T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VİŞNE (*Prunus cerasus* L.) POSASINDAN FENOLİK MADDE EKSTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

Fatih Mehmet YILMAZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA
2012

Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN danışmanlığında, Fatih Mehmet YILMAZ'ın hazırladığı "**Vişne (*Prunus cerasus* L.) Posasından Fenolik Madde Ekstraksiyonunun Optimizasyonu** " konulu bu çalışma 10/07/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN

Üye : Yrd. Doç. Dr. A. Coşkun DALGIÇ

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım

Prof. Dr. Mehmet CİCİ
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 1180

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ iii
ABSTRACT iv
TEŞEKKÜR v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ vii
SİMGELER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 3
2.1. Vişne ve Vişne Üretimi 3
2.2. Ekstraksiyon 4
2.2.1. Etanol Çözücüsü 4
2.2.2. Fitokimyasal Ekstraksiyonu 4
2.3. Fenolik Maddeler 6
2.4. Antosiyaninler 7
2.4.1. Antosiyanin Biyosentezi 8
2.4.2. Antosiyaninlerin Parçalanması 9
2.4.2.1 pH etkisi 10
2.4.2.2. Termal bozulma 11
2.5. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) 13
3. MATERYAL ve YÖNTEM 14
3.1. Materyal 14
3.1.1. Vişne Posası 14
3.1.2. Kimyasal Maddeler 14
3.2.Yöntem 14
3.2.1. Ekstraksiyon İşlemi 14
3.2.2. Deney Tasarımı 15
3.2.3. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) 19
3.3. Analizler 20
3.3.1.Meyve Suyuna İşlenen Vişnede ve Posada Yapılan Analizler 20
3.3.2.Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini 20
3.3.3. Doğal Vişne Spektral Eğrisinin Belirlenmesi 20
3.3.4. Toplam Antosiyanin Miktarı (TA) Tayini 21
3.3.5. Antioksidan Kapasitesi (% DPPH) Analizi 21
3.3.6. Fenolik Bileşenlerin HPLC ile Belirlenmesi 22
3.3.6.1. Örnek hazırlama 22

3.3.6.2. Kromatografi koşulları ve tanımlama 22
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 25
4.1. Posası Alınan Meyveye ve Posaya Uygulanan Analizler 25
4.2. Çözücü Konsantrasyonu – Oranı ve Ekstraksiyon Sıcaklığının Optimizasyonu 26
4.3. Sürenin Etkisi 34
4.4. Çözücü Miktarının Etkisi 39
4.5. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Belirlenmesi 40
4.5.1. Renksiz Fenolik Bileşenlerin Tespiti 40
4.5.2. Antosiyaninlerin Tespiti 41
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 45
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 52
EKLER 53
ÖZET 72
SUMMARY 73

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

VİŞNE (*Prunus cerasus* L.) POSASINDAN FENOLİK MADDE EKTRAKSİYONUNUN OPTİMİZASYONU

Fatih Mehmet YILMAZ

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN

Yıl: 2012, Sayfa: 73

Bu çalışma kapsamında meyve suyu atığı olan vişne posasından fenolik madde ekstraksiyonunun optimizasyonu çalışması yapılmış; ekstraksiyon sıcaklığının, çözücü konsantrasyonunun ve çözücü oranının toplam fenolik madde miktarına, toplam antosiyanın miktarına ve antioksidan kapasitesine etkileri incelenmiştir. Zamana bağlı olarak fenolik madde geçişi incelenerek bir kinetik çalışma yapılmıştır. En optimum ekstraksiyon koşulları % 48 EtOH konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık, 11 (ml/g) çözücü oranı ve toplam fenolik madde için 60 – 100 dakika; toplam antosiyanin miktarı için 40 – 60 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Elde edilen ekstraktların absorbans değerleri ile çözücüye geçen fenolik madde miktarı arasında doğrusal bir ilişki olduğu sonucuna da varılmıştır. Ayrıca posada kalan fenolik maddelerin HPLC'de tanımlaması yapılmıştır. Vişne posasında neoklorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kateşin renksiz fenolik bileşenler; malvidin-3,5-diglikozit, siyanidin-3,5-di-O-glikozit, siyanidin-3-O-glikozit klorür ve siyanidin-3-O-rutinozit klorür antosiyaninler olarak tespit edilmiştir. HPLC analizi sonuçlarıyla toplam fenolik madde ve toplam antosiyanin miktarı analizleri sonuçları arasında paralellik olduğu sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgulara göre vişne posası atığının gıda katkı maddesi olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Vişne Posası, Fenolik Madde, Antosiyanin, Ekstraksiyon, Yanıt Yüzey Yöntemi, HPLC

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

OPTIMIZATION OF PHENOLIC COMPOUND EXTRACTION FROM SOUR CHERRY POMACE (*Prunus cerasus* L.)

Fatih Mehmet YILMAZ

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Food Engineering Department

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hasan VARDİN

Year: 2012, Page: 73

In the context of this study, extraction optimization of phenolic compounds from sour cherry pomace, a fruit juice byproduct, was carried out. The effects of temperature, solvent concentration and solvent to solid ratio on total phenolic compounds, total anthocyanin content and antioxidant activity were investigated. A kinetic study was done by observing phenolic compound transition through solvent depending on time. The most optimum extraction conditions were determined as 48 % EtOH concentration, 75 °C, 11 (v/m) solvent ratio and 60 – 100 minute and 40 – 60 minute extraction periods for total phenolic compounds and total anthocyanin contents respectively. A linear relationship was found between absorbance values and phenolic compunds in extracts. Furthermore, phenolic compounds in sour cherry pomace were identified. Neochlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, catechin were colorless phenolic compounds; malvidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3,5-di-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside chloride and cyanidin-3-O-rutinoside chloride were anthocyanins detected in sour cherry pomace. Correlation among HPLC analyses results and total phenolic compound & total anthocyanin content analyses results was found. According to the results, it is concluded that sour cherry pomace is a candidate as a source of food value compounds.

KEY WORDS: Sour Cherry Pomace, Phenolic Compound, Anthocyanin, Extraction, Response Surface Methodology, HPLC

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden araştırmanın yürütülmesinden değerlendirilmesine kadar bana her konuda yardımcı olan danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Hasan VARDİN ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN'a; tez jürisinde bulunan değerli hocam A. Coşkun DALGIÇ'a; bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZKAN'a ve Gıda Mühendisi Betül ERKAN KOÇ'a; HPLC analizlerinin yapımında gayretle çalışan ve tecrübelerini paylaşan Uzman Biyolog Çiğdem GÖVER'e; HPLC analizi için bazı standart maddeleri bizlere ulaştıran Çukurova Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Asiye AKYILDIZ'a ve Arş. Gör. Erdal AĞÇAM'a; vişne posası elde etmemize yardımcı olan ve sektörle ilgili bilgileri paylaşan Gıda Mühendisi Serkan KARA'ya; laboratuvar aşamalarında fedakârca yardımlarını gördüğüm Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğrencilerine ve hayatım boyunca bana destek olan aileme teşekkürü borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Bitkilerde antosiyanin ve proantosiyanidin biyosentezinin izyolu 9

Şekil 2.2. Farklı pH derecelerinde antosiyaninlerin durumları..... 11

Şekil 2.3. Doğada yaygın olarak bulunan iki antosiyaninin olası bozulma mekanizması 12

Şekil 3.1. Vişne posası üretimi, ekstraksiyon ve analiz aşamaları 17

Şekil 3.2. Posa eldesi ve ekstraksiyon işlemlerinden görseller..... 18

Şekil 3.3. HPLC analizi için numune hazırlama aşamasından görseller..... 24

Şekil 4.1. Vişne posası ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarı (g GAE/kg posa) için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri 31

Şekil 4.2. Vişne posası ekstraksiyonunda toplam antosiyanin miktarı (mg siy 3-rut/kg posa) için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri..... 32

Şekil 4.3. Vişne posası ekstraksiyonunda % DPPH için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri 33

Şekil 4.4. Optimizasyon için genel görünüm grafiği..... 34

Şekil 4.5. Antosiyanin miktarının 3 farklı sıcaklıkta zamana bağlı değişimi 35

Şekil 4.6. Toplam fenolik madde miktarının 3 farklı sıcaklıkta zamana bağlı değişimi..... 35

Şekil 4.7. 25 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi 36

Şekil 4.8. 50 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi 36

Şekil 4.9. 75 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi 37

Şekil 4.10. 25 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi..... 37

Şekil 4.11. 50 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi 38

Şekil 4.12. 75 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi..... 38

Şekil 4.13. Toplam fenolik madde miktarının (db) çözücü miktarına göre değişimi..... 39

Şekil 4.14. Toplam antosiyanin miktarının (db) çözücü miktarına göre değişimi 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Antosiyaninlerin temel yapıları ve asitlendirilmiş metanol içerisinde maksimum absorbans değerleri 7

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenler ve onların kod değerleri 16

Çizelge 3.2. Mobil faz gradiyenti 23

Çizelge 4.1. Posanın kuru madde ve kül değerleri 25

Çizelge 4.2. Posası alınan meyveye ait bazı analiz sonuçları … 25

Çizelge 4.3. RSM deney planı ve sonuçlar 27

Çizelge 4.4. TFM, TA ve % DPPH için istatistiksel sonuçlar 28

Çizelge 4.5. TFM, TA ve % DPPH sonuçları için ayrı ayrı ve bütün olarak değerlendirildiğinde optimum ekstraksiyon koşulları 30

Çizelge 4.6. Renksiz fenolik Bileşenler için ekstraksiyon koşulları ve tespit edilen maddelerin miktarları 43

Çizelge 4.7. Antosiyaninler için ekstraksiyon koşulları ve tespit edilen maddelerin miktarları . 44

SİMGELER DİZİNİ

A	Absorbans
Adj R^2	Düzeltilmiş Determinasyon Katsayısı
AK	Antioksidan Kapasitesi
AU	Pik Alanı
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOH	Etil Alkol
FAO	Food and Agriculture Organization (Gıda ve Tarım Organizasyonu)
GAE	Gallik Asit Eşdeğer
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
MetOH	Metil Alkol
ORAC	Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi
PDA	Photo Diode Array (Foto Diyot Dizilim)
Pred R^2	Tahmin Edilen Determinasyon Katsayısı
R^2	Determinasyon Katsayısı
SÇKM	Suda Çözünür Kuru Madde
TA	Toplam Antosiyanin
TFM	Toplam Fenolik Madde
dak	Dakika
db	Kuru Ağırlık Üzerinden (Dry Basis)
nm	Nanometre
ppm	Milyonda Bir ($mg.L^{-1}$)
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
rut	Rutinozit
siy	Siyanidin
v	Hacim
a^*	Kolorimetrede Kırmızı-Yeşil Eksen
°C	Santigrat Derece
Λ	Dalga Boyu
µ	Mikro

1. GİRİŞ

Eğitim seviyesinin artmasıyla beraber tüketiciler tercihlerini doğal ve sağlıklı gıdalardan yana kullanmaya başlamışlardır. Tüketicilerin doğal gıda katkı maddeleri veya bunlardan üretilmiş ürünler tercih etmesinden dolayı fenolik maddelerin alt grubunda yer alan antosiyaninler sentetik gıda boyalarının yerini almaktadır (Fan ve ark., 2008). Gıda endüstrisi atıklarından antioksidan özellikli ürünlerin özütlenmesi, atıkların değerlendirilmesi düşük maliyetli olması ve sentetik antioksidanların yerini alacağından çok önemli görülmektedir. Atık ürünlerden elde edilen antosiyaninlerin toksik özellik göstermemesi ve antimutajenik olmalarının haricinde sağlığa olan olası pozitif etkileri de bulunmaktadır (Bridle ve Timberlake, 1996). Bu da antosiyaninlere olan ilginin artmasına, ayrıca gıda atık ürünlerinin değerlendirilmesi için fırsata yol açacaktır.

Fenolik maddeler bitki türlerine göre yapıları ve fizikokimyasal özellikleri değişiklik gösterdiklerinden farklı polarite özelliklerine sahiptirler (Luthria, 2008). Ayrıca fenolik maddelerin yine gıdalardaki diğer bileşenlerle (karbonhidratlar, asitler, alkil gruplar) etkileşimi de farklılık gösterebilmektedir (Mitic ve ark., 2010;). Fenolik maddelerin gıdalardan ekstraksiyonunda gıdanın yapısal özelliklerine göre farklı parametreler etkili olmakta; dolayısıyla evrensel bir ekstraksiyon metodu bulunmamaktadır. Bu yüzden farklı gıdalardan fenolik maddelerin ekstraksiyonu için optimizasyon koşullarının belirlenmesi önem arz etmektedir (Silva ve ark., 2007). Literatürde farklı gıda maddeleri için en yüksek fenolik madde ekstraksiyon veriminin alındığı çok sayıda optimizasyon çalışmaları mevcuttur; maydonoz tozu (Luthria, 2008), yer fıstığı kabuğu (Ballard ve ark., 2009), üzüm posası (Monrad ve ark., 2010; Spigno ve ark., 2007; Pinelo ve ark., 2005), kudingcha (Sun ve ark., 2011), siyah kuş üzümünün kullanıldığı (Cacace ve Mazza, 2003a; Cacace ve Mazza, 2003b) araştırmalar bu çalışmalardan bazılarıdır.

Ülkemizin vişne üretiminde dünyada ilk sıralarda yer aldığı bilinmekte ve yıllık üretilen vişnenin büyük bir miktarı vişne suyuna işlenmektedir. Vişne antosiyaninleri genel olarak meyvenin kabuk kısmında toplanmıştır (Kim ve ark., 2005). Meyve suyu üretiminde presleme işlemi ile kabukta bulunan

antosiyaninlerin belirli miktarı meyve suyuna geçse de; yüksek basıncın etkisiyle kabukta bulunan bu maddeler belirli zararlar görseler de vişne suyu üretiminde önemli oranda posa kalması ve posadaki biyoaktif maddelerin öneminin günümüzde artması nedeni ile posanın değerlendirilmesi büyük önem arz etmektedir. 2010 yılında 73 500 ton vişnenin meyve suyuna işlendiği ve % 10'a yakın kabuğun posa olarak ayrıldığı düşünülürse yıllık 610 kg'ı antosiyanin olmak üzere 22 500 kg fenolik madde değerlendirilmeden atılmakta ya da hayvan yemi olarak besicilere verilmektedir.

Bu çalışmada vişne suyu üretiminde atık olarak ayrılan vişne posasından fenolik maddelerin eldesi için uygun ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda öncelikle vişne posası, EtOH çözücüsünün farklı konsantrasyonları ve miktarıyla birlikte farklı sıcaklıklarda işleme tabi tutularak en yüksek fenolik madde miktarının elde edildiği şartların belirlenmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon çalışması sonuçlarının değerlendirilmesinde günümüzde en fazla kullanılan programlardan olan Design Expert'ten yararlanılmıştır. Optimum koşulların (EtOH çözücüsünün konsantrasyonu, miktarı, ekstraksiyon sıcaklığı) belirlenmesinin ardından ikinci adımda, zamana bağlı olarak çözücüye fenolik madde geçişi izlenmiş ve kinetik çalışma yapılmıştır. Son adım olarak da posada bulunan fenolik maddelerin ve antosiyaninlerin tespiti HPLC metodu kullanılarak yapılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Vişne ve Vişne Üretimi

Türkiye, son yıllardaki istatistiklere göre dünya vişne üretiminde birinci sırada yer almakta ve dünya vişne üretiminin yaklaşık % 16'sını karşılamaktadır (FAO, 2012).

Ülkemizde en yaygın olarak yetiştirilen iki vişne çeşiti Kütahya ve Montmorency'dir. Bunlardan Kütahya çeşidi geçci, yuvarlak meyveli, çok iri (ort. 6.79 g), koyu morumsu-şarabi renkte, çok sert, bol sulu, az lifli ve yükek kalitelidir (Anonim, 2011).

Vişne sağlığa olumlu etki eden fenolik bileşenlerce zengin bir meyvedir. Önemli miktarda güçlü antioksidan aktivite ve antiinflamatuvar özelliği gösteren antosiyanin içermektedir. Vişnenin gıda endüstrisinde kullanımı son yüzyılda artış göstermiştir (Khoo ve ark., 2011). Vişnenin en önemli renk maddesi olan siyanidin-3-O-glikozitin akciğer kanser hücresinin (NCI-H460) gelişimini önemli düzeyde engellediği ortaya konmuştur (Reddy ve ark., 2005).

Türkiye'de vişne üretimi her geçen yıl artmaktadır. 2005 yılında 140 000 ton vişne meyvesi üretilmiş; 2010 yılında ise bu rakam 195 000 tona yükselmiştir ve vişne Türkiye'de meyve suyuna en çok işlenen meyvelerden biridir. Ülkemizde meyve suyuna işlenen 6 ana meyve elma, şeftali, kayısı, vişne, portakal ve nardır. Elma bu meyveler arasında en çok işlenen meyve olarak başı çekmektedir (tüm meyve çeşitleri arasında % 46 oran ile). Türkiye'de meyve suyu sanayisinin gelişmesiyle birlikte son beş yılda meyve suyuna işlenen vişne miktarı % 45'e yakın artış göstermiştir. 2010 yılında 73 500 ton vişne meyve suyuna işlenmiş; 16 800 ton vişne konsantresi üretilmiştir. Vişne suyu konsantresi elma suyu konsantresinin ardından Türkiye'de en çok üretilen meyve suyu konsantresidir (% 61 elma suyu konsantresi; % 17 vişne suyu konsantresi) (Akdağ, 2011). Vişne suyu üretiminde presleme işleminin ardından posa (% 9 - 10), üretim hattından çekirdek (% 12 - 13) ve sapla (% 3 - 4) birlikte ayrılmaktadır. Ayrılan bu kısımlar fabrikalarca değerlendirilmemekte; ya atılmakta ya da hayvan yemi olarak besicilere

verilmektedir (Kişisel görüşme yapılmıştır, Limkon Gıda San. Üretim Müh. Serkan KARA).

2.2. Ekstraksiyon

Sıvı – katı ekstraksiyonu bir matriks içinde bulunan katı maddelerin matriksle temas ettirilen çözücüye geçmesi olayı olarak tanımlanabilir (Corrales ve ark., 2008).

Çözücü ekstraksiyonu doğal antioksidanların elde edilmesinde kullanılan en yaygın yöntemdir (Bazykina ve ark., 2002). Ayrıca çözücü ekstraksiyon metodu fitokimyasal ekstraksiyonunda en yüksek verim sağlayan metoddur (Tsao ve Deng, 2004).

2.2.1. Etanol Çözücüsü

Etanol her ne kadar ekstraksiyon işleminde metanol, aseton gibi çözücülere kıyasla daha az verimli ve yüksek kaynama noktasından dolayı uzaklaştırılması güç olsa da diğer çözücülere kıyasla en az zararlı ve en az toksik özellik göstermesi nedeniyle gıda sistemlerinde sıklıkla tercih edilen çözücüdür (Abou-Arab, 2011; Gould ve ark., 2009; Nakamiya ve ark., 2003). Etanol gıdalarda kullanılabilir (Pompeu ve ark., 2009), insan tüketimi açısından güvenilir bir çözücüdür (Dai ve Mumper, 2010). Etanol fermentasyon yoluyla üretildiği için doğal olarak da nitelendirilebilen bir çözücüdür (Dias ve ark., 2003).

2.2.2. Fitokimyasal Ekstraksiyonu

En yüksek ekstraksiyon verimini yakalamak için bitki materyalinin türünü ve biyoaktif bileşenlerini göz önünde bulundurmak gerekir. Lipofilik veya hidrofilik özellik fitokimyasal çözünürlüğünü etkilemektedir. Çözücünün polaritesi de ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Lignanlar veya prosiyanidinler gibi bazı bileşikler bağlı veya polimerize durumdadırlar; bu yüzden ekstraksiyon öncesinde hidroliz aşaması gerekebilmektedir. Ekstraksiyon işlemi ekstrakte edilecek fenoliklerin çeşitlerine göre veya ekstraksiyon işleminin nitel/nicel olması durumuna göre belirlenmektedir. Fenolik asitler ve glikozitler gibi polar antioksidanlar genellikle su, alkol veya su – alkol karışımları ile ekstrakte edilmektedirler. Bazı flavonoidlerin aglikonları ve birçok karotenoidler ise susuz solventler ile ekstrakte

edilmektedirler. Çözücünün yüksek oranda su içermesi fenolik maddelerin glikozitlerinin ekstraksiyonuna yardımcı olur (Tsao ve Deng, 2004).

Luthria (2008) basınçlı sıvı ekstraktör kullanarak maydanoz tozunun ekstraksiyonuna tane büyüklüğünün, sıcaklığın, çözücü miktarının ve basıncın etkisini incelemiş; sonuç olarak da tane büyüklüğünün ekstraksiyon veriminde en önemli faktör olduğunu bildirmiştir. Birçok çalışmada tane büyüklüğünün etkisinin incelenmediği vurgusu da yapılmıştır. Sıcaklık artışının toplam fenolik madde içeriğinde çok önemli değişime neden olmadığını; ancak bireysel olarak fenolikler incelendiğinde apiin ve asetil-apiin maddelerinin sıcaklık artışıyla miktarlarında artış olduğu; malonil-apiin miktarında ise düşüş olduğunu göstermiştir.

Monrad ve ark. (2010), üzüm posasının ekstraksiyonunda etanolun çevreye olan etkisinin ve maliyetlerin göz önünde bulundurulduğunda üzüm posasının antosiyaninlerinin ekstraksiyonu için % 50 etanol konsantrasyonu, 80 - 120 °C sıcaklıkta işlem yapmanın uygun olacağı sonucuna varmışlardır.

Fenolik maddelerin ekstraksiyonunda kullanılan çeşitli çözücüler aynı üründe yapılan analizlerde farklı etkiler gösterebilmektedir. Ballard ve ark. (2009), yer fıstığı kabuğunda bulunan fenoliklerin ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında üç farklı çözücünün (etanol, metanol, su), konsantrasyonun (0, 30, 60, 90 %), sıcaklığın (30, 45, 60 °C) ve zamanın (10, 20, 30 dak) toplam fenolik madde ve ORAC değerine etkisini incelemişler; ve EtOH ekstraktlarının en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğunu bunu sırasıyla MetOH ve suyun izlediğini göstermişler; ORAC değeri için de en iyi sonucun MetOH ekstraktlarına ait olduğunu, bunu sırasıyla EtOH ve su ekstraktlarının izlediğini göstermişlerdir. Toplam fenolik maddenin maksimum olduğu optimizasyon koşulunun % 30.8 EtOH çözücüsüyle 30.9 °C sıcaklık derecesi ve 12 dakika ekstraksiyon süresi olduğunu göstermişlerdir.

Ekstraksiyon aşamasında belirli miktarda asit kullanımı ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Düşük konsantrasyonda HCl kullanımı gıdanın hücre duvarını parçalayarak fenolik maddelerin ekstraksiyonu için gerekli ortamı hazırlamada yardımcı olur. HCl miktarının fazla kullanıldığı durumlarda ise kompleks yapıdaki pigmentlerin doğal formu değişebilmektedir. Açillenmiş pigmentlerin bozulmasını

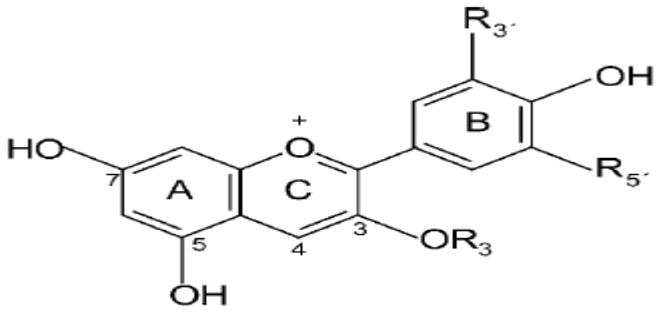
indirgemek için düşük konsantrasyonlarda asit kullanımı önerilmiştir (Ersus, 2004). Pompeu ve ark. (2009) *Euterpe oleracea* meyvelerinin fenolik madde ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında etanol konsantrasyonu ve sıcaklık faktörleriyle birlikte HCl konsantrasyonunun fenolik madde miktarı, antosiyanin miktarı ve antioksidan kapasitesine etkisini incelemişler; sonuç olarak toplam fenolik madde için 0.006 mol/L, toplam antosiyanin miktarı için 0.0065 mol/L ve antioksidan kapasitesi için de 0.0074 mol/L HCl kullanımının ekstraksiyon için optimum HCl konsantrasyonları olduğunu göstermişlerdir.

2.3. Fenolik Maddeler

Fenolik maddeler bitkilerde yaygın olarak bulunan sekonder (ikincil) metabolitlerdir (Flores ve ark., 2012, Ryan ve ark., 2002) ve doğal kaynaklardan yaklaşık 8000'in üzerinde fenolik madde izole edilmiştir (Luthria 2008). Antioksidan özellik gösteren fenolik bileşenlerin sağlığa olumlu etkileri; kanser ve koroner kalp hastalıklarını önleyici etkileri nedeniyle önemi artmakta; tüketiciler tarafından yoğun ilgi görmekte ve sağlığa kazandırdığı olumlu etkileri nedeniyle fonksiyonel gıdalara olan talebi artırmaktadır (Flores ve ark., 2012; Kahkönen ve ark., 1999). Fenolik maddelerin antioksidan aktiviteleri serbest radikalleri nötürleyen ve absorbe edebilen yükseltgenme indirgenme reaksiyonlarına dayanmaktadır (Zheng ve Wang, 2001). Fenolik maddeler bitkilerde serbest veya bağlı formda bulunurlar. Bağlı formdaki fenolik bileşenler hücre duvarı polimerlerine ester bağı ile bağlı bulunurken, serbest fenolik bileşenler genellikle proantosiyanidin veya flavonoidlerdir (Vichapong ve ark., 2010). Meyve & sebzeler, bitkiler, tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin ekstraktlarının içerdiği fenolik bileşenler özellikle yağların oksidatif parçalanmasını geciktirmesi özelliği nedeniyle gıda endüstrisi tarafından yoğun ilgi görmektedir. Oksidatif parçalanmanın gecikmesiyle gıdaların beslenme değerlerinin arttığı ve dolayısıyla kalite değerlerinde de artış olduğu bilinmektedir (Kahkönen ve ark., 1999). Gıdaların içeriğindeki fenolik maddeler proteinlerle kompleks oluştururlar, bu özelliği sayesinde fenolik maddelerce zengin bitki ve ekstraktları deri sanayisinde de kullanılmaktadır (Yıldız ve Baysal, 2003).

2.4. Antosiyaninler

Antosiyaninler bitkilerde çokça bulunan genel adı flavonoid olan fenolik maddelerin bir sınıfına ait maddelerdir (Patras ve ark., 2010). Antosiyaninler çiçeklerde, meyvelerde ve yapraklarda turuncudan maviye renk veren, bitkilere polinatörleri çeken ve bitkileri abiotik ve biotik streslerden koruyan maddelerdir (Nakayama ve ark., 2003). Antosiyaninler glikolize olmuş antosiyanidinlerdir; şekerler antosiyanidinlerin 3-hidroksil pozisyonuna (bazen flavilyum iyonunun 5 veya 7 pozisyonuna) bağlandığında antosiyanin olarak adlandırılmaktadır (McGhie ve Walton, 2007). Bitkilerin yenilebilen kısımlarında bulunan en yaygın bulunan antosiyaninler; siyanidin, pelargonidin, peonidin, delfinidin, petunidin ve malvidin glikozitleridir (Sass-Kiss ve ark., 2005). (Çizelge 2.1.).

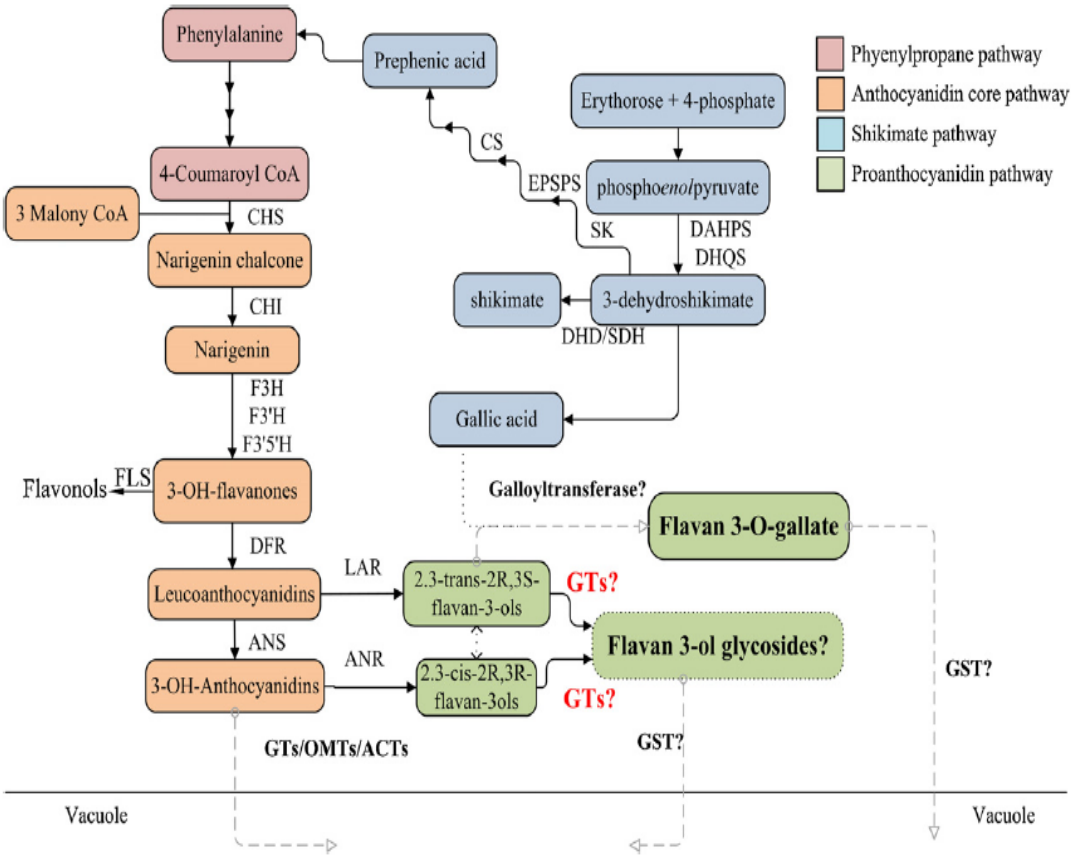


Çizelge 2.1. Antosiyaninlerin temel yapıları ve asitlendirilmiş metanol içerisinde maksimum absorbans değerleri (Stintzing ve Carle, 2004).

Antosiyanin	**R_3**	**$R_{3'}$**	**$R_{5'}$**	**$\lambda_{vis\text{-}maks}$(nm)**
Pelargonidin	H	H	H	520
Siyanidin	H	OH	H	535
Delfinidin	H	OH	OH	546
Peonidin	H	OCH_3	H	532
Petunidin	H	OCH_3	OH	543
Malvidin	H	OCH_3	OCH_3	542
Pelargonidin 3-glikozit	Glc	H	H	516
Siyanidin 3-glikozit	Glc	OH	H	530
Delfinidin 3-glikozit	Glc	OH	OH	543
Peonidin 3-glikozit	Glc	OCH_3	H	536
Petunidin 3-glikozit	Glc	OCH_3	OH	546
Malvidin 3-glikozit	Glc	OCH_3	OCH_3	546

2.4.1. Antosiyanin Biyosentezi

Antosiyanin biyosentezi temel olarak fenilalanin amino asiti ile başlar. Fenilalanin kalkon sentaz ile flavonoid izyoluna yönlendirilir. Dihidroflavonol reduktaz (DFR) tarafından katalizlenen enzimatik reaksiyonlar antosiyanin ve flavonlar için substrat oluşumunu tetikler. Antosiyanidin sentaz (ANS) antosiyanidin pigmentlerinin ve siyanidin türevi proantosiyanidin sentezlenmesinde rol oynar. Ardından UDP-glukoz: flavonoid 3-O-glukoziltransferaz (UGT) veya diğer glukoziltransferazlar (GTs) antosiyaninlerin stabilitesini veya suda çözünürlüğünü artırmak için glikolizasyon adımını katalizlerler; bu da geniş spektrumda renk değişiminin ortaya çıkmasına neden olur. Lökoantosiyanidin reduktaz (LAR) ve antosiyanidin reduktaz (ANR) flavonolların sentezi için iki ayrı izyol sağlamaktadır. Bu işlem MYB, bHLH, WD40 ve diğer proteinleri de içeren farklı transkripsiyon faktörleriyle kontrol edilmektedir. Genellikle MYB, bHLH ve WD40 antosiyanin veya proantosiyanidin biyosentezi için etkili kompleksler oluşturan kofaktörler olarak bilinmektedir (Şekil 2.1.) (Chen ve ark., 2012).



Şekil 2.1. Bitkilerde antosiyanin ve proantosiyanidin biyosentezinin izyolu.

Kısaltmalar: kalkon sentaz (CHS); flavanon 3-hidroksilaz (F3H); flavonoid 3'-hidroksilaz (F3'H); flavonoid 3'5'-hidroksilaz (F3'5'H); dihidroflavonol 4-reduktaz (DFR); antosiyanidin sentaz (ANS); flavonol sentaz (FLS); UDP-glukoz: flavonoid 3-O-glukoziltransferaz (GTs); antosiyanidin reduktaz (ANR); lökoantosiyanidin reduktaz (LAR); glutatyon S-transferaz (GST); O-metiltransferaz (OMTs); açiltransferaz (ACTs); 3-deoksi-d-arabino-heptulosonat 7-fosfat sentaz (DAHPS); 3-dehidrokinat sentaz (DHQS); 3-dehidrokinat dehidrataz/şimat 5-dehidrogenaz (DHD/SDH); şimat kinaz (SK); 5-enolpirvulşimat 3-fosfat sentaz (EPSPS); korizmat sentaz (CS).

2.4.2. Antosiyaninlerin Parçalanması

Meyve sebzelerde bulunan antosiyaninlerin stabilitesi pH, sıcaklık, konsantrasyon, oksijen, ışık, enzimler, askorbik asit, şekerler, metal iyonlarının varlığı ve sülfitler gibi faktörlere bağlı olarak değişse de (Cavalcanti ve ark., 2011; Bakowska-Barczak, 2005), daha çok çözücü, sıcaklık ve özellikle pH'dan etkilenmektedir.

Antosiyaninler değişik etkilerle parçalanmaktadırlar. Sarı renkli fenolik bileşiklerin (flavon, flavonoller) oluşumunun antosiyaninlerle muhtemelen aynı

biyosentetik yolu izlediği ve meyve sebzelerde antosiyaninlerle bir arada bulunduğu bilinmekte; ayrıca bu bileşiklerin antosiyaninlerin parçalanmasına karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir (Ersus, 2004).

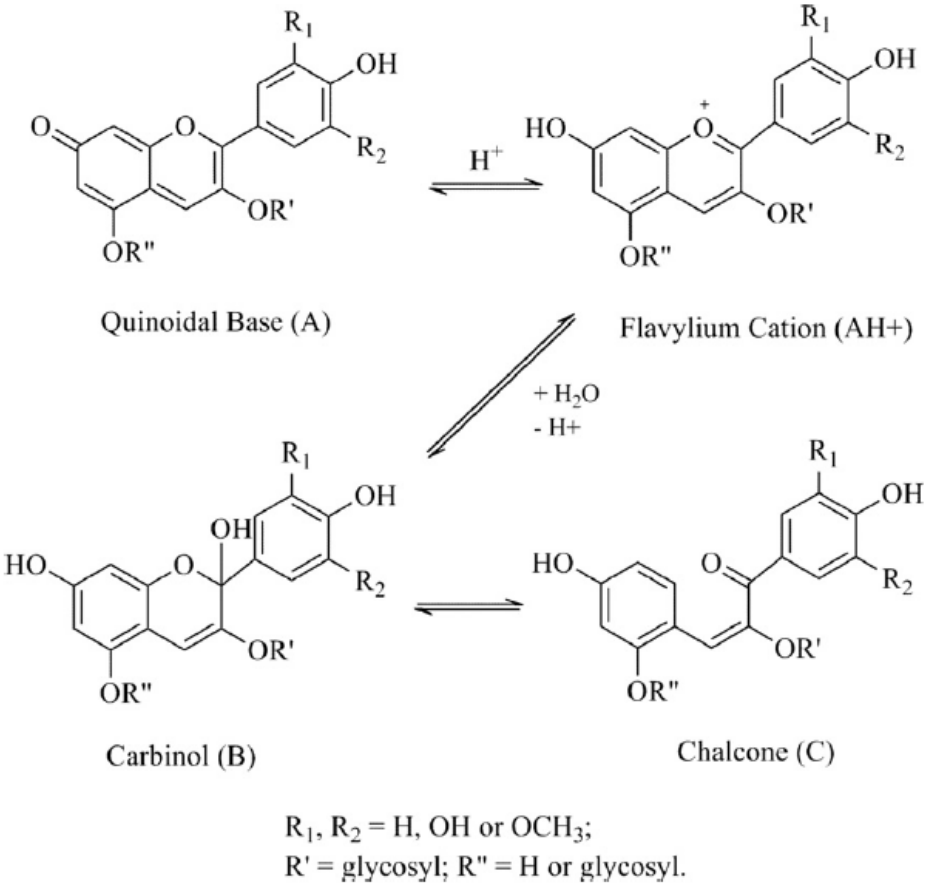
Kırca ve ark. (2007), siyah havuç suyunda sıcaklığın, pH'ın ve kuru madde değerinin antosiyanin stabilitesine etkisini incelemişler ve üç faktörün de siyah havuç antosiyanin miktarını etkilediğini göstermişlerdir. Hem depolama hem de ısıl işlem sırasında kuru madde değeri, pH ve sıcaklık arttıkça antosiyanin parçalanmasının arttığını göstermişlerdir. Sıcaklık ve pH derecelerinin toplam antosiyanin miktarına etkisinin incelendiği başka bir çalışmada, sıcaklık ve pH derecelerindeki artışın siyah pirinçte antosiyanin bozulmasını artırdığı; özellikle 100 °C sıcaklıkta ve pH 5.0'te maksimum kayıpların olduğu gösterilmiştir (Hou ve ark., 2011).

Shao-qian ve ark. (2011), sıcaklığın ve zamanın artışının kan portakalında doğrusal olarak toplam antosiyanin miktarında kayıplara neden olduğunu kinetik olarak göstermişler; ayrıca antosiyanin miktarı ve renk değeri (a^*) arasında ilişkiden dolayı renk değerinin de antosiyanin kaybı hakkında fikir verebileceğini ortaya koymuşlardır.

Harbourne ve ark. (2008), yaptıkları çalışmada 100 °C üzerinde ısıl işlemin de etkisini göstermek amacıyla izotermal ve non-izotermal koşullarda antosiyaninlerin sıcaklığa ve zamana bağlı etkisini incelemişler ve her işlem için aktivasyon enerjisi hesaplamışlardır. UHT yöntemiyle üretilen ürünlerde antosiyanin bozulmasının incelenmesi için izotermal olmayan yöntemin kullanılması gerektiği sonucunu bildirmişlerdir.

2.4.2.1 pH etkisi

Sulu çözeltide pH'ın etkisiyle antosiyaninlerin renk verici özelliğinin bir dengesi gerçekleşmektedir. Çok düşük pH'da denge kırmızı flavilyum katyonun etkisindedir (AH^+). pH arttıkça hidrasyonla AH^+ renksiz karbinole (B) dönüşmekte ve daha ileri pH derecelerinde halka yapının açılmasıyla kalkona (C) dönüşmektedir. A'dan AH^+'a proton transferi çok hızlıdır. Flavilyum katyonu rengi aktive ettiğinden ve ayrışmaya karşı hassasiyeti daha az olduğundan antosiyaninlerin renkleri düşük pH'larda (<3) en stabil haldedir (Şekil 2.2.) (Mazzaracchio ve ark., 2011).

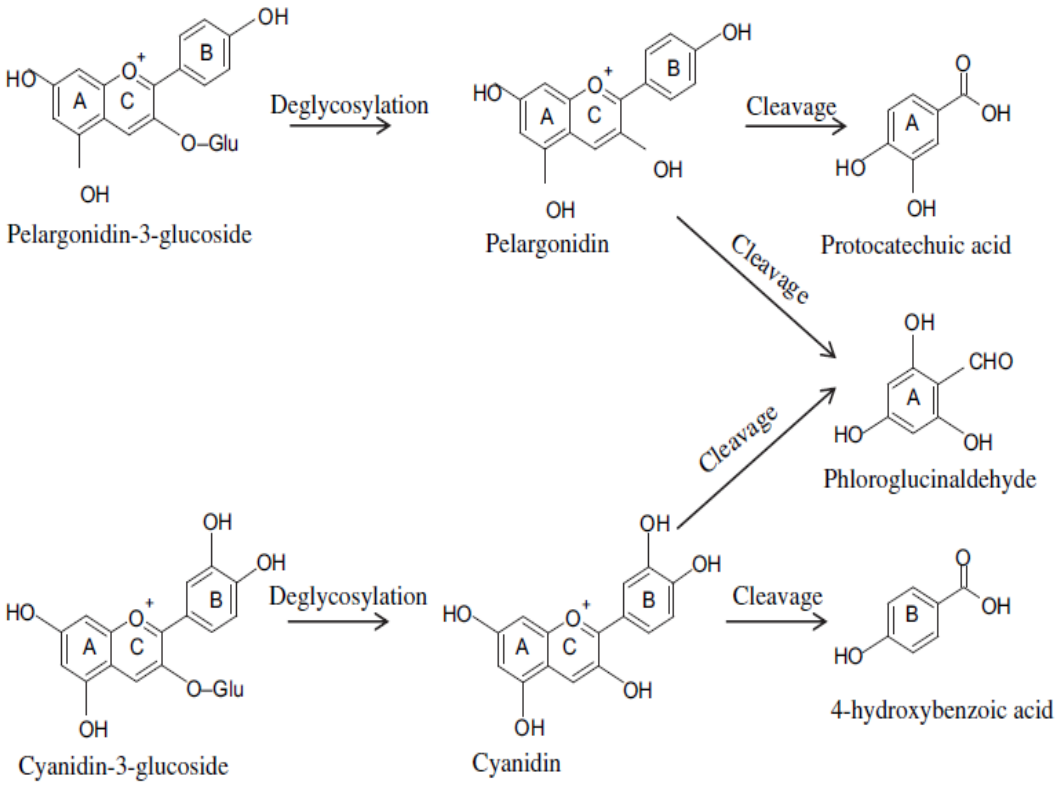


Şekil 2.2. Farklı pH derecelerinde antosiyaninlerin durumları (Mazzaracchio ve ark., 2011).

2.4.2.2. Termal bozulma

Çeşitli türlerdeki antosiyaninlerin termal bozulması ısının şiddetine ve durumuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Bozulma mekanizmasının ne şekilde gerçekleştiğiyle ilgili çok az şey biliniyor; ancak kimyasal yapı ve organik asitlerin varlığı güçlü bir kanıt olarak gösterilmektedir. Proses ve depolama esnasında sıcaklığın artmasıyla pirilyum halkasının açılması ve kalkon oluşması bozulmanın ilk adımı olarak yorumlanmaktadır. Diğer bir yorum ise halkalı eklenti oluşumuna bağlı olarak şeker kısmının hidrolizi ve aglikon oluşumu bozulmanın ilk adımı, devamında ise ısının daha da artmasıyla antosiyanin kalkon yapısına dönüşür, sonrasında B

halkasının kaybıyla kumarin glukozit türevine dönüşür. Şekil 2.3. antosiyaninlerin bozulma mekanizmasını ve ara ürünlerin oluşumunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Doğada yaygın olarak bulunan iki antosiyaninin olası bozulma mekanizması (Patras ve ark., 2010).

2.5. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM)

Ekstraksiyon parametrelerinin etkisinin değerlendirilmesi birden fazla faktörün yer aldığı durumlarda güçtür. Optimum ekstraksiyon koşulunun iyi bir şekilde değerlendirilmesi için birden fazla faktörün incelenmesi gereklidir. Yanıt yüzey yöntemi bu sorunların üstesinden gelmektedir; çünkü bu metot bağımsız değişkenlerin etkilerinin, değişkenler arasındaki etkileşimlerin ve çeşitli proseslerin matematiksel modellemelerinin incelenmesine olanak sağlamaktadır (Pompeu ve ark., 2009; Silva ve ark., 2007) ve metot bu işlemleri yaparken de deney sayısını azaltarak sonuçların üç boyutlu, eş yükselti eğrisi, kübik gibi grafiksel çıktılarını da vermektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Vişne Posası

Vişne suyu üretiminde presleme işleminin ardından vişnenin çekirdek ve sap kısmıyla birlikte kabuk kısmı da üretimden atık olarak ayrılır. Presleme işleminin ardından ortaya çıkan Kütahya çeşidi vişne atığı (kabuk, çekirdek, sap) Limkon Gıda Sanayi ve Ticaret A.Ş. (Adana)'den temin edilmiştir. Üretim esnasında elde edilen atık bütünüyle alınmış ve naylon poşetlerde 4 °C sıcaklıkta laboratuvara taşınmıştır. Atıkta yer alan kabuk, çekirdekten ve saptan el yordamıyla hızlıca ayrılmış ve ayrılan kabuklar 50 °C etüvde kuru madde oranı % 90±1 olana dek kurutulmuştur (105 °C etüvde sabit ağırlığa gelene kadar bekletilerek saptanmıştır). Elde edilen kurutulmuş vişne posası tane büyüklüğünü küçültmek; dolayısıyla yüzey alanını artırmak için hızla öğütme işlemine tabi tutulmuştur (Polymix Culatti). Elekten geçirilerek son tane büyüklüğü 2 mm. ve altına getirilen kurutulmuş ve öğütülmüş vişne posası analizlerde kullanılmak üzere amber cam kavanozlarda analizlerin yapılacağı zamana kadar 0 °C'deki buzdolabında bekletilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan EtOH SIGMA-ALDRICH Co. Ltd (Steinheim, Almanya); Folin-Ciocalteu ayracı Merck (Almanya), siyanidin-3,5-di-O-glikozit ve malvidin-3,5-diglikozit Çukurova Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünden ve diğer tüm kimyasallar SIGMA-ALDRICH Co. Ltd (Steinheim, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1. Ekstraksiyon İşlemi

Ekstraksiyon işlemi 500 ml'lik amber cam şişelerde çalkalamalı inkubatörde (Labline, ABD) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon çözücüsü olarak farklı oranlarda saf su ile seyreltilmiş etanol (Sigma 32221, Steinheim, Almanya) kullanılmıştır. Cam şişelere 5'er g posa konularak ekstraksiyon çözücüsüyle karıştırmadan önce ekstraksiyon çözücüsüyle (% 0.01 HCl içeren) aynı anda ayrı ayrı ekstraksiyon

sıcaklığında 7-8 dakika bekletilmiştir. Ekstraksiyon işleminin tamamı çalkalamalı inkubatörde 200 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Deneyin birinci basamağında (RSM deney dizaynına göre belirlenen) 60 dak sabit süre olarak belirlenmiştir; çünkü ön denemelere göre fenolik madde geçişi bu süre zarfında genellikle sabitlenmektedir (Silva ve ark., 2007). Ekstraksiyon işleminin ardından homojenat santrifüj tüplerine aktarılmış ve 6000 rpm'de 10 dak santrifüj (Hitachi CT6E, Taiwan) işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında sıvı faz (serum) falkon tüplerine aktarılmış ve analizin yapılacağı zamana kadar - 40°C'de bekletilmiştir (Şekil 3.1. & Şekil 3.2.).

3.2.2. Deney Tasarımı

Birinci Adım: Çözücü Konsantrasyonu, Sıcaklık ve Çözücü Oranının Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonuna Etkisi

İkinci Adım: Ekstraksiyon Süresinin Belirlenmesi ve Çözücü Oranının Etkisinin Belirlenmesi

Üçüncü Adım: Posada Bulunan Antosiyanin ve Flavonoidlerin HPLC ile Belirlenmesi

Birinci Adım

Vişne posasından fenolik maddelerin ekstraksiyonunda öncelikle üç faktör (etanol konsantrasyonu, sıcaklık, çözücü oranı) göz önünde bulundurularak optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu aşamada süre 60 dakika olarak sabit tutulmuştur.

İkinci Adım

Optimum ekstraksiyon süresini belirlemek için ikinci bir deney basamağı oluşturulmuştur. Bu aşamada, birinci aşamada belirlenen optimum şartlar göz önünde bulundurularak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Optimum çözücü konsantrasyonunda ve çözücü miktarında üç farklı sıcaklıkta (25, 50 ve 75 °C) iki dakika ve beş dakika süreden başlayarak 10'ar dakika aralıklarla örnekleme yapılacak şekilde 180 dakikada tamamlanan ekstraksiyonlar (2, 5, 10, 20, 30, … ,

180 dak) yapılmıştır. Elde edilen verilerden zamana bağlı değişen TFM miktarı ve TA miktarı tespit edilmiştir.

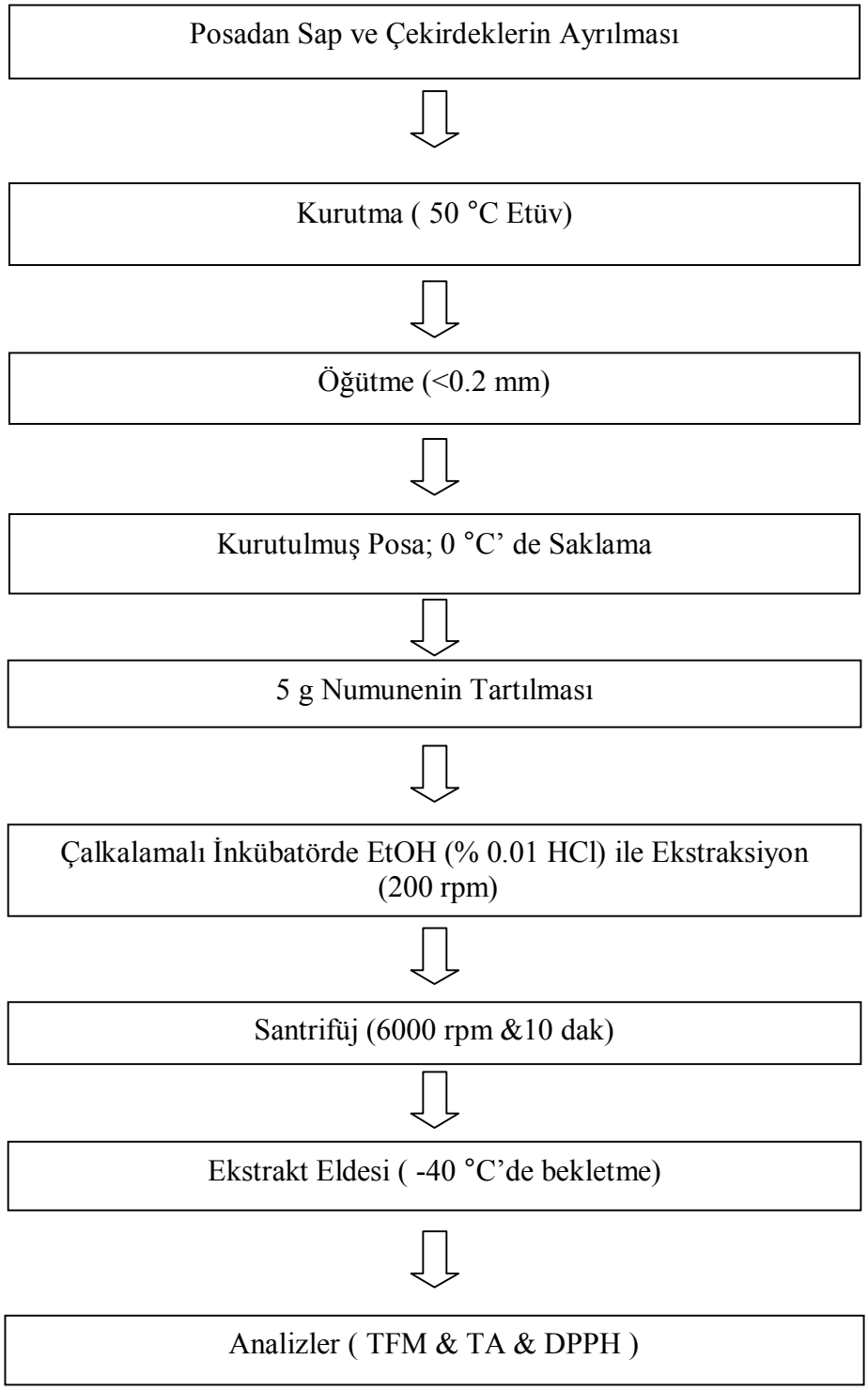
Deney planında her faktör için limit belirlenirken çözücü konsantrasyonu ve sıcaklık limitleri için birçok çalışmada dikkate alınan faktör limitleri seçilmiştir; ancak çözücü miktarı limiti net olmayan bir faktördür. Bu faktörün etkisinin belirlenmesi için çalışmalarda ya deneysel plandan ayrı tutularak analizler yapılmış (Pompeu ve ark., 2009; Silva ve ark., 2007); ya da geniş aralıklar kullanılarak analizlerin yapıldığı görülmüştür (Cacace ve Mazza, 2003a; Cacace ve Mazza, 2003b). Belirli bir miktardan fazla çözücü kullanmanın çevre ve maliyetler göz önünde bulundurulduğunda yüksek maliyet anlamına geldiği açıktır. Deneysel planda belirlenen aralıkların üstünde çözücü miktarının fenolik madde geçişine etkisini belirlemek üzere ayrı bir deney yapılmıştır. Optimum koşulların (çözücü konsantrasyonu, sıcaklık ve çözücü oranı) belirlenmesinin ardından farklı çözücü miktarları kullanılarak fenolik madde, antosiyanin miktarı analizleri yapılmıştır. Çizelge 3.1. bağımsız değişkenleri ve onlara ait kod değerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.1. Bağımsız değişkenler ve onların kod değerleri

Bağımsız Değişken	Birim	-Alfa	+ Alfa
Konsantrasyon	% (v/v)	0	100
Sıcaklık	°C	8	92
Çözücü Miktarı	-	4	14

Üçüncü Adım

Deney planına göre elde edilen ekstraktlar azot (N_2) gazı altında su banyosunda kurutulmuş; antosiyaninler ve renksiz fenolik maddeler elde edilmiş ve saf suda çözündürülerek HPLC'de tanımlamaları yapılmak üzere kullanılmıştır. Farklı ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktların antosiyanin ve fenolik maddelerinin ayrı ayrı profilleri incelenmiştir.



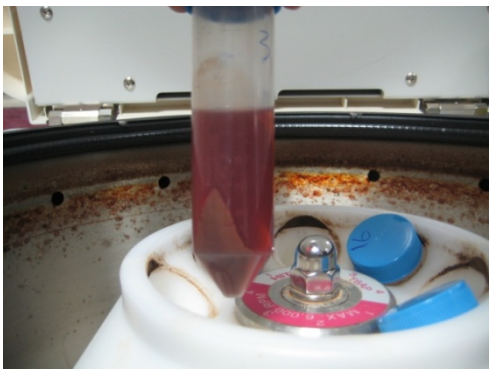
Şekil 3.1. Vişne posası üretimi, ekstraksiyon ve analiz aşamaları

1) Presleme işleminin ardından sistemden ayrılan atık

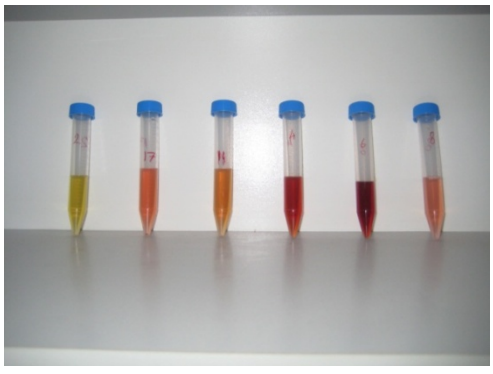
2) Kabuğun el ile saptan ve çekirdekten ayrılması

3) Kurutulmuş ve öğütülmüş vişne posası

4) Çalkalamalı inkubatörde ekstraksiyon



5) Santrifüj sonrası ekstrakt



6) Farklı EtOH konsantrasyonlarında elde edilen ekstraktlar

Şekil 3.2. Posa eldesi ve ekstraksiyon işlemlerinden görseller

3.2.3. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM)

Vişne posasından fenolik maddelerin ekstraksiyonunun optimizasyonu Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology) kullanılarak belirlenen deney planına göre gerçekleştirilmiştir. Üç faktörlü, beş düzeyli 'rotatable central composite dizayn' (CCD) seçilmiştir. Deney planı dördü merkez noktası olmak üzere 18 adımdan oluşmuştur. Bağımsız değişkenler olarak A: çözücü konsantrasyonu (0 – 100 %), B: sıcaklık (25 – 92 °C) ve C: çözücü oranı (çözücü/kabuk oranı) (4 – 14 (ml/g)) olarak belirlenmiştir. CCD datayı ikinci dereceden modele örtüştürmek için en küçük kare yaklaşımını (least square regression) kullanmaktadır. Her bir cevabın ikinci derece modeli aşağıdaki gibidir.

$$Y = \beta 0 + \sum_{i=1}^{k} \beta i\, Xi + \sum_{i=1}^{k} \beta ii\, Xi^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i<j}}^{k-1} \sum_{j=2}^{k} \beta ij\, XiXj$$

Burada Y tahmin edilen cevap; X_1, X_2,..., X_k bağımsız değişkenler; β_0, β_i (i = 1, 2,…, k), β_{ii} (i = 1, 2,…, k), β_{ij} (i = 1, 2,…, k; j = 1, 2, …, k) sırasıyla kesişim, lineer, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarıdır; k ise değişken sayısını ifade etmektedir (Silva ve ark., 2007). Modelin doğruluğu programın ANOVA (Analysis of variance) çıktıları olan lack of fit, hesaplama katsayısı (R^2) ve Fisher test değerine (F-değeri) bakılarak değerlendirilmiştir. Program yukardaki eşitliği kullanarak yanıt yüzeyini oluşturmaktadır. Optimum değerlerdeki sonuçların üç boyutlu yanıt yüzey çizimleri (3D) ve eş yükselti eğrisi grafikleri çıkarılmıştır.

3.3. Analizler

3.3.1.Meyve Suyuna İşlenen Vişnede ve Posada Yapılan Analizler

pH ölçümünde dijital pH metreden (Orion 420) yararlanılmıştır. Kuru madde tayini, çözünür kuru madde tayini, kül tayini, titrasyon asitliği AOAC (1985)'ye göre belirlenmiştir. En/boy oranı, 100 tane ağırlığı AOCS (1971)'ye göre belirlenmiştir.

3.3.2.Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini

Toplam fenolik madde tayini gallik asit standartı kullanılarak Folin-Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir. 2.37 ml saf su içeren test tüpüne önce 30 µl ekstrakt, sonra 150 µl Folin-Ciocalteu ayracı eklenmiş ve tüp vortekslendikten sonra 8 dakika karanlıkta tutulmuştur. Sonra 0.45 ml doymuş sodyum karbonat eklenmiş, tekrar vortekslendikten sonra 30 dakika karanlık ortamda tutulmuştur. Aynı işlem kör hazırlamak üzere uygulanmış; 30 µl ekstrakt yerine saf su kullanılmıştır. Örneklerin absorbans değerleri 750 nm'de köre karşı Biochrom Libra S70 UK spektrofotmetrede okunmuştur. Kalibrasyon eğrisi için farklı konsantrasyonlarda gallik asit çözeltileri (50, 100, 200, 300, 400, 500 µg/ml) hazırlanmış ve aynı işlemler bu çözeltiler için de uygulanarak gallik asit standart eğrisi çizilmiştir (Cemeroğlu, 2010). Sonuçlar g gallik asit eşdeğer/kg (g GAE/kg) olarak ifade edilmiştir (Karaaslan ve ark., 2011).

3.3.3. Doğal Vişne Spektral Eğrisinin Belirlenmesi

Antosiyanin analizlerinde maksimum absorbans veren dalga boyunun bilinmesi gerekmektedir (Cemeroğlu ve Artık, 1990). Bu nedenle, vişne ekstraktlarında spektrofotometre (Biochrom Libra S70 UK) kullanılarak 1 cm optik yollu küvette 350-700 nm arasında absorbans taraması yapılarak spektral eğri ve maksimum absorbans belirlenmiştir.

3.3.4. Toplam Antosiyanin Miktarı (TA) Tayini

Toplam antosiyanin miktarı analizi Wrolstad (1976)'a göre pH diferansiyel yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar uygun spektrofotometrik okuma aralığına göre pH 1.0 (0.025 potasyum klorid) ve pH 4.5 (0.4 M sodyum asetat) tampon çözeltileriyle seyreltilmiştir. Örneklerin absorbans değerleri spektrofotometrede okunmadan önce bulanıklığı önlemek amacıyla 0.45 µm'lik teflon filtrelerden (Minisart Sartorius RC) geçirilmiştir. İki örnek seyreltiklerinin absorbans değerleri 515 nm ve 700 nm'de kaydedilmiştir. Seyreltilmiş örneklerin absorbans farkı (A) değerleri 1. denkleme göre; toplam antosiyanin değeri de 2. denkleme göre belirlenmiştir.

$$A = (A_{\lambda 515} - A_{\lambda 700})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda 515} - A_{\lambda 700})_{pH\ 4.5} \quad (1) \qquad TA = \frac{AxMWxDFx1000}{\epsilon x l} \quad (2)$$

Burada;

A: Düzeltilerek hesaplanmış absorbans farkı

MW: Baz alınacak antosiyaninin molekül ağırlığı (siyanidin-3-rutinozit; 595.2 g/mol)

DF: Seyreltme faktörü

ϵ: Absorpsiyon katsayısı (siyanidin 3-rutinozit; 28800 L/cm mg)

l: Küvet katman kalınlığı & ışık yolu (1 cm)

Sonuçlar mg siyanidin 3-rutinozit/kg numune (mg siy-3-rut/kg) olarak ifade edilmiştir.

3.3.5. Antioksidan Kapasitesi (% DPPH) Analizi

Ekstraktların antioksidan kapasiteleri Blois (1958) tarafından rapor edilmiş DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) metoduna göre bazı küçük modifikasyonlarla belirlenmiştir. Örneklerin farklı miktarlarda çözücü ile ekstrakte edilmesinden dolayı öncelikle örneklerde etanol ile seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için bütün ekstraktlar en seyreltik numune ile aynı miktarda çözücü içerecek şekilde seyreltme işlemine tabi tutulmuştur. Sonrasında 0.1 ml seyreltik ekstraktlardan alınarak 2.9 ml DPPH çözeltisi (0.1 mM; etanol içerisinde çözündürülmüş) içeren tüplere ilave edilmiştir. Bu işlemin ardından

tüpler karanlık ortamda 30 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakılmış ve spektrofotometrede (Biochrom Libra S70 UK) 517 nm'de absorbans okuması yapılmıştır. Kontrol için 0.1 ml etanol kullanılmış ve örnekler için gerçekleştirilen adımlar aynen uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre hesaplanmış ve % DPPH olarak ifade edilmiştir.

$\% \text{ DPPH} = [(A_C - A_S)/A_C]x100$

Burada ;

A_C: Kontrolun absorbans değeri

A_S: Numunenin absorbans değeri

3.3.6. Fenolik Bileşenlerin HPLC ile Belirlenmesi

3.3.6.1. Örnek hazırlama

Numune hazırlarken öncelikle 3.2.1.'de bahsedilen şekilde posaya ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Elde edilen sıvı faz (serum) 40 °C'de su banyosunda azot (N_2) gazı altında buharlaştırılmış ve kalıntı asitlendirilmiş su (% 0.01 HCl) içerisinde çözündürülerek ekstrakt elde edilmiştir.

Antosiyaninlerin ve renksiz fenolik maddelerin saflaştırılması için C_{18} SEP-Pak kartuşları (Teknokroma, Finisterre) kullanılmıştır. Manifold yardımıyla kartuştan ayrılan fenolik maddeler ve antosiyaninler asitlendirilmiş su (% 0.01 HCl) içerisinde çözündürülüp 0.45 µm tek kullanımlık teflon filtreden (Minisart Sartorius RC) geçirilmiş ve HPLC'ye enjekte edilmek üzere viallere alınmıştır (Cemeroğlu, 2010). Örnek hazırlama aşamasında laboratuar çalışmalarından görseller şekil 3.3.'te verilmiştir.

3.3.6.2. Kromatografi koşulları ve tanımlama

Fenolik bileşiklerin analizinde PDA dedektörlü (Waters 2996) Waters 2795 (Waters Technology, Kanada) marka HPLC kullanılmıştır. Fenolik bileşenlerin tespiti Crozier ve ark. (1997)'nın metoduna göre bazı modifikasyonlarla yapılmıştır. Analizlerde kullanılan HPLC'nin çalışma koşulları aşağıdaki gibidir:

- Kolon: Supelcosil (Superco) LC-18-T (15cm x 4.6 mm x 3 µm)
- Enjeksiyon miktarı: 50 µl
- Kolon sıcaklığı: 35 °C
- Akış hızı: 1 ml/dak

- Taşıyıcı faz: A = % 0.1 Trifloroasetik asit (TFA)
  B = Asetonitril
- Dalga boyu: 280, 320 ve 520 nm

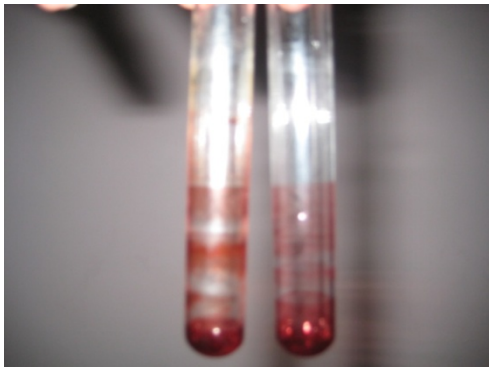
Çizelge 3.2. Mobil faz gradiyenti

Zaman (dak)	A: % 0.1 TFA (%)	B: ACN (%)
0	90	10
30	90	10
50	80	20
55	80	20
56	90	10
60	90	10

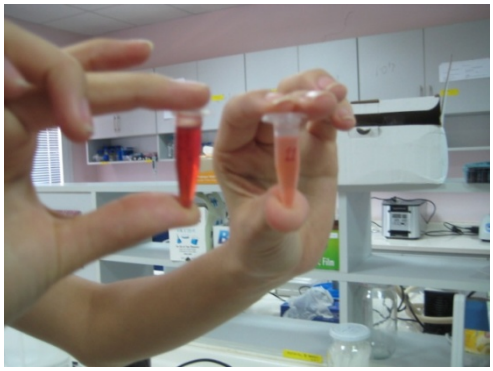
Renksiz fenolik bileşiklerin tespiti için 280 ve 320 nm dalga boyu; antosiyaninler için ise 520 nm dalga boyu kullanılmıştır. Maddelerin HPLC'de farklı zamanlarda ayrılmasına göre mobil faz gradiyenti modifiye edilmiştir (Çizelge 3.2.). Fenolik maddelerin tanısı ve miktarı kullanılan standart maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarından yararlanılarak yapılmıştır. Renksiz fenolik bileşiklerde standart madde için beş farklı konsantrasyonda; antosiyaninler için üç farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmış ve HPLC'ye enjekte edilerek her bir madde için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Bu eğrilerden ve denklemlerinden yararlanılarak da posadaki fenolik bileşiklerin miktarı hesaplanmıştır.

3.3.7. İstatistiksel Analizler

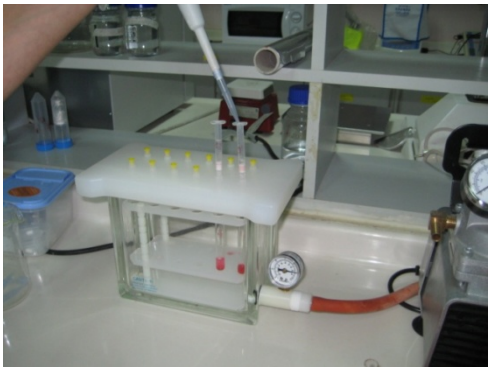
Çalışma iki tekerrürlü, üç paralelli olarak yürütülmüştür. Deney planı Design Expert (8.0.7.1) deneme versiyonu programında RSM metodolojisine göre belirlenmiş, sonuçlar yine bu programa göre değerlendirilerek program çıktısı olarak grafiklerle ifade edilmiştir. Bazı istatistiksel analizler SPSS sürüm 9.0 ve Minitab paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grafiklerin çizimi Sigma Plot (9.0) ve Microsoft Office Excel ile yapılmıştır.



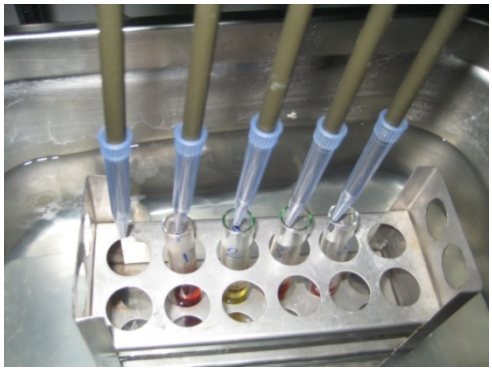
1) N_2 gazı altında kurutulmuş ekstrakt



2) Farklı EtOH konsantrasyonunda hazırlanmış ekstrakt

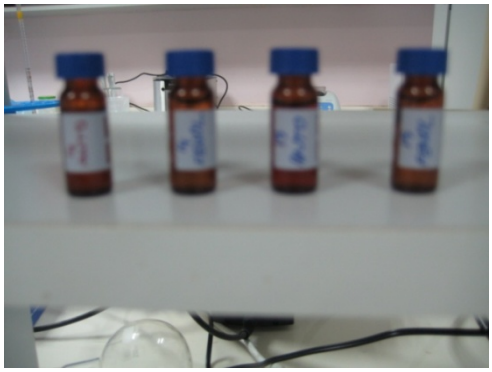


3) Manifold ve kartuş yardımıyla fenolik maddeleri saflaştırma aşaması



4) N_2 gazı altında su banyosunda kurutma işlemi

5) Renksiz fenolik bileşenler ve antosiyanin kalıntıları



6) HPLC için örneklerin viallere alınması

Şekil 3.3. HPLC analizi için numune hazırlama aşamasından görseller

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Posası Alınan Meyveye ve Posaya Uygulanan Analizler

Elde edilen vişne posasına ait kuru madde ve kül değerleri çizelge 4.1.'de, posası alınan meyvenin asitlik, SÇKM (briks), pH, en/boy oranı, 100 tane ağırlığı, toplam antosiyanin miktarı ve toplam fenolik madde içeriği çizelge 4.2.'de standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.1. Posanın kuru madde ve kül değerleri

Analizler	Sonuçlar
Kuru Madde (%)	90.07 ± 0.03
Kül (%)	3.40 ± 0.02

Çizelge 4.2. Posası alınan meyveye ait bazı analiz sonuçları

Analizler	Sonuçlar
Asitlik (% Malik Asit)	2.05 ± 0.03
Briks (%)	17.50 ± 0.20
pH	3.39 ± 0.02
En/Boy Oranı	1.17 ± 0.06
100 Tane Ağırlığı (g)	418.60 ± 8.65
Toplam Antosiyanin (mg siy 3-rutinozit/kg meyve)	605.28 ± 5.29
Toplam Fenolik Madde (mg GAE/kg meyve)	4321.05 ± 2.25

Spigno ve ark. (2007) üzüm posasının ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında ekstraksiyon işleminden önce örnekleri 60 °C'de numunelerin nem içeriği %2-4 olana dek kurutma işlemine tabi tutmuşlardır. Bilek (2010) zeytin yapraklarının ekstraksiyon optimizasyonu çalışmasında numuneleri 60-65 °C'de vakum altında kurutmuş; elde ettiği numunenin kuru madde içeriğini de % 98 olarak saptamıştır. Bu çalışmada ise 50 °C'de kurutma işlemi yapılmış ve elde edilen posanın kuru madde değeri % 90.07±0.03 olarak bulunmuştur.

4.2. Çözücü Konsantrasyonu – Oranı ve Ekstraksiyon Sıcaklığının Optimizasyonu

Araştırmanın ilk adımı olan bu çalışmada TFM, TA ve % DPPH'in maksimum değerlerini yakalamak için optimum noktalar bulunmuştur. Deneysel veriler çizelge 4.3.'te verilmiştir. TFM, TA ve DPPH analizlerinde modellerin önemli olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Her üç sonuç için de % 99.9 güven aralığında quadratic modelin sonuçları kapsadığı görülmüştür. Lineer model ise istatistiksel olarak önemsiz görülmüştür ($p>0.05$). TFM, TA ve % DPPH için R^2 değerleri sırasıyla 0.9653, 0.9728 ve 0.9914 olarak bulunmuştur. Lack of fit testi deneysel verinin uygunluğunu doğrulamak için göz önünde bulundurulan bir testtir (Silva ve ark., 2007). Bir model önemli düzeyde lack of fit içeriyorsa bu model sonuçlar için iyi bir gösterge değildir ve bunun üzerinden de sonuçlar yorumlanamaz (Yağcı ve Göğüş, 2008). Lack of fit testi TFM, TA ve % DPPH için de önemsiz ($p>0.05$) çıkmıştır; bu da modelin deneysel veriye yeterli derecede uygun olduğunu göstermektedir. Adj R^2 ve Pred R^2 değerlerinin birbirine yakın olması da sonuçların değerlendirilmesinde önemlidir. Sıcaklık faktörü üç sonuç için de istatistiksel olarak en önemli bulunmuştur ($p<0.001$). TFM miktarının konsantrasyona bağlı olarak değiştiği gözlenmiş ancak istatistiksel olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur. Konsantrasyon TA miktarı ve % DPPH için istatistiksel olarak önemli düzeyde etkili bulunmuştur ($p<0.001$). Çözücü oranı her üç sonuç için de farklı güven aralıklarında istatistiksel olarak önemli düzeyde bulunmuştur (Çizelge 4.4.). Ayrıca TFM, TA ve % DPPH sonuçları arasında da bağlantı olduğu görülmüştür ($p<0.001$). Pompeu ve ark. (2009) da TFM & TA ve TA & AK arasında korelasyon olduğunu; ancak TFM & AK arasında istatistiksel olarak bir korelasyon olmadığını rapor etmişlerdir. TFM, TA ve % DPPH sonuçlarının konsantrasyon (A), sıcaklık (B) ve Çözücü oranına (C) bağlı olarak kodlu birimlerle (coded unit) regresyon denklemleri program tarafından aşağıdaki gibi verilmiştir.

$$Y_{TFM} = 12.88 - 0.15A + 2.69B + 0.93C - 4.08A^2 - 1.00B^2 - 0.67C^2$$

$$Y_{TA} = 389.75 - 35.71A + 50.81B + 18.43C - 114.79A^2 - 15.66B^2 - 18.76C^2$$

$$Y_{DPPH} = 87.60 - 2.77A + 4.15B + 1.80C + 1.13BC - 11.93A^2 - 1.76B^2 - 1.01C^2$$

Çizelge 4.3. RSM deney planı ve sonuçlar

Standart Sıra	İşlem Sırası	Faktör 1(A) Konsantrasyon (%)	Faktör 2(B) Sıcaklık (°C)	Faktör 3(C) Çözücü Oranı (ml/g)	Sonuç 1 TFM (db) (g GAE/kg posa)	Sonuç 2 TA (db) (mg siy 3-rut/kg posa)	Sonuç 3 % DPPH (%)
14	1	50	50	14	13.59 ± 1.07	380.26 ± 26.03	88.21 ± 2.13
8	2	80	75	12	9.65 ± 0.72	274.04 ± 12.47	77.04 ± 1.12
18	3	50	50	9	12.38 ± 1.31	385.02 ± 35.47	87.21 ± 1.65
17	4	50	50	9	13.30 ± 1.09	382.23 ± 37.41	88.17 ± 1.47
11	5	50	8	9	6.03 ± 0.57	275.28 ± 11.92	77.39 ± 1.00
2	6	80	25	6	3.88 ± 0.33	127.10 ± 13.33	63.14 ± 1.75
15	7	50	50	9	12.52 ± 1.13	427.80 ± 27.54	86.85 ± 1.89
10	8	100	50	9	1.63 ± 0.12	14.88 ± 0.84	50.79 ± 0.85
1	9	20	25	6	3.54 ± 0.24	212.66 ± 14.83	71.23 ± 1.37
12	10	50	92	9	15.68 ± 1.54	444.54 ± 23.77	88.80 ± 1.74
5	11	20	25	12	4.12 ± 0.25	228.16 ± 10.72	72.46 ± 1.60
3	12	20	75	6	7.45 ± 0.39	268.46 ± 18.72	76.16 ± 1.63
13	13	50	50	4	9.94 ± 1.15	322.01 ± 24.03	82.24 ± 1.34
4	14	80	75	6	8.10 ± 0.76	236.22 ± 15.51	72.45 ± 0.99
7	15	20	75	12	11.34 ± 1.72	347.20 ± 22.20	83.35 ± 1.68
6	16	80	25	12	4.46 ± 0.43	148.80 ± 6.85	64.64 ± 1.25
9	17	0	50	9	2.62 ± 0.12	144.15 ± 8.37	57.87 ± 1.34
16	18	50	50	9	13.05 ± 0.98	358.98 ± 18.40	87.99 ± 1.71

Çizelge 4.4. TFM, TA ve % DPPH için istatistiksel sonuçlar

	TFM	TA	% DPPH
Model	***	***	***
Linear	NS	NS	NS
Quadratic	***	***	***
R^2	0.9653	0.9728	0.9914
Adj R^2	0.9464	0.9579	0.9853
Pred R^2	0.8747	0.9226	0.9638
Lack of Fit	NS	NS	NS
Konsantrasyon	NS	***	***
Sıcaklık	***	***	***
Çözücü Oranı	**	*	***

*** $p<0.001$ derecede önemli.
** $p<0.01$ derecede önemli.
* $p<0.05$ derecede önemli.
NS önemsiz ($p>0.05$).

Sonuçların ayrı ayrı optimum noktaları gösterilirken programda bir değer için "maximize" diğerleri için "in range" seçeneği kullanılmış; genel olarak incelemesi yapılırken ise bütün sonuçlar için "maximize" ifadesi kullanılmıştır. Sonuçların ayrı ayrı çıktıları alındığında TFM için %58 EtOH konsantrasyonu, 75 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve çözücü miktarı olarak da 10 ml/g optimum noktalar olarak bulunmuştur. TA için % 40 EtOH konsantrasyonu, 75 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 8 ml/g çözücü miktarı; % DPPH için ise % 49 EtOH konsantrasyonu, 71 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 8 ml/g çözücü miktarı optimum noktalar olarak saptanmıştır. Üç sonuç da aynı anda değerlendirildiğinde optimize koşullar olarak %48 EtOH konsantrasyonu, 75 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 11ml/g çözücü miktarı olarak bulunmuştur. Çizelge 4.5.'te TFM, TA ve % DPPH için farklı

optimum noktalar ve üç sonucun birlikte değerlendirildiği optimizasyon koşulları; şekil 4.4.'te de optimizasyon için genel görünüm grafiği (overlay plot) gösterilmiştir.

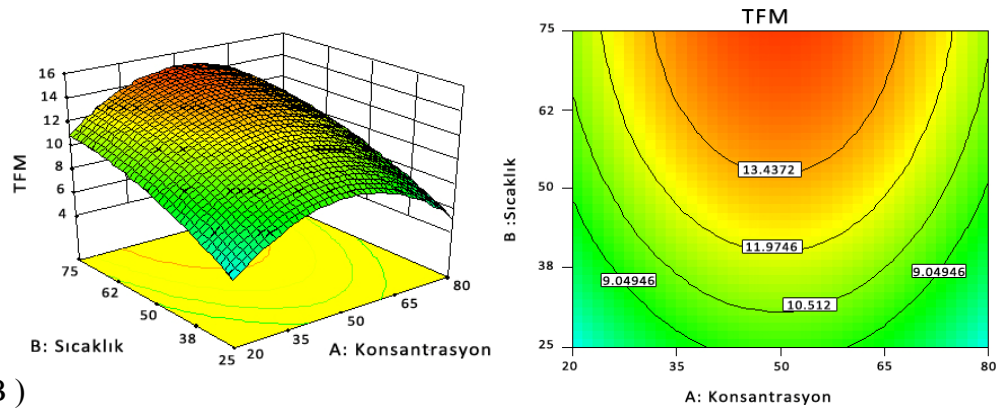
11 ml/g çözücü oranı çalışmada denenen en yüksek14 ml/g değerinden daha aşağıda olduğu için çözücünün çevreye ve maliyete etkisini azaltmaktadır. Bazı çalışmalarda sıcaklığın belli bir noktasından sonra antosiyanin ve fenolik maddelere olumsuz etki yaparak düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir (Sun ve ark., 2011; Yim ve ark., 2011; Ballard ve ark., 2009; Cacace ve Mazza, 2003b). Silva ve ark. (2007) ve Pinelo ve ark. (2005) çalışmalarında sıcaklık değerinin belirli bir noktadan sonra bazı flavonoidlere zarar vereceğini düşünerek en yüksek sırasıyla 65.2 °C'de ve 50 °C'de tutmuşlardır. Ancak bu çalışmada sıcaklığın artması ile (92 °C'ye kadar) antosiyanin ve fenolik madde değerlerinde artış gözlenmiştir. Yang ve ark. (2009) sıcaklığın artışının fenolik madde ekstraksiyonuna doğrusal olarak etki ettiğini bildirmişler; optimum sıcaklık olarak da 72.9 °C'yi göstermişlerdir.

Birçok çalışmada sulu çözeltilerin ekstraksiyon veriminin yüksek olduğu vurgulanmıştır. Pompeu ve ark. (2009) optimum etanol konsantrasyonu olarak % 70-80 arasını, Silva ve ark. %86.8 göstermiştir. Yang ve ark. (2009) % 51.3, Cacace ve Mazza (2003b) %50 konsantrasyonu optimum noktalar olarak göstermişlerdir. Şekil 4.1., 4.2. ve 4.3.'te TFM, TA ve % DPPH sonuçları için 3 boyutlu ve 2 boyutlu grafik çıktıları görülmektedir.

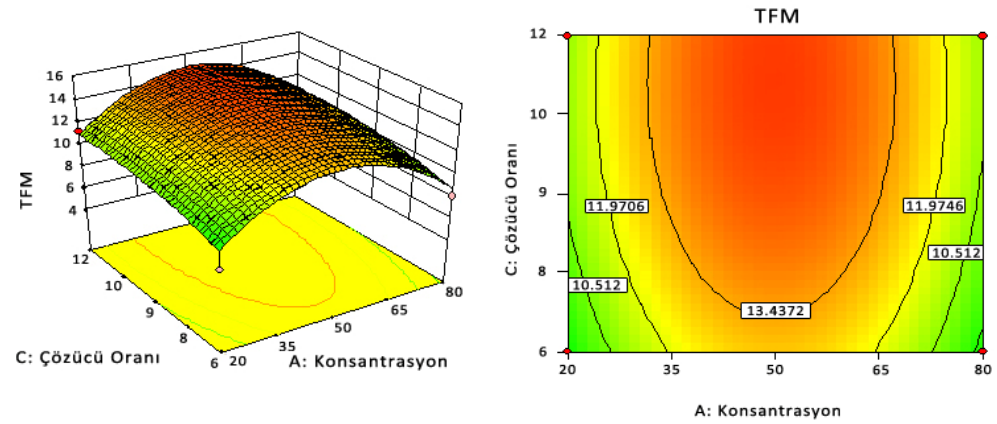
Çizelge 4.5. TFM, TA ve % DPPH sonuçları için ayrı ayrı ve bütün olarak değerlendirildiğinde optimum ekstraksiyon koşulları

	TFM	TA	% DPPH	Optimizasyon
Konsantrasyon (% EtOH)	58	40	49	48
Sıcaklık (°C)	75	75	71	75
Çözücü Oranı (ml/g)	10	8	8	11
TFM (g GAE/kg posa)	14.37	13.89	14.09	14.88
TA (mg siy 3-rut/kg posa)	408.43	418.34	415.46	431.38
% DPPH (%)	88.80	88.80	89.05	91.52
İstenirlik (Desirability)	0.907	0.939	1.00	0.97

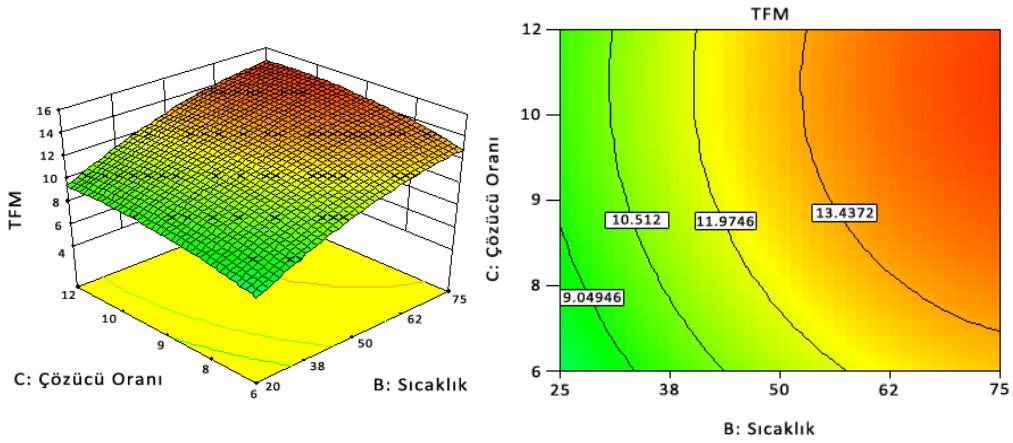
(A)



(B)

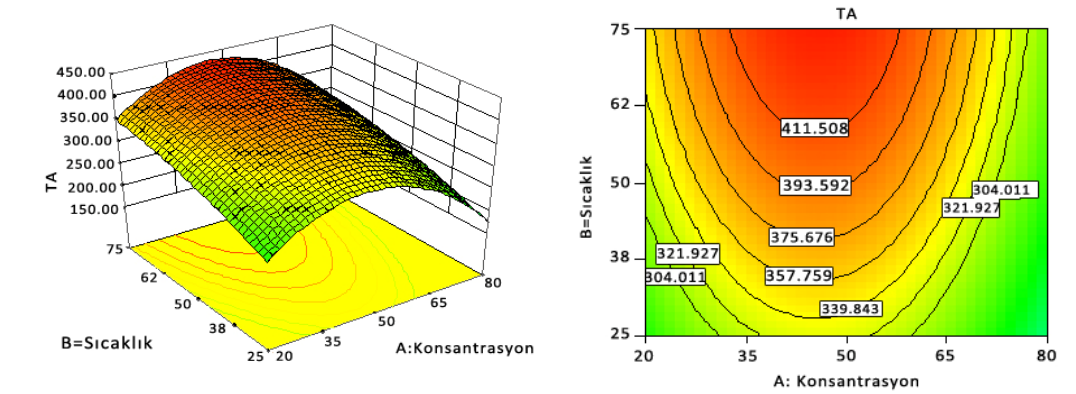


(C)

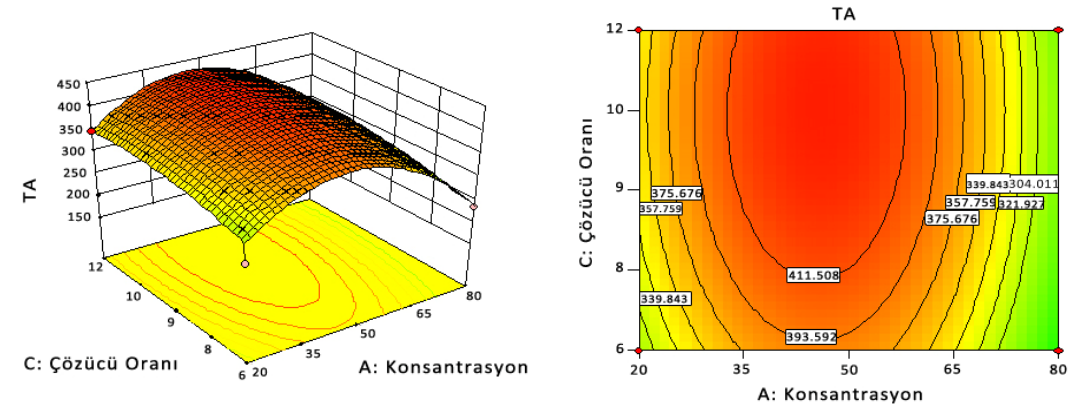


Şekil 4.1. Vişne posası ekstraksiyonunda toplam fenolik madde miktarı (g GAE/kg posa) için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri

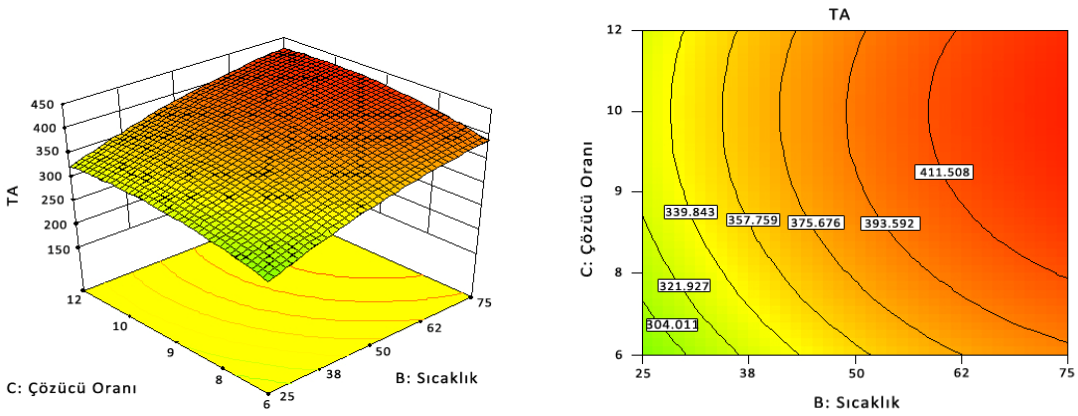
(A)



(B)

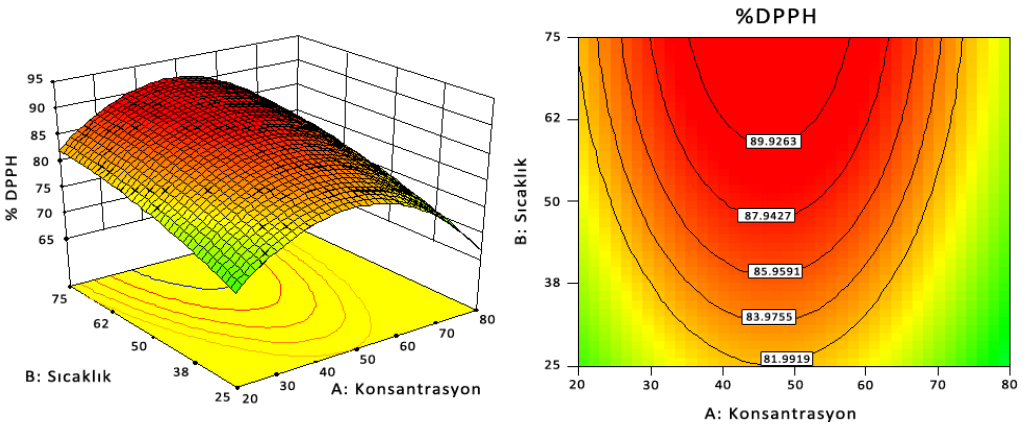


(C)

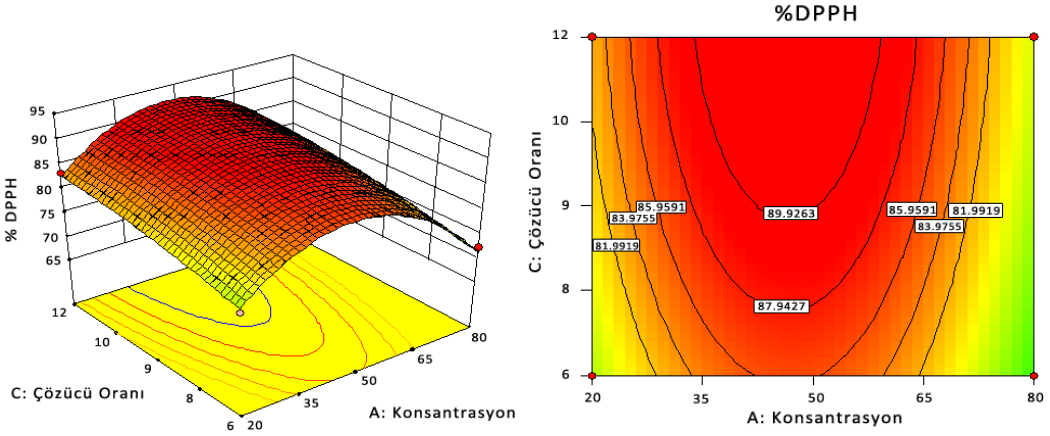


Şekil 4.2. Vişne posası ekstraksiyonunda toplam antosiyanin miktarı (mg siy 3-rut/kg posa) için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri

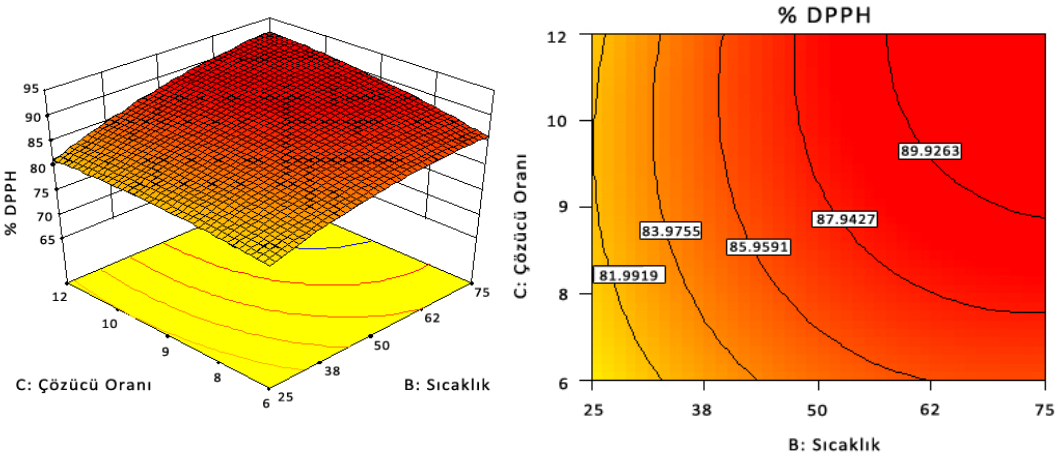
(A)



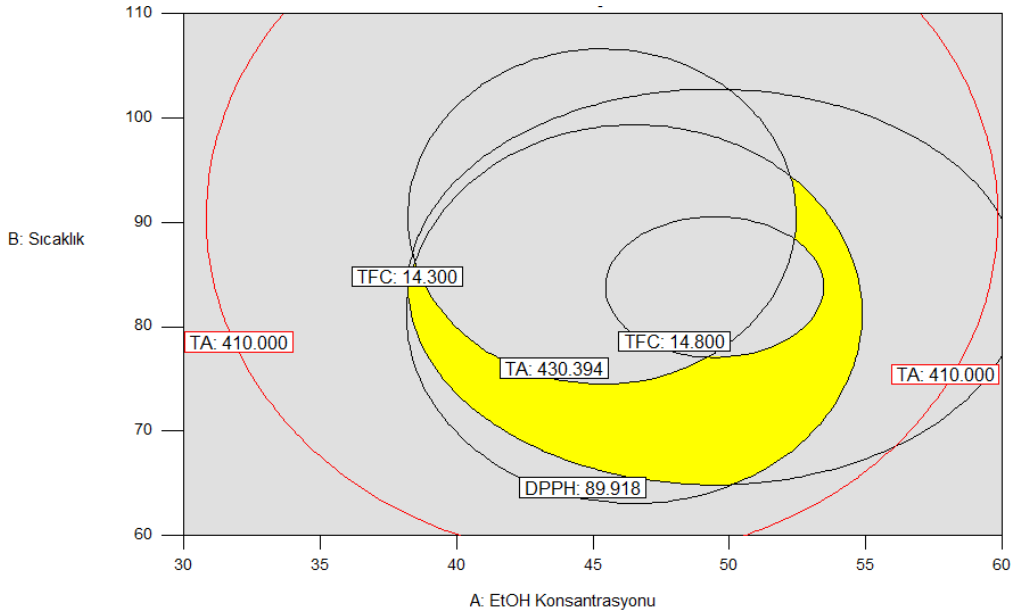
(B)



(C)



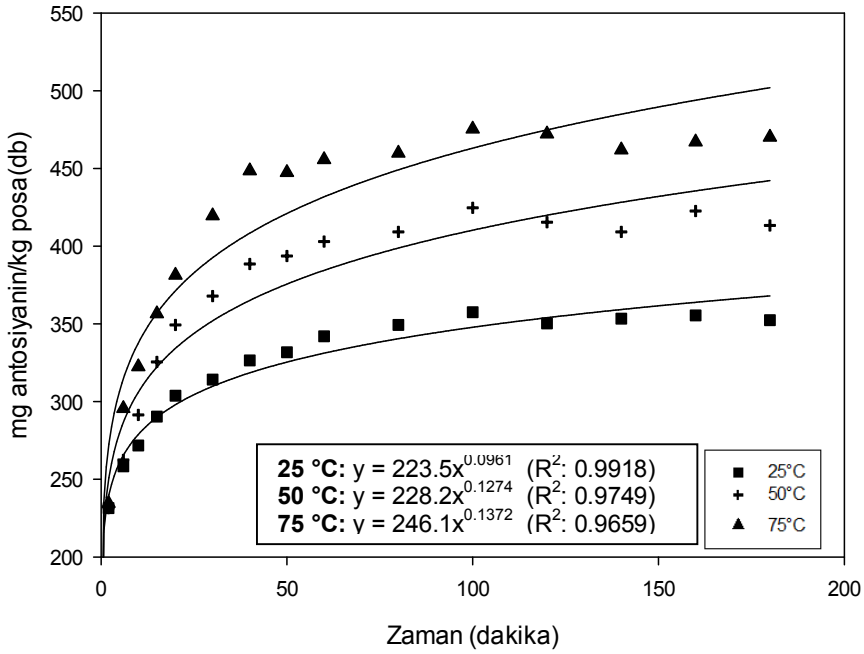
Şekil 4.3. Vişne posası ekstraksiyonunda % DPPH için etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın etkisinin 11 ml/g sabit çözücü oranında (A); konsantrasyon ve çözücü oranının 75 °C sabit sıcaklıkta (B) ve sıcaklık ve çözücü oranının % 48 sabit konsantrasyonda (C) 3 boyutlu (sol) ve 2 boyutlu (sağ) grafik görünümleri



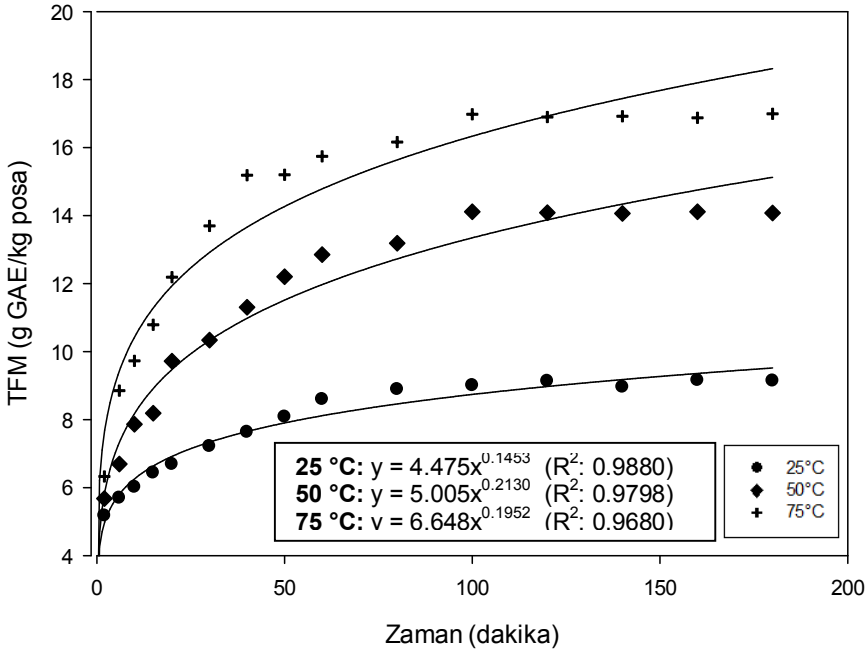
Şekil 4.4. Optimizasyon için genel görünüm grafiği

4.3. Sürenin Etkisi

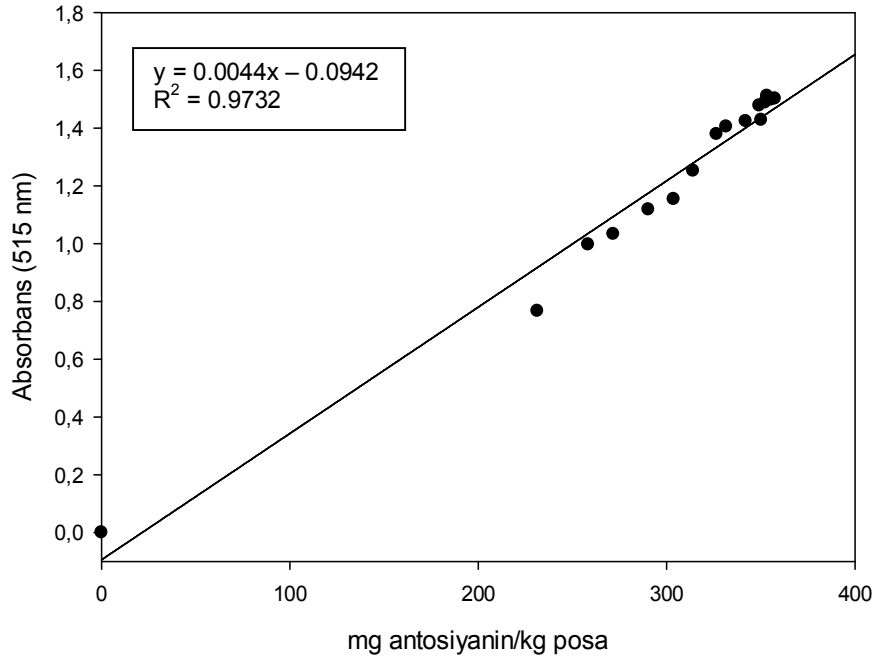
Posa içerisinde bulunan fenolik maddelerin çözücüye zaman içerisinde geçişini göstermek amacıyla kinetik çalışma yapılmış; TFM miktarının 60 – 100 dak arasında ve TA miktarının 40-60 dak arasında sabit miktarlara ulaştığı saptanmıştır. 25 °C'de sabit değerlere her iki sonuç için de daha kısa sürelerde ulaşıldığı; sıcaklık artışıyla birlikte sabit değerlere daha uzun sürelerde ulaşıldığı saptanmıştır (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). Ayrıca ekstraktların absorbans değerlerinin (λ_{515}) TFM ve TA miktarları için bir belirteç olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7., Şekil 4.8., Şekil 4.9., Şekil 4.10., Şekil 4.11., Şekil 4.12.). Ochoa ve ark. (2001) üründe renk değişimini göstermek için belirli dalga boyunda absorbans değerinin okunmasının iyi bir indikatör olarak yorumlanabileceğini belirtmiştir.



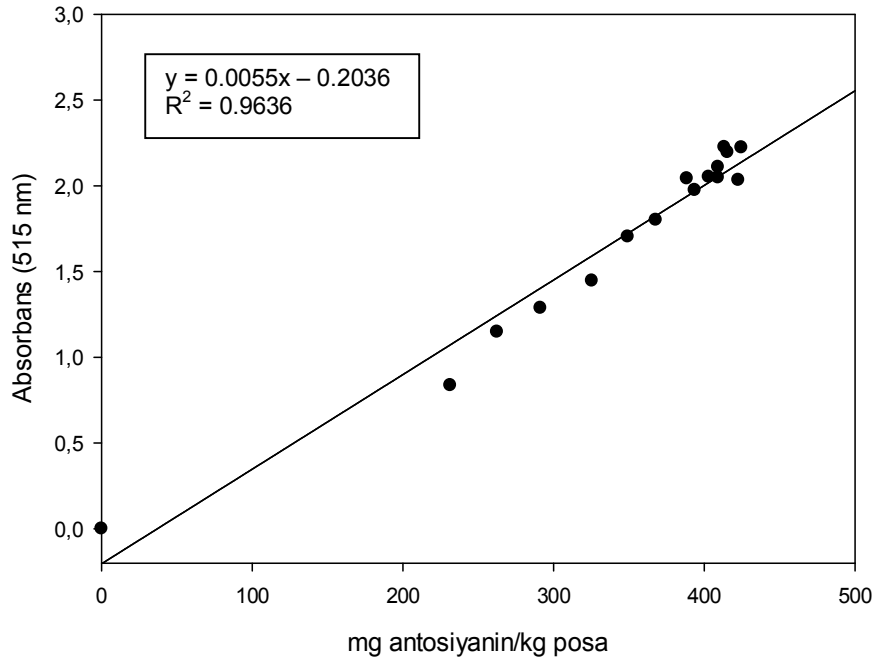
Şekil 4.5. Antosiyanin miktarının üç farklı ekstraksiyon sıcaklığında zamana bağlı değişimi



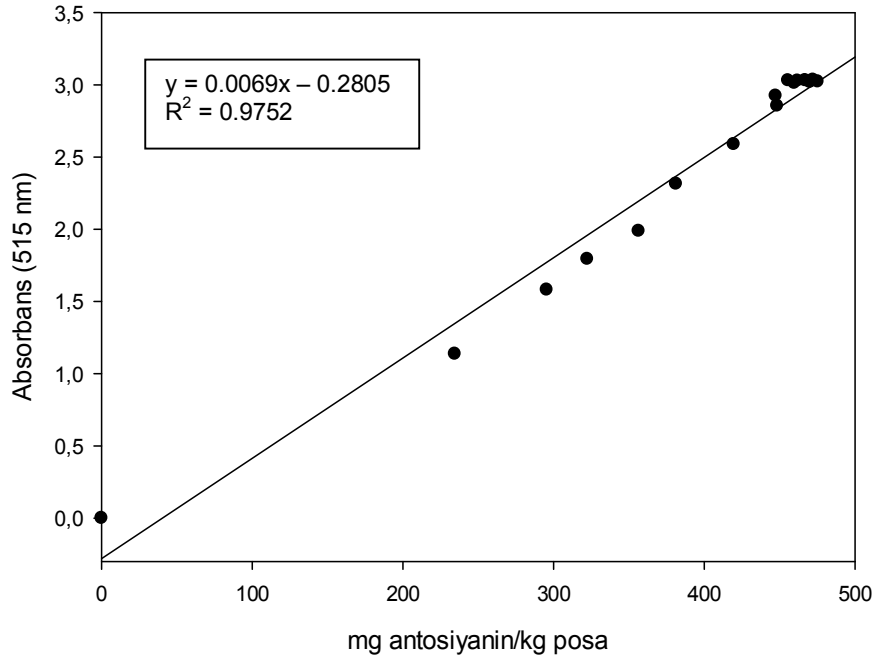
Şekil 4.6. Toplam fenolik madde miktarının üç farklı ekstraksiyon sıcaklığında zamana bağlı değişimi



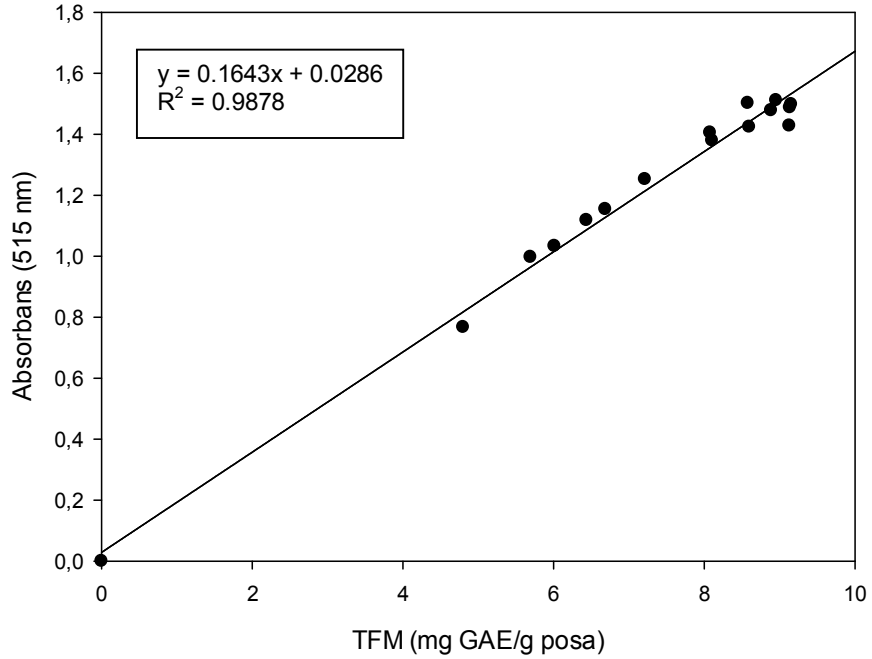
Şekil 4.7. 25 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi



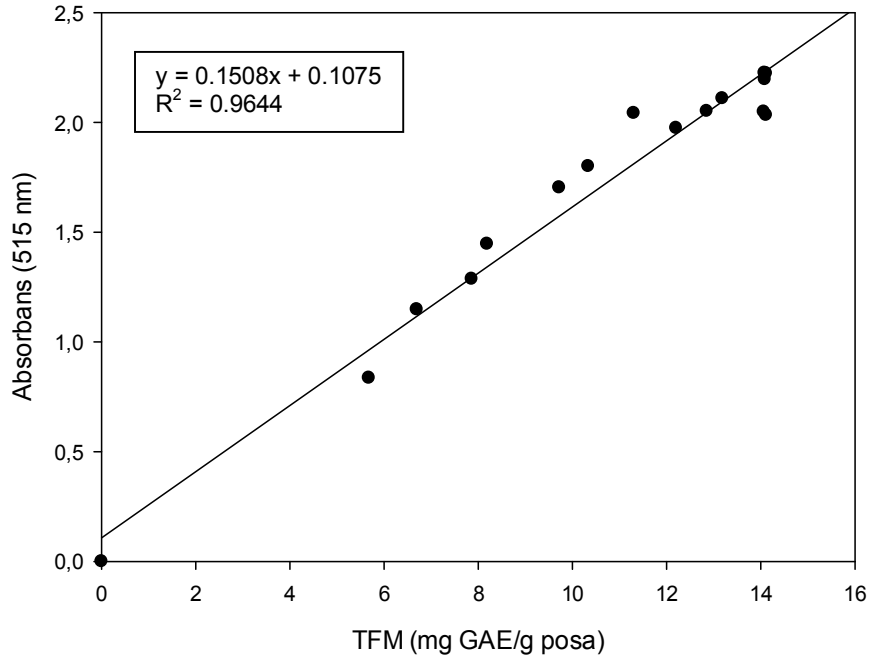
Şekil 4.8. 50 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi



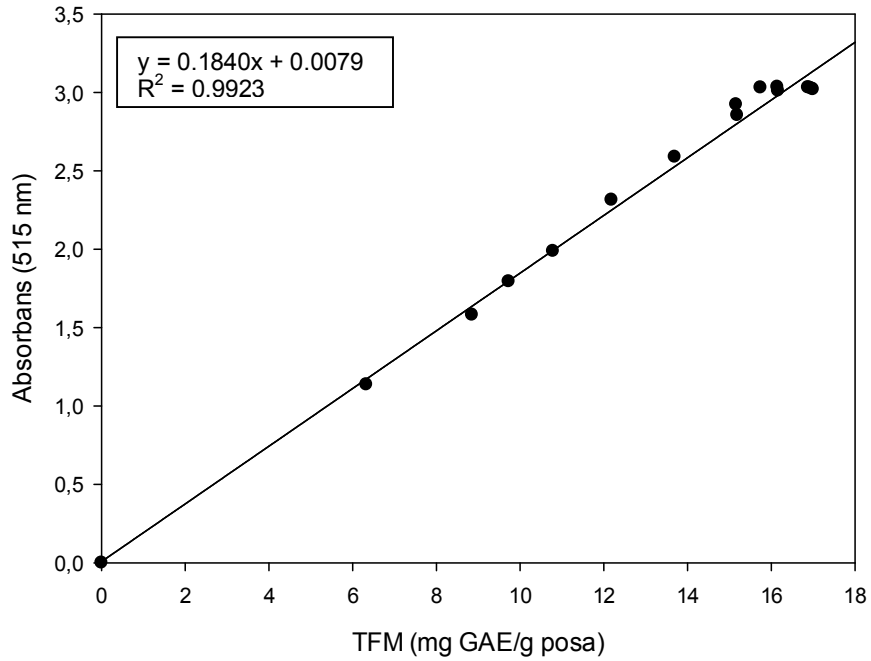
Şekil 4.9. 75 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki antosiyanin miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi



Şekil 4.10. 25 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi



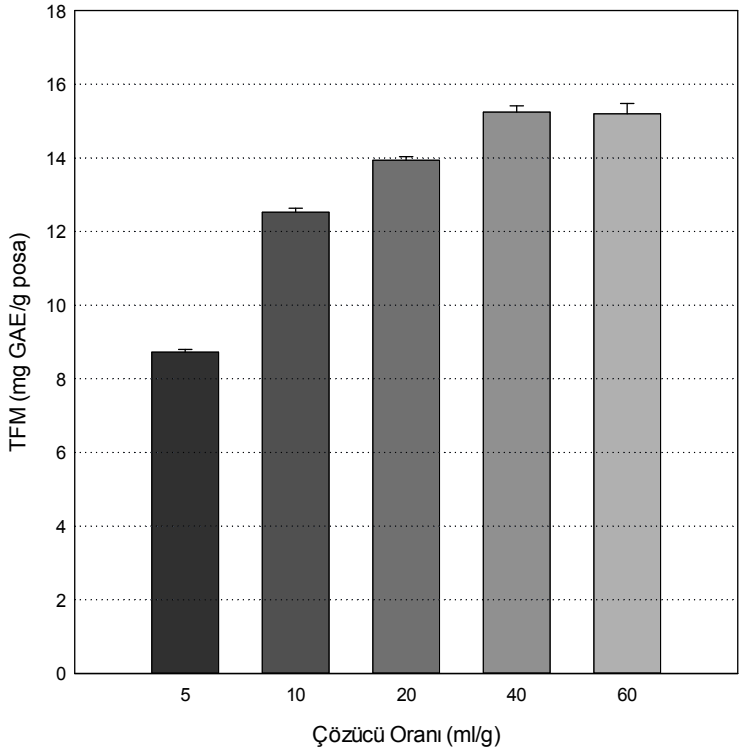
Şekil 4.11. 50 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi



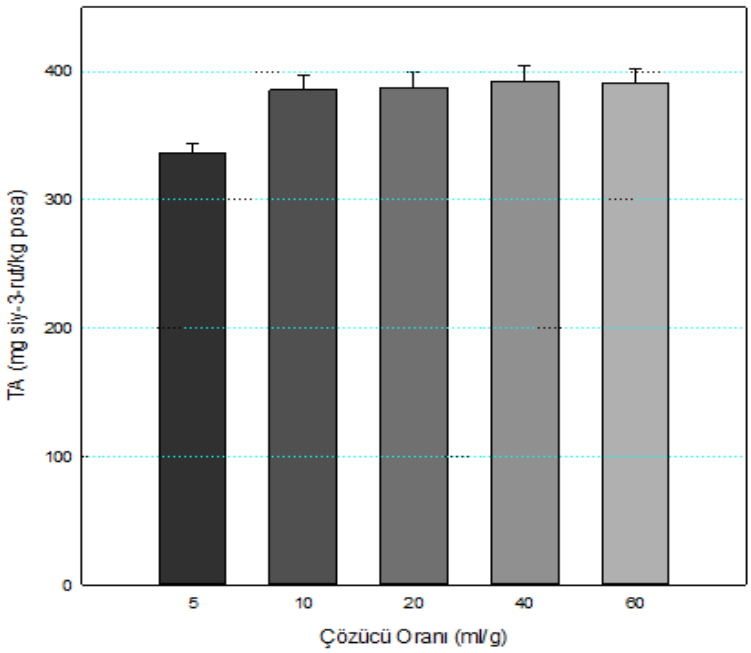
Şekil 4.12. 75 °C sıcaklıktaki ekstraksiyonda, ekstrakttaki fenolik madde miktarının (db) absorbans değerine göre değişimi

4.4. Çözücü Miktarının Etkisi

Çözücü miktarının limitini belirlemek için sıcaklık ve konsantrasyon sabit tutularak TFM miktarındaki ve TA miktarındaki değişim çözücü oranı 60 ml/g olana kadar hesaplanmış, TFM için 40 ml/g çözücü oranından sonra toplam fenolik geçişinin sabit kaldığı; TA için ise 10 ml/g çözücü oranından sonra sabit kaldığı gözlenmiştir (şekil 4.13. & şekil 4.14.). Sonuç olarak antosiyaninler için daha az miktarda çözücü ile sabit değerlere ulaşılabileceği söylenebilir. Maliyetler ve çevre düşünüldüğünde çözücü oranının minimum tutulması gerekmektedir. Nitekim optimizasyon çalışmasında da sınır değerleri olarak (- alfa, + alfa) 4, 14 ml/g gösterilmiş; program da 11 çözücü oranının optimum nokta olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.13. Toplam fenolik madde miktarının (db) çözücü miktarına göre değişimi (50 °C sıcaklık ve % 48 EtOH konsantrasyonunda ekstraksiyona tabi tutulmuştur).



Şekil 4.14. Toplam antosiyanin miktarının (db) çözücü miktarına göre değişimi (50 °C sıcaklık ve % 48 EtOH konsantrasyonunda ekstraksiyona tabi tutulmuştur).

4.5. Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Belirlenmesi

4.5.1. Renksiz Fenolik Bileşenlerin Tespiti

Renksiz fenolik bileşenlerin 280 ve 320 nm dalga boylarında vişne posasında neoklorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit ve kateşin varlığı tespit edilmiştir. Kateşin dışındaki renksiz fenolik maddeler hem 280 hem de 320 nm dalga boylarında tespit edilirken; kateşin yalnızca 280 nm'de tespit edilebilmiştir. Ekstraktlardaki renksiz fenolik maddeler arasında en yüksek miktar olarak neoklorojenik asit ve kateşin görülmüştür. Ekstraktlardaki en yüksek neoklorojenik asit miktarı 235.8 mg/kg posa, kafeik asit miktarı 37.4 mg/kg posa, *p*-kumarik asit miktarı 15.46 mg/kg posa, ferulik asit miktarı 3.02 mg/kg posa ve kateşin miktarı olarak da 223 mg/kg posa olarak bulunmuştur. Fenolik maddelerin ekstraksiyonu sıcaklıkla farklı şekillerde değişmektedir. Dolayısıyla sıcaklığa bağlı olarak her bir maddenin ayrı ayrı analizinin yapılması gerekmektedir. Luthria (2008), apiin ve asetil-apiin maddelerinin sıcaklıkla doğrusal olarak arttığını; malonil apiin miktarının ise sıcaklık artışıyla düştüğünü bildirmişlerdir. % 100 EtOH kullanılarak ekstrakte edilmiş numunelerde fenolik bileşenler çok

düşük seviyelerde tespit edilmiştir (< 1 mg/kg). En yüksek fenolik bileşenler optimum noktalarda belirlenmiştir. Analizi yapılan bütün ekstraktlar içerisinde fenolik maddelerin en yüksek değerleri % 50 EtOH konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı ekstraksiyon koşullarında elde edilmiştir. Sıcaklık ile madde miktarları arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca % 20 ve % 80 EtOH konsantrasyonları kıyaslandığında % 80 EtOH ile ekstrakte edilmiş numunelerde daha yüksek miktarda maddelerin tespit edildiği görülmüştür. Neoklorojenik asit miktarları kıyaslandığında % 80 EtOH ile ekstrakte edilmiş ürünlerin % 20 ile ekstrakte edilenlere kıyasla iki misli neoklorojenik asit içerdiği tespit edilmiştir. Bu durumun oluşmasının sebebi olarak da etanol konsantrasyonunun artışının çözeltinin dielektrik katsayısının düşüşüne sebebiyeti ve dolayısıyla çözücü moleküllerinin ayrılmasıyla gerekli enerjinin düşmesi ve çözünen moleküllerin bunların arasına rahatça girmesi olarak açıklanabilir (Pompeu ve ark., 2009). Neoklorojenik asit sonuçları programda analiz edildiğinde en optimum EtOH konsantrasyonunun % 60 oduğu sonucuna varılmıştır. Analizlere ait sonuçlar çizelge 4.6.'da verilmiştir.

4.5.2. Antosiyaninlerin Tespiti

Skrede ve ark. (2000) malvidin glikozitin en stabil; delfinidin glikozitin ise en düşük stabiliteye sahip antosiyaninler olduğunu rapor etmişlerdir. Elde ettiğimiz bulgulara göre de vişne posasından elde edilen en yüksek antosiyanin malvidin-3,5-diglikozit olarak tespit edilmiş; delfinidin glikozit ise tespit edilememiştir. Tüm ekstraktlar içerisinde en yüksek miktarda bulunan antosiyanin malvidin-3,5-diglikozit olarak tespit edilmiştir. Ekstraktlardaki en yüksek malvidin-3,5-diglikozit miktarı 210 mg/kg posa, siyanidin-3,5-di-O-glikozit miktarı 100.78 mg/kg posa, siyanidin-3-O-glikozit miktarı 19.88 mg/kg posa ve siyanidin-3-O-rutinozit miktarı olarak da 41.19 mg/kg posa tespit edilmiştir. % 20 ve % 80 EtOH konsantrasyonları kıyaslandığında, renksiz fenolik bileşenlerin aksine, antosiyaninlerin en yüksek görüldüğü konsantrasyon % 20 EtOH konsantrasyonu olarak tespit edilmiştir. Ayrıca malvidin-3,5-diglikozit miktarları Design Expert programında analiz edildiğinde modelin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmüştür. Malvidin-3,5-diglikozitin ekstakte edilmesinde en optimum koşullar olarak % 33 EtOH konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık ve 10 ml/g çözücü oranı

belirlenmiştir. Deney tasarımının birinci aşamasında elde ettiğimiz sonuçlar bu tespitleri destekler niteliktedir; çünkü TFM miktarı için optimum EtOH konsantrasyonu % 58; TA miktarı için ise % 40'dır. Bu durum da şu şekilde açıklanabilir: Antosiyaninlerin yapılarında glikozidik bağlar ve şekerler olduğu için renksiz fenolik maddelere kıyasla suda çözünürlükleri daha fazladır (Fan ve ark., 2008; Tall ve ark., 2004); bundan dolayı ekstraksiyon işleminde ortamda daha yüksek miktarda su bulunması ekstraksiyon verimini artırmıştır. Renksiz fenolik bileşenlerde olduğu gibi sıcaklık artışıyla tespit edilen antosiyanin miktarı arasında doğru orantı olduğu; sıcaklık artışıyla antosiyanin miktarında düşme olmadığı aksine artış olduğu görülmüştür. % 100 EtOH kullanılarak elde edilen ekstraktta antosiyanin tespit edilememiştir. Ayrıca çözücü oranı yüksek olan ekstraktlarda daha yüksek miktarlarda antosiyanin tespit edilmiştir. Sonuçlara ait veriler çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Renksiz fenolik bileşenler için ekstraksiyon koşulları ve tespit edilen maddelerin miktarları

Ekstraksiyon Koşulları			**Tespit Edilen Fenolik Maddeler (mg/kg posa)**					
Konsantrasyon (% EtOH)	Sıcaklık (°C)	Çözücü Oranı (ml/g)	neoklorojenik asit	kafeik asit	p-kumarik asit	ferulik asit	kateşin	TOPLAM
50	50	9	235.87	10.65	13.98	2.18	223.09	485.77
100	50	9	1.39	0.80	0.83	-	-	3.02
0	50	9	83.67	11.28	4.81	-	88.73	188.49
20	25	6	80.94	13.38	5.44	-	23.25	123.01
20	25	12	137.25	26.83	10.47	1.92	45.79	222.26
20	75	6	86.02	12.88	5.04	-	27.53	131.47
20	75	12	146.34	14.98	7.11	-	74.91	243.34
80	25	6	120.02	25.39	11.64	3.02	134.78	294.85
80	25	12	145.96	24.01	13.30	-	148.44	331.71
80	75	6	132.15	28.93	17.17	1.78	129.70	309.73
80	75	12	161.17	25.12	10.81	-	151.19	348.29

Çizelge 4.7. Antosiyaninler için ekstraksiyon koşulları ve tespit edilen maddelerin miktarları

Ekstraksiyon Koşulları			**Tespit Edilen Antosiyaninler (mg/kg posa)**				
Konsantrasyon (% EtOH)	Sıcaklık (°C)	Çözücü Oranı (ml/g)	malvidin-3,5-diglikozit	siyanidin-3,5-di-O-glikozit	siyanidin-3-O-glikozit	siyanidin-3-O-rutinosit	TOPLAM
50	50	9	209.89	40.43	11.16	26.72	288.2
100	50	9	-	-	-	-	-
0	50	9	97.14	37.71	7.21	11.90	153.96
20	25	6	138.11	28.46	7.39	16.52	190.48
20	25	12	175.04	51.69	11.40	21.36	259.49
20	75	6	152.55	51.13	10.08	20.33	234.09
20	75	12	205.73	100.79	19.88	41.19	367.59
80	25	6	84.68	25.43	5.75	10.84	126.70
80	25	12	99.55	49.50	17.24	24.22	190.51
80	75	6	105.95	27.37	6.93	13.24	153.49
80	75	12	132.52	52.89	10.86	21.72	217.99

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez kapsamında vişne posasından elde edilen kabukta fenolik maddelerin ekstrakte edilebilirliği ve bu işlemin optimizasyonu araştırılmıştır. Araştırmada maksimum TFM, TA ve % DPPH değerlerine ulaşılabilmesi için ekstraksiyon parametreleri (çözücü konsantrasyonu ve oranı, sıcaklık, zaman) incelenmiş ve optimum noktalar belirlenmiştir. TFM, TA ve % DPPH sonuçlarının maksimum olduğu noktalar olarak % 48 EtOH konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık, 11 ml/g çözücü oranı ve toplam fenolik madde miktarı için 60 – 100 dakika; toplam antosiyanin miktarı için ise 40 – 60 dakika ekstraksiyon süreleri optimum işlem parametreleri olarak belirlenmiştir. Üç faktör ekstraksiyona olan etkilerine göre şu şekilde sıralanabilir: sıcaklık > çözücü konsantrasyonu > çözücü oranı. Bu çalışmada sıcaklık artışının fenolik maddelerin ekstraksiyon verimini arttırdığı sonucuna varılmıştır. Maliyetler göz önüne alındığında sıcaklık değerinin düşük olması enerji tasarrufuna olumlu yansımaktadır; bu durumda bu işlemi uygulayacaklar için maliyet – verim hesabının yapılması gerekmektedir. Çevre ve maliyetler göz önüne alındığında çözücü miktarının da minimum miktarda tutulması gerekmektedir. Toplam fenolik madde ekstraksiyonunda en yüksek verim 40 ml/g çözücü oranında alınmıştır; bu miktarın artmasıyla fenolik madde miktarında artış gözlenmemiştir. Toplam antosiyanin miktarı göz önünde bulundurulduğunda 10 ml/g çözücü oranının üstünde antosiyanin miktarının sabit kaldığı görülmüştür. Farklı koşullarda ekstrakte edilen numunelerin absorbans değerleri ile TFM ve TA miktarları arasında korelasyon olduğu görülmüştür. Ekstraktların renginin ekstrakt verimi hakkında fikir verebileceği sonucuna varılmıştır.

Vişne posasından elde edilen ekstraktların tamamında malvidin-3,5-diglikozit en yüksek miktarda antosiyanin maddesi; neoklorojenik asit ise en yüksek miktarda renksiz fenolik bileşen olarak tespit edilmiştir. HPLC sonuçlarından elde edilen sonuçlar TFM ve TA miktarları analizlerinin sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Her iki bileşen için (renksiz fenolik bileşenler & antosiyanin bileşenler) % 50 EtOH konsantrasyonunda en yüksek verim elde edilmiştir. % 80 ve % 20 EtOH konsantrasyonları kıyaslandığında HPLC ile belirlenen antosiyaninlerin miktarlarının % 20 EtOH konsantrasyonunda; renksiz

fenolik bileşenlerin miktarının ise % 80 EtOH konsantrasyonunda daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Renksiz fenolik maddeler için en optimum EtOH konsantrasyonu % 60; antosiyaninlerden malvidin-3,5-diglikozit için ise % 33 olarak belirlenmiştir. HPLC analizlerinden elde edilen sonuçların toplam fenolik madde miktarı ve toplam antosiyanin miktarı analizleriyle paralellik gösterdiği görülmektedir.

Türkiye son yıllarda vişne üretiminde dünyada birinci sırada yer almaktadır. Üretilen vişnelerin büyük bölümünün vişne suyu konsantresine işlendiği bilinmekte ve önemli miktarlarda da posa atılmaktadır. Posada bulunan fenolik maddeler değerlendirilmemektedir. Yapılan optimizasyon sonuçlarından elde edilen en yüksek TFM ve TA miktarları (14.88 g/kg posa, 431 mg/kg posa) ve Türkiye'de vişne suyuna işlenen vişne miktarı ve posa hesaba alındığında yıllık yaklaşık 625 kg'ı antosiyaninler olmak üzere 22 500 kg fenolik maddenin değerlendirilmediği sonucuna varılmıştır. Vişne posası gıdalarda renklendirici olarak kullanıldığında içeriğinde yüksek miktarda bulunan renksiz fenolik maddeler de gıda içeriğine geçecektir. Böylece renksiz fenolik bileşenler antosiyaninlerin parçalanmasını engelleyici ajanlar olarak görev yapacağı gibi insan sağlığı yönünden de olumlu etkisi artmış olacaktır.

Dünya nüfusunun hızla arttığı, artışla birlikte de gıda işleyen fabrikaların artacağı düşünülürse gıda atık miktarları ve atık problemlerinin de artacağı öngörülmektedir. Bu nedenle atıkların toplanması, işlenmesi ve yeni ürünlerin üretiminde kullanılması insan sağlığı, çevre sağlığı ve ülke ekonomisi bakımından önem arz etmektedir. Günümüzde antosiyaninlerin çok pahalı ürünler olması endüstriyel atıklara olan ilgiyi her geçen gün artırmaktadır. Halen atık olarak veya hayvan yemi olarak değerlendirilen vişne posasında bu çalışma ile önemli miktarda fenolik maddelerinin bulunduğu belirlenmiş ve değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

ABOU-ARAB, A.A., ABU-SALEM, F.M., and ABOU ARAB, E.A., 2011. Physico-Chemical Properties of Natural Pigments (Anthocyanin) Extracted from Roselle Calyces (*Hibiscus subdariffa*). Journal of American Science, 7(7): 445-456.

AKDAĞ, E., 2011. Türkiye Meyve Suyu v.b. Ürünler Sanayi Raporu. Meyve Suyu Endüstrisi Derneği (MEYED).

ANONİM, 2011. http://www.tarim.gov.tr/uretim/

AOAC, 1985. Official Methods of Analysis (13. Baskı). Washington, DC. Association of Official Analytical Chemists.

AOCS, 1971. Official and Tentative Methods of Analysis of the American Oil Chemists' Society, Champaign, IL. USA.

BAKOWSKA-BARCZAK, A., 2005. Acylated Anthocyanins as Stable, Natural Food Colorants - A Review. Polish Journal of Food Nutrition Science, 14(55): 107-116.

BALLARD, T.S., MALLIKARJUNAN, P., ZHOU, K., and O'KEEFE, S.F., 2009. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Peanut Skins Using Response Surface Methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57: 3064-3072.

BAZYKINA, N.I., NIKOLAEVSKII, A.N., FILIPPENKO, T.A., and KALOEROVA, V.G., 2002. Optimization of Conditions for the Extraction of Natural Antioxidants from Raw Plant Materials. Pharmaceutical Chemistry Journal, 36(2): 100-103.

BİLEK, S.E., 2010. The Effects of Time, Temperature, Solvent:Solid Ratio and Solvent Composition on Extraction of Total Phenolic Compound from Dried Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. Gıda, 35(6): 411-416.

BLOIS, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. Nature, 181: 1199-1200.

BRIDLE, B., and TIMBERLAKE, C.F., 1996. Anthocyanins as Natural Food Colours-Selected Aspects. Food Chemistry, 58: 103-109.

CACACE, J.E., and MAZZA, G., 2003a. Optimization of Extraction of Anthocyanins from Black Currants with Aqueous Ethanol. Journal of Food Engineering and Physical Properties, 68: 240-248.

CACACE, J.E., and MAZZA, G., 2003b. Mass Transfer Process During Extraction of Phenolic Compounds From Milled Berries. Journal of Food Engineering, 59: 379–389.

CAVALCANTI, R. N., SANTOS, D. T., and MEIRELES, M. A. A., 2011. Non-Thermal Stabilization Mechanisms of Anthocyanins in Model and Food Systems-An Overview. Food Research International, 44: 499-509.

CEMEROĞLU, B., ve ARTIK, N., 1990. Isıl İşlem ve Depolama Koşullarının Nar Antosiyaninleri Üzerine Etkisi. Gıda, 15(1): 13-19.

CEMEROĞLU, B., (ED.) 2010. Gıda Analizleri. Bizim Grup Basımevi, 657, Ankara.

CHEN, Q., YU, H., TANG, H., and WANG, X., 2012. Identification and Expression Analysis of Genes Involved in Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in the Fruit of Blackberry. Scientia Horticulturae, 141: 61–68.

CORRALES, M., GARCIA, A.F., BUTZ, P., and TAUSCHER, B., 2008. Extraction of Anthocyanins From Grape Skins Assisted by High Hydrostatic Pressure. Journal of Food Engineering, 90: 415-421.

CROZIER, A., JENSEN, E., LEAN, M.E.J., and MCDONALD, M.S., 1997. Quantitative Analysis of Flavonoids by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatography, 761: 315-321.

DAI, J., and MUMPER, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules, 15: 7313-7352.

DIAS, S.F., VALENTE, D.G., and ABREU, J.M.F., 2003. Comparison Between Ethanol and Hexane for Oil Extraction from *Quercus suber* L. Fruits, Grasas y Aceites, 54(4): 378-383.

ERSUS, S.U., 2004. Kara Havuç (*Daucus carota* L.) Antosiyanin Ekstraktının Püskürtmeli Kurutucu Kullanılarak Mikroenkapsülasyonu. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, İzmir, 191s.

FAN, G., HAN, Y., GU, Z., and CHEN, D., 2008. Optimizing Conditions for Anthocyanins Extraction from Purple Sweet Potato using Response Surface Methodology (RSM), Swiss Society of Food Science and Technology, 41: 155-160.

FAO, www.fao.org, 2010

FLORES, M.I.A., ROMERO-GONZALEZ, R., FRENICH, A.G., and VIDAL, J.L.M., 2012. Analysis of Phenolic Compounds in Olive Oil by Solid-Phase Extraction and Ultra High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Food Chemistry, 134(4): 2465-2472.

GOULD, K., DAVIES, K., WINEFIELD, C., (ED.) 2009. Anthocyanins; Biosynthesis, Functions and Applications. Springer, 348, New York.

HARBOURNE, N., JACQUIER, J.C., MORGAN, D.J., and LYNG, J.G., 2008. Determination of the Degradation Kinetics of Anthocyanins in a Model Juice System Using Isothermal and Non-Isothermal Methods, Food Chemistry, 111: 204-208.

HOU, Z., QIN, P., ZHANG, Y., CUI, S., and REN, G., 2011. Identification of Anthocyanins Isolated From Black Rice (Oryza Sativa L.) and Their Degradation Kinetics. Food Research International, In Press.

KAHKONEN, M.P., HOPIA, A.I., VUORELA, H.J., RAUHA, J.P., PIHLAJA, K., KUJALA, T.S., and HEINONEN, M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(10): 3954-3962.

KARAASLAN, M., OZDEN, M., VARDIN, H., and TURKOGLU, H., 2011. Phenolic Fortification of Yogurt using Grape and Callus Extracts. Food Science and Technology 44: 1065-1072.

KHOO, G.M., CLAUSEN, M.R., PEDERSEN, B.H and LARSEN, E., 2011. Bioactivity and Total Phenolic Content of 34 Sour Cherry Cultivars. Journal of Food Composition and Analysis, 24(6): 772-776.

KIM, D. O., HEO, H. J., KIM, Y. J., YANG, H. S., and LEE, C. Y., 2005. Sweet and Sour Cherry Phenolics and Their Protective Effects on Neuronal Cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53(26): 9921-9927.

KIRCA, A., ÖZKAN, M., ve CEMEROGLU, B., 2007. Effects of Temperature, Solid Content and pH on the Stability of Black Carrot Anthocyanins. Food Chemistry, 101:212-218.

LUTHRIA, D., 2008. Influence of Experimental Conditions on the Extraction of Phenolic Compounds from Parsley (Petroselinum crispum) Flakes Using Liquid Extractor. Food Chemistry, 107: 745-752.

MAZZARACCHIO, P., TOZZI, S., BOGA, C., FORLANI, L., PIFFERI, P.G., and BARBIROLI, G., 2011. Interaction Between Gliadins and Anthocyan Derivatives. Food Chemistry, 129: 1100-1107.

MCGHIE, T.K., and WALTON, M.C., 2007. The Bioavailability and Absorption of Anthocyanins: Towards a Better Understanding. Molecular Nutrition Food Research, 51: 702-713.

MITIC, M.N., OBRADOVIC, M.V., GRAHOVAC, Z.B., and PAVLOVIC, A.N., 2010. Antioxidant Capacities and Phenolic Levels of Different Varieties of Serbian White Wines, Molecules, 15: 2016-2027.

MONRAD, J.K., HOWARD, L.R., KING, J.W., SRINIVAS, K., and MAUROMOUSTAKOS, A., 2010. Subcritical Solvent Extraction of Anthocyanins from Dried Red Grape Pomace. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58: 2862-2868.

NAKAMIYA, K., FURUICHI, T., and ISHII, K., 2003. Evaluation of the Optimal Washing Conditions for Dioxin-Contaminated Soils from the Circumference of an Incinerator, Journal of Material Cycles Waste Management, 5: 63-68.

NAKAYAMA, T., SUZUKI, H., and NISHINO, T., 2003. Anthocyanin Acyltransferases: Specificities, Mechanism, Phylogenetics, and Applications. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 23: 117-132.

OCHOA, M.R., KESSELER, A.G., MICHELIS, A., MUGRIDGE, A., and CHAVES, A.R., 2001. Kinetics of Colour Change of Raspberry, Sweet (*Prunus avium*) and Sour (*Prunus cerasus*) Cherries Preserves Packed in Glass Containers: Light and Room Temperature Effects. Journal of Food Engineering, 49: 55-62.

PATRAS, A., BRUNTON, N.P., O'DONNELL, C., and TIWARI, B.K., 2010. Effect of Thermal Processing on Anthocyanin Stability in Foods; Mechanisms and Kinetics of Degradation. Trends in Food Science & Technology, 21: 3-11.

PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., and NUNEZ, M.J., 2005. Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 2111-2117.

POMPEU, D.R., SILVA, E.M., and ROGEZ, H., 2009. Optimisation of the Solvent Extraction of Phenolic Antioxidants from Fruits of Euterpe Oleracea using Response Surface Methodology. Bioresource Technology, 100: 6076-6082.

REDDY, M.K., EXANDER – LINDO, R.L., and NAIR, M.G., 2005. Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 9268-9273.

RYAN, D., ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K and LAVEE, S., 2002. Biotransformations of Phenolic Compounds in *Olea europaea* L. Scientia Horticulturae, 92(2): 147-176.

SASS-KISS, A., KISS, J., MILOTAY, P., KEREK, M.M., and TOTH-MARKUS, M., 2005. Differences in Anthocyanin and Carotenoid Content of Fruits and Vegetables, 38: 1023–1029.

SHAO-QIAN, C., LIANG, L., and SI-YI, P., 2011. Thermal Degradation Kinetics of Anthocyanins and Visual Color of Blood Orange Juice. Agricultural Sciences in China,10(12): 1992-1997.

SILVA, E.M., ROGEZ, H., and LARONDELLE, Y., 2007. Optimization of Extraction of Phenolics from *Inga edulis* Leaves using Response Surface Methodology, Separation and Purification Technology 55: 381-387.

SKREDE, G., WROLSTAD, R.E., and DURST, R.W., 2000. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.). Journal of Food Science, 65: 357-364.

SPIGNO, G., TRAMELLI, L., and DE FAVERI, D.M., 2007. Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. Journal of Food Engineering, 81: 200-208.

STINTZING, F.C., and CARLE, R., 2004. Functional Properties of nthocyanins and Betalains in Plants, Food, and in Human Nutrition. Trends in Food Science & Technology, 15: 19-38.

SUN, Y., XU, W., ZHANG, W., HU, Q., and ZENG, X., 2011. Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidants from Kudingcha Made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using Response Surface Methodology. Separation and Purification Technology 78: 311-320.

TALL, J.M., SEERAM, N.P., ZHAO, C., NAIR, M.G., MEYER, R.A., and RAJA, S.N., 2004. Tart Cherry Anthocyanins Suppress Inflammation-Induced Pain Behaviour in Rat. Behavioural Brain Research, 153: 181-188.

TSAO, R., and DENG, Z., 2004. Separation Procedures for Naturally Occurring Antioxidant Phytochemicals. Journal of Chromatography B, 812: 85-99.

VICHAPONG, J., SOOKSERM, M., SRIJESDARUG, V., SWATSITANG, P., and SRIJARANAI, S., 2010. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activites in Rice Varieties. Food Science and Technology, 43(9): 1325-1330.

WROLSTAD, R. E., (ED.) 1976. Color and Pigment Analyses in Fruit Products. Agricultural Station Bulletin, Vol. 624. Oregon State University.

YAĞCI, S., and GÖĞÜŞ, F., 2008. Response Surface Methodology for Evaluation of Physical and Functional Properties of Extruded Snack FoodsDeveloped from Food-by-Products. Journal of Food Engineering, 86: 122-132.

YANG, B., LIU, X., and GAO, Y., 2009. Extraction Optimization of Bioactive Compounds (Crocin, Geniposide and Total Phenolic Compounds) from Gardenia (*Gardenia jasminoides* Ellis) Fruits with Response Surface Methodology. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10: 610-615.

YILDIZ, H., ve BAYSAL, T., 2003. Bitkisel Fenoliklerin Kullanım Olanakları ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri. Gıda Mühendisliği Dergisi, 29-35.

YIM, H.S., CHYE, F.Y., KOO, S.M., MATANJUN, P., HOW, S.E., and HO, C.W., 2011. Optimization of Extraction Time and Temperature for Antioxidant Activity of Edible Wild Mushroom, *Pleurotus porrigens*. Food and Bioproducts Processing, In Press.

ZHENG, W., and WANG, S.Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(11): 5165-5170.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Aksaray'da doğdu. 2009 yılında Gaziantep Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans eğitimine başladı. 2010 yılında Harran Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümüne araştırma görevlisi olarak atandı.

EK 1. TFM analizine ait program çıktısı

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob >F	
Model	322.97	6	53.83	51.03	<0.0001	significant
A-Konsantrasyon	0.30	1	0.30	0.28	0.6044	
B-Sıcaklık	99.00	1	99.00	93.86	<0.0001	
C-Çözücü oranı	11.86	1	11.86	11.25	0.0064	
A^2	210.97	1	210.97	200.02	<0.0001	
B^2	12.53	1	12.53	11.88	0.0055	
C^2	5.74	1	5.74	5.44	0.0396	
Residual	11.60	11	1.05			
Lack of Fit	11.03	8	1.38	7.25	0.0654	not significant
Pure Error	0.57	3	0.19			
Cor Total	334.57	17				

EK 2. TA analizine ait program çıktısı

ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

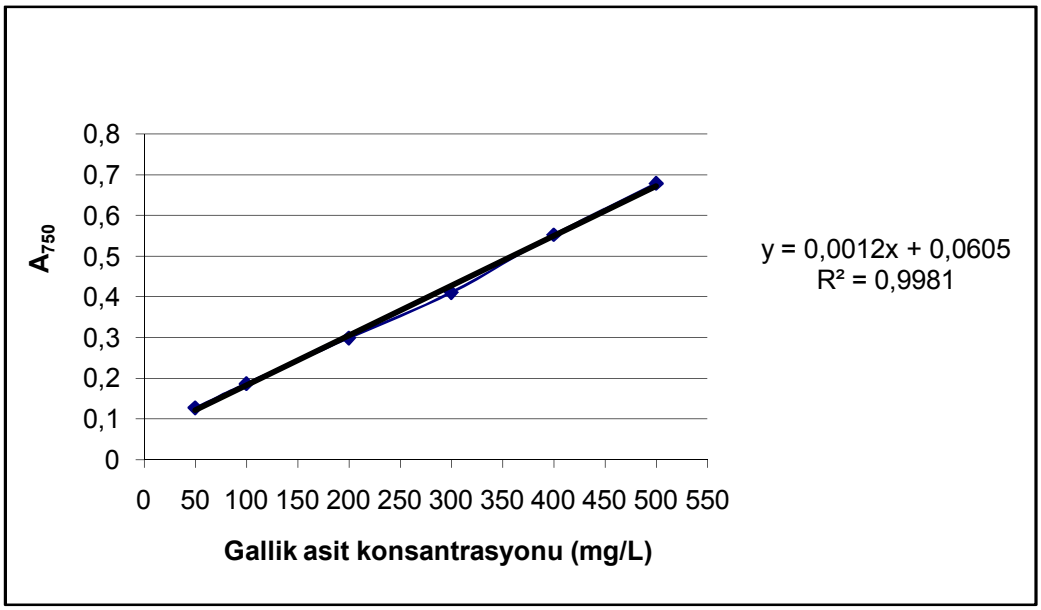
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Model	2.251E+005	6	37519.16	65.47	< 0.0001	significant
A-Konsantrasyon	17418.07	1	17418.07	30.40	0.0002	
B-Sıcaklık	35252.78	1	35252.78	61.52	< 0.0001	
C-Çözücü oranı	4639.41	1	4639.41	8.10	0.0159	
A^2	1,667E+005	1	1,667E+005	290.85	< 0.0001	
B^2	3100.17	1	3100.17	5.41	0.0402	
C^2	4450.91	1	4450.91	7.77	0.0177	
Residual	6303.60	11	573.05			
Lack of Fit	3836.25	8	479.53	0.58	0.7592	not significant
Pure Error	2467.34	3	822.45			
Cor Total	2.314E+005	17				

EK 3. % DPPH analizine ait program çıktısı

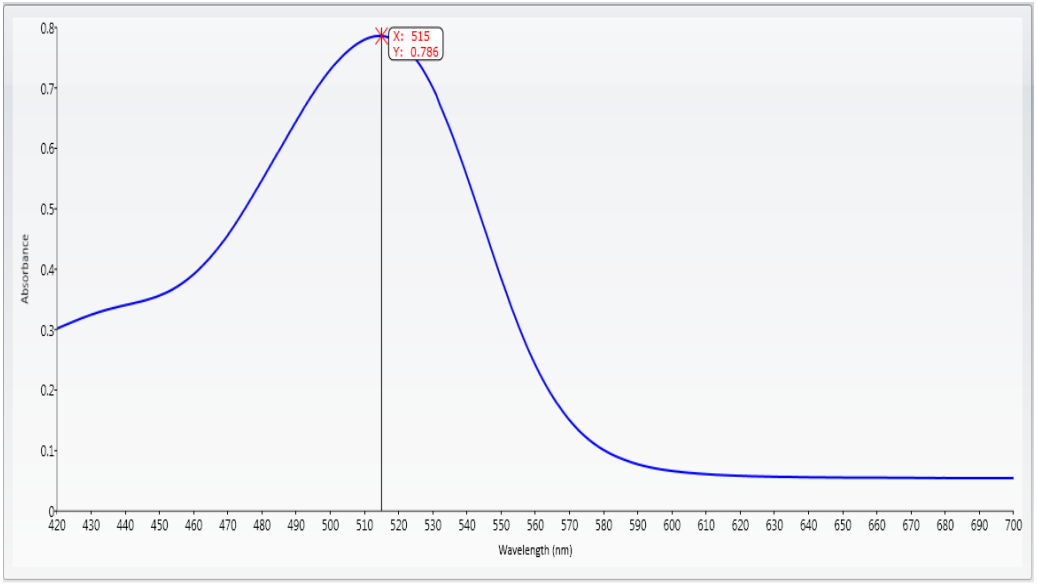
ANOVA for Response Surface Reduced Quadratic Model
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	2227.79	7	318.26	164.02	<0.0001	significant
A-Konsantrasyon	104.83	1	104.83	54.03	< 0.0001	
B-Sıcaklık	235.56	1	235.56	121.41	< 0.0001	
C-Çözücü oranı	44.13	1	44.13	22.75	0.0008	
BC	10.24	1	10.24	5.28	0.0445	
A^2	1800.47	1	1800.47	927.94	< 0.0001	
B^2	39.21	1	39.21	20.21	0.0012	
C^2	12.84	1	12.84	6.62	0.0278	
Residual	19.40	10	1.94			
Lack of Fit	18.22	7	2.60	6.60	0.0746	not significant
Pure Error	1.18	3	0.39			
Cor Total	2247.19	17				

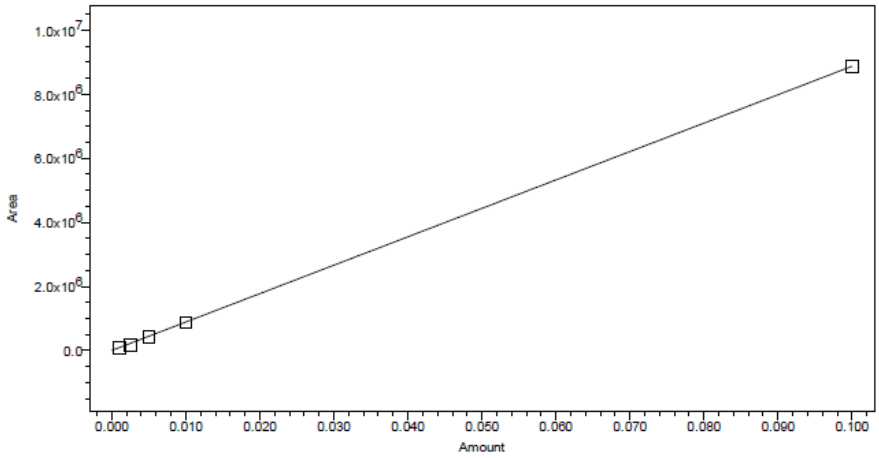
EK 4. Gallik asit standart eğrisi



EK 5. Vişne ekstraktına ait spektral eğri



EK 6. Neoklorojenik asit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi

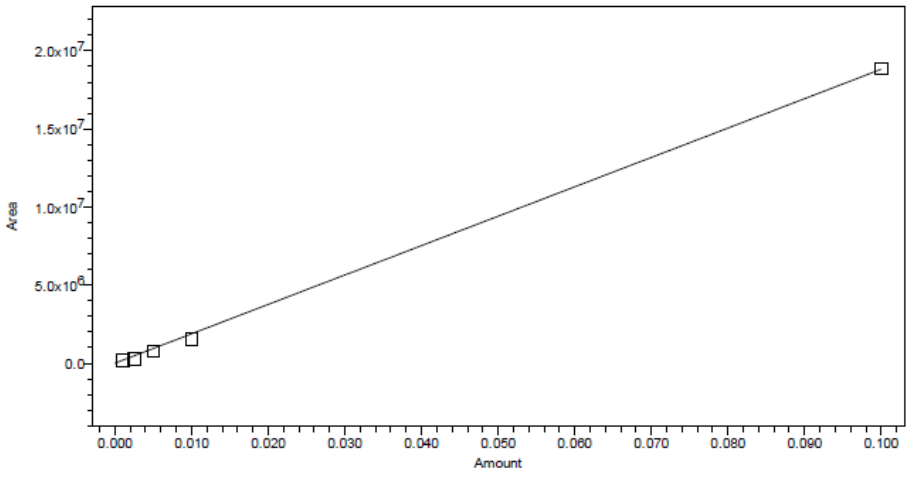


Peak Name: neochlorogenic acid; RT: 3.468; Fit Type: Linear thru Zero; Cal Curve Id: 6468; R: 0.999983; R^2: 0.999965; Weighting: None; Equation: Y = 8.87e+007 X; Normalized Intercept/Slope: 0.000000; RSD(E): 1.074865

Peak: neochlorogenic acid

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual
1	yeni std 1ppm	6472	neochlorogenic acid	Level 1	0.001	96473.999	0.001	8.75	No
2	yeni std 2.5ppp	6480	neochlorogenic acid	Level 2	0.003	182382.997	0.002	-17.77	No
3	yeni std 5 ppm	6482	neochlorogenic acid	Level 3	0.005	430928.997	0.005	-2.85	No
4	yeni std 10 ppm	6484	neochlorogenic acid	Level 4	0.010	871670.996	0.010	-1.74	No
5	yeni std 100 ppm	6486	neochlorogenic acid	Level 5	0.100	8874417.037	0.100	0.03	No

EK 7. Kafeik asit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi

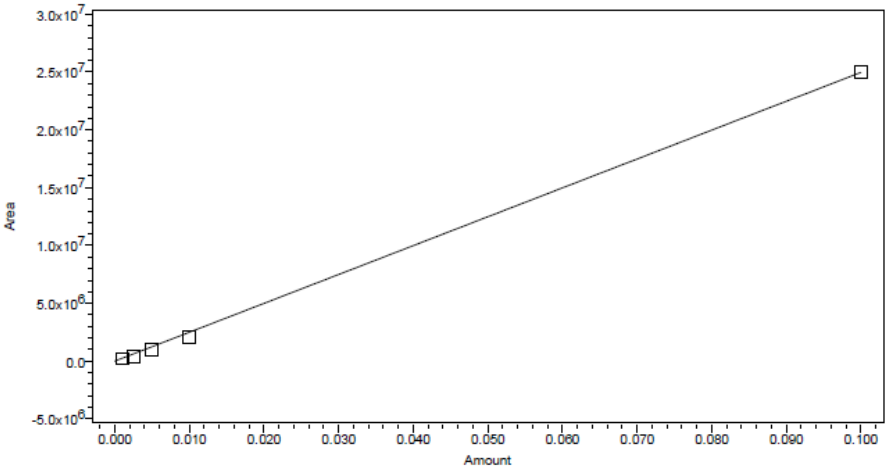


Peak Name: caffeic acid; RT: 6.596; Fit Type: Linear thru Zero; Cal Curve Id: 6469; R: 0.999675; R^2: 0.999350; Weighting: None; Equation: Y = 1.88e+008 X; Normalized Intercept/Slope: 0.000000; RSD(E): 4.801870

Peak: caffeic acid

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	yeni std 1ppm	6472	caffeic acid	Level 1	0.001	148907.999	0.001	-20.87	No	No
2	yeni std 2.5ppp	6480	caffeic acid	Level 2	0.003	292066.005	0.002	-37.92	No	No
3	yeni std 5 ppm	6482	caffeic acid	Level 3	0.005	752204.009	0.004	-20.06	No	No
4	yeni std 10 ppm	6484	caffeic acid	Level 4	0.010	1563583.020	0.008	-16.92	No	No
5	yeni std 100 ppm	6486	caffeic acid	Level 5	0.100	18865446.966	0.100	0.25	No	No

EK 8. *p*-kumarik asit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi

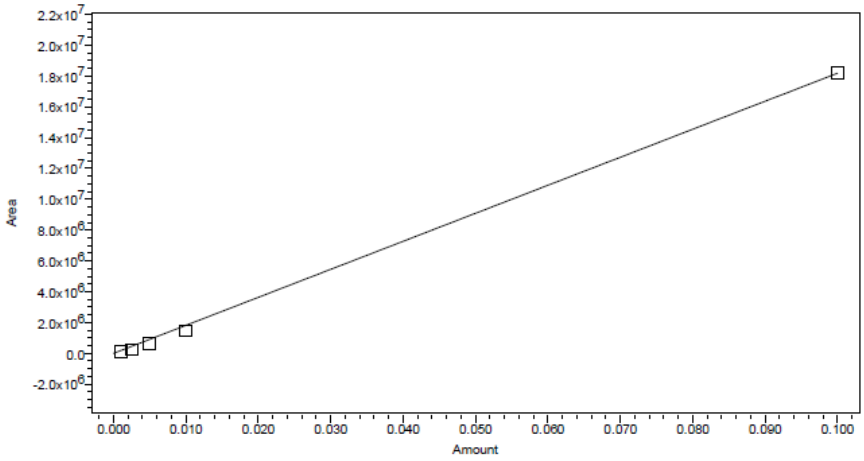


Peak Name: p-coumaric acid; RT: 10.748; Fit Type: Linear thru Zero; Cal Curve Id: 6470; R: 0.999668; R^2: 0.999335; Weighting: None; Equation: Y = 2.50e+008 X; Normalized Intercept/Slope: 0.000000; RSD(E): 4.859609

Peak: p-coumaric acid

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual
1	yeni std 1ppm	6472	p-coumaric acid	Level 1	0.001	197946.002	0.001	-20.74	No
2	yeni std 2.5ppp	6480	p-coumaric acid	Level 2	0.003	384135.000	0.002	-38.47	No
3	yeni std 5 ppm	6482	p-coumaric acid	Level 3	0.005	995507.006	0.004	-20.27	No
4	yeni std 10 ppm	6484	p-coumaric acid	Level 4	0.010	2070010.489	0.008	-17.11	No
5	yeni std 100 ppm	6486	p-coumaric acid	Level 5	0.100	25034821.262	0.100	0.25	No

EK 9. Ferulik asit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi

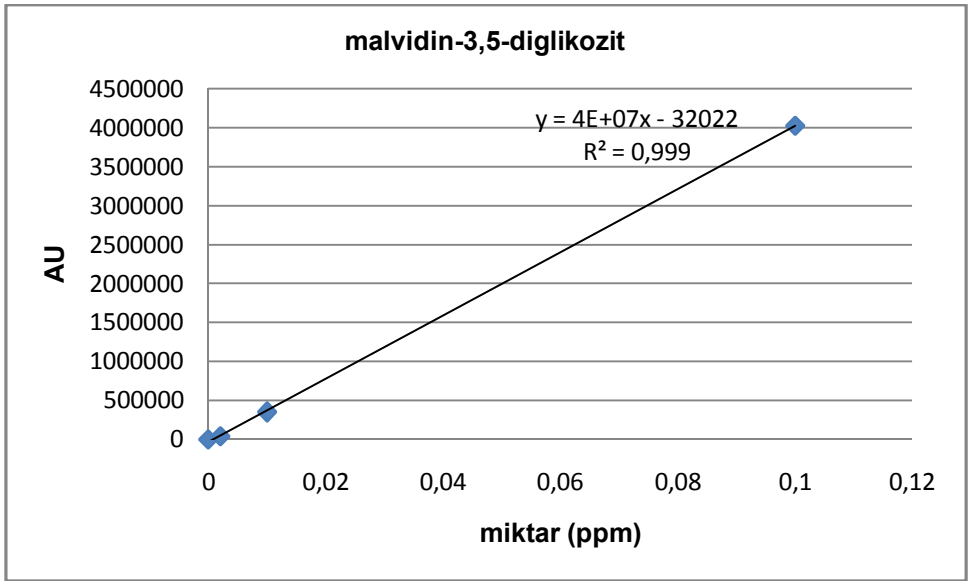


Peak Name: ferulic acid; RT: 13.765; Fit Type: Linear thru Zero; Cal Curve Id: 6471; R: 0.999505; R^2: 0.999010; Weighting: None; Equation: Y = 1.82e+008 X; Normalized Intercept/Slope: 0.000000; RSD(E): 5.994699

Peak: ferulic acid

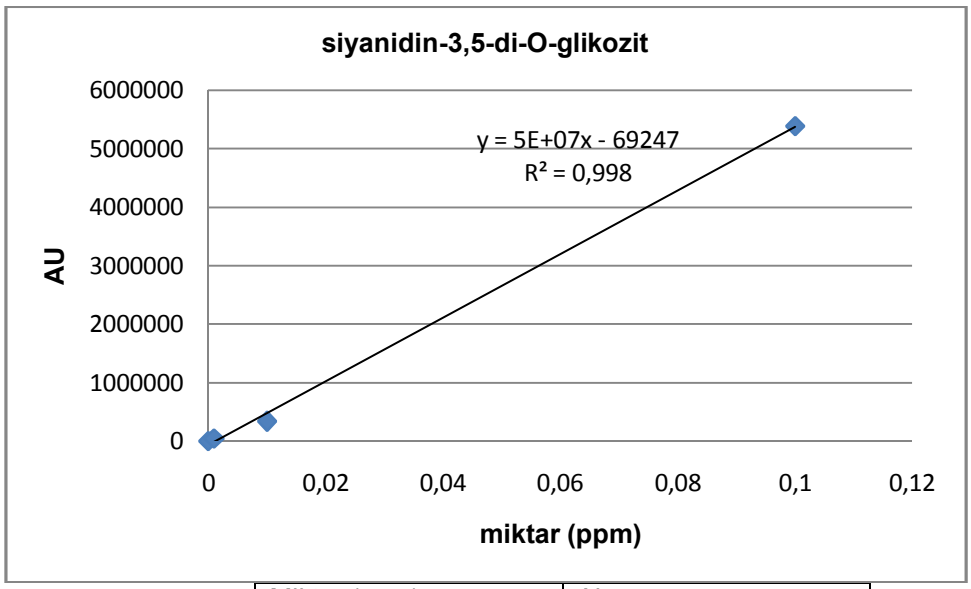
	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore
1	yeni std 1ppm	6472	ferulic acid	Level 1	0.001	128908.999	0.001	-29.07	No	No
2	yeni std 2.5ppp	6480	ferulic acid	Level 2	0.003	250551.000	0.001	-44.85	No	No
3	yeni std 5 ppm	6482	ferulic acid	Level 3	0.005	636249.997	0.004	-29.98	No	No
4	yeni std 10 ppm	6484	ferulic acid	Level 4	0.010	1463668.006	0.008	-19.46	No	No
5	yeni std 100 ppm	6486	ferulic acid	Level 5	0.100	18227460.055	0.100	0.30	No	No

EK 10. Malvidin-3,5-diglikozit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi



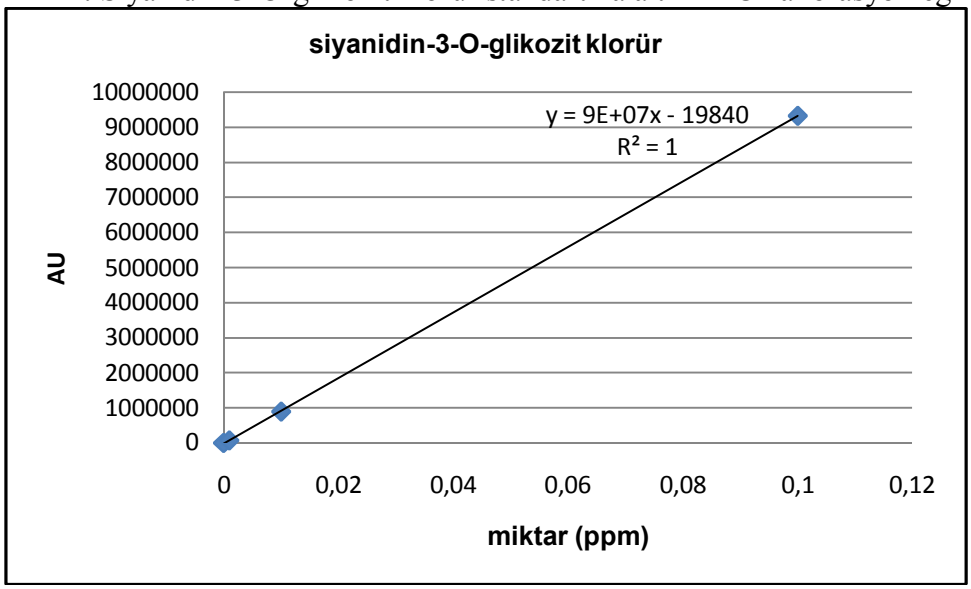
Miktar (ppm)	Alan
0.002	40699
0.01	347389
0.1	4028800
Alıkonma Zamanı	*16.367*

EK 11. Siyanidin-3,5-di-O-glikozit standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi



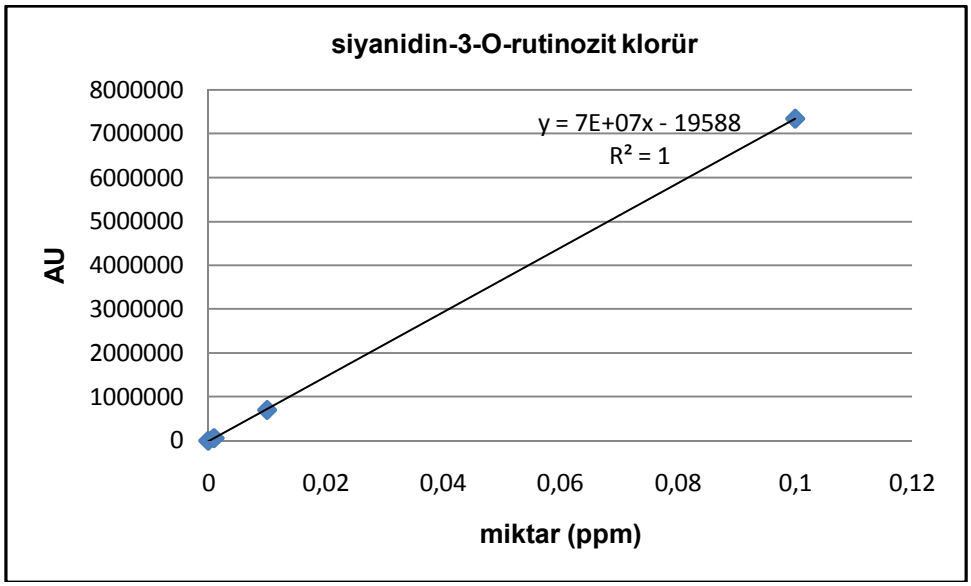
Miktar (ppm)	Alan
0.001	44807
0.01	332640
0.1	5388443
Alıkonma Zamanı	*9.945*

EK 12. Siyanidin-3-O-glikozit klorür standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi



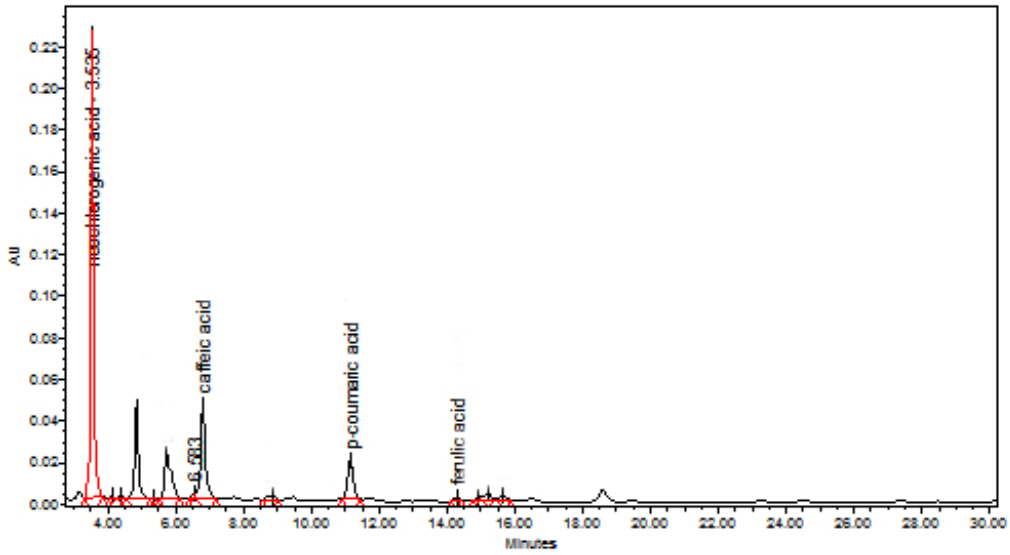
Miktar (ppm)	Alan
0.001	74318
0.01	891308
0.1	9322668
Alıkonma Zamanı	*19.213*

EK 13. Siyanidin-3-O-rutinozit klorür standartına ait HPLC kalibrasyon eğrisi

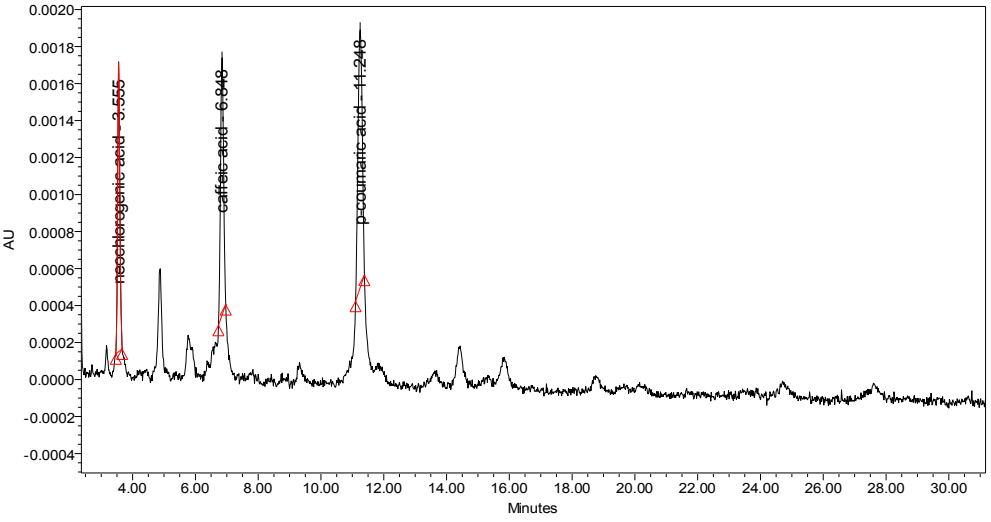


Miktar (ppm)	Alan
0.001	53616
0.01	695970
0.1	7350521
Alıkonma Zamanı	*21.454*

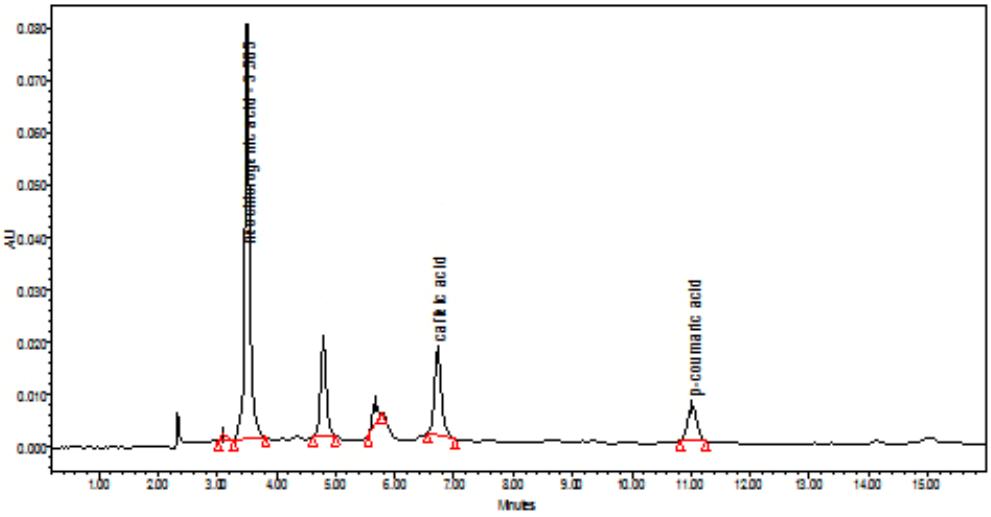
EK 14. % 50 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



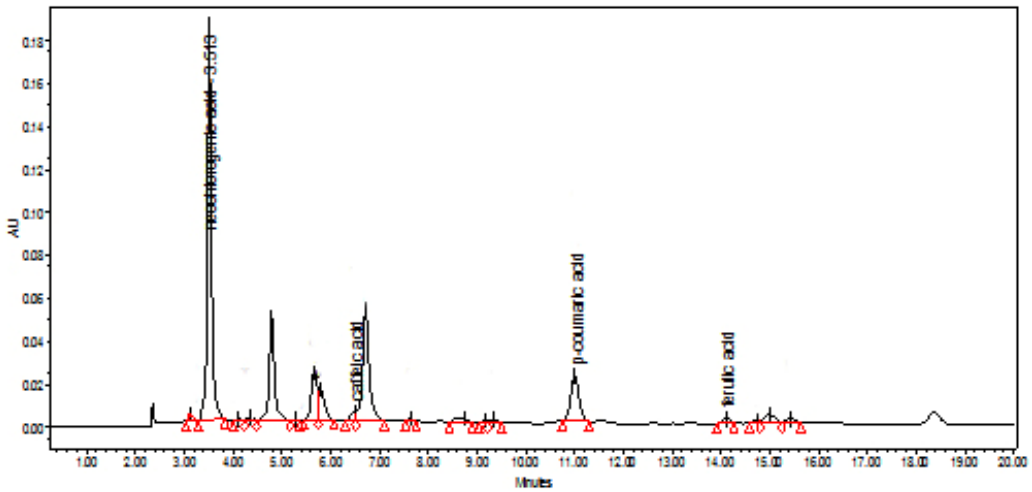
EK 15. % 100 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



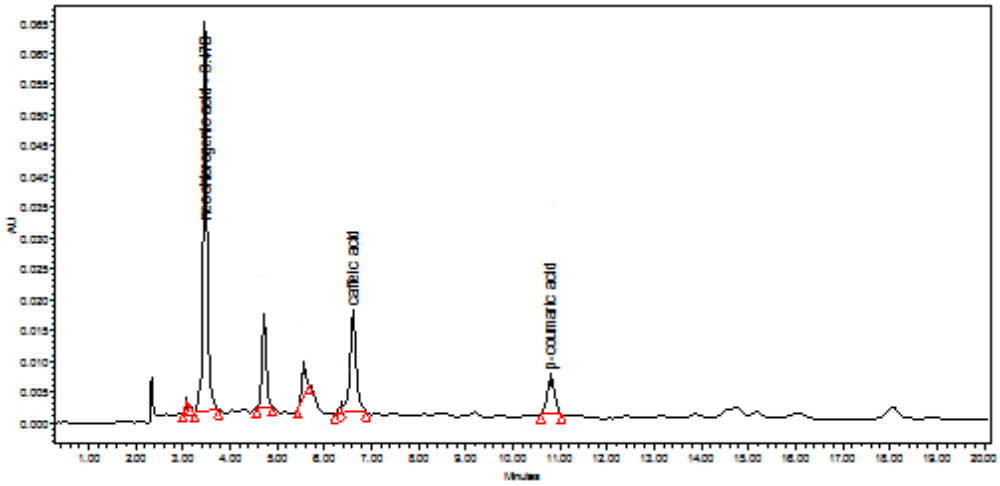
EK 16. % 0 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



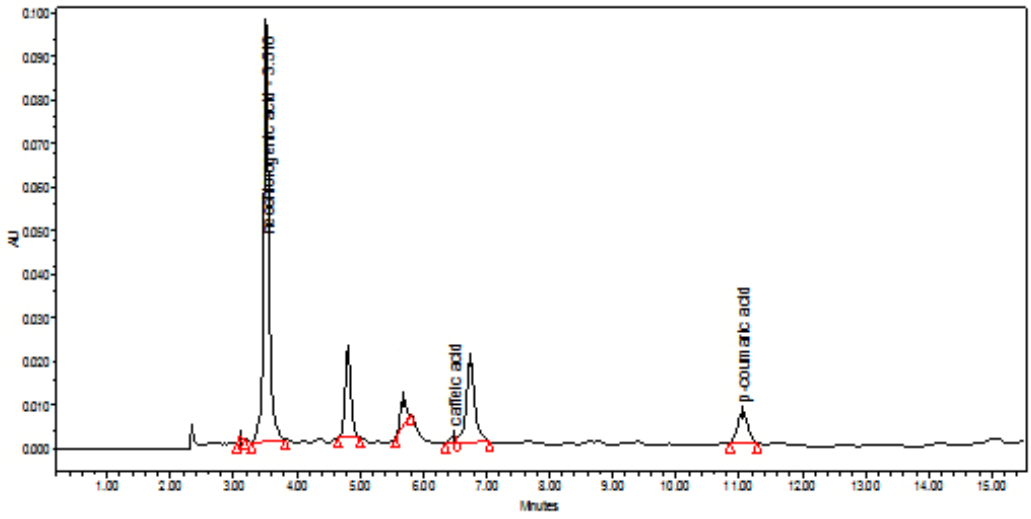
EK 17. % 20 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



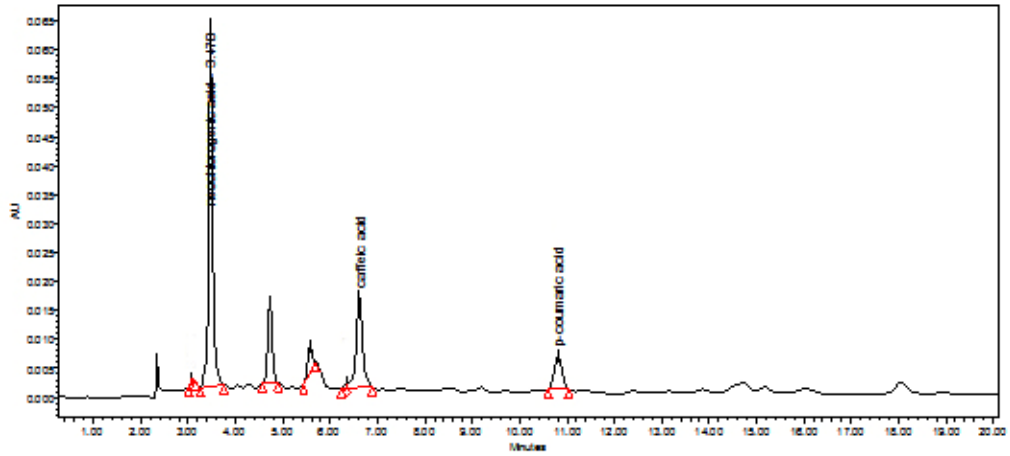
EK 18. % 20 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



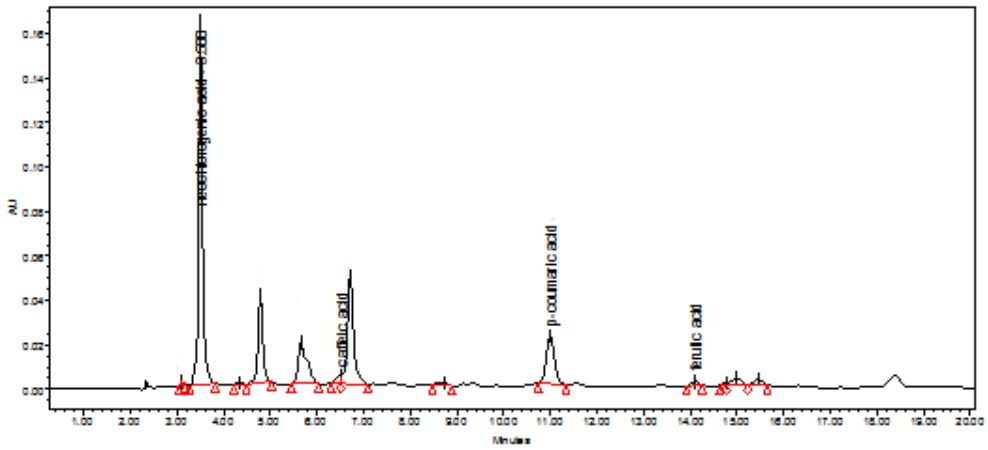
EK 19. % 20 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



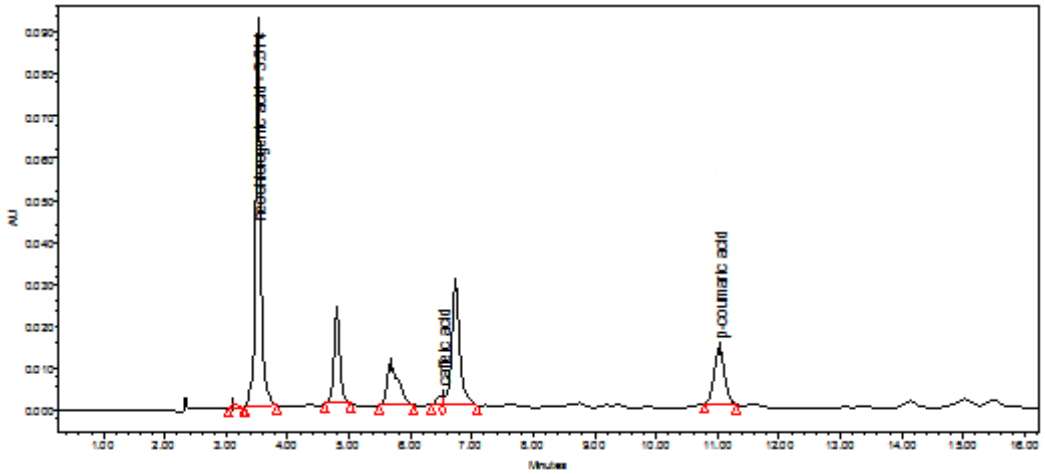
EK 20. % 20 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



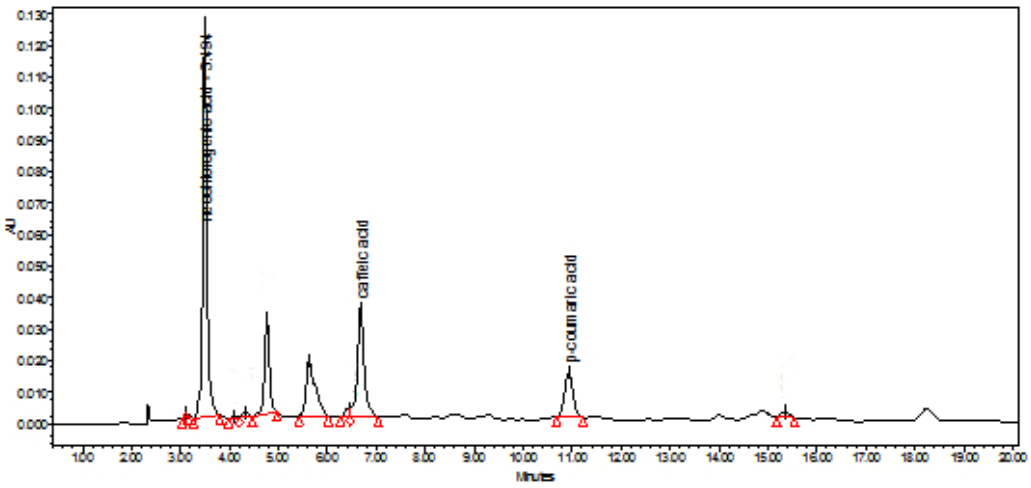
EK 21. % 80 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



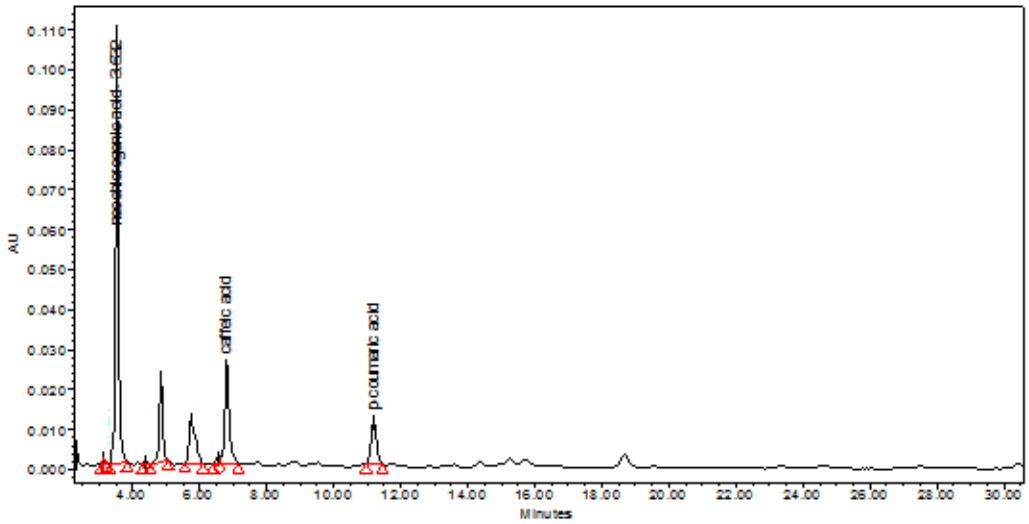
EK 22. % 80 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



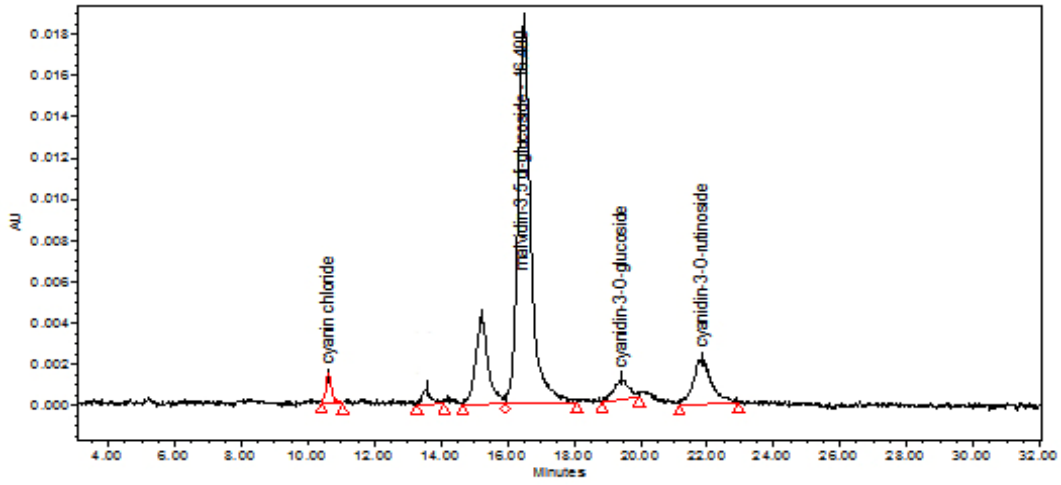
EK 23. % 80 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



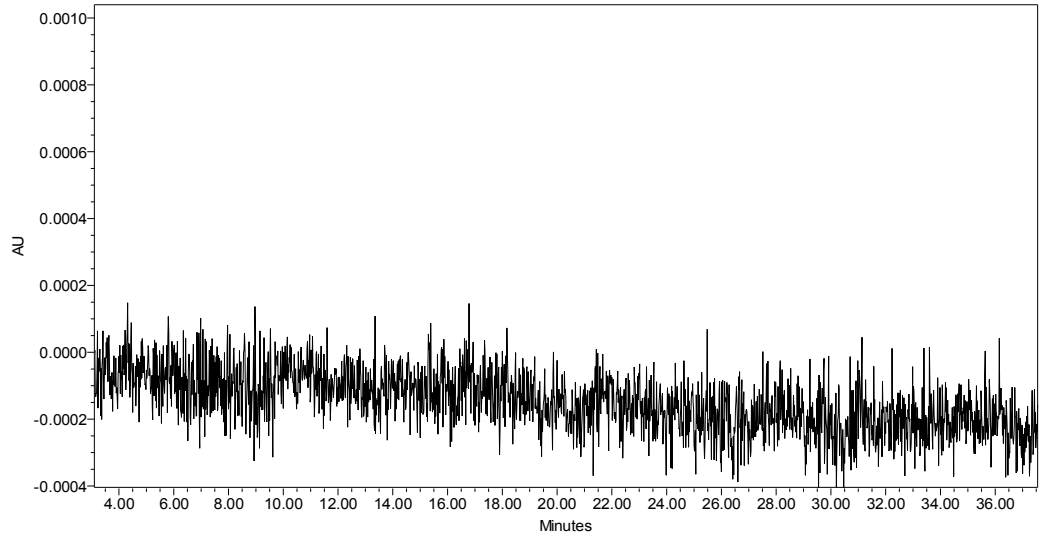
EK 24. % 80 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın renksiz fenolik bileşenlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (320 nm)



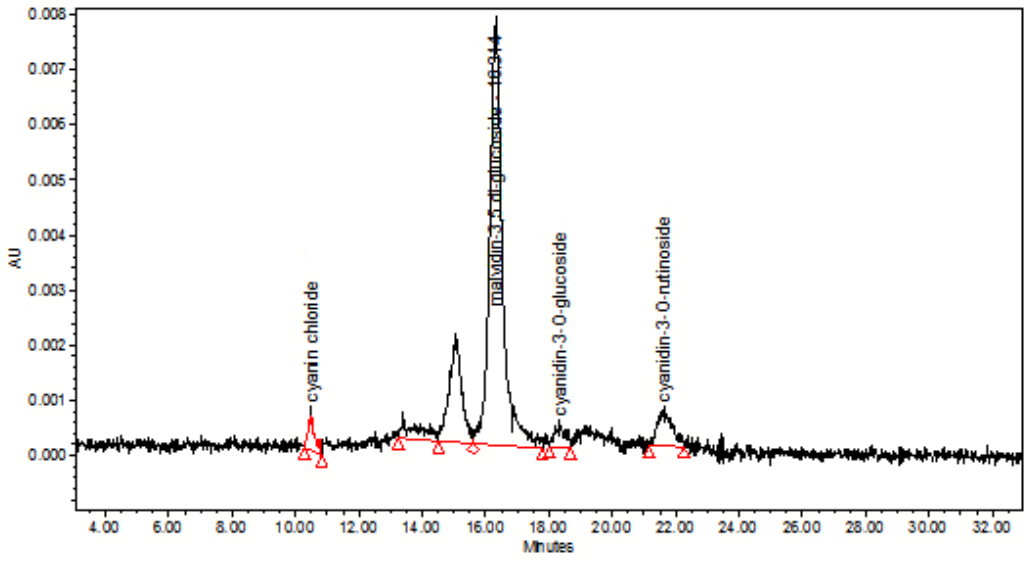
EK 25. % 50 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



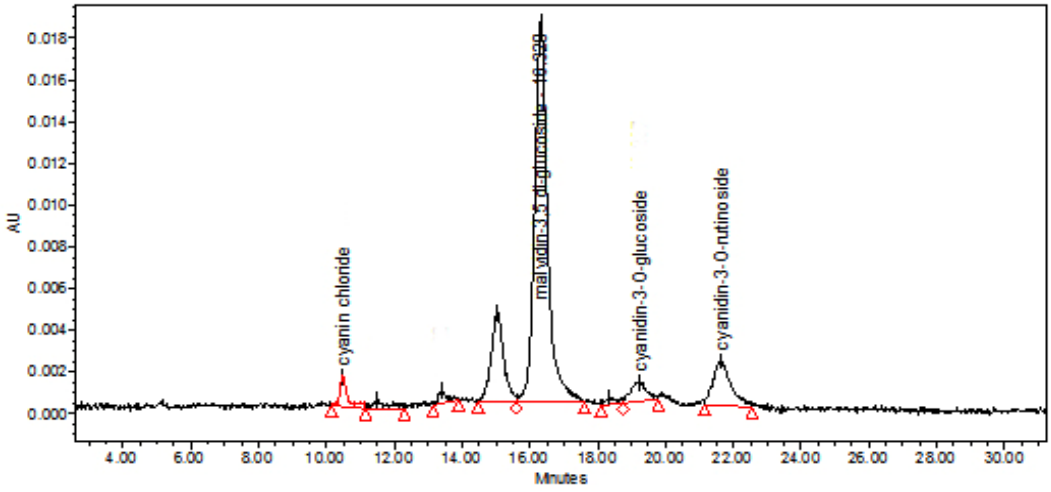
EK 26. % 100 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



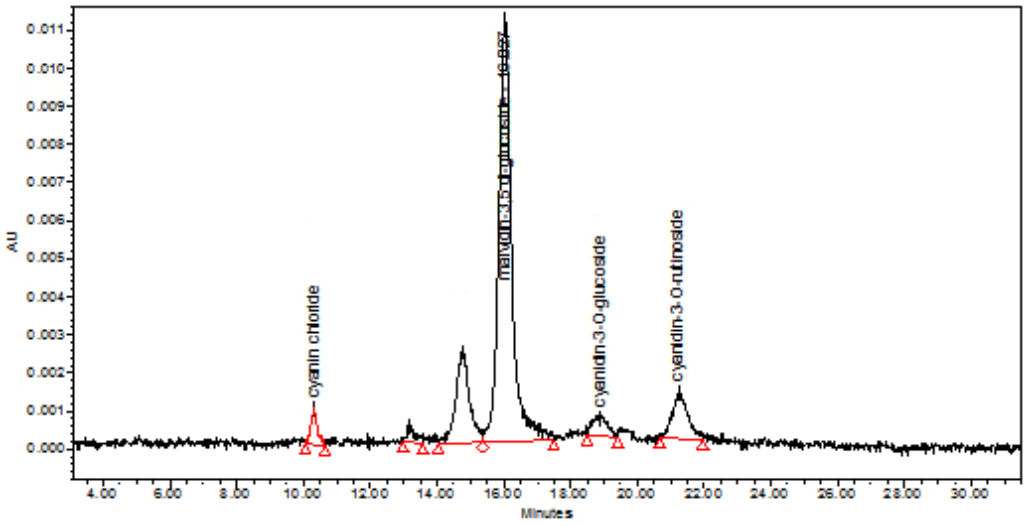
EK 27. % 0 Etanol konsantrasyonu, 50 °C sıcaklık ve 9 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



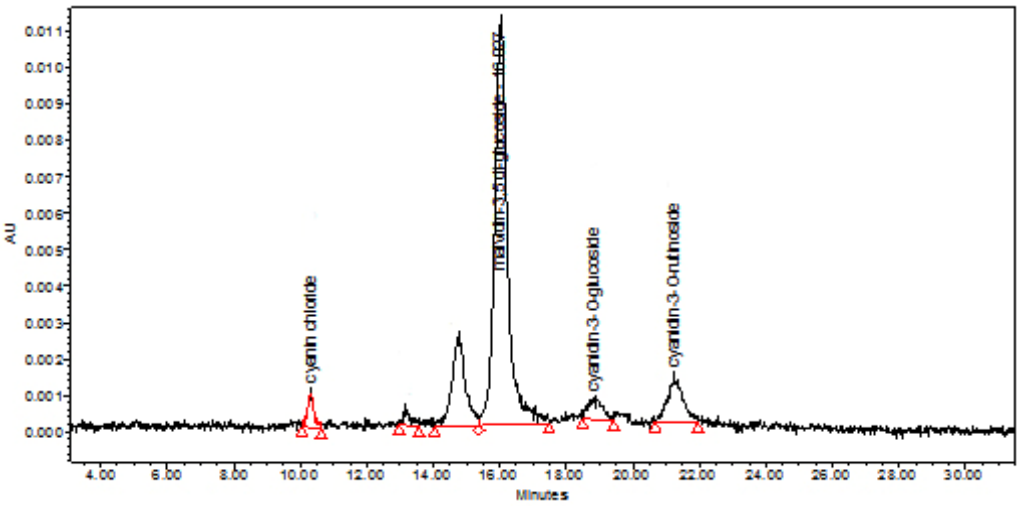
EK 28. % 20 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



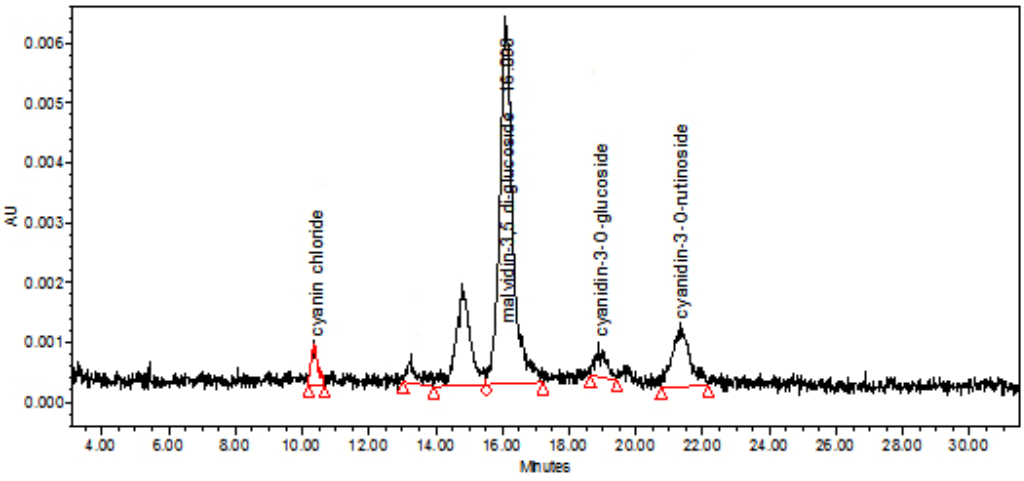
EK 29. % 20 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



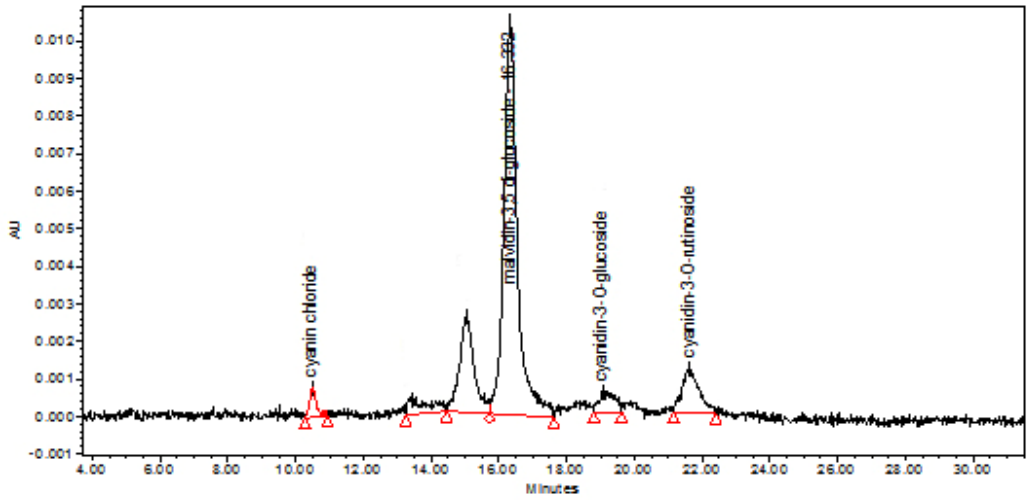
EK 30. % 20 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



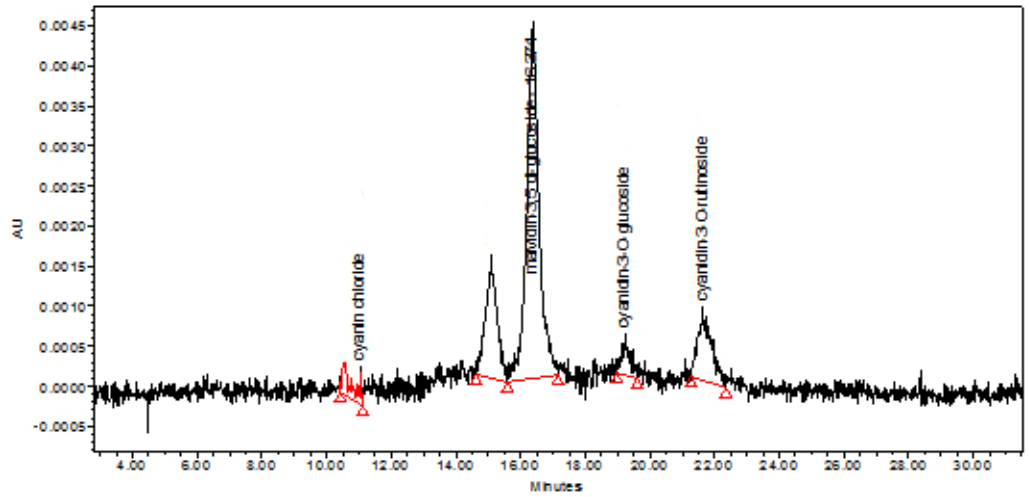
EK 31. % 20 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



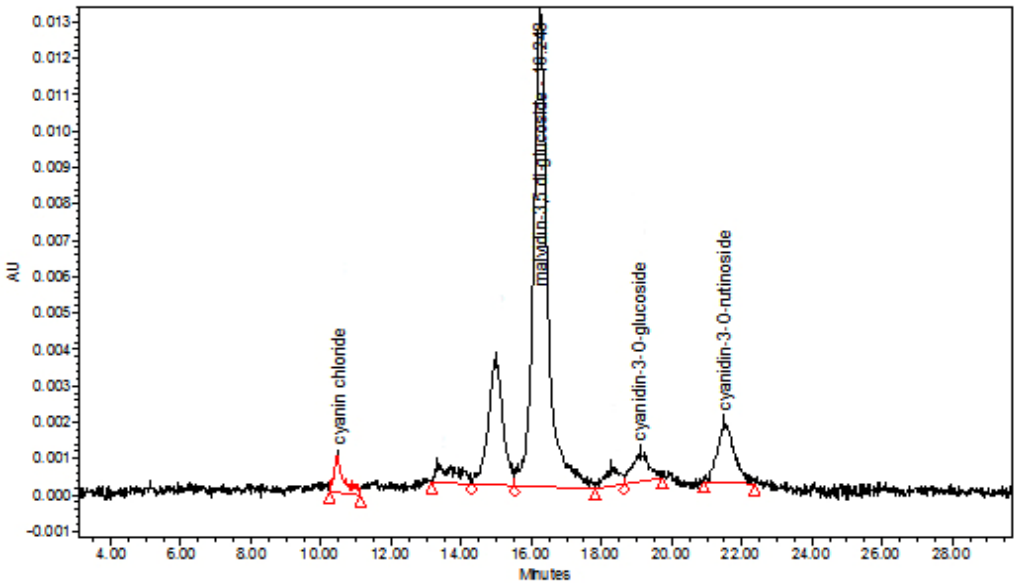
EK 32. % 80 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



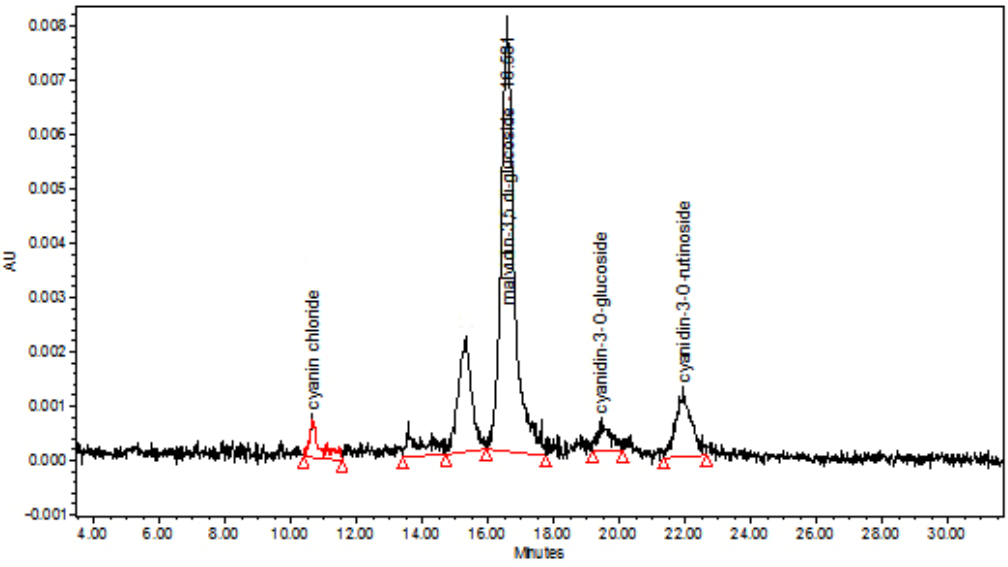
EK 33. % 80 Etanol konsantrasyonu, 25 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



EK 34. % 80 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 6 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



EK 35. % 80 Etanol konsantrasyonu, 75 °C sıcaklık ve 12 ml/g çözücü oranı kullanılarak elde edilen ekstraktın antosiyaninlerine ait HPLC kromatogram görüntüsü (520 nm)



ÖZET

Bu çalışmada, meyve suyu üretim tesislerinden endüstriyel atık olarak çıkan vişne posasından fenolik maddelerin ekstrakte edilebilirliği ve bu işlemin optimizasyonu araştırılmıştır. Araştırmada maksimum toplam fenolik madde, toplam antosiyanin ve % DPPH değerlerine ulaşılabilmesi için ekstraksiyon parametreleri (çözücü konsantrasyonu ve oranı, sıcaklık, zaman) incelenmiş ve optimum noktalar belirlenmiştir. Ayrıca, farklı ekstraksiyon şartlarında vişne posasından ekstrakte edilebilecek fenolik maddeler ve antosiyaninlerin HPLC ile belirlenmesi çalışmaları yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre;

- Vişne suyu üretim hattında etkili bir presleme işlemi uygulanmasına rağmen posada önemli miktarda biyoaktif maddelerin varlığı tespit edilmiştir.
- Toplam fenolik madde, toplam antosiyanin miktarı ve antioksidan kapasitesi göz önünde bulundurulduğunda optimum ekstraksiyon koşulları olarak; % 48 EtOH çözeltisi (çözücü), 75 °C ekstraksiyon sıcaklığı, 11 (ml/g) çözücü/kabuk oranı ve 1 saatlik ekstraksiyon süresi belirlenmiştir.
- Toplam fenolik madde miktarındaki değişim ile toplam antosiyanin miktarındaki değişim arasında önemli derecede korelasyon saptanmıştır ($p<0.001$).
- Ekstraktların absorbans değerleri ile toplam fenolik madde & antosiyanin değerleri arasında doğrusal bir korelasyon belirlenmiştir.
- Vişne posasında fenolik maddelerin tespiti yapılmıştır. Posada değişen miktarlarda neoklorojenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kateşin, malvidin-3,5-diglikozit, siyanidin-3,5-di-O-glikozit, siyanidin-3-O-glikozit klorür ve siyanidin-3-O-rutinozit klorür tespit edilmiştir.
- Yapılacak çalışmalarla hızlı ve uygun şekilde, posanın sap ve çekirdekten ayırma işlemi için uygun prosesler geliştirilmeli ve vişne posası gıda katkı maddesi elde edilmesinde değerlendirilmelidir.

SUMMARY

In this work, the attainability of phenolic compounds extraction from sour cherry pomace, purged from fruit juice production plants as byproduct, and the optimization of the extraction process was investigated. In the study, extraction parameters (solvent concentration and ratio, temperature, time) were investigated to obtain maximum total phenolic compound, total anthocyanin and % DPPH values and optimum points were determined. Furthermore, identification studies of extractable phenolic compounds and anthocyanins from sour cherry pomace at different extraction conditions were carried out. According to the results;

- Significant amount of bioactive compounds were detected in the sour cherry pomace even effective pressing process is applied at the sour cherry juice production line.
- 48 % EtOH solution, 75 °C extraction temperature, 11 (ml/g) solvent ratio and circa. 1 hour operation is determined as optimum extraction parameters while considering the highest total phenolic compound, amount of total anthocyanin and antioxidant capacity.
- A significant correlation between total phenolic compunds and total anthocyanin contents was observed ($p<0.001$).
- A linear relationship between absorbances and total phenolic & anthocyanin content of extracts was determined.
- Identification of phenolic compounds were carried out. Varying amounts of neochlorogenic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, catechin, malvidin-3,5-diglucoside, cyanidin-3,5-di-O-glucoside, cyanidin-3-O-glucoside chloride and cyanidin-3-O-rutinoside were detected in sour cherry pomace.
- Rapid and convenient processes should be developed via studies to separate seed and stem from peel and sour cherry pomace should be evaluated as food additives.