sağlayan bir cihazda kartuş içerisine yerleştirilir (Ügdüler vd., 2020). Ekstrakt uygun çözücü ya da katı-faz tuzunda toplanır.

Yöntemde temel olarak kullanılan süperkritik akışkanın CO₂ olması bu maddenin geri dönüştürülebilir, yanıcı ve toksik olmayan, ucuz bir malzeme olması sebebi ile avantaj sağlamaktadır (Gullon vd. 2017; Saini ve Keum, 2018). Diğer yandan CO₂'in düşük polaritesi nedeni ile bu yöntemin yüksek polariteye sahip fenolik antioksidanların tayini için kullanımı uygun değildir. Polaritesi yüksek diğer süperkritik akışkan alternatiflerinin de yüksek maliyetli olduğu bilinmektedir (Ügdüler vd., 2020).

2.3.2.6 Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu (ASE)

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (accelerated solvent extraction; ASE) ya da basınçlı sıvı ekstraksiyonu (pressurized-liquid extraction, PLE) olarak bilinen bu yöntem yüksek sıcaklık ve basınç altında özellikle bitkisel kaynaklardan elde edilecek ekstraktların hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir (Cong vd., 2017; Gullon vd., 2017).

Sıcaklık, basınç ve ekstraksiyon süresini hassas bir şekilde kontrol eden sistemde çok sayıda numunenin ekstraksiyonu örnekler ışık ve oksijenden etkilenmeden kolaylıkla gerçekleştirilmektedir (Saini ve Keum, 2018).

Uygulanan yüksek sıcaklık ve basınç ekstraksiyon çözücüsünün hızlı bir şekilde bitki hücrelerine nüfuz etmesini sağlarken fenolik bileşiklerin bozulmasını engeller. Geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında bu yöntem daha az miktarda çözücünün kullanıldığı daha hızlı bir yöntemdir (Cong vd., 2017). Yöntemin dezavantajı ise uygulanan yüksek sıcaklık sebebi ile ısısal kararlılığı düşük örneklerle uygulanmasının mümkün olmamasıdır.

2.3.2.7 Yüksek Hidrostatik Basınç Ekstraksiyonu (HHPE)

Yüksek hidrostatik basınç ekstraksiyonu yöntemi, 100 – 1000 MPa arasında değişen çok yüksek basınçlarda ağırlıklı olarak ilaç, metalurji ve gıda sanayinde kullanılan ve diğer yöntemlere kıyasla oldukça hızlı ve etkili bir yöntemdir. Hücre membranına çözücü nüfuz hızı ve ekstraksiyon verimi doğrudan basıncın yüksek olmasına bağlıdır (Chanioti ve Tzia, 2018).

Yöntemin uygulanmasının oldukça maliyetli bir sistem gerektirmesi en önemli dezavantajıdır (Cong vd., 2017).

Çeşitli gıda ve bitki ürünlerinin içerdiği antioksidan bileşikleri incelemek adına yapılan tüm bu ekstraksiyon yöntemleri arasından en çok kullanılanlar sıvı-katı ekstraksiyonlarıdır. Her örneğin kendisine özgü benzersiz yapı ve kompozisyonu olduğu düşünüldüğünde bu yöntemlerin kullanılacak örneğin özelliklerine göre çeşitli avantaj ve dezavantajları olduğu bilinmektedir. Tüm bahsedilen ekstraksiyon yöntemlerinin avantaj ve dezavantaj kıyaslaması Tablo 2.3'te verilmiştir.

Tablo 2.3 Ekstraksiyon yöntemlerinin kıyaslanması

Ekstraksiyon Yöntemi	Avantajları	Dezavantajları
Sokslet	Uygulaması kolaydır, düşük maliyetli bir ekipmanı vardır.	Fazla miktarda toksik çözücü kullanımı gerektirir, dolayısı ile maliyet çözücü açısından artar. Uzun ekstraksiyon süresi gerektirir. Ekstraktın eldesi için buharlaştırma aşaması çözücü fazla olduğundan uzun sürer.
Maserasyon	Karmaşık cihazlar olmadan yüksek verim sağlar.	Fazla miktarda toksik çözücü kullanımı gerektirir, dolayısı ile maliyet çözücü açısından artar. Uzun ekstraksiyon süresi gerektirir.
UAE	Hızlı, ısı gerektirmeyen, verimli bir yöntemdir. Az miktarda çözücü kullanımı yeterli olduğundan çevre dostudur.	Ultrason cihazının kullanım süresi ekstraksiyon verimini değiştirebilir. Santrifüj ya da filtrasyon gerektirir.
MAE	Basit, hızlı ve düşük maliyetlidir. Az miktarda çözücü kullanımı yeterli olduğundan çevre dostudur. Kurutucu işlemler gerektirmez.	Polar çözücü kullanımına uygun değildir. Ekstrakttan istenilen ürünlerin ayrılmasını gerektirir. Sıcaklık sebebi ile özellikle fenolik bileşiklerin izomerlerine dönüşümüne sebep olur.
SFE	Yanıcı ve toksik olmayan, geri dönüştürülebilir çözücü kullanılır. (CO ₂ ve etanol gibi)	CO ₂ nin polaritesinin düşük olması sebebi ile polar ürünlerin ekstraksiyonuna uygun değildir. Maliyeti yüksektir.
ASE ya da PLE	Hızlıdır ve çok az miktarda çözücü gerektirir.	Isısal kararlılığı düşük ve yüksek hacimli örnekler için kullanımı uygun değildir. Yüksek maliyetli bir ekipman gerektirir.
HHPE	Çok hızlı ve etkili bir ekstraksiyon sağlar.	Yüksek maliyetli bir ekipman gerektirir.

2.3.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Enzimatik ve enzimatik olmayan birçok karmaşık sistemin etkisi ile insan vücudunda oluşan sayısız serbest radikalın etkisinden korunabilmek için beslenmeye yeteri kadar antioksidan eklenmesi önem taşır. Son yıllarda araştırmacılar tek çeşit antioksidan kaynağı yerine bunların çeşitli karışımlarının alınmasının çok daha etkili bir koruyucu olacağı düşüncesindedir (Alam vd., 2013). Bu nedenle çeşitli gıda ve bitkisel kaynakların antioksidan özelliklerinin incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

Gıda maddeleri ve bitkisel örneklerin antioksidan özelliklerinin incelenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Antioksidan aktivite ölçümlerinin temeli genel olarak reaksiyon kinetiği ve antioksidan molekül başına yakalanan radikal ya da transfer edilen elektron sayısı gibi ölçümleri içeren reaksiyon termodinamiği ölçümlerine dayanmaktadır (Özyürek vd., 2011). Antioksidan aktivite tayin yöntemleri, *in-vitro*, *in-vivo* yöntemler; enzimatik ve enzimatik olmayan yöntemler gibi farklı sınıflandırılma şekilleri ile incelenebilmektedir (Alam, 2013; Fierascu vd., 2018; Özyürek vd., 2011;).

Yaygın olarak kullanılan en temel sınıflandırma testlerin hidrojen atomu transferine (HAT) dayalı ve elektron transferine dayalı (ET) yöntemler olarak ayrılmasıdır (Tablo 2.4). Her iki yöntem de antioksidan maddenin yapı ve özelliklerine, çözünürlüğüne ve kullanılan çözücü karışımı oranı ile doğrudan ilişkilidir.

Tablo 2.4 Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin sınıflandırılması

Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri		
Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Yöntemler-HAT	Elektron Transferine Dayalı Yöntemler-ET	Diğer Yöntemler
1. TRAP; (Total radical trapping antioxidant parameter; Toplam radikal tutma parametresi) 2. ORAC; (Oxygen absorbance radical capacity; Oksijen radikali absorplama kapasitesi) 3. TOSC; (Total oxyradical scavenging capacity; Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) 4. Krosin ağartma testi (Crocine bleaching test) 5. Luminol testi (Luminol test)	1. CUPRAC; (Copper (II) reducing power; Bakır (II) iyonu indirgeme gücü) 2. TEAC ya da ABTS (Trolox equivalent antioxidant capacity- ABTS radical cation reducing power; Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite ya da ABTS radikal katyon indirgeme kapasitesi) 3. FRAP; (Ferric ion reducing antioxidant parameter; Demir (III) iyonu indirgeme gücü)	1. Diğer antioksidan aktivite testleri 2. Briggs-Rauscher salınım reaksiyonu inhibisyonu (Inhibition of Briggs-Rauscher oscillation reaction) 3. LDL oksidasyonu; (Oxidation of Low density lipoprotein) 4. Kemilüminesans yöntemler (Chemiluminescence analysis) 5. Elektrokemilüminesans yöntemler (Electrochemiluminescence analysis)

Tablo 2.4 Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin sınıflandırılması (devamı)

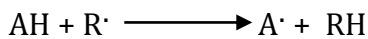
Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri		
Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Yöntemler-HAT	Elektron Transferine Dayalı Yöntemler-ET	Diğer Yöntemler
6. DCFH-DA; (Dichloro fluorescein-diacetate test; Diklorofloresin-diasetat testi) 7. PE esaslı yöntemler; (Phycoerythrin-based methods; Fikoeritrin esaslı yöntemler)	4. Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik madde tayini; (Total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent) 5. DPPH; (Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity; DPPH radikali yakalama kapasitesi)	

Bu yöntemlerde antioksidan aktivite ya ROT'nin inhibisyon miktarı ya da seçilen askorbik asit, Troloks gibi bir standart antioksidanın eşdeğeri olarak ifade edilmektedir. Ölçümlerde spektrofotometrik, florometrik, kemilümünensans, elektron-paramanyetik rezonans (EPR), gelişmiş infrared (FT-IR gibi) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) teknolojiler kullanılabilir (Shahidi ve Zhong, 2015).

Antioksidan aktivite ölçümlerinde kullanılan kimyasal yöntemler son derece basit ve hızlı olması, tekrar edilebilir olması, basit ekipmanlar ile sonuç veriyor olması dolayısı ile de uygun maliyetli olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.3.3.1 Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Yöntemler-HAT

HAT testlerinde genellikle termal olarak üretilen peroksil radikallerini etkisiz hale getirmek için antioksidan ve substratın rekabet ettiği düşünülebilir (Prior, 2015). Antioksidan ve kıyaslama için tercih edilen Troloks gibi bir standart, üretilen serbest radikale bir H atomu vererek radikalın etkisini yok eder. Bu mekanizmada R, radikal ve A, antioksidan olmak üzere aşağıdaki gibi temel bir reaksiyon gerçekleşir (Lopez-Alarcon ve Denicola, 2013).



Bu yöntemlerde antioksidan başına yok edilen serbest radikal miktarı spektrofotometrik olarak ölçülür.

a)TRAP (Toplam Radikal Tutma Kapasitesi): İlk olarak 1985 yılında Wayner tarafından bulunan bu yöntemde peroksidasyon sürecinde insan plazmasında kullanılan oksijen miktarı tespit edilmektedir (Lopez-Alarcon, 2013; Pinchuk vd., 2012). Günümüzde plazma, serum, çeşitli doku örnekleri ve gıda türlerinin peroksidasyonunu değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu testte antioksidanın floresan bir proteinin oksidasyonunu geciktirme süresi ve inhibisyonun en yüksek yüzdesi Troloks standartı ile kıyaslama yolu ile ölçülmektedir. R-fikoeritrin (R-PE) gibi peroksidasyona uğrayabilen floresan maddelerin 2,2"-azobis-(2-amidinopropan) (AAPH) ile verdiği peroksidasyonu temel alınarak kullanılan oksijen miktarı hesaplanır (Alam, 2013).

b)ORAC (Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi): 1993 yılında Cao vd. tarafından geliştirilen bu yöntemde hedef molekül olarak β -Fikoeritrin (β -PE) kullanılmaktadır (Lopez-Alarcon ve Denicola, 2013). Serbest peroksil radikalının oluşturulmasında AAPH ve serbest hidroksil radikalının oluşturulmasında Cu(II)-H₂O₂'nin kullanıldığı bu yöntemde β -Fikoeritrin ile serbest radikallerin reaksiyonu sonucunda floresans bir protein olan β -Fikoeritrin'in yarattığı floresans etkideki düşüş hesaplanır. Standart olarak TRAP yönteminde olduğu gibi Troloks kullanılır. İlgili güncel araştırmalar incelendiğinde 2005 yılından sonra yapılan çalışmalarda β -PE'nin yerine farklı ORAC testi hedef moleküllerinin tercih edildiği görülmektedir (Alam, 2013). Prior vd. bu testte β -PE gibi çalışan ışığa dayanıklı, ucuz ve polifenollerle etkileşmeyen bir prob üretmiş ve bu gelişmeler β -PE'nin kullanımını azaltmıştır (Lopez-Alarcon ve Denicola, 2013).

c)TOSC (Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi): 1998 yılında Winston tarafından bulunan yöntemde AAPH tarafından serbest peroksil radikalleri oluşturulur. Bu serbest radikalın α -keto- γ -metiolbütirik asid (KMBA)'in yükseltgenmesine bağlı oluşan etilen gazının gaz kromatografisi yardımı ile tespit edilmesi ve örneğin toplam oksiradikal süpürme etkisinin ölçülmesine dayalı bir yöntemdir.

d)Krosin Ağartma Testi: İlk kez 1984'te Bors vd.'nin bulduğu ve 1996 yıllarında Tubaro ve vd.'nin geliştirdiği bu test tekli bileşiklerin yanı sıra sızma zeytinyağı, biberiye ekstresi ve Maillard Reaksiyon ürünleri gibi karışımları da analiz edebilmek için kullanılmıştır. Diğer yöntemlere kıyasla daha az kullanılan bu yöntemde, antioksidanın peroksil radikal söndürme kabiliyeti, bir karotenoid türevi olan krosin ile antioksidanın bir diazo bileşiğinin termal yollarla ayrılması ile üretilen radikali söndürmek için rekabet ettiği paralel reaksiyonların karşılaştırılması ile belirlenir (Bortolomeazzi vd., 2007). Krosin ağartma miktarı 450 nm de alınan absorbanslar ile hesaplanır (Prieto vd., 2015). Serbest radikal üretmek üzere AAPH (R-N=N-R) kullanılan yöntemde de sonuçlar Troloks ya da α - tokoferol ile kıyaslanarak verilmektedir. 1999 yılında ise Lussignoli vd. serbest radikal kaynağı olarak AMVN (2,2'-azobis-2,4-dimetilvarenitril) kullanımı ile testin lipofilik ürünlere uygulanmasını ve pro-oksidan aktivite ölçümü için kullanılmasını sağlamıştır (Prieto vd., 2015)

e)Luminol Testi: Bir kemilüminesans reaktif olan luminolün birçok yöntemde kullanılan AAPH'ın meydana getirdiği serbest peroksil radikalleri tarafından oksidasyonuna dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin gücüne bağlı olarak oluşan lüminol radikallerinin kemilüminesans ışması gecikir. Bu gecikme Troloks standartının geciktirme oranları ile kıyaslanarak antioksidan aktivite belirlenir. (Shaidi, 2015)

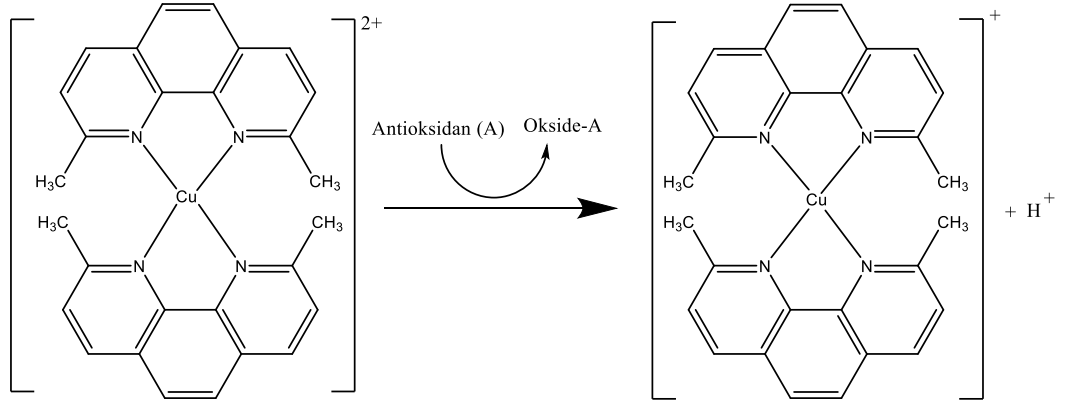
f)DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) Testi: İlk kez Keston ve Brandt'in (1965) kullandığı DCFH-DA testinde, horseradish peroksidaz (HPR) varlığında florometrik olarak hidrojen peroksit ölçümü yapılmıştır (Yazdani, 2015). 1997'de Valkonen ve Kuusi, TRAP metodunu esas alarak floresan oksitlenebilir substrat olarak DCFH-DA kullanarak yöntemi geliştirmiştir. Bu testte DCFH-DA'nın peroksil radikali ile oksitlenmesi ile floresan özelliği hayli güçlü olan diklorofloresin (DCF) meydana gelir. Dolayısı ile artan floresan etki antioksidanın varlığına ve radikali giderme etkisine işaret eder (Magalhaes vd., 2008). Oksidasyon ürünü DCF 492-495 nm de uyarılır ve 517-527 nm arasında emüsyon yapar (Matilla vd., 2015).

g)PE (Fikoeritrin) Esaslı Yöntemler: 1994 yılında Ghiselli tarafından geliştirilen yöntem floresans antioksidan yöntemlerden biridir. Burada AAPH ile Cu(II)-askorbat bileşiği de aktif olarak kullanılır. APPH peroksil radikallerini süpürürken Cu(II)-askorbat, hidroksil radikalleri ile tepkimeye girer. B ya da R-PE'nin substrat olarak kullanıldığı tepkimelerde açığa çıkan bir floresans söz konusudur ve bu floresansın lineer azalması üzerinden hesaplamalar gerçekleştirilir (Lopez vd., 2003).

2.3.3.2 Elektron Transferine Dayalı Yöntemler-ET

ET yöntemleri, antioksidanın bir elektron vermek suretiyle oksidantı indirgemesi esnasında meydana gelen renk değişiminin spektrofotometrik ölçümüne dayalı yöntemlerdir. Renk değişiminin şiddeti doğrudan örneğin antioksidan aktivitesi ile ilişkilidir (Prior, 2015).

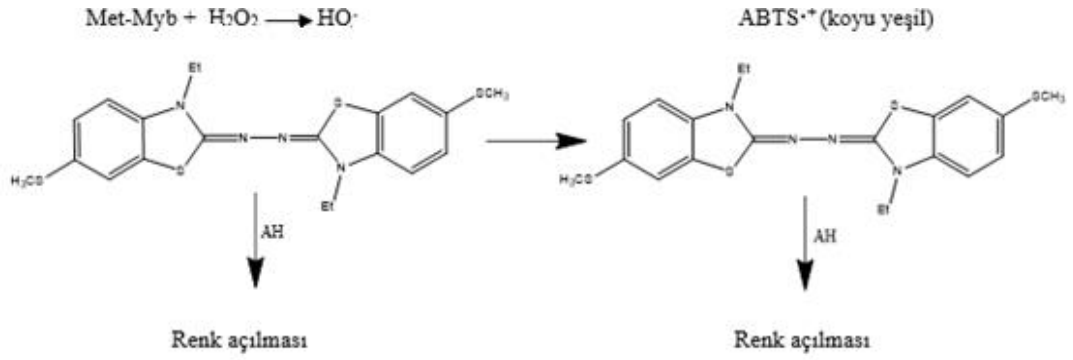
a)CUPRAC (Cu(II) iyonu İndirgeme Gücü): FRAP yönteminde kullanılan demir yerine bakırın kullanıldığı Apak vd. tarafından geliştirilen bir testtir (Shaidi ve Zhong, 2015). Polifenoller ve plazma antioksidanlarının Cu(II) iyonlarını indirgeme kabiliyetinin keşfi ile ortaya çıkan bu yöntemde, Cu(II) iyonu ile 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin'in (Neocuproin-Nc) reaksiyonu sonucu bis-bakır(II)neokuprin (Cu(II)-Nc) şelatı oluşur. Devamında gerçekleşen redoks reaksiyonu ile oluşan Cu(I)-Nc şelatının renk değişimi (Şekil 2.23) 450 nm'de ölçülerek antioksidan kapasite tayin edilir. Kullanılan kromojenik redoks reaktifi kolay bulunabilir, kararlı ve seçici olmakla beraber aynı zamanda kimyasal yapısı ve hidrofilik özelliğine bakılmaksızın tüm önemli biyolojik antioksidanlarla ve her çeşit gıda antioksidanı ile kullanılabilir (Özyürek vd., 2011).



Şekil 2.23 CUPRAC reaksiyonu (Özyürek vd., 2011)

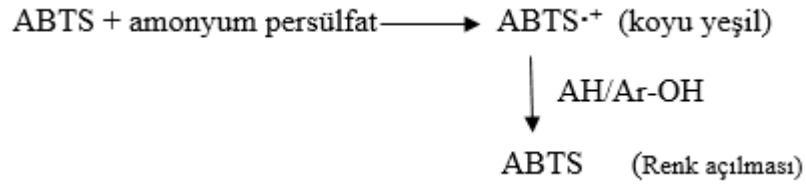
b)TEAC (Troluks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)-ABTS (ABTS radikal katyon indirgeme kapasitesi): Miller tarafından ilk kez 1993 yılında geliştirilen bu yöntem toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde kullanılan basit bir yöntemdir. Antioksidanın, kararlı bir katyon radikali olan ABTS^{•+} (2,2"-azinobis-(3etilbenzotiyozalin-6-sülfonikası))'i yakalama etkisinin ölçüldüğü bir yöntemdir. 734 nm'de alınan absorbans ölçümlerinde belirlenen katyon radikalının güçlü mavi-yeşil rengindeki azalma ile antioksidanın radikali yakalama kapasitesi doğru orantılıdır (Shaidi ve Zhong, 2015).

Bu yöntemde antioksidan etkili molekül ya radikal oluşumunu engelleyen ya da oluşan radikal ile reaksiyona girerek onun etkisini durduran iki farklı mekanizma ile etkisini gösterir. Bu iki mekanizma için de iki farklı reaksiyon yaklaşımı söz konusudur. Ticari kitlerde de kullanılan ilk yöntemde (Şekil 2.24) öncelikle ABTS'yi renkli serbest radikal formuna oksitlemek için bir OH[•] oluşturmak üzere H₂O₂ ve metmiyoglobin reaksiyonu gerçekleştirilir. Daha sonra antioksidanla reaksiyona giren radikal katyonun mavi-yeşil rengindeki azalmanın ölçülmesi söz konusudur (Miller vd., 1993; Schaich vd., 2015).



Şekil 2.24 Miller vd. tarafından geliştirilen iki aşamalı TEAC yöntemi (Schaich vd., 2015)

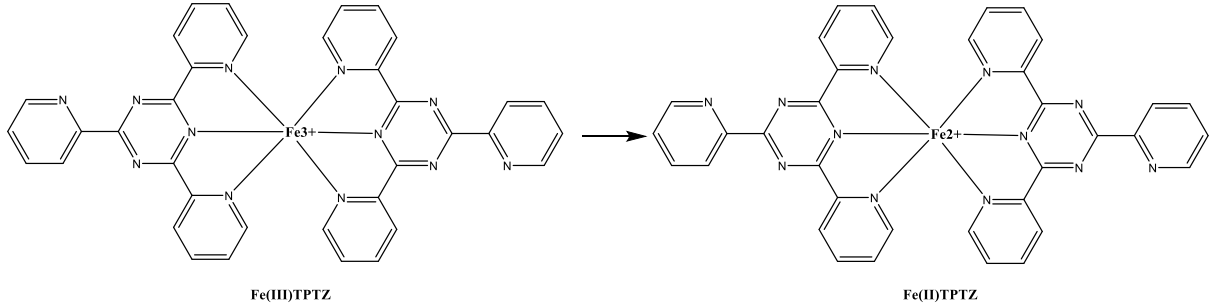
Bu iki aşamalı yöntemin 1999 yılında Re tarafından geliştirilmesi ile ortaya çıkan ikinci yöntemde ABTS yüksek miktarda potasyumpersülfatlı ortamda hızla renkli okside türüne dönüşür ve antioksidanın yalnızca oluşan bu radikal katyonu ile reaksiyona girmesi ile tek aşamada renksizleşmenin etkisi ölçülür. (Şekil 2.25) Sonuçlar Troloks standartı eşdeğeri olarak hesaplanmaktadır (Re vd., 1999; Schaich vd., 2015).



Şekil 2.25 Re vd. tarafından geliştirilen tek aşamalı TEAC yöntemi (Schaich vd., 2015)

c)FRAP (Fe(III) İyonu İndirgeme Kapasitesi): 1999 yılında Benzie ve Strain'in geliştirdiği bu yöntemde temel olarak antioksidanın Fe(III) iyonunu Fe(II) iyonuna indirgemesi ile oluşan koyu mavi renkli kompleks oluşumunun spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanmaktadır (Şekil 2.26) (Alam, 2013; Pinchuk vd., 2012). Burada demirin kompleks oluşturduğu ligant tripridil-tirazin (TRPZ) dir ve test asidik pH (pH=3.6) ortamında gerçekleştirilir. Antioksidan aktivite 593 nm de artan absorbans ölçümüne dayanarak hesaplanır. Yöntemin ilk çıkışında katyonun reaksiyona girdiği ligant olan TRPZ yerine günümüzde farklı ligantlar da kullanılabilir. Askorbik asit indirgeme gücünün hesaplanması işlemlerinde ferrozin kullanımı görülürken son zamanlarda FRAP uygulamalarında ligant olarak

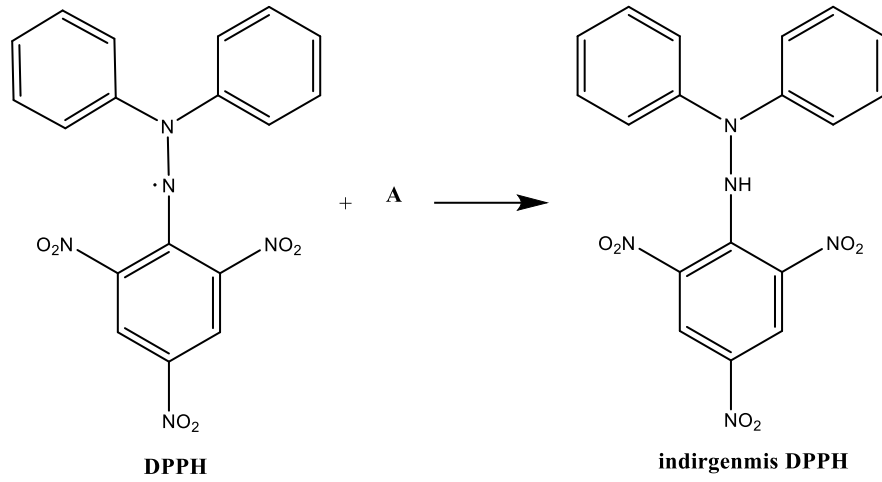
potasyum-ferrisiyanid kullanımı da yaygındır. Yapılan güncel çalışmalar incelendiğinde bu testin kulorometik titrasyon işlemi ile daha da geliştirildiği testlerin çeşitli antioksidan örneklerin FRAP değerlerinin hesaplanmasına olanak tanıdığı görülmektedir (Shaidi, 2015).



Şekil 2.26 TPTZ kompleksinin FRAP yönteminde indirgenmesi (Alam, 2013; Pinchuk vd., 2012).

d)Folin-Ciocalteu Reaktifi ile Toplam Fenolik Madde Tayini: Özellikle gıda ve bitkisel kaynaklı örneklerin antioksidan özelliklerinin içerdikleri fenolik bileşik miktarları ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu amaçla örneğin içerdği toplam fenolik madde miktarının ölçülmesi antioksidan kapasitesine ilişkin önemli ipuçları verir. Toplam fenolik madde tayini için Singleton (1999) tarafından geliştirilen yöntemde, bazık ortamda, antioksidan örnek ile kompleks oluşturan CuSO_4 bileşiğinin Cu(I) hâline indirgenmesi esastır. Örnekler üzerine folin fenol reaktifi (fosfomolibdik fosfotungstik asit) ilave edildiğinde, molibdatotungstat ayracının sarı rengi, Cu(I) ile maviye dönüşür.

e)DPPH Radikali Yakalama Kapasitesi: Brand-Williams tarafından (1995) geliştirilen bu teknik en sık kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerindendir. Elektron transferine (ET) dayalı bu yöntemin hidrojen atomu transferine dayalı (HAT) bir mekanizmaya sahip olması ilgi çekicidir. Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) mor menekşe renkli kromojenik bir kararlı radikaldir. DPPH yakalama kapasitesi testi antioksidan bileşiklerin radikal etkisini gidermek üzere elektron transferine dayanır (Şekil 2.27). Antioksidanın etkisi ile DPPH'ın rengindeki azalma 517 nm de alınan absorbanslar ile hesaplanmaktadır (Shahidi ve Zhong 2015).



Şekil 2.27 DPPH radikalının indirgenmesi reaksiyonu (Shahidi ve Zhong 2015)

2.3.3.3 Diğer Yöntemler

Metabolizmada meydana gelen birçok ROT mevcuttur ve bu türlerin etkilerinin azaltılabilmesi adına antioksidan türlerin etkilerini incelemek için *in-vitro* şartlarda oluşturulan ROT için anlatılan temel yöntemlerin dışında da çeşitli uygulamalar yapılmaktadır. Ayrıca gelişen yeni teknolojilerin de kullanıldığı birçok yöntem bu amaçla kullanılmaktadır.

Yapılan çalışmalar bir örneğin antioksidan aktivitesinin tek bir aktivite testi ile belirlenemeyeceğini ancak bir grup test için alınan sonuçların anlamlı olacağını göstermiştir.

➤ Nitrik oksit (NO·) yakalama aktivitesi; NO· radikali biyolojik dokularda genellikle sitrülünün arjinine dönüşmesi mekanizmasında oluşmaktadır. Bu radikalın yakalanması testinde kullanılan sodyum nitroprussidin sulu ortamda fizyolojik pH (pH=7.2)' ta NO· üreterek ayrıştığı bilinmektedir. Burada oluşan radikal daha kararlı moleküller (nitrat, nitrit gibi) oluşturmak üzere ortama eklenen Griess reaktifi ile reaksiyona girer ve oluşan azo-yapılar 570 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak sodyum nitrit kullanılarak antioksidan bileşiğin verileri elde edilir (Alam, 2013; Magalhaes vd., 2008).

- İndirgeme gücü tayini: HAT temelli FRAP yöntemini baz alan bu test reaksiyon karışımlarının absorbanstlarındaki artışın ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Artan absorbanst antioksidan aktivitenin gücü ile doğru orantılıdır. Antioksidan, ferrisiyanid, tri-kloroasetik asit ve Fe(III)klorür ile renkli 700 nm de absorbanst veren bir kompleks oluşturmaktadır (Magalhaes vd., 2008).
- DMPD katyon radikal yakalama aktivitesi: Biyolojik kaynaklar ve gıda örneklerinin antioksidan aktivitesinin ölçümü için geliştirilen bu yöntemde asetat tamponu ve Fe(III)klorür içeren çözeltide renkli olan radikalın renksizleştirilmesinin 505 nm’de ölçülmesi söz konusudur (Alam, 2013; Magalhaes vd., 2008).
- Metal şelatlama aktivitesi: Ferrozin, Fe²⁺ ile şelatlar oluşturarak kırmızı renkli kompleksler meydana getirir. Bu reaksiyonda eğer ortamda başka bir şelatlama ajanı var ise renk şiddetinde azalma görülür. Azalmanın 562 nm’de çok iyi bir şelatlama ajanı olan EDTA (Etilendiamin tetra-asetik asit) ile kıyaslanması ile ölçüm alınır (Alam, 2013; Magalhaes vd., 2008).
- β-karoten ağartma testi: Krosin ağartma yöntemini temel alan ve oldukça hızlı sonuç veren bu testte, bir doymamış yağ asidi olan linoleik asidin ROT tarafından oksitlenmesi reaksiyonunun dayandır. Oluşan ürünler β-karoten oksidasyonunu başlatır ve bu renk şiddetinin azalmasına neden olur. Antioksidanlar, 434 nm’de alınan renk değişimi azalma oranına göre değerlendirilir (Alam, 2013, Lage vd., 2013; Magalhaes vd., 2008).
- Briggs-Rauscher salınım reaksiyonu inhibisyonu: son yıllarda doğal antioksidan kaynakları için yapılan testlere bakıldığında Mn(II) katalizli Briggs-Rauscher (BR) reaksiyonlarının kullanımı göze çarpmaktadır (Li, 2016). Bu reaksiyonda H₂O₂ ve potasyum iyodat (KIO₃) varlığında malonik asit (CH₂(COOH)₂) oksidasyonu söz konusudur. BR salınım reaksiyonu ortamına ilave edilen analitlere son derece hassastır. Salınım dinamiklerinin bu hassas özelliklerinden yararlanılarak ilave edilen analitlerin konsantrasyonları, antioksidan ve antiviral etkileri değerlendirilebilir (Pagnacco vd., 2019).

Reaksiyonda Mn(II) ya da bazen Ni(II) ile meydana gelen makrosiklik kompleksin salınım esnasında çeşitli radikalik türler oluşturduğu bilinmektedir. Bu durumda BR reaksiyon ortamına eklenen antioksidanın bu türlerin etkisini azaltmasına dair ölçümler yapılarak antioksidan aktivite tayin edilebilmektedir (Briggs ve Raucher, 1973; Li, 2016; Zagrean-Tuzav vd., 2020).

➤ LDL oksidasyonu; Metabolizmada artan LDL konsantrasyonuna bağlı olarak koroner kalp hastalığı, felç ve çeşitli damar hastalıklarını kapsayan kardiyovasküler riskler ortaya çıkmaktadır. Bu sebeple LDL oksidasyonu canlıyı bu risklerden korumak için önem taşımaktadır. Doğal kaynakların LDL oksidasyonu sağlaması da metabolizma için önemli bir antioksidan etki yaratacağı anlamına gelmektedir. İn vitro olarak uygulanabilen bu yöntemde genellikle radikal başlatıcı olarak AAPH kullanılmaktadır (Hou vd., 2004; Filleria ve Tironi 2017; Nakamura vd., 2006).

➤ Kemilüminesans destekli bazı yöntemler; bu yöntemler ile antioksidan aktivite tayininde temel olarak antioksidanların kemilüminesans (CL) reaksiyonları inhibisyon yeteneği tespit edilmektedir. CL yöntemler, hem yüksek hassasiyette hem de oldukça düşük maliyetli basit yöntemler olmaları sebebi ile avantajlıdır. Luminol, peroksiokzalat ve KMnO_4 yöntemleri sıklıkla tercih edilen CL tekniklerindendir. Gelişmiş analitik tekniklerin kullanıldığı akış enjeksiyon analizi (Flow injection analysis) (FIA) ve mikroakışkan analizi (microfluid analysis) (MF) yöntemleri günümüzde kullanılan yöntemlerdendir (Kohler ve Kröhnke, 1999; Iranifam ve Lawati, 2019).

➤ Elektrokemilüminesans yöntemler; spektroskopik ve elektrokimyasal yöntemlerin bir kombisyanudur. Yüksek seçicilik ve hassasiyet, kolay kontrol edilebilirlik, geniş algılama aralığı ve diğer yöntemlerle kolay birleştirilebilirlik özellikleri taşıması nedeni ile birçok teknikte tercih edilebilmektedir (Nagatani vd., 2016; Yi vd., 2020). CL gibi Luminol yöntemini temel alan elektrokemilüminesans (ECL) yöntemlerde, luminolün oksidasyonunda elektrik potansiyelinin kullanılmasına ilişkin avantajlar sağlayabilmektedir. Ancak asidik ya da nötral ortamlarda çalışmak üzere CL'nin daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Xiuhua vd., 2012).

Tüm bu antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin doğal kaynaklara uygulanması ile elde edilen sonuçlarda, incelenen kaynağın testlerin çoğuna pozitif sonuç vermesi güçlü bir antioksidan aktivitenin işaretçisidir.

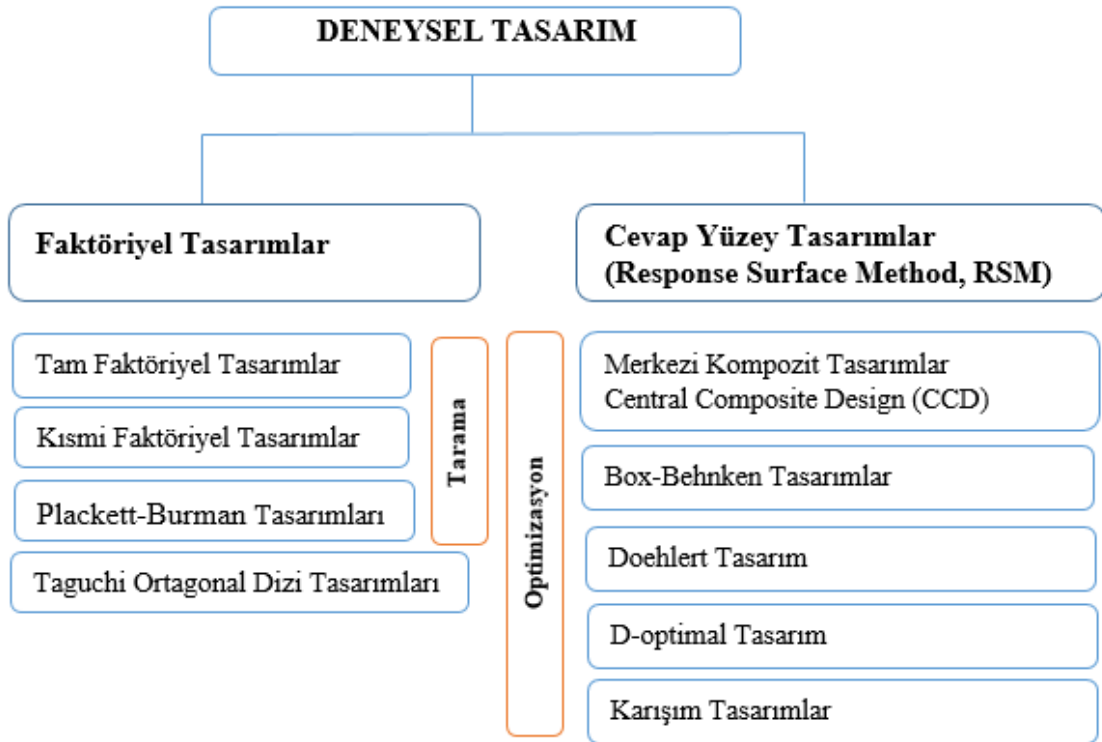
2.4 Deneysel Tasarım

Kaliteli ürün üretme ve kaliteli iş yapmanın öneminin giderek daha da önem kazanması, her alanda yapılan işlerin ve proseslerin belirli standartlara uyması gerekliliğini de ortaya çıkartmıştır. Deneysel proseslerde kullanılan reaktif maliyetlerinin yüksek olması, en yüksek verimle en doğru sonuca ulaşmak için çokça deneme yapılması gerekliliği sebebi ile fazlaca zaman harcanması ve analitik süreci etkileyen sayısız değişkenin olması bu süreçlerin geliştirilmesi ve validasyonunun sağlanmasını gerektirmiştir. Bu bağlamda yapılan analitik sürecin performansının iyileştirilmesi ve en iyi cevabın elde edileceği koşulların belirlenmesi süreçlerine 'optimizasyon' denilmektedir (Candioti vd., 2014).

Deneysel tasarım ise çalışma için gerekli tüm araçlar kullanıldığında sistemin davranışlarının ayrıntılı biçimde istatistiksel olarak incelenmesini ifade etmektedir. Deneysel tasarımda belirli kurallar çerçevesinde bir dizi deney planlanır ve bu deneyler gerçekleştirilirken sonucu etkileyebilecek her türlü değişkenin sistem üzerine etkileri araştırılır. Bu çalışmaların sonuçları tatmin edici veriler sunduğunda elde edilen özgün tasarım şartları benzer diğer çalışmalarda deneme sayısını azaltacağından hem kullanılan kimyasal madde miktarı hem de harcanacak zaman açısından büyük avantajlar sağlayacaktır. Tüm bu avantajlardan ötürü oldukça kullanışlı bir teknik olan deneysel tasarım ilk olarak tarım ve biyoloji araştırmalarında faktöriyel dizayn ve varyans analiz (ANOVA) olarak 1930'lu yıllarda Ronald A. Fisher tarafından geliştirilmiştir (Makela, 2017; Narendran vd., 2019).

Daha az sayıda deney ile daha az zaman harcayarak bir ya da birden fazla değişken etkisini inceleyerek en doğru ve kesin sonuca ulaşmayı amaçlayan bu istatistiksel yöntem **cevap, değişken ve model** olmak üzere üç yapıtaşından oluşmaktadır. Deneysel tasarım yöntemleri; Faktöriyel Tasarımlar ve Cevap Yüzey Tasarımları (Response Surface Method) olmak üzere iki temel grupta incelenebilir (Şekil 2.28).

Bu gruplar içerisinde tasarımların bir kısmı tarama bir kısmı da optimizasyon tasarımı yöntemleri olarak incelenebilmektedir (Narenderan vd., 2019). Tarama tasarımlarında, sonucu etkileyebilecek çok sayıda değişken olması halinde bu değişkenlerden hangilerinin sonuç üzerine etkisinin olduğu belirlenirken, optimizasyon tasarımlarında ise deneylerden bir ya da birkaç tanesinin tekrarlanabilmesi ile hata hesabı da yapılarak değişkenlerin deney sonucuna parabolik etkileri de incelenebilmektedir.



Şekil 2.28 Deneysel tasarımın sınıflandırılması (Narenderan vd., 2019)

2.4.1 Faktöriyel Tasarımlar (Factorial Design)

Faktöriyel tasarımlar bir çalışmanın sonucuna birden fazla değişkenin iki ya da daha fazla seviyede etkilerinin incelenmesine olanak tanımaktadır (Wang ve Wan, 2009). Değişkenler arasındaki etkileşim hakkında bilgi verebilmesi açısından bu tasarımlar kullanışlıdır (Mousavi vd., 2018).

a) Tam Faktöriyel Tasarımlar (Full Factorial Design)

Bu tasarımlar, iki ya da daha fazla seviyeli tasarımlarda sonucu etkileyen birkaç değişkenin ve bunlar arasında en etkili olanların, en uygun seviyelerinin tahmin edilebilmesi için önemli yöntemlerdendir. Ancak tüm değişkenlerin etkilerinin ve birbirleriyle etkileşimlerinin incelenmesine olanak tanınmasına rağmen dört parametreden fazla değişkenin olduğu durumlarda kullanılması dezavantajlıdır. İki seviyeli tam faktöriyel tasarımlarda deney sayısı belirlenirken genellikle 2^k formülü kullanılır, burada k; değişken sayısını ifade etmek üzere 5 değişkenin olduğu bir tasarım için deney sayısı $2^5=32$ olmaktadır ve bu uygulanması oldukça zaman ve kimyasal madde gerektiren bir sayıyı ifade eder. Bu nedenle bu tasarım çalışmaları, sonuca etkileyen değişkenlerin ve bunların birbirleriyle etkileşimlerinin incelenmesi işlemlerinin ötesine geçememektedir (Candioti vd., 2014; Makela, 2017; Mousavi vd., 2018).

b) Kısmi Faktöriyel Tasarımlar (Fractional Factorial Design)

Kısmi faktöriyel tasarımlarda, tam faktöriyel tasarımda belirlenen bazı noktalar çalışılarak deney sayısı azaltılmaktadır. Burada deney sayısı 2^{k-p} formülü ile belirlenmektedir ve k: değişken sayısını, p:kullanılan tam faktöriyel tasarımın seviyesinin boyutunu ifade etmektedir. Örneğin iki seviyeli bir tasarımda 6 değişkenin olduğu durumda deney sayısı $2^{6-1}=32$, dört seviyeli 6 değişkenli bir tasarımda ise $2^{6-2}=16$ olarak hesaplanmaktadır. Bu tasarımın dezavantajı deney sayısının azaltılması ile değişkenlerden bazılarının etkisinin incelenememesidir (Candioti vd., 2014; Makela, 2017; Mousavi vd., 2018).

c) Plackett-Burman Tasarımlar (Plackett-Burman Designs)

Faktöriyel tasarımlarda değişken sayısının fazla olduğu durumlarda tarama yöntemlerinden tam ve kısmi faktöriyel tasarımların dezavantajları nedeni ile Plackett-Burman tasarımları tercih edilmektedir. 1946 yılında istatistikçi R. L. Plackett ve J. P. Burman tarafından geliştirilen bu yöntem özellikle iki seviyeli tasarımlarda oldukça etkilidir (Narendran vd., 2019).

Burada deney sayısı değişken sayısının bir fazlası olacak şekilde hazırlanan standart tasarım tabloları kullanılmaktadır.

Tasarım 4'ün katları olan $4n$ deneylerinde $4n-1$ değişkenin ana etkilerini inceleme olanağı tanımaktadır (Mousavi vd., 2019; Narendaran vd., 2019; Sharif vd., 2014).

d) Taguchi Ortogonal Dizi Tasarımları (Taguchi Ortogonal Array Designs)

Bir optimizasyon tasarımı olan ve Genichi Taguchi tarafından bulunan bu yöntem sağlam bir optimizasyon temeli için 3 adım içermektedir. Bunlar; konsept, parametre ve tolerans tasarımıdır (Narendaran vd., 2019). Taguchi tasarımı doğru kullanıldığında çeşitli faktör seviyelerinin optimal kombinasyonlarını belirlemede verimli ve güçlü bir yöntemdir. Taguchi çalışmalarında çok daha az deney ile ve en az klasik olanı kadar iyi sonuç veren deney dizileri (ortogonal dizi) geliştirmiş, faktör seviyelerini teker teker değiştirmek yerine eş zamanlı değiştiren ortogonal dizileri kullanmayı uygun görmüştür.

2.4.2 Cevap Yüzey Tasarımlar (Response Surface Method, RSM)

RSM, analitik çalışmalar, endüstriyel uygulamalar ve biyoproseslerde sıklıkla kullanılan bir optimizasyon yöntemidir. İlk olarak 1950'li yıllarda Box ve Wilson tarafından kimyasal deneylerde özellikle matematiksel ve istatistiksel tasarımlarda kullanılmıştır (Makela, 2017). RSM grubundaki tüm tasarımlarda değişkenlerin etkilerini ölçmek üzere deneysel veriler elde edilir ve sonra tüm bu veriler cevap yüzeyini karakterize etmek amacıyla çoklu doğrusal regresyonların polinom modeli üzerine yerleştirilir (Candioti vd., 2014).

a) Merkezi Kompozit Tasarımlar (Central Composite Designs, CCD)

1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilen tasarımda hem doğrusal hem de kuadrik modellerle çalışılabilmektedir. CCD, üç seviyeli tam faktöriyel dizayna daha az deney sayısı sağlayan iyi bir alternatif olarak düşünülebilir. Bu yöntemde faktöriyel tasarım noktalarına yıldız (star) ve merkez (center) noktaları eklenerek tasarım oluşturulmaktadır (Sharif vd., 2014). Deney sayısı belirlenirken k^2+2k+C_p formülü kullanılır, k değişken sayısını p ise merkez (center) noktasının tekrar sayısını ifade etmektedir (Narendaran vd., 2019). CCD'de her faktör için 5 seviye

belirlenmektedir ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). $-\alpha$; yıldız noktayı (en düşük seviye), -1 ; faktöriyel noktayı, 0 ; merkez noktayı, $+1$; faktöriyel noktayı ve $+\alpha$; yıldız noktayı (en yüksek seviye) temsil etmektedir (Mousavi vd., 2019).

b) Box-Behnken Tasarım (Box-Behnken Design)

1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilen bu tasarımda üç veya daha fazla değişkenli sistemler üç farklı seviyede incelenecek şekilde bir matris kullanılır. CCD ile kıyaslandığında oldukça avantajlı bir yöntem olan Box-Behnken tasarımında deney sayısı $2k(k-1)+nc$ formülü ile belirlenir. Burada k değişken sayısını, nc merkez noktasındaki deney sayısını ifade etmektedir (Narenderan vd., 2019). Tasarım 4 temel aşamada gerçekleştirilir:

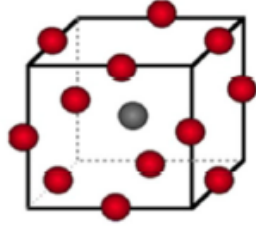
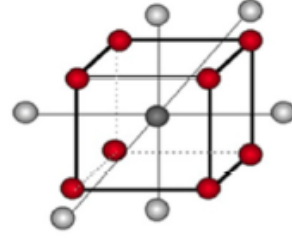
1. Seçilen değişkenlere göre deney planı hazırlanır.
2. İstatistiksel olarak tasarlanmış deneyler yapılır.
3. Matematiksel modeldeki katsayılar tahmin edilir ve modelin doğruluğu kontrol edilir.
4. Optimal koşulları tahmin etmek için cevap analizi yapılır ve bu tahminler deneysel olarak onaylanır.

Bu tasarım tüm küresel tasarımları içermesi ve yalnızca 3 seviyeli bir çalışma gerektirmesi açısından avantaj sağlamaktadır (Ferreira vd., 2017).

CCD ve Box-Behnken tasarımları kıyaslandığında aynı şartlarda Box-Behnken tasarımı daha az deney sayısı gerektirmektedir. Bu tasarımda her bir değişken ayrı ayrı 3 farklı seviyede incelenebilmektedir ve tüm değişkenler için alt ve üst sınırlar aynı anda hiçbir zaman kapsamadığı için, uç değerlerin yaratacağı tatmin edici olmayan sonuçlar engellenmiş olur (Mousavi vd., 2018; Narenderan vd., 2019; Wang ve Wan, 2009).

Şekil 2.29 da 3 seviyeli bir tasarımda CCD ve Box-Behnken tasarımların şematik gösterimi incelenmiştir.

Box-Behnken Tasarımlar

Merkezi Kompozit Tasarımlar
Central Composite Design (CCD)

Şekil 2.29 Merkezi Kompozit Tasarım (CCD) ve Box-Behnken Tasarımın 3 seviyeli bir tasarım için şematik gösterimi (Mousavi vd., 2019)

Tablo 2.5' te faktöriyel tasarım, CCD ve Box-Behnken için yine 3 seviyeli bir tasarımda geçerli olan deney sayıları kıyaslanarak gösterilmiştir. Burada '-', 0, + ve α değerleri farklı değişken seviyelerini ifade etmektedir. Eksi (-) düşük seviyeyi, sıfır (0) merkez noktayı, artı (+) yüksek seviyeyi ve CCD için $-\alpha$; yıldız noktayı yani en düşük seviyeyi, $+\alpha$; yıldız noktayı yani en yüksek seviyeyi temsil etmektedir.

Tablo 2.5 Faktöriyel, Merkezi kompozit (CCD) ve Box-Behnken tasarımlarda deney sayılarının kıyaslanması

Deney sayısı	Faktöriyel Tasarım			CCD			Box-Behnken Tasarım		
	Değişkenler			Değişkenler			Değişkenler		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	+	+	+	+	+	+	-	-	0
2	+	+	-	+	+	-	+	-	0
3	+	-	-	+	-	-	-	+	0
4	-	-	+	-	-	+	+	+	0
5	-	+	+	-	+	+	-	0	-
6	-	+	-	-	+	-	+	0	-
7	+	-	+	+	-	+	-	0	+
8	-	-	-	-	-	-	+	0	+
9				0	0	0	0	-	-
10				0	0	0	0	+	-
11				0	0	0	0	-	+
12				0	0	0	0	+	+
13				0	0	0	0	0	0
14				0	0	0	0	0	0
15				$-\alpha$	0	0	0	0	0
16				$+\alpha$	0	0	0	0	0
17				0	$-\alpha$	0	0	0	0
18				0	$+\alpha$	0			
19				0	0	$-\alpha$			
20				0	0	$+\alpha$			

c) Doehlert Tasarım (Doehlert Design)

Doehlert tarafından 1970'lerde önerilen bu kullanışlı tasarımda deneysel noktalar küresel bir kabuk üzerine dağıtılır. Tasarımda ortagonal ya da rotasyonel hareketler olmaksızın verilen değişken alanı son derece düzgün bir biçimde doldurulmaya çalışılır. Tüm bitişik deneysel noktalar eşit mesafelerle yerleştirilir. Toplam deney sayısı $2k+k+nc$ formülü ile bulunur, burada k , değişken sayısını, nc ise merkez noktadaki deney sayısını ifade eder (Mousavi vd., 2018; Narenderan vd., 2019).

d) D-optimal Tasarım (D-optimal Design)

Tasarım noktalarının optimal dağılımlarının hesaplanabildiği bu yöntem aynı sayıda değişkenli tam faktöriyel tasarımdan daha az deney ile aynı hassasiyette sonuç verebilmektedir (Narenderan vd., 2019). Hem tarama tasarımlarında hem de cevap yüzey tasarımlarında kullanılabilmesi bu yöntemin avantajlarından olmasına rağmen tarama amaçlı kullanımı pek yaygın değildir (Mousavi vd., 2018).

e) Karışım Tasarımlar (Mixture Design)

Tasarımda analiz edilecek değişkenler bir karışımın elemanları olduğunda, bu değişkenlerin seviyelerini birbirinden bağımsız ele almak mümkün değildir. Bu durumda karışım tasarımları kullanmak gerekmektedir. Burada mevcut tasarım alanı üç boyutlu değişken alanında bir üçgen düzlemdir (Candioti vd., 2014).

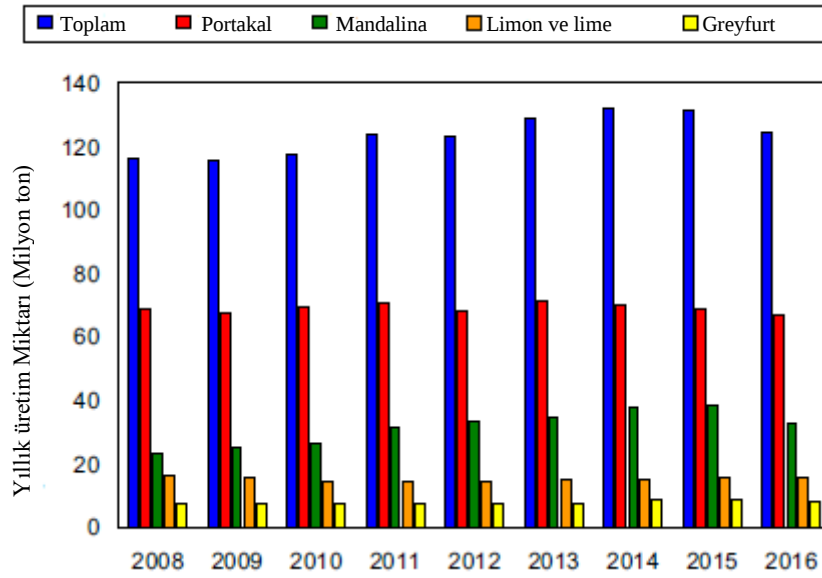
2.5 Turunçgiller ve Özellikleri

Turunçgiller, '*Rutaceae (Sedef otugiller)*' ailesine ait dünyanın en önemli meyve gruplarındadır (Zou vd., 2016). Tropikal, subtropikal ve ılıman iklim çeşitlerine göre dağılmış yaklaşık 40 farklı çeşit turunçgilden bahsetmek mümkündür. Doğal ve yapay melezleme yoluyla elde edilen birçok türe rastalamak mümkündür. Özellikle beslenmede yaygın olarak yer alan portakal, greyfurt, mandalina, limon, lime gibi çeşitlerinin yanında turunç, bergamot, kumkuat, şadok, pamelö, yuzu ve ağaç kavunu gibi türlerde bu aileye aittir (Assefa vd., 2016; Singh vd., 2020; Wang vd., 2017).

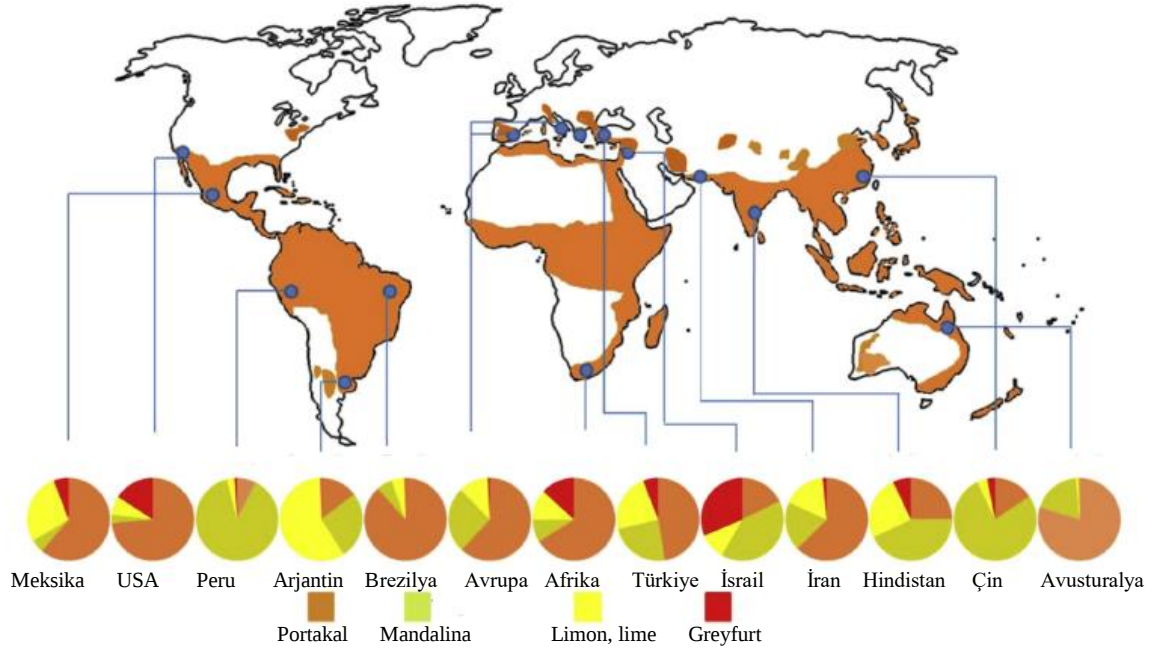
Oldukça lezzetli olan bu meyve grubu besin değeri açısından da önem taşımaktadır. Yapılan araştırmalar turunçgillerin antioksidan, antikanser, anti-enflamasyon, anti-

diyabetik özellikler gibi çeşitli biyoaktif özellikler taşıdığını ortaya çıkartmıştır (Wang vd., 2017). Bu özellikleri, içeriklerinde bulunan büyüme ve gelişmeye katkı sağlayan mineral, vitamin ve lif kaynakları yanında biyoaktif özellikteki flavonoid ve karotenoid gibi önemli bileşiklerden gelmektedir (Sharma vd., 2017).

2016 yılı istatistik verilerine bakıldığında turuncğil ya da narenciye olarak bilinen bu meyve ailesinin çeşitli türlerinin üretiminin dünyada yaklaşık 124.24 milyon tonu bulunduğu görülmektedir (Şekil 2.30). Brezilya, Çin, Amerika, Meksika, Hindistan, İspanya, İran, İtalya, Nijerya ve Türkiye üretimde dünyada ilk 10 sırayı oluşturan ülkelerdir (Singh vd., 2020). Çeşitli türlerin ülkelere göre üretim miktarları Şekil 2.31’de şematize edilmiştir.



Şekil 2.30 Turuncğillerden bazılarının dünyaca üretim miktarlarının yıllara göre dağılımı (Zema vd., 2018)



Şekil 2.31 Bazı turunçgil türlerinin ülkelere göre üretim miktarları (Sharma vd., 2017)

2.5.1 Türkiye’de Turunçgil Üretimi

Ilıman iklimde yetişen turunçgillerin, yurdumuzda en fazla Akdeniz ve Ege Bölgeleri’nde yetiştiriciliği yapılmakta, ayrıca az da olsa Marmara ve Doğu Karadeniz Bölgeleri’nde de üretimi gerçekleştirilmektedir. Türkiye 2016 yılında yaklaşık 51 milyon ton yaş meyve ve sebze üretim miktarı ile önemli bir üretici ülke konumunda yer almaktadır (TÜİK, 2017). Tarım ürünleri ihracatı incelendiğinde %12 pay alan yaş meyve sebze ürünlerinin yaklaşık %5’ini turunçgillerin oluşturduğu görülmektedir (Uysal ve Polatöz, 2016). Yaş meyve sebze ihracatı içerisinde ise turunçgillerin payı yaklaşık %44 düzeyindedir (TİM, 2017).

Türkiye’nin turunçgil üretimi son on yılda %44’lük artışla yaklaşık 4,29 milyon ton seviyesine ulaşmıştır. 2007 yılında toplam turunçgil üretim alanı 111 bin hektar iken, %23 artışla 2016 yılında 135 bin hektar alana çıkmıştır (TÜİK, 2017).

Birçok çeşiti olmasına rağmen üretim ve tüketim oranlarına bakıldığında ilk sıralarda portakal, mandalina ve limonun geldiği görülmektedir.

2018 yılında Türkiye’de yaklaşık 4,9 milyon ton olan turunçgil üretiminin %39’unun portakala ait olduğu görülmüştür. TÜİK verilerine göre; kişi başı portakal tüketimi 2017/2018 sezonunda 10,8 kg olarak belirlenmiştir (TEPGE, 2019).

Limon üretimine bakıldığında, Türkiye’de yaklaşık 360 bin dekar alanda limon üretimi yapıldığı görülür, bu alanlarının % 51’i Mersin’de, %33’ü ise Adana’da bulunmaktadır. 1961 yılında 70 ton olan limon üretiminin günümüzde yaklaşık onbeş kat artış gösterdiği bilinmektedir (TÜİK, 2017) .

Türkiye’de 2015/2016 üretim sezonunda 1 milyon 156 bin ton mandalina üretimi gerçekleşmiş olup, üretimin %84’ü Akdeniz, %14’ü Ege Bölgesi’nden karşılanmaktadır. İllere göre mandalina üretimine bakıldığında ise, aynı sezonda %45 üretim payı ile Hatay’ın Türkiye mandalina üretiminde ilk sırada yer aldığı görülmektedir (TEPGE, 2017).

Tablo 2.6’da TÜİK verilerine göre ülkemizde 2016 yılında üretilen turunçgil çeşitleri, dikim alanı, üretim, verim ve ağaç sayısı görülmektedir.

Tablo 2.6 Türkiye’de turunçgil dikim alanı, üretim, verim ve ağaç sayısı

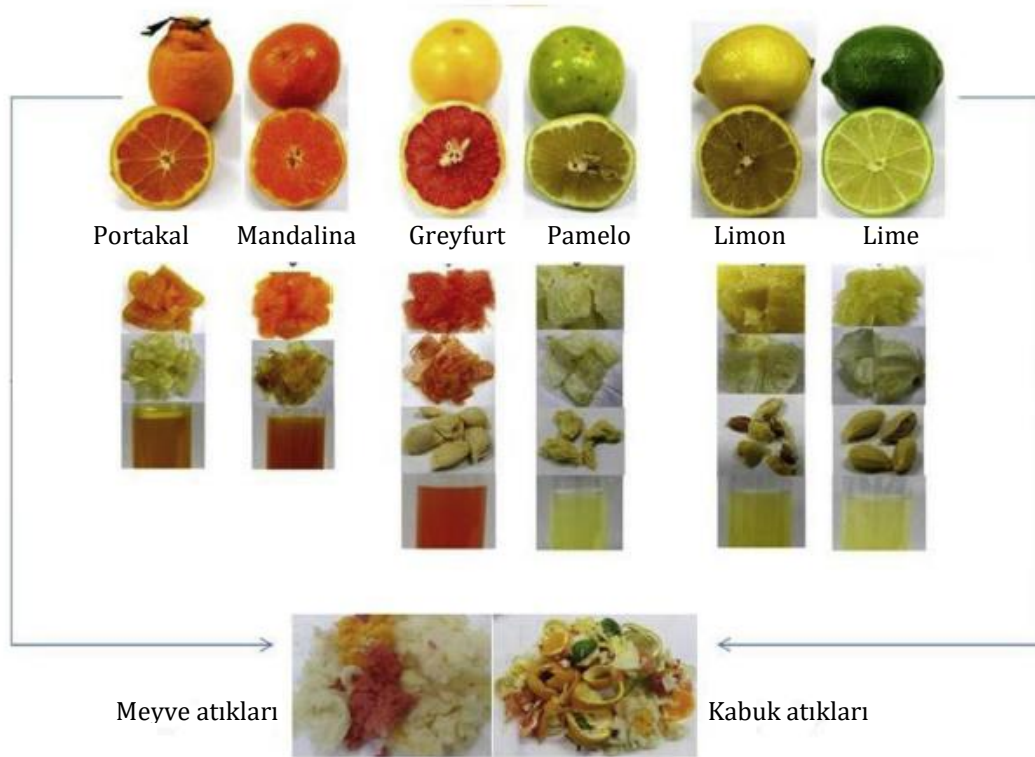
Ürün Adı	Toplu Meyvelik Alanı (Bin dekar)	Üretim (Bin ton)	Ağaç Başına Ortalama Verim (kg)	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (Bin adet)	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (Bin adet)	Toplam Ağaç Sayısı (Bin adet)
Toplam Portakal	527	1.850	-	13.860	700	14.562
Portakal (Washington)	375	1.358	136	9.950	438	10.388
Portakal (Yafa)	19	71	124	574	45	619
Portakal (Diğer)	132	421	126	3.337	217	3.554
Toplam Mandalina	466	1.377	-	13.305	2.901	16.206
Mandalina (Satsuma)	234	795	110	7.259	968	8.227
Mandalina (Clementin)	28	95	106	899	71	970
Mandalina (King)	2	6	116	51	4	55
Mandalina (diğer)	202	441	86	5.096	1.859	6.955
Limon	300	851	96	8.820	1.225	10.045
Geyfurt	62	253	181	1.395	75	1.473
Turunç	0	2	40	57	23	80
Toplam	1.355	4.293	-	37.437	4.927	42.365

2.5.2 Turunçgillerin Anatomik Yapısı

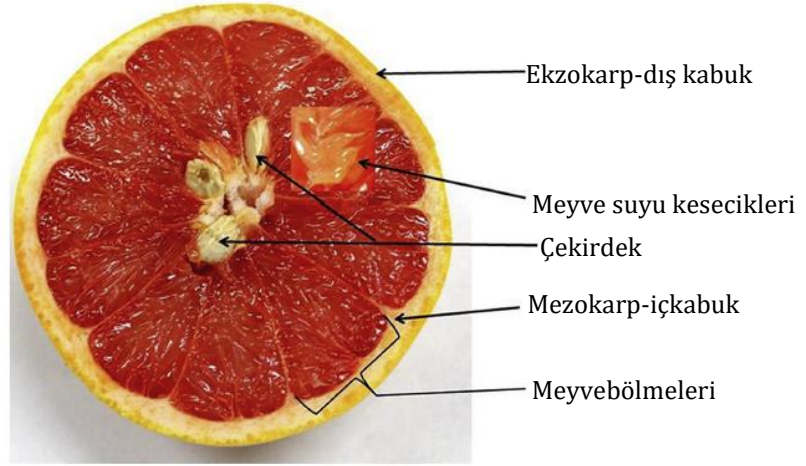
Kendilerine özgü harika kokuları ile bilinen turunçgillerin tıbbi etkileri yüzyıllardır bilinir. Genel anatomik yapıları turunçgilin türüne, çeşitine, olgunluk derecesine ve kalitesine göre farklılıklar göstermektedir.

Dünyada yaygın olarak üretilen bazı türlerin meyve, çekirdek, su ve kabuk gibi çeşitli kısımları Şekil 2.32’de gösterilmiştir.

Genel olarak bir turunçgil en dışta ekzokarp denilen bir dış kabuk, hemen ardında mezokarp denilen çok tabakalı bir orta kabuk, meyve kısmı ve burada bulunan meyve suyu kesecikleri, tohum da olabilen çekirdek kısımlarından oluşmaktadır. Tüm bu kısımlar Şekil 2.33’te verilmektedir.



Şekil 2.32 Bazı turunçgil türlerinin meyve, çekirdek, su ve kabuk kısımları (Sharma vd., 2017)



Şekil 2.33 Turunçgillerin anatomik yapısı (Sharma vd., 2017)

2.5.3 Turunçgillerin İçerdikleri Biyoaktif Bileşikler

Turunçgillerin bileşimi yetiştiği bölgenin özelliklerinden, iklim şartlarından, büyüme ve olgunlaşma şartlarından etkilenmektedir (Sharma vd., 2017). Büyüme aşamasında hidroksibenzoik asit, hidroksisinamik asit gibi düşük ağırlıklı fenolik bileşikler, asetofenonlar, terpenoidler, flavonoidler, stilbenler ve tannenler gibi çeşitli fitokimyasal oluşur. Oluşan bu fitokimyasallar daha sonra turunçgil hücrelerinde birikir. Genel olarak tüm turunçgiller oleik, linoleik, linolenik, stearik asit, gliserol gibi lipidler, glukoz, fruktoz, sukroz gibi şekerler ve genellikle sitrik ve malik asit gibi asitler içerirler. Bu temel bileşiklerin yanında benzoik, okzalik, süksinik asitler, selüloz, pektin gibi suda çözünmeyen karbonhidratlar, pektinesteraz, fosfataz, peroksidaz gibi temel enzimler, hesperidin, naringin gibi flavonoidler, çeşitli kabuk yağları, alkol, aldehit, keton ve hidrokarbon türevi çeşitli uçucu yağlar, karoten ve ksantofiller gibi pigmentler, temelde askorbik asit ve B vitamini kompleksleri gibi vitaminler ve kalsiyum ve potasyum gibi minerallerden oluşan zengin bir içeriğe sahiptirler (Ajikumaran Nair vd., 2018; Khan vd., 2014; Mahato vd., 2018; Sharma vd., 2017; Zou, 2016).

Turunçgillerin yapılarında bulunan biyoaktif bileşikler Tablo 2.7’de verilmiştir.

Tablo 2.7 Turunçgillerin içerdikleri biyoaktif bileşikler

Biyoaktif Bileşikler	Flavonoidler	1.Flavononlar (Hesperidin, naringin, neohesperidin) 2.Flavonlar (Apigenin, diosmetin, luteolin) 3.Antosiyaninler
	Karbonhidratlar/Şekerler	1.İndirgen şekerler (Glukoz, früktoz, galaktoz) 2.İndirgen olmayan şekerler (Sükroz, threaloz)
	Polisakkaritler	Pektin, ksilan, glukozan, galaktan, araban
	Uçucu tat vericiler	Aroma ve esans yağları
	Lipitler/Yağ asitleri	Palmitik, sterarik, oleik, linoleik, linolenik asit
	Karotenoidler	Lutein, β-karoten, likopen, zeaksantin, retinal
	Azotlu Türler	Çeşitli nitratlar
	Vitaminler	Askorbik asit, niasin, riboflavin, tiamin
	Polifenoller	Fenolik asitler, kumarin
	Organik Asitler	Sitrik asit, malik asit, süksünik asit
	Limonoidler	Limonin, lominin, limonoik asit

2.5.4 Atık Turunçgil Kabuklarının Özellikleri ve Kullanım Alanları

Dünyada turunçgil üretim miktarlarına bakıldığında yılda yaklaşık 15×10^6 ton turunçgil atığının olduğu bilinmektedir (Shofinita vd., 2015). Bu atıkların yaklaşık % 34'ü meyve suyu endüstrisinde oluşmaktadır (Ajikumaran Nair vd., 2018).

Turunçgil kütlesinin yaklaşık %40-50'si kabuktan oluşmaktadır. Özellikle meyveli ürün ve meyve suyu endüstrilerinde çokça kullanılan turunçgillerin kabukları birer atık olarak düşünülse de aslında içerdikleri yüksek miktarda flavonoid ve karotenoid türevleri onları kıymetli kılmaktadır (Shofinita vd., 2015; Singh vd., 2020). Bu atıklar özellikle gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır. Endüstriyel ve evsel bir atık olan turunçgil kabuklarının en önemli avantajları ekonomik ve doğal olmasıdır. Gıda sektöründe, kimyasal koruyucular yerine kullanılabileceği gibi sağlığa olumlu etkili fonksiyonel gıdaların hazırlanmasında da bu atıkların kullanımı mümkündür. Birçok farmasötik etkili ürün turunçgil atıkları kullanılarak hazırlanabilir dolayısıyla ilaç sektöründe kullanımları mümkündür.

Turunçgil kabukları tıpkı meyvenin yenilebilen kısımlarında olduğu gibi hücreyi serbest radikal etkilerine karşı koruma özelliği olan polifenolik bileşikler açısından oldukça zengindir. Flavonoidler ve fenolik bileşikler bu grubun en önemli ve etkili üyeleridir. Biyoaktif önemli bileşikler olan flavonoidler ve fenolik bileşiklerin

atıklardan izolasyonunda çeşitli katı-sıvı ve sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar meyve kabuğu ekstraktlarının bir arada bulundukları tüm biyokatif bileşiklerin etkisi ile çok etkili antioksidan özellikler taşıdığını göstermiştir. Ancak aynı amaçla tek tek izole edilerek kullanılan polifenolik bileşiklerin etkisinin kabuk ekstraktlarından oldukça düşük olduğu da bilinmektedir.

Turunçgil kabuklarının içerdikleri önemli biyoaktif bileşiklerden biri de fenolik asitlerdir ve meyvenin tamamı incelendiğinde kabuklarda fenolik asit miktarlarının yenen kısımlara kıyasla daha fazla olduğu görülmüştür. Limon, portakal, mandalina ve greyfurt gibi yaygın turunçgillerin kabuklarında bulunan fenolik asitlerin en önemli üyesi ferulik asittir.

Bunlara ek olarak kabuklar, flavonon, flavon, flavonol ve antosiyaninlerden oluşan flavonoid miktarları açısından oldukça zengindir. İçerdikleri flavonoid miktarları turunçgil kabukları arasında farklılık gösterdiği gibi aynı türün olgunlaşma zamanına göre de değişkenlik gösterebilmektedir.

Antioksidan özellikler bakımından önemli bir diğer grup olan uçucu yağlar açısından da zengin olan turunçgil kabukları bu grubun en etkili üyeleri olan çeşitli aldehit, ester, alkol ve asitleri içerisinde bulundurmaktadır. Taze turunçgil kabuklarının kütlesinin %0.5-5'inin uçucu aromatik bileşiklerden oluştuğu bilinmektedir (Singh vd., 2020).

Portakal, limon, mandalina ve greyfurtun içerdikleri flavonoidler, fenolik asitler ve uçucu aromatik bileşikler Tablo 2.8'de görülmektedir.

Tüm bu önemli özellikleri ile çeşitli endüstrilerde kullanılmakta olan turunçgil kabuklarının fermentasyon yöntemleri ile biyoyakıt üretiminde de kullanıldığı bilinmektedir (Ledesma-Escobar ve María D. Luque de Castro, 2014).

Tablo 2.8 Turunçgillerin içerdikleri flavonoid, fenolik asit ve uçucu bileşikler

Bileşik	Portakal	Limon	Greyfurt	Mandalina
Flavonoidler				
Skopoletin			+	
Dihidrokuersetin				+
Dihidrokaemferol			+	+
Kuersetin	+	+	+	+
Dihidroizorhamnetin	+	+	+	+
Luteolin	+	+	+	+
Naringenin	+	+	+	+
Apigenin	+	+	+	+
İzohamnetin	+	+		+
Diosmetin	+	+		+
Eriyodiktiyol	+	+		+
Hesperetin	+	+	+	+
Homoeriyodiktiyol		+	+	+
İzohamnetin	+	+		+
Krisoeriyol		+		+
Tamariksetin		+		+
Kaempferol	+		+	+
İzosakuranetin	+	+	+	+
Fenolik Asitler				
Sinapik	+	+	+	+
Ferulik	+	+	+	+
<i>p</i> -hidroksibenzoik	+	+	+	+
vanilik	+	+	+	+
<i>p</i> -kumarik	+	+	+	+
Kafeik	+	+	+	+
Gallik	+	+	+	+
Uçucu Bileşikler (%)				
Limonen	91,38	56,04	88,65	86,59
Linalool	1,21	12,56	0,95	1,65
β -mirsen	2,93	2,14	4,18	2,92
γ -terpinen	0,05	6,99	0,05	4,08
2- β -pinen	0,06	7,44	0,05	0,46
1R- α -pinen	0,87	1,70	1,20	1,34
α -terpineol	0,25	1,77	0,34	0,56
Linalil asetat	0,00	2,95	0,00	0,08
ϵ -sitral	0,29	1,37	0,51	0,04
Sabinen	0,49	0,53	0,50	0,31

2.5.5 Turunçgillerle Yapılan Önceki Çalışmalar

Önceki çalışmalar incelendiğinde doğal antioksidan kaynağı olarak bilinen birçok bitki, baharat ve meyvenin uzun yıllardır çalışmalara konu olduğu görülmektedir. Turunçgiller de içerdikleri antioksidan etkili organik bileşikler nedeni ile birçok çalışmada yer almıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar turunçgillerin farklı türlerine ilişkin hem meyve hem de atık kabuk kısımlarının antioksidan aktivite yönünden incelenmesine ait çeşitli sonuçlar içermektedir.

Ma vd., 2008 yılında yaptıkları çalışmada turunçgil kabuklarının antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik madde miktarını ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanarak incelemişlerdir. Optimizasyon da yapmayı amaçladıkları çalışmada ekstraksiyon şartlarını etkileyen parametrelerden ultrases cihazının gücü, sıcaklık ve süre değişkenlerinin antioksidan aktiviteye etkisini araştırmışlardır. Sonuçları değerlendirdiklerinde 42-45 W güçte, 23-25 dak ve 31-34 °C aralığında optimal koşullara ulaşmışlardır.

Dahmoune vd., 2013 yılında atık limon kabuklarını kullanarak mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerini kullanarak antioksidan özellikler açısından optimum şartları belirlemeye çalışmışlardır. Süre, ekstraksiyon için kullanılan sıvı/katı oranı (S/K) ve ekstraksiyon çözeltisindeki etanol oranı açısından inceleme yaptıkları çalışmada sırasıyla 15,05 dak, 40 mL/g S/K ve % 63,93 etanol oranı için uygun koşullara ulaşmışlardır.

Zeng vd., 2015 yılında kumkuat polisakkaritlerinin UAE ile elde edilen ekstraktları için yaptıkları çalışmada optimal şartların 171 W güç, 50 °C sıcaklık, 32 mL/g S/K oranı ve 87 dak için sağlandığı sonucuna varmışlardır.

Benzer bir çalışmada greyfurt kabukları ile çalışan Wang vd. (2015) optimizasyon için gerekli şartların 12,56 W güç, 66.71 °C sıcaklık, 27,95 dak değerleri ile sağlandığını belirlemişlerdir.

Assefa vd. (2017) Doğu Asya kökenli bir turunçgil türü olan yuzu meyvesi ile antioksidan aktivite tayini ve optimizasyon çalışması yapmışlar ve ekstraksiyon için kullanılan S/K oranı, süre ve sıcaklık etkisini incelemişlerdir. 37,168 mL/g S/K oranı, 119,67 dak ve 43.864 °C için optimal koşulların sağlandığını kaydetmişlerdir.

Nipornram vd. (2018) düşük güçte ultrases destekli ekstraksiyon işlemi ile mandalina kabuklarını fenolik madde miktarı açısından incelemişlerdir. Sıcaklık, süre ve ultrasonik gücün etkisinin incelendiği çalışmada 48 °C, 56,51 W ve 40 dak için optimal koşulların sağlandığı belirtilmiştir.

Hosseini vd., 2019 yılında ekşi portakal kabuklarından elde edilen pektin ekstraktları için ultrases destekli ekstraksiyon kullanarak optimizasyonu çalışmışlar ve ekstraksiyon şartlarında güç, süre ve pH etkisini incelemişlerdir. 150 W güç, 10 dak ve 1,5 pH ta optimal koşulların sağlandığını ifade etmişlerdir.

Tüm bu çalışmalar ışığında bu tez kapsamında da ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak turunçgil kabuklarından elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerine süre, ekstraksiyon çözücüsü oranı ve ekstraksiyon çözücüsü hacminin etkileri incelenmiş ve optimal ekstraksiyon koşulları belirlenmeye çalışılmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Materyal ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışması kapsamında antioksidan özelliklerin incelenmesi için standart antioksidanlar olan BHA, BHT, Troloks, kateşin, epikateşin, pirokateşol ve α -tokoferol kullanılmıştır. Kimyasallar HPLC saflıkta olarak Fluka, Sigma-Aldrich, Merck, Riedel-de Haen firmalarından temin edilmiştir. Tablo 3.1 kullanılan tüm kimyasallara ilişkin bilgileri içermektedir.

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasalın Adı	Üretici Firma/Katolog Numarası
BHA	Fluka / 20021
BHT	Fluka / 34750
Troloks	Fluka / 56510
Askorbik asit	Sigma - Aldrich / 33034
α -tokoferol	Fluka / 95240
Kateşin	Fluka / 22110
Pirokateşol	Merck / 822261
Epikateşin	Fluka / 45300
NaNO ₂	Merck / 106544
DPPH	Sigma / D9132
DMPD	Merck / 103067
ABTS	Sigma / A1888
EDTA	Merck / 108421

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Kimyasalın Adı	Üretici Firma/Katolog Numarası
TCA	Sigma - Aldrich / 33731
FeCl ₃	Fluka / 44943
FeCl ₂ .4H ₂ O	Fluka / 44939
Ferrozin	Fluka / 82950
Ninhidrin	Sigma / N4876
Prolin	Sigma / P5607
Linoleik asit	Aldrich / 62240
β-Karoten	Fluka / 22040
Sülfanilamid	Sigma - Aldrich / S9251
Naftiletilendiamin	Fluka / 70720
Sülfosalisilik asit	Merck / 800691
Sodyum nitroprusiyat dihidrat	Merck / 106541
Tween 20	Merck / 167657
Tween 40	Sigma / P1504
AlCl ₃ .6H ₂ O	Merck / 1084
NH ₄ SCN	Merck / 101213
NaOH	Riedel-de Haën / 06203
NaCl	Fluka / 71376
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haën / 04272
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Riedel-de Haën / 04269
KCl	Merck / 104935
K ₃ Fe(CN) ₆	Merck / 104973
KH ₂ PO ₄	Merck / 104871
K ₂ HPO ₄	Merck / 105104
K ₂ S ₂ O ₈	Merck / 105091
CH ₃ COONa	Sigma / S7545
CH ₃ COOH	Merck / 100063
CHCl ₃	Merck / 102431
Toluen	Riedel-de Haën / 24529
CH ₃ OH	Merck / 106007

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Kimyasalın Adı	Üretici Firma/Katolog Numarası
C ₂ H ₅ OH	Merck / 100971
CH ₃ COOC ₂ H ₅	Merck / 109623
HCl	Sigma - Aldrich / 07102
H ₃ PO ₄	Merck / 100573
Sodyum karbonat	Riedel-de Haën / 13418
Folin & Ciocalteu Reaktifi	Laboratuvarda sentezlendi
Sodyum-tungstat-2-hidrat	Riedel-de Haën / 14304
Sodyum molibdat dihidrat	Riedel-de Haën / 31439
Lityum sülfat dihidrat	Fluka / 62609
Brom	Merck / 1947
Tris	Merck / 108382
Asetilkolinesteraz	Sigma / C2888
Asetilkolin iyodür	Fluka / 01480
DTNB	Sigma / 01480
Calf Thymus DNA	Sigma / D1501

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

a) Antioksidan aktivite tayininde gerekli spektrofotometrik ölçümler için;

- Shimadzu UVmini-1240 UV/VIS spektrofotometre
- Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotometre

b) Yöntemlerin gerektirdiği kimyasal çözeltilerin ve hazırlanması için;

- Chiltern Hotplate HS31 manyetik karıştırıcı
- IKA MS3 Basic vorteks
- Termal N11150M

c) Tampon çözeltilerin hazırlanmasında pH kontrolü için;

- Sartorius Basic Meter PB-11 pH metre

d) Santrifüjleme işlemleri için;

- Sigma 3K30 santrifüj
- Hettich EBA-20 santrifüj

e) İnkübasyon için;

- GFL 1086 çalkalamalı su banyosu

f) Kimyasalların tartımı için;

- Sartorius Extend ED224S tartı
- Sartorius LE623S tartı

g) Distile su temini için;

- ELGA LA620 distile su cihazı

h) Ekstraktların hazırlanmasında kullanılacak ultrasonik banyo için;

- Alex Machine Ultrasonic Cleaner 660 W 32 kHz ultrasonik banyo

i) Turunçgil kabuklarının kurutulması ve ekstrakt çözücülerinin buharlaştırılması için;

- Memmert UFB 400 etüv

Marka ve özellikli cihazları kullanılmıştır.

3.2 Turunçgillerin Temini ve Analize Hazırlanması

3.2.1 Turunçgillerin Temin Edilmesi ve Hazırlanması

Tez çalışması kapsamında turunçgil çeşitlerinden dünyada ve ülkemizde en çok üretilen ve tüketilen türler olan portakal, mandalina ve limon kabukları kullanılmıştır. Tezin temel amaçlarından birinin atık değerlendirmesi olmasından dolayı evsel atık olarak çıkan kabuklar Aralık-Şubat aylarında toplanmıştır. Toplanan kabuklar yıkanıp temizlendikten sonra küçük parçalar halinde doğranmış

ve etüvde 40 °C sıcaklıkta 5 gün kurutulmuştur. Kurutulan kabuklar kahve öğütme makinasından geçirilerek toz haline getirilmiş ve ekstrelerin hazırlanmasında kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C'de saklanmıştır (Şekil 3.1) (Laghna-Benamrouche ve Madani, 2013).



Şekil 3.1 Turunçgil kabuklarının hazırlık aşamaları

3.2.2 Turunçgil Kabuğu Ekstrelerinin Hazırlanması

Tez kapsamında günümüzde değeri giderek artmakta olan atık değerlendirmesi ve geri dönüşüm konularına katkı sağlamak amacıyla turunçgil atıkları olarak ortaya çıkan kabuklar kullanılmıştır. Çevre korumasının esas alınması doğrultusunda ekstraksiyon yöntemleri arasından az miktartlı kimyasal çözücü ile kısa sürede sonuç verdiği bilinen Ultrases-destekli ekstraksiyon (UAE) yöntemi tercih edilmiştir. Ekstraksiyon şartlarının optimizasyonu için Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi seçilmiş ve ekstraksiyon şartları ile deney sayısı bu tasarımın kuralları çerçevesinde belirlenmiştir. Bu kapsamda ekstraksiyon için; ekstraksiyon süresi (dak), çözücü oranı (% su/aseton) ve çözücü miktarı (mL) olmak üzere üç farklı değişken seçilmiş, tasarım esaslarına göre en yüksek (+1), orta (0) ve en düşük (-1) olacak şekilde Tablo 3.2’de belirtilen üç farklı seviye seçilmiştir.

Ayrıca uygulanacak deney sayısına ilişkin ekstraksiyon şartları Tablo 3.3’de verilmiştir. Tablo 3.3’te verilen deney şartlarının her biri için 1 g turunçgil kabuğu tartılmış ve ultrases destekli ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Ekstraksiyon süresi tamamlandıktan sonra 15 dak 10.000 rpm hızda santrifüjleme yapıldıktan sonra alınan süpernatantların çözücüleri 37 °C’de uçurularak, elde edilen ekstreler analizlerde kullanılmak üzere buzdolabında +4 °C’de saklanmıştır (Şekil 3.2).

Tablo 3.2 Box-Behnken Tasarımı şartlarına uygun seçilen ekstraksiyon değişkenleri ve seviyeleri

Değişken	Değişken Sembolü	Değişken Seviyesi		
		En düşük (-1)	Orta (0)	En yüksek (+1)
Ekstraksiyon süresi (dak)	A	2	6	10
Çözücü oranı (% su/aseton)	B	0	50	100
Çözücü hacmi (mL)	C	10	15	20

Tablo 3.3 Deney sayısı ve ekstraksiyon şartları

Deney Sayısı	X ₁	X ₂	X ₃
	Eks. Süresi (dak)	Su/aseton oranı (%)	Çözücü Hacmi (mL)
1	2	0	15
2	10	0	15
3	2	100	15
4	10	100	15
5	2	50	10
6	10	50	10
7	2	50	20
8	10	50	20
9	6	0	10
10	6	100	10
11	6	0	20
12	6	100	20
13	6	50	15
14	6	50	15
15	6	50	15



Şekil 3.2 Hazırlanan ekstraktlar

Turunçgil kabuklarının ekstraksiyon verimlerine ilişkin bilgiler Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4 Ekstraksiyon verimleri

	Portakal Kabuğu	Mandalina Kabuğu	Limon Kabuğu
Deney No	% Verim		
1	3,15	1,92	4,66
2	2,26	2,26	2,50
3	13,16	9,72	15,68
4	21,40	16,16	10,76
5	17,74	14,26	15,67
6	22,20	23,46	15,00
7	28,60	38,09	10,00
8	29,50	36,70	22,84
9	2,10	0,70	3,14
10	15,05	8,03	13,38
11	2,70	2,03	2,90
12	4,10	18,15	21,28
13	29,10	29,02	19,80
14	25,80	24,29	19,87
15	24,50	24,55	18,00

3.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

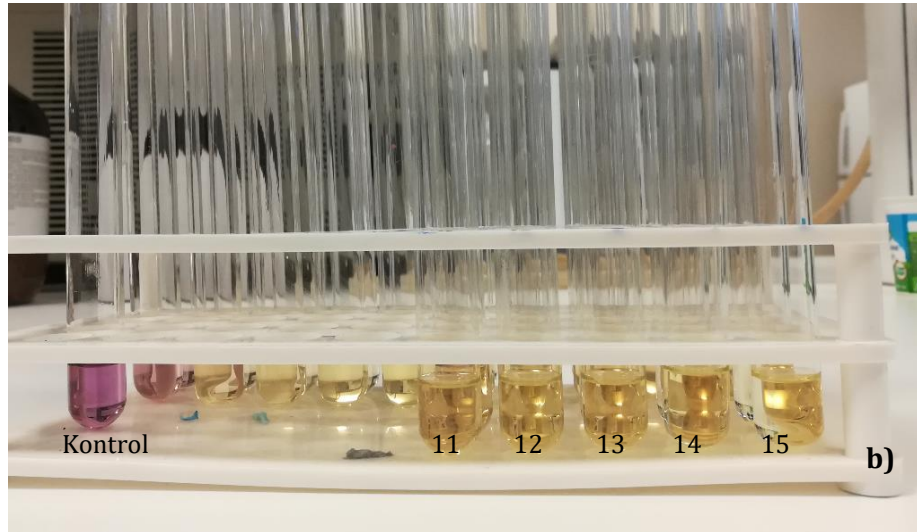
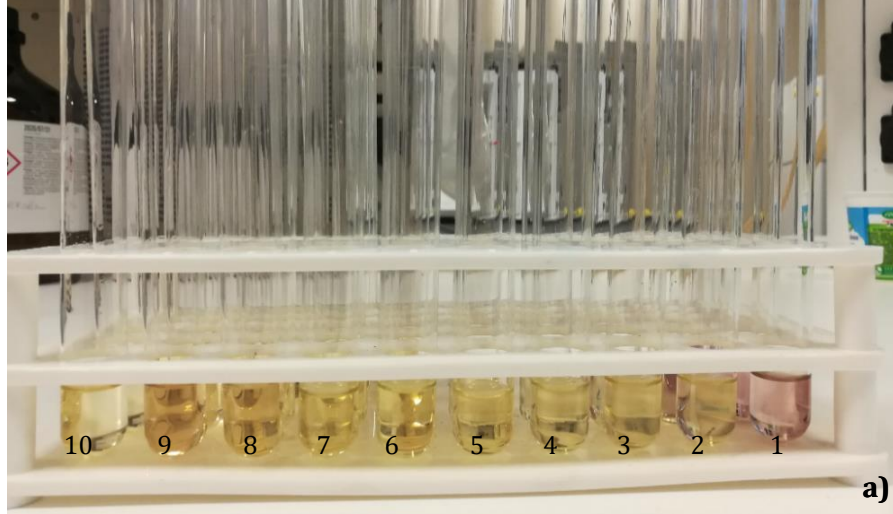
3.3.1 DPPH[•] (1,1'-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikali Yakalama Aktivitesi Tayini

DPPH radikali yakalama aktivitesi tayini ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğine göre mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açmasının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (İşbilir, 2008).

Bu test için Tablo 3.3' te belirlenen deney şartlarına göre hazırlanan her bir ekstrakttan 1000 µg/mL konsantrasyonunda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden 0,75 mL alınarak üzerine 1,5 mL DPPH (%2 w/v) çözeltisi eklenmiştir. 1,5 mL DPPH çözeltisi ile 0,75 mL H₂O ile kontrol çözeltisi hazırlanmış ve tüm çözeltiler iyice karıştırıldıktan sonra 30 dak karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme süresi tamamlandıktan sonra 517 nm'de alınan absorbans ölçümleri ile eşitlik 3.1' de verilen formülden % radikal giderme aktiviteleri hesaplanmıştır (Brand-Williams vd., 1995).

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ radikali yakalama etki (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0 \times 100] \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte A_0 : Kontrol çözeltisinin absorbansını, A_1 : standart ya da örnek absorbansını ifade etmektedir. Bu testte DPPH radikalinin mor rengindeki azalma ile ölçülen absorbans değeri doğru orantılı olarak azalırken, azalan absorbans yüksek radikal yakalama aktivitesinin göstergesidir. Turunçgil kabukları ile yapılan bu testte 1-15 no'lu ekstraktların renk değişimine ilişkin görsel Şekil 3.3'te verilmiştir.



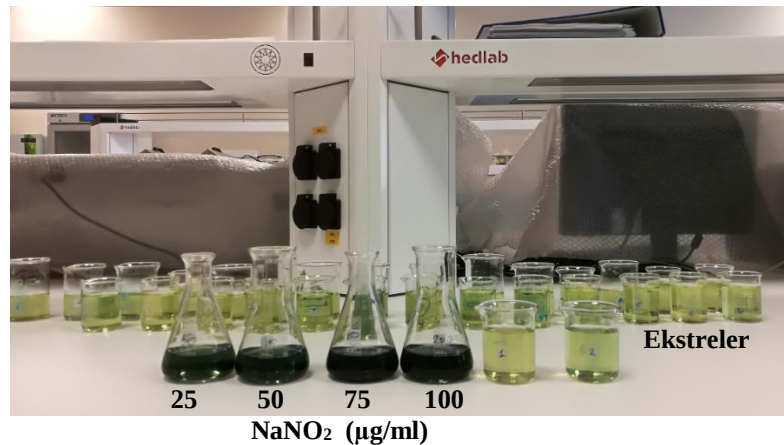
Şekil 3.3 DPPH yakalama aktivitesi tayininde renk değişimi

3.3.2 Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı belirlenirken Slinkard-Singleton (1977) yönteminden yararlanılmıştır. Yöntemde kullanılan Folin-Ciocalteu reaktifi (FC) reaktifi fosfotungustik ($H_3PW_{12}O_{40}$) ve fosfomolibdik ($H_3PMo_{12}O_{40}$) asitlerin karışımı olup fenol oksidasyonu sırasında bu oksitlerin mavi renkli bileşiklere indirgendiği bilinmektedir. Bu renk değişimi polifenolik bileşik miktarı ile orantılı olup 760 nm’de spektrofotometrede takip edilebilir. Polifenol miktarı genellikle gallik asit veya kateşol ekivalenti olarak ifade edilir (İşbilir, 2008).

Tüm ekstraktların 1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda hazırlanan örneklerinden 1 mL alınıp, destile su ile hacimler 46 mL’ye tamamlandıktan sonra 1 mL FC reaktifi eklenmiştir. 3 dakika sonra % 2’lik Na_2CO_3 çözeltisi ilave edilip oda koşullarında 2 saat düzenli olarak karıştırılmıştır. Örnek yerine destile su içeren kör denemeye karşı, 760 nm’de absorbanslar ölçülmüştür (Slinkard ve Singleton, 1977).

25-100 $\mu\text{g/mL}$ arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart pirokateşol çözeltilerine FC reaktifi ile toplam fenolik madde tayini uygulanmış, okunan absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen pirokateşol standart grafiğinin denkleminde, örneklerin toplam fenolik madde miktarları μg pirokateşol ($\mu\text{g PKE/mg}$ ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanmıştır. Turunçgil kabukları ile yapılan bu testte ekstraktların ve $NaNO_2$ çözeltilerinin görüntüsüne ilişkin görsel Şekil 3.6’da verilmiştir.



Şekil 3.4 Ekstrelerin ve $NaNO_2$ ’nin reaktifler eklendikten sonraki görüntüsü

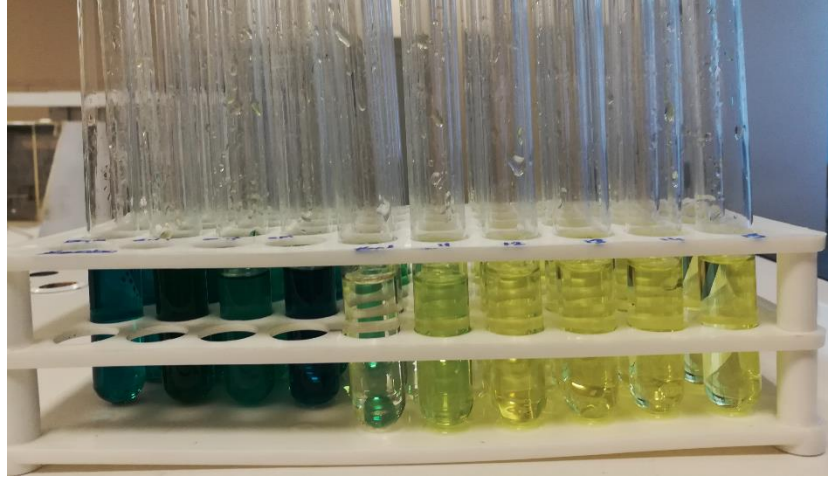
3.3.3 Toplam Flavonoid Miktarı Tayini

Toplam flavonoid içeriği tayininde Zhishen (1999) tarafından geliştirilen kolorimetrik metod kullanılmıştır. Standart olarak kullanılan (+)-kateşin konsantrasyonu 25-100 µg/mL arasında hazırlanarak çalışılmıştır.

Ekstrelerin 1000 µg/mL konsantrasyonda hazırlanan örneklerinden 0,25 mL alınıp, ardından 1,25 mL destile su ve 75 µL sodyum nitrit çözeltisi (%5) ilave edilerek 6 dak bekletilmiştir. Flavonoid-alüminyum kompleksi oluşturmak üzere 150 µL alüminyum klorür çözeltisi (%10) eklenip, 5 dak karıştırılmıştır. Karışıma 2,5 mL NaOH çözeltisi (1M) ilave edilip üzerine 2,5 mL destile su ilave edilmiştir. İyice karıştırıldıktan sonra 510 nm de absorbansda alınan absorbans değerleri kaydedilerek, sonuçlar absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen kateşin standart grafiği denkleminde, örneklerin toplam flavonoid miktarları µg kateşin (µg KE/mg ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanarak verilmiştir (Zhisen vd., 1999).

3.3.4 İndirgeme Gücü Tayini

İndirgeme gücü tayini için Oyaizu (1986) yöntemi kullanılmıştır. 1000 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstraktlara 2,5 mL fosfat tamponu (0,2 M, 6,6 pH) ve 2,5 mL potasyum ferrisiyanid [$K_3Fe(CN)_6$] (%1, w/v) eklenmiş ardından 30 dak 50 °C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon işleminden sonra karışıma 2,5 mL trikloroasetik asit (%10, w/v) eklenip, 3000 rpm hızda 10 dak santrifüjlendikten sonra alınan 2,5 mL süpernatant üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL $FeCl_3$ (%0,1 w/v) ilave edilmiş ardından 700 nm de absorbanslar ölçülmüştür. Bu testte reaksiyon başlangıcında mevcut yeşil renk mavi-yeşile dönüşmektedir. Açığa çıkan potasyum ferrosiyanür bileşiği, Fe^{3+} ile bir kompleks oluşturarak renkli çözeltilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Karışımlar için ölçülen yüksek absorbans kuvvetli indirgeme gücünü göstermektedir (Oyaizu, 1986). Turunçgil kabukları ile yapılan bu testte renk değişimine ilişkin görsel Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.5 İndirgeme gücü tayininde renk değişimi

3.3.5 Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini

Decker ve Welch'in 1990 yılında geliştirdiği yöntem kullanılarak yapılan test Ferrozin molekülünün Fe^{2+} atomu ile verdiği menekşe renkli kompleksin 562 nm'deki spesifik absorbands değerlerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

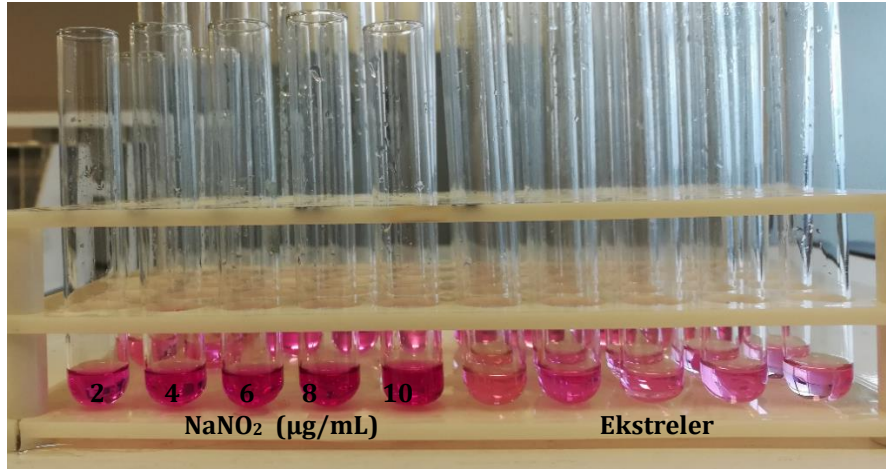
1000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda seyreltilen ekstrelerden alınan 1 mL üzerine 3,7 mL distile su, ardından 0,1 mL FeCl_2 (2 mM) eklenmiş ve karıştırılan örnekler, oda sıcaklığında 10 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Standart olarak çift dişli ve çok iyi bağlayıcı özellik gösteren bir ligand olan EDTA'nın kullanılmış ve reaksiyon sonunda 562 nm'deki absorbandsları ölçülmüştür (Decker ve Welch, 1990). Oluşan çözeltilerin absorbands değerleri Eşitlik 3.2'de verilen eşitlik de kullanılarak, Ferrozin ve Fe^{2+} arasında oluşan kompleksin inhibisyon yüzdesi hesaplanmıştır. Burada A_0 , kontrol çözeltisi olan EDTA'nın absorbandsını temsil ederken, A_1 e ekstrelerden hazırlanan örnekler ve standart antioksidanlara ait absorbandsı ifade etmektedir.

$$\text{Şelatlama aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (3.2)$$

3.3.6 NO (Nitrik Oksit) Yakalama Aktivitesi Tayini

Bu testte kullanılan yöntemde sulu çözeltide ve fizyolojik pH değerinde sodyum nitroprussiyatın herhangi bir müdahale olmaksızın NO• üretmesinden faydalanılmaktadır. Ortaya çıkan NO• radikali, bulunduğu ortamdaki oksijenle etkileşir ve ortaya NO₂⁻ iyonları çıkmaktadır. Tüm bu tepkimeler sonucunda ortaya çıkan NO₂⁻ de Griess reaktifi aracılığıyla pembe/kırmızı bir renk alır ve 570 nm’de ölçülen absorbans değeri ile ortamdaki NO•’in tayinine yardımcı olur.

Hazırlanan ekstraktlardan (1000 µg/mL) 4mL alınarak üzerine 1mL sodyum nitroprussiyat çözeltisi (10 mM, pH 7.4 fosfat tamponunda) eklenerek 37 °C’de 3 saat inkübe edilmiştir. İnkübe olan karışımdan 0,5 mL alınıp üzerine 0,5 mL Griess reaktifi (%5 H₃PO₄ ve %0.1 naftiletilediamin dihidroklorür de %1 sülfanilamid) eklenmiş ve 570 nm de absorbanslar ölçülmüştür. Standart olarak NaNO₂’nin 2-10 µg/mL çözeltileri kullanılmıştır. (Marcocci vd., 1994). Elde edilen absorbans değerleri sonucunda ekstraktların NO• radikali süpürme aktivitesi, nitrit konsantrasyonu cinsinden ifade edilmiştir. Ekstrelerin ve standartların reaktifler eklendikten sonraki görüntüsü Şekil 3.5’ te verilmiştir.



Şekil 3.6 Ekstrelerin ve standartların reaktifler eklendikten sonraki görüntüsü

3.3.7 β -Karoten Ağartma Testi

10 mL kloroformda yaklaşık 10 mg trans- β -karoten çözülüp bu çözeltiliden 0,2 mL alınarak içerisinde 20 mg linoleik asit ile 200 mg Tween-40 bulunan behere eklenmiştir. Kloroformu uzaklaştırılan karışıma 50 mL destile su ilavesinden sonra hızlıca karıştırılarak oluşan emülsiyondan 5 mL alınıp üzerine 0,2 mL (1000 μ g/mL) ekstrakt eklenmiş ve karışımlar 50 °C de su banyosunda bekletilerek 60. ve 120. dakikalarda 470 nm’ de absorbands değerleri ölçülmüştür (Bruni vd., 2004). Burada pozitif kontrol olarak BHA (bütillenmiş hidroksianisol) (1 mg/mL) ve negatif kontrol olarak linoleik asit β -karoten emülsiyonu kullanılmıştır. Relatif antioksidan aktivite (RAA) değerleri eşitlik 3.3’te verilen formülle hesaplanan sonuçlar kaydedilmiştir.

$$RAA = \text{Örneğin absorbands değeri} / \text{BHA çözeltisinin absorbands değeri} \quad (3.3)$$

3.3.8 DMPD⁺ (N,N'-dimetil-p-fenilendiamin diklorür) Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini

Ekstraktların DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi tayini için Fogliano vd.’nin metodu (1999) kullanılmıştır. Bu metotta asidik olan bir pH değerinde veya bir oksidan bulunan ortamda DMPD’nin 505 nm’de spesifik bir absorbands veren katyonik radikal formuna, yani DMPD⁺ radikaline dönüşmesi esası kullanılmaktadır.

100mM DMPD⁺ çözeltisi deiyonize su ile hazırlanıp, 50 mL 0,1 M asetat tamponuna (pH:5.3) hazırlanan DMPD⁺ çözeltisinden 0,5 mL ilave edilmiştir. Ardından bu karışıma 0,1 mL 0,05M FeCl₃ çözeltisi ilave edilerek radikal çözeltisi hazırlanmış, radikal çözeltisinden 1 mL alınıp 0,5 mL ekstrakt çözeltisi üzerine ilave edilip, 10 dak beklendikten sonra 505 nm de absorbandslar ölçülmüştür. Eşitlik 3.4’ te verilen formülden % radikal yakalama aktiviteleri hesaplanmıştır.

$$\text{DMPD}^+ \text{ radikal yakalama aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100 \quad (3.4)$$

Burada A₀, kontrol çözeltisi absorbandsını temsil ederken, A₁ e ekstrelerden hazırlanan örneklerle ve standart antioksidanlara ait absorbandsı ifade etmektedir.

3.3.9 ABTS⁺ (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) Radikal Yakalama Aktivitesi Tayini

ABTS katyon radikali yakalama aktivitesi tayini için Arnao yöntemi (2001) kullanılmıştır. 7,4 mM ABTS ve 2,6 mM potasyumpersülfat çözeltileri hazırlanıp herbirinden eşit hacimde karıştırılarak 12 saat karanlıkta bekletilmiş, 1 mL ABTS katyon çözeltisi metanol ile seyreltilerek absorban 734 nm de 1.1 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ekstraktlara (150 µL) 2,85 µL ABTS⁺ çözeltisi eklenip karanlıkta 2 saat bekletilmiş, lineer standart grafiği oluşturmak için konsantrasyonları 100-500 µM olarak hazırlanan Troloks çözeltileri ve ekstraktların 734 nm de absorbanları ölçülmüş ve sonuçlar µM Troloks eşdeğeri (TE)/g ekstrakt olarak ifade edilmiştir (Arnao vd., 2001).

3.4 Deneysel Tasarım

Bu tez kapsamında atık turuncgil kabuklarının ekstraksiyonu için klasik yöntemlerle kıyaslandığında kimyasal kullanımı, zaman ve maliyet açısından avantajlı olan ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin antioksidan kapasite için optimizasyon şartları belirlenmiştir.

Bu amaçla ekstraksiyon işleminde optimize edilmek istenen değişkenlerin tek tek ve birbirleri ile etkileşimine ait etki değerlerini hesaplamak için deneysel tasarım yöntemlerinden bir optimizasyon tasarımı yöntemi olan Box-Behnken tasarımı kullanılmıştır. Elde edilen her bir antioksidan aktivite değerleri için regresyon analizi yapılmış ve sonuçlar varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

Optimum koşulların belirlenmesinde, tüm cevapları aynı anda optimize etmek için kullanılan Derringer istenebilirlik (DF) fonksiyonu kullanılmıştır. Bu fonksiyon tek tek her bir deneye ait DF değerlerinin geometrik ortalaması alınarak hesaplanmaktadır. 0'dan (istenmeyen) 1'e kadar (tüm cevapların istenen düzeyde olduğu) değişen değerler alabilir. Bütün cevapların eşzamanlı optimizasyonu için, üç cevabın da maksimum değerde olması hedeflenen amaçtır.

Önce her bir antioksidan aktivite cevabı için tek tek hesaplanarak tanımlanan koşullardan istatistiksel program yardımı ile çoklu cevap optimizasyonu DF yapılarak tüm pozitif sonuç veren antioksidan aktivite parametrelerinin maksimum düzeyde olduğu ekstraksiyon şartları belirlenmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Mandalina Kabuğu Ekstreleri

4.1.1 Mandalina Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

a) DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi

Mandalina kabukları için Box-Behnken deneysel tasarım şartlarına uygun hazırlanan 15 ekstrakt için DPPH radikal yakalama aktivitesi sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir. Burada en düşük aktivitenin %39,43 ile 11 no’lu ekstraksiyon şartlarında (6 dak, %100 aseton, 20 mL) ve en yüksek aktivitenin %88,06 ile 15 no’lu ekstraksiyon şartlarında (6 dak, %50 aseton, 15 mL) olduğu görülmüştür.

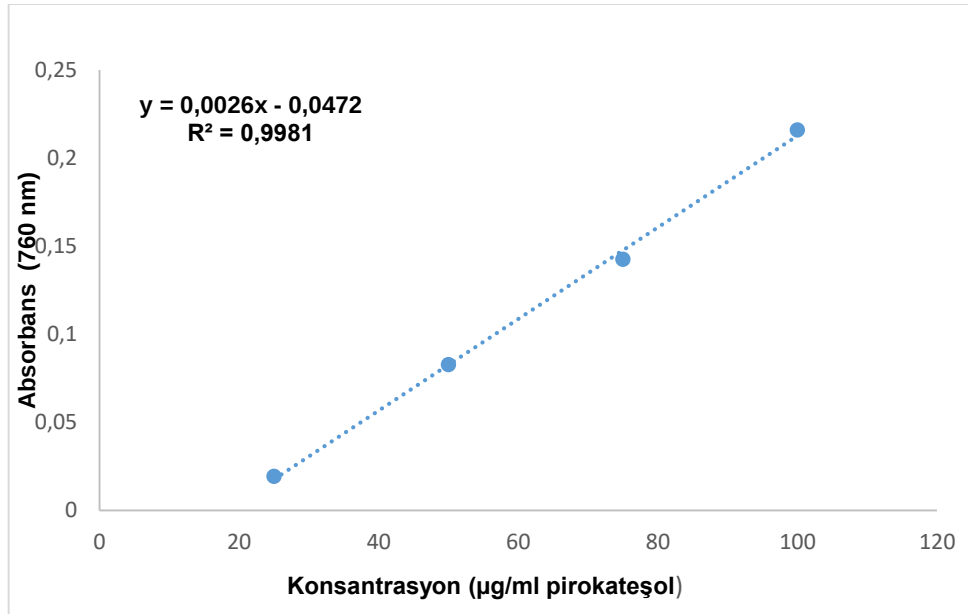
Tablo 4.1 Mandalina kabuğu ekstrelerinin DPPH radikal yakalama aktivitesi

Deney No	Absorbans (517nm)	DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,511	
1	0,307	39,92
2	0,305	40,41
3	0,162	68,30
4	0,103	79,94
5	0,062	87,89
6	0,063	87,73
7	0,069	86,59
8	0,072	85,95
9	0,284	44,52
10	0,100	80,43
11	0,310	39,43
12	0,144	71,92
13	0,065	87,28
14	0,068	86,69
15	0,061	88,06

b)Toplam Fenolik Madde Miktarı

Bu test için 25-100 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda hazırlanan standart pirokateşol çözeltilerine FC reaktifi ile toplam fenolik madde tayini uygulanmış, okunan absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen pirokateşol standart grafiğinin (Şekil 4.1) denkleminde, örneklerin toplam fenolik madde miktarları µg pirokateşol (µg PKE/g ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de görülmektedir.

19,65 µg PKE/mg ekstrakt ile en düşük miktar 2 no’lu ekstreye (10 dak, 100 aseton, 15 mL) ait iken en yüksek 76,81 µg PKE/mg ekstraktın ise 11 no’lu ekstreye (6 dak, %100 aseton, 20 mL) ait olduğu görülmüştür.



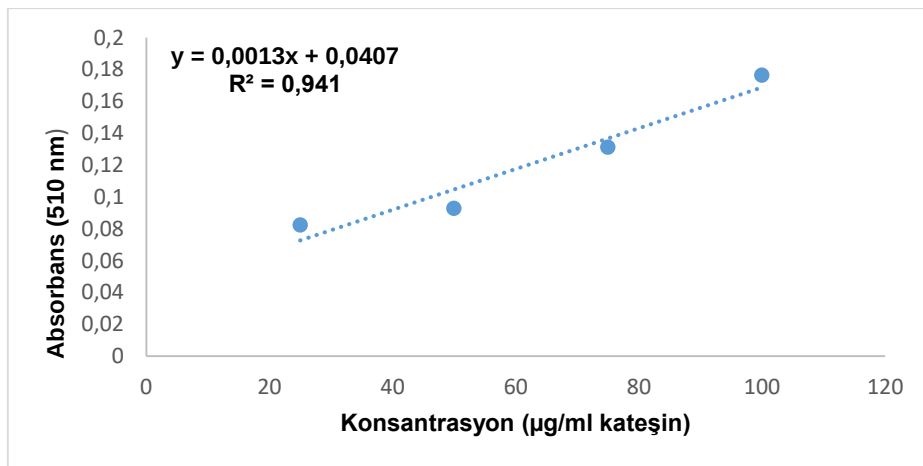
Şekil 4.1 Pirokateşol standart grafiği

Tablo 4.2 Mandalina kabuğu ekstratlarının toplam fenolik madde miktarı sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 760 nm)	(µg PKE/mg ekstrakt)
1	0,006	20,42
2	0,004	19,65
3	0,059	40,65
4	0,075	46,88
5	0,016	24,23
6	0,047	36,19
7	0,050	37,42
8	0,051	37,88
9	0,106	58,92
10	0,060	41,08
11	0,012	22,81
12	0,153	76,81
13	0,0568	40,00
14	0,0432	34,77
15	0,0478	36,54

c) Toplam Flavonoid Miktarı

Toplam flavonoid miktarının belirlenmesi için absorbanslar ile konsantrasyonlar arasında çizilen (+)kateşin standart grafiği (Şekil 4.2) denkleminde hesaplamalar yapılarak sonuçlar (Tablo 4.3) µg kateşin (µg KE/mg ekstrakt) eşdeğeri şeklinde hesaplanarak verilmiştir. Burada en yüksek miktar 50,69 µg KE/mg ekstrakt ile 1 no'lu (2 dak, %100 aseton, 15 mL) ekstredir.



Şekil 4.2 Kateşin standart grafiği

Tablo 4.3 Mandalina kabuğu ekstralarının toplam flavonoid miktarı sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 510 nm)	µg KE/mg ekstrakt
1	0,1066	50,69
2	0,1020	47,15
3	0,0077	-25,38
4	0,0055	-27,07
5	0,0058	-26,84
6	0,0055	-27,07
7	0,0081	-25,07
8	0,0082	-25,00
9	0,0872	35,80
10	0,0057	-26,92
11	0,0830	32,54
12	0,0078	-25,31
13	0,0062	-26,54
14	0,0066	-26,24
15	0,0059	-26,80

Deney 3-15 arasında alınan absorban değerleri çok düşük olduğundan µg KE/mg ekstrakt miktarları hesaplanamamıştır.

d) İndirgeme Gücü

İndirgeme gücü metodunun prensibi, antioksidan bileşiklerin $K_3Fe(CN)_6$, TCA ve $FeCl_3$ ile oluşturduğu renkli komplekslerin 700 nm’de absorbanlarının ölçümüne dayanmaktadır. Yüksek absorban yüksek indirgeme gücü etkisi olarak sonuçlandırılır. Mandalina kabuğu ekstraları ve standart olarak kullanılan α -tokoferole ait indirgeme gücü sonuçları Tablo 4.4’te verilmiştir. Burada yüksek absorban değerinin indirgeme gücü ile doğru orantılı olduğundan yola çıkılarak α -tokoferol standart absorbanına (0,97) en yakın değerin 0,77 ile 14 no’lu ekstrede (6 dak, %50 aseton, 15 mL) olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon çözeltisi olarak yalnızca asetonun kullanıldığı 1, 2, 9 ve 11 no’lu ekstralarda absorban değerlerinin polaritesi yüksek çözeltilerle hazırlanan ekstrele oranla düşük olduğu ve en düşük indirgeme gücüne 9 no’lu ekstraktın (6 dak, %100 aseton, 10 mL) sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.4 Mandalina kabuğu ekstrelerinin indirgeme gücü sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs. 700nm)
α -tokoferol	0,97
1	0,42
2	0,57
3	0,59
4	0,64
5	0,57
6	0,54
7	0,71
8	0,72
9	0,41
10	0,60
11	0,41
12	0,64
13	0,69
14	0,77
15	0,75

e)Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal iyonlarını şelatlama aktivitesi metodu Fe^{2+} iyonlarını bağlamak üzere, güçlü bir demir şelatlayıcı olan ferrozin reaktifi ile ortamda bulunan metal bağlayıcı bileşiklerin yarışmasına dayanır. Şelatlama gücü yüksekse kırmızı renkli Fe^{2+} /ferrozin kompleksinin oluşumu engellenir ve 562 nm de alınan absorbans ölçümlerinin değeri azalır. Tablo 4.5 mandalina kabuğu ekstreleri için şelatlama sonuçlarını göstermektedir. Sonuçlar iyi bir şelatlama ajanı olan EDTA (0,026) ile kıyaslandığında ekstrelerin şelatlama aktivitelerinin EDTA'nın aktivitesinin %100 kabul edildiği şartlarda 2,63-2,87 arasında birbirine yakın değerlerde olduğu görülmektedir. Bu değerler antioksidan aktivite açısından ihmal edilebilir düzeylerdedir.

Tablo 4.5 Mandalina kabuğu ekstrelerinin metal şelatlama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs. 562nm)	% aktivite
EDTA	0,026	100
Kontrol	0,888	
1	0,903	2,87
2	0,941	2,76
3	0,936	2,77
4	0,958	2,71
5	0,941	2,76
6	0,957	2,72
7	0,954	2,73
8	0,961	2,71
9	0,948	2,74
10	0,954	2,73
11	0,936	2,77
12	0,971	2,67
13	0,997	2,61
14	0,981	2,65
15	0,989	2,63

f)NO (Nitrik Oksit) Yakalama Aktivitesi

Bu testte gerçekleşen tepkimeler sonucunda ortaya çıkan NO_2^- Griess reaktifi aracılığıyla pembe/kırmızı bir renk alır ve 570 nm’de ölçülen absorbans değeri ile ortamdaki NO’nin tayinine yardımcı olur.

Standart olarak kullanılan NaNO_2 ’nin 2-10 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlu örnekleri ve ekstrelerin NO yakalama aktivitesi testi için ölçülen absorbans değerleri Tablo 4.6’da gösterilmiştir. Standart ölçümlerine bakıldığında deney serisi ekstrelerinin absorbansına en yakın değer olan NaNO_2 ’nin 2 $\mu\text{g/mL}$ olduğu konsantrasyon için hesaplamalar yapıldığında 2 (10 dak, %100 aseton, 15 mL) ve 11 (6 dak, %100 aseton, 20 mL) numaralı ekstreler için %91,65 gibi yüksek bir inhibisyon, 5 (2 dak, %50 aseton, 10 mL) numaralı ekstre için ise %34 oranında inhibisyon ölçülmüştür. Tüm sonuçlar incelendiğinde aktivitenin aseton oranı yüksek çözeltiler ile hazırlanan ekstraktlarda daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6 Mandalina kabuğu ekstrelerinin NO yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs. 570nm)
NaNO ₂ (2µg)	0,743
NaNO ₂ (4µg)	1,051
NaNO ₂ (6µg)	1,401
NaNO ₂ (8µg)	1,645
NaNO ₂ (10µg)	1,893
1	0,501
2	0,681
3	0,291
4	0,259
5	0,254
6	0,268
7	0,277
8	0,296
9	0,358
10	0,301
11	0,681
12	0,304
13	0,279
14	0,283
15	0,292

g)β-Karoten Ağartma Aktivitesi

Bitkilerde yaygın olarak bulunup, yağda çözünebilen karotenoidlerin en bilineni A vitamini öncüsü olan β-karotendir. β-karoten; singlet oksijen başta olmak üzere peroksit radikalleri ve süperoksit radikallerini giderir.

Bu yöntem inhibisyon sonucu β-karotenin renginin açılması esasına dayanır. Yükselen absorbans değeri % antioksidan aktivite ile doğru orantılıdır. Burada pozitif kontrol olarak BHA (bütillenmiş hidroksianisol) (1 mg/mL) ve negatif kontrol olarak linoleik asit β-karoten emülsiyonu kullanılmıştır. Relatif antioksidan aktivite (RAA) değerleri 60. ve 120. dakikada alınan absorbans değerleri ile hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.7’de verilmiştir. BHA standart çözeltisinin RAA değerinin 1 olarak kabul edildiği bu yöntemde geçen zamana karşı ekstre RAA değerlerinin BHA’ya yakınlığı incelenmiş ve ekstrelerin büyük bir kısmında β-karoten ağartma aktivitelerinin BHA’ya yakın olduğu özellikle 11 (6 dak, %100

aseton, 20 mL) ve 15 (6 dak, %50 aseton, 15 mL) numaralı ekstreler için en yakın değerlere ulaşıldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.7 Mandalina kabuğu ekstrelerinin β -Karoten ağartma aktivitesi sonuçları

Deney No	Abs. (470 nm) 60 min.	RAA 60 min.	Abs. (470 nm) 120 min	RAA 120 min.
BHA	0,217	1	0,207	1
1	0,195	0,897	0,205	0,989
2	0,189	0,869	0,191	0,922
3	0,193	0,888	0,189	0,912
4	0,190	0,874	0,186	0,898
5	0,195	0,897	0,194	0,936
6	0,195	0,897	0,193	0,931
7	0,194	0,892	0,193	0,931
8	0,197	0,906	0,194	0,936
9	0,189	0,869	0,188	0,907
10	0,197	0,906	0,193	0,931
11	0,205	0,943	0,208	1,004
12	0,193	0,888	0,19	0,917
13	0,193	0,887	0,193	0,931
14	0,192	0,883	0,193	0,931
15	0,198	0,911	0,198	0,955

h)DMPD⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

Bu metot asidik olan bir pH değerinde veya bir oksidan bulunan ortamda DMPD'nin 505 nm'de spesifik bir absorbans veren katyonik radikal formuna dönüşmesi esasına dayanmaktadır.

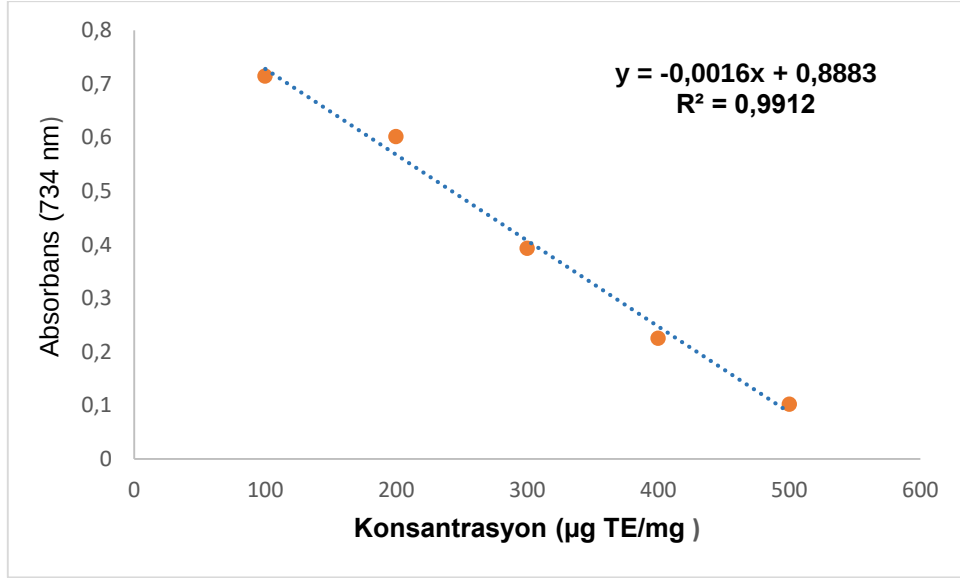
DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi tayini için mandalina kabuğu ekstrelerinin 505 nm'de ölçülen absorbans değerleri ve % radikal yakalama sonuçları Tablo 4.8'de verilmiştir. %99,90 ile 4 no'lu ekstre (10 dak, %0 aseton, 15 mL) için en yüksek aktivite ölçümü alınmıştır. Özellikle ekstraksiyon çözücüsünde su oranı artışına bağlı olarak aktivitenin de artış gösterdiği görülmektedir.

Tablo 4.8 Mandalina kabuğu ekstralarının DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs. 505nm)	DMPD Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,4886	
1	0,3604	26,30
2	0,3802	22,18
3	0,0708	85,50
4	0,0652	99,90
5	0,0679	86,60
6	0,0641	86,80
7	0,0687	85,90
8	0,0665	86,40
9	0,2061	57,80
10	0,0633	87,00
11	0,8038	-64,50
12	0,0749	84,60
13	0,0701	85,70
14	0,0695	85,78
15	0,0719	85,30

i)ABTS⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

Bu testte aktivite ölçümü için 734 nm de ölçülen absorbans sonuçları, 100-500 µM konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks çözeltilerinin lineer grafiğinden (Şekil 4.3) değerlerin hesaplaması yapılmış ve sonuçlar µg Troloks eşdeğeri (TE)/mg ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.9'da elde edilen sonuçlar incelendiğinde düşük absorbansa karşılık en yüksek aktivite değerinin 11 no'lu ekstreya (6 dak, %100 aseton, 20 mL) ait olduğu görülmektedir. 11 numaralı ekstre ve bu ekstrenin değerlerine yakın olan 13, 14 ve 15 numaralı ekstraların polaritelerinin düşük olduğu görülmektedir.



Şekil 4.3 Troloks standart garifği

Tablo 4.9 Mandalina kabuğu ekstrelerinin ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs. 734 nm)	µg TE/mg ekstrakt
1	0,6703	136,25
2	0,6668	138,44
3	0,6196	167,94
4	0,6836	127,94
5	0,5753	195,63
6	0,6146	171,06
7	0,5622	203,81
8	0,5707	198,50
9	0,6403	155,00
10	0,6540	146,44
11	0,5022	241,31
12	0,5978	181,56
13	0,5501	211,38
14	0,5333	221,88
15	0,5411	217,00

4.1.2 Mandalina Kabuğu Ekstrelerinin Deneysel Tasarım Sonuçları

Tablo 3.2’de verilen ekstraksiyon süresi (A), çözücü oranı (B) ve çözücü hacmi (C) olmak üzere belirlenen 3 farklı değişken için hesaplanan Box-Behnken deneysel tasarım şartlarına uygun (Tablo 3.3) 15 farklı ekstre ile çalışılan sonuçlar için optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon hesaplamaları yapılırken ekstrele uygulanan antioksidan aktivite testlerinden pozitif sonuç verenler kullanılmıştır. Mandalina kabuğu ekstraktları için belirlenen değişkenlerin UAE işlemi üzerine etkileri; DPPH[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₁), indirgeme gücü (Y₂), ABTS^{•+} radikal yakalama aktivitesi (Y₃) ve toplam fenolik madde miktarı (Y₄) testlerine verilen cevaplar üzerinden istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu önemli değişkenlerin etkileri ve etkileşimlerini incelemek için cevaplara regresyon analizi uygulanmış ve sonuçlar (Tablo 4.10) varyans analizi (ANOVA) ile verilmiştir. Bir istatistiksel çalışma olan ANOVA tablosunda p-değeri 0.05’den küçük olan parametrelerin sonuç üzerine %95 güvenilirlikte etkili olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca analizde tüm etkileşimlerin %95 güven oranında tahmin edilebilmesi için F-testi kullanılmıştır. Buradan yola çıkarak verilen analiz sonuçlarında F tablo değerinden büyük olan ve p-değeri<0.05 olan parametrelerin ekstraksiyon işleminde etkili olduğu kabul edilmiştir.

Analizlerde düzeltme katsayısı (R^2) ve ayarlı düzeltme katsayısı (ayarlı R^2) değerlerinin 1’e yakın olması hem deneysel sonuçlar hem de istatistiksel olarak yapılan hesaplamalar ile tahmin edilen sonuçlar arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca $R^2 > 0.08$ olması doğru bir model oluşturulduğunun göstergesidir (Lundstedt vd., 1998). Burada elde edilen sonuçlar incelendiğinde R^2 değerlerinin Y cevapları için sırasıyla 0,9950, 0,9751, 0,9851 ve 0,9791 olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar seçilen modellerin doğruluğunu destekler niteliktedir.

Tablo 4.10 Mandalina kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi (Df)	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Y₁					
A	0,96605	1	0,96605	2,0500	0,2889
B	2040,65	1	2040,65	4321,7	0,0002*
C	34,8195	1	34,8195	73,730	0,0133*
AA	17,6145	1	17,6145	37,300	0,0258*
AB	1,703030	1	1,703030	3,6100	0,1980
AC	0,055225	1	0,055225	0,1200	0,7650
BB	3356,760	1	3356,760	7108,7	0,0001*
BC	2,924100	1	2,924100	6,1900	0,1306
CC	13,09640	1	13,09640	27,730	0,0342*
Hata	0,944467	2	9,81		
Toplam	5530,950	14	R ² = 99,5052	R ² (ayarlı) = 98,6147	
Y₂					
A	0,003386650	1	0,00338665	24,59	0,0383*
B	0,071915300	1	0,07191530	522,25	0,0019*
C	0,008456000	1	0,00845650	61,410	0,0159*
AA	0,006650940	1	0,00665094	48,300	0,0201*
AB	0,000040322	1	0,00004032	0,2900	0,6426
AC	0,000647702	1	0,00064770	4,7000	0,1624
BB	0,125846000	1	0,12584600	913,89	0,0011*
BC	0,000396010	1	0,000396010	2,8800	0,2320
CC	0,013433000	1	0,013433000	97,550	0,0101*3
Hata	0,000275407	2	0,000275407		
Toplam	0,226558	14	R ² = 97,5075	R ² (ayarlı) = 93,0211	
Y₃					
A	186,486	1	186,486	6,750	0,1216
B	985,958	1	985,958	35,71	0,0269*
C	314,848	1	314,848	11,40	0,0776
AA	1531,65	1	1531,65	55,48	0,0176*
AB	43,0664	1	43,0664	1,560	0,3380
AC	92,6406	1	92,6406	3,360	0,2085
BB	7975,65	1	7975,65	288,87	0,0034*
BC	18,3291	1	18,3291	0,6600	0,5008
CC	63,0651	1	63,0651	2,2800	0,2698
Hata	55,2188	2	55,2188		
Toplam	10849,4	14	R ² = 98,3084	R ² (ayarlı) = 95,2635	
Y₄					
A	39,9618	1	39,9618	5,6500	0,1407
B	874,038	1	874,038	123,52	0,0080*
C	26,2813	1	26,2813	3,7100	0,1938
AA	414,020	1	414,020	58,510	0,0167*
AB	12,2500	1	12,2500	1,7300	0,3188
AC	33,0625	1	33,0625	4,6700	0,1632

Tablo 4.10 Mandalina kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları (devamı)

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi (Df)	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
BB	107,104	1	107,104	15,140	0,0054*
BC	1290,25	1	1290,25	182,34	0,0331*
CC	203,057	1	203,057	28,700	0,3069
Hata	14,1525	2	14,1525		
Toplam	3124,34	14	$R^2 = 97,9107$	R^2 (ayarlı) = 94,1499	

Df: serbestlik derecesi, *:etkili parametreler, DPPH· radikal yakalama aktivitesi (Y_1), indirgeme gücü (Y_2), ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi (Y_3), toplam fenolik madde miktarı(Y_4)

Şekil 4.4'te ana faktörlerin Y cevapları üzerine etkileri ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Pareto grafikleri (Şekil4.4a) incelendiğinde Y_1 cevabı için hem doğrusal B ve C değişkenleri hem de tüm karesel değişkenlerin (AA, BB, CC) önemli olduğu görülmüştür.

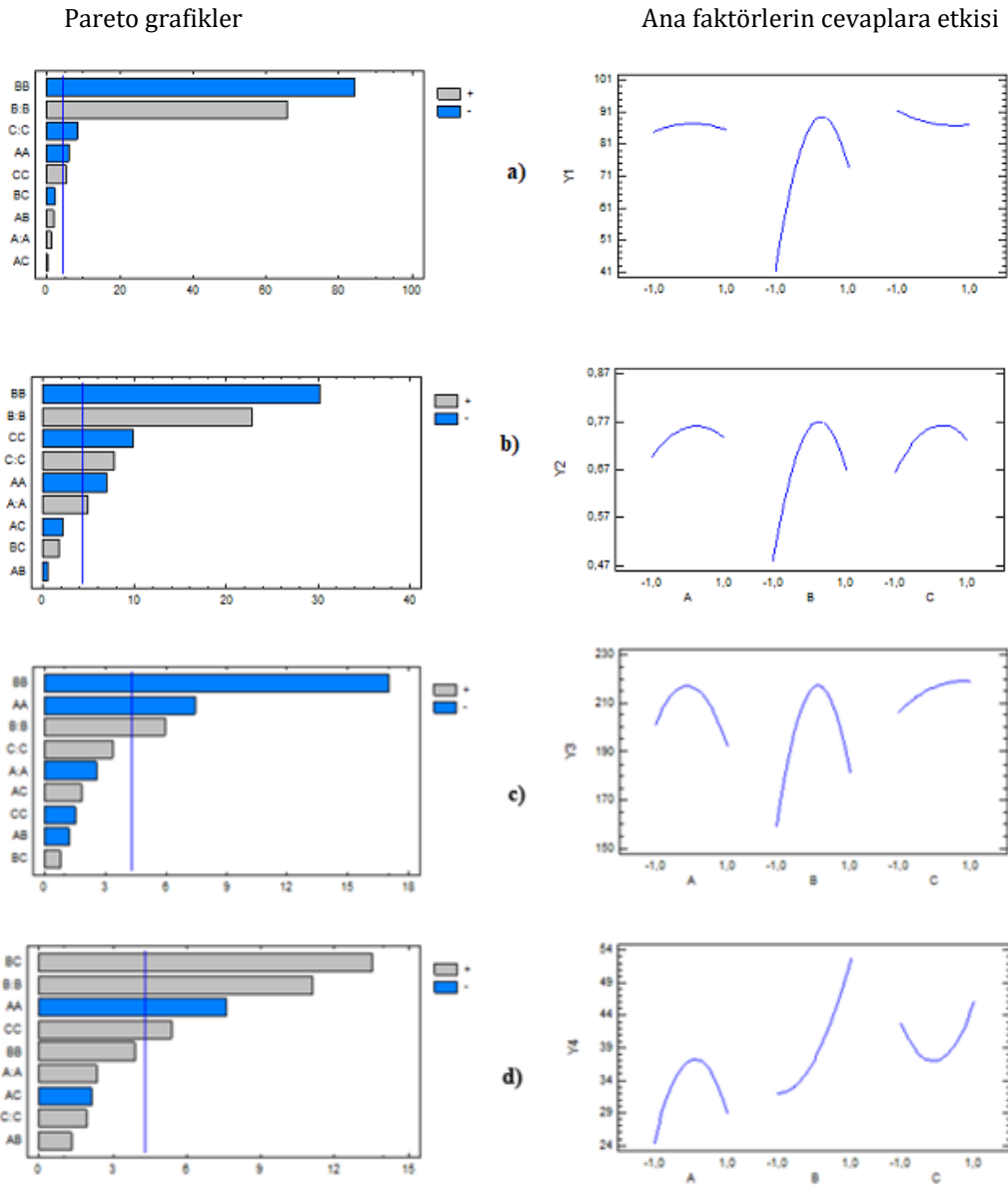
AA ve BB karesel değişkenleri ile C doğrusal değişkeninin test aktivitesine pozitif etkisi ile beraber B doğrusal ve CC karesel değişkenlerinin sonuca pozitif etkisi olduğu kaydedilmiştir.

Y_2 cevabı için (Şekil 4.4b) A, B ve C değişkenlerinin UAE sürecinde etkili olduğu görülürken, değişkenlerin birbirleri arasındaki etkileşimlerin ihmal edilebilir düzeyde olduğu belirlenmiştir. Çözücülerin özellikle polarite gibi karakteristik özelliklerinin ekstraksiyon verimine etkisi olduğu birçok çalışmada görülmektedir, burada da ekstraksiyon çözücüsü oranı değişkeni olan B'nin antioksidan ekstraksiyonu üzerinde önemli bir etkisi olduğu görülmüştür. Ayrıca tüm karesel değişkenlerin (AA, BB, CC) Y_2 cevabı üzerine önemli bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Doğrusal değişkenlerin sonuca etkisi incelendiğinde her bir değişkenin pozitif etkisinin olmasının bu değişkenlerin miktarlarının arttırılması ile sonucun da pozitif yönde etkileneceğini göstermektedir. Bunun yanında tüm karesel değişkenlerin bu antioksidan kapasite testi için UAE sürecini negatif yönde etkilemektedir.

Y_3 cevabını ifade eden ABTS⁺ radikali yakalama aktivitesi için Tablo 4.10 ANOVA değerleri incelendiğinde p değerinin 0,05'ten küçük olduğu B doğrusal ve AA ve BB karesel değişkenlerinin sonuca önemli etkisini sayısal olarak ifade etmektedir.

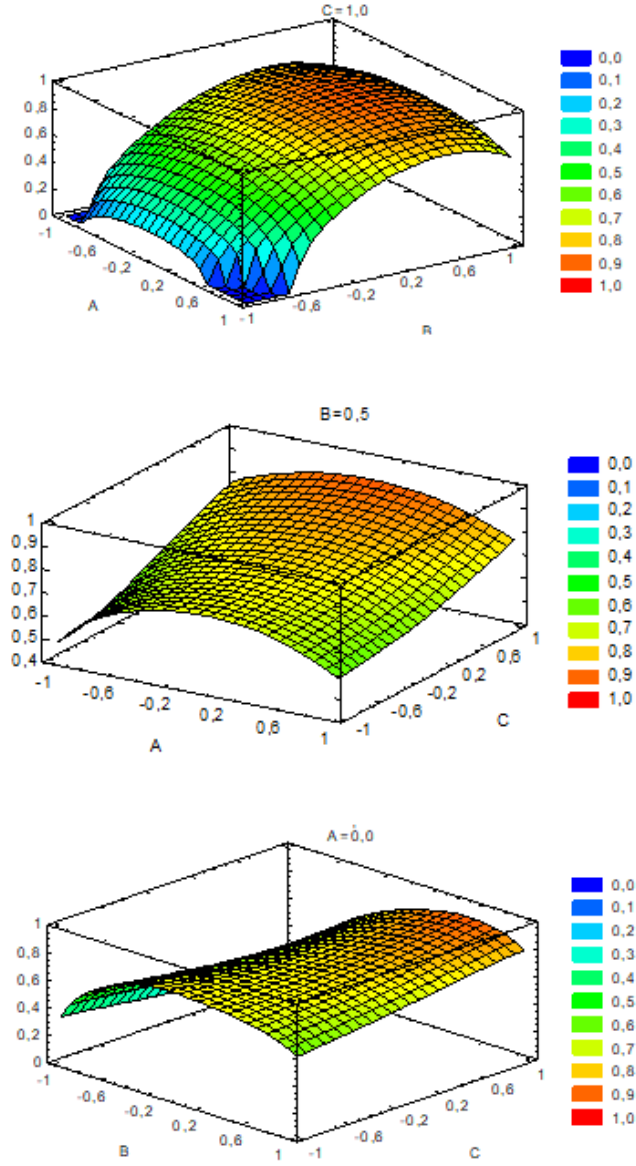
Bunun yanında seçilen aralıklar için A ve C değişkenleri etkisinin ihmal edilebilir düzeylerde olduğu görülmektedir.

Toplam fenolik madde miktarını ifade eden Y_4 sonucu için aseton oranı yüksek olan çözücü tercihinde antioksidan aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Ekstraksiyon çözücüsündeki aseton oranı ve çözücü miktarı arasındaki (BC) etkileşimler ve karesel değişkenler AA ve CC nin olumlu etkisinin % 95 seviyesinde güvenilirliğe sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4 a) Y_1 , b) Y_2 , c) Y_3 , d) Y_4 cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi

Antioksidan aktivite sonuçlarının karesel polinom değerleri ($R^2 \geq 0,9791$) ile örtüşmesine dayanarak mandalina kabuklarının UAE için çoklu cevap optimizasyonu değerlendirilmiştir. Tekli sonuçlar ekstraksiyon çözücüsündeki aseton miktarının hem yapılan antioksidan kapasite testleri hem de toplam fenolik madde miktarını etkilediğini göstermiştir. Buna göre her değişken için aseton miktarının artması ile ekstraksiyon verimliliğinin arttığı görülmektedir. Çoklu optimizasyon ile hem önemli bir etken olduğu belirlenen çözücüdeki aseton miktarı hem de diğer değişkenler için sonuçlar değerlendirilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmeye karşılık gelen optimum şartlar için tüm cevapları aynı anda optimize etmek için kullanılan Derringer istenebilirlik fonksiyonu (DF) kullanılmıştır. Bu fonksiyon tek tek her bir deneye ait DF değerlerinin geometrik ortalaması alınarak hesaplanmaktadır. 0'dan (istenmeyen) 1'e kadar (tüm cevapların istenen düzeyde olduğu) değişen değerler alabilir. Bütün cevapların eşzamanlı optimizasyonu için, dört cevabın da maksimum değerde olması hedeflenen amaçtır. Burada cevap yüzey tasarımı grafikleri (Şekil 4.5) DF değerlerinin profillerini öngörmek için kullanılmıştır. Bu kemometrik yöntem vasıtası ile bulunan optimum UAE şartlarının her bir parametrenin etkilerinin incelendiği diğer verilerle de örtüştüğü görülmüştür. Cevap yüzey tasarım grafikleri, maksimum antioksidan etkinin (Y_1 için %86,91; Y_2 için 0,74 abs, Y_3 için 231,36 TE/ μ g ekstrakt, Y_4 için 62,42 μ g/mL pirokateşol) olduğu optimum ekstraksiyon şartlarının; ekstraksiyon süresi (A) için 6 dak, çözücü oranı (B) için %75 aseton, çözücü hacmi (C) için 20 mL olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5 İstenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri

4.2 Limon Kabuğu Ekstreleri

4.2.1 Limon Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

a) DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi

Limon kabuğu ekstreleri için kaydedilen DPPH radikal yakalama aktivitesi sonuçları Tablo 4.11’de verilmiştir. DPPH radikal yakalama aktivitesi değerlerinin %49,26-93,5 arasında değiştiği ve en yüksek % aktivitenin 5 (2 dak, %50 aseton, 10 mL) ve 6 no’lu ekstrteler için (10 dak, %50 aseton, 10 mL) olduğu görülmüştür. Tüm sonuçlar incelendiğinde su oranı artışına bağlı olarak radikal yakalama aktivitesinin de arttığı belirlenmiştir.

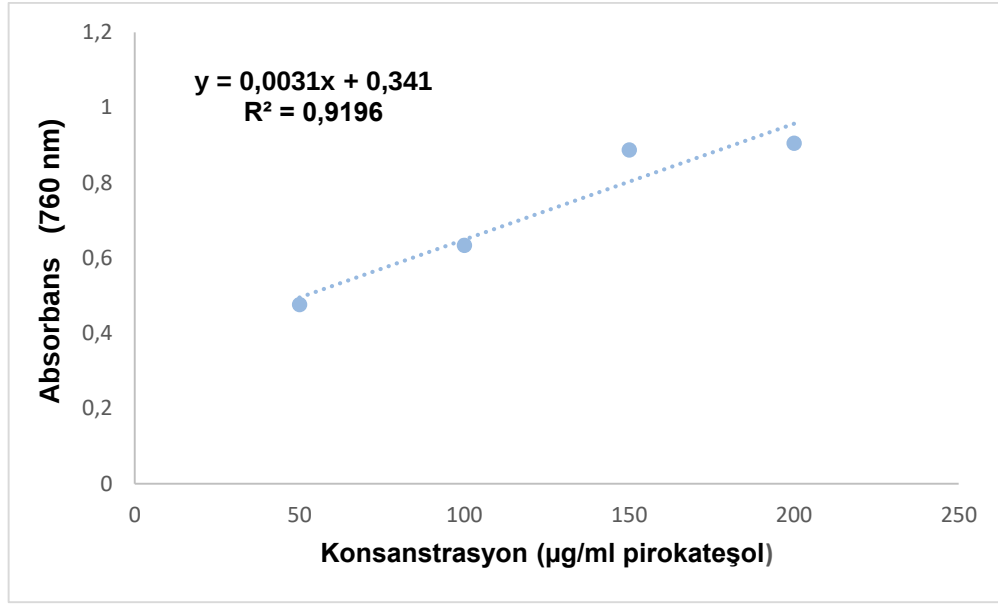
Tablo 4.11 Limon kabuğu ekstrelerinin DPPH’ radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçün Sonuçları (Abs, 517nm)	DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,474	-
1	0,241	49,26
2	0,084	82,2
3	0,089	81,2
4	0,042	91,1
5	0,031	93,5
6	0,031	93,5
7	0,036	92,4
8	0,044	90,7
9	0,109	77
10	0,043	91
11	0,099	79,2
12	0,044	90,8
13	0,036	92,4
14	0,034	92,8
15	0,032	93,4

b)Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarı tayini için çizilen pirokateşol standart grafiği (Şekil 4.6) denkleminden hesaplanan sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiştir. Tüm ekstrteler için absorbans değerleri çok düşük olduğundan hesaplama yapılamamıştır. Benzer şekilde Donga vd. 2019 yılında limonun fenolik madde içeriği ve antioksidan

özelliklerini inceledikleri çalışmalarında hasat zamanı ve meyvenin olgunluk derecesine göre fenolik madde miktarlarında değişiklikler olduğunu kaydetmişlerdir.



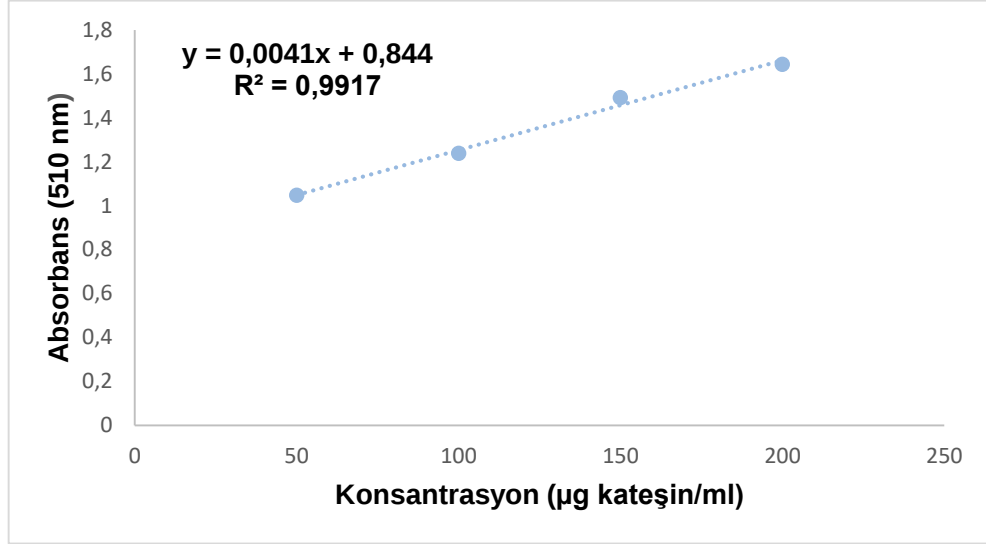
Şekil 4.6 Standart Pirokateşol grafiği

Tablo 4.12 Limon kabuğu ekstreleri için toplam fenolik madde miktarı sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 760 nm)	µg PKE/mg ekstrakt
1	0,0615	-93,16
2	0,0605	-93,50
3	0,0440	-99,00
4	0,0350	-102,00
5	0,0480	-97,66
6	0,0495	-97,16
7	0,0490	-97,33
8	0,1050	-78,66
9	0,0635	-92,50
10	0,036	-101,67
11	0,055	-95,33
12	0,037	-101,33
13	0,051	-96,83
14	0,046	-98,33
15	0,049	-97,33

c)Toplam Flavonoid Miktarı

Toplam flavonoid miktarı tayini için çizilen (+)kateşin standart grafiği (Şekil 4.7) denkleminde hesaplanan sonuçlar Tablo 4.13'te verilmiştir. Absorbans değerlerinin fenolik madde tayininde olduğu gibi çok düşük çıkması nedeni ile hesaplama yapılamamıştır.



Şekil 4.7 Kateşin standart grafiği

Tablo 4.13 Limon kabuğu ekstraktları için toplam flavonoid miktarı sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 510 nm)	(µg KE/mg ekstrakt)
1	0,100	-181,46
2	0,085	-185,12
3	0,046	-194,63
4	0,042	-195,61
5	0,070	-188,78
6	0,070	-188,78
7	0,085	-185,12
8	0,259	-142,68
9	0,300	-132,68
10	0,040	-196,09
11	0,200	-157,07
12	0,049	-193,90
13	0,078	-186,83
14	0,077	-187,07
15	0,077	-187,07

d)İndirgeme Gücü

İndirgeme gücü tayini için Oyaizu (1986) metodu kullanılmış ve sonuçlar Tablo 4.14'te verilmiştir. α -tokoferol standartının kıyaslama için kullanıldığı yöntemde yüksek absorbansın yüksek indirgeme gücünü ifade etmesinden yola çıkıldığında α -tokoferol absorbansına (0.884) en yakın değerin 0,685 ile 13 no'lu ekstre için (6 dak, %50 aseton, 15 mL) kaydedildiği görülmüştür.

Tablo 4.14 Limon kabuğu ekstreleri için toplam indirgeme gücü sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 700nm)
α -tokoferol	0,884
1	0,607
2	0,506
3	0,558
4	0,607
5	0,641
6	0,661
7	0,658
8	0,637
9	0,561
10	0,571
11	0,424
12	0,625
13	0,685
14	0,672
15	0,678

e)Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktivitesi tayini için standart olarak EDTA kullanılarak uygulanan işlemlerde 562 nm de alınan absorbans değerleri Tablo 4.15'te verilmiştir. Absorbansın düşmesi ile artan şelatlama aktivitesi EDTA'nın aktivitesi %100 kabul edilerek hesaplandığında ile kıyaslandığında limon kabuğu ekstreleri için %1,01-1,11 arasında şelatlama aktivitesi olduğu kaydedilmiştir. EDTA ile kıyaslanan bu değerlere bakıldığında limon kabukları için metal şelatlama aktivitesinin ihmal edilebileceği düşünülmüştür.

Tablo 4.15 Limon kabuğu ekstreleri için metal şelatlama aktivitesi sonuçları

Deney No	Absorbans (562nm)	% Aktivite
EDTA	0,00	100
Kontrol	0,937	
1	0,903	1,11
2	0,941	1,06
3	0,936	1,07
4	0,958	1,04
5	0,941	1,06
6	0,957	1,05
7	0,954	1,05
8	0,961	1,04
9	0,948	1,06
10	0,954	1,05
11	0,936	1,07
12	0,971	1,03
13	0,997	1,00
14	0,981	1,02
15	0,989	1,01

f)NO (Nitrik Oksit) Yakalama Aktivitesi

NO yakalama aktivitesi tayini için 2-10 µg/mL konsantrasyonlu NO₂ çözeltileri kullanılarak ortamda oluşan NO[•] radikalinin tespiti için 570 nm de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Tablo 4.16'da verilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek absorbans değerinin (0,969) 4 µg/mL konsantrasyonlu NO₂ çözeltisinin absorbansına (1,051) yaklaştığı ve 11 no'lu ekstreye ait olduğu görülmüştür. 11 (6 %100 aseton, 20 mL) no'lu ekstre için %92,19 inhibisyon görülürken, 5 (2 dak, %50, aseton, 10 mL) numaralı ekstre için %24,16 oranında inhibisyon ölçülmüştür.

Tablo 4.16 Limon kabuğu ekstreleri için NO yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 570nm)
NaNO ₂ 2µg	0,743
NaNO ₂ 4µg	1,051
NaNO ₂ 6µg	1,401
NaNO ₂ 8µg	1,645
NaNO ₂ 10µg	1,893
1	0,613
2	0,833
3	0,344
4	0,353
5	0,254
6	0,262
7	0,268
8	0,265
9	0,911
10	0,336
11	0,969
12	0,357
13	0,271
14	0,266
15	0,262

g)β- Karoten Ağartma

İnhibisyon sonucu β-karotenin renginin açılması esasına dayanan bu yöntemde yükselen absorbans değeri % antioksidan aktivite ile doğru orantılıdır. β- Karoten ağartma testine ilişkin absorbanslar ve 60 ile 120. dakikalarda hesaplanan relatif antioksidan aktivite (RAA) değerleri Tablo 4.17’de görülmektedir. Pozitif kontrol olarak kullanılan BHA’nın RAA değerinin 1 kabul edildiği şartlarda ekstrelerin bu değere çok yakın RAA değerine sahip olduğu ve bunu zamana bağlı koruduğu görülmüştür. Tüm ekstreler için değerlerin BHA’ya çok yakın olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.17 Limon kabuğu ekstreleri için β - Karoten Ağartma testi sonuçları

Deney No	Abs, (470 nm) 60 min,	RAA 60 min,	Abs, 120 min	RAA 120 min,
BHA	0,196	1	0,207	1
1	0,195	0,994	0,205	0,990
2	0,189	0,964	0,191	0,923
3	0,193	0,985	0,189	0,913
4	0,19	0,969	0,186	0,898
5	0,195	0,995	0,194	0,937
6	0,195	0,995	0,193	0,932
7	0,194	0,989	0,193	0,932
8	0,197	1,005	0,194	0,937
9	0,189	0,964	0,188	0,908
10	0,197	1,005	0,193	0,932
11	0,205	1,046	0,208	1,004
12	0,193	0,984	0,190	0,918
13	0,193	0,984	0,193	0,932
14	0,192	0,979	0,193	0,932
15	0,198	1,010	0,198	0,957

h)DMPD⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

505 nm’de spesifik bir absorbans veren DMPD katyonik radikalının ölçülmesi esasına dayalı bir metotda elde edilen sonuçlar Tablo 4.18’de verilmiş olup birçok ekstre için yüksek radikal yakalama aktivitesi tespit edilmiş ve en yüksek aktivitenin (%92,02) 4 no’lu ekstreye (10 dak, % 100 su, 15 mL) ait olduğu kaydedilmiştir. Bunun tam tersi en düşük aktivitelerin görüldüğü 9 ve 11 numaralı ekstrelerin % 100 aseton oranı ile hazırlanan ekstreler olduğu görülmektedir.

Tablo 4.18 Limon kabuğu ekstreleri için DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi

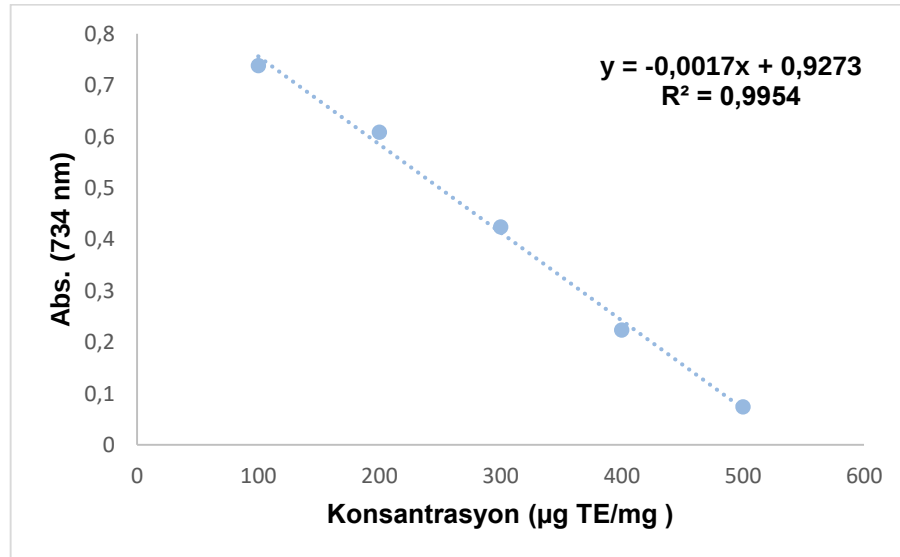
Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 505nm)	DMPD Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,502	-
1	0,362	27,98
2	0,335	33,36
3	0,046	90,90
4	0,040	92,02
5	0,060	88,16
6	0,061	87,94
7	0,069	86,18

Tablo 4.18 Limon kabuğu ekstreleri için DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi (devamı)

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 505nm)	DMPD Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
8	0,071	85,97
9	0,737	-0,47
10	0,063	87,44
11	0,532	-5,96
12	0,067	86,72
13	0,074	85,31
14	0,080	84,15
15	0,079	84,35

i)ABTS⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

Bu testte 100-500 µM konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks çözeltilerinin absorbans-konsantrasyon için çizilen lineer grafiğinden (Şekil 4.8) değerlerin hesaplaması yapılmış ve sonuçlar µg Troloks eşdeğeri (TE)/mg ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.19’da elde edilen sonuçlar incelendiğinde düşük absorbansa karşılık en yüksek aktivite değerinin 8 no’lu ekstreye (10 dak, % 50 aseton, 20 mL) ait olduğu görülmüştür. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde aseton oranının yüksek olduğu ekstrelerde aktivitenin de yüksek olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.8 Troloks standart grafiği

Tablo 4.19 Limon kabuğu ekstreleri için ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 734nm)	µg TE/mg ekstrakt
1	0,079	499,0
2	0,113	479,0
3	0,454	278,4
4	0,302	367,8
5	0,274	384,3
6	0,253	396,7
7	0,208	423,1
8	0,001	545,5
9	0,03	527,8
10	0,344	343,1
11	0,049	516,7
12	0,48	263,1
13	0,209	422,5
14	0,277	382,5
15	0,224	413,7

4.2.2 Limon Kabuğu Ekstrelerinin Deneysel Tasarım Sonuçları

Tablo 3.2’de verilen ekstraksiyon süresi (A), çözücü oranı (B) ve çözücü hacmi (C) olmak üzere belirlenen 3 farklı değişken için hesaplanan Box-Behnken deneysel tasarım şartlarına uygun (Tablo 3.3) 15 farklı ekstre ile çalışılan sonuçlar için optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon hesaplamaları yapılırken ekstrele uygulanan antioksidan aktivite testlerinden pozitif sonuç verenler kullanılmıştır. Limon kabuğu ekstreleri için belirlenen değişkenlerin UAE işlemi üzerine etkileri; DPPH[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₁), ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi (Y₂), β – Karoten ağartma testi (Y₃), indirgeme gücü (Y₄) ve DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi (Y₅) testlerine verilen cevaplar üzerinden istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu önemli değişkenlerin etkileri ve birbirleriyle etkileşimlerini incelemek için cevaplara regresyon analizi uygulanmış ve sonuçlar (Tablo 4.20) varyans analizi (ANOVA) ile verilmiştir.

Analizlerde düzeltme katsayısı (R²) ve ayarlı düzeltme katsayısı (ayarlı R²) değerlerinin 1’e yakın olması hem deneysel sonuçlar hem de istatistiksel olarak yapılan hesaplamalar ile tahmin edilen sonuçlar arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermektedir.

Ayrıca $R^2 > 0,08$ olması doğru bir model oluşturulduğunun göstergesidir (Lundstedt vd., 1998). Burada uygulanan test sonuçlarına bakıldığında cevaplar için elde edilen R^2 değerlerinin 0,9410-0,9806 arasında olduğu görülmektedir ve bu sonuçlar seçilen modelin doğruluğunu destekler niteliktedir.

Tablo 4.20 Limon Kabuğu Ekstreleri için ANOVA test sonuçları

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi (Df)	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Y₁					
A	1177	1	1177	119,99	0,0001*
B	552	1	552	56,25	0,0007*
C	10	1	10	1,08	0,3466
AA	483	1	483	49,24	0,0009*
AB	133	1	133	13,53	0,0143*
AC	41	1	41	4,18	0,0965
BB	111	1	111	11,34	0,0200*
BC	1	1	1	0,15	0,7174
CC	31	1	31	3,12	0,1377
Hata	49	5	9,81		
Toplam	2536	14	$R^2 = 0,9806$	R^2 (ayarlı) = 0,9458	
Y₂					
A	1177	1	1177	119,99	0,0001*
B	552	1	552	56,25	0,0007*
C	10	1	10	1,08	0,3466
AA	483	1	483	49,24	0,0009*
AB	133	1	133	13,53	0,0143*
AC	41	1	41	4,18	0,0965
BB	111	1	111	11,34	0,0200*
BC	1	1	1	0,15	0,7174
CC	31	1	31	3,12	0,1377
Hata	49	5	9,81		
Toplam	2536	14	$R^2 = 0,9806$	R^2 (ayarlı) = 0,9458	
Y₃					
A	0,00125	1	0,00125	17,61	0,0085*
B	0,00495	1	0,00495	69,74	0,0004*
C	0,00023	1	0,00023	3,26	0,1310
AA	0,00011	1	0,00011	1,55	0,2683
AB	0,00078	1	0,00078	11,04	0,0209*
AC	0,0	1	0,0	0,13	0,7363
BB	0,00005	1	0,00005	0,72	0,4363
BC	0,00011	1	0,00011	1,55	0,2679
CC	0,00005	1	0,00005	0,72	0,4363

Tablo 4.20 Limon Kabuğu Ekstreleri için ANOVA test sonuçları (devamı)

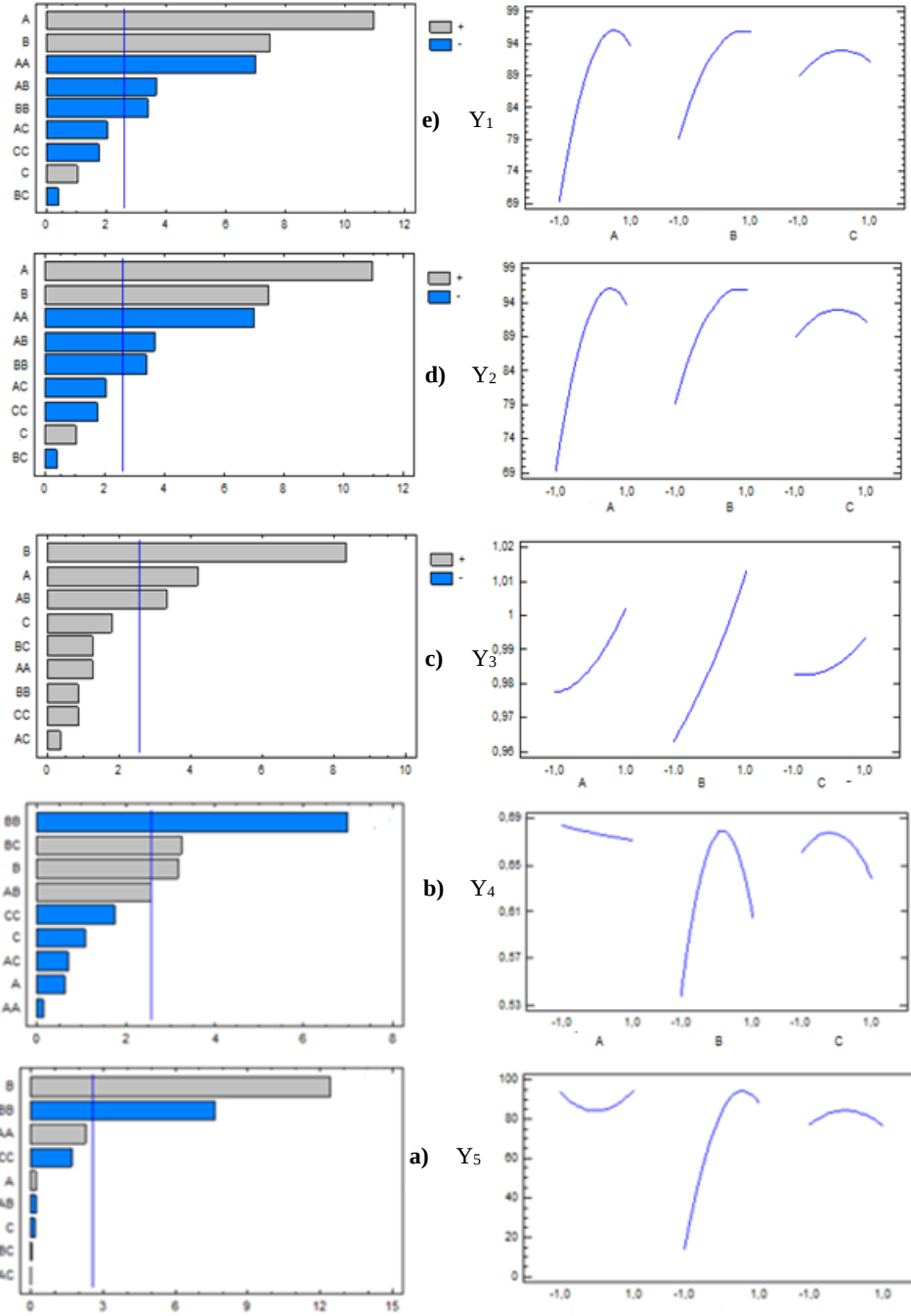
Hata	0,00035	5	0,000070		
Toplam	0,00787	14	R ² = 0,9549		
Y₄					
A	0,00035	1	0,00035	0,41	0,5506
B	0,00864	1	0,00864	10,07	0,0247*
C	0,00101	1	0,00101	1,18	0,3270
AA	0,00002	1	0,00002	0,03	0,8803
AB	0,00562	1	0,00562	6,55	0,0507
AC	0,00042	1	0,00042	0,49	0,5153
BB	0,04181	1	0,04181	48,71	0,0009*
BC	0,00912	1	0,00912	10,62	0,0225*
CC	0,00262	1	0,00262	3,06	0,1407
Hata	0,00429	5	0,00086		
Toplam	0,07274	14	R ² = 0,9410	R ² (ayarlı) = 0,8348	
Y₅					
A	4,59	1	4,59	0,06	0,8090
B	10933	1	10933	154,55	0,0001*
C	2,71	1	2,71	0,04	0,8525
AA	368,50	1	368,50	5,21	0,0713
AB	4,56	1	4,56	0,06	0,8097
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BB	4151	1	4151	58,68	0,0006*
BC	0,13	1	0,13	0,00	0,9677
CC	210	1	210	2,96	0,1458
Hata	353,7	5	70,7		
Toplam	16164,4	14	R ² = 0,9781	R ² (ayarlı) = 0,9387	

Df:serbestlik derecesi, *:etkili parametreler, DPPH[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₁), ABTS[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₂), β -Karoten ağartma testi (Y₃), indirgeme gücü (Y₄) ve DMPD[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₅)

Şekil 4.9'da ana faktörlerin cevaplar üzerine etkisi ayrıntılı olarak görülmektedir. Verilen Pareto grafikleri incelendiğinde A ve B değişkenlerinin Y₁, Y₂ ve Y₃ cevapları üzerine etkisinin önemli olduğu, C değişkeni ve seçilen düzeyler arasındaki bazı etkileşimlerin ise ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür. A ve B faktörlerinin cevaplar üzerinde olumlu etkileri olduğundan bu değişkenlerin miktarlarının artırılmasının sonucun pozitif etkilerini de olumlu etkileyeceği düşünülmüştür.

Pareto grafikler

Ana faktörlerin cevaplara etkisi

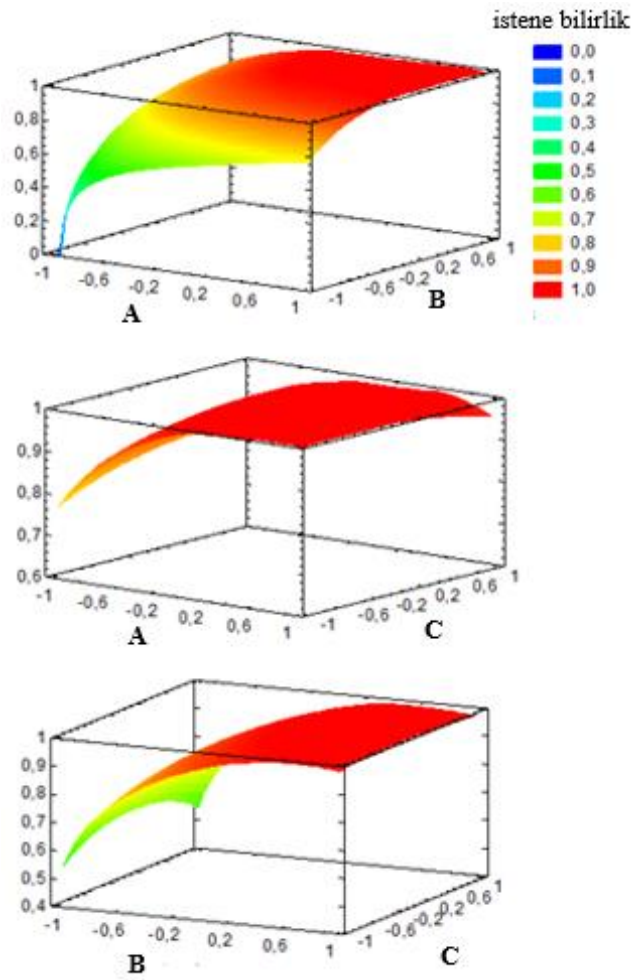


Şekil 4.9 a) Y_1 , b) Y_2 , c) Y_3 , d) Y_4 ve e) Y_5 cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi

UAE işlemi üzerine önemli etkilerin araştırılması için elde edilen Y_4 ve Y_5 cevaplarının incelenmesinde Şekil 4.9d ve Şekil 4.9e kullanılmış ve burada yalnızca B değişkeni için istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Ayrıca Y_3 cevabı

hariç tüm cevaplar üzerine AA ve BB karesel değişkenlerinin önemli derecede etkisi olduğu da açıkça görülmüştür.

En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmeye karşılık gelen optimum şartlar için tüm cevapları aynı anda optimize etmek için kullanılan Derringer istenebilirlik fonksiyonu (DF) kullanılmıştır. Burada cevap yüzey tasarımı grafikleri (Şekil 4.10) DF değerlerinin profillerini öngörmek için kullanılmıştır. Bu kemometrik yöntem vasıtası ile bulunan optimum UAE şartlarının her bir parametrenin etkilerinin incelendiği yukarıdaki diğer verilerle de örtüştüğü görülmüştür.



Şekil 4.10 İstenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri

Sonuç olarak burada optimum ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi için daha önce tekli cevaplara göre tanımlanan koşullardan istatistiksel program yardımıyla çoklu cevap optimizasyonu için DF değerleri hesaplanmış ve optimum ekstraksiyon şartlarının; ekstraksiyon süresi (A) için 6 dak, çözücü oranı (B) için %80 aseton, çözücü hacmi (C) için 12 mL olduğu belirlenmiştir.

4.3 Portakal Kabuğu Ekstreleri

4.3.1 Portakal Kabuğu Ekstrelerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

a) DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi

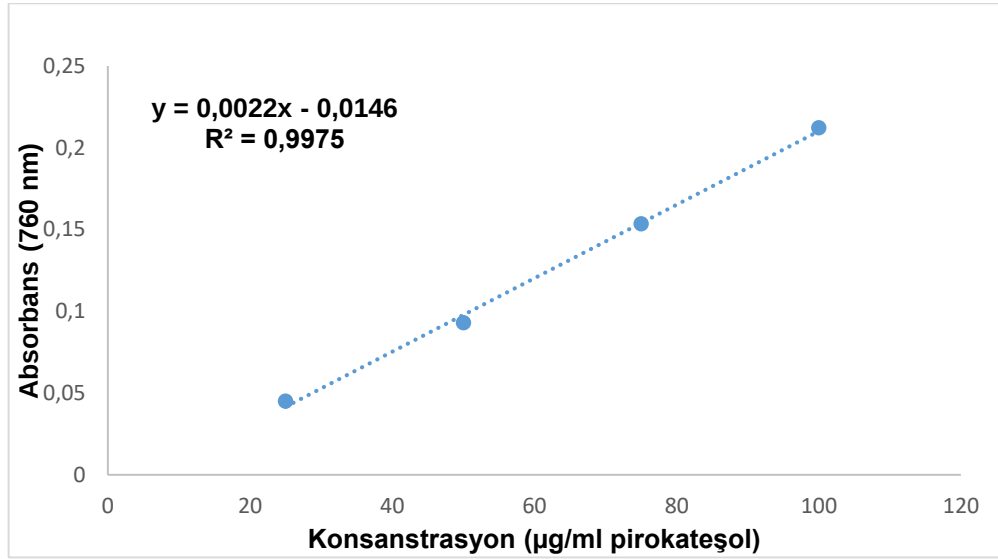
Portakal kabuğu ekstraktlarının DPPH radikal yakalama aktivitesi için 507 nm de ölçülen absorbans değerleri ve hesaplanan % aktivite değerleri Tablo 4.21’de verilmiştir. Ekstrelerin tamamına yakınında %80 üzerinde aktivite görülürken en yüksek aktivitenin % 93,67 ile 6 no’lu ekstreye (10 dak, %50, 10 mL) ait olduğu kaydedilmiştir.

Tablo 4.21 Portakal kabuğu ekstraktları için DPPH radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 517nm)	DPPH Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,4975	
1	0,2097	57,85
2	0,1719	65,45
3	0,0532	89,31
4	0,0447	91,02
5	0,0344	93,09
6	0,0315	93,67
7	0,0334	93,29
8	0,0525	89,45
9	0,0862	82,67
10	0,0489	90,17
11	0,0725	85,43
12	0,0516	89,63
13	0,0422	91,52
14	0,0397	92,02
15	0,0409	91,78

b)Toplam Fenolik Madde Miktarı

Toplam fenolik madde miktarı tayini için çizilen pirokateşol standart grafiği (Şekil 4.11) denkleminde hesaplanan sonuçlar Tablo 4.22’de verilmiştir. Burada en yüksek fenolik içeriğin 3 no’lu ekstreye (2 dak, % 100 su, 15 mL) ait olduğu görülmektedir. Tüm ekstrelerin hesaplanan fenolik madde miktarlarına bakıldığında 18,0-26,545 µg PKE/mg ekstrakt arasında değişen birbirine yakın değerler kaydedilmiştir.



Şekil 4.11 Pirokateşol standart grafiği

Tablo 4.22 Portakal kabuğu ekstreleri için toplam fenolik madde miktarı sonuçları

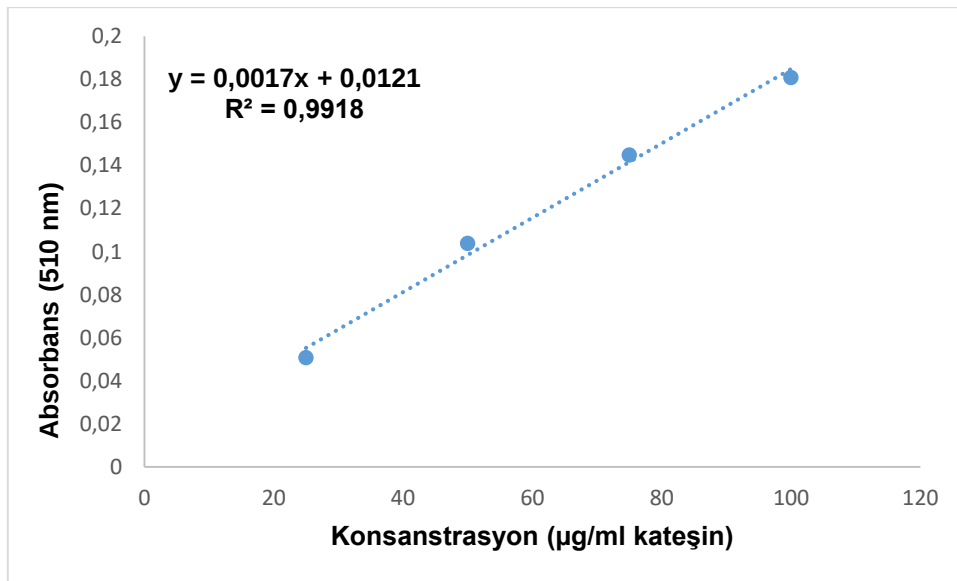
Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 760 nm)	µg PKE/mg ekstrakt
1	0,0345	22,318
2	0,0358	22,909
3	0,0438	26,545
4	0,0278	19,272
5	0,0304	20,454
6	0,0337	21,954
7	0,0278	19,272
8	0,0314	20,909
9	0,0295	20,045
10	0,0250	18,000
11	0,0275	19,136
12	0,0341	22,136
13	0,0311	20,772

Tablo 4.22 Portakal kabuğu ekstreleri için toplam fenolik madde miktarı sonuçları (devamı)

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 760 nm)	µg PKE/mg ekstrakt
14	0,0332	21,727
15	0,0322	21,272

c)Toplam Flavonoid Miktarı

Toplam flavonoid miktarı tayini için çizilen (+) kateşin standart grafiği (Şekil 4.12) denkleminde hesaplanan sonuçlar Tablo 4.23'te verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek flavonoid içeriğinin (43,471 µg KE/mg ekstrakt) 9 no'lu ekstreye (6 dak, %100 aseton, 10 mL) ait olduğu görülmüştür. Ayrıca yalnızca su ile hazırlanan ekstrelerde absorbansın çok düşük olması nedeni ile hesaplama yapılamamıştır.



Şekil 4.12 Kateşin standart grafiği

Tablo 4.23 Portakal kabuğu ekstreleri için toplam flavonoid madde miktarı sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 510 nm)	µg KE/mg ekstrakt
1	0,0498	22,176
2	0,0817	40,941
3	0,0058	-3,706
4	0,0002	-7,000
5	0,0259	8,118
6	0,0242	7,117
7	0,0219	5,765
8	0,0236	6,765
9	0,0860	43,471
10	0,0064	-3,353
11	0,0537	24,471
12	0,0181	3,529
13	0,0341	12,941
14	0,0332	12,412
15	0,0338	12,765

d)İndirgeme Gücü

α- Tokoferol standartının kullanıldığı indirgeme gücü tayinine ait sonuçlar Tablo 4.24'te verilmiş olup, standart absorbansının % 100 indirgeme gücü olarak kabul edildiği hesaplamalar ile en yüksek değere ait 1 no'lu ekstrenin (2 dak, %100 aseton, 15 mL) %44,14 oranında indirgeme gücü olduğu kaydedilmiştir.

Tablo 4.24 Portakal kabuğu ekstreleri için indirgeme gücü sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 700nm)
α-tokoferol	0,9882
1	0,4362
2	0,4190
3	0,3052
4	0,3261
5	0,3049
6	0,3245
7	0,3125
8	0,3134

Tablo 4.24 Portakal kabuğu ekstreleri için indirgeme gücü sonuçları (devamı)

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 700nm)
9	0,4115
10	0,3525
11	0,3909
12	0,3260
13	0,3565
14	0,359
15	0,3601

e)Metal Şelatlama Aktivitesi

Şelatlama aktivitesi oldukça yüksek olan EDTA standartı esas alınarak yapılan test sonuçları (Tablo 4.25) incelendiğinde standartın yanında oldukça düşük aktivite değerleri olduğu görülmektedir.

Tablo 4.25 Portakal kabuğu ekstreleri için metal şelatlama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 562nm)	% Aktivite
EDTA	0,0054	100
Kontrol	0,8920	
1	1,2167	0,44
2	0,9938	0,54
3	0,8060	0,67
4	0,8514	0,63
5	0,7829	0,69
6	0,8742	0,62
7	0,8387	0,64
8	0,8880	0,61
9	1,1137	0,48
10	0,8322	0,65
11	0,8245	0,66
12	0,7942	0,68
13	0,8291	0,65
14	0,8451	0,64
15	0,7969	0,68

f)NO (Nitrik Oksit) Radikal Yakalama Aktivitesi

2-10 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan NO₂ çözeltilerinin standart olarak kullanıldığı yöntemde portakal kabuğu için elde edilen sonuçlar Tablo 4.26'da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde en yüksek absorbans değerinin (1,0465) 6 µg/mL konsantrasyonlu NO₂ çözeltisinin absorbansından (1,0046) yüksek olduğu ve 9 no'lu ekstreye ait olduğu görülmüştür. 9 no'lu (6 dak, %100 aseton, 10 mL) ekstre için %104,17 inhibisyon görülmürken, 6 no'lu (10 dak, %50 aseton, 10 mL) ekstre için (0,1781) %17,72 oranında inhibisyon ölçülmüştür. Ayrıca aseton oranı yüksek ekstraktlarda yüksek aktivite değerleri mevcuttur.

Tablo 4.26 Portakal kabuğu ekstreleri için NO yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 570nm)
NaNO ₂ 2µg	0,4218
NaNO ₂ 4µg	0,7413
NaNO ₂ 6µg	1,0046
NaNO ₂ 8µg	1,4987
NaNO ₂ 10µg	1,8024
1	0,9897
2	0,7757
3	0,2358
4	0,2233
5	0,1851
6	0,1781
7	0,1697
8	0,1641
9	1,0465
10	0,2555
11	0,4786
12	0,2445
13	0,1842
14	0,192
15	0,1893

g)β- Karoten Ağartma

İnhibisyon sonucu β-karotenin renginin açılması esasına dayanan bu yöntemde yükselen absorbans değeri % antioksidan aktivite ile doğru orantılıdır. β- Karoten ağartma testine ilişkin absorbanslar ve 60 ile 120. dakikalarda hesaplanan relatif antioksidan aktivite (RAA) değerleri Tablo 4.27’de görülmektedir. BHA standart çözeltisinin RAA değerinin 1 olarak kabul edildiği bu yöntemde geçen zamana karşı ekstre RAA değerlerinin BHA’ya yakınlığı incelenmiş ve ekstrelerin büyük bir kısmının β-karoten ağartma aktivitelerinin BHA’ya yaklaştığı; en yakın değer (0.957) 9 no’lu (6 dak, %100 aseton, 10 mL) ekstreye ait olduğu olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.27 Portakal kabuğu ekstreleri için β- Karoten Ağartma testi sonuçları

Deney No	Abs, (470 nm) 60 min,	RAA 60 min,	Abs, 120 min	RAA 120 min,
BHA	0,2163	1	0,2044	1
1	0,2060	0,952	0,1763	0,863
2	0,1855	0,858	0,1661	0,813
3	0,1836	0,849	0,1675	0,819
4	0,2001	0,925	0,1681	0,822
5	0,1759	0,813	0,1704	0,834
6	0,1738	0,804	0,1602	0,784
7	0,1904	0,880	0,1610	0,788
8	0,1737	0,803	0,1587	0,776
9	0,2071	0,957	0,1822	0,891
10	0,1742	0,805	0,1615	0,790
11	0,1778	0,822	0,1738	0,850
12	0,1878	0,868	0,1682	0,822
13	0,1836	0,848	0,1721	0,842
14	0,1857	0,859	0,1742	0,852
15	0,1842	0,852	0,1709	0,836

h)DMPD⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

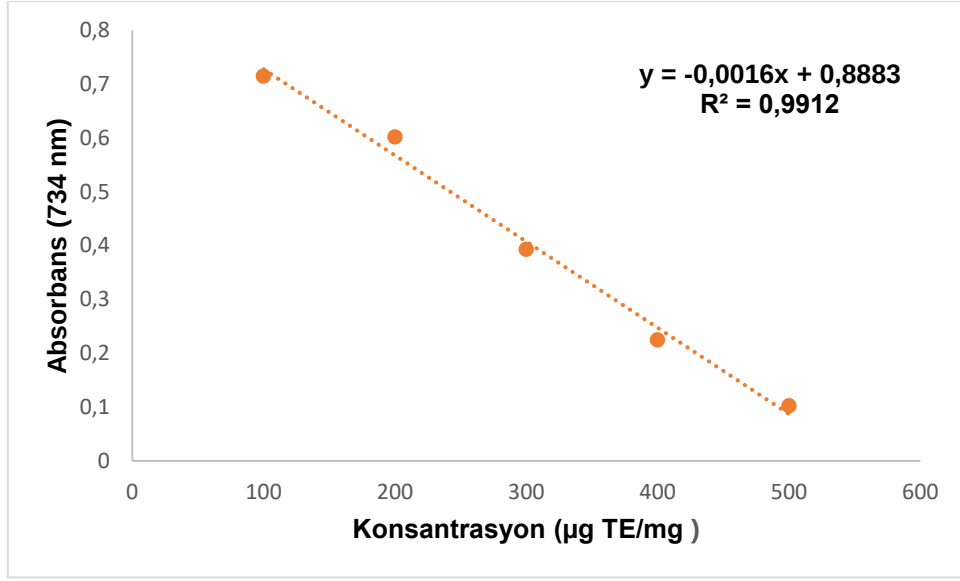
DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi için 505 nm de alınan absorbans değerleri Tablo 4.28’de verilmiştir. 1,46-59,84 arasında değişen değerlerde radikal yakalama aktiviteleri belirlenmiş olup değerlerin % 100 aseton içeren ekstraksiyon çözeltileri için diğerlerinden daha düşük olduğu görülmüştür.

Tablo 4.28 Portakal kabuğu ekstreleri için DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm Sonuçları (Abs, 505nm)	DMPD Radikal Yakalama Aktivitesi (%)
Kontrol	0,3080	
1	0,2386	22,53
2	0,2692	12,60
3	0,1901	38,28
4	0,1790	41,88
5	0,1255	59,25
6	0,1315	57,31
7	0,1250	59,42
8	0,1237	59,84
9	0,3035	01,46
10	0,1890	38,64
11	0,2848	07,53
12	0,1727	43,93
13	0,1287	58,21
14	0,1241	59,71
15	0,1256	59,02

i)ABTS⁺ Radikal Yakalama Aktivitesi

Bu radikal yakalama testinde 100-500 µM konsantrasyonlarda hazırlanan Troloks çözeltilerinin absorbans-konsantrasyon için çizilen lineer grafiğinden (Şekil 4.13) değerlerin hesaplaması yapılmış ve sonuçlar µg Troloks eşdeğeri (TE)/mg ekstrakt olarak ifade edilmiştir. Tablo 4.29’da elde edilen sonuçlar incelendiğinde düşük absorbansa karşılık en yüksek aktivite değerinin (300,19 µg (TE)/mg ekstrakt) 1 no’lu ekstreye (2 dak, % 100 aseton, 15 mL) ait olduğu görülmüştür. Aseton oranı artışı ile aktivitenin arttığı belirlenmiştir.



Şekil 4.13 Troloks standart garifiği

Tablo 4.29 Portakal kabuğu ekstraktları için ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi sonuçları

Deney No	Ölçüm sonuçları (Abs, 734 nm)	µg (TE)/mg ekstrakt
1	0,4080	300,19
2	0,4598	267,81
3	0,7270	100,81
4	0,7484	87,44
5	0,6531	147,00
6	0,6489	149,63
7	0,6560	145,19
8	0,6356	157,94
9	0,4254	289,31
10	0,7372	94,43
11	0,4305	286,13
12	0,6896	124,18
13	0,5992	180,69
14	0,5899	186,50
15	0,6023	178,75

4.3.2 Portakal Kabuğu için Deneysel Tasarım Sonuçları

Tablo 3.2’de verilen ekstraksiyon süresi (A), çözücü oranı (B) ve çözücü hacmi (C) olmak üzere belirlenen 3 farklı değişken için hesaplanan Box-Behnken deneysel tasarım şartlarına uygun (Tablo 3.3) 15 farklı ekstre ile çalışılan sonuçlar için optimizasyon yapılmıştır. Optimizasyon hesaplamaları yapılırken ekstrele uygulanan antioksidan aktivite testlerinden pozitif sonuç verenler kullanılmıştır. Portakal kabuğu ekstreleri için belirlenen değişkenlerin UAE işlemi üzerine etkileri; DPPH[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₁), DMPD⁺ radikal yakalama aktivitesi (Y₂), ABTS⁺ radikal yakalama aktivitesi (Y₃), indirgeme gücü (Y₄) ve NO yakalama aktivitesi (Y₅) ve Toplam Flavonoid miktarı tayini (Y₆) testlerine verilen cevaplar üzerinden istatistiksel olarak incelenmiştir. Bu önemli değişkenlerin etkileri ve etkileşimlerini incelemek için cevaplara regresyon analizi uygulanmış ve sonuçlar (Tablo 4.30) varyans analizi (ANOVA) ile verilmiştir.

Analizlerde düzeltme katsayısı (R^2) ve ayarlı düzeltme katsayısı (ayarlı R^2) değerlerinin 1’e yakın olması hem deneysel sonuçlar hem de istatistiksel olarak yapılan hesaplamalar ile tahmin edilen sonuçlar arasında yüksek bir korelasyon olduğunu göstermektedir. Ayrıca $R^2 > 0,08$ olması doğru bir model oluşturulduğunun göstergesidir (Lundstedt vd., 1998). Yapılan istatistiksel hesaplamalar ile elde edilen 0,9451-0,9917 arasında değişen R^2 değerleri modelin doğruluğunu destekler niteliktedir.

Tablo 4.30 Portakal kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi (Df)	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Y₁					
A	18	1	18	1,29	0,3067
B	1058	1	1058	76,12	0,0003*
C	2	1	2	0,14	0,7200
AA	1298,08	1	1298,08	0,93	0,3782
AB	6,25	1	6,25	0,45	0,5322
AC	0,25	1	0,25	0,02	0,8985
BB	762,981	1	762,981	54,89	0,0007*
BC	6,25	1	6,25	0,45	0,5322
CC	48,5192	1	48,5192	3,49	0,1207
Hata	69,5	5	13,9		
Toplam	2010,93	14	R ² = 0,9654	R ² (ayarlı) = 0,9032	
Y₂					
A	7,70281	1	7,70281	0,33	0,5893
B	1758,54	1	1758,54	75,87	0,0003*
C	24,7105	1	24,7105	1,07	0,3492
AA	36,0289	1	36,0289	1,55	0,2677
AB	45,7652	1	45,7652	1,97	0,2190
AC	1,3924	1	1,3924	0,06	0,8161
BB	4006,62	1	4006,62	172,86	0,0000*
BC	0,1521	1	0,1521	0,01	0,9386
CC	29,1289	1	29,1289	1,26	0,3132
Hata	115,894	5	23,18		
Toplam	6081,89	14	R ² = 0,9809	R ² (ayarlı) = 0,9466	
Y₃					
A	0,00030	1	0,00030	0,94	0,3776
B	0,17361	1	0,17361	550,77	0,0000*
C	0,00035	1	0,00035	1,11	0,3404
AA	0,00407	1	0,00407	12,91	0,0157*
AB	0,00023	1	0,00023	0,73	0,4310
AC	0,00007	1	0,00007	0,21	0,6674
BB	0,00732	1	0,00732	23,23	0,0048*
BC	0,00069	1	0,00069	2,20	0,1979
CC	0,00121	1	0,00121	3,83	0,1079
Hata	0,001576	5	0,00032		
Toplam	0,1905	14	R ² = 0,9917	R ² (ayarlı) = 0,9768	

Df:serbestlik derecesi, *:etkili parametreler, DPPH[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₁), DMPD[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₂), ABTS[•] radikal yakalama aktivitesi (Y₃)

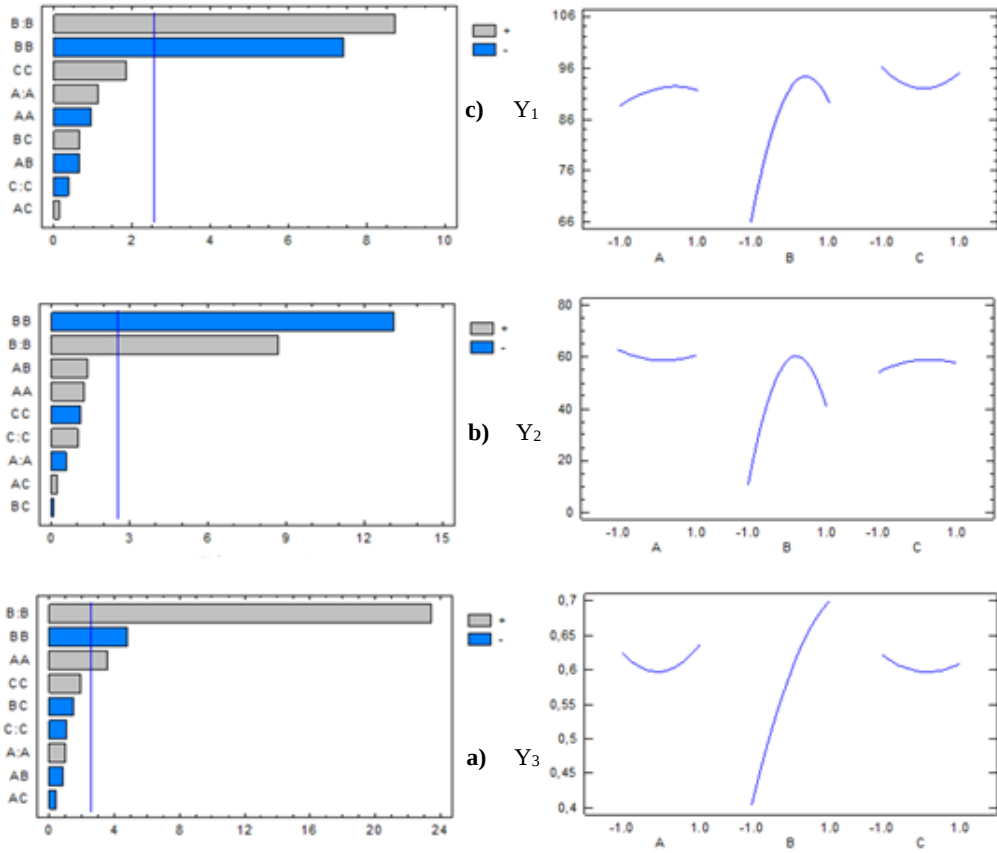
Tablo 4.30 Portakal kabuğu ekstreleri için ANOVA test sonuçları (devam)

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik derecesi (Df)	Kareler Ortalaması	F-değeri	p-değeri
Y₄					
A	0,00005	1	0,00005	0,17	0,7000
B	0,01445	1	0,01445	48,17	0,0001*
C	0,0002	1	0,0002	0,67	0,4513
AA	0,00187	1	0,00187	6,23	0,0547
AB	0,0004	1	0,0004	1,33	0,3004
AC	0,0001	1	0,0001	0,33	0,5887
BB	0,00519	1	0,00519	17,31	0,0088*
BC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
CC	0,00279	1	0,00279	9,31	0,0284*
Hata	0,0015	5	0,0003		
Toplam	0,02733	14	R ² = 0,9451	R ² (ayarlı) = 0,8463	
Y₅					
A	0,00781	1	0,00781	0,73	0,4306
B	0,68445	1	0,68445	63,34	0,0005*
C	0,04961	1	0,04961	4,66	0,0832
AA	0,00114	1	0,00114	0,13	0,7356
AB	0,00902	1	0,00902	0,85	0,3993
AC	0,0	1	0,0	0,00	0,1000
BB	0,4566	1	0,4566	42,92	0,0012*
BC	0,07563	1	0,07563	7,11	0,0446*
CC	0,00351	1	0,00351	0,33	0,5906
Hata	0,0532	5	0,0106		
Toplam	1,3488	14	R ² = 0,9606	R ² (ayarlı) = 0,8896	
Y₆					
A	29,8764	1	29,8764	0,33	0,5893
B	2505,61	1	2505,61	75,87	0,0003*
C	27,5282	1	27,5282	1,07	0,3492
AA	86,6435	1	86,6435	1,55	0,2677
AB	121,661	1	121,661	1,97	0,2190
AC	1,0	1	1,0	0,06	0,8161
BB	101,608	1	101,608	172,86	0,0000*
BC	167,444	1	167,444	0,01	0,9386
CC	3,11951	1	3,11951	1,26	0,3132
Hata	45,6572	5	9,1314		
Toplam	3106,3	14	R ² = 0,9853	R ² (ayarlı) = 0,9588	

Df:serbestlik derecesi, *:etkili parametreler, indirgeme gücü (Y₄) ve NO yakalama aktivitesi (Y₅) ve Toplam Flavonoid miktarı tayini (Y₆)

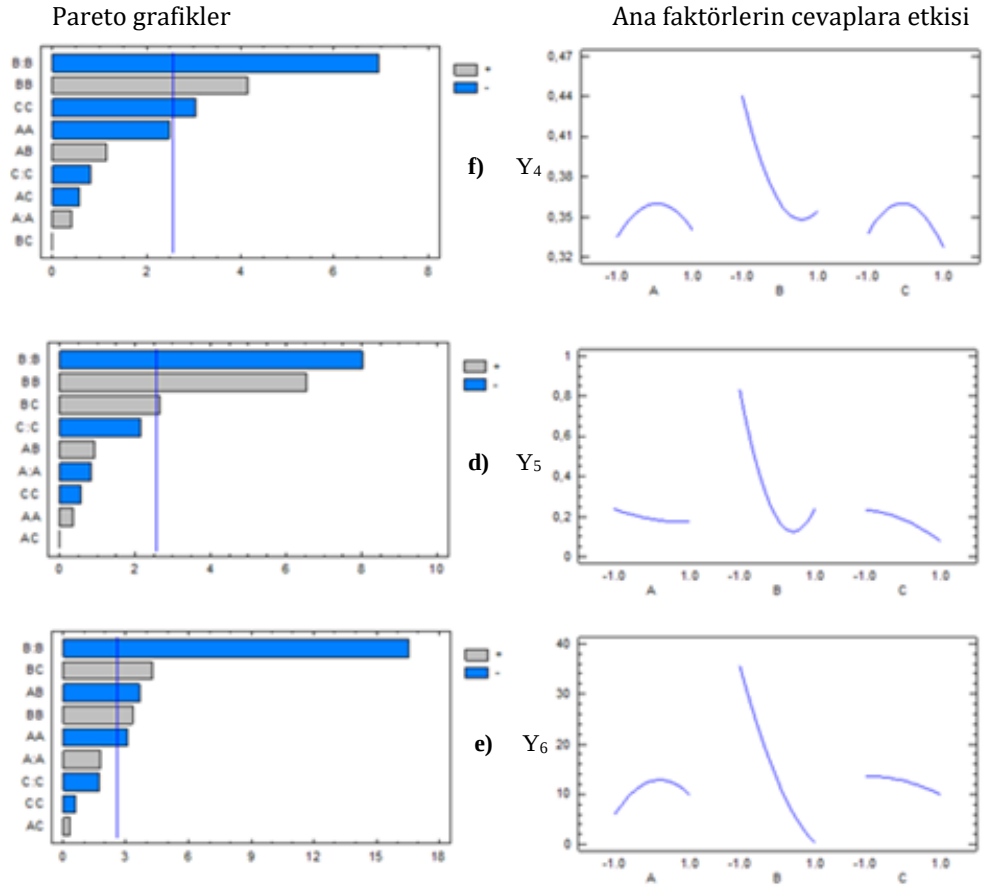
Pareto grafikler

Ana faktörlerin cevaplara etkisi



Şekil 4.14 a) Y_1 , b) Y_2 ve c) Y_3 cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi

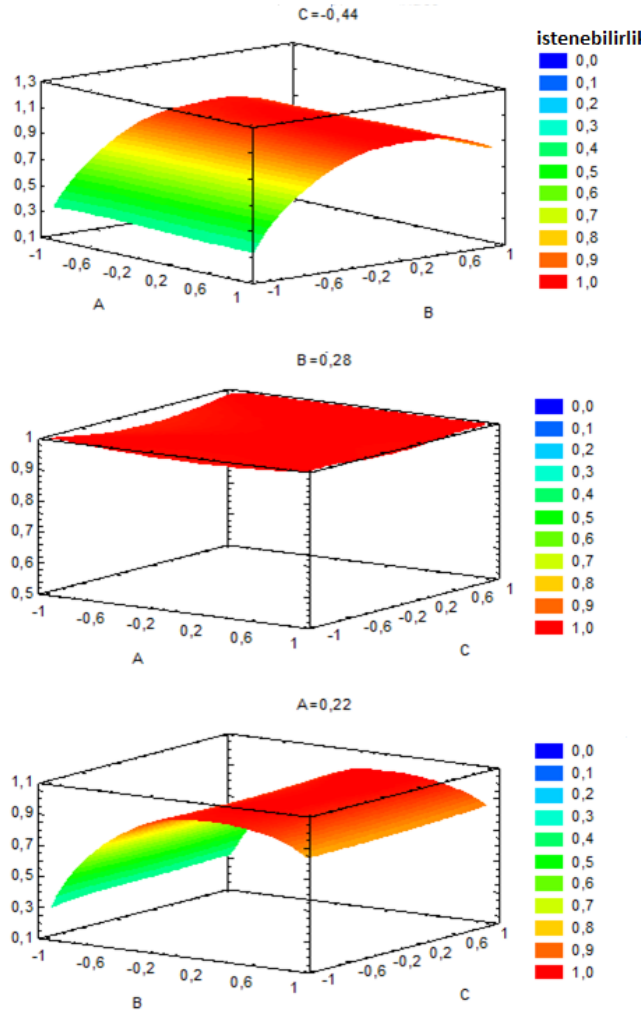
Şekil 4.14'te ana faktörlerin cevaplar üzerine etkisi ayrıntılı olarak görülmektedir. Verilen Pareto grafikleri incelendiğinde B değişkeninin cevapların tamamı üzerine etkisinin önemli olduğu, A ve C değişkenleri ile seçilen düzeyler arasındaki bazı etkileşimlerin ise ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür. B faktörünün cevaplar üzerinde olumlu etkileri olduğundan bu değişkenlerin miktarlarının artırılmasının sonucun pozitif etkilerini de olumlu etkileyeceği düşünülmüştür. Benzer şekilde tüm cevaplar üzerine BB karesel değişkeninin; ayrıca Y_3 için AA, Y_4 için CC ve Y_5 için BC karesel faktörlerinin de önemli derecede etkisi olduğu açıkça görülmüştür.



Şekil 4.15 d) Y_4 , e) Y_5 ve f) Y_6 cevapları için Box-Behnken Tasarımı ile elde edilen Pareto grafikleri ve ana faktörlerin cevaplara etkisi

En yüksek ekstraksiyon verimini elde etmeye karşılık gelen optimum şartlar için tüm cevapları aynı anda optimize etmek için kullanılan Derringer istenebilirlik fonksiyonu (DF) kullanılmıştır. Yapılan incelemeler Y_1 , Y_2 ve Y_3 radikal yakalama etkisi cevapları için B faktörünün su oranı yüksek çözeltilerde pozitif etki gösterdiğini ve bu verinin tam aksine Y_4 , Y_5 ve Y_6 cevapları için ise B faktörünün aseton oranı yüksek çözeltilerde pozitif etki gösterdiğini ortaya çıkartmıştır. Bu nedenle cevaplar üzerinde birincil derecede etki gösteren B faktörüne bağlı böyle bir zıtlığın optimizasyonda tüm cevaplar için ortak bir nokta bulunmasını güçleştirmiştir. Elde edilen bu sonuca bağlı olarak radikal yakalama aktivitesi cevapları olan ve su oranı yüksek çözeltiler için pozitif etki gösteren Y_1 , Y_2 ve Y_3 için ortak bir optimizasyon ve aseton oranı yüksek çözeltiler için pozitif etki gösteren Y_4 , Y_5 ve Y_6 için ortak bir optimizasyon çalışması yapılmıştır.

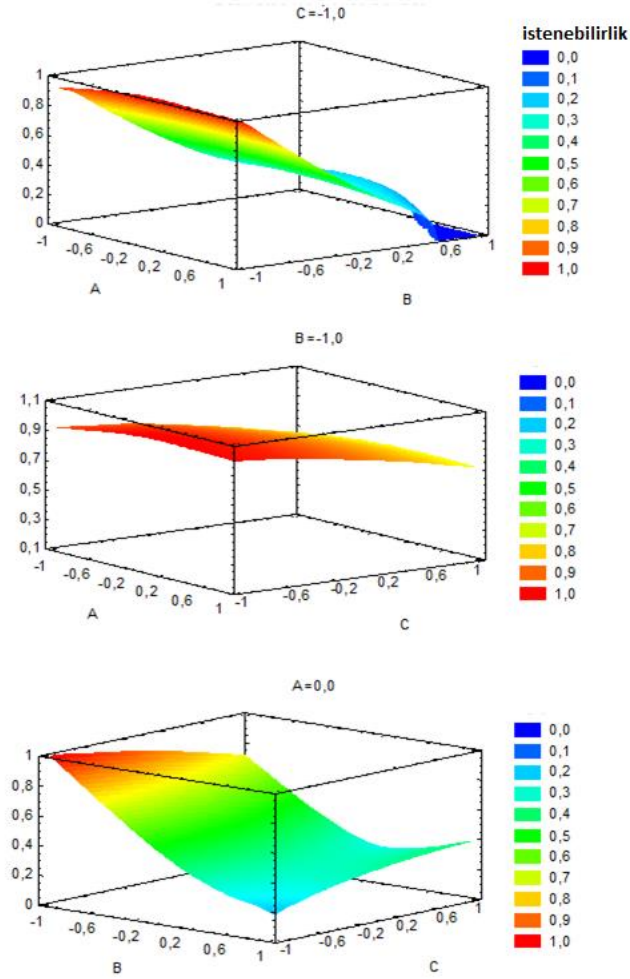
DF kapsamında yapılan istatistiksel hesaplamalar ile istenebilirlik değerleri hesaplanmış ve Y_1 , Y_2 ve Y_3 için yapılan optimizasyona ait cevap yüzey tasarımı grafikleri (Şekil 4.16) çizilmiştir. Bu kemometrik yöntem vasıtası ile bulunan optimum UAE şartlarının her bir parametrenin etkilerinin incelendiği yukarıdaki diğer verilerle de örtüştüğü görülmüştür.



Şekil 4.16 Y_1 , Y_2 ve Y_3 için yapılan optimizasyonda istenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri

Burada optimum ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi için tekli cevaplara göre tanımlanan koşullardan istatistiksel program yardımıyla çoklu cevap optimizasyonu için DF değerleri hesaplanmış ve DF'nin 1 olduğu optimum ekstraksiyon şartlarının; optimum; ekstraksiyon süresi (A) için 7,5 dak, çözücü oranı (B) için %40 aseton, çözücü hacmi (C) için 12 mL olduğu belirlenmiştir.

Benzer şekilde Y_3 , Y_4 ve Y_5 için DF kapsamında yapılan istatistiksel hesaplamalar ile istenebilirlik değerleri hesaplanmış bu üç cevabın çoklu optimizasyonuna ait cevap yüzey tasarımı grafikleri (Şekil 4.17) çizilmiştir. Bu yöntem vasıtası ile bulunan optimum UAE şartlarının her bir parametrenin etkilerinin incelendiği diğer verilerle örtüştüğü görülmüştür.



Şekil 4.17 Y_3 , Y_4 ve Y_5 için yapılan optimizasyonda istenebilirlik fonksiyonu için çizilen Cevap Yüzey Tasarımı grafikleri

Y_3 , Y_4 ve Y_5 cevaplarına ait optimum ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi için tekli cevaplara göre tanımlanan koşullardan istatistiksel program yardımıyla çoklu cevap optimizasyonu için DF değerleri hesaplanmış ve optimum ekstraksiyon şartlarının; ekstraksiyon süresi (A) için 6 dak, çözücü oranı (B) için %100 aseton, çözücü hacmi (C) için 10 mL olduğu belirlenmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda doğal yaşamı tehdit eden küresel ısınma sebebi ile hızla ve maalesef çoğu kez geri dönüşümsüz şekilde olumsuz etkilenen günümüz dünyasında önemi giderek artan geri dönüşüm ve atık değerlendirme, kontrollü kimyasal kullanımı, çevre koruma ve zaman tasarrufu konularına katkı sağlama çalışmalarının önemi daha da artmıştır. Tüm bu önemli konular dikkate alınarak tez çalışması kapsamında materyal seçimi yapılırken özellikle meyve sebze işleme sırasında ciddi atık miktarları bulunan turunçgil ailesinin limon, mandalina ve portakal gibi örneklerinin kabukları tercih edilmiştir.

Antioksidan kapasite tayini için ekstrakt hazırlanması yöntemi seçilirken klasik yöntemler ile karşılaştırıldığında daha az çözücünün kullanıldığı ve daha az ekstraksiyon süresinde iyi sonuçlar elde edildiği bilinen Ultrases Destekli Ekstraksiyon Yöntemi (UAE) tercih edilmiştir.

Tüm antioksidan aktivite parametreleri için elde edilen sonuçlarla istatistiksel çalışmalar yapılarak ekstraksiyon optimizasyon şartları belirlenmiştir. Her bir kabuk için bulunan ekstraksiyon şartları Tablo 5.1’de verilmiştir.

Tablo 5.1 Elde edilen optimum ekstraksiyon şartları

Değişken	Optimum Ekstraksiyon Şartları			
	Mandalina Kabuğu	Limon Kabuğu	Portakal Kabuğu	
	Tüm cevaplar için	Tüm cevaplar için	Y ₁ , Y ₂ ve Y ₃ için	Y ₄ , Y ₅ ve Y ₆ için
A (dak)	6	6	7.5	6
B (% aseton)	75	80	40	100
C (mL)	20	12	12	10

Elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile süre, çözücü oranı ve S/K oranı açısından kıyaslanmıştır. Tablo 5.2’de verilen değerler incelendiğinde bu tez çalışmasında elde edilen optimizasyon şartlarının 6 dak ve 7,5 dak gibi kısa sürelerde 10-20 mL arasında değişen çok az miktarl çözücü kullanımı ile oldukça avantajlı olduğu görülmektedir.

Tablo 5.2 Sonuçların benzer çalışmalarla kıyaslanması

Kullanılan ürün	UAE şartları			Kaynak
	Zaman (dak)	%Ekstraksiyon çözücüsü	S/K (mL/g)	
Turunçgil atıkları	23-25	-	40	Ma vd., 2008
Limon kabuğu atıkları	15,05	63,93 etanol	40	Dahmoune vd., 2013
Kumkuat polisakkaritleri	87	100 su	32	Zeng vd., 2015
Greyfurt kabukları	27,95	100 asidik su	50	Wang vd., 2015
Yuzu	119,67	65,55 etanol	37,168	Assefa vd., 2017
Mandalina kabuğu	40	80 aseton	20	Nipornram vd., 2018
Ekşi portakal kabuğu	10	100 asidik su	20	Hosseini vd., 2019
Mandalina kabuğu atıkları	6	75 aseton	20	Bu tez çalışması
Limon kabuğu atıkları	6	80 aseton	12	Bu tez çalışması
Portakal kabuğu atıkları (Y ₁ , Y ₂ ve Y ₃)	7,5	40 aseton	12	Bu tez çalışması
Portakal kabuğu atıkları (Y ₄ , Y ₅ ve Y ₆)	6	100 aseton	10	Bu tez çalışması

Gıda sanayilerinde oluşan atıkların alternatif kazanım yolları ile çeşitli aroma maddeleri, doğal renk maddeleri gibi ürünlere dönüştürülebildiği fikri ile, elde edilen antioksidan kapasitesi yüksek ekstraktların raf ömrü uzatma açısından önem taşıyan sentetik gıda katkı maddelerinin kullanım miktarını azaltabileceği ya da yerine doğal bir alternatif olarak kullanılabileceği ve çeşitli fonksiyonel gıda çalışmalarında bu ekstraktların kullanım alanı bulabileceği öngörülmektedir.

- Ajikumaran Nair S., Rajani Krup S. R., Akhila S. N., Sabulal B., (2018). "Citrus peels prevent cancer". *Phytomedicine*. 50, pp. 231-237.
- Akhtar M. J., Ahamed M., Hisham A., Alhadlaq Aws A., (2017). "Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in ROS associated degenerative disorders". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1861, pp. 802-813.
- Alam N., Bristi N. J., Rafiquzzaman M., (2013). "Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity". *Saudi Pharm. J.* 21, pp. 143-152.
- Arnao M.B., Cano A., A Costa M., (2001). "The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity". *Food Chem.* 73, pp. 239-244.
- Assefa A. D., Ko E. Y., Moon S. H., Keum Y-S., (2016). "Antioxidant and antiplatelet activities of flavonoid-rich fractions of three citrus fruits from Korea". *Biotech.* 109, pp. 1-10.
- Assefa A. D., Saini R. K., Keum Y. S., (2017). "Extraction of antioxidants and favonoids from yuzu (*Citrus junos* Sieb ex Tanaka) peels: a response surface methodology study". *Food Measure*. 11, pp. 364-379.
- Ballaz S. J., Rebec G. V., (2019). "Neurobiology of vitamin C: Expanding the focus from antioxidant to endogenous neuromodulator". *Pharmacol. Res.* 146, 104321.
- Benzie I. F. F., Strain J. J., (1999). "Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration". *Methods Enzymol.* 299, pp. 15-27.
- Bharath S., Hsu M., Kaur D., Rajagopalan S., Andersen J. K., (2002). "Glutathione, iron and Parkinson's disease". *Biochem. Pharmacol.* 64, pp. 1037-1048.
- Bors W., Michel C., Saran M., (1984). "Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity". *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids* 796, pp. 312-319.
- Bortolomeazzi R., Sebastianutto N., Toniolo R., Pizzariello A., (2007). "Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential". *Food Chem.*, 100, pp. 1481-1489.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C., (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity". *LWT-Food Sci. Technol.* 28, pp. 25-30.
- Brewer M. S., (2011). "Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications". *Compr. Rev. Food Sci. F.* 10, pp. 221-247.
- Briggs T. S., Rauscher W. C., (1973). "An oscillating iodine clock". *J. Chem. Educ.* 50, pp. 496.

- Bruni R., Muzzoli M., Ballero M., Loi M.C., Fantin G., Poli E. and Sacchetti G., (2017). "Tocopherols, fatty acids and sterols in seeds of four Sardinian wild Euphorbia species" *Fitoterapi*. 75, pp. 50–61.
- Candiotti L. V., Zan M. M., Camara M. S., Goicoechea H. C., (2014). "Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development". *Talanta*. 124, pp. 123-138.
- Cao G., Alessio H. M., Cutler R. G., (1993). "Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants". *Free Radic. Biol. Med.* 14, pp. 303-311.
- Carocho M., Ferreira I. C. F. R., (2013). "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food Chem. Toxicol.* 51, pp. 15-25.
- Carochoa M., Moralesb P., Ferreiraa I.C.F.R., (2018). "Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives". *Trend Food Sci. Tech.* 71, pp. 107-120.
- Chafik A., Essamadi A., Yildirim Çelik S., Mavi A., (2019). "Purification and biochemical characterization of a novel copper, zinc superoxide dismutase from liver of camel (*Camelus dromedarius*): An antioxidant enzyme with unique properties". *Bioorg. Chem.* 86, pp. 428-436.
- Chand K., Rajeshwari A., Hiremathad A., Mahak S., Santos M. A., Keri R. S., (2017). "A review on antioxidant potential of bioactive heterocycle benzofuran: natural and synthetic derivatives". *Pharmacol. Rep.*, 69, pp. 281–295.
- Chanioti S., Tzia C., (2018). "Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques". *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 48, pp. 228-239.
- Chen M-H., Yang K-M., Huang T-C., Wu M-L., (2017). "Traditional small-size citrus from Taiwan: essential oils, bioactive compounds and antioxidant capacity". *Medicines*, 4, pp. 1-11.
- Cong X., Bing W., Yi-Qiong P., Jian-Sheng T., Tong Z., (2017). "Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials". *Chin. J. Nat. Med.* 15, pp. 721-731.
- Cuvelier M. E., Richard H., Berset C., (1992). "Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure activity relationship". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, pp. 324-325.
- Dahmoune F., Boulekbache L., Moussi K., Aoun O., Spigno G., Madani K., (2013). "Valorization of Citrus limon residues for the recovery of antioxidants: Evaluation and optimization of microwave and ultrasound application to solvent extraction". *Ind. Crops Prod.* 50, pp. 77-87.
- Debelo H., Li M., Ferruzi M. G., (2020). "Processing Influences on food polyphenol profiles and biological activity". *Curr. Opin. Food Sci.* 32, pp. 90-102.
- Decker E., Welch, B., (1990). "Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food". *J. Agric. Food Chem.* 38, pp. 674-677.

- Diab A.E K., (2016). "*In vitro* studies on photochemical content antioxidant anticancer immunomodulatory and antigenotoxic activities of lemon. grapefruit and mandarin citrus peels". Asian Pac. J. Cancer P. 17, pp. 3559-3567.
- Dipasquale M., Nguyen M. H. L., Rikeard B. W., Cesca N., Tannous C., Castillo S. R., Katsaras J., Kelley E. G., Heberle f. A., Marquardt D., (2020). "The antioxidant vitamin E as a membrane raft modulator: Tocopherols do not abolish lipid domains". Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj. 1862, 183189.
- Donga X., Hu Y., Li Y., Zhou Z., (2019). "The maturity degree, phenolic compounds and antioxidant activity of Eureka lemon [Citrus limon (L.) Burm. f.]: A negative correlation between total phenolic content, antioxidant capacity and soluble solid content". Sci. Hort. 243, pp. 281-289.
- Durling N. E., Catchpole O. J., Grey J. B., Webby R. F., Mitchell K. A., Foo L. Y., Perry N. B., (2007). "Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures". Food Chem. 101, pp. 1417-1424.
- Dziezak J. D., (1986)., "Preservatives: Antioxidants". Food. Technol. 40, pp. 94-102.
- Eggersdorfer M., Wyss A., (2018). "Carotenoids in human nutrition and health". Arch. Biochem. Biophys. 652, pp. 18-26.
- Eler G. J., Peralta R. M., Bracht A., (2009). "The action of n-propyl gallate on gluconeogenesis and oxygen uptake in the rat liver". Chem. Biol. Interact. 181, pp. 390-399.
- Farina M., Aschner M., (2019). "Glutathione antioxidant system and methyl mercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay". Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj. 1863, 129285.
- Ferreira S. L. C., Caires A. O., Borges T. S., Lima A. M. D. S., Silva L. O. B., Santos W. L. N., (2017). "Robustness evaluation in analytical methods optimized using experimental designs". Microchem. J. 131, pp. 163-169.
- Fierascu R. C., Ortan A., Fierascu I. C., Fierascu I., (2018). "*In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant properties of wild-growing plants. A short review". Food Sci. 24, pp. 1-8.
- Filleria S. F. G., Tironi V. A., (2017). "Prevention of *in vitro* oxidation of low density lipoproteins (LDL) by amaranth peptides released by gastrointestinal digestion". J. Func. Food. 34, pp. 197-206.
- Fogliano V., Verde V., Randazzo G., Ritieni A., (1999). "Method for measuring antioxidant capacity of wines". J. Agric. Food. Chem. 47, pp. 1035-1040.
- Gate L., Paul J., Ba G. N., Tew K. D., Tapiero H., (1999). "Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants". Biomed. Pharmacother. 53, pp. 169-180.
- Ghiselli M., Serafini M., Maiani G., Azzini E., Ferroluzzi A., (1995). "Fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability". Free Radic. Biol. Med. 18, pp. 29-36.

- Guimaraes C. M., Giao M. S., Martinez S., Pintado A. I., Pintado M. E., Bento L. S., Xavier Malacata F., (2007). "Antioxidant activity of sugar molasses, including protective effect against DNA oxidative damage". *Food Chem. Toxic.* 72, pp. 39-43.
- Gullon B., Lu-Chau T. A., Moreira M. T., Lema J. M., Eibes G., (2017). "Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability". *Trends Food Sci. Technol.* 67, pp. 220-235.
- Halliwel B., (2001). "Handbook of Antioxidant". Marcel Dekker, New York.
- Hamlaoui I., Bencheraiet r., Bensegueni R., Bencharif M., (2018). "Experimental and theoretical study on DPPH radical scavenging mechanism of some chalcone quinoline derivatives". *J. Mol. Struct.* 1156, pp. 385-389.
- Hosseini S. S., Khodaiyan F., Kazemi M., Najari Z., (2019). "Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method". *Int. J. Biol. Macromol.* 125, pp. 621-629.
- Hou L., Zhou B., Yang Li, Liu Z-L., (2004). "Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by flavonols and their glycosides". *Chem. Phys. Lipids.* 129, pp. 209-219.
- Ighodaro O. M., Akinloye O. A., (2018). "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid". *Alexandria J. Med.* 54, pp. 287-293.
- Iranifam M., Lawati H. A.J., (2019). "Monitoring the antioxidant capacity in honey and fruit juices using a microfluidic device with a $\text{NaHCO}_3\text{-H}_2\text{O}_2\text{-Co}^{2+}$ chemiluminescence reaction". *Food Chem.* 297, 124930.
- İşbilir Ş. S., (2008). "Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi". Trakya Üniversitesi Doktora Tezi.
- Kashanian S., Dolatabadi J. E. N., (2009). "DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive". *Food Chem.* 116, pp. 743-747.
- Keston A. S., Brandt R., (1965). "The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide". *Anal. Biochem.* 11, pp. 1-5.
- Khan M. K., Huma Z., Dangles O., (2014). "A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols". *J. Food Compos. Anal.* 33, pp. 85-104.
- Kirschweng B., Tatraaljai D., Földes E., Pukanszky B., (2017). "Natural antioxidants as stabilizers for polymers". *Polym. Degrad. Stabil.* 145, pp. 25-40.
- Kohler D. R., Kröhnke C., (1999). "Chemiluminescence as an industrial test method for antioxidant effectiveness in polyols: II. Versatile application aspects". *Polym. Degrad. Stab.* 63, pp. 165-173.
- Lage M. A. P., García M. A. M., Álvarez J. A. V., Anders Y., Curran T.P., (2013). "A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic and hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and β -carotene bleaching methods in

- a single combined assay: Tea extracts as a case study". *Int. Food Res. J.* 53, pp. 836-846.
- Lagha-Benamrouche S., Madani K., (2013). "Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (*Citrus sinensis* L. and *Citrus aurantium* L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves". *Ind. Crop. Produc.* 50, pp. 723-730.
- Ledesma-Escobar C., A., Luque de Castro M. L., (2014). "Towards a comprehensive exploitation of citrus". *Trends Food Sci. Technol.* 39, pp. 63-75.
- Leopaldini M., Russo N., Toscana M., (2011). "The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants". *Food Chem.* 125, pp. 288-306.
- Li M., Hu G., Chen Y., (2016). "Evaluation of the antioxidant capacity of natural polyphenolic compounds using a macrocyclic Ni-(II) complex-catalysed Briggs-Rauscher reaction". *Food Chem.* 197, pp. 987-991.
- Liang J. R., Dai H., Yang H. M., Yang Z., Wang Z. Y., (2019). "The effect of dietary vitamin A supplementation in maternal and its offspring on the early growth performance, liver vitamin A content, and antioxidant index of goslings". *Poult Sci.* 98, pp. 6849-6856.
- Lopez M., Martinez F., Dell valle C., Ferrit M., Luque R., (2003). "Study of phenolic compounds as natural antioxidants by a fluorescence method"; *Talanta.* 60, pp. 609-616.
- Lopez-Alarcon C., Denicola A., (2013). "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays". *Anal. Chim. Acta.* 763, pp. 1-10.
- Lundstedt T., Seifert E., Abramo L., Thelin B., Nyström Å., Pettersen J., Bergman R., (1998). "Experimental design and optimization". *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42, pp. 3-40.
- Lussignoli S., Fraccaroli M., Andrioli G., Brocco G., Bellavite P., (1999). "A Microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma". *Anal. Biochem.* 269, pp. 38-44.
- Ma Y. Q., Chen J. C., Liu D. H., Ye X. Q., (2008). "Effect of ultrasonic treatment on the total phenolic and antioxidant activity of extracts from citrus peel". *Food Chem. Toxicol.* 73, pp. 115-120.
- Magalhaes L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C., (2008). "Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties". *Anal. Chim. Acta.* 613, pp. 1-19.
- Mahato N., Sharma K., Sinha M., Cho M. H., (2018). "Citrus waste derived nutraceuticals for health benefits: Current trends and future perspectives". *J. Funct. Foods.* 40, pp. 307-316.
- Makela M., (2017). "Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review". *Talanta.* 151, pp. 630-640.

- Marcocci L., Maguire J.J., Droy-Lefaix M.T. and Packer L., (1994). "The nitric-oxide scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, pp. 748–75.
- Martinez-Patino J. C., Gullon B., Romero I., Ruiz E., Brncic M., Zlabur J. S., Castro E., (2019). "Optimization of ultrasound-assisted extraction of biomass from olive trees using response surface methodology". *Ultrason. Sonochem.* 52, pp. 487-495.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini, (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes". *J. Nutr. Biochem.* 16, pp. 577-586.
- Matilla H., Khorobrykh S., Havurinne V., Tyystjarvi E. (2015). "Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues". *J. Photochem. Photobiol. B.* 152, pp. 176-214.
- Miller D. D., (1996). "Minerals" In: O. R. Fennema, Ed., *Food Chem.* Marcel Dekker, New York, pp. 617-649.
- Miller N. J., Rice-Evans C., Davies M. J., (1993). "A new method measuring antioxidant activity". *Biochem. Soc. Trans.* 21, pp. 95S.
- Mironczuk-Chodakowska I., Witkowska a. M., Zujko M. E., (2018). "Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body". *Adv. Med. Sci-Poland.* 63, pp. 68-78.
- Moure A., Cruz J. M., Franco D., Dominguez J. M., Sineiro J., Dominguez H., Nunez M. J., Parajo J. C., (2001). "Natural antioxidants from residual sources" *Food chem.* 75, pp. 145-171.
- Mousavi L., Tamiji Z., Khoshayand M. R., (2018). "Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review" *Talanta.* 190, pp. 335-356.
- Nagatani N., Inoue Y., Araki A., Ushijima H., Hattori G., Sakurai Y., Ogidou Y., Saito M., Tamiya E., (2016). "Rapid sensing of antioxidant capacity based on electrochemiluminescence induced by electrochemically generated reactive oxygen species". *Electrochim. Acta.* 222, pp. 580-586.
- Nakamura Y. K., Read M. H., Elias J. W., Omaye S. T., (2006). "Oxidation of serum low-density lipoprotein (LDL) and antioxidant status in young and elderly humans". *Arch. Gerontol. Geriatr.* 42, pp. 265-276.
- Nanditha P., Prabhasankar P., (2009). "Antioxidants in bakery products: A review". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* vol. 49, pp. 1-27.
- Narenderan S. T., Meyyanathan S. N., Reddy Karri V. V. S., (2019). "Experimental design in pesticide extraction methods: A review". *Food Chem.* 289, pp. 384-395.
- Neha K., Haider R., Pathak A., Yar M. S., (2019). "Medicinal prospects of antioxidants: A review". *Eur. J. Med. Chem.* 178, 687-704.
- Nijhawana P., Arorab S., Behlb T., (2019). "Intricate role of oxidative stress in the progression of obesity". *Obes. Med.* 15, pp. 1-5.

- Nipornram S., Tochampa W., Rattanatraiwong P., Singanusong R., (2018). "Optimization of low power ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampueng) peel". *Food Chem.* 241, pp. 3358-345.
- Olszowy M., (2019). "What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?". *Plant Physiol. Biochem.* 144, pp. 135-143.
- Oroian M., Escriche I., (2015). "Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis". *Food Res. Int.*, 74, pp. 10-36.
- Oyaizu M., (1986). "Studies on products of browning reaction prepared from glucose amin". *Jpn. J. Nutr.* 44, pp. 307-315.
- Ozdinc S., Oz G., Ozdemir C., Kilic I., Karakaya Z., Bal A., Koken T., Solak O., (2016). "Melatonin: is it an effective antioxidant for pulmonary contusion?". *J. Surg. Res.* 204, pp. 445-451.
- Özyürek M., Güçlü K., Apak R., (2011). "The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement". *Trends Anal. Chem.* 30, pp. 652-664.
- Pagnacco M. C., Maksimovic J. P., Mudrinic T. M., Mojovic Z. D., Nedic Z. P., (2019). "Briggs-Rauscher reaction as a novel electrochemical detector for phosphate tungsten and phosphate molybdenum bronzes". *J. Electroanal. Chem.* 849, 113369.
- Pang Y., Jiang X., Zhao S., Huang Z., Zhu H., (2018). "Beneficial role of melatonin in protecting mammalian gametes and embryos from oxidative damage". *J. Integr. Agric.* 17, pp. 2320-2335.
- Panja P., (2018). "Green extraction methods of food polyphenols from vegetable materials". *Curr. Opin. Food Sci.* 23, pp. 173-182.
- Pinchuk I., Shoval H., Dotan Y., Lichtenberg D., (2012). "Evaluations of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays". *Chem. Phys. Lipids.* 165, pp. 638-647.
- Prasad S., Gupta S. C., Tyagi A. K., (2017). "Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals". *Cancer lett.* 387, pp. 95-105.
- Prieto M. A., Vazquez J. A., Murado M. A., (2015). "Crocic bleaching antioxidant assay revisited: application to microplate to analyse antioxidant and pro-oxidant activities". *Food Chem.*, 167, pp. 299-310.
- Prior R. L., (2015). "Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits". *J. Funct. Foods.* 18, pp. 797-810.
- Rafiq S., Kaul R., Sofi S. A., Bashir N., Nazir F., Nayik G. A., (2018). "Citrus peel as a source of functional ingredient". *J. Saudi Soc. Agric. Sci.* 17, pp. 351-358.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C., (1999). "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radic. Biol. Med.*, 26, pp. 1231-1237.
- Reiter R. J., (2003). "Melatonin: clinical relevance". *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol.*, 17, pp. 273-285.

- Ribeiro D., Freitas M., Silva A. M. S., Carvalho F., Fernandes E., (2018). "Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products". *Food. Chem. Toxicol.* 120, pp. 681-699.
- Rondeau P., Bourdon E., (2011). "The glycation of albumin: Structural and functional impacts". *Biochimie.* 93, pp. 645-658.
- Sacan O., Yanardag R., (2010). "Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*)". *Food Chem. Toxicol.* 48, pp. 1275–1280.
- Safdar M. N., Kausar T., Jabbar S., Mumtaz A., Ahad K., Saddozai A. A., (2017). "Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques". *J. Food Drug Anal.* 25, pp. 488-500.
- Saini R. K., Keum Y. S., (2018). "Carotenoid extraction methods: A review of recent developments". *Food Chem.* 240, pp. 90-103.
- Sanchez C., *(2017). "Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms". *Synth. Syst. Biotechnol.* 2, pp. 13-22.
- Sarangarajan R., Meera S., Rukkumani R., Sankar P., Anuradha G., (2017). "Antioxidants: Friend or foe?". *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, pp. 1111-1116.
- Schaich K. M., Tian X., Xie J., (2015). "Reprint of Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays". *J. Func. Food.* 18, pp. 782-796.
- Shahidi F., Ambigaipalan P., (2015). "Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects". *J. Funct. Foods*, 18, pp. 820-897.,
- Shahidi F., Wanasundara J. P. D., (1992). "Phenolic antioxidants". *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 32, pp. 67-103.
- Shahidi F., Zhong Y., (2015). "Measurement of antioxidant activity". *J. Funct. Foods*. 8, pp. 757-781.
- Sharif K. M., Rahman M. M., Azmir J., Mohamed A., Jahurul M. H. A., Sahena F., Zaidul I. S. M., (2014). "Experimental design of supercritical fluid extraction – A review". *J. Food Eng.* 124, pp. 105-116.
- Sharma K., Mahato N., Cho M. H., Lee Y. R., (2017). "Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmently friendly approaches". *Nutrition.* 34, pp. 29-46.
- Sharma S., Cheng S-F., Bhattacharya B., Chakkaravarthi, (2019). "Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation". *Trends Food Sci. Technol.* 91, pp. 305-318.
- Shofinita D., Feng S., Langrish T. A. G., (2015). "Comparing yields from the extraction of different citrus peels and spray drying of the extracts". *Adv Powder Technol.* 26, pp. 1633-1638.

- Signorella S., Palopoli C., Ledesma G., (2018). "Rationally designed mimics of antioxidant manganoenzymes: Role of structural features in the quest for catalysts with catalase and superoxide dismutase activity". *Coord. Chem. Rev.* 365, pp. 75-102.
- Singh B., Singh J. P., Kaur A., Singh N., (2020). "Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel". *Int. Food Res. J.* 132, 109114.
- Singleton V. L., Otrhofer R., Lamuela-Raventos R. M., (1999). "Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent". *Methods Enzymol.* 299, pp. 152-178.
- Sisein E. A., (2014). "Biochemistry of Free radicals and antioxidants", *Sch. Acad. J. Biosci.* 2, pp.110-118.
- Slinkard K., Singleton V. L., (1977). "Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods". *Am. J. Enol. Vitic.* 28, pp. 49-55.
- Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE), (2017). "Durum/Tahmin Turunçgiller 2016/2017".
- Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE), (2019). "Tarım ürünleri piyasaları, portakal".
- Tubaro F., Micossi E., Ursini F., (1998). "Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics". *Free Radic. Biol. Med.* 24, pp. 1228-1234.
- Türkiye İhracatçılar Meclisi (TİM), (2017). "İhracat rakamları". (<http://tim.org.tr>), 2017.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), (2017). Bitkisel üretim istatistikleri, (<http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>).
- Uysal O., Polatöz S., (2016). "Dünyada ve Türkiye’de turunçgil üretimi ve dış ticareti". *TÜRKTOB*, pp. 6-11.
- Ügdüler S., Van Geem K. M., Roosen M., Delbeke E. I. P., Meester S., (2020). "Challenges and opportunities of solvent-based additive extraction methods for plastic recycling". *Waste Management.* 104, pp. 148-182.
- Vareltzis K., Koufidis D., Gavrilidou E., Papavergou E., Vasiliadou S., (1997). "Effectiveness of natural rosemary (*rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage". *Z Lebensm. Unters. Forsch. A.* 20, pp. 93-96.
- Vrolijk M. F., Opperhuizen A., Jansen E. H. J. M., Godschalk R. W., Van Schooten F. J., Bast A., Haenen G. R. M. M., (2015). "The shifting perception on antioxidants: The case of vitamin E and β -carotene". *Redox Biol.* 4, 272-278.
- Wang J., Wan W., (2009). "Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review". *Int. J. Hydrog. Energy.* 34, pp. 235-244.
- Wang W., Ma X., Xu Y., Cao Y., Jiang Z., Ding T., Ye X., Liu D. (2015) "Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: optimization and comparison with the conventional method". *Food Chem.* 178, pp. 106-114.

- Wang Y., Qian J., Cao J., Wang D., Liu C., Yang R., (2017). "Antioxidant capacity anticancer ability and flavonoids composition of 35 Citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties". *Molecules*. 22, pp. 1-20.
- Wayner D. D., Burton G. W., Ingold K. U., Locke S., (1985). "Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: The important contribution made by plasma proteins". *FEBS Lett.*, 187, pp. 33-37.
- Winston G. W., Regoli F., Dugas A. J., Fong J. H., Blanchard K. A., (1998). "A Rapid Gas Chromatographic Assay for Determining Oxyradical Scavenging Capacity of Antioxidants and Biological Fluids". *Free Radic. Biol. Med.*, 24, pp. 480-493.
- Xi W., Zhang Y., Sun Y., Shen Y., Ye X., Zhou Z., (2014). "Phenolic compositions of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Balnco.) pulps and their antioxidant properties". *Ind. Crop. Produc.* 52, pp. 466-474.
- Xing C., Qin C., Li X., Zhang F., Linhardt R. J., Sun P., Zhang A., (2019). "Chemical composition and biological activities of essential oil isolated by HS-SPME and UAHD from fruits of bergamot". *LWT-Food Sci. Technol.* 104, pp. 38-44.
- Xiuhua W., Chao L., Yifeng T., (2012). "Microemulsion-enhanced electrochemiluminescence of luminol-H₂O₂ for sensitive flow injection analysis of antioxidant compounds" *Talanta*. 94, pp. 289-294.
- Yao Q., Jiang X., Kou L., Samuriwo A. T., Xu H. L., Zhao Y. Z., (2019). "Pharmacological actions and therapeutic potentials of bilirubin in islet transplantation for the treatment of diabetes". *Pharmacol. Res.* 145, 104256.
- Yazdani M., (2015). "Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species *in vitro*". *Toxicol In Vitro*. 30, pp. 578-582.
- Yi K., Bao-Hua Z., Zi-Hui Z., Yu-Wei Z., Li N., (2020). "Recent advances in electrochemiluminescence of halide perovskites" 48, e20021-e20031.
- Zagrean-Tuza C., Dorneanu S., Mot A. C., (2020). "The strange case of polyphenols inhibiting the Briggs-Rauscher reaction: pH modulated reactivity of the superoxide radical". *Free Radic. Biol. Med.* 146, pp. 189-197.
- Zema D. A., Calabro P. S., Folino A., Tamburino V., Zappia G., Zimbone S. M., (2018). "Valorisation of citrus processing waste: A review". *Waste Manage.* 80, pp. 252-273.
- Zhang P., Zhou Z., (2019). "Postharvest ethephon degreening improves fruit color flavor quality and increases antioxidant capacity in 'eureka' lemon (*Citrus limon* (L.) burm. f.)" *Sci. Hortic.* 248, pp. 70-80.
- Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W., (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals". *Food Chem.* 64, pp. 555-559.
- Zou Z., Xi W., Hu Y., Nie C., Zhou Z., (2016). "Antioxidant activity of Citrus fruits". *Food Chem.* 196, pp. 885-896.

- Zurita J. L., Jos A., Peso A. D., Salguero M., Lopez-Artiguez M., Repetto G. (2007). "Exotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems". *Water Res.* 41, pp. 2599-2611.
- Zwingelstein M., Draye M., Besombes J-L., Piot C., Chatel G., (2020). "Viticultural wood waste as a source of polyphenols of interest: Opportunities and perspectives through conventional and emerging extraction methods". *J. Waste Manag.* 102, pp. 782-794.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Makaleler

1. Tan Erkoç N., Dinç Zor Ş., Alpdoğan G., Peksel A., “Optimization of ultrasonic-assisted extraction of antioxidants from lemon peel waste using response surface methodology and multi-response desirability function.” J. Indian Chem. Soc., (2020) Vol. 97, No. 11b, pp. 2482-2489.

Sözlü Sunumlar

1. Tan Erkoç N., Dinç Zor Ş., Alpdoğan G., Peksel A., “Ultrasound destekli ekstraksiyon ile limon kabuklarından elde edilen ekstraktların antioksidan etkilerinin incelenmesi ve optimum ekstraksiyon koşullarının deneysel tasarım yöntemi ile belirlenmesi”. 31. Ulusal Kimya Kongresi, 10-13 Eylül 2019, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.