

## Beyaz hindibadan (*Cichorium intybus* L.) antioksidan maddelerin ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin kemometrik optimizasyonu

*Chemometric Optimization of Ultrasonic Assisted Extraction Parameters of Antioxidants from White Chicory (Cichorium intybus L.)*

Açelya AKLAN<sup>1</sup> , Önder AYBASTIER\*<sup>1</sup> 

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bursa, Türkiye

• Geliş tarihi / Received: 20.01.2023

• Kabul tarihi / Accepted: 03.05.2023

### Öz

Beyaz hindiba yapraklarından fenolik bileşiklerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu için deneysel koşulları optimize etmek amacıyla beş seviyeli beş faktörlü yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Yanıt verileri olarak toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite seçilerek beş bağımsız değişken; süre (dk), HCl derişimi (mol/L), sıcaklık (°C), sıvı/katı oranı (mL/g) ve metanol derişimi (%) kullanılarak 48 deney gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon sonucunda en yüksek toplam fenolik madde için optimum koşullar, sıcaklık 73 °C, süre 69 dk, metanol derişimi %84, HCl derişimi 0.57 mol/L ve sıvı/katı oranı 33.97 mL/g olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasite için optimum koşullar sıcaklık 73 °C, süre 69 dk, metanol derişimi %85, HCl derişimi 0.47 mol/L ve sıvı/katı oranı 33.99 mL/g olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda elde edilen beyaz hindiba ekstraktının toplam fenolik madde içeriği 33.5±0.5 mg GAE/g kuru bitki ve antioksidan kapasite 7.2±0.1 mg TE/g kuru bitki olarak bulunmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Antioksidan kapasite, *Cichorium intybus* L, Fenolik madde, Kemometrik optimizasyon, Yanıt yüzey yöntemi

### Abstract

In order to optimize the experimental conditions for the ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from chicory leaves, a five level five factor central composite design response surface methodology was used. Total phenolic content and antioxidant capacity were selected as the response and 48 experiments were performed using five independent variables; time (min), HCl concentration (mol/L), temperature (°C), liquid/solid ratio (mL/g) and methanol concentration (%). As a result of optimization, optimum conditions, for maximum total phenolic content were determined as temperature 73 °C, time 69 min, methanol 84%, HCl concentration 0.57 mol/L and liquid/solid ratio 33.97 mL/g. The optimum conditions, for maximum antioxidant capacity were temperature 73 °C, time 69 min, methanol 85%, HCl concentration 0.47 mol/L and liquid/solid ratio 33.99 mL/g. The total phenolic content of white chicory extract obtained as a result of extraction under optimum conditions was determined as 33.5±0.5 mg GAE/g dried plant and antioxidant capacity as 7.2±0.1 mg TE/g dried plant.

**Keywords:** Antioxidant capacity, *Cichorium intybus* L., Phenolic substance, Chemometric optimization, Response surface methodology

\*Önder AYBASTIER; aybastier@uludag.edu.tr

## 1. Giriş

### 1. Introduction

Ülkemizde beyaz hindiba olarak bilinen *Asteraceae* (papatyagiller) familyasına ait *Cichorium intybus* L., Hindistan, Kuzey ve Güney Avrupa ve Türkiye'de yaygın olarak bulunmaktadır. Bu türün kökeni Avrupa-Akdeniz olarak kabul edilmektedir. Hindiba, kökleri için yetiştirildiğinde sıcak ve nemli bir iklim gerektirir; fakat tohum için yetiştirildiğinde, kuru ılıman iklime sahip bölgelerde (orta Asya, kuzey Afrika, doğu ABD, Avustralya) daha iyi yetiştirilmektedir. (Bais & Ravishankar, 2001; Wang & Cui, 2011; Al-Snafi, 2016). Yaygın dağılımı nedeniyle bitkinin pek çok kısmı dünya çapında geleneksel ilaçlarda kullanılmıştır. Türk halk hekimliğinde de kökleri ve yaprakları çeşitli amaçlar için kullanılmıştır (Sezik vd., 1991).

Beyaz hindiba (*C. intybus* L.), yaklaşık 80-90 cm yüksekliğe, 20-100 cm uzunluğunda geniş yapraklara, genellikle parlak mavi, nadiren beyaz veya pembe çiçeklere ve yaklaşık 75 cm uzunluğa, etli kazık köklere sahip, oldukça odunsu ve çok yıllık bir bitkidir. Temmuz'dan Eylül'e kadar çiçek açmaktadır. Öğle vakti çiçekler kapanır ve sabah saatlerinde tekrar açılır. Bu bitkinin pek çok bölgesi olduğu gibi kök kısmı da şifalı olarak kullanılır ve inülin, şeker gibi bileşenlerden oluşmaktadır. Kök kısmı uçucu yağ ve glikozitler içermektedir. Başta C vitamini olmak üzere vitamin bakımından da oldukça zengin bir bitkidir (Kaya vd., 2004; Khaghani, 2012; Dalar & Konczak 2014; Tunçtürk vd., 2018).

Beyaz hindiba'nın tedavi amaçlı kullanımı insanlık tarihiyle başlamıştır. Uzun kullanım geleneğine rağmen, bitki Avrupa Farmakopesi'nde veya bir Avrupa Birliği Üye Devletinin herhangi bir resmi farmakopesinde tanımlanmamıştır. (Cadalen vd., 2010; Al-Snafi, 2016). Beyaz hindiba bitkisinde tespit edilen çeşitli besinsel açıdan önemli bileşikler, zengin ve çok yönlü besin bileşimini göstermiştir. Karbonhidratlar, fenolik bileşikler, flavonoidler, yağ ve amino asitler, laktonlar, vitaminler, mineraller, antosiyaninler, inülin, alkaloidler, kumarinler, seskiterpenler, doymamış steroller, klorofil pigmentleri, saponinler, sinnamik ve kinik asit türevleri gibi bir dizi önemli bileşik içermektedir ve bu içeriklerinden dolayı büyük bir kullanım alanı zenginliğine sahiptir (Molan vd., 2003; Muthusamy vd., 2008).

Tıbbi amaçlar için en yaygın kullanım şekli bitkinin taze ve kurutulmuş formudur (Janda vd., 2021). Yapraklar iyi bir potasyum, kalsiyum ve fosfor kaynağı iken, A ve C vitaminleri açısından da oldukça zengindir (Mulabagal vd., 2009; Koner vd., 2011). Hindiba ekstraktları enerji içeceği üretimi için kullanılırken, hindiba köklerinden etanol ve fruktoz şurubu üretiminde faydalanılmaktadır (Bais & Ravishankar, 2001). Bitkinin kavrulmuş kökleri kahve yerine kullanılmıştır. Köklerden fırında yakılarak elde edilen kül, tereyağı ile karıştırılarak yara iyileşmesi için ve cilt bozuklukları tedavisinde de merhem olarak kullanılmıştır (Sezik vd., 1991). Halk hekimliğinde bu bitki ishal tedavisinde, karaciğer rahatsızlıklarının tedavisinde, akciğer hastalığı ve öksürük tedavisinde, ateş ve kusma tedavisinde, tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmıştır (Bais & Ravishankar, 2001; Ahmed vd., 2003; Muthusamy vd., 2008; Street vd., 2013). Ayrıca fenolik asitlere atfedilen diüretik etkisi de vardır. Unani ve Ayurvedik tıp sistemlerinde beyaz hindiba tohumları etkili bir şekilde kullanılmıştır (Rahimullah vd., 2018). Ek olarak, hindiba hepatoprotektif, antiinflamatuvar, antioksidan, sedatif, immünolojik, kardiyovasküler, hipolipidemik, antidiyabetik, antikanser, gastro-koruyucu, antimikrobiyal gibi birçok biyolojik aktivite de gösterir (Bahmani vd., 2015; Al-Snafi, 2016). Hindibadan izole edilen laktosin ve laktokosiprin gibi seskiterpenlerin, antibakteriyel ve antimalaryal aktiviteleri bulunmaktadır. Antifungal ve böcek öldürücü etkilerinin de olduğu pek çok kaynakta ifade edilmektedir (Nandagopal & Kumari, 2007).

Fenolik bileşikler pek çok meyve, sebze ve bitkisel ürünler de doğal olarak bulunan ve bu ürünlerin renk, tat, koku gibi çeşitli spesifik özelliklerini oluşturan fitokimyasallardır. Doğal antioksidan kaynaklarını genel olarak bitki fenolik maddeleri oluşturmaktadır. Aynı zamanda fenolik bileşikler, bitkilerin savunma mekanizmasında rol oynayarak virüsler ve parazitler gibi çeşitli zararlılara karşı etki gösterirler (Atoui vd., 2005; Huang vd., 2005; Skerget vd., 2005; Mathew & Abraham, 2006; Bohn, 2014). Son yıllarda, fenolik bileşikler için ekstraksiyon süresini kısaltmak, verimi artırmak ve daha az çözücü kullanmak amacıyla yeni ve yeşil ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine ilgi artmıştır (Chemat vd., 2019; Chen vd., 2018). Bu amaçla ultrasonik destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ve hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu gibi teknikler kullanılmaktadır. Bu ekstraksiyon tekniklerinin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun, yüksek maliyetli olması ve çözücülerin mikrodalga absorplama yeteneklerine göre seçilmesi; süperkritik akışkan ekstraksiyonunun, yüksek maliyetli ve matriks yapısına bağlı olması; hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda da maliyetin yüksek olması ve ekstraksiyonun matrise bağımlı olması gibi dezavantajları vardır (Büyüktünel, 2012). Bunların yanında

ultrasonik destekli ekstraksiyon, maliyetinin düşük olması, az zaman alması ve yüksek ekstraksiyon verimi gibi özelliklerinden dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyonda örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını, hücre duvarlarının parçalanmasını ve hücre zarında gerçekleşen kütle transferini sağlar (Pan vd., 2011).

Son yıllarda, daha az reaktif kullanımı ve daha az laboratuvar çalışması ile yürütülmesi gereken çalışmalarda deney sayısında azalma ve parametreler arası ilişkinin de göz önünde bulundurulması gibi avantajları sebebiyle analitik yöntemlerin optimizasyonu için kemometrik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (Ferreira vd., 2007). Kemometrik deneysel dizaynın amacı, deney sayısını düşürmek, maliyeti azaltmak ve zamandan tasarruf sağlamaktır. Deney sayısı ve çalışılan faktörlerin seviyeleri, kemometrik dizayna göre oluşturulan matrise bağlıdır (Ferreira vd., 2018). Merkezi kompozit dizayn (CCD), beş seviye içeren iki veya daha fazla parametrenin optimizasyonu için kullanılan bir yanıt yüzey yöntemidir. (Bezzera, 2008; Ferreira vd., 2018). CCD yöntemi, istatistiksel analiz yoluyla, sonuçlara dayanarak farklı faktörler arasındaki etkileşimi analiz edebilir. Böylece yapılan işlemde rol oynayan faktörler daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilir (Youcai & Tao, 2021).

Bu çalışmada, beyaz hindiba yapraklarından antioksidan bileşiklerin ultrasonik destekli ekstraksiyonu için; süre (dk), HCl (mol/L), sıcaklık (°C), sıvı/katı (mL/g) ve metanolden (%) oluşan beş parametre incelenmiştir. Bu parametrelerin etkisini incelemek için 5 seviye-5 faktörlü bir merkezi kompozit dizayn oluşturularak 48 deney gerçekleştirilmiştir. Design Expert 7.0.0 programı yardımıyla hesaplamalar yapılarak optimum koşullar belirlenmiştir.

## 2. Materyal ve metot

### 2. Material and method

#### 2.1. Materyal

##### 2.1. Material

Ticari olarak satılan beyaz hindiba (*C. intybus* L.) bitkisinin kurutulmuş yaprakları satın alınmıştır. Kurutulmuş yapraklar ekstraksiyon öncesi +4 °C'de muhafaza edilmiştir. ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit), bakır (II) sülfat pentahidrat, Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum hidroksit, sodyum karbonat, sodyum-potasyum tartarat tetrahidrat Sigma-Aldrich (St. Louis, MO. ABD)'ten, etanol, hidroklorik asit, metanol, potasyum persülfat Merck (Darmstadt, Almanya)'ten satın alınmıştır. Tüm deneysel işlemlerde analitik saflıkta kimyasallar ve ultra saf su kullanılmıştır.

#### 2.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon

##### 2.2. Ultrasonic assisted extraction

Beyaz hindibanın kurutulmuş yaprakları 25 mL'lik cam viallere alınarak üzerine toplam hacim 20 mL olacak şekilde su, metanol ve hidroklorik asit ilave edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon sıcaklık kontrollü ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ekstrakt süzgeç kâğıdı ile süzülerek analize hazır hale getirilmiştir. Süzülen ekstraktlar analizi yapılabilecek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 2.3. Deneysel dizayn

##### 2.3. Experimental Design

Merkezi kompozit dizaynda gerçekleştirilecek deney sayısı,  $N = 2^k + 2k + 1$  formülü ile belirlenir. Burada k parametre sayısıdır (Ait-Amir vd., 2015). Merkezi kompozit dizayn yanıt yüzey yöntemi deney tasarlamaya, modeller oluşturmaya, değişkenlerin veya faktörlerin etkisini değerlendirmeye ve istenen yanıtlara yol açan optimum koşulları aramaya yardımcı olur. Yanıt yüzey yönteminin amaçları, beklenen yanıtı tahmin etmek için yaklaşık bir fonksiyon oluşturmak ve yanıt fonksiyonunun optimizasyonuna yol açan en iyi değişken değerlerinin belirlenmesidir (Pattanaik vd., 2018).

Beyaz hindiba ile gerçekleştirilen ultrasonik destekli ekstraksiyonda sıcaklık, ekstraksiyon süresi, metanol yüzdesi, HCl derişimi ve sıvı/katı oranından oluşan beş parametre incelenmiştir. Bu parametrelerin etkisini incelemek için 5 seviye-5 faktörlü bir merkezi kompozit dizayn oluşturularak 48 deney gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 1.** Merkezi kompozit dizaynda kullanılan gerçek ve kodlanmış değerler

**Table 1.** Actual and coded values used in the central composite design

Faktörler	Seviyeler				
	-2.378	-1	0	+1	+2.378
x <sub>1</sub> Sıcaklık (°C)	26	40	50	60	74
x <sub>2</sub> Süre (dk)	12	40	60	80	108
x <sub>3</sub> Metanol (%)	14.3	35.0	50.0	65.0	85.7
x <sub>4</sub> HCl (mol/L)	0.41	0.75	1.00	1.25	1.59
x <sub>5</sub> Sıvı/katı (mL/g)	8.65	16.00	21.33	26.67	34.02

Bu çalışmada, 3 boyutlu yanıt yüzey grafikleri ve ANOVA sonuçları değerlendirilerek en yüksek toplam fenolik madde ve antioksidan kapasiteyi elde etmek için optimum ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir.

## 2.4. Toplam fenolik madde tayini

### 2.4. Total phenolic compound assay

Toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Aybastier vd., 2013). Lowry A çözeltisi %0.4 NaOH ve %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> içerecek şekilde saf su ile hazırlanmıştır. Lowry B çözeltisi %1 NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub> ve %0.5 CuSO<sub>4</sub> içerecek şekilde saf su ile hazırlanmıştır. 50:1 (h/h) oranında Lowry A ve Lowry B karıştırılarak Lowry C çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz tüplerine konulan 0.1 mL beyaz hindiba ekstraktının üzerine 1.9 mL saf su, 2.5 mL Lowry C çözeltisi ve 1/3 oranında seyreltilmiş 0.25 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi eklenerek tüpler vorteks karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. 30 dk karanlıkta bekletilen tüplerin 750 nm'de UV-Vis spektrofotometresi yardımıyla absorbansları ölçülmüştür. Kalibrasyon grafiği için standart gallik asit çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen doğru denklemi kullanılarak beyaz hindiba örneklerindeki toplam fenolik madde içeriği mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g kuru bitki olarak hesaplanmıştır.

## 2.5. Antioksidan kapasite tayini

### 2.5. Antioxidant capacity assay

Antioksidan kapasite tayini ABTS yöntemi kullanılarak yapılmıştır (Aybastier vd., 2013). ABTS stok çözeltisi 7.0 mmol/L ABTS reaktifi ve 24.5 mmol/L K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> içerecek şekilde saf su ile hazırlanmıştır. Bir gün karanlıkta bekletildikten sonra saf su ile 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Her örnek için 200 µL örnek alınıp üzerine 3800 µL etanol ve 1 mL ABTS eklenerek 6 dk sonunda 734 nm de absorbansı UV-Vis spektrofotometresi yardımıyla okunmuştur. Ölçümler sonucunda örneklerin ve standartların % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Kalibrasyon grafiği için standart troloks çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen doğru denklemi kullanılarak beyaz hindiba örneklerindeki antioksidan kapasite mg troloks eşdeğeri (TE)/g kuru bitki olarak hesaplanmıştır.

## 3. Bulgular ve tartışma

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu

##### 3.1. Optimization of ultrasonic assisted extraction parameters

Ekstraksiyon parametreleri, merkezi kompozit dizayn yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Bu çalışmada 5 tekrar içeren 48 farklı deney gerçekleştirilmiştir. Tablo 2'de yapılan tüm deney koşulları ve mg GAE/g kuru bitki, mg TE/g kuru bitki değerleri verilmiştir.

**Tablo 2.** Merkezi kompozit dizayn tablosu ve yanıt değerleri  
**Table 2.** The table of central composite design and response values

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Metanol (%)	HCl (mol/L)	Sıvı/katı (mL/g)	mg GAE/g kuru bitki	mg TE/g kuru bitki
1	40.0	80	35.0	0.75	16.00	13.41	2.62
2	60.0	80	65.0	1.25	26.67	26.15	5.00
3	50.0	60	50.0	1.00	21.33	20.50	3.74
4	40.0	40	35.0	0.75	16.00	15.66	2.78
5	60.0	80	35.0	1.25	16.00	19.26	3.18
6	50.0	60	50.0	1.00	21.33	24.37	3.71
7	50.0	60	14.3	1.00	21.33	15.82	3.16
8	60.0	80	35.0	0.75	26.67	24.01	4.76
9	50.0	60	50.0	1.00	34.02	24.67	5.27
10	50.0	60	50.0	1.00	21.33	24.80	4.02
11	50.0	12	50.0	1.00	21.33	20.59	3.60
12	60.0	40	65.0	1.25	26.67	28.26	4.88
13	26.2	60	50.0	1.00	21.33	20.72	3.65
14	50.0	60	50.0	1.00	21.33	22.48	3.81
15	40.0	80	65.0	1.25	26.67	20.41	5.33
16	40.0	80	65.0	0.75	26.67	23.04	5.05
17	40.0	40	65.0	0.75	16.00	17.74	3.07
18	40.0	40	65.0	0.75	26.67	21.71	4.95
19	60.0	80	65.0	1.25	16.00	22.53	2.41
20	73.8	60	50.0	1.00	21.33	32.39	4.68
21	60.0	80	65.0	0.75	16.00	21.23	3.46
22	50.0	60	85.7	1.00	21.33	24.87	4.17
23	60.0	40	65.0	0.75	26.67	30.30	4.68
24	60.0	80	65.0	0.75	26.67	26.73	5.03
25	40.0	40	65.0	1.25	26.67	21.83	4.21
26	50.0	60	50.0	1.00	21.33	21.44	3.70
27	40.0	80	35.0	0.75	26.67	19.55	3.89
28	50.0	60	50.0	0.41	21.33	21.97	4.32
29	60.0	40	35.0	0.75	26.67	20.53	4.85
30	40.0	40	35.0	1.25	26.67	17.94	3.36
31	60.0	40	35.0	1.25	26.67	22.92	4.35
32	40.0	40	35.0	0.75	26.67	15.69	3.89
33	40.0	80	65.0	0.75	16.00	21.36	3.27
34	60.0	40	35.0	0.75	16.00	19.50	3.37
35	60.0	80	35.0	1.25	26.67	21.91	4.42
36	40.0	40	35.0	1.25	16.00	18.17	3.00
37	40.0	80	35.0	1.25	26.67	15.12	4.59
38	50.0	60	50.0	1.00	8.65	15.54	1.88
39	60.0	80	35.0	0.75	16.00	19.91	3.19
40	40.0	40	65.0	1.25	16.00	20.69	3.03
41	40.0	80	35.0	1.25	16.00	15.17	2.67
42	40.0	80	65.0	1.25	16.00	18.53	2.69
43	60.0	40	35.0	1.25	16.00	18.80	3.24

**Tablo 2.** Devamı  
**Table 2.** Continuing

	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)	Metanol (%)	HCl (mol/L)	Sıvı/katı (mL/g)	mg GAE/g kuru bitki	mg TE/g kuru bitki
44	50.0	60	50.0	1.00	21.33	25.40	4.07
45	60.0	40	65.0	0.75	16.00	20.61	3.36
46	50.0	60	50.0	1.59	21.33	24.54	3.51
47	50.0	108	50.0	1.00	21.33	18.97	3.98
48	60.0	40	65.0	1.25	16.00	24.39	3.26

En yüksek toplam fenolik madde içeriği (32.39 mg GAE/g kuru bitki) 73.8 °C, 60 dk, %50 metanol, 1 mol/L HCl, 21.33 sıvı/katı oranıyla 20. deney olmuştur. En düşük toplam fenolik madde içeriği (13.41 mg GAE/g kuru bitki) 40 °C, 80 dk, %35 metanol, 0.75 mol/L HCl, 16.00 sıvı/katı oranıyla 1. deney olmuştur. En yüksek antioksidan kapasite değeri (5.33 mg TE/g kuru bitki) 40 °C, 80 dk, %65 metanol, 0.75 mol/L HCl, 26.67 sıvı/katı oranıyla 15. deney olmuştur. En düşük antioksidan kapasite değeri (1.88 mg TE/g kuru bitki) 50 °C, 60 dk, %50 metanol, 1.0 mol/L HCl, 8.65 sıvı/katı oranıyla 38. deney olmuştur. Her faktörün etkileri ve etkileşimleri bir Design Expert programı 7.0.0 kullanılarak hesaplanmıştır. Verilerin çeşitli modellerle hesaplanması ve ardından varyans analizi (ANOVA) ile toplam fenolik madde içeriğinin ve antioksidan kapasitenin en uygun şekilde ikinci dereceden polinom modeliyle tanımlandığı belirlenmiştir. %95 güven düzeyinde F değerleri modelin anlamlı olduğunu göstermiştir.

### 3.2. Toplam fenolik madde içeriğinin yanıt yüzey analizi

#### 3.2. Response surface analysis of total phenolic content

Beyaz hindibanın kurutulmuş yapraklarında antioksidan bileşiklerin ultrasonik destekli ekstraksiyonunda HCl derişimi, metanol yüzdesi, sıcaklık, süre ve sıvı/katı oranı ekstraksiyon parametrelerinin etkileri araştırılmıştır. Her bir katsayının önemi, F değerleri ve *p* değerleri ile belirlenmiştir. Toplam fenolik içeriğinin yanıt yüzey analizi, toplam fenolik madde ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. F değeri ne kadar büyük ve *p* değeri ne kadar küçükse, karşılık gelen katsayı o kadar anlamlıdır. Bu çalışmada,  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ,  $x_5$ ,  $x_2x_4$ ,  $x_2^2$ ,  $x_3^2$  ve  $x_5^2$  önemli parametrelerdir.  $x_2$ ,  $x_4$ ,  $x_1x_2$ ,  $x_1x_3$ ,  $x_1x_4$ ,  $x_1x_5$ ,  $x_2x_3$ ,  $x_2x_5$ ,  $x_3x_4$ ,  $x_3x_5$ ,  $x_4x_5$ ,  $x_1^2$  ve  $x_4^2$  parametrelerinin *p* değerleri 0.05'ten büyük olduğu için toplam fenolik madde içeriği için ultrasonik destekli ekstraksiyon üzerinde daha az etkiye sahiptir. Önemli parametreler ile oluşturulan model denklemi Tablo 3'te verilmiştir. Ekstraksiyon parametreleri ile toplam fenolik madde arasındaki ilişki, yanıt yüzey grafikleri ile araştırılmıştır. Şekil 1'de HCl derişimi ile sürenin ve Şekil 2'de sıvı/katı oranı ile sıcaklığın toplam fenolik madde üzerindeki etkileşimini göstermektedir.

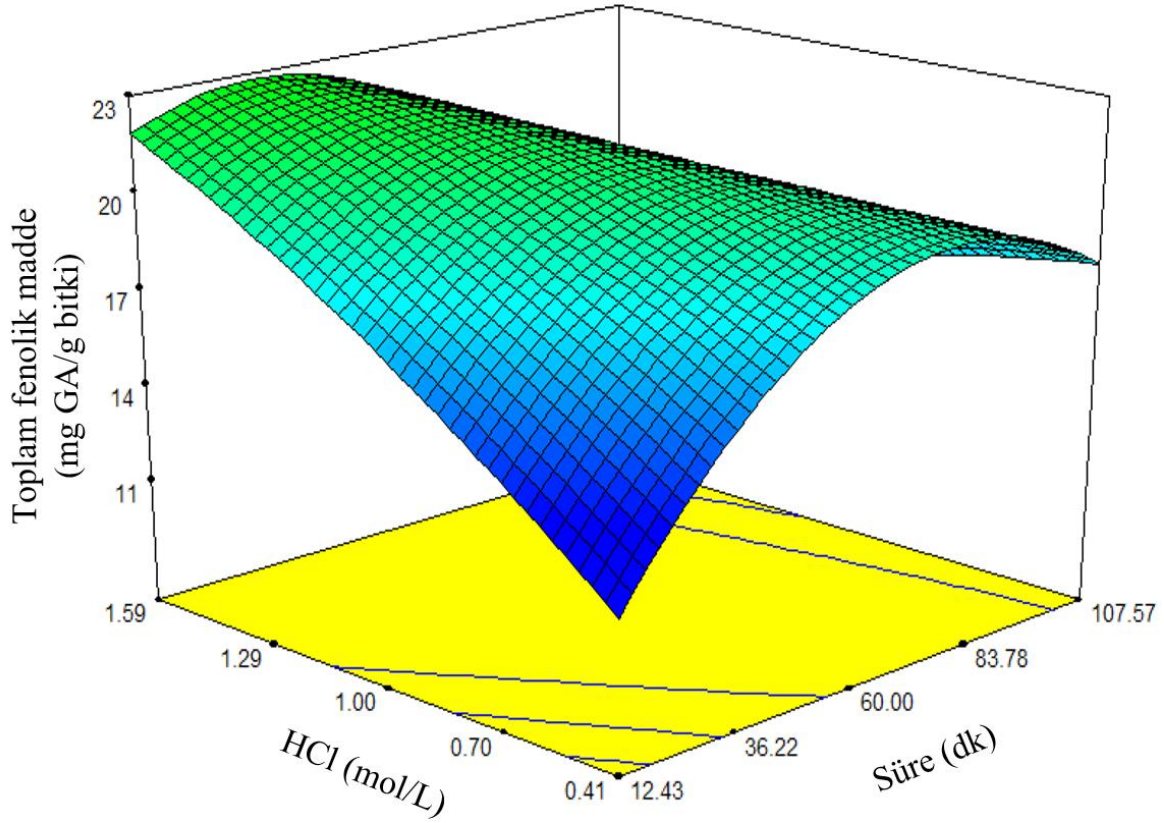
Şekil 1'de ekstraksiyon süresi kısa tutulduğunda ve HCl derişimi artırıldığında toplam fenolik madde içeriğinde artma, HCl'in düşük derişimde tutulduğu ve ekstraksiyon süresi kısa tutulduğu durumda toplam fenolik madde içeriğinde azalma gözlemlenmiştir. Şekil 2'de sıvı/katı oranının ve sıcaklığın artışı ile toplam fenolik madde içeriği artmıştır. En yüksek toplam fenolik madde içeriği, daha yüksek bir ekstraksiyon sıcaklığında gözlemlenmiştir. Yüksek sıcaklıklarda, birçok fenolik bileşiğin çözünürlüğü arttığından, fenolik bileşiklerin daha yüksek miktarda ekstrakte edilmesine neden olmuştur.

**Tablo 3.** Toplam fenolik içeriği için önemli parametrelerle oluşturulan model denklemi

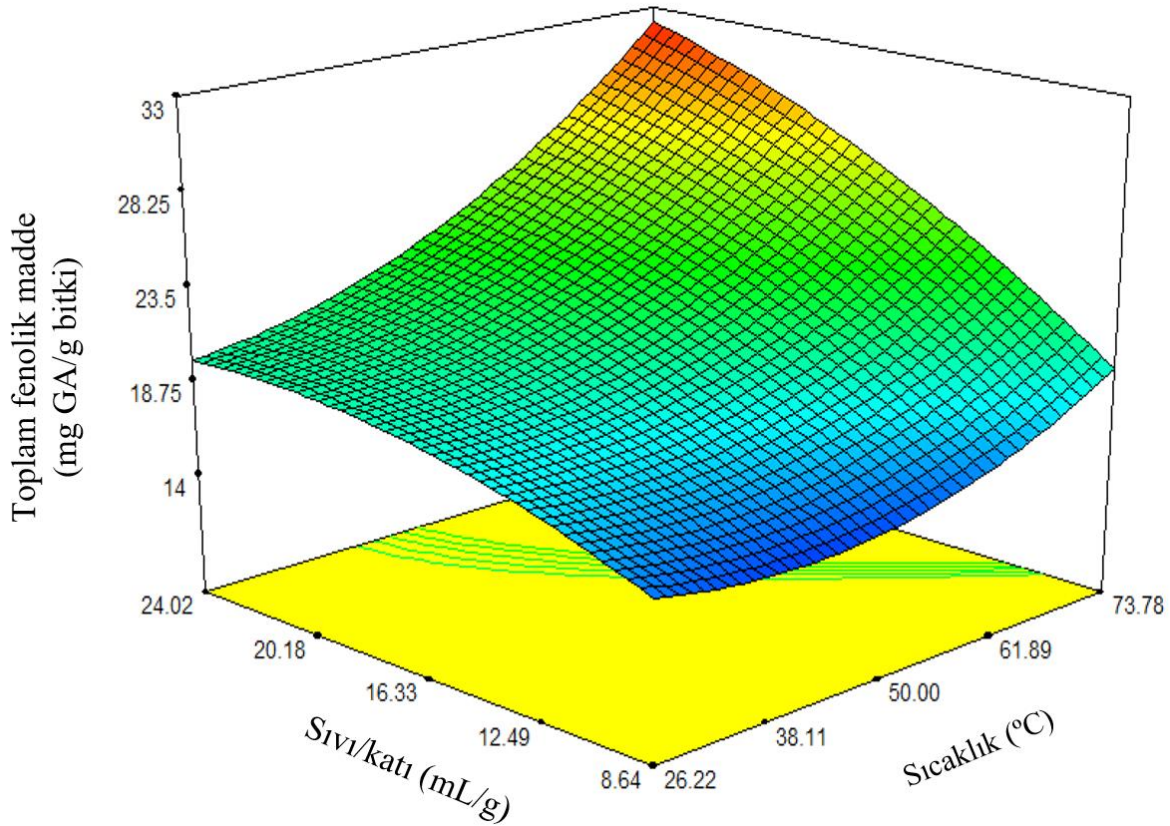
**Table 3.** Model equation with significant parameters for total phenolic content

Toplam fenolik madde	$y = 22.92 + 2.28x_1 - 0.24x_2 + 2.07x_3 + 1.64x_5 - 0.67x_2x_4 - 0.75x_2^2 - 0.65x_3^2 - 0.70x_5^2$
----------------------	--





**Şekil 1.** HCl derişimi ile sürenin toplam fenolik madde üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği  
**Figure 1.** Response surface plot of the effect of HCl concentration and time on total phenolic content



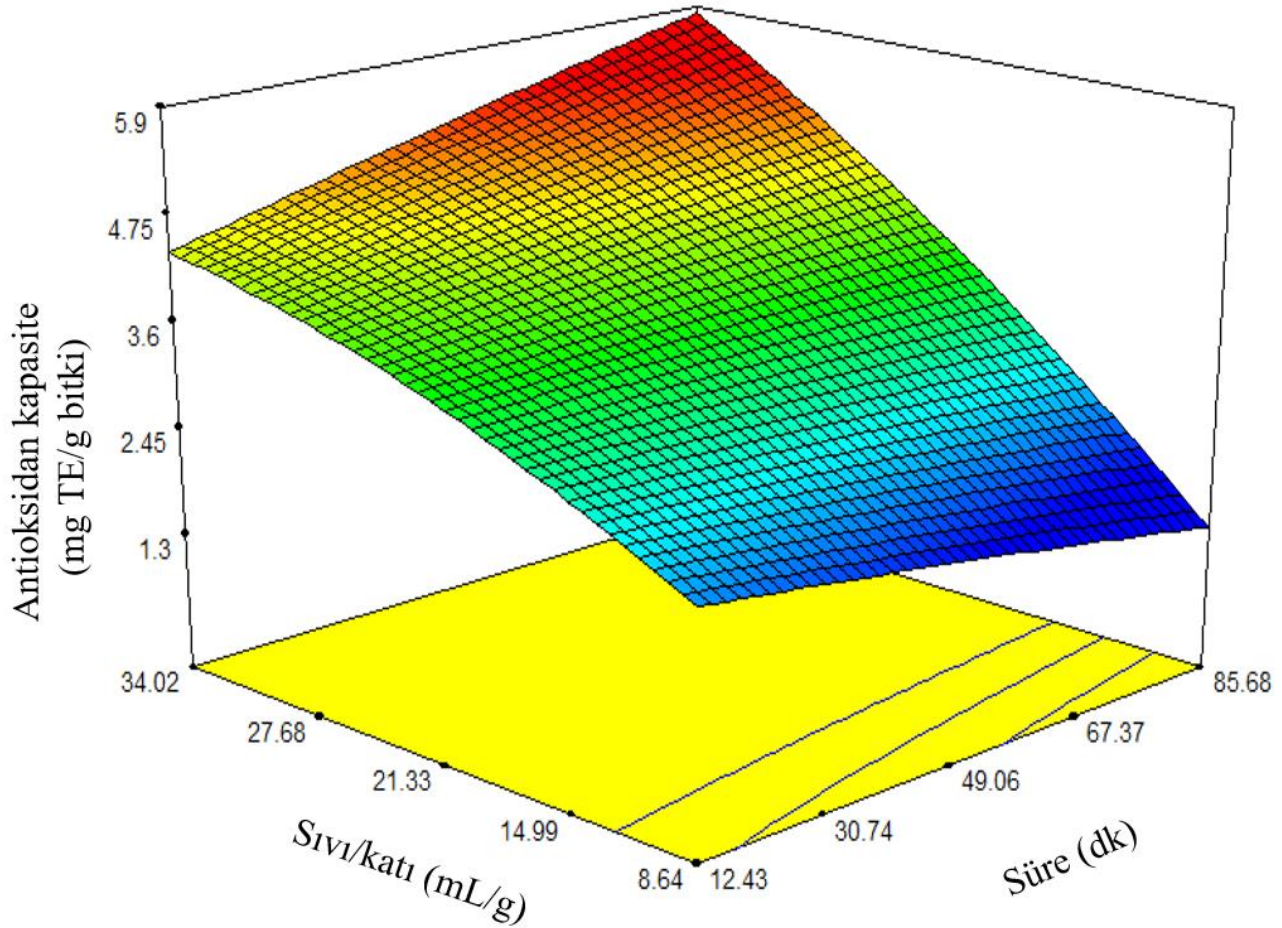
**Şekil 2.** Sıvı/katı oranı ile sıcaklığın toplam fenolik madde üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği  
**Figure 2.** Response surface plot of the effect of liquid/solid ratio and temperature on total phenolic content

### 3.3. Antioksidan kapasitenin yanıt yüzey analizi

#### 3.3. Response surface analysis of antioxidant capacity

Antioksidan kapasite ile HCl derişimi, metanol yüzdesi, sıcaklık, süre ve sıvı/katı oranı arasındaki ilişki incelenmiştir. Her bir katsayının önemi, F değerleri ve *p* değerleri ile belirlenmiştir. Yanıt yüzey analizi antioksidan kapasite ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. F değeri ne kadar büyük ve *p* değeri ne kadar küçükse, karşılık gelen katsayı o kadar anlamlıdır. Bu çalışmada,  $x_1$ ,  $x_3$ ,  $x_4$ ,  $x_5$ ,  $x_1x_3$ ,  $x_1x_5$ ,  $x_3x_5$  önemli parametrelerdir.  $x_2$ ,  $x_1x_2$ ,  $x_1x_4$ ,  $x_2x_3$ ,  $x_2x_4$ ,  $x_2x_5$ ,  $x_3x_4$  ise *p* değeri 0.05'ten büyük olduğu için antioksidan kapasite üzerinde daha az etkiye sahiptir. Önemli parametrelerin model denklemi Tablo 4'te verilmiştir. Ekstraksiyon parametreleri ile antioksidan kapasite arasındaki ilişki, yanıt yüzey grafikleri ile araştırılmıştır. Şekil 3'te sıvı/katı oranı ile sürenin ve Şekil 4'te sıvı/katı oranı ile metanol yüzdesinin antioksidan kapasite üzerindeki etkileşimini göstermektedir.

Şekil 3'e göre antioksidan kapasitenin, sıvı/katı oranı ve süre arttıkça arttığı gözlemlenmiştir. Şekil 4'te en yüksek antioksidan kapasite, daha yüksek bir sıvı/katı oranında ve yüksek metanol yüzdesinde gözlemlenmiştir. Metanol, antioksidan bileşiklerin çoğunu sudan daha iyi çözdüğünden, çalışmamızdaki ekstraksiyonlarda metanol derişiminin artmasıyla antioksidan kapasitede artış gözlemlenmiştir.



Şekil 3. Sıvı/katı oranı ile sürenin antioksidan kapasite üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği

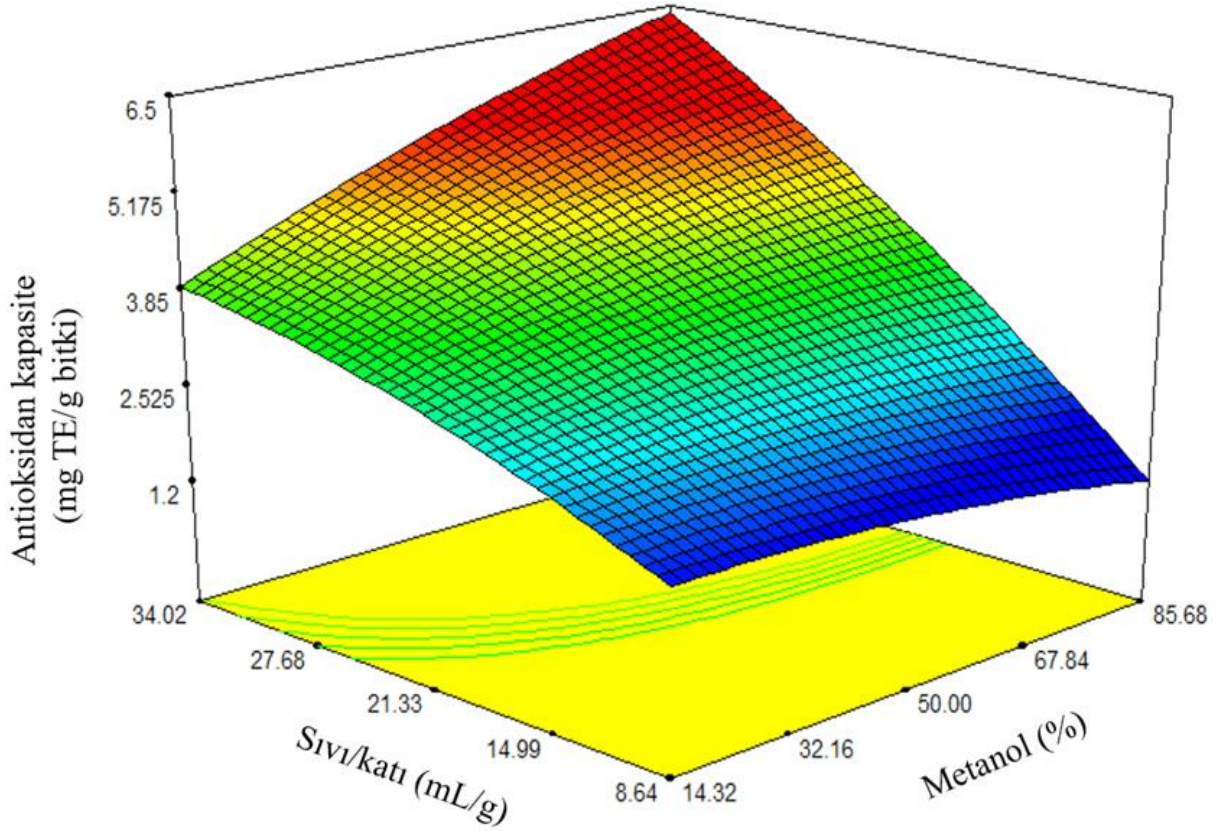
Figure 3. Response surface plot of the effect of liquid/solid ratio and time on antioxidant capacity

Tablo 4. Antioksidan kapasite için önemli parametrelerle oluşturulan model denklemi

Table 4. Model equation with significant parameters for antioxidant capacity

Antioksidan kapasite	$y = 3.84 + 0.17x_1 + 0.18x_3 - 0.10x_4 + 0.76x_5 - 0.13x_1x_3 + 0.011x_1x_5 + 0.14x_3x_5$
----------------------	--





**Şekil 4.** Sıvı/katı oranı ile metanol yüzdesinin antioksidan kapasite üzerine etkisinin yanıt yüzey grafiği  
**Figure 4.** Response surface plot of the effect of liquid/solid ratio and methanol percentage on antioxidant capacity

### 3.4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonunun doğrulanması

#### 3.4. Verification of the optimization of ultrasonic assisted extraction parameters

Beyaz hindiba yapraklarından en yüksek toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite için gerekli ultrasonik destekli ekstraksiyon koşulları Tablo 5'te verilmiştir. Her bir faktörün etkisi ve birbirleriyle etkileşimi Design Expert (7.0.0) programı kullanılarak hesaplanmıştır. Verilerin çeşitli modellerle birleştirilmesi ve ardından yapılan varyans analizi (ANOVA), toplam fenolik madde içeriğinin ve antioksidan kapasitenin en uygun şekilde ikinci dereceden polinom modeli ile tanımlandığını göstermiştir. İkinci dereceden polinom modeli, yanıtlar ile önemli parametreler arasındaki ilişkiyi (Folin–Ciocalteu ve ABTS için  $p < 0.0001$ ) temsil etmek için en uygun model olarak belirlenmiştir.

**Tablo 5.** Optimum koşullar, tahmini ve deneysel optimum değerler

**Table 5.** Optimum conditions, estimated and experimental optimum values

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Metanol (%)	HCl (mol/L)	Sıvı/katı (mL/g)	Optimum değerler	
						Tahmini	Deneysel
<b>Toplam fenolik madde</b> (mg GAE/g kuru bitki)	73	69	84	0.57	33.97	39.0	33.5±0.5
<b>Antioksidan kapasite</b> (mg TE/g kuru bitki)	73	69	85	0.47	33.99	7.2	7.2±0.1

Belirlenen optimum koşullarda yapılan ekstraksiyon sonucu beyaz hindibanın toplam fenolik madde miktarı  $33.5 \pm 0.5$  mg GAE/g kuru bitki ve antioksidan kapasitesi  $7.2 \pm 0.1$  mg TE/g kuru bitki olarak belirlenmiştir. Tablo 6'da daha önce çalışılmış ekstraksiyon uygulamaları gösterilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz toplam

fenolik madde değerleri literatürdeki bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur. Bunun sebeplerinden biri kullandığımız ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ve çözücü seçimidir. Ultrasonik ekstraksiyon geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek ekstraksiyon verimi sağlamaktadır. Bir diğer sebep ise literatürde yapılan çalışmaların hiçbirinde ekstraksiyon koşullarının kemometrik olarak optimize edilmemiş olmasıdır. Kemometrik yöntemle optimizasyon yapıldığında, incelenen tüm parametrelerin hem kendi etkileri hem ikinci dereceden etkileri hem de çapraz etkileşimleri göz önünde bulundurulmaktadır. Bu da ekstraksiyon koşulların en uygun şekilde belirlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca literatürde çalışılanlar ile bizim çalıştığımız bitkinin yetiştiği ortamdaki toprak, sıcaklık, su, ışık gibi çevresel faktörlerin de aynı olması mümkün değildir. Bu faktörlerin de bitkinin fenolik profili üzerine önemli etkileri vardır.

**Tablo 6.** Beyaz hindibanın ekstraksiyon uygulamaları  
**Table 6.** Extraction applications of white chicory

Ekstraksiyon tekniği	Kullanılan çözücü	Süre	Toplam fenolik madde	Kaynak
Geleneksel ekstraksiyon	Etanol ile 1.5 N HCl çözeltisinin 85:15 oranında hazırlanması	1 gece	33.15±0.15 mg GAE/g kuru bitki	Şahan vd., 2017
Ultrasonik ekstraksiyon	Formik asit ile metanolün 5:95 oranında hazırlanması	30 dakika	0.58 - 4.03 mg GAE/g kuru bitki	Sinkovič vd., 2015
Geleneksel ekstraksiyon	%95 Etanol	3 saat	4.3 - 7.9 mg GAE/g kuru bitki	Denev vd., 2014
Geleneksel ekstraksiyon	Etanol	40 dakika	22.6±1.0 - 22.4±0.3 mg GAE/g kuru bitki	Spina vd., 2008

#### 4. Sonuçlar

##### 4. Conclusions

Merkezi kompozit dizayn yanıt yüzey yöntemi kurutulmuş beyaz hindiba yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu optimize etmek için başarıyla kullanılmıştır. Fenolik bileşiklerin toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasitelerine göre en yüksek ekstraksiyon verimi için HCl (mol/L), metanol (%), süre (dk), sıcaklık (°C) ve sıvı/katı oranı (mL/g) için optimum koşullar belirlenmiştir. Optimizasyon sonucunda en yüksek toplam fenolik içerik için optimum koşullar; sıcaklık 73 °C, süre 69 dk, metanol yüzdesi %84, HCl derişimi 0.57 M ve sıvı/katı oranı 33.97 mL/g olarak belirlenmiştir. En yüksek antioksidan kapasite için optimum koşullar sıcaklık 73 °C, süre 69 dk, metanol yüzdesi %85, HCl derişimi 0.47 mol/L ve sıvı/katı oranı 33.99 mL/g olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar için hesaplanan tahmini değerlerin elde edilen deneysel değerlere yakın olması modelin doğruluğunu göstermiştir. Sonuç olarak bu çalışma ile beyaz hindiba yapraklarının iyi bir antioksidan kaynağı olarak kabul edilebileceği belirlenmiştir. Beyaz hindiba bitkisinin, tüketicilere fenolik ve antioksidan içeriklerinden dolayı önemli sağlık faydaları sağlayacak potansiyele sahip olduğu ortaya koyulmuştur.

#### Yazar katkısı

##### Author contribution

AA: Literatür taraması, deneysel işlemler ve makale yazımı, ÖA: Çalışmanın planlanması, hesaplamalar, makalenin organizasyonu, makalenin kontrolü.

**Etik beyanı***Declaration of ethical code*

Bu makalenin yazarları, bu çalışmada kullanılan materyal ve yöntemlerin etik kurul izni ve yasal-özel izin gerektirmediğini beyan etmektedir.

**Çıkar çatışması beyanı***Conflicts of interest*

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

**Kaynaklar***References*

- Ahmed, B., Al Howirin, A.T. & Siddiqui, AB. (2003). Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 237-240. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00145-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00145-4)
- Al-Snafi, A.E. (2016). Medical importance of *Cichorium intybus* – A review. *Journal of Pharmacy*, 6(3), 41-56.
- Ait-Amir, B., Pougnet, P., & Hami, A.E. (2015). Meta-model development. *Embedded Mechatronic Systems*, 2, 157-187.
- Atoui, A.K., Mansouri, A., Boskou, G. & Kefalas, P. (2005). Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry*, 89, (1), 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.075>
- Aybastier, Ö., Şahin, S. & Demir, C. (2013). Response surface optimized ultrasonic-assisted extraction of quercetin and isolation of phenolic compounds from *hypericum perforatum* l. by column chromatography. *Separation Science and Technology*, 48, (11), 1665-1674. <https://doi.org/10.1080/01496395.2012.760603>
- Bahmani, M., Rafieian-kopaei, M. & Saki, K. (2015). Chicory: A review on ethnobotanical effects of *Cichorium intybus* L. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 8(4), 672-682.
- Bais, H.P. & Ravishankar, G.A. (2001). *Cichorium intybus* L- Cultivation, processing, utility, value addition and biotechnology, with an emphasis on current status and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, (5), 467-484. <https://doi.org/10.1002/jsfa.817>
- Bezzera, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, P., Villar, L.S. & Escalera L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
- Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72, (7), 429-452. <https://doi.org/10.1111/nure.12114>
- Büyüktuncel, E. (2012). Gelişmiş ekstraksiyon teknikleri I. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 2, 209-242.
- Cadalen, T., Mörchen, M. & Blassiau, C. (2010). Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Mol Breeding*, 25, 699–722. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9369-5>
- Chemat, F., Abert Vian, M., Ravi, H.K., Khadhraoui, B., Hilali, S., Perino, S. & Fabiano Tixier, A.S. (2019). Review of alternative solvents for green extraction of food and natural products: Panorama, principles, applications, and prospects. *Molecules*, 24(16), 3007. <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>
- Chen, C., Wang, L., Wang, R., Luo, X., Li, Y., Li, J., Li, Y. & Chen, Z. (2018). Ultrasound-assisted extraction from defatted oat (*Avena sativa* L.) bran to simultaneously enhance phenolic compounds and  $\beta$ -glucan contents: compositional and kinetic studies. *Journal of Food Engineering*, 222, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.002>
- Dalar, A. & Konczak, I. (2014). *Cichorium intybus* from Eastern Anatolia: Phenolic composition antioxidant and enzyme inhibitory activities. *Industrial Crops and Products*, 60, 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.043>

- Denev, P., Petkova, N., Ivanov, I., Sirakov, B., Vrancheva, R., & Pavlov, A. (2014). Determination of biologically active substances in taproot of common chicory (*Cichorium intybus* L.). *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*, 18, 124-129.
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., Brandao, G.C, David, J.M., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S. & dos Santos, W.N.L. (2007). Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597, (2), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
- Ferreira, S.L.C., Lemos, V.A., de Carvalho, V.S., da Silva, E.G.P., Queiroz, A.F.S., Felix, C.S.A., da Silva, D.L.F., Dourado, G.B. & Oliveira, R.V. (2018). Multivariate optimization techniques in analytical chemistry—an overview. *Microchemical Journal*, 140, 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.002>
- Gundogdu, M., Tunçtürk, M., Berk, S., Şekeroğlu, N. & Gezici, S. (2018). Antioxidant capacity and bioactive contents of mulberry species from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(4), 96-101. <https://doi.org/10.5530/ijper.52.4s.82>
- Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays, Reviews. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 53, 1841-1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Maran, J.P. & Priya, B. (2015). Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 115, 732-738. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.07.058>
- Kaya, İ., İncekara, N. & Nemli Y. (2004). Ege Bölgesi'nde sebze olarak tüketilen yabancı kuşkonmaz, sirken, yabancı hindiba, rezene, gelincik, çoban değneği ve ebegümecinin bazı kimyasal analizleri. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(1), 1-6.
- Khaghani, S., Shakouri, M. J., Mafakheri, S. & Aslanpour, M., (2012). Effect of different chemical fertilizers on chicory (*Cichorium intybus* L.). *Indian Journal of Science and Technology*, 5(1), 1-3. <https://dx.doi.org/10.17485/ijst/2012/v5i1.15>
- Koner, A., Ghosh, S. & Roy, P. (2011). Isolation of antimicrobial compounds from chicory (*Cichorium intybus* L.) root. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology*, 1(2), 13-18.
- Mathew, S. & Abraham, T.E. (2006). Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. *Food Chemistry*, 94, 520-528. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.043>
- Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, T.N. & McNabb, W.C. (2003). Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International*, 52(3), 209-218. [https://doi.org/10.1016/s1383-5769\(03\)00011-4](https://doi.org/10.1016/s1383-5769(03)00011-4)
- Mulabagal, V., Wang, H., Ngouajio, M. & Nair, M.G. (2009). Characterization and quantification of health beneficial anthocyanins in leaf chicory (*Cichorium intybus*) varieties. *European Food Research and Technology*, 230, 47-53. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1144-7>
- Muthusamy, V.S., Anand, S., Sangeetha, K.N., Sujatha, S., Arun, B. & Lakshmi, B.S., (2008). Tannins present in *Cichorium intybus* enhance glucose uptake and inhibit adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes through PTP1B inhibition. *Chemistry Biol Interact*, 174, (1), 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.04.016>
- Nandagopal, S. & Ranjitha Kumari, B.D. (2007). Phytochemical and antibacterial studies of chicory (*Cichorium intybus* L.)- a multipurpose medicinal plant. *Advances in Biological Research*, 1, (1-2), 17-21.
- Pan, Z., Qu W., Ma H., Atungulu G.G. & McHugh T.H. (2011). Continuous and pulsed ultrasound assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365-372. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.01.005>
- Pattanaik, A. & Rayasam, V. (2018). Analysis of reverse cationic iron ore fines flotation Using RSM-D-optimal design – an approach towards sustainability. *Advanced Powder Technology*, 29(12), 3404-3414. <https://doi.org/10.1016/j.appt.2018.09.021>
- Rahimullah T.G., Shah S.T., Rehman M., & Hayat A., (2019). Phytochemical and antibacterial screening of *Cichorium intybus* seeds use in traditional medicine systems in Pakistan. *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy*, 8, (2), 46–49. <https://doi.org/10.3390/2Fmolecules25184160>



- Sahan, Y., Gurbuz, O., Guldaz, M., Degirmencioglu, N., & Begenirbas, A. (2017). Phenolics, antioxidant capacity and bioaccessibility of chicory varieties (*Cichorium* spp.) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 217, 483-489. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.108>
- Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Goto, K. & Ikeshiro, Y. (1991). Traditional medicine in Turkey I. *Folk medicine in Northeast Anatolia Journal of Ethnopharmacology*, 35(2), 191-196. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90072-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90072-1)
- Sinkovič, L., Demšar, L., Žnidarčič, D., Vidrih, R., Hribar, J., & Treutter, D. (2015). Phenolic profiles in leaves of chicory cultivars (*Cichorium intybus* L.) as influenced by organic and mineral fertilizers. *Food Chemistry*, 166, 507-513. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.024>
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hras, A.R., Simonic, M. & Knez, Z. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones, and flavonol in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, (1), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.025>
- Street, R.A., Sidana, J. & Prinsloo, G. (2013). *Cichorium intybus*: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 579319. <https://doi.org/10.1155/2013/579319>
- Youcai, Z. & Tao, Z. (2020). Pretreatment and aged refuse dosage on biohydrogen production from food waste. *Biohydrogen Production and Hybrid Process Development Energy and Resource Recovery from Food Waste*, 182, 149-238. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-821728-3.00003-7>
- Zhang, Q., Zhou, M.M., Chen, P. L., Cao, Y.Y. & Tan, X.L. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis for the extraction of luteolin and apigenin from celery. *Journal of Food Science*, 76(5), 680-685. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02174.x>