

Elma Ekstraktının Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Değişkenlerin Etkilerinin Yanıt Yüzey Yöntemi ile Belirlenmesi

Recep PALAMUTOĞLU^{1*}, Cemal KASNAK¹

ÖZET: Elma (*Malus domestica*) besin öğeleri bakımından fonksiyonel özelliklere sahip olan ve hoşça giden tadı ile severek tüketilen bir meyvedir. Elmalar ve polifenolik bileşikleri içeren diğer gıdaların ekstraksiyonunda farklı çözümler ve farklı metotlar kullanılmaktadır. Son yıllarda ekstraksiyon verimliliğinin artırılması amacıyla ultrasound destekli ekstraksiyon uygulamaları üzerine çalışmalar artmaktadır. Bu çalışmada farklı sürelerle ultrasound uygulaması, farklı etanol konsantrasyonu ve farklı örnek miktarı parametrelerinin elmalardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu ve ekstraktların antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Buna göre toplam fenolik madde miktarı ve ABTS (2,2'-azino-bis(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic asit) sonuçları için lineer modellemeler geliştirilirken DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sonuçları için quadratik modelleme belirlenmiştir. Ultrasonik su banyosu içerisinde farklı sürelerle ekstraksiyon işleminin toplam fenolik madde miktarına dolayısıyla da antioksidan aktivite göstergesi olan DPPH ve ABTS radikal süpürme aktiviteleri üzerine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları ise %76.153 etanol konsantrasyonu, 12.452 dk ultrasound uygulaması ve 2.844 g örnek miktarı şeklinde tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ABTS, DPPH, Elma, Yanıt Yüzey Metodu, Ultrasound

Determination of the Effects of Variables on Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Apple Extracts by Response Surface Method

ABSTRACT: Apple (*Malus domestica*) is a fruit which has a pleasant taste so consumed with pleasure and have functional properties in terms of nutrients. Different solvents and different methods are used in the extraction of apples and other foods which contains polyphenolic compounds. In recent years, studies on ultrasound assisted extraction applications have been increasing to increase extraction efficiency. In this study, the effects of ultrasound application at different times, different ethanol concentration and different sample amount parameters on the extraction of phenolic compounds from apples and antioxidant activities of apples were determined using response surface method. Accordingly, linear modeling was developed for total phenolic content and ABTS (2,2'-azino-bis(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) results, while quadratic modeling was determined for DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) results. It was determined that the extraction process with different periods in the ultrasonic water bath had no significant effect on the total phenolic content and thus on the antioxidant activity DPPH and ABTS radical scavenging activities. Optimum extraction conditions were determined as 76.153% ethanol concentration, 12.452 min ultrasound application and 2.844 g sample amount.

Keywords: ABTS, DPPH, Apple, Response Surface Method, Ultrasound

¹ Recep PALAMUTOĞLU (Orcid ID: 0000-0002-1168-081X), Cemal KASNAK (Orcid ID: 0000-0002-8312-7829), Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Afyonkarahisar,

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Recep PALAMUTOĞLU, e-mail: receppalamutoglu@hotmail.com

GİRİŞ

Elmalar (*Malus domestica*) sahip oldukları hoşça giden tatları, vitaminler bakımından zengin olmaları, biyoaktif bileşenleri içermeleri ve yıl boyunca kolay bulunabilmeleri nedeni ile insan beslenmesinde yaygın tüketilen bir meyve türüdür. Birçok çalışma ile de elmaların sahip oldukları biyoaktif özellikler ortaya konmuştur (Jakobek ve ark., 2015). Türkiye’de kişi başı elma tüketimi 2015-2016 yıllarında ortalama 23 kg olarak gerçekleşmiştir (Taşcı, 2017). Elmaların içeriğindeki polifenollerin, serbest radikalleri süpürme etkilerinden dolayı insan sağlığıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jakobek ve ark., 2015). Polifenoller insan beslenmesinde en çok bulunan antioksidan etkili maddelerdir. C vitamini gibi temel besin öğelerinden ziyade elmadaki antioksidan etkinin de önemli bir kısmını polifenoller oluşturmaktadır (Tsao ve ark., 2005). Polifenoller bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bir veya daha fazla aromatik halka içeren sekonder metabolitleri temsil eden bir gruptur. Sahip oldukları konjuge bağlar ve hidroksil grupları antioksidan aktivitelerinden sorumludur. Elmalarda başlıca 5 grup polifenolik bileşik bulunmaktadır; flavanoller (kateşin, epikateşin, prosiyanidin), fenolik asitler (başta klorojenik asit), dihidrokalkonlar (floretilin glikozitler), flavonoller (kuersetin glikozitleri) ve antosiyaninler (siyanidin) (Wojdyło ve ark., 2008). Polifenoller homojenize elma örneklerinden farklı solventler kullanılarak sıvı-katı ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Bu amaçla uygulanan işlemler sırasında genellikle metanol, farklı konsantrasyonlarda metanol-su karışımı, farklı konsantrasyonlarda etanol-su karışımı, farklı konsantrasyonlarda su- etanol- metanol karışımı vb gibi çözücüler kullanılmaktadır. Elma örnekleri bu çözücüler içerisinde farklı sürelerle ve farklı karıştırıcılar kullanılarak homojen hale getirilirler (Jakobek ve ark., 2015). Uygun olmayan ekstraksiyon süresi, solvent ve bitki materyali / solvent oranı, polifenollerin yetersiz ekstraksiyonuna yol açabilir. Bu nedenle polifenollerin uygun şekilde belirlenmesi ve miktar tayini için uygun ekstraksiyon parametreleri seçilmeli ve optimize edilmelidir (Jakobek ve ark., 2015). Ekstraksiyon işlemleri sırasında ultrasound uygulaması en basit ve en ucuz teknik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu sayede çeşitli çözücülerin ve düşük sıcaklıkların kullanılmasına imkan tanır, ekstrakte edilecek bileşiğin polaritesi veya bulunduğu matrisin nem miktarı ekstraksiyona herhangi bir sınırlama getirmemektedir ve tekrarlanabilir ve ölçek artırma potansiyeline sahip bir uygulamadır (Ghitescu ve ark., 2015). Aynı zamanda ekstraksiyon ve proses süresini, kullanılan enerji ve çözücü miktarını, CO₂ emisyonunu da azaltması başlıca yararlarından (Chemat ve ark., 2017; Medina-Torres ve ark., 2017).

Bu çalışmada çözücü (etanol; % 60, 75, 90), ultrasound uygulaması (süre; 5, 10, 15 dk) ve örnek miktarının (g; 1, 2, 3) elmaların toplam fenolik, DPPH ve ABTS radikal süpürme aktivitesi üzerine etkilerinin yanıt yüzey yöntemi kullanılarak belirlenmesi ve işlem parametrelerinin optimizasyonunun sağlanması amaçlanmaktadır. Bu sayede ultrasound uygulamasının ve ekstraksiyon parametrelerinin toplam fenolik miktarı ve antioksidan aktivite üzerine etkisi belirlenerek daha az çözücü kullanımı, daha az enerji kullanımı ve daha yüksek verim ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu sağlanmaya çalışılacaktır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Deney Tasarımı ve İstatistik Analizler

Araştırmada optimum ekstraksiyon koşulları Minitab 17 kullanılarak yanıt yüzey yöntemine göre Box-Behnken Design deney tasarımı şartlarında araştırılmıştır. Buna göre bağımsız değişkenler etanol konsantrasyonu (%60, 75 ve 90, X₁), Ultrasound süresi (5, 10 ve 15 dk, X₂), elma miktarıdır (1, 2 ve 3 g, X₃). Yanıtlar ise 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), toplam fenolik miktarı (TPC) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) değerlerinden oluşmaktadır. Deney tasarımına

göre 15 deneme 4 aksiyal, 4 küp ve 7 merkezi noktadan oluşmaktadır. Çizelge 1’de Box-Behnken Design deney tasarımına ait faktörler verilmiştir. Analizler iki paralelli olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Box-Behnken Design deney tasarımına göre bağımsız değişkenler ve seviyeleri

Bağımsız Değişkenler	Birim	Seviye		
		-1	0	1
Etanol konsantrasyonu (X_1)	(%)	60	75	90
Ultrasound süresi (X_2)	Dakika (dk)	5	10	15
Örnek ağırlığı (X)	(g)	1	2	3

Örnek hazırlama

Elma örnekleri Afyonkarahisar’da yerel bir marketten temin edilmiştir. Star King cinsi elmalar aynı büyüklükte, aynı fiziksel görünümde olanlar arasından temin edilmiştir. Elmalar yıkanıp, durulanıp kurutulduktan sonra kabukları soyulmuş ve rendelenerek örnekler alınmıştır.

Elma ekstraktlarının hazırlanması

1 g rendelenmiş elma örneği 11000 rpm’de 20 ml %60-90 etanol içerisinde 3 dk homojnize edilmiştir. Daha sonra homjenizat 5-15 dk ultrasonik su banyosunda (40 kHz, WUC-D03H, Daihan/Korea) bekletilmiştir. Ardından filtre kağıdı ile süzülen süpernatant analizler gerçekleştirilinceye kadar ağzı kapalı test tüplerinde – 18 C’de muhafaza edilmiştir.

DPPH radikal süpürme aktivitesi tayini

Elma ekstraktlarının antioksidan aktivitesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali süpürme metoduna göre gerçekleştirilmiştir (Choi ve ark., 2016). Metanol içerisinde 4.1075 M DPPH çözeltisi hazırlanmıştır. 400 µl DPPH çözeltisi ile 1600 µl elma ekstraktı karıştırılarak 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Tüm örnekler absorbansları 517 nm’de (Optizen pop spektrofotometre/Kore) belirlenmiştir. Kontrol olarak örnek yerine methanol kullanılmıştır. Antioksidan aktivite; kontrol absorbansından örnek absorbansının çıkarılıp kontrol absorbansına bölünmesi sonucunun 100’le çarpımı ile (%) olarak tespit edilmiştir.

ABTS radikal süpürme aktivitesi analizi

ABTS radikal süpürme aktivitesi analizi Re ve ark., (1999)’nin önerdiği metodun modifikasyonu ile belirlenmiştir. ABTS^{•+} katyon radikali 2,2'-azino-bis(3)-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic asitin saf su içerisinde potasyum persülfat (2.45 mM) ile reaksiyonu sonucu oluşur. Bu karışım 1 gün boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. ABTS çözeltisi kullanılmadan önce 732 nm’deki absorbansı 0.70±0.02 olacak şekilde metanolla seyreltilmiştir. Ardından 990 µl ABTS çözeltisi ve 10 µl elma ekstraktı karıştırılarak köre göre absorbansları belirlenmiştir. Sonuçları troloks eğrisi ($r^2 > 0.99$) üzerinden eşdeğerlik olarak belirtilmiştir.

Toplam fenolik miktarı (TFM)

Elma ekstraktlarından 0.5 ml alınarak üzerine 7 ml distile su ve 0.5 ml Folin-Chiocalteu reaktifi ilave edilip karıştırılarak 3 dk inkübe edilmiştir. Ardından 2 ml %2’lik Na₂CO₃ eklenip karıştırılmıştır. Elde edilen son karışım 25 °C’de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Örneklerin absorbansları 765 nm’de belirlenmiştir. Sonuçlar gallik asit standart eğrisi ($r^2 > 0.99$) kullanılarak belirlenmiştir (Kaur & Kapoor, 2002).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Elmanın farklı etanol konsantrasyonları, ultrasound uygulaması süresi ve örnek miktarı ile ekstrakte edilmesi için düzenlenen deneme deseni ve buna göre elde edilen analiz sonuçları Çizelge 2’de verilmiştir.

Çizelge 2. Deneme deseni ve analiz sonuçları

Test No	Faktör Kodları			Faktörler			Yanıtlar		
	X ₁	X ₂	X ₃	Etanol	Ultrasound	Örnek Miktarı	TFM (mg Gallik asit/100 g)	DPPH (%)	ABTS (mg Troloks eşdeğeri/ 100 g)
1	-1	-1	0	60	5	2	260	72.73	307.29
2	1	-1	0	90	5	2	350	86.92	343.24
3	-1	1	0	60	15	2	270	68.96	309.37
4	1	1	0	90	15	2	350	86.92	364.33
5	-1	0	-1	60	10	1	130	82.21	216.11
6	1	0	-1	90	10	1	190	91.74	208.61
7	-1	0	1	60	10	3	420	65.52	389.26
8	1	0	1	90	10	3	400	84.79	362.27
9	0	-1	-1	75	5	1	100	85.74	172.42
10	0	1	-1	75	15	1	170	87.09	192.69
11	0	-1	1	75	5	3	440	70.56	365.34
12	0	1	1	75	15	3	380	67.35	361.70
13	0	0	0	75	10	2	220	82.47	259.08
14	0	0	0	75	10	2	240	83.22	278.86
15	0	0	0	75	10	2	280	82.40	297.53

Yanıtların varyans analizleri (ANOVA)

Yanıt yüzey metodu bağımsız değişkenler ile bu değişkenlere karşılık elde edilen verilerin tanımlanması için kullanılan bir grup matematiksel ve istatistiksel tekniğin genel adıdır. Yanıt yüzey metodu değişkenlerin tek tek veya birlikte etkilerin tanımlanması olup deneysel bir metodoloji ve matematiksel bir model de oluşturmaktadır. Elde edilen bu matematiksel modelin grafik perspektifine yanıt yüzey metodu terimi denilmiştir. Kimyasal ve biyokimyasal işlemler çok sayıda parametreden etkilenir. Tüm parametrelerin etkilerini belirlemek mümkün olmadığından ana etkileri olan parametreleri seçmek gerekir (Bas ve Boyacı, 2007).

Çizelge 3’te verilen elmaların toplam fenolik madde miktarları için varyans analizi sonuçları incelendiğinde modelin p-değerinin 0.05’ten küçüktür bu da modelin oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Uyum eksikliğinin p değerinin (p>0.05) anlamlı olmadığı belirlenmiştir ki bu da uygunluk modelinin, verileri yorumlamak için iyi olduğunu göstermektedir. Örnek miktarının toplam fenolik madde miktarı üzerine istatistiki olarak çok önemli oranda etkili olduğu belirlenmiştir. Buna göre modelin ve değişkenlere verilen cevapların p-değerinin 0.05’ten küçük olması parametrelerin yanıtlar üzerinde anlamlı etkisinin olduğunu göstermektedir (Ekici ve ark., 2014).

Toplam fenolik miktarı için varyans analizi sonuçlarına göre geliştirilen matematiksel model Eşitlik 1’de verilmiştir.

Tahmini R² (0.8073) ile düzeltilmiş R² (0.8663) arasındaki fark 0.2’den az olduğu için deneysel değerler ile öngörülen değerler oldukça tutarlıdır.

$$\text{TFM} = 280.0 + 26.25 X_1 + 2.5 X_2 + 131.25 X_3 \quad (1)$$

Çizelge 3. Elma ekstraktlarının TFM linear model için varyans analizi sonuçları

Varyans	SS*	df*	MS*	F-değeri	p-değeri
Model	1.434E+05	3	47791.67	31.25	< 0.0001
X ₁ -Etanol	5512.50	1	5512.50	3.60	0.0842
X ₂ -Ultrasound Süresi	50.00	1	50.00	0.0327	0.8598
X ₃ -Örnek Miktarı	1.378E+05	1	1.378E+05	90.10	< 0.0001
Artık	16825.00	11	1529.55		
Uyum Eksikliği	14958.33	9	1662.04	1.78	0.4109
Hata	1866.67	2	933.33	31.25	
Toplam	1.602E+05	14		3.60	
R ² = 0.8950	Adj R ² =0.8663	Pre.R ² = 0.8073			

*SS: Kareler toplamı, *df: Serbestlik derecesi, *MS: Ortalamanın karesi

Ilghami ve ark. (2015), kırmızı pancar ile yaptıkları çalışmada ekstraksiyon süresini 3.5 dk'dan 20 dk'ya çıkarmanın her iki yoğunlukta (düşük ve yüksek) ultrasound uygulamasında da toplam fenolik madde miktarında önemli bir artış sağladığını bildirmişlerdir. Sonuçlar çözgen içerisine pancar parçacıklarından fenolik bileşiklerin difüzyonunun ve çözünürlüğünün ekstraksiyon süresi ile arttığını tespit etmişlerdir.

Altemimi ve ark. (2016), balkabağı örneklerinde toplam fenolik miktarının ultrasound uygulama süresinin artışına (10 dk'dan 25,67 dk'ya) bağlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Ultrasonik su banyolarının, balkabağının hücre duvarlarını kırmak için yeterli kavitsiyonu sağlayabileceğini ve bu sayede sonikasyonun hücre içeriğinin ekstraksiyon çözeltisi içerisine difüzyonunu arttırdığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ultrasound süresinin etkisi istatistiki olarak önemli olmadığı görülmüştür. Uygulama süresinin kısa tutulması beklenen hücre duvarı parçalanmasını gerçekleştirememiş olabilir.

Bakht ve ark. (2018), yaptıkları çalışmada polifenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için geleneksel yöntemin yanında ultrasonik banyo (40 kHz) ve prob (26 kHz) kullanarak ultrasound destekli ekstraksiyon gerçekleştirmişlerdir. Buna göre çay örneklerinden ekstrakte edilen polifenolik madde miktarının düşük frekans uygulanan örneklerde yüksek frekans uygulanmış örneklerle göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Aynı frekans uygulanan örneklerin diğer değişkenlere verdikleri cevaplar arasında önemli farklılıklar gözlenmediğini ancak iki farklı frekans uygulamaları arasında önemli farklılık bulunduğunu bildirmişlerdir. González-Centeno ve ark. (2014), üzüm posasının su ile ekstraksiyonunda akustik frekans, ultrasonik güç ve ekstraksiyon süresinin etkilerini araştırdıkları çalışmada en iyi sonucu 40 kHz frekansta, 150 W/L güç yoğunluğunda ve 25 dk ekstraksiyon süresi ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre de ultrasonik su banyosunda aynı frekansta (40 kHz) örnekleri farklı sürelerle bekletmenin arasında istatistiki olarak önemli bir fark olmadığını göstermiştir.

Ultrasound frekansı arttıkça, sıvıda kavitsiyon üretimi ve yoğunluğu azalır. Yüksek frekansta akustik kavitsiyonun başlatılması daha zor olacaktır, çünkü kavitsiyon kabarcıklarının seyreltme döngüsü sırasında başlaması için bir gecikmeye ihtiyacı vardır ve sıkıştırma-seyreltme işleminin döngüleri kabarcıkların kavitsiyonunun artmasına izin vermek için çok kısa olabilir. Seyreltme fazının uzunluğu ultrasonik frekansla ters orantılıdır; bu nedenle, yüksek frekanslarda, kavitsiyon oluşturmak için daha büyük genlikler ve yoğunluklar gerekir (Mason & Lorimer, 2002).

Ghafoor ve ark. (2009), üzüm çekirdeklerinden ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının sabit ekstraksiyon sıcaklığında (50 °C), etanol konsantrasyonunun artmasıyla yavaşça arttığını en yüksek etanol konsantrasyonunda en yüksek değere yakın fenolik madde miktarına ulaşıldığını bildirmişlerdir.

Benzer şekilde sabit etanol konsantrasyonunda ekstraksiyon sıcaklığının artışına bağlı olarak fenolik madde miktarında kademeli bir artış olduğunu belirlemiştir.

Çizelge 4'te görüldüğü üzere Model F değeri (30.02), modelin önemli olduğunu göstermektedir. Gürültü nedeniyle bu kadar büyük bir F değerinin ortaya çıkma olasılığı sadece % 0.08'dir.

Etanol konsantrasyonunun ve örnek miktarının istatistiki olarak çok önemli olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). DPPH süpürme aktivitesinin varyans analizi sonuçları ile elde edilen matematiksel model Eşitlik 2'de verilmiştir.

Çizelge 4. Elmaların toplam DPPH analizi quadratik model için varyans analizi sonuçları

Varyans	SS*	df*	MS*	F-değeri	p-değeri
Model	982.11	9	109.12	30.02	0.0008
X ₁ -Etanol	464.36	1	464.36	127.73	< 0.0001
X ₂ -Ultrasound Süresi	3.96	1	3.96	1.09	0.3443
X ₃ -Örnek Miktarı	428.66	1	428.66	117.91	0.0001
X ₁ X ₂	3.55	1	3.55	0.9774	0.3682
X ₁ X ₃	23.72	1	23.72	6.52	0.0510
X ₂ X ₃	5.20	1	5.20	1.43	0.2854
X ₁ ²	0.1740	1	0.1740	0.0479	0.8355
X ₂ ²	47.77	1	47.77	13.14	0.0151
X ₃ ²	7.39	1	7.39	2.03	0.2133
Artık	18.18	5	3.64		
Uyum Eksikliği	17.76	3	5.92	28.66	0.0339
Hata	0.4133	2	0.2066		
Toplam	1000.29	14			

R²= 0.9818, Adj R²= 0.9491, Pre.R²=0.7149

*SS: Kareler toplamı, *df: Serbestlik derecesi, *MS: Ortalamanın karesi

$$\text{DPPH} = 82.70 + 7.62 X_1 - 0.7037 X_2 - 7.32 X_3 - 0.2171 X_1^2 - 3.6 X_2^2 - 1.41 X_3^2 + 0.9425 X_1 X_2 + 2.44 X_1 X_3 - 1.14 X_2 X_3 \quad (2)$$

Ilghami ve ark. (2015), çalışmalarında farklı uygulamaların DPPH serbest radikal inhibisyon kuvveti üzerine istatistiki olarak önemli ölçüde etkili olduklarını ancak varyans analizi sonuçlarına göre uyum eksikliğinin önemsiz olduğunu bildirmişlerdir.

Altemimi ve ark. (2016), balkabağı ve şeftali örneklerine uyguladıkları ultrasound frekansları (37. 80 kHz) arasında toplam fenolik madde miktarı ve DPPH aktivitesi açısından istatistiki olarak önemli ölçüde farklılık olduğunu bildirmişlerdir. Analiz sonuçları 37 kHz ultrasound uygulamasının yüksek frekans uygulamasına nazaran daha yüksek toplam fenolik madde miktarı ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu belirlemiştir. Bunun yüksek frekans uygulaması sırasında numunelerde kabarcıkların çökmesine neden olabileceğini ve sonuç olarak yüksek frekansın kaviteasyon baloncuklarının tüm hedef bileşikleri elde edebilmek için yeterli zamana olanak vermemesi şeklinde olduğunu izah etmişlerdir.

Bakht ve ark. (2018), reaksiyon ortamına doğrudan prob daldırılarak 26 kHz'lik ultrasonik frekans uygulamasının örneklere güç uygulamasındaki %5-10'luk değişikliklerle bile fenolik madde ekstraksiyonu ve DPPH sonuçlarını etkileyebileceğini bununla birlikte ultrasonik banyo uygulamasındaki 40 kHz'lik frekans uygulamasının doğrudan örnekle temas olmaması sebebi ile sıcaklık ve güç uygulamalarından etkilenmediğini gözlemişlerdir.

Ghafoor ve ark. (2009), üzüm çekirdeği ekstraktlarında en yüksek antioksidan aktiviteyi % 60 etanol konsantrasyonu, 60 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 30 dk ekstraksiyon süresi ile elde etmişlerdir. Araştırmacılar antioksidan aktivite artışının üzerine ekstraksiyon süresinin etkisinin çözgen ile katı partiküllerin temas süresinin bir sonucu olarak fenolik madde difüzyonunu artıracaklarını bildirmişlerdir.

ABTS süpürme aktivitesinin varyans analizi sonuçları ile elde edilen matematiksel model Eşitlik 3'te verilmiştir.

$$ABTS = 295.21 + 705 X_1 + 4.98 X_2 + 86.09 X_3 \quad (3)$$

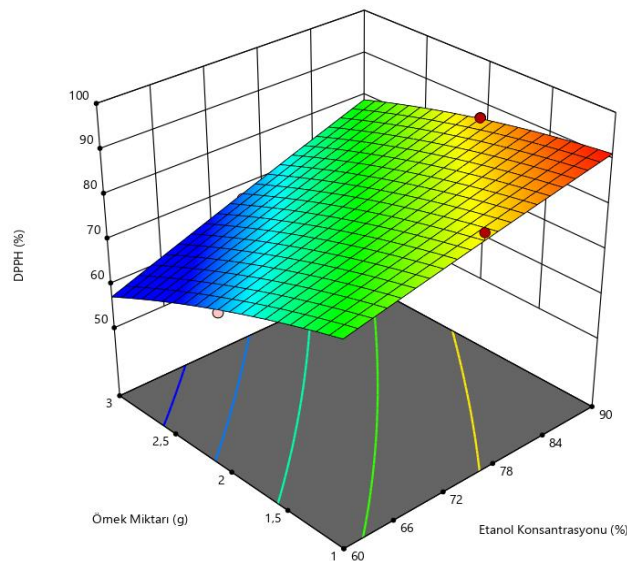
Çizelge 5. Elma ekstraktlarının ABTS analizleri linear model için varyans analizi sonuçları

Varyans	SS*	df*	MS*	F-değeri	p-değeri
Model	59894.76	3	19964.92	19.71	< 0.0001
X ₁ -Etanol	397.92	1	397.92	0.3928	0.5436
X ₂ -Ultrasound Süresi	198.05	1	198.05	0.1955	0.6670
X ₃ -Örnek Miktarı	59298.79	1	59298.79	58.53	< 0.0001
Artık	11144.31	11	1013.12		
Uyum Eksikliği	10404.98	9	1156.11	3.13	0.2657
Hata	739.33	2	369.67		
Toplam	71039.07	14			

R²=0.8431, Adj R²=0.8003, Pre.R²=0.6861

*SS: Kareler toplamı, *df: Serbestlik derecesi, *MS: Ortalamanın karesi

Çizelge 5 incelendiğinde modelin ve örnek miktarının istatistiki olarak çok önemli olduğu belirlenmiştir (p<0.01). ABTS süpürme aktivitesinin ANOVA sonuçları ile elde edilen matematiksel model denklem 3'te verilmiştir. Çizelge 5'te verilen elmaların ABTS radikal süpürme aktiviteleri için varyans analizi sonuçları incelendiğinde modelin p-değerinin 0.05'ten küçüktür bu da modelin oldukça önemli olduğunu göstermektedir. Uyum eksikliğinin p değerinin (p>0.05) anlamlı olmadığı belirlenmiştir ki uygunluk modelinin verilerini yorumlamak için iyi olduğunu göstermektedir. Çizelge 5'te gösterildiği gibi, belirleme R² ile öngörülen R² arasındaki fark 0.2'den küçüktür. Bu durum modelin deneysel veriler için makul bir uyum içinde olduğunu gösterir.



Şekil 1. Elma ekstraktlarının DPPH süpürme aktiviteleri üzerine örnek miktarı ve etanol konsantrasyonunun etkisi

Şekil 1'e göre en yüksek örnek miktarı ve en düşük etanol konsantrasyonu uygulamasında en düşük DPPH sonuçları elde edilmişken en düşük örnek miktarı ve en yüksek etanol konsantrasyonunda

en yüksek DPPH sonuçları elde edilmiştir. Yüksek frekans uygulamalarında kavitasyon oluşumu için daha geniş genlik ve yoğunluklara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Kullanılan farklı çözümler ultrasound uygulanması sırasında farklı kavitasyon özellikleri sergilemektedirler. Aynı şekilde ortamda bulunan parçacık miktarının artışı (örnek miktarının artması) ve çözücünün içerisindeki farklı bir sıvının (su) oranının (% 10'dan % 40'a) yüksek olması kavitasyon oluşumunu geciktirmiş olabilir bu sebeple DPPH sonuçlarının düşük çıkması söz konusu olabilir (Bakht ve ark. 2018).

Araştırmamızda sonikasyon uygulamasında ultrasonik su banyosu kullanımı ve çözümler ile katı partiküllerin temas süresinin kısa tutulması sebebiyle ultrasound uygulama süresinin DPPH ve ABTS sonuçları üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmamıştır.

Liu ve ark. (2018), *Phyllanthus urinaria* bitkisinden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu üzerine yanıt yüzey yöntemi kullanarak etanol konsantrasyonu, ultrasound uygulama süresi ve katı:sıvı oranının etkisini araştırdıkları çalışmada optimum koşulların 500W ve 53 kHz frekansta ultrasound süresinin 34 dk, etanol konsantrasyonunun %47 ve katı sıvı oranının 1:63 g/ml olduğunu bildirmişlerdir.

SONUÇ

Araştırmanın sonuçlarına göre ultrasonik su banyosu içerisinde farklı sürelerle sonikasyon uygulamasının elmaların toplam fenolik madde miktarına dolayısıyla da antioksidan aktivite göstergesi olan DPPH ve ABTS radikal süpürme aktiviteleri üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Literatürde daha düşük frekanslarda ultrasound uygulamasının ve su banyosu yerine farklı sonikatörler kullanılmasının ekstraksiyon verimini arttırdığı bildirilmiştir (Bakht ve ark., 2018). Bu sebeple yapılacak çalışmalarda daha düşük frekanslarda sonikasyon uygulanması ekstraksiyon verimini ve antioksidan aktivitelerini önemli ölçüde arttıracaktır. İstatistiksel analizlerin sonucuna göre optimum ekstraksiyon koşulları ise %76.153 etanol konsantrasyonu, 12.452 dk ultrasound uygulaması ve 2.844 g örnek miktarı şeklinde tespit edilmiştir. Her ne kadar ultrasound destekli ekstraksiyon uygulamalarına araştırmacıların ilgileri oldukça fazla olsa da farklı gıdalarda ve farklı frekans ile güçlerde ultrasound uygulamasının sonuçları ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Altemimi A, Watson DG, Choudhary R, Dasari MR, 2016. Ultrasound Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Peaches and Pumpkins, PLoS ONE, 11 (2): 1–20.
- Bakht A, Geesi MH, Riadi Y, Imran M, Ali I, 2018. Ultrasound-assisted extraction of some branded tea : Optimization based on polyphenol content , antioxidant potential and thermodynamic study. Saudi Journal of Biological Sciences, 26 (5): 1043–1052.
- Bas D, Boyacı İH, 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering, 78: 836–845.
- Chemat F, Rombaut N, Sicaire A, Meullemiestre A, Abert-vian M, 2017. Ultrasound assisted extraction of food and natural products . Mechanisms , techniques , combinations , protocols and applications . A review. Ultrasonics - Sonochemistry, 34: 540–560.
- Choi S-H, Kozukue N, Kim H-J, Friedman M, 2016. Analysis of protein amino acids, non-protein amino acids and metabolites, dietary protein, glucose, fructose, sucrose, phenolic, and flavonoid content and antioxidative properties of potato tubers, peels, and cortexes (pulps). Journal of Food Composition and Analysis, 50: 77-87.
- Ekici E, Uzun G, Kıvık T, 2014. Evaluation of The Effects of Cutting Parameters on The Surface Roughness During The Turning Of Hadfield Steel With Response Surface Methodology. Uludağ Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi, 19 (2): 19–28.

- Ghafoor K, Choi YH, Jeon JY, Jo IH, 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (11): 4988–4994.
- Ghitescu R-E, Volf I, Carausu C, Bühlmann A-M, Gilca IA, Popa VI, 2015. Optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenols from spruce wood bark. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22: 535–541.
- González-centeno MR, Knoerzer K, Sabarez H, Simal S, Rosselló C, Femenia A, 2014. Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*Vitis vinifera* L.) – A response surface approach, *Ultrasonics Sonochemistry*, 21: 2176–2184.
- Ilghami A, Ghanbarzadeh S, Hamishehkar H, 2015. Optimization of the Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Ferric Reducing Activity and Antioxidant Activity of the *Beta vulgaris* Using Response Surface Methodology, *Pharmaceutical Sciences*, 21: 46–50.
- Jakobek L, Boc M, Barron AR, 2015. Optimization of Ultrasonic-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Apples, *Food Analytical Methods*, 8: 2612–2625.
- Kaur C, Kapoor HC, 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 153–161.
- Liu Y, She X, Huang J, Liu M, Zhan M, 2018. Ultrasonic-extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus urinaria*: optimization model and antioxidant activity, *Food Science and Technology* 38(Suppl. 1): 286–293.
- Mason TJ, Lorimer JP, 2002. General Principles. In *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing* (pp. 25–74). Germany: Wiley-VCH Verlag.
- Medina-Torres N, Ayora-Talavera T, Espinosa-Andrews H, 2017. Ultrasound Assisted Extraction for the Recovery of Phenolic Compounds from Vegetable Sources. *Agronomy*, 7 (3): 47.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C, 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9): 1231–1237.
- Taşcı F, 2017. Elma Ürün Raporu. T.C. Gıda, Tarım Ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Ankara.
- Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S, 2005. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4989–4995.
- Wojdyło A, Oszmiański J, Laskowski P, 2008. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15): 6520–6530.