

FARKLI EKSTRAKSİYON YÖNTEMLERİNİN HİBİSKUS EKSTRAKTLARININ KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Cüneyt Dinçer^{1,2}, *Timur Tongur³, Taner Erkaymaz⁴

¹ Akdeniz Üniversitesi Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, Türkiye

² Akdeniz Üniversitesi Finike Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, Antalya, Türkiye

³ Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Antalya, Türkiye

⁴ Süleyman Demirel Üniversitesi Doğal Ürünler Uygulama ve Araştırma Merkezi, Isparta, Türkiye

Geliş / Received: 02.12.2019; Kabul / Accepted: 28.03.2020; Online baskı / Published online: 08.04.2020

Dinçer, C., Tongur, T., Erkaymaz, T. (2020). Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin hibiskus ekstraktlarının kalite özellikleri üzerine etkisinin araştırılması. *GIDA* (2020) 45(3)409-420 doi: 10.15237/gida.GD19155

Dinçer, C., Tongur, T., Erkaymaz, T. (2020). Investigation of the effect of different extraction methods on the quality properties of hibiscus extracts. *GIDA* (2020) 45(3)409-420 doi: 10.15237/gida.GD19155

ÖZ

Bu çalışmada farklı ekstraksiyon yöntemlerinin hibiskus ekstraktlarının kalite özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla termal ekstraksiyon (40 ve 75 °C) ve termosonikasyon (0.031 W/mL, 40 ve 75 °C) uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sürecinde 1., 5., 15. 30., 60. ve 120. dk'larda alınan örneklerde, sıcaklık ve süreye bağlı olarak °Brix ve antosiyanin içeriğinde artış belirlenirken, pH önemli bir değişim seyri göstermemiştir. Ardından örnekler 1.1 °Briks'e kadar ekstrakte edilmiştir. Bu örneklerde antosiyanin içeriği 149.7-156.2 mg/L arasında tespit edilirken, delphinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit ise sırasıyla 112.1-120.5 ve 52.35-55.26 mg/L arasında belirlenmiştir. Sakaroz, en yüksek miktardaki şeker olarak belirlenirken, malik asit ise 811.2-932.4 mg/L arasında tespit edilmiştir. Ekstraksiyonların kalite özellikleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde bulanıklık değerleri hariç, uygulamalar arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Hibiscus sabdariffa* L, ekstraksiyon, termosonikasyon, antosiyanin.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF DIFFERENT EXTRACTION METHODS ON THE QUALITY PROPERTIES OF HIBISCUS EXTRACTS

ABSTRACT

In this study, the effect of different extraction methods on the quality properties of hibiscus extracts was investigated. Therefore, thermal extraction (40 and 75 °C) and thermosonication (0.031 W/mL, 40 and 75 °C) applications were performed. In the samples taken at 1st, 5th, 15th, 30th, 60th and 120th minutes during the extraction, an increase in °Brix and anthocyanin content was determined depending on the temperature and time, while pH did not show a significant difference. The samples were then extracted up to 1.1 °Brix. In these samples, anthocyanin content was determined between 149.7-156.2 mg/L, while delphinidin-3-sambubioside and cyanidin-3-sambubioside were determined between 112.1-120.5 and 52.35-55.26 mg/L, respectively. Sucrose was determined as the highest amount of sugar while malic acid was found between 811.2-932.4 mg/L. When the effects of extractions on the quality characteristics were evaluated, it was determined that there was no statistically significant difference between the applications except turbidity values.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L, extraction, thermosonication, anthocyanin.

* Yazışmalardan sorumlu yazar /Corresponding author

✉ cdincer@akdeniz.edu.tr

☎ (+90) 242 227 2057/2598

☎ (+90) 242 310 6506

Cüneyt Dinçer; ORCID no: 0000-0002-9160-4242

Timur Tongur; ORCID no: 0000-0003-3030-8930

Taner Erkaymaz; ORCID no: 0000-0002-1939-3153

GİRİŞ

Hibiscus sabdariffa L. bitkisi tropikal ve subtropikal iklimlerde yetiştirilebilen, Malvaceae familyasından, çalimsı bir bitkidir (Gedik, 2014). Almanya’da Hibiscus ve Sabdariff-Eibisch, Fransa’da Karkade ve P’Oiselle, İngiltere’de Red sorel ve Roselle, İspanya’da Jamaica, Arabistan’da Karkade, Tayland’da Krachiap daeng gibi isimler ile bilinen bitki ülkemizde bamya çiçeği, kara bamya, Sudan bamyası, hibiskus veya kerkede gibi isimlerle anılmaktadır (Özdoğan, 2001; Gedik, 2014). Bitkinin ticari olarak önemli olan kısmı etli çanak yapraklarıdır (Gedik, 2014). Hibiskus çanak yaprakları önemli miktarda karbonhidrat, protein, ham lif ve organik asit içermesi yanında ticari olarak önemi özellikle antosiyanin içeriğinden kaynaklanmaktadır. Delfinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit hibiskus çanak yapraklarında bildirilen başlıca antosiyaninlerdir (Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015).

Halk arasında farklı hastalıkların tedavisinde uzun yıllardır kullanılan hibiskus ekstraktlarının, son dönemde yapılan çalışmalarda içerdiği biyoaktif maddelere bağlı olarak antioksidan, antibakteriyel, diüretik, ateş düşürücü, tansiyon düşürücü, antikolesterol ve antidiabetik özellikler gösterdiği bildirilmektedir (Da-Costa-Rocha vd., 2014; Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015). Hibiskus çanak yaprakları (kaliksleri) gıda endüstrisinde bitki çayı, sıcak ve soğuk içecekler, reçel, şekerlemeler, dondurma, çikolata, tatlandırıcılar, puding ve pasta gibi ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Da-Costa-Rocha vd., 2014; Cid-Ortega ve Guerrero-Beltrán, 2015).

Hibiskus gibi bitkisel kaynakların gıda endüstrisinde istenen amaca uygun olarak değerlendirilebilmesi için ekstraksiyon, konsantrasyon vb. işlemlere tabi tutulması gerekebilmektedir. Ekstraksiyon, katı ya da sıvı fazda bulunan bir veya birden fazla bileşiğin farklı çözünürlük özelliklerinden yararlanılarak diğer bir sıvı faza alınması olarak tanımlanabilmektedir (Nakilcioğlu ve Ötleş, 2014). Gıda sanayiinde klasik termal ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı oldukça yaygındır. Ancak bu yöntemlerde, çözgen tüketiminin yüksek olmasının yanı sıra, ekstraksiyon süre ve

sıcaklığına bağlı olarak ısıya hassas bileşenlerce zengin ürünlerde arzu edilmeyen olumsuzlukların meydana gelmesi yeni ekstraksiyon yöntemleri ile ilgili çalışmaları hızlandırmıştır. Bu kapsamda termal yöntemle kıyasla daha düşük sıcaklıklarda ve kısa sürede ekstraksiyona imkan tanıyan ultrases ekstraksiyonu gibi yöntemler ön plana çıkmaktadır (Ergün vd., 2013).

Ultrases, katı, sıvı ve gazlardan geçebilen, insanların duyma sınırı (16-20 kHz) üzerindeki yüksek frekanslı ses dalgaları olarak tanımlanmaktadır (Condón vd., 2005; Dinçer ve Topuz, 2018). Ultrases sıvı içerisinde uygulandığında sonikasyon olarak adlandırılmaktadır (Tiware ve Mason, 2011) ve sonikasyonun temel etki mekanizması kaviteasyon ile açıklanmaktadır. Ses dalgası sıvının içerisinden geçerken boyuna dalgalar oluşturur ve ardışık olarak kasılıp gevşeme olayları gerçekleşir ve mikro kabarcıklar ve boşluklar oluşur. Sıvı içindeki küçük kabarcıklar ultrases dalgalarının gevşeme-sıkışma hareketleri ile hızlı bir şekilde gelişir ve kritik bir değere ulaştığında patlamaktadır ki buna kaviteasyon denir (Piyasena vd., 2003; Tiware ve Mason, 2011). Sonikasyon tek başına uygulanabildiği gibi etkinliği arttırmak için, ısı işlem ile birlikte de kullanılabilir ki bu uygulama termosonikasyon olarak adlandırılmaktadır (Karagöz ve Demirdöven, 2016)

Ultrasonik uygulama, ekstraksiyon işleminde hücre duvarlarını mekanik olarak parçalamakta ve materyal aktarımını sağlamaktadır. Hücre duvarının yıkılmasıyla hücre içindeki bileşenler, hücre dışına kolayca çıkabilmekte bu nedenle ultrases uygulamasıyla yapılan ekstraksiyon işlemi diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Ultrasonik uygulama ile partikül çapının azalmasına bağlı olarak, katı ve sıvı kısımlar arasındaki yüzey alanı artar. Ultrasesin mekanik aktivitesi, solventin dokulara doğru olan dağılımını hızlandırır. Mekanik olarak hücre duvarı yıkıldığından hücre içi bileşen, çözücü solvente kolayca geçmektedir (Camelo-Méndez vd., 2013, Ergün vd., 2013).

Farklı yöntemler ile gerçekleştirilen ekstraksiyon çalışmalarında genellikle sistemler ayrı ayrı optimize edilmekte ve optimum şartlardaki uygulamalar mukayese edilmektedir. Bir diğer uygulama ise önceki çalışmalarda ekstraksiyon şartlarının kullanılarak doğrudan sonuçların karşılaştırılması şeklindedir. Söz konusu çalışmalarda örnekler farklı seviyelerde uygulamaya maruz bırakılmakta, farklı seviyelerde suda çözünür kuru madde değerlerine ulaşmakta ve bu sonuçlar mukayese edilmektedir. Ancak ekstraksiyon işlemi yüksek verimin yanı sıra yararlı bileşenlerin zarar görmeden eldesi de önemli bir faktördür. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada hibiskus örneklerinin önce farklı yöntemler ile aynı sürelerde gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucunda pH, suda çözünür kuru madde ve antosiyanin içeriklerinin değerlendirilmesi ve ardından yaklaşık aynı suda çözünür kuru madde içeriğine kadar ekstrakte edilmesiyle bu şartlardaki kalite özelliklerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada materyal olarak *Hibiscus sabdariffa* L. bitkisinin kurutulmuş çanak yaprakları (kaliksleri) kullanılmıştır. Antalya'da faaliyet gösteren bir aktardan temin edilen örnekler blendırda (Beko BKK-2155 Maxi El Blandırı, Türkiye) öğütüldükten sonra eleklerden (Retsch, Almanya) elenerek partikül büyüklüğünün 0.5-1 mm arasında olması sağlanmıştır.

Yöntem

Geleneksel termal ekstraksiyon

Öğütülmüş numuneden alınan 2 g örnek 100 mL'lik cam şişelere aktarılmış ardından, katı sıvı oranı 1/40 olacak şekilde üzerine ekstraksiyon sıcaklığındaki (40 °C veya 75 °C) distile su ilave edilmiştir (Ramirez-Rodrigues vd., 2011). Ekstraksiyon çalkalamalı su banyosunda (Mommert WNE 29, SV 2945 Almanya), su banyosundaki su seviyesi şişe içerisindeki seviyenin üzerinde olacak şekilde, 150 d/dk çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon süresince düzenli zaman aralıkları ile (1, 5, 15, 30, 60 ve 120. dk) örnekleme yapılmış, çözeltilerde pH, antosiyanin ve suda çözünür kuru

madde içeriği belirlenmiştir. Ardından aynı uygulamalarla bu sefer 1.1 °Briks seviyesine kadar ekstrakte edilen örneklerde belirlenen analizler gerçekleştirilmiştir.

Termosonikasyon uygulaması

Termosonikasyon uygulaması ultrasonik banyoda (Çalışkan Ultrasonic cleaner, Türkiye) 40 °C ve 75 °C olmak üzere iki farklı sıcaklıkta, 40 kHz sabit frekansta ve 0.031 W/mL Akustik Güç Yoğunluğunda (AGY) uygulanmıştır (AGY, Tiwari vd. (2008)'nin rapor ettiği metoda göre kalorimetrik olarak belirlenmiştir). Geleneksel termal ekstraksiyonda olduğu gibi, öğütülmüş numuneden alınan 2 g örnek 100 mL'lik cam şişelere aktarılmış ardından, katı sıvı oranı 1/40 olacak şekilde üzerine ekstraksiyon sıcaklığındaki (40 °C veya 75 °C) distile su ilave edilmiştir.

Ekstraksiyon süresince düzenli zaman aralıkları ile (1, 5, 15, 30, 60 ve 120. dk), çözeltilerde pH, antosiyanin ve suda çözünür kuru madde içeriği belirlenmiştir. Ardından aynı uygulamalarla bu sefer 1.1 °Briks seviyesine kadar ekstrakte edilen örneklerde belirlenen analizler gerçekleştirilmiştir.

Suda çözünür kuru madde tayini (SÇKM)

Örneklerin suda çözünebilir kuru madde miktarı refraktometre (PAL- α ATAGO, Tokyo, Japonya) ile oda sıcaklığında ölçülmüştür.

pH Ölçümü

Örneklerin pH değerleri oda sıcaklığında dijital pH metre (Orion 4-Star pH meter, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçülmüştür (Ramirez-Rodrigues vd., 2011).

Titrasyon asitliği

Titrasyon asitliği örneklerin 0.1 N NaOH çözeltisi ile pH 8.1 noktasına kadar titrasyonu ile potansiyometrik olarak belirlenmiştir ve sonuçlar g malik asit/100 mL ekstrakt cinsinden sunulmuştur (AOAC, 2002).

Renk analizi

Örneklerin renk analizi Konica-Minolta CR-400 (Japonya) renk ölçer cihazı ve sıvı kabı kullanılarak yapılmıştır. Renk, L (koyuluk-açıklık), a (yeşillik-

kırmızılık), b (mavilik-sarılık) renk parametreleri cinsinden ifade edilmiştir.

Bulanıklık

Örneklerdeki bulanıklık değeri ölçümü için örnek 95 mm yüksekliği ve 25 mm çapa sahip örnek kabına yerleştirilmiş ve türbidimetre (Hach 2100 N Turbidimeter, A.B.D.) kullanılarak NTU (Nephelometric Turbidity Unit) değeri cinsinden belirlenmiştir (Tajchakavit vd., 2001).

Toplam monomerik antosiyanin tayini

Örneklerde toplam monomerik antosiyanin tayini pH diferansiyel metodu ile spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve sonuçlar siyanidin-3-glukozit cinsinden mg/L olarak sunulmuştur (Wang ve Xu, 2007).

Antioksidan aktivite tayini

DPPH radikalinin inhibisyonuna dayalı antioksidan aktivite Fernández-León vd., (2013) tarafından uygulanan yöntemle göre belirlenmiştir. Bu amaçla uygun oranda seyreltilmiş örnek ekstraktından 50 µL ve üzerine taze hazırlanmış 950 µL 6.10⁻⁵ M DPPH çözeltisi ilave edilmiştir. Karışım oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra 516 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen değer ile DPPH çözeltisinin bekleme süresinin başında saf metanole karşı 516 nm dalga boyunda yapılan okumasına göre farkları alınmıştır. Örneklerin antioksidan aktivitesi bu absorbans farkları kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış troluks ile elde edilen eğri yardımıyla mg troluks eşdeğer aktivite / 100 mL ekstrakt cinsinden hesaplanmıştır.

Antosiyanin Kompozisyonunun Belirlenmesi

Ekstraktların antosiyanin kompozisyonu Li vd. (2010) tarafından uygulanan metod modifiye edilerek Thermo Fisher UHPLC-DAD cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Antosiyaninlerin kromatografik ayrımı GL Sciences Inertsil ODS-4 (4.6 mm ID x 250 mm, 5 µm partikül boyutlu) HPLC kolonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz A suda %2 (v/v) formik asit ile %5 (v/v) asetonitrilden, mobil faz B ise su-asetonitril (40:58) karışımındaki %2 (v/v) formik asitten oluşmaktadır. Gradyen elüsyon %15 B fazı ile başlamış ve artarak 30. dakikada %25 olmuştur.

Ardından B fazı 40. dakikaya kadar artarak %100'e ulaşmıştır. 45. dakikaya kadar da B fazı başlangıç oranı olan %15'e geri dönmüştür. Akış hızı 1 mL/dk, enjeksiyon hacmi de 20 µL olarak belirlenmiştir. HPLC kolonun ve oto örnekleyicinin sıcaklığı sırasıyla 25 °C ve 10 °C olarak ayarlanmıştır. Antosiyaninlerin kalitatif ve kantitatif tayini maksimum absorbans verdiği 520 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Şeker ve organik asit bileşimi

Şekerlerin ve organik asitlerin tayini Coelho vd. (2018)'nin kullandığı yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Analizler Refraktif İndeks Dedektörlü (RID) Shimadzu LC-20 AD model HPLC cihazı kullanılarak yürütülmüştür. Şeker ve organik asitlerin kromatografik ayrımı Transgenomics ICE ORH-801 jel kolonda (6.5 mm ID x 300 mm) gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak 0.01 N H₂SO₄ çözeltisi kullanılmıştır. İzokritik akış hızı 0.6 mL/dk'dır ve her bir enjeksiyon 25 dakika sürmüştür. Enjeksiyon hacmi 50 µL, HPLC kolonun, otoörnekleyicinin ve RID hücresinin sıcaklığı sırasıyla 65 °C, 10 °C ve 55 °C olarak ayarlanmıştır. Sakkaroz, glikoz, fruktoz ve tartarik asit, sitrik asit, okzalik asit, malik asit, garcinia asidin kalitatif ve kantitatif tayini RID dedektörde pozitif polarizasyonda yapılmıştır.

İstatiksel analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş analizler paralelli olarak yürütülmüştür. Ortalamalar varyans analizine tabi tutularak, önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya konulmuştur.

SONUÇ VE TARTIŞMA

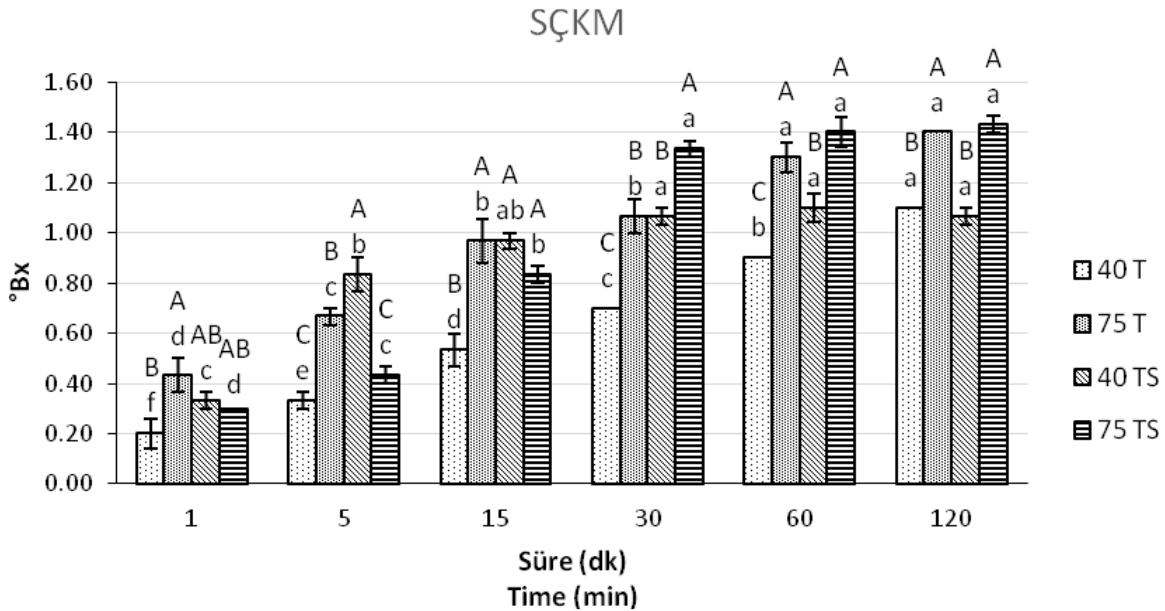
Geleneksel termal ekstraksiyon ve termosonikasyonda, ekstraksiyon süresince düzenli zaman aralıkları ile (1, 5, 15, 30, 60 ve 120. dk) alınan örneklerde belirlenen suda çözünür kuru madde, antosiyanin içeriği ve pH sonuçları Şekil 1-3'de sunulmuştur.

Su banyosunda (150 d/dk) 40 °C'de ekstrakte edilen örnekler incelendiğinde süredeki artışa bağlı olarak °Bx değerlerinin istatistiki açıdan artış

gösterdiği ve 120 dk sonunda yaklaşık 1.1 °Bx'lik değere ulaşıldığı belirlenmiştir. Su banyosunda 75 °C'de ekstrakte edilen örneklerin zamana bağlı °Bx değerleri incelendiğinde ise genel olarak süredeki artışa bağlı olarak istatistiki olarak 15. dk'ya kadar bir artış gösterdiği, 15 ile 30. dk'larda yapılan ölçümlerde istatistiki açıdan bir fark görülmediği belirlenmiştir. Bu ekstraksiyon yönteminde en yüksek briks değerine (1.4 °Bx) 120. dk'da ulaşıldığı ancak 60 ve 120. dk'lar arasında istatistiki açıdan bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Ultrasonik banyoda 40 °C'de gerçekleştirilen çalışmada 15. dk'dan sonra örneklerin °Bx değerlerinde istatistiki açıdan bir farklılık belirlenmezken, ultrasonik banyoda 75 °C'de gerçekleştirilen çalışmada ise 30 dk'dan sonra örneklerin briks değerlerinde istatistiki açıdan bir farklılık görülmemiştir. Bununla birlikte en yüksek briks değerine (1.43 °Bx) ultrasonik banyoda 75 °C'de 120 dk ekstrakte edilen örneklerde ulaşılmıştır. Genel bir değerlendirme

yapıldığında 40 °C'de gerçekleştirilen uygulamalardan ultrasonik banyoda gerçekleştirilen ekstraksiyonun 60. dk'ya kadar istatistiki açıdan daha etkili olduğu görülürken 120. dk'da iki ekstraksiyon işlemi arasında °Bx değerleri bakımından istatistiki açıdan fark olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca 60. dk'dan sonra 75 °C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinin 40 °C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinden °Bx değerleri açısından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olduğu görülmektedir.

Şekil 2. incelendiğinde en yüksek antosiyanin içeriğine (216.7 mg/L) termosonikasyon ile 75 °C'de 60. dk'da ulaşıldığı görülmektedir. Ayrıca 30. dk'dan itibaren 75 °C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu elde edilen anyosiyanin değerlerinin 40 °C'de gerçekleştirilenlerden istatistiki olarak daha yüksek olduğu görülmektedir.

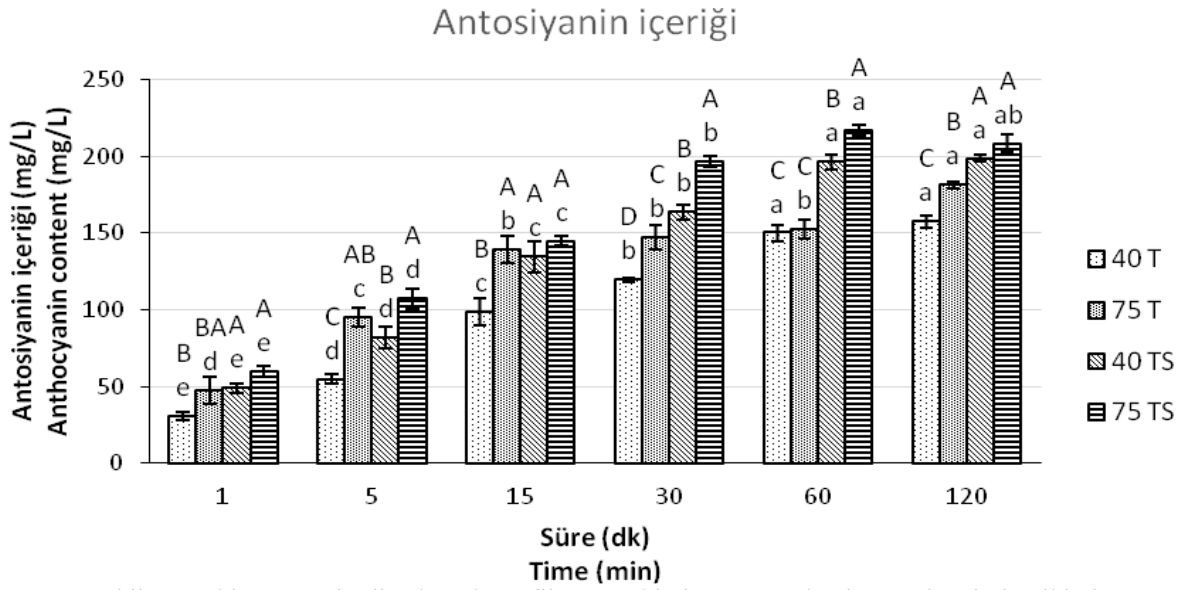


Şekil 1. Farklı yöntemler ile ekstrakte edilen örneklerin zamana bağlı °Bx değerleri

Figure 1. Time-dependent °Bx values of samples extracted by different methods

Aynı süredeki farklı büyük harfler metotlar arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. Ortalama değerler ± standart hata. Aynı desendeki farklı küçük harfler aynı metotta süreler arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir.

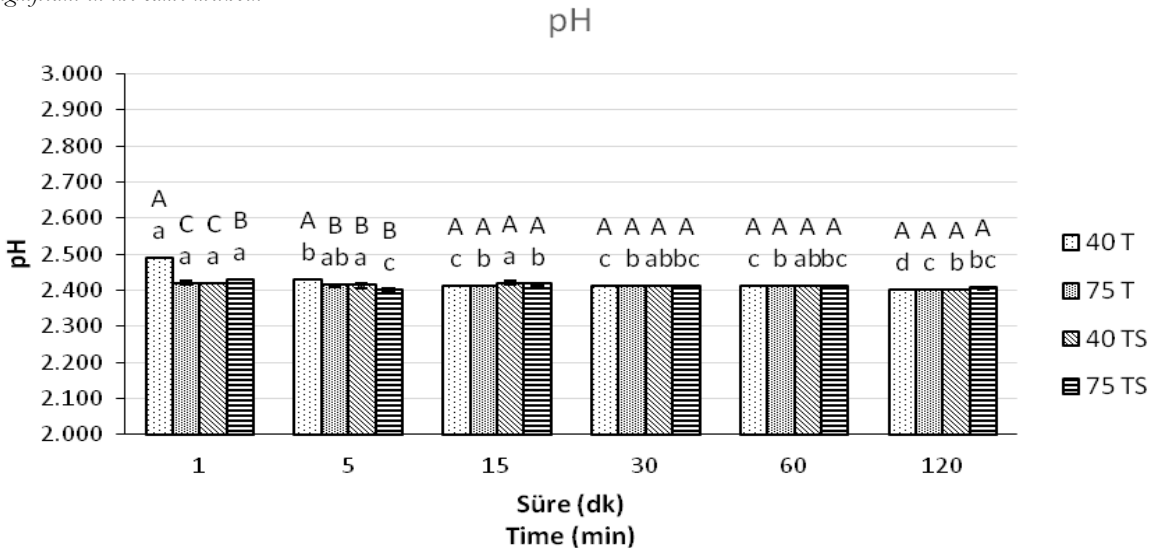
Different capital letters on the same time represent that the difference between the different methods is statistically significant. Mean values ± standard error. Different lower case letters in the same pattern represent that the difference between time periods is statistically significant in the same method.



Şekil 2. Farklı yöntemler ile ekstrakte edilen örneklerin zamana bağlı antosiyanin içerikleri
 Figure 2. Time-dependent anthocyanin content of samples extracted by different methods

Aynı süredeki farklı büyük harfler metotlar arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. Ortalama değerler \pm standart hata. Aynı desendeki farklı küçük harfler aynı metotta süreler arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir.

Different capital letters on the same time represent that the difference between the different methods is statistically significant. Mean values \pm standard error. Different lower case letters in the same pattern represent that the difference between time periods is statistically significant in the same method.



Şekil 3. Farklı yöntemler ile ekstrakte edilen örneklerin zamana bağlı pH değerleri
 Figure 3. Time-dependent pH values of samples extracted by different methods

Aynı süredeki farklı büyük harfler metotlar arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir. Ortalama değerler \pm standart hata. Aynı desendeki farklı küçük harfler aynı metotta süreler arası farkın istatistiksel olarak önemli olduğunu gösterir.

Different capital letters on the same time represent that the difference between the different methods is statistically significant. Mean values \pm standard error. Different lower case letters in the same pattern represent that the difference between time periods is statistically significant in the same method.

Şekil 3. incelendiğinde genel olarak pH'nın 2.4-2.5 aralığında olduğu görülmektedir. Bununla birlikte 40 °C'de ekstrakte edilen örneklerin pH değerlerinin 1. ve 5. dk.'lardaki ölçümlerde diğer yöntemlere göre istatistiki açıdan daha yüksek olmasının, pH üzerine etkili bileşenlerin bu yöntemde nispeten daha yavaş suya geçmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 15. dk'dan sonra gerçekleştirilen ölçümlerde örneklerin pH değerlerinde istatistiki açıdan önemli farklılıklar gözlenmemiştir.

Yukarıda açıklanan ekstraksiyon ön denemeleriyle, örneklerin 120 dk sonunda ulaşılan en düşük seviye olan 1.1 °Briks'e (40 °C'de termal ekstraksiyon) kadar ekstrakte edilmesine karar verilmiştir. Bununla birlikte termal yöntem ile 75 °C'de 1.1 °Bx seviyesine 32dk'da ulaşmıştır. 40 °C'de ultrasonik banyoda örnekler 1.1 Bx seviyesine 29 dk'da, 75 °C'de ise 23 dk'da ulaşmıştır. Aynı koşullarda 1.1 °Bx seviyesine kadar işleme tabi tutulan ekstraktlarda kaba filtre ile süzöldükten sonra Çizelge 1'de görülen fiziksel ve kimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Hibiskus ekstraktlarının fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

Table 1. Physical and chemical analysis results of hibiscus extracts

	40T	75T	40TS	75TS
pH	2.417±0.003	2.420±0.000	2.413±0.003	2.420±0.000
TTA (g/mL), TTA (g/mL), L	0.377±0.009	0.387±0.003	0.393±0.007	0.397±0.003
a	16.17±0.01	16.15±0.02	16.16±0.01	16.15±0.01
b	0.82±0.02	0.74±0.07	0.84±0.03	0.66±0.08
Bulanıklık (NTU), Turbidity (NTU),	1.15±0.00	1.13±0.02	1.16±0.01	1.14±0.01
TMA (Siyanidin-3-glukozit mg/L), TMA (Cyanidin-3- glucoside mg/L),	10.31±b0.60	12.39±b1.48	18.23±a0.85	16.63±a1.02
TEAK (mg TE/100mL), TEAC (mg TE/100mL)	153.6±a2.4	151.8±a5.5	156.2±a4.4	149.7±a2.4
Delfinidin-3-sambiosit (mg/L) Delphinidin 3-sambubioside (mg/L)	79.99±a1.94	86.91±a1.17	84.61±a2.35	85.38±a1.33
Siyanidin-3-sambiosit (mg/L) Cyanidin 3-sambubioside (mg/L)	120.5±a1.26	112.1±a1.6	117.8±a3.1	114.2±a2.6
Glikoz (mg/L), Glucose (mg/L)	55.26±a1.03	53.57±a1.40	54.19±a0.86	52.35±a1.23
Fruktoz (mg/L), Fructose (mg/L)	1329.7±a18.4	1301.0±a9.2	1362.7±a27.7	1372.6±a54.0
Sakkaroz (mg/L), Sucrose (mg/L)	629.9±a19.7	646.3±a37.0	610.5±a21.8	692.7±a0.1
Malik asit (mg/L), Malic acid (mg/L)	5390.7±a93.8	5332.7±a136.5	5324.5±a72.8	5212.4±a108.8
	811.2±a37.4	880.9±a50.1	845.5±a37.1	932.4±a29.7

40T ve 75T: 40 °C ve 75 °C deki termal ekstraksiyon. 40TS ve 75TS: 40 °C ve 75 °C deki termosonik ekstraksiyon. Aynı satırdaki farklı harfler örnekler arası farkın istatistiksel olarak önemli ($P<0.05$) olduğunu gösterir. Ortalama değer±standart hata.

40T and 75T: Thermal extraction at 40 °C and 75 °C. 40TS and 75TS: Thermosonic extraction at 40 °C and 75 °C. Different letters on the same line represent that the difference between the samples is statistically significant ($P<0.05$). Mean values ±standard error

pH ve titrasyon asitliği

Çizelge 1. incelendiğinde örneklerin pH değerlerinin 2.4 civarında ve istatistiki açıdan ($P>0.05$) önemli bir değişim göstermediği

belirlenirken titrasyon asitliği değerleri ise 0.37-0.40 g malik asit/100 mL ekstrakt olarak belirlenmiştir. Genel olarak titrasyon asitliği değerlerinde de uygulanan ekstraksiyon

yöntemine göre istatistiki açıdan önemli değişimler gözlenmemiştir. Chumsri vd., (2008) taze ve kurutulmuş hibiskus çanak yapraklarını suda farklı sıcaklık (50, 60 °C), süre (30, 60 dk) ve katı/çözücü oranlarında (1/5, 1/10) ekstrakte ettiği çalışmada, örneklerin ekstraksiyon şartlarında pH değerinin 2.79 ile 2.95, toplam asit miktarının 1.71-3.29 (%) malik asit, toplam çözünebilir katı madde miktarının 5.33-9.80 briks arasında belirlendiğini bildirilmişlerdir. Ayrıca kurutulmuş örneklerde optimum koşulların 1/10 katı/çözücü oranında 50 °C'de ve 30 dk'da gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edildiği rapor edilmiştir. Söz konusu çalışma ile sunulan çalışmanın pH ve titrasyon asitliği değerlerindeki farklılığın temel nedeninin farklı katı/çözücü oranları (1/5, 1/10 ile 1/40) ve ekstraksiyon sıcaklıkları olduğu söylenebilir. Bununla birlikte Chumsri vd., (2008)'nin yürüttüğü çalışmada çözeltilerin daha konsantre olmasına rağmen pH değerinin daha yüksek olmasının ise kullanılan hammadde farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Ramirez-Rodrigues vd., (2011)'nin katı/çözücü oranı sunulan çalışmada olduğu gibi 1/40 ve 25 °C'de 30, 60, 120 ve 240 dk ile 90 °C'de 2, 4, 8, 16 dk olmak üzere farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirdikleri çalışmada; pH değeri 2.31-2.37 arasında toplam katı miktarı 0.68-1.08 g/100 mL ekstrakt ve titrasyon asitliği ise 0.28-0.44 g malik asit/100mL ekstrakt aralığında belirlenmiştir. Ramirez-Rodrigues vd., (2011) çalışması ile sunulan çalışma sonuçlarının oldukça uyumlu olduğu görülmektedir.

Renk ve bulanıklık

Örneklerin L, a, b renk değerlerinin uygulanan ekstraksiyon yöntemlerine göre önemli bir değişim göstermediği belirlenirken termosonikasyon yöntemiyle ekstrakte edilen örneklerin bulanıklık (NTU) değerlerinin geleneksel yöntem ile ekstrakte edilen örneklerin NTU değerlerine kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Nitekim literatürde yer alan çalışmalarda da ultrases ile gerçekleştirilen uygulamaların geleneksel termal yöntemlere kıyasla daha yüksek bulanıklık değerlerine neden olduğu bildirilmektedir (Dinçer ve Topuz, 2015).

Ultrases uygulamasıyla çözeltilerdeki bulanıklık artışı genellikle kavitasyon olgusuyla ilişkilendirilmektedir. Noktasal da olsa kavitasyon süresince meydana gelen yüksek sıcaklık ve basınç değişimleri büyük moleküllerin daha küçük olanlara parçalanmasına neden olabilmektedir. Büyük partiküllerin parçalanması, aslı partikül sayısını artırır, yüzey alanının genişlemesiyle partiküller arasındaki mesafeyi düşürür ve böylece çözelti bulanıklığını arttırabilmektedir (Dinçer ve Topuz, 2015).

Wong vd., (2003) taze hibiskus çanak yapraklarında sıcak su ekstraksiyonu, vidalı pres, blendırda sıcak (100 °C) ve soğuk (27 °C) su ekstraksiyonu olmak üzere farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kalite özellikleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Wong vd., (2003) uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre L, a, b renk değerlerinde istatistiki açıdan önemli farklılıklar gözlemlendiğini ve sırasıyla L değerinin 22.5-29.8, a değerinin 13.3-18.5 ve b değerinin 4.08-5.47 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ramirez-Rodrigues vd., (2011)'nin 1/40 katı/çözücü oranında ve 25 °C'de 30, 60, 120 ve 240 dk ile 90 °C'de 2, 4, 8, 16 dk olmak üzere farklı sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirdikleri çalışmada; uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre L, a, b renk değerlerinde istatistiki açıdan önemli farklılıklar tespit edildiği ve L, değerinin 35.26-54.18, a değerinin 63.93-67.65 ve b değerinin 45.39-68.76 arasında değiştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte hibiskus ile gerçekleştirilen çalışmalarda da diğer ekstraksiyon çalışmalarında olduğu gibi ekstraksiyon işleminin aynı briks seviyesine göre yürütülmediği düşünüldüğünde elde edilen değerlerin geniş bir aralıkta ve uygulamalara göre önemli farklılıklar göstermesinin nedeni anlaşılabilir.

Antosiyenin içeriği ve antioksidan kapasite

Uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre örneklerin ortalama antosiyenin içeriği 149.7-156.2 siyanidin-3-glukozit mg/L arasında belirlenirken, DPPH yöntemi ile belirlenen Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAK) değerleri ise 80.0-86.9 mg TE /100 mL arasında belirlenmiştir. Bununla birlikte antosiyenin içeriği ve TEAK değerlerinin uygulanan ekstraksiyon

yöntemleri arasında istatistiki açıdan önemli bir değişim göstermediği tespit edilmiştir.

Wong vd., (2003) taze hibiskus çanak yapraklarında sıcak su ekstraksiyonu, vidalı pres, blendırda sıcak (100 °C) ve soğuk (27 °C) su ekstraksiyonu olmak üzere farklı ekstraksiyon yöntemlerinin kalite özellikleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre (1/40 katı/çözücü oranında) antosiyanin içeriğini 7-42.9 delfinidin-3-glukozit mg/L, arasında rapor etmişlerdir.

Chumsri vd., (2008)'nin kurutulmuş hibiskus çanak yapraklarını 60 °C suda 1/5 ve 1/10 katı/çözücü oranlarında ekstrakte ettiği çalışmada, kurutulmuş örneklerin toplam antosiyanin miktarının 400.67-445.02 siyanidin-3-galaktozit mg/100g arasında, EC₅₀ antioksidan aktivite değerlerinin ise 50.48-45.05 mg/mL arasında belirlendiği bildirilmiştir.

Cisse vd., (2012) farklı ekstraksiyon prosedürlerinin depolama esnasında hibiskus ekstraktlarındaki renk ve antosiyanin degradasyonuna etkisini araştırmıştır. Sıcak (100 °C'de 30 dk) ve soğuk (30 °C'de 240 dk), pastörize edilmiş (90 °C'de 5 dk) ve edilmemiş olmak üzere dört farklı proses sonucu elde edilen ekstraktlarda en yüksek çözünür kuru madde (48 g/kg) ve antosiyanin içeriği (280 delfinidin-3-ksiloglukozit mg/L) 100 °C'de 30 dk (1:15 örnek su oranında) ekstrakte edildikten sonra pastörize edilmemiş örneklerde tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada ORAC antioksidan aktivite sonuçları ise 159-241 µmol /Trolox g arasında rapor edilmiştir.

Sindi vd., (2014) *Hibiscus sabdariffa*'nın formik asitli ve formik asitsiz, farklı çözgen (su, metanol, etil asetat ve hekzan), farklı süre (3, 5, 10 dk) ve farklı sıcaklıklarda (25°C, 50 °C ve çözgenlerin kaynama sıcaklıklarında) ekstraksiyonu ile elde ettikleri ekstraktlarda toplam polifenol, antioksidan kapasite (DPPH, FRAP ve TEAC) ve antosiyanin bileşenlerini belirlemişlerdir. Sonuçlara göre en yüksek antioksidan kapasite formik asitli veya formik asitsiz su ile 100 °C'de 10 dk ekstrakte edilen örneklerde tespit edilmiştir. Bununla

birlikte antioksidan aktivite tayininde farklı yöntemler kullanılması ve aynı yöntemde dahi sonuçların farklı şekillerde sunulması verilerin mukayese edilmesini zorlaştırmaktadır.

Antosiyanin kompozisyonu

Hibiskus ile yürütülen çalışmalar incelendiğinde, genel olarak delfinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit'in majör antosiyaninler olarak rapor edildiği görülmektedir. Bununla birlikte delfinidin-3-glikozid ve siyanidin-3-glikozidin de bazı kaynaklarda hibiskus örneklerinde tespit edildiği rapor edilmektedir. Sunulan çalışmada söz konusu majör antosiyaninlerden delfinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit sırasıyla 112.1-120.5 mg/L ve 52.4-55.3 mg/L arasında belirlenirken, delfinidin-3-glikozid ve siyanidin-3-glikozidin antosiyaninleri tespit edilememiştir. Bununla birlikte bu antosiyaninlerin ekstraksiyon yöntemlerine göre istatistiki açıdan önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir.

Sıcak (90 °C) ve soğuk (25 °C) su ile eşdeğer ekstraksiyon koşullarında hazırlanan hibiskus ekstraktlarında, Ramirez-Rodrigues vd., (2011) fizikokimyasal ve fitokimyasal özellikleri değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar 25 °C'de 240 dk ve 90 °C'de 16 dk (1:40 hibiskus:su oranında) ekstrakte edilen örneklerin antosiyanin içeriğinin istatistiki olarak eşdeğer olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte siyanidin-3-sambiosit miktarı (41.62-44.88 mg/L) her iki ekstraktta istatistiki açıdan aynı bulunsun da, sıcak (90 °C) su ile ekstrakte edilen örneklerdeki delfinidin-3-sambiosit miktarı (100.90 mg/L) 25 °C'de ekstrakte edilenlere (87.32 mg/L) kıyasla daha yüksek oranda tespit edilmiştir.

Sindi vd., (2014) *Hibiscus sabdariffa*'nın formik asitli ve formik asitsiz su ve metanol çözgenlerini kullanarak kaynama noktasında 10 dk süre ile gerçekleştirdikleri ekstraksiyon sonucunda örneklerin delfinidin-3-sambiosit içeriğini 2.41-3.687 mg/g arasında, delfinidin-3-glikozid içeriğini 0.15-0.19 mg/g arasında, siyanidin-3-sambiosit içeriğini 1.96-3.81 mg/g arasında ve siyanidin-3-glikozid içeriğini ise 0.46-0.52 mg/g arasında bildirmişlerdir.

Sinela vd., (2017) hibiskus örneklerinde 1/10 katı sıvı oranında, oda sıcaklığında 30 dk'da gerçekleştirdikleri ekstraksiyon sonunda delfinidin-3-sambiosit içeriğini 0.78 mg/mL, siyanidin-3-sambiosit içeriğini ise 0.46 mg/mL olarak rapor etmişlerdir.

Organik asit ve şeker kompozisyonu

Hibiskus örneklerinde tespit edilen şekerlerin uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre istatistiki açıdan önemli bir değişim göstermediği belirlenmiştir. Tespit edilen şekerler içinde sakaroz en yüksek oranda (5212.4-5390.7 mg/L) belirlenirken fruktoz ise en düşük (610.5-692.7 mg/L) oranda belirlenen şeker olmuştur. Hibiskus ekstraktlarında değerlendirilen organik asitler (tartarik asit, sitrik asit, okzalik asit, malik asit, garcinia asit) içerisinde ise sadece malik asit tespit edilmiştir (811.2-932.4 mg/L). Malik asit içeriği de uygulanan ekstrakt yöntemlerine göre istatistiki açıdan önemli bir değişim göstermemiştir.

Wong vd., (2002) taze hibiskus kalikslerinde gerçekleştirdikleri çalışmada glikoz içeriğini 1.29 g/100g, fruktoz içeriğini 1.12 g/100g, sakaroz içeriğini ise 0.87 g/100g olarak belirlemişlerdir. Ayrıca organik asitlerden süksinik asit içeriğini 0.51 g/100g, okzalik asit içeriğini 0.43 g/100g, tartarik asit içeriğini 0.17 g/100g, malik asit içeriğini 0.12 g/100g ve askorbik asit içeriğini ise 141.09 mg/100g olarak rapor etmişlerdir. Jung vd (2013) ise kurutulmuş hibiskus kalikslerinin fizikokimyasal ve antimikrobiyal özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında fruktoz içeriğini 19.1 g/kg, glikoz içeriğini 23.8 g/kg ve sakkaroz içeriğini ise 5.10 g/kg olarak bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada maltoz içeriğinin de araştırıldığı ancak tespit edilemediği rapor edilmiştir. Okzalik, tartarik, malik, laktik, asetik, sitrik, süksinik ve fumarik asit gibi organik asitlerin de araştırıldığı çalışmada sadece 274.5 g/kg seviyesinde malik asit rapor edilmiştir.

SONUÇ

Hibiskus örneklerinin ekstraksiyonunda termosoniaksyon işleminin geleneksel termal yöntemine göre daha kısa sürede hedeflenen ekstrakt seviyesini sağladığı belirlenmiştir.

Ekstraksiyon sürecinde sıcaklık ve süreye bağlı olarak suda çözünür kuru madde ve antosiyanin içeriğinde genel olarak artış belirlenirken, pH genel olarak önemli bir değişim göstermemiştir. 1.1 °Briks seviyesine kadar ekstrakte edilen örneklerde delfinidin-3-sambiosit ve siyanidin-3-sambiosit başlıca antosiyaninler olarak belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktlarda sakaroz, en yüksek miktardaki şeker olarak belirlenirken, bunu glikoz ve fruktoz takip etmiştir. Ekstraksiyon uygulamalarının kalite özellikleri üzerine etkisi değerlendirildiğinde bulanıklık değerleri hariç, uygulamalar arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Bitki çayı, sıcak ve soğuk içecekler, reçel, şekerlemeler, dondurma, çikolata, tatlandırıcılar, puding ve pasta gibi ürünlerin hazırlanmasındaki kullanım potansiyeli ve analiz sonuçları göz önüne alındığında; hibiskus kaliksleri gıda endüstrisi açısından zengin bir antosiyanin kaynağı olarak dikkat çekmektedir. Hibiskus kalikslerinin endüstriyel ölçekte kullanımında maksimum fayda sağlanması açısından ekstraksiyon şartlarının optimize edilmesi kaçınılmazdır. Diğer taraftan, ekstraksiyon yöntemi ve şartlarının belirlenmesinde, hedef bileşenlerin yüksek verim, düşük enerji gideri ve düşük maliyetle elde edilmesinin yanında ekstraktların kullanım amacına göre renk, bulanıklık vb. fiziksel özelliklerinin de dikkate alınması önem arz etmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı FBA-2018-3150 proje numarası ile maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

AOAC. 2002. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 17th ed. Washington, DC.

Camelo-Méndez, G. A., Ragazzo-Sánchez, J. A., Jimenez-Aparicio, A. R., Vanegas-Espinoza, P. E., Paredes-López, O., Del Villar-Martinez, A. A. (2013). Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by

- multivariable analysis. *Plant Food Hum Nutr.* 68(3), 229-234. doi: 10.1007/s11130-013-0360-2.
- Chumsri, P., Sirichote, A., & Itharat, A. (2008). Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarın J. Sci. Technol.*, 30(1), 133-9.
- Cid-Ortega, S., Guerrero-Beltrán, J. A. (2015). Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*), an alternative to the food and beverages industries: a review. *J. Food Sci. Technol.* 52(11), 6859-6869. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1800-9>.
- Cisse, M., Vaillant, F., Kane, A., Ndiaye, O., Dornier, M. (2012). Impact of the extraction procedure on the kinetics of anthocyanin and colour degradation of roselle extracts during storage. *J. Sci. Food Agric.*, 92(6), 1214-1221. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4685>
- Coelho, E. M., da Silva Padilha, C. V., Miskinis, G. A., de Sá, A. G. B., Pereira, G. E., de Azevêdo, L. C., dos Santos Lima, M. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *J. Food Compos. Anal.*, 66, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
- Condón, S., Raso, J., Pagán, R. (2005). Microbial inactivation by ultrasound. In: *Novel Food Processing Technologies*. Barbosa-Cánovas, G. V., Tapia, S. M., Cano M. P. CRC Press pp. 423-442. New York.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.* 165, 424-443. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.002>.
- Dinçer, C., Topuz, A. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* and quality changes in black mulberry juice under pulsed sonication and continuous thermosonication treatments. *J. Food Process. Preserv.*, 39(6), 1744-1753. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12406>
- Dinçer, C., Topuz, A. (2018). Meyve Suyu İşlemede Ultrases Kullanımı. *Gıda*, 43(4), 569-581. <https://doi.org/10.15237/gida.GD18037>
- Ergün, A. R., Baysal, T., Bozkır, H. (2013). Ultrases yöntemi ile karotenoidlerin ekstraksiyonu. *Gıda*, 38(4), 239-246. doi: 10.5505/gida.2013.30074.
- Fernández-León, M. F., Fernández-León, A. M., Lozano, M., Ayuso, M. C., Amodio, M. L., Colelli, G., & González-Gómez, D. (2013). Retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2), 302-313. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.10.012>
- Gedik, S. (2014). Çukurova koşullarında farklı ekim zamanlarının kerkede (*Hibiscus sabdariffa* L.) bitkisinin çanak yaprak verimi ve kalitesine etkisi. Çukurova Üniversitesi / Fen Bilimleri Enstitüsü / Tarla Bitkileri Anabilim Dalı. Y.lisans Tezi.116s.
- Jung, E., Kim, Y., Joo, N. (2013). Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *J. Sci. Food Agric.*, 93(15), 3769-3776. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6256>
- Karagöz, Ş., Demirdöven, A. 2016. Termosonikasyon ve geleneksel ısıtma uygulamalarının havuç suyuna etkileri: pektin metilesteraz inaktivasyonu ve fizikokimyasal özellikler. *Gıda*, 41(5): 345-350. doi: 10.15237/gida.GD16027
- Li, Z., Pan, Q., Cui, X., Duan, C. 2012. Optimization on anthocyanins extraction from wine grape skins using orthogonal test design. *Food Sci. Biotechnol.* 19(4): 1047-1053. doi 10.1007/s10068-010-0147-2.
- Nakilcioğlu, E., Ötleş, S. (2014). Basınçlı Çözgen Ekstraksiyonu ve Gıda Sanayisindeki Uygulamaları. *Akademik Gıda*, 12(2).88-94.
- Özdoğan F. P. (2001) Hibiscus sabdariffa'nın fitoterapi açısından değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Eczacılık ve Farmakoloji. Yüksek Lisans175s,
- Piyasena, P. Mohareb, E., Mckellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a

- review. *Int J Food Microbiol*, 87 (3): 207-216, doi:10.1016/S0168-1605(03)00075-8.
- Ramirez-Rodrigues, M. M., Plaza, M. L., Azeredo, A., Balaban, M. O., Marshall, M. R. (2011). Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Food Sci.*, 76(3), C428-C435. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02091.x>
- Sindi, H. A., Marshall, L. J., Morgan, M. R. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chem.* 164, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.097>
- Sinela, A., Rawat, N., Mertz, C., Achir, N., Fulcrand, H., Dornier, M. (2017). Anthocyanins degradation during storage of *Hibiscus sabdariffa* extract and evolution of its degradation products. *Food Chem.* 214, 234-241. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.071>
- Tajchakavit, S., Boye, J.I., Belanger, D., Couture, R. 2001. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. *Food Res. Int.* 34 (5): 431-440. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00188-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00188-5).
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J. (2008). Effects of sonication on the kinetics of orange juice quality parameters. *J. Agric. Food. Chem.*, 56(7), 2423-2428. <https://doi.org/10.1021/jf073503y>.
- Tiwari, B.K., Mason, T.J. (2011). Ultrasound processing of fluid foods. In: Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. Cullen, P.J., Tiwari, B. K., Valdramidis V. (Editors) Academic Press, pp. 135-165, Waltham.
- Wang, W.D. Xu, S.Y. 2007. Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *J. Food Eng.* 82 (3): 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.018>
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., & Man, C. (2003). Optimization of hot water extraction of roselle juice using response surface methodology: a comparative study with other extraction methods. *J. Sci. Food Agric.*, 83(12), 1273-1278. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1416>
- Wong, P. K., Yusof, S., Ghazali, H. M., Che Man, Y. B. (2002). Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Nutrition & Food Science*, 32(2), 68-73. <https://doi.org/10.1108/00346650210416994>