HOROZİBİĞİ (*Amaranthus caudatus* L.) ÇİÇEKLERİNDEN BETALAİNLER VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN VAKUM MİKRODALGA-DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU VE ENKAPSÜLASYONU

VACUUM MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND ENCAPSULATION OF BETALAINS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM AMARANTH (*Amaranthus caudatus* L.) FLOWERS

NUR SENA AKDENİZ

Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

Güzel aileme,

ÖZET

HOROZİBİĞİ (*Amaranthus caudatus* L.) ÇİÇEKLERİNDEN BETALAİNLER VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN VAKUM MİKRODALGA-DESTEKLİ EKSTRAKSİYONU VE ENKAPSÜLASYONU

Nur Sena AKDENİZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Elif YOLAÇANER

Nisan 2025, 147 sayfa

Horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus* L.), sahip olduğu pembe-mor renkli çiçeklerinin betalain içeriği ile potansiyel bir doğal gıda renklendiricisi olmasının yanında fenolik bileşiklerce zengin olması ve yüksek antioksidan kapasitesiyle son yıllarda öne çıkmaktadır. Fakat doğal kaynaklardan elde edilen biyoaktif bileşiklerin kararlılığının düşük olması sebebiyle kullanımları kısıtlıdır. Geleneksel yöntemlerle ekstraksiyon uzun sürdüğü ve yüksek miktarlarda çözücü gerektirdiği için, daha kısa sürelerde daha verimli ekstraksiyon sağlayabilen yeni nesil yeşil ekstraksiyon yöntemlerinden olan vakum mikrodalga destekli teknoloji geliştirilmiştir. Enkapsülasyon uygulamaları ile bu doğal renk maddelerinin ve sağlık açısından değerli biyoaktif bileşiklerin kararlılığının arttırılması amaçlanmaktadır. Bu enkapsülasyon yöntemlerinden biri olan niyozomlar, yüzey aktif maddeler kullanılarak biyoaktif bileşiklerin taşınmasını sağlayan veziküllerdir.

Yapılan literatür araştırması sonucunda ve bilgilerimiz dahilinde horozibiği çiçeğinden betalainlerin ve fenolik bileşiklerin yeni nesil vakum mikrodalga destekli ekstraksiyon

yöntemiyle elde edildiği ve ardından bu biyoaktif bileşiklerin depolama sürecinde kararlılığının korunması amacıyla niyozom veziküler yapılarıyla enkapsüle edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında geleneksel ve yeni nesil vakum mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleriyle horozibiği çiçeğinden betalain ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu yapılmış, sonuçlar karşılaştırmalı olarak incelenmiş, ardından renk ve biyoaktif bileşiklerin kararlılığının arttırılması için niyozom yöntemi ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon ve enkapsülasyonda sırasıyla uygun proses şartları ve formülasyonların optimizasyonu yanıt yüzey metodu ile belirlenmiştir.

Konvansiyonel ekstraksiyon (KE) yöntemi olarak maserasyon ve yeni nesil ekstraksiyon yöntemi olarak da vakum mikrodalga destekli ekstraksiyon (VMDE) kullanılmış ve yanıt yüzey metodu kullanılarak proses şartlarının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. İki yöntem için de 3 seviyeye sahip 4 bağımsız değişkenin olduğu Box-Behnken deney tasarımı seçilmiştir. KE için belirlenmiş bağımsız değişkenler; süre (1, 2 ve 3 sa), sıcaklık (30, 40 ve 50°C), etanol yüzdesi (%20, 40 ve 60) ve örnek:çözücü oranı (1:10, 1:20 ve 1:30 g:mL) ve VMDE için belirlenmiş bağımsız değişkenler ise basınç (150, 300 ve 450 mmHg), süre (3, 9 ve 15 dk), etanol yüzdesi (%20, 40 ve 60) ve örnek:çözücü oranı (1:10, 1:20 ve 1:30 g:mL)'dır. Tüm ekstrakt örneklerinde yanıt olarak, toplam betalain miktarı (TBM), toplam fenolik madde miktarı (TFM) ve toplam antioksidan kapasite (TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC}) analizleri gerçekleştirilmiştir.

KE için belirlenmiş şartlarda yapılan deneyler sonucunda, elde edilen yanıtların aralıkları, TBM için 1554.67-2918.67 mg betalain/kg kuru ağırlık; TFM için 9.19-14.81 mg GAE/g kuru ağırlık; TAK_{DPPH} için 34.08-109.55 mmol TE/kg kuru ağırlık ve TAK_{CUPRAC} için 107.53-167.02 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. VMDE yöntemi ile yapılan deneyler sonucunda ise yanıtların aralıkları, TBM için 993.54-3153.58 mg betalain/kg kuru ağırlık; TFM için 5.54-17.04 mg GAE/g kuru ağırlık; TAK_{DPPH} için 21.86-101.42 mmol TE/kg kuru ağırlık ve TAK_{CUPRAC} için 69.42-195.39 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Her iki yöntem için de elde edilen yanıtlara göre gerçekleştirilen optimizasyon uygulamalarında, KE için optimum çalışma koşulları 1 saat ekstraksiyon süresi, 50 °C sıcaklık, % 40.99 etanol yüzdesi ve 1:10 g/mL örnek:çözücü oranı bulunmuştur. VMDE için optimum çalışma şartları ise, 450 mmHg basınç değeri, 12 dakika ekstraksiyon süresi, % 30.74 etanol yüzdesi ve 1:23.9 g/mL örnek:çözücü oranı olarak belirlenmiştir.

Her iki yöntemde de optimum şartlarda elde edilmiş olan ekstrakt örneklerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiş ve KE ile partikül yapısı daha parçalı ve düzensiz görünürken; VMDE ile daha pürüzsüz ve gözenekli yapılar gözlenmiştir. Ayrıca, ekstrakt örneklerinde betalain kompozisyonu analizi için Q-TOF LC/MS uygulanmış ve optimum şartlarda elde edilmiş ekstraktların içerdiği betalain miktarları, betanin eşdeğeri cinsinden KE ve VMDE için sırasıyla 6393.17 ppm ve 9256.50 ppm olarak hesaplanmıştır.

Ekstraksiyon sonuçlarına göre, VMDE yönteminin KE'ye göre 1/5 oranında daha kısa sürede, daha düşük oranda etanol kullanılarak ve daha verimli sonuçlar verdiği gözlenmiştir. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerinin TBM değeri KE ile %38.26, VMDE ile %44.27 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, niyozomal enkapsülasyon yöntemiyle devam etmek için VMDE yöntemindeki optimum şartlarda elde edilen ekstrakt örnekleri kullanılmıştır.

Enkapsülasyonda uygun formülasyon ve ultrason süresinin belirlenmesi için yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyon gerçekleştirilmiştir ve bağımsız değişkenler sürfektanların molar oranı (Span60:Tween 80, mol:mol), ekstrakt: sürfektan oranı (mg ekstrakt/ 100 mg sürfektan), kolesterol: sürfektan oranı (mg kolesterol/ 100 mg sürfektan) ve sonikasyon süresi (s) olarak seçilmiştir. Box-Behnken deneysel tasarımına göre gerçekleştirilen deneylerde yanıt olarak toplam betalain miktarı (TBM), toplam fenolik madde miktarı (TFM), toplam antioksidan kapasite (TAK_{CUPRAC}) ve kırmızı renk değeri (a*) ölçümleri yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre uygulanan optimizasyon sonrası elde edilen optimum koşullar, 1:1 sürfektanların molar oranı (Span60: Tween 80), 8.109 mg ekstrakt/100 mg sürfektan, 0.1 mg kolesterol/ 100 mg sürfektan ve 81.877 s ultrason süresi olarak bulunmuştur. Ayrıca optimum koşuldaki niyozom örneklerinin ısıl kararlılık, 30 günlük depolama sonucu stabilite, TEM, FT-IR, parçacık boyutu ve zeta potansiyeli analizleri de gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen ısıl kararlılık deneylerine göre %67.35 ve %65.73 olarak bulunan KE ve VMDE ısıl kararlılık oranları, niyozom yöntemiyle %97.974'e yükselmiştir.

Bu tez çalışmasının sonucunda, horozibiği çiçeğinin doğal gıda renklendiricisi olarak değerlendirilmesi amacıyla betalainlerin ve fenolik bileşiklerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu için VMDE yönteminin süre ve çözücü gereksinimi açısından daha sürdürülebilir ve verimli olduğu; ayrıca niyozom yöntemi ile enkapsülasyonun betalain

ve fenolik bileşiklerin stabilitesinin arttırmada etkili bir strateji sunduğu belirlenmiştir. Bu doğrultuda doğal renklendiricilerin gıda endüstrisindeki kullanım potansiyelinin artırılması için vakum mikrodalga destekli ekstraksiyon teknolojisinin ve niyozomal enkapsülasyonun birlikte kullanımı önerilmektedir

Anahtar Kelimeler: Horozibiği çiçeği, betalain, fenolik bileşik, vakum mikrodalga-destekli ekstraksiyon, niyozom yöntemi, optimizasyon

ABSTRACT

VACUUM MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION AND ENCAPSULATION OF BETALAINS AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM AMARANTH (*Amaranthus caudatus* L.) FLOWERS

Nur Sena AKDENİZ

Master of Science, Department of Food Engineering

Supervisor: Asst. Prof. Elif YOLAÇANER

April 2025, 147 pages

Amaranthus caudatus L., with its pink-purple flowers rich in betalains, has gained attention in recent years as a potential natural food colorant due to its high phenolic content and strong antioxidant capacity. However, the limited stability of bioactive compounds of the natural sources limits their applications. Because extraction with traditional methods takes a long time and requires high amounts of solvent, vacuum microwave-assisted technology, which is a new generation green extraction method that can provide more efficient extraction in shorter times, has been developed. Encapsulation techniques have been introduced to enhance the stability of these natural pigments and health-promoting bioactive compounds. Among these, niosomes are vesicular carriers composed of surfactants that facilitate the delivery of bioactive compounds.

According to the literature review and common knowledge, no study has been found that extracts betalains and phenolic compounds from amaranth flowers using vacuum microwave-assisted extraction and subsequently encapsulates them in niosomal vesicular structures for stability enhancement. Therefore, in this thesis, betalain and phenolic compound extraction from amaranth flowers was performed using both conventional and vacuum microwave-assisted extraction methods, and the results were comparatively analyzed. Subsequently, niosomal encapsulation was applied to improve the stability of the extracted pigments and bioactive compounds. The optimization of process conditions and formulations for extraction and encapsulation was conducted using the response surface methodology (RSM).

Maceration was used as the conventional extraction (CE) method, while vacuum microwave-assisted extraction (VMAE) was selected as the new-generation extraction technique. A Box-Behnken design was applied with four independent variables at three levels for both methods. The independent variables for CE were extraction time (1, 2, and 3 hours), temperature (30, 40, and 50°C), ethanol concentration (20%, 40%, and 60%), and sample-to-solvent ratio (1:10, 1:20, and 1:30 g/mL). For VMAE, the independent variables were pressure (150, 300, and 450 mmHg), extraction time (3, 9, and 15 min), ethanol concentration (20%, 40%, and 60%), and sample-to-solvent ratio (1:10, 1:20, and 1:30 g/mL). The total betalain content (TBC), total phenolic content (TPC), and total antioxidant capacity (TAC_{DPPH} and TAC_{CUPRAC}) were analyzed for all extract samples.

The response values obtained from CE experiments ranged between 1554.67–2918.67 mg betalain/kg dry weight for TBC, 9.19–14.81 mg GAE/g dry weight for TPC, 34.08–109.55 mmol TE/kg dry weight for TAC_{DPPH}, and 107.53–167.02 mmol TE/kg dry weight for TAC_{CUPRAC}. In the VMAE method, the response values ranged between 993.54–3153.58 mg betalain/kg dry weight for TBC, 5.54–17.04 mg GAE/g dry weight for TPC, 21.86–101.42 mmol TE/kg dry weight for TAC_{DPPH}, and 69.42–195.39 mmol TE/kg dry weight for TAC_{CUPRAC}. The optimization results revealed the optimal CE conditions as 1-hour extraction time, 50°C temperature, 40.99% ethanol concentration, and a 1:10 g/mL sample-to-solvent ratio. For VMAE, the optimal conditions were determined as 450 mmHg pressure, 12-minute extraction time, 30.74% ethanol concentration, and a 1:23.91 g/mL sample-to-solvent ratio.

The morphology of extracts obtained under optimal conditions was examined using scanning electron microscopy (SEM), revealing that CE resulted in a more fragmented and irregular cell structure, whereas VMAE produced smoother and more porous structures. Additionally, betalain composition analysis was performed using Q-TOF LC/MS, and the betalain content of extracts obtained under optimal conditions was calculated as 6393.17 ppm for CE and 9256.50 ppm for VMAE in betanin equivalents.

The results demonstrated that VMAE achieved more efficient extraction than CE, reducing the processing time by 80% while using lower ethanol concentrations. The TBM value of untreated amaranth flowers was found to be 38.26% with KE and 44.27% with VMDE. Therefore, extracts obtained under the optimal VMAE conditions were selected for niosomal encapsulation. The response surface methodology was applied to optimize formulation parameters and ultrasonication time, with the independent variables being the molar ratio of surfactants (Span60:Tween80, mol:mol), extract-to-surfactant ratio (mg extract/100 mg surfactant), cholesterol-to-surfactant ratio (mg cholesterol/100 mg surfactant), and ultrasonication time (s).

The experimental design followed a Box-Behnken model, and responses included total betalain content (TBC), total phenolic content (TPC), total antioxidant capacity (TAC_{CUPRAC}), and red color intensity measurements. The optimization results identified the optimal conditions as a 1:1 molar ratio of surfactants (Span60:Tween80), 8.109 mg extract/100 mg surfactant, 0.1 mg cholesterol/100 mg surfactant, and 81.877 s ultrasonication time. Additionally, thermal stability, stability after 30 days of storage, TEM, FT-IR, particle size, and zeta potential analyses were conducted for the optimized niosome samples. According to the thermal stability experiments, the KE and VMDE thermal stability rates, which were found to be 67.35% and 65.73%, were increased to 97.974% with the niosome method.

In conclusion, this study showed that the extraction of betalains and phenolic compounds from amaranth flowers can be efficiently performed using VMAE, which offers advantages over conventional methods in terms of time efficiency and solvent usage. Furthermore, niosomal encapsulation proved to be an effective strategy for enhancing the stability of betalains and phenolic compounds.

In conclusion, VMAE was found to be a more sustainable and efficient technique than conventional extraction for obtaining betalains and phenolics from *A. caudatus*, with lower ethanol usage and shorter processing time. Moreover, niosomal encapsulation provided an effective strategy to improve the stability of these bioactive compounds, suggesting that the combined use of VMAE and niosomal encapsulation holds strong potential for the development of natural colorants for the food industry.

Keywords: Amaranth flowers, betalains, phenolic compounds, vacuum microwave-assisted extraction, niosomes, optimization.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecimin her safhasında bilgisi ve desteğiyle yanımda olan, kaygılarımı gideren ve yol gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Elif Turabi Yolaçaner'e, laboratuvardaki uzun yolculuğuma eşlik eden, bu süreci kolaylaştırıp güzelleştiren canım hocam Arş. Gör. Büşra Akdeniz Oktay'a, ders ve destek aldığım tüm Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü hocalarına, birlikte çalışmaktan ve öğrenmekten keyif aldığım bütün E.L.F.I Lab üyelerine, Portekiz'de bana kattığı her şey için Escola Superior Agrária de Coimbra Üniversitesinden Prof. Rui Costa'ya teşekkür ediyorum.

Hayattaki en büyük destekçilerim ve başarılarımın mimarları olan canım annem Aysel Akdeniz ve canım babam Halis Akdeniz'e; birçok yola olduğu gibi bu yola da benimle çıkan güzel ablam Handan Akdeniz'e; sevgi ve desteklerini esirgemeyen geniş ailemin tüm fertlerine; lise yıllarımızdan beri her şeyin üstesinden birlikte geldiğimiz biricik arkadaşım Öznur Yılmaz Kızıltoprak'a ve her zaman yanımda olan değerli meslektaşlarım Buket Cantürk ve Kibele Kula'ya çok teşekkür ediyorum.

Bu tez çalışmasının gerçekleşmesine büyük katkısı olan 222O444 nolu projenin hayata geçirilmesi için destek veren TÜBİTAK'a, Erasmus+ Staj sürecimde tüm destek ve yönlendirmeleri için Hacettepe AB Ofisi'ne teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT v

TEŞEKKÜR ix

İÇİNDEKİLER x

ŞEKİLLER DİZİNİ xiv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

SİMGELER VE KISALTMALAR xix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. Doğal Kaynaklı Gıda Renklendiricileri 4

2.2. Betalainler 5

2.2.1. Betasiyaninler 6

2.2.2. Betaksantinler 7

2.3. Fenolik Bileşikler 8

2.4. Antioksidanlar 9

2.5. Horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus L.*) 10

2.6. Ekstraksiyon 12

2.6.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE) 12

2.6.2. Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri 13

2.6.2.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MDE) 13

2.6.2.2. Vakum Mikrodalga-Destekli Ekstraksiyon (VMDE) 15

2.7. Enkapsülasyon 15

2.7.1. Lipozomlar ve Niyozomlar 16

2.7.1.1. Niyozom Oluşturma Yöntemleri 18

2.7.1.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi 19

2.7.1.3. Niyozomların Karakterizasyonu 20

3. MATERYAL VE YÖNTEM 21

3.1.Materyal ve Kimyasallar 21
3.2.Horozibiği Çiçeğinin Fizikokimyasal Özellikleri 21
3.3. Horozibiği Çiçeğinden Betalain ve Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Şartlarının Optimizasyonu 22
3.3.1.Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE) 23
3.3.2.Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (VMDE) 25
3.4.Horozibiği Çiçeği Ekstraktlarının Analizi 28
3.4.1.Toplam Betalain Miktarı (TBM) 28
3.4.2.Toplam Fenolik Madde (TFM) 28
3.4.3.Toplam Antioksidan Kapasite (TAK) 29
3.4.3.1.DPPH Yöntemi (TAK_{DPPH}) 29
3.4.3.2. CUPRAC Yöntemi (TAK_{CUPRAC}) 30
3.4.4. KE ve VMDE Şartlarının Optimizasyonu 31
3.4.5.Renk Analizi 32
3.4.6.LC-MS-Q-TOF ile Analizi 32
3.4.7. Isıl Kararlılık 33
3.4.8.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfolojik Analiz 33
3.5.Niyozom Yöntemi ile Enkapsülasyon 33
3.5.1.Ekstrakt Yüklü Niyozomal Veziküllerin Analizi ve Optimizasyonu 37
3.5.1.1.Niyozomlarda Toplam Betalain Miktarı (TBM_N) 38
3.5.1.2.Niyozomlarda Toplam Fenolik Madde (TFM_N) 38
3.5.1.3.Niyozomlarda Toplam Antioksidan Kapasite (TAK_N) 39
3.5.1.4.Niyozomlarda Renk Analizi 39
3.5.1.5.Enkapsülasyon Verimi (%) 39
3.6.Optimum Şartlarda Elde Edilen Niyozomal Veziküllerin Karakterizasyonu 39
3.6.1.Niyozomal Veziküllerin Isıl Kararlılığı 39
3.6.2.Enkapsülasyon Stabilitesi 40
3.6.3.Morfolojik analiz (TEM) 40
3.6.4.FT-IR analizi 40
3.6.5.Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli 41
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 42
4.1. İşlem Görmemiş Horozibiği Çiçeklerinin Fizikokimyasal Özellikleri 42

4.2. Horozibiği Çiçeğinden Betalain ve Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Optimizasyonu 43
4.2.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE) 43
4.2.1.1. Toplam Betalain Miktarı (TBM_{KE}) 43
4.2.1.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_{KE}) 47
4.2.1.3. Toplam Antioksidan Kapasite-DPPH ($TAK_{KE-DPPH}$) 51
4.2.1.4. Toplam Antioksidan Kapasite- CUPRAC ($TAK_{KE-CUPRAC}$) 55
4.2.1.5. Konvansiyonel Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu 59
4.2.2. Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (VMDE) 59
4.2.2.1. Toplam Betalain Miktarı (TBM_{VMDE}) 60
4.2.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_{VMDE}) 64
4.2.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite DPPH ($TAK_{VMDE-DPPH}$) 68
4.2.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite CUPRAC ($TAK_{VMDE-CUPRAC}$) 72
4.2.2.5. Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu 75
4.3. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Fonksiyonel Özellikleri 75
4.3.1. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Renk Analizi 75
4.3.2. Optimum Koşullardaki Betalain Ekstraktlarının LC-MS-Q-TOF ile Nicel Analizi 76
4.3.3. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi 76
4.4.Enkapsülasyon ve Optimizasyon 79
4.4.2 Niyozomal Veziküllerin Analizleri ve Karakterizasyonu 79
4.4.2.1. Niyozomlarda Toplam Betalain Miktarı (TBM_N) 79
4.4.2.2. Niyozomlarda Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_N) 83
4.4.2.3. Niyozomlarda Toplam Antioksidan Kapasite ($TAK_{CUPRAC-N}$) 87
4.4.2.4. Niyozomlarda Renk Analizi 90
4.4.2.5. Enkapsülasyon Verimi (% EE) 94
4.4.2.6. Niyozom Metodu Optimizasyonu 98
4.5. Optimum Koşullardaki Niyozomların Analizleri ve Karakterizasyonu 99
4.5.1. Niyozomların Isıl Kararlılığı 99
4.5.2. Depolama Sürecinde Enkapsülasyon Stabilitesi 100
4.5.3. Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM, Transmission Electron Microscopy) 100

4.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR) 101
4.5.5. Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli 103
5. YORUM 105
6. KAYNAKLAR 108
EKLER 123
EK A. KALİBRASYON EĞRİLERİ 123
EK B. DENEYLERİN YANITLARI 130
EK C. ANOVA ÇİZELGELERİ 133
EK 4 - Tezden Türetilmiş Yayınlar 144
EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler 145
EK 6 - Tez Çalışması Orijinallik Raporu 146
ÖZGEÇMİŞ 147

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Betalamik asit 5
Şekil 2.2. Betasiyanin ve radikal gruplara göre türleri 7
Şekil 2.3. Betaksantin ve türleri 7
Şekil 2.4. Horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus* L.) 11
Şekil 2.5. Lipozom ve niyozom yapıları 17
Şekil 3.1. VMDE için kullanılan ayarlanabilir vakumlu mikrodalga cihazı.....25
Şekil 3.2. Niyozom veziküllerinin oluşturulmasında ince film hidrasyon yöntemi ile oluşan ince film tabakası 37
Şekil 4.1. KE'de bağımsız değişkenlerin TBM_{KE} (Y_1) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey 46
grafikleri 46
Şekil 4.2. KE'de bağımsız değişkenlerin TFM_{KE} (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 50
Şekil 4.3. KE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{KE\text{-}DPPH}$ (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 54
Şekil 4.4. KE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 58
Şekil 4.5. VMDE'de bağımsız değişkenlerin TBMVMDE (Y1) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri.....63
Şekil 4.6. VMDE'de bağımsız değişkenlerin TFM_{VMDE} (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 67
Şekil 4.7. VMDE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{VMDE\text{-}DPPH}$ (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri.....71
Şekil 4.8. VMDE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{VMDE\text{-}CUPRAC}$ (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri.....74
Şekil 4.9. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerin, KE ve VMDE ile elde edilen ekstraktların SEM görüntüleri; (a) (b) (c) sırasıyla işlenmemiş çiçek örneklerinin 75X, 500X,1000X büyütmeleri; (d), (e), (f) sırasıyla KE 75X, 500X, 1000X; (g), (h), (i) sırasıyla VMDE 75X, 500X, 1000X büyütmelerini gösterir.....78

Şekil 4.10. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TBM_N (Y_1) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 82
Şekil 4.11. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TFM_N (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 86
Şekil 4.12. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TAK_N (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 89
Şekil 4.13. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin a* değeri (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 93
Şekil 4.14. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon verimi (Y_5) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri 97
Şekil 4.17. Horozibiği çiçeklerinden optimum koşullarda elde edilen kapsüllerde TEM sonuçları: (a) 1. Gün için 68,000 x büyütme; (b) 30.gün için 49,000 x büyütme. 101
Şekil 4.18. Horozibiği çiçeği için FT-IR spektrumları: (a) ekstrakt eklenmiş kapsül, (b) ekstrakt, (c) boş niyozom vezikülü, (d) ekstraktta kullanılan solvent 102
Şekil 4.19. Parçacık boyutu analiz grafiği 103
Şekil A1. TFM hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi 123
Şekil A2. TFM hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi 123
Şekil A3. TFM hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi 124
Şekil A4. TFM hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi 124
Şekil A5. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi 125
Şekil A6. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi 125
Şekil A7. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi 126
Şekil A8. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi 126
Şekil A9. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi 127

Şekil A10. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi 127
Şekil A11. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi 128
Şekil A12. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi 128
Şekil A13. Ticari betanin örneği kullanılarak LC-MS-Q-TOF verileriyle hazırlanan standart eğri 129

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Konvansiyonel ekstraksiyonda kullanılan bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri 23

Çizelge 3.2 Konvansiyonel ekstraksiyonda uygulanan Box-Behnken deney tasarımı (X_1: süre (sa), X_2:sıcaklık (°C), X_3:etanol oranı (%), X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL)) 24

Çizelge 3.3. Vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda kullanılan bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri 26

Çizelge 3.4. Vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda uygulanan Box-Behnken deney tasarımı (X_1: Vakum değeri (mmHg), X_2: Süre (dk), X_3: Etanol oranı (%), X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL)) 27

Çizelge 3.5. Niyozom yöntemi ile enkapsülasyonda kullanılan bağımsız değişken derecelerinin kodlanmış ve gerçek değerleri 35

Çizelge 3.6. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinin enkapsülasyonunda gerçekleştirilen deneyler (X_1: Sürfektan molar oranı (Span60:Tween80), X_2: Ekstrakt miktarı (mg /100 mg sürfektan), X_3: Kolesterol miktarı (mg/100 mg sürfektan), X_4: Ultrason süresi (s)) 36

Çizelge 4.1. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerinin fizikokimyasal özellikleri 42

Çizelge 4.2 Konvansiyonel ekstraksiyon için optimum deney koşullarında elde edilen yanıtlar ve program çıktısı tarafından verilen teorik değerler 59

Çizelge 4.3 VMDE için optimum deney koşullarında elde edilen yanıtlar ve program çıktısı tarafından verilen teorik değerler 75

Çizelge 4.4. Horozibiği çiçeği enkapsülasyonu için bağımlı değişkenlerin program çıktısından elde edilen teorik değerleri ile deneysel değerleri. 99

Çizelge B1. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinde KE sonucu elde edilen yanıtlar 130

Çizelge B2. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinde VMDE sonucu elde edilen yanıtlar 131

Çizelge B3. Horozibiği çiçeği için Box-Behnken tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen niyozom deneylerinde elde edilen yanıtlar 132

Çizelge C1. Horozibiği çiçeği ile yapılan konvansiyonel ekstraksiyonda X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin Y_1, Y_2 ,Y_3 ve Y_4 üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 133

Çizelge C2. Horozibiği çiçeği ile yapılan vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin Y_1, Y_2 ,Y_3 ve Y_4 üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 136

Çizelge C3. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TBM (Y_1) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 139

Çizelge C4. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TFM (Y_2) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 140

Çizelge C5. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TAK_{CUPRAC} (Y_3) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 141

Çizelge C6. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin a* değeri (Y_4) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 142

Çizelge C7. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon verimi (EE%) (Y_5) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları 143

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

g	gram
mL	mililitre

Kısaltmalar

KE	Konvansiyonel Ekstraksiyon
VMDE	Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
TBM	Toplam Betalain Miktarı
TFM	Toplam Fenolik Madde
TAK	Toplam Antioksidan Kapasite
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
LC/MS Q-TOF	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (Quadrupole-Time of Flight)

1. GİRİŞ

Bir gıdanın tüketici tarafından kabul edilip edilmeyeceğini belirleyen unsurlardan birisi olan renk, ürün değerlendirmesinin % 62-90'ından sorumludur (Echegaray et al., 2023). Buna ek olarak, renk gıdada sadece görsel gelişimi sağlamakla kalmaz, gıdanın güvenliği ve kalitesi açısından da önemli bir rol oynar. 2025 yılında dünya genelinde 2.95 milyar dolara ulaşacağı ve yıllık %4.6'lık bir büyüme oranına sahip olan gıda renklendiricileri pazarı yapay veya doğal renklendiricilerden oluşmaktadır (Carreón-Hidalgo et al., 2022; Prajapati & Jadeja, 2022).

Sentetik gıda renklendiricilerinin potansiyel zararlı etkileri ve alerjik reaksiyonlarla ilişkilendirilmeleri, tüketicilerin doğal renklendiricilere olan eğilimini artırmaktadır. Bu sebeple de doğal gıda renklendiricileri üzerine yapılan çalışmalar son 10 yılda önem kazanmıştır (Echegaray et al., 2023; Lu et al., 2021). Doğal kaynaklardan elde edilen ve toksik olmayan bu renklendiriciler, yapaylara kıyasla daha yüksek dozlarda kullanılabilmekle birlikte, sağlık üzerinde olumlu etkileri bulunur. Fakat doğal renklendiricilerin yapay renklendiricilere kıyasla daha düşük stabilite ve daha yüksek üretim maliyetine sahip olması gibi bazı olumsuzluklar mevcuttur. Bu sebeple de doğal renklendiricilerin elde edileceği kaynakların ve yöntemlerin daha fazla araştırılması ve stabilitelerinin artırılması konusunda çalışmalar yapılması gerekmektedir(Carreón-Hidalgo et al., 2022).

Gıdalarda kullanılan doğal renk maddeleri mor renk veren antosiyaninler, sarı-turuncu renk veren karotenoidler, yeşil renk veren klorofiller ve kırmızıdan sarıya renk veren betalainlerdir. Literatürde karotenoidler ve antosiyaninler üzerinde yapılmış birçok çalışma bulunmasına rağmen betalainler antosiyaninlere kıyasla pH 3-7 arasında daha kararlı olup, suda daha yüksek çözünürlüğe sahip olmasıyla öne çıkarlar. Ayrıca betalainler üç kat daha fazla renklendirme kapasitesine sahiptir bu sayede asidik ve nötr gıdalarda doğal renklendirici olarak kullanılabilirler (Stintzing & Carle, 2007) Betalainlerin bu renklendirme kapasitelerinin yanında aynı zamanda sahip oldukları antioksidan ve antikanserojen, antimikrobiyal ve antitümör özellikleri de doğal gıda renklendiricilerinin içinde öne çıkmasına sebep olmuştur (Gengatharan et al., 2015).

Endüstride halihazırda en çok kullanılan betalain kaynağı kırmızı pancar (E162) olmasına rağmen, pancardaki geosmin ve bazı pirazin türevlerinin varlığı gıdalara istenmeyen topraksı bir aroma vermesi sebebiyle alternatif betalain kaynaklarının araştırılmasını gerektirmiştir (Stintzing & Carle, 2007; Strack et al., 2003). Yoğun pembe renge sahip olan horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus* L.), içerdiği yoğun pigmentasyon karakterli betalainler sayesinde doğal bir gıda renklendiricisi olarak kullanılma potansiyeline sahiptir. Bu renklendirme kapasitesinin yanında antioksidan, hipoglisemik ve hipolipidemik gibi çeşitli biyolojik işlevlere de sahip olan bitki ekstraktları bu renklendiricileri yapaylara kıyasla daha güvenli, sağlıklı ve işlevsel kılar (Roriz et al., 2018).

Doğal renklendiricilerin ekstraksiyonu için geleneksel ve yeni nesil yöntemler mevcuttur. Geleneksel yöntemlerde uzun süren prosesler ve yüksek miktarlarda çözücü kullanımı sebebiyle alternatif, yeşil teknolojiler (mikrodalga, ultrason, kızılötesi vb.) günümüzde önem kazanmıştır, çünkü bitkilerden elde edilen renk maddeleri ve fenolik bileşikler; ısı, ışık, oksijen, sıcaklık gibi çevresel koşullardan olumsuz etkilenebilmekte ve bu da biyoyararlanımın azalmasına ve fonksiyonel özelliklerin kaybolmasına yol açmaktadır. Hem ekstraksiyon yönteminde bu değerli bileşiklerin kaybolmaması için yöntem doğru seçilmeli hem de ekstraksiyondan sonra stabilitelerinin sağlanması için enkapsülasyon çalışmaları yapılmasına gereksinim duyulmuştur (Rezvankhah et al., 2020).

Bu tez çalışmasında, Türkiye'de yetiştirilen horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus* L.) potansiyel bir doğal betalain kaynağı olarak incelenmiş, konvansiyonel ekstraksiyon (KE) ve vakum mikrodalga-destekli ekstraksiyon (VMDE) yöntemlerinin betalain eldesindeki verimi kıyaslanmıştır. Her iki yöntem için de 4 bağımsız değişken belirlenmiştir; KE için sıcaklık (°C), süre(sa), örnek:çözücü oranı (g/mL), etanol yüzdesi (%); VMDE için basınç (mmHg), süre(dk), örnek:çözücü oranı(g/mL), etanol yüzdesi (%). Her iki yöntem için de Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak 5 merkez noktalı 29 deney gerçekleştirilmiş ve 4 yanıt alınmıştır. Bu yanıtlar, ekstraktların içerdiği toplam betalain miktarıdır (TBM), toplam fenolik madde (TFM), iki farklı toplam antioksidan kapasitesi testleridir (TAK_{CUPRAC} ve TAK_{DPPH}). Yanıt yüzey yöntemi optimizasyon için kullanılmış ve yöntemlerin kıyaslaması yapılmıştır. Her iki yöntem için de optimum koşul belirlenmiş, morfolojik değişimlerin gözlenmesi için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) analizi

yapılmış ve daha verimli sonuçlar elde edildiği için VMDE ile elde edilen optimum koşuldaki ekstrakt enkapsülasyon deneylerinde kullanılmıştır.

Enkapsülasyon, biyoaktif bileşiklerin stabilitesini, biyoyararlanımını ve kontrollü salınımını artırarak gıdaya vitamin, renk maddesi, probiyotikler gibi bileşiklerin entegrasyonunu sağlar (Rezagholizade-shirvan et al., 2024). Enkapsülasyon yöntemleri içinde niyozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik bileşikleri kapsülleyebilme yetenekleri, biyouyumluluklarının yüksek olması ve düşük toksisiteye sahip, yüksek stabilite sağlamaları ve iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılarak hazırlanabilmeleri sebebiyle tercih edilmiştir (Thabet et al., 2022). Niyozomlar oluşturulurken ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır. Enkapsülasyon deney planında sürfektan molar oranı, ekstrakt miktarı, kolesterol miktarı, ultrason süresi olmak üzere 4 farklı bağımsız değişken belirlenmiş ve Box-Behnken deney tasarımına göre 5 merkez noktada 29 deney gerçekleştirilmiş ve elde edilen niyozomlarda toplam betalain miktarı (TBM), toplam fenolik madde (TFM), toplam antioksidan kapasite (TAK_{CUPRAC}), renk (a*) ve enkapsülasyon verimi ölçülmüştür. Yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyon gerçekleştirilmiş ve enkapsülasyon için optimum koşul elde edilmiştir. Ardından optimum koşulda ısıl kararlılık, depolama süresince betalain degradasyonu, FT-IR, morfolojik analizler (TEM), parçacık boyutu analizi ve zeta potansiyeli ölçümü gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında Türkiye'de yetiştirilen horozibiği çiçeklerinin potansiyel betalain kaynağı olarak değerlendirilmesi amacıyla geleneksel ekstraksiyon yöntemiyle yeni nesil vakum mikrodalga destekli yöntemin verimi kıyaslanmış ve elde edilen betalainlerin stabilitesinin artırılması için enkapsülasyon çalışmaları yapılmıştır. Literatürde bu çiçeklerle alakalı ultrason destekli ekstraksiyon çalışması mevcuttur fakat VMDE kullanılarak yapılan bir çalışmaya ve niyozom yöntemiyle enkapsülasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasında incelenen konularla ilgili temel ve güncel literatür bilgisi verilmiştir. Bahsedilen temel konular; gıda endüstrisindeki doğal kaynaklı gıda renklendiricilerinden olan betalainlerin horozibiği çiçeğinden geleneksel yöntem ve yeni nesil yöntemlerden vakum mikrodalga-destekli ekstraksiyonu, ayrıca niyozom yöntemi ile enkapsülasyonu ile stabilizasyonunun arttırılması ve tüm deneylerin yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimizasyonudur.

2.1. Doğal Kaynaklı Gıda Renklendiricileri

Renk, sıklıkla tüketiciler tarafından bir gıdanın tazeliği ve kalitesi hakkında bilgi veren önemli bir gösterge olarak algılanmaktadır (Echegaray et al., 2023). Son yıllarda doğal kaynaklı bileşiklere olan tüketici ilgisi ve yapay katkı maddelerinin toksik etkileri olması endişesiyle doğal kaynaklı renklendiricilere olan talep hızla artış göstermektedir (Martins et al., 2017). Örneğin yapay renklendiricilerden gıdalara sarı renk vermesi için kullanılan E102 kodlu Tartrazin'in özellikle çocuklarda alerjik reaksiyonlar, astım ve hiperaktiviteye sebep olduğu bildirilmiş; kırmızı renk için kullanılan E128 kodlu Red 2G'nin ise mutajenik ve karsinojenik etkileri sebebiyle Avrupa'da kullanımı yasaklanmıştır(Silva et al., 2022).

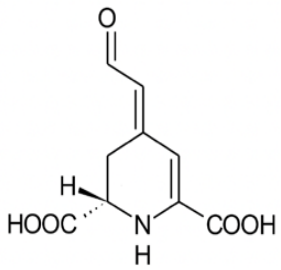
Doğal kaynaklı gıda renklendiricileri dört grupta incelenmektedir; flavonoid türleri (antosiyaninler), izopren türevleri (karotenoidler), pirol türevleri (klorofiller) ve azot-heterosiklik türevleri (betalainler) (Sigurdson et al., 2017).

Antosiyaninler, meyve, sebze veya çiçeklerde bulunan, suda çözünen, bulunduğu ortamın pH seviyesine göre renk veren doğal pigmentlerdir; asidik ortamda kırmızı, nötr ortamda mor ve bazik ortamlarda mavi renk verirler (Echegaray et al., 2023; Nabi et al., 2023). Karotenoidler yağda çözünebilen pigmentlerdir ve gıdalara sarı-turuncu renk verirler; fotosentezde önemli rol oynayan klorofiller de yağda çözünebilen pigmentlerdir ve yaygın türleri olan klorofil-a ve klorofil-b farklı dalga boylarında ışık emilimi yaparak mavi-yeşil ve sarı-yeşil renkler meydana getirirler (Echegaray et al., 2023; Nabi et al., 2023).

2.2. Betalainler

Betalainler, betalamik asitin amonyum türevleridir (4-(2-oxoethylidene)-1,2,3,4-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylic acid); bu yapının aminler ve/veya türevleri ile yoğunlaşması, sarı betaksantinleri oluştururken, betalamik asidin siklo-dopa (siklo-3-(3,4-dihidroksifenilalanin)) veya onun glukozil türevleri ile yoğunlaşması kırmızı-mor betasiyaninlerin oluşumuna neden olur (Şekil 2.1) (Miguel, 2018).

Betalainler, *Caryophyllales* takımına ait bitkilerde bulunurlar ve pH 3-7 aralığında antosiyaninlerden daha kararlı olmaları sebebiyle öne çıkarlar (Nabi et al., 2023). E162 kodu ile kırmızı pancardan elde edilen betanin endüstrideki yapay kırmızı rengin yerine tercih edilebilen doğal kaynaklı bir alternatiftir (Lombardelli et al., 2021). Renklendirme özelliklerine ek olarak antioksidan, antimikrobiyal, anti-kanser ve anti-lipidemik özellikleriyle de öne çıkmaktadır (Gengatharan et al., 2015).



Betalamik asit

Şekil 2.1. Betalamik asit

Betalainlerin stabilitelerini pH<3 veya pH>7, yüksek su aktivitesi (a_W), metal katyonların varlığı (Fe^{3+}, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Cu^{+}, Sn^{2+}, Al^{3+}, Hg^{2+}, Cr^{3+}), yüksek sıcaklık, ışık, O_2, H_2O_2, düşük pigment içeriği gibi faktörler olumsuz etkileyebilmektedir (Miguel, 2018). Isı genellikle O_2 varlığında betalainlerin dekarboksilasyonunu tetikler; bu da kırmızı rengin sarı-turuncuya dönüşmesine neden olmaktadır. pH<3 durumunda betalainler anyonik formdan katyonik forma dönüşür ve renkte kırmızıdan mor-mavi tonlarına geçiş olur, pH>7 ise aldimin bağ hidrolizi sonucu betalamik asit ile siklo-dopa-5-O-glikozit ortaya çıkar ve bu da rengin sarı-kahverengiye dönüşmesine neden olur. Metal iyonları oksidasyonun hızlanmasına sebep olarak renk kaybına yol açabilirler (Miguel, 2018).

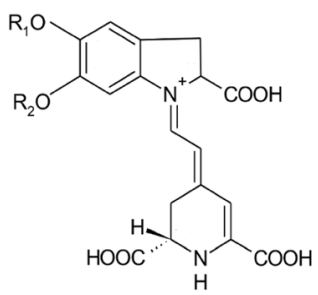
Başlıca betalain kaynakları kırmızı ve sarı pancar (*Beta vulgaris* L. ssp. vulgaris), renkli pazı (*B. vulgaris* L. ssp. cicla) ve çeşitli amarant türleri (*Amaranthus* sp.) olmak üzere birçok yenilebilir bitki türüdür. Ayrıca *Opuntia* ve *Hylocereus* cinslerine ait kaktüs meyveleri de betalain içerir. Bununla birlikte, toksik saponinler ve lektinler içermesi nedeniyle gıda renklendiricisi olarak kullanımına izin verilmeyen betalain kaynağı *Phytolacca americana* L. ve betalainlerin bazı mantar türlerinde de bulunduğu belirlenmiş olup bunlardan birkaçı *Amanita muscaria, Hygrocybe* ve *Hygrophorus* olarak rapor edilmiştir (Gengatharan et al., 2015; Sadowska-Bartosz & Bartosz, 2021).

42 betasiyanin ve 32 betaksantin içeren 75 iyi karakterize edilmiş betalain yapısı vardır fakat bu sayı sıvı kromatografisi ve kütle spektrometrisinde yeni analitik metodolojilerin kullanımı sebebiyle artış göstermektedir (Carreón-Hidalgo et al., 2022).

2.2.1. Betasiyaninler

Betalain pigment grubunun bir alt sınıfı olan betasiyaninler, *Caryophyllales* takımına ait bitkilere karakteristik kırmızı-mor renklerini kazandıran suda çözünür bileşiklerdir ve yapısal olarak betalamik asidin siklo-DOPA veya glikozillenmiş formları ile kondenzasyonu sonucu oluşurlar (Stintzing et al., 2001). Bu pigmentler 532–550 nm arasında maksimum absorbans gösterir (M. I. Khan, 2016).

Betasiyaninler, içerdikleri radikal grubun özelliğine göre sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2) (Carreón-Hidalgo et al., 2022); örneğin betanin grubu çoğunlukla kırmızı pancar gibi bitkilerde bulunan temel betasiyaninleri içerirken, Amaranthin grubu, Amaranthaceae ailesine ait bitkilerde bulunan betasiyaninleri içerir. Gomphrenin grubu ise, *Gomphrena globosa* L. çiçeklerinden izole edilen gomphrenin I gibi bileşikleri içerir ve aynı gruptaki diğer bileşikler, izoformlar, farklı şekerler ve kumaroil/feruloil türevleri içerir ve 2-Deskarboksil-Betanin grubundaki betasiyaninler, dopamin türevlerinden oluşmaktadır (Coy-Barrera, 2020; Stintzing et al., 2001). Betasiyaninler, çevresel koşullara duyarlı olup, stabiliteleri pH, sıcaklık ve oksidatif faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir (Coy-Barrera, 2020).

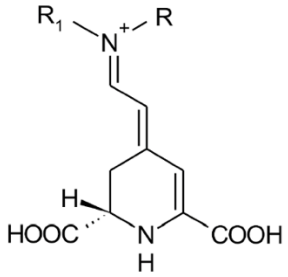


Betasiyanin Tipi	R1	R2
Betanidin	H	H
Betanin	5-O- beta-glucoside	H
Gomphrenin I	6-O- beta-glucoside	H
Phyllocactin	5-O-(6'-O-malonyl)-beta-glucoside	H
Amaranthin	2-O-(beta-glucoronic acid)-beta-glucose	H
Bougainvillein V	6-O- sophoroside	H

Şekil 2.2. Betasiyanin ve radikal gruplara göre türleri

2.2.2. Betaksantinler

Betaksantinler, betalainler ailesinin doğal pigmentler arasında yer alır ve özellikle *Caryophyllales* takımındaki bitkilerdeki sarı ve turuncu renklerin kaynağını oluşturur (Martins et al., 2017). Betalainlerin yoğun miktarda bazı aminlerle tepkimeye girmesi betaksantinlerin oluşumuna yol açar ve bu tepkime sonucu çözeltideki betalamik asit miktarı azalır ve betaksantinler daha kararlı hale gelir (Coy-Barrera, 2020). Bu pigmentler 457–485 nm arasında maksimum absorbans göstermektedir (M. I. Khan, 2016).



Betaksantin Tipi	R1	R
Indicaxanthin	Proline	H
Vulgaxanthin-I	Glutamine	H
Miraxanthin I	Methionine sulfoxide	H
Dopaxanthin	L-DOPA	H
Arginine-betaxanthin	Arginine	H
(S)- Tryptophan-betaxanthin	(S)- Trytophan	H
Portuşacaxanthin II	Tyrosine	H

Şekil 2.3. Betaksantin ve türleri

Amino asitlerin türevleri olarak bulunan betaksantinler, birçok farklı kimyasal yapıya sahip olabilir (Şekil 2.3) (Carreón-Hidalgo et al., 2022) örneğin, en yaygın betaksantin pigmenti olan glutamin-betaksantin (vulgaxanthin I), *B. vulgaris* (kırmızı pancar), *M. geometrizans*, *O. ficus-indica* (yeşil incir), *O. albicarpa*, *O. megacantha*, *O. robusta*, *R. humilis* ve *U. tuberosus* gibi bitkilerde bulunmaktadır (Martins et al., 2017).

2.3. Fenolik Bileşikler

Bir veya birden fazla hidroksil grubuna bağlı tek veya çoklu aromatik halkaya sahip bileşikler fenolik bileşikler olarak isimlendirilir (Alara et al., 2021). Bitkilerde yaygın olarak bulunan ikincil metabolitler olan fenolik bileşikler hem bitki hem de insan sağlığı üzerinde önemli rollere sahip geniş ve yapısal açıdan çeşitlenen bir doğal bileşik grubudur. Basit fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, proantosiyanidinler, stilbenler ve lignanlar gibi çeşitli türlere sınıflandırılmaları, bu bileşiklerin karmaşıklığını ve sergiledikleri biyolojik aktivitelerin geniş yelpazede olduğunu gösterir (Cheynier, 2012; Vuolo et al., 2019). Fenolik bileşiklerin bu yapısal çeşitliliği, bitkilerde ve insanlarda çeşitli biyolojik aktivitelerde önemli rollere sahip olmasını sağlar, örneğin bu bileşikler reaktif oksijen türlerini temizleyerek bitkilerin UV radyasyonu ve aşırı sıcaklıklar gibi abiyotik streslerle başa çıkmasına yardımcı olur (Zagoskina et al., 2023).

Bu bileşikler meyvelerde, sebzelerde, baklagillerde, çayda, kahvede bulunur ve bitkisel gıdaların organoleptik özelliklerinin oluşumunda etkilidirler; buna ek olarak fenolik bileşiklerin tükürük glikoproteini ile etkileşimleri nedeniyle meyvelerde oluşan acı tattan sorumlu olduğu bildirilmiştir (Alara et al., 2021).

Fenolik ve polifenolik bileşikler, tek başlarına veya karotenoidler, E vitamini ve C vitamini gibi vitaminlerle beraber, insan vücudundaki dokuları oksidatif stresin olası zararlı etkilerinden korurlar. Benzoik asit ve sinnamik asitler basit fenolik bileşiklerdir ve daha kompleks fenolik bileşiklerin oluşumunda rol alırlar; gallik, ellajik, protokatekuik ve 4-hidroksibenzoik asitler, insanlar tarafından tüketilen en yaygın benzoik asitlerken; kafeik, ferulik, sinapik ve p-kumarik asitler en yaygın sinnamik asitlerdir. Bitki bazlı diyetler, besinsel avantajlar sağlayan ve kronik hastalıkları önlemeye katkıda bulunan fenolik bileşikler açısından zengindir (Rahman et al., 2022).

Fenolikler insan sağlığı üzerinde de antioksidan, anti-inflamatuar ve kardiyoprotektif etkileriyle tanınırlar ve bu nedenle ilaçlarda ve besin takviyelerinde kullanılmaktadırlar (Sun & Shahrajabian, 2023). Hem fenolik bileşikler hem de betalainler önemli antioksidan aktiviteler sergilerler ve fenolik hidroksi gruplarının varlığı betalainlerin serbest radikal temizleme aktivitesini artırır (Gandía-Herrero et al., 2009).

Fenolik bileşiklerin insan sağlığı için önemi göz önüne alındığında, bu bileşiklerin biyoyararlanımı iyileştirmek için sürdürülebilir ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi, saflaştırma ve stabilizasyonunun arttırılması gerekmektedir (Albuquerque et al., 2021).

2.4. Antioksidanlar

Oksijen, çoğu elementle ve diğer bileşiklerle kolayca tepkimeye giren, oldukça reaktif bir ametaldir (Gulcin, 2020). Oksidatif stres, reaktif oksijen ve azot türlerinin aşırı üretimi ile antioksidan savunma arasındaki dengenin bozulmasının sonucunda proteinler, lipitler, DNA gibi biyomoleküllerde hasar meydana getirebilir. Antioksidanlar, serbest radikal zincir reaksiyonlarını durdurarak veya bu türlerin etkisini ortadan kaldırarak hücresel hararı önleyen, oksidatif stresle mücadele eden bileşiklerdir (Pisoschi & Pop, 2015).

Antioksidanların etkileri birkaç mekanizma ile açıklanabilir; peroksidasyonu başlatan ve yayan serbest radikalleri temizlemek, oksidasyon sürecini hızlandıran metal iyonlarını şelatlamak, hidroksil radikalinin oluşumunu önlemek için O_2 iyonlarını etkisiz hale getirmek, otooksidasyon zincir reaksiyonunu kırmak ve üründe mevcut O_2 konsantrasyonunu düşürmek (Abeyrathne et al., 2022). Antioksidanlar işlev, kaynak ve mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Örneğin enzimatik katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidanlar hücre içinde oksidatif stresi kontrol ederken, suda çözünen askorbik asit (C vitamini) ve flavonoidler veya yağda çözünen tokoferoller (E vitamini) ve karotenoidler gibi antioksidanlar doğrudan serbest radikalleri bağlayarak veya zincirleri kırarak çalışır. Ayrıca meyve, sebze gibi doğal kaynaklardan elde edilenlerin yanında gıda endüstrisinde koruyucu olarak kullanılan BHA (bütillenmiş hidroksianisol) gibi antioksidanlar da mevcuttur (Ali et al., 2020).

Sentetik antioksidanlara kıyasla tüketiciler doğal antioksidan kaynaklarına yönelmektedir ve bu doğal kaynaklı antioksidanlar bitkisel veya hayvansal olabilir. Bitkisel antioksidanlar esas olarak fenolik bileşikler, karotenoidler ve vitaminlerken; hayvansal antioksidanlar ise esas olarak tam protein veya et, balık, yumurta, süt ve bitki proteinlerinin peptitleridir. Bitki bazlı antioksidanlar esas olarak aromatik halkalardan oluşurken, hayvan bazlı antioksidanlar esas olarak amino asitlerden oluşur. Fenolik bileşikler ve peptitler oksidasyonu önlemede farklı davranırlar ve hayvansal antioksidanlarla kıyaslandığında bitkisel bileşikler gıda endüstrisinde daha ucuz ve pratik

bir kaynak olarak değerlendirilirken, hayvan bazlı peptitler antioksidan kapasitesini artıracak bir bileşik olarak kabul edilebilirler (Abeyrathne et al., 2022).

Bitkilerde bulunan antioksidanlar, oksidatif stresin yol açtığı hastalıkların önlenmesinde rol oynarlar ve serbest radikal temizleyici özelliklerin yanı sıra anti-inflamatuar etkiler gösterdiklerinden kanser, yaşlanma, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite ve nörodejeneratif hastalıklara karşı etkilidirler (Zhang et al., 2015).

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi için çeşitli in vitro yöntemler kullanılır ve bu yöntemler antioksidanların etki türleri, mekanizması ve reaksiyon kinetiklerinin belirlenmesine yönelik farklı prensiplere dayanmaktadır. Örneğin DPPH, elektron veya hidrojen atomu transferi yoluyla serbest radikalleri nötralize eden antioksidanları ölçerken; CUPRAC, Cu^{2+} iyonlarının Cu^{+}'a indirgenmesine dayanır ve özellikle de polifenoller için uygun bir redüksiyon kapasitesi belirleme yöntemidir. Bunların dışında ABTS, FRAP ve serbest radikal kaynaklı oksidasyon testleri de bulunur ve her bir yöntemin farklı avantajlar ve dezavantajları mevcuttur(Gulcin, 2020).

2.5. Horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus L.*)

Orta ve Güney Amerika kökenli olan *Amaranthus*, geniş yapraklar, damarlı yapılar ve çapraz bağlara sahip (dikotiledonlu) bir C4 (genellikle yüksek sıcaklık ve su stresi altında daha iyi performans) bitkisidir. *Amaranthus* cinsi, yabanî formlardan oluşan yaklaşık 70 türe sahip olsa da yalnızca birkaç türünün tarımı yapılır; Orta ve Güney Amerika, Asya ve Afrika'nın gelişmekte olan ülkelerinde, amaranth yaprakları çiğ veya işlenmiş formda tüketilir (Stevanović et al., 2023).

Gelişmemiş ülkelerde yetersiz beslenme ve kuraklık gibi sorunlara çözüm olabilecek potansiyele sahip bir bitki olarak tanımlanan *Amaranthus*, "psödo-tahıl" olarak sınıflandırılmakta olup hem glutensiz olması hem de mineral, vitamin ve biyoaktif bileşikler açısından zengin olması ile önem kazanmaktadır. *Amaranthus*'un başlıca üç türü olan A. *cruentus, A. caudatus* ve *A. hypochondriacus,* tahıl üretimi için yaygın olarak yetiştirilir (Ruth et al., 2021).

Son yıllarda sahip olduğu kırmızı-morumsu renk ve antioksidan kapasitesi potansiyeli ile dikkat çeken, 2 metreye kadar uzayabilen bir yıllık dikey bir bitki olan horozibiği çiçeği

(Şekil 2.4), doğal renklendirici kaynağı olarak değerlendirilebilecek potansiyele sahiptir (Saubhik Das, 2016).



Şekil 2.4. Horozibiği çiçeği (*Amaranthus caudatus* L.)

Horozibiği çiçeği tohumlarının kaliteli besin profili ile dikkat çekse de tohumları için üretimi yapılan bu bitkilerden arta kalan pembe-mor çiçeklerin alternatif bir renklendirici kaynağı olarak değerlendirilmesi son zamanlarda öne çıkmıştır. Çiçekler, sahip oldukları pembe-mor renkleri sayesinde betasiyaninlerin eldesinde kullanılmakla kalmayıp ayrıca içerdiği antioksidan, hipoglisemik ve hiperlipidemik aktivite gibi birçok biyolojik özellik ile de dikkat çekmektedir (Roriz et al., 2021). 2019'da yapılan bir çalışmada horozibiği çiçeğinin biyolojik aktivitesinin ve antioksidan kapasitesinin yetiştirildiği toprak türüne ve hasat zamanına bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Jimoh et al., 2019).

2021'de yapılan *Amaranthus caudatus* L. kullanılarak ultrason destekli ekstraksiyon çalışmasında bu çiçeklerin alternatif bir betasiyanin kaynağı olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (Roriz et al., 2021). Bu çalışmanın sonucunda 13.3 dakika süresince 500W ultrason uygulaması sonucunda Portekiz'de yetiştirilen horozibiği çiçeklerinden 77.6 mg/g toplam betasiyanin elde edilmiş ve bu çiçeklerin HPLC ile kromatografik analizleri sonucunda betasiyanin profili incelendiğinde en çok amaranthine, isoamaranthine; ardından betanin ve isobetanin içerdiği görülmüştür (Roriz et al., 2021).

Rutin, horozibiği çiçeğinde çeşitli büyüme aşamalarında bulunan baskın flavonoiddir ve kaempferol ve kuersetin gibi diğer flavonoidlerle birlikte bulunur (Karamać et al., 2019).

Antioksidan özellikleri açısından en iyi beş bitki arasında yer almış olan horozibiği çiçeği, fitosteroller, polifenoller, vitaminler, skualen ve biyoaktif peptitler gibi antioksidan maddelerce zengindir (Martinez-Lopez et al., 2020).

2.6. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, karmaşık gıda matrislerinden besinsel ve işlevsel özellikteki değerli bileşiklerin izole edilmesi için kullanılır. Ekstraksiyon yönteminin seçimi; sıcaklık, çözücü oranı, süre gibi parametrelerin optimizasyonu ve gıda matrisinin yapısı, elde edilmek istenilen bileşikler, ekonomiklik ve işlem verimliliği için önemlidir (Sridhar et al., 2022). Uzun yıllardır kullanılan geleneksel yöntemler ekstraksiyon için etkili olsa da genellikle daha uzun sürerler, daha yüksek miktarlarda çözücü gerektirirler ve çevre üzerinde olumsuz etkilere sahiplerdir (S. U. Khan et al., 2025). Geleneksel yöntemlere alternatif olarak geliştirilen yeni nesil ekstraksiyon yöntemleri, geleneksel yöntemlere kıyasla daha yüksek verimliliğe sahip olması ve daha az çözücü gerektirmesine ek olarak biyoaktif bileşiklerin korunmasında da daha etkilidir (S. U. Khan et al., 2025).

2.6.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE)

Bitkisel materyallerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için maserasyon, soxhlet ekstraksiyon ve hidrolizasyon gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri kullanılabilir (Azmir et al., 2013). Maserasyonla ekstraksiyon, numunenin kapalı bir sistemde uygun çözücüye batırılması, ardından sabit sıcaklıkta sürekli veya ara sıra çalkalanması ve ardından katı parçaları çözücüden ayırmak için genellikle filtrasyon, dekantasyon veya berraklaştırma ayırma işlemi ile gerçekleştirilir. Yöntem kolay olmasına rağmen, zaman alıcı olması, sürdürülebilir olmaması ve büyük miktarlarda çözücü gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (Alara et al., 2021; Ameer et al., 2017).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri basit olmaları sebebiyle hala koku ve aroma ekstraksiyonu amacıyla kullanılmaya devam etse de biyoaktif maddelerin çıkarılması, ekstraksiyon verimliliğinin arttırılması, daha az çözücü kullanılması, daha kısa sürelerde daha fazla materyalin elde edilmesi için yeni nesil ekstraksiyon yöntemleri üzerindeki araştırmalar devam etmektedir (Bitwell et al., 2023).

2.6.2. Yeşil Ekstraksiyon Yöntemleri

Yeni nesil "yeşil" ekstraksiyon yöntemleri, gıda endüstrisinde doğal bileşiklerin geri kazanımı konusunda çevre dostu adımların atılmasını sağlamıştır. Bu yöntemler arasında süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SAE), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (BSE), ultrason destekli ekstraksiyon (UDE) ve mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) gibi tekniklerdir. Yeşil teknoloji, daha az çözücü kullanımı ve yüksek sıcaklığa daha kısa maruz bırakma gibi avantajları sayesinde hedef bileşiklerin daha yüksek kalite ve verimle eldesini sağlar (Osorio-Tobón, 2020).

SAE için kullanılan süperkritik akışkanlar, kritik sıcaklık ve basınç üzerinde hem sıvı hem gaz özellikleri taşırlar ve bu çift fazlı özellikleri sayesinde daha yüksek kütle transferi sağlarlar; bu yöntem için en sık kullanılan ekonomik ve güvenli (GRAS) olan CO_2'dir (Ameer et al., 2017). Literatürde üzüm yan ürünleri ve biberiye yapraklarından SAE ile ekstraksiyonunda CO_2-etanol kombinasyonu ile fenolik bileşiklerin yüksek verimle elde edildiği bildirilmiştir (Týskiewicz et al., 2018).

BSE yönteminle örnek bir hücreye yerleştirilir ve çözücü HPLC pompası ile sisteme gönderilir, sıcaklık ve basınç belirlenmiş seviyeye ulaştığında çözücünün viskozitesinin düşmesi ile bitkisel matrisin daha hızlı ıslanması ve böylecek biyoaktif bileşeiklerin çözünürlüğünün artması sağlanır. Aynı zamanda van der Waals, dipol-dipol ve hidrojen bağları gibi etkileşimlerin zayıflamasıyla da fenolik bileşiklerin bitkisel matristen çözünmesi kolaylaşmış olur (Ameer et al., 2017). 2022'de yayımlanmış bir çalışmada defne yaprağından BSE ile verimli bir şekilde fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Dobroslavić et al., 2022).

UDE, 20 Hz- 20 kHz aralığındaki frekansta yayılım gösteren ultrasonik dalgaların sıvı ortamda oluşturduğu kavitasyon etkisi sayesinde çözünme ve madde transferini artıran bir yöntemdir. Bu kavitasyon esnasında oluşan yüksek sıcaklık ve basınç sayesinde bitkisel materyallerin içindeki biyoaktif bileşiklerin verimli bir şekilde ekstraksiyonu gerçekleşir (Ameer et al., 2017). 2021 yılında Roriz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Amaranthus caudatus* L. çiçeklerinden UDE ile betasiyaninlerin ekstraksiyonunda verimli sonuçlar alınmasını sağlamıştır (Roriz et al., 2021).

2.6.2.1. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MDE)

Mikrodalga, elektrik ve manyetik alanların birleşimiyle oluşan 300 MHz-300GHz arasında değişen frekanslara sahip elektromanyetik dalgalardır ve materyallerle girdiği

etkileşimlerde manyetik ve dielektrik kayıplar sonucunda ısı üretir, bu ısınma mekanizması da ekstraksiyon süreçlerinde büyük önem taşımaktadır (López-Salazar et al., 2023).

Mikrodalgaların ısı üretimi iyonik iletim ve dipol rotasyonu ile gerçekleşir ve iyonik iletim, elektrik alanı etkisiyle iyonların ve elektronların elektroforetik hareketini başlatır; bunun sonucunda hareket halindeki iyonlar ve çevreleyen ortam arasındaki sürtünme sebebiyle ısı üretir. Dipol rotasyonu ise dipol moleküllerinin, alternatif elektrik alanına uyum sağlama çabasıyla oluşan süreçte dipoller ve çevresindeki moleküller arasındaki çarpışmalar sonucunda ısı üretilir ve iki fenomen de aynı anda gerçekleşmesiyle mikrodalga enerjisinin termal enerjiye dönüşümü gerçekleşir (Desai et al., 2010).

MDE, mikrodalga enerjisinin elektromanyetik radyasyonu emen ve bu enerjiyi ısıya dönüştürebilen su molekülleri veya mevcut diğer polar moleküllere doğrudan etkisiyle gerçekleştirilir. Yöntemin temel mekanizması mikrodalga radyasyonunun örneğin içerisinde doğrudan hacimsel ısı üretmesidir (López-Salazar et al., 2023).

MDE verimliliği mikrodalga gücü, ekstraksiyon süresi, matrisin yapısı, karıştırma etkisi, çözücü seçimi gibi çeşitli parametrelere bağlıdır. Yüksek mikrodalga gücü materyalin matrisinde aşırı ısınmaya ve ısıya duyarlı biyoaktif bileşiklerin bozulmasına yol açabilir, optimum güç seviyesi materyale ve hedef bileşiğe göre belirlenmelidir. Ekstraksiyon süresi uzadıkça materyaldeki biyoaktif bileşiklerin kaybı artabilir, dolayısıyla verim azalabilir. Kullanılan materyalin toz haline getirilmiş, kurutulmuş veya ön işlemden geçirilmiş olması gibi matrisin özellikleri de mikrodalga radyasyonunun etkisini değiştirir, materyalin su içeriği de mikrodalganın ısıtma etkisini arttırarak kütle transferini etkiler. Karıştırma işlemi çözücü ve çözünen arasında etkileşimi arttırdığından verim üzerinde etkilidir. Çözücü seçimi ekstraksiyon etkinliğini doğrudan etkiler, su-alkol karışımları bitkisel materyallerde daha iyi nüfuz etmesi sebepli mikrodalga emilimini arttırır (Ameer et al., 2017).

Cardoso-Ugarte ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı araştırmada mikrodalga kullanılarak kırmızı pancardan aynı miktarda betalain konsantrasyonunun, geleneksel yöntemlere kıyasla iki katına kadar verimle on kat daha hızlı elde edilebildiği bildirilmiştir (Cardoso-Ugarte et al., 2014; Zin et al., 2020). Yaban mersini yapraklarının antosiyaninleri ve flavonoidleri üzerinde Routray and Orsat (2014) tarafından yapılmış

bir çalışmada, MDE, UDE ve KE kıyaslanmış; MDE diğer yöntemlere göre daha verimli olduğu görülmüştür (Routray & Orsat, 2014).

2023 yılında kestane kabuklarının polifenol kaynağı olarak değerlendirilmesi amacıyla KE, BSE, UDE ve MDE yöntemleri kullanılarak yapılan deneyler sonucunda MDE yönteminin ekstraksiyon verimliliği, elde edilen polifenol miktarı ve işlem süresi açısından diğer yöntemlerden daha avantajlı olduğu bildirilmiştir (Tomasi et al., 2023).

2.6.2.2. Vakum Mikrodalga-Destekli Ekstraksiyon (VMDE)

VMDE, özellikle yüksek sıcaklığa ve oksijene duyarlı bileşikler için mikrodalga destekli ekstraksiyonun daha verimli kullanılması amacıyla geliştirilmiştir. Yüksek sıcaklıklar ve oksijene maruz kalma, fenolik bileşikler, renk maddeleri ve steroller gibi belirli biyoaktif bileşiklerin bozulmasına veya oksidasyonuna neden olabileceğinden VMDE, vakum koşulları altında çalışarak daha düşük ekstraksiyon sıcaklıklarına ve azaltılmış oksijene maruz kalmaya olanak tanır ve bu da bu hassas bileşiklerin korunmasına yardımcı olur. Sonuçta ekstraksiyon veriminin artması ve antioksidanların ve diğer biyoaktiflerin daha iyi koşullarda elde edilmesi VMDE'yi hassas bitki bazlı bileşiklerin ekstraksiyonu için daha etkili bir yöntem haline getirmiştir (Xiao et al., 2009).

VMDE mekanizması, ekstraksiyon çözücüsünün kaynama noktasının, atmosferik basınca kıyasla vakum sayesinde düşürülmesi ilkesine dayanır ve bu sayede daha düşük sıcaklıklarda ekstraksiyon gerçekleştirilerek yüksek sıcaklık sebepli kayıpların önüne geçilir. Buna ek olarak, bu yöntemle ekstraksiyon sisteminden havanın uzaklaştırılması sayesinde oksijenin varlığı kısıtlanarak oksidasyon da en aza indirilmiş olur (López-Salazar et al., 2023). Vakum uygulamasıyla mikrodalga destekli ekstraksiyonun verimi arttırılarak hassas renk, fenolik ve antioksidan bileşiklerinin korunumu arttırılabilir.

2021 yılında taze nar posasından fenolik bileşiklerin ve antioksidanların ekstraksiyonu için RSM ile optimize edilen VMDE yöntemi kullanılmış, sonuçta yöntemin taze nar posasından doğal antioksidan ekstraktların endüstriyel ölçekte üretimi için uygulanabilir olduğu bildirilmiştir (Petrotos et al., 2021).

2.7. Enkapsülasyon

Enkapsülasyon, çeşitli gıdalarda biyoaktif bileşiklerin etkili bir şekilde gıdaya entegrasyonu ve stabilizasyonunu sağlayarak gıda endüstrisinde devrim yaratan bir

yöntemdir ve vitaminler, mineraller, antioksidanlar ve probiyotikler gibi maddeleri koruyucu bir taşıyıcı malzeme içine alarak, sadece bunların stabilitesini, biyoyararlanımını ve kontrollü salınımını artırmakla kalmaz; bu bileşiklerin işlevsel bütünlüğünü korurken onları olumsuz çevre koşullarından ve diğer gıda bileşikleriyle istenmeyen etkileşimlerden de korur (Rezagholizade-shirvan et al., 2024).

Doğal kaynaklı gıda renklendiricilerinin yapaylara kıyasla bozulmalara karşı daha hassas olmaları sebebiyle enkapsülasyon tekniklerinin bu bileşiklere uygulanması önem kazanmıştır. Betalainlerin pH, sıcaklık ve ışık gibi çevresel faktörlere karşı dayanıklılığın az olması sebebiyle stabilitelerinin artırılması amacıyla enkapsülasyon yöntemleri kullanılabilir (Calva-Estrada et al., 2022; Rezagholizade-shirvan et al., 2024).

Literatürde, gıda uygulamaları için biyolojik olarak aktif bileşikleri kapsüllemeye yönelik kimyasal, fiziksel ve fiziko-kimyasal tekniklerle alakalı çalışmalar mevcuttur. Kimyasal enkapsülasyon yöntemlerine in-situ polimerizasyon, lipozom ve niyozom yöntemleri örnek verilebilir ve bu yöntemlerde kimyasallar kullanılarak tabakalar oluşturularak hassas bileşiklerin kaplanması sağlanır. Fiziksel enkapsülasyon yöntemlerinde kimyasal reaksiyonlar kullanılmaz, örneğin sprey kurutmada biyoaktif bileşik içeren sıvının sıcak havayla spreylenerek çözücünün hızla buharlaşması soncunda elde edilen katı parçacıklarda bileşiğin kapsüllenmesi sağlanır ve ekstrüzyon, ayrıca akışkan yatak kaplama fiziksel yöntemlerdendir. Fiziko-kimyasal yöntemler ise hem fiziksel hem de kimyasal ilkelerin kullanımını gerektirir; örneğin koaservasyon yönteminde sıcaklık uygulaması ve çözücü bileşiminin etkisi birlikte kapsül oluşumunda etkilidir (Castro Coelho et al., 2021).

2.7.1. Lipozomlar ve Niyozomlar

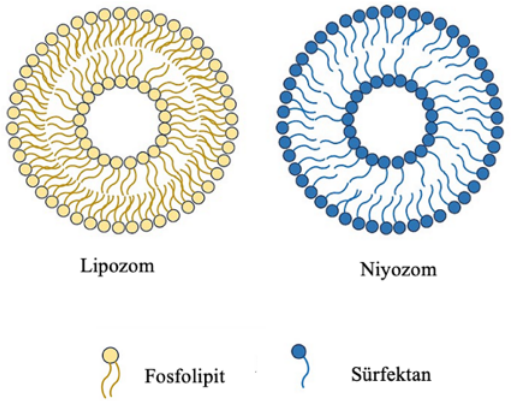
Hem hidrofilik hem de lipofilik bileşikleri kapsülleme amacıyla yaygın olarak kullanılan veziküller, amfipatik moleküllerden oluşan konsantrik bir çift katmanlı yapı ile çevrili, su içeren bir çekirdeğe sahip kolloidal parçacıklardır; hidrofilik bileşikler çift katmanlı yapının arasındaki suyu içeren bölmelerde tutulurken, lipofilik bileşiklerse bu yapının lipidik matrisinde tutulurlar ve gıda, kozmetik, farmasötik ilaç taşıma sistemlerinde kullanılırlar (Matos et al., 2019).

Bu veziküllerin en yaygın türlerinden biri olan ve ilk kez 1965 yılında Bangham ve arkadaşları tarafından üretilen lipozomlar; fosfolipitlerden oluşan çift katmanlı yapıya

sahiptir (Şekil 2.5) ve özellikle biyoaktif bileşiklerin enkapsülasyonunda kullanılırlar. Boyutları nanometre ile mikrometre arasında değişebilen lipozomların temel yapıtaşları fosfolipitler olsa da stabiliteyi arttırmak için kolesterol ilavesi yapılmaktadır. Fosfolipitlerin amfipatik yapısı sayesinde lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik molekülleri kapsülleyebilme yeteneğine sahiptir (Ajeeshkumar et al., 2021; Matos et al., 2019).

2023 yılında lipozom metodu kullanılarak betanin stabilizasyonunun arttırılması amacıyla jelibonlarla yapılan çalışmanın sonucunda betaninlerin stabilizasyonu ve antioksidan aktivitesi artmış, buna ek olarak elde edilen lipozomların jelibonlarda duyusal özellikleri de geliştirdiği ve biyoyararlanımını önemli ölçüde iyileştirdiği bildirilmiştir (Amjadi et al., 2018).

Niyozomlar da lipozomlara benzer yapıya sahiptir fakat niyozomların oluşturulmasında iyonik olmayan yüzey aktif maddeler (sürfektanlar) (Şekil 2.5) kullanılmaktadır (Matos et al., 2019; Riccardi et al., 2024).



Şekil 2.5. Lipozom ve niyozom yapıları

Lipozomlara alternatif olarak 1970'li yıllarda kozmetik ve farmasötik amaçlı üretilen niyozomlar; üretim maliyetlerinin düşük olması, toksik olmamaları, iyonik olmayan sürfektanlar sayesinde daha basit ve ucuz üretim tekniklerine sahip olmaları, fosfolipitlere kıyasla oksidasyona karşı daha stabil olmaları gibi önemli avantajlar taşımaktadır (Masjedi & Montahaei, 2021; Riccardi et al., 2024).

Niyozomların oluşturulması için polisorbatlar, Span, alkil oksietilenler, Tween gibi farklı türde iyonik olmayan sürfektanlar kullanılmaktadır ve stabilite için kolesterol ilavesi

yapılabilir. Ayrıca bu sürfektanların seçimi, hidrofilik-lipofilik balans (HLB) değeri, kritik paketleme parametresi (CPP) ve jel-sıvı geçiş sıcaklığı (T_C) gibi faktörlere göre belirlenir (Thabet et al., 2022). Niyozom oluşumu için en yaygın kullanılan iyonik olmayan sürfektanlar Span, Brij ve Tween'dir. Tween ve yüksek HLB değerine sahip bazı Brij yüzey aktif maddeleri, tek başına niyozom oluşturmak için uygun olmadığı için genellikle diğer sürfektanlar veya kolesterol ile kullanılır (Matos et al., 2019).

Amfipatik yapıdaki iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin yapısı niyozom oluşumunu sağlar, genellikle çift tabakalı zar oluşumunda hidrofobik bölgenin daha baskın olduğu sürfektanlar gereklidir fakat stabilizasyon için kolesterol gibi maddeler eklenerek de zardaki sağlamlık arttırılabilir. Uygun yüzey aktif maddenin seçiminde HLB dikkate alınmalıdır (Matos et al., 2019).

HLB sürfektanların moleküler yapılarındaki farklı grupların katkılarını tanımlama ihtiyacından doğmuş bir kavram olup düşük HLB değeri lipofilik özelliği, yüksek HLB değeri ise hidrofilik özelliği belirtir ve niyozom formülasyonlarının belirlenmesinde, kullanılan sürfektanların HLB değeri ve kapsüllenen bileşiklerin çözünürlüğü son derece önemlidir; örneğin HLB değeri arttıkça, niyozomların ortalama partikül boyutu artarken, düşük HLB değeri, düşük yüzey enerjisi nedeniyle daha küçük niyozom partiküllerine yol açabilir (Mawazi et al., 2025).

2.7.1.1. Niyozom Oluşturma Yöntemleri

Niyozomların oluşturulması için literatürde tanımlanan yöntemler; ince film hidrasyon yöntemi, eter enjeksiyon yöntemi, ters faz buharlaştırma yöntemi, transmembran pH gradyanı, baloncuk yöntemi ve mikrofülize yöntemidir (Thabet et al., 2022).

Eter enjeksiyon yönteminde bir sürfektan ve kolesterol karışımı dietil eterde çözülüp yavaşça örneği içeren önceden ısıtılmış bir sulu çözeltinin içine eklenir ve organik çözücü buharlaştığında, tek lipit katmanlı büyük veziküller oluşur (Thabet et al., 2022). 2023'te yapılan bir çalışmada aspirinin yaygın etkilerinden olan mide ülseri ve kanamanın önüne geçilmesi için eter enjeksiyon yöntemi ile niyozom oluşturularak aspirin kapsüllenmiş ve bu yan etkiler minimize edilmiştir (Krishna & Ruth, 2023).

Ters faz buharlaştırma yönteminde bir sürfektan ve kolesterol karışımı, bir organik çözücü içinde çözülür ardından örneği içeren sulu çözelti bu karışıma etkilendikten sonra

bu iki karışmayan faz emülsiyon oluşturmak için homojenize edilir ve ultrason uygulanır. Sonrasında organik çözücü düşük basınç altında buharlaştırılarak, sulu fazda dağılmış tek lipit katmanlı büyük niyozomlar elde edilir (Thabet et al., 2022). 2019'da sivilce tedavisinde kullanılan klindamisin fosfatın etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak için için ters faz buharlaştırma tekniği ile niyozom oluşturulmuştur (R. Sharma et al., 2019).

Transmembran pH gradyanı tekniğinde, sürfektan ve kolesterol kloroformda çözüldükten sonra inceltilmiş basınç altında buharlaştırılarak ince bir lipid filmi oluşturulur ve bu film, asidik bir çözelti (genellikle sitrik asit, pH yaklaşık 4) ile çözülür ve sonuçta elde edilen ürün, niyozom oluşturmak için dondurulur ardından kapsüllenecek örnek ilave edilmek üzere çözülür, çözeltinin pH seviyesini 7–7.2'ye yükseltmek için fosfat tamponu eklenir, böylece niyozomların iç ortamı dış ortamdan daha asidik hale gelir. Bu durum, kapsüllenen örneğin iyonize olmayan formunun niyozomal çift katmanından geçmesine olanak tanıyarak başarılı bir şekilde tutulmasını sağlar (Thabet et al., 2022). 2020 yılında sivrisineklerle mücadele için zerdeçal yağının niyozom oluşturulmasında transmembran pH grandaynı yöntemi uygulanmış olup niyozomların hastalık taşıyan sivrisineklerle mücadelede etkin olabileceği bildirilmiştir (Asaithambi et al., 2020).

2.7.1.2. İnce Film Hidrasyon Yöntemi

İnce film hidrasyon yöntemi, niyozom oluşturmak için yaygın olarak kullanılan basit bir teknik olup bu yöntemde, membran oluşturan sürfektan ve kolesterol, bir organik çözücüde çözülerek bir döner buharlaştırıcı kullanılarak karıştırılır ve organik çözücünün buharlaştırılması sonucunda şişenin tabanında ince bir film oluşturulur. Ardından, kapsüllenecek örneği içeren sulu çözelti sürfektanın geçiş sıcaklığının üzerindeki bir sıcaklıkta bu filme eklenir ve belirli bir süre boyunca sürekli hafif bir karıştırma ile çok katmanlı veziküller oluşturulur. Bu veziküller daha sonra ultrason işlemi ile tek katmanlı veziküllere (unilamellar vesicles) dönüştürülebilir (Thabet et al., 2022).

2022 yılında yapılmış bir çalışmada, yeşil çay kateşinlerinin biyoyararlanımını arttırmak için ince film hidrasyon yöntemi ile niyozomlar oluşturulmuş ve sonuçta elde edilen niyozomların kateşinlerin biyoyararlanımını arttırabildiği görülmüş ve çalışma niyozom ile enkapsülasyonun gıda uygulamalarında da kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Gadapa et al., 2022).

2021'de, güçlü bir antioksidan olan kuersetinin biyoyararlanımının ve stabilitesinin arttırılması amacıyla Tween ve Span sürfektanları kullanılarak, ince film hidrasyon yöntemi ile niyozomların içinde başarıyla kapsüllenmiştir (Javani et al., 2021).

2.7.1.3. Niyozomların Karakterizasyonu

Niyozomların parçacık boyutu, morfolojisi gibi özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla mikroskobik, kromatografik veya spektrofotometrik yöntemler kullanılarak karakterizasyon işlemleri yapılır (Hurma, 2024).

Kızılötesi (IR) ışınlar kullanılarak numunedeki moleküllerin titreşim hareketlerinin incelenmesi ile fonksiyonel grupların analiz edilmesini sağlayan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FT-IR) cihazı, 400-4000 cm^{-1} aralığındaki absorpsiyon piklerini göstererek niyozomların karakterizasyonu için kullanılır ve bu yöntem, moleküllerdeki küçük yapısal değişikliklerin tespitinde kullanılır (Kuşdemir, 2021).

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), elektronların 80-100 nm arasındaki ince kesitlerden geçerek numunenin iç yapısının detaylı görüntülenmesini sağlar; bu sayede niyozom ve hücre doku bileşiklerinin görselleştirilmesi açısından pahalı olsa da önemli bir karakterizasyon yöntemdir (Hurma, 2024).

Niyozomların süspansiyon içindeki dağılımının ve sistemin kararlılığının belirlenmesi için kullanılan bir yöntem olan Zeta potansiyeli, bir parçacık ile içinde bulunduğu sıvı arasındaki elektron potansiyeli ifade eder, parçacıkların itme-çekme kuvvetlerini belirler ve kollodial sistemlerin kararlılığı hakkında bilgi verir (Ateş, 2018).

Bu tez çalışmasında horozibiği çiçeklerinden konvansiyonel (KE) ve vakum mikrodalga destekli ekstraksiyon (VMDE) yöntemleri kullanılarak betalain ve fenolik bileşiklerin eldesi amaçlanmış ve her iki yöntemde optimizasyon gerçekleştirilerek uygun şartlar belirlenmiştir. Ayrıca, ekstrakt örneklerinde karakterizasyon için taramalı elektron mikroskobu ile morfolojik analizler gerçekleştirilmiştir. VMDE sonucu elde edilen optimum koşuldaki ekstrakt örneği niyozom yöntemiyle enkapsüle edilmiştir ve bunun için de optimum formülasyon bulunmuştur. Çiçek örneklerindeki betalainler ve diğer biyoaktif bileşiklerin stabilizasyonun arttırılması amaçlanmış, karakterizasyon için FTIR, TEM, parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçülmüştür. Ayrıca niyozom örneklerinin ısıl kararlılığı ölçülmüş, stabilizasyonu 30 günlük depolama sonucunda analiz edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal ve Kimyasallar

Horozibiği çiçekleri Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü'nden (Adana, Türkiye) temin edilmiştir. Temmuz- Ağustos 2023'te hasat edilen çiçek örnekleri kullanılmıştır. Çiçekler bitkiden elle ayrılmış olup, ardından 4°C'de sonraki analizlere dek muhafaza edilmiştir.

Analizler için kullanılan metanol, etanol, asetik asit, NaOH, gallik asit ve Folin-Ciocalteu Merck Chemical Reagents Company (Darmstadt, Germany)'den; amonyum asetat, sodyum karbonat, KCl, sodyum asetat, hidroklorik asit, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), formik asit, neocuproine, $CuCl_2$ ve troloks Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany)'den temin edilmiştir.

Niyozomal enkapsülasyon sırasında kullanılan Span 60, Tween 80, kloroform, kolesterol, sodyum fosfat dibazik, sitrik asit ve betanin standardı Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany)'den temin edilmiştir.

3.2.Horozibiği Çiçeğinin Fizikokimyasal Özellikleri

Herhangi bir işlem uygulanmamış horozibiği çiçeği örneğinde rutubet analizi etüvde 105 ^{o}C'de kurutma ve sabit tartıma getirme yöntemiyle, AACC 44-15.02 standardına göre gerçekleştirilmiştir (Anonim, 2009). Suda çözünür kuru madde tayini (°Brix) dijital refraktometre (Boeco, Almanya) kullanılarak 20°C'de gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir işlem uygulanmamış ve 1:10 (ağırlık:hacim) oranında saf su ilave edilmiş horozibiği çiçeği örneklerinde pH değerleri bir pH-metre (PL-700PV, Ezdo, Tayvan) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam titrasyon asitliği tayini için, 10 g horozibiği çiçeği örneğine 100 ml saf su ilave edilmiş ve süzülmüştür. Süzülen sıvıdan 25 ml alınarak 0.1 N NaOH çözeltisi ile pH 8 olana kadar titrasyon yapılmıştır ve sonuç sitrik asit cinsinden ifade edilmiştir. Toplam titrasyon asitliği için aşağıdaki eşitlik (3.1) kullanılmıştır.

$$\text{Toplam Titrasyon Asitliği} = V \times N \times E \times 1000/M \quad (3.1)$$

Bu eşitlikte; V kullanılan NaOH hacmi (mL), N kullanılan NaOH normalitesi, E örnekteki baskın organik asit olarak kabul edilen sitrik asitin eşdeğer ağırlığı ve M alınan örnek miktarını temsil etmektedir.

Horozibiği çiçeği örneğinde renk analizi, renk ölçüm cihazı (Minolta, CM-3600d, Japonya) kullanılarak CIE L*, a* ve b* renk skalası ile ifade edilmiştir.

İşlem görmemiş horozibiği çiçeğinin toplam betalain miktarı (TBM), toplam fenolik madde miktarı (TFM) ve toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için ultrasonik banyo (Şimşek Laborteknik, Türkiye, model: WF-UD10) kullanılmış, etanol:su (2:5 v:v) ile 6 kez 10 dakika ekstraksiyon yapılmış ve filtrasyon gerçekleştirilerek çiçeklerin rengi beyazlaşana kadar çıkarılan tüm örnekler biriktirilmiştir. Ardından örneklerde TBM (bkz. 3.4.1.), TFM (bkz. 3.4.3) ve TAK_{CUPRAC} (bkz. 3.4.3.2.) analizleri yapılmıştır.

3.3. Horozibiği Çiçeğinden Betalain ve Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Şartlarının Optimizasyonu

Horozibiği çiçeği örneklerinden betalain ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu amacıyla konvansiyonel (KE) ve vakum mikrodalga destekli (VMDE) olmak üzere iki ayrı yöntem kullanılmıştır. Her iki yöntemde de kullanılan şartların optimizasyonu için istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin birleşimi olan yanıt yüzey metodu (Response Surface Methodology-RSM) uygulanmıştır(Baş & Boyacı, 2007; Yolmeh & Jafari, 2017). Mühendislik proseslerinin analizi ve modellenmesinde sık kullanılan bu yöntemin içerdiği Box-Behnken deneysel tasarımı her iki yöntemle ekstraksiyon için kullanılmıştır (Baş & Boyacı, 2007). Deney sayısının belirlenmesi amacıyla eşitlik (3.2) kullanılmıştır (Yolmeh & Jafari, 2017).

$$N = k^2 + k + c_p \qquad (3.2)$$

Bu eşitlikte, k bağımsız değişken sayısı, c_p merkez noktadaki deneyin tekrarlanma sayısıdır. Her iki ekstraksiyon yönteminde de 4 bağımsız değişken, 5 merkez nokta ve toplam 29 deney noktası belirlenmiştir.

Her iki yöntemde de ekstraksiyon çözücüleri olarak %20, %40, %60 etanol oranlarında etanol:su (v:v) karışımları tercih edilmiştir. Çünkü, fenolik bileşikler ve antioksidanlar hem polar (fenolik asitler gibi) hem de yarı polar (flavonoidler gibi) molekülleri içerir.

Su çok polar bileşikleri çözer; etanol daha az polar olanları çözer. Betalainler suda çözünen bileşiklerdir ve bunların yanında daha geniş yelpazede fenolik bileşiklerin ve antioksidan kapasitesi yüksek olan bileşiklerin ekstraksiyonu için etanol:su karışımları tercih edilmektedir (Yang et al., 2017).

Literatürde de etanol:su karışımlarının (özellikle %50-80 etanol) saf çözücülere kıyasla sürekli olarak daha yüksek miktarlarda fenolik, flavonoid ve betalain çıkardığını göstermektedir (Xu & Chang, 2007).

3.3.1.Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE)

Horozibiği çiçeği örneklerinde konvansiyonel yöntemle ekstraksiyon (maserasyon) için çalkalamalı su banyosu (msc 30, Mikrotest, Türkiye) kullanılmıştır. Bu yöntemde, 10 g örnek uygun miktardaki çözücüyle, belirlenen sıcaklık ve sürede su banyosunda maserasyona tabi tutulmuştur. Ardından, elde edilen ekstraktlar 0.45 μm'lik şırınga filtreden geçirilerek analizlere hazır hale getirilmiştir.

KE şartlarının optimizasyonu için kullanılan 4 adet bağımsız değişken, X_1: süre (sa), X_2: sıcaklık (°C), X_3: etanol oranı (%) ve X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL) olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin her biri için üçer seviye değeri belirlenmiş olup, bu değerler Çizelge 3.1'de verilmektedir. Değerlerin belirlenmesinde güncel literatürden yararlanılmıştır (Prakash Maran et al., 2013; Rodríguez-Mena et al., 2021; Zin et al., 2020). Toplam 29 deneyin şartları kodlanmış şekilde Çizelge 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3.1. Konvansiyonel ekstraksiyonda kullanılan bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

	Derecelerin kodlanmış ve gerçek değerleri		
Bağımsız değişkenler	**-1**	**0**	**1**
X_1: Ekstraksiyon süresi (sa)	1	2	3
X_2: Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	30	40	50
X_3: Etanol yüzdesi (%)	20	40	60
X_4: Örnek: çözücü oranı (g:mL)	1:10	1:20	1:30

Çizelge 3.2 Konvansiyonel ekstraksiyonda uygulanan Box-Behnken deney tasarımı (X_1: süre (sa), X_2:sıcaklık (°C), X_3:etanol oranı (%), X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL))

	Bağımsız Değişkenler			
Deney No.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**
1	0	1	0	1
2	-1	0	1	0
3	-1	1	0	0
4	1	0	-1	0
5	0	0	0	0
6	0	0	1	1
7	1	0	0	-1
8	0	0	0	0
9	0	1	0	-1
10	-1	0	0	1
11	1	-1	0	0
12	0	0	1	-1
13	0	0	0	0
14	-1	0	-1	0
15	0	1	-1	0
16	-1	-1	0	0
17	0	-1	0	1
18	1	0	0	1
19	1	1	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	-1	-1
22	0	-1	-1	0
23	0	0	-1	1
24	0	0	0	0
25	0	-1	1	0
26	0	1	1	0
27	1	0	1	0
28	0	-1	0	-1
29	-1	0	0	-1

Çizelge 3.2'de verilmiş olan şartlara uygun olarak gerçekleştirilen 29 deney sonucu elde edilen ekstrakt örneklerinde, Y_1: toplam betalain miktarı (TBM), Y_2: toplam fenolik madde miktarı (TFM), Y_3 ve Y_4: toplam antioksidan kapasitesi (TAK_{CUPRAC} ve TAK_{DPPH}) değerleri bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak ölçülmüştür. Optimum şartların

belirlenmesinde bu değerlerin maksimize edilmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon için Design Expert 13 (Stat-Ease, Minneapolis, ABD) programı kullanılmıştır.

3.3.2.Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (VMDE)

Horozibiği çiçeği örneklerinin vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonu için ayarlanabilir vakumlu mikrodalga cihazı (IFTECH, Türkiye) kullanılmıştır (Şekil 3.1). Bu yöntemde, 10 g örnek ve uygun oranda çözücü karıştırılmış ve vakum altında mikrodalga destekli ekstraksiyon uygulaması yapılmıştır. Ekstrakt örnekleri, 0.45 μm'lik şırınga filtreden geçirilmiş ve analize hazır hale getirilmiştir.

VMDE şartlarının optimizasyonu için kullanılan 4 adet bağımsız değişken, X_1: vakum değeri (mmHg), X_2: süre (dk), X_3: etanol oranı (%) ve X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL) olarak belirlenmiştir. Bu değişkenlerin her biri için üçer seviye değeri belirlenmiş olup, bu değerler Çizelge 3.1'de verilmektedir.

Box-Behnken deney tasarımı ile 4 bağımsız değişken, 5 merkez nokta ve toplam 29 deney gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4). 4 bağımsız değişkenin belirlenmesinde ön deneyler yapılmıştır (Akdeniz & Yolaçaner, 2025).



Şekil 3.1. VMDE için kullanılan ayarlanabilir vakumlu mikrodalga cihazı

Çizelge 3.3. Vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda kullanılan bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve gerçek değerleri

	Derecelerin kodlanmış ve gerçek değerleri		
Bağımsız değişkenler	**-1**	**0**	**1**
X_1: Vakum değeri (mmHg)	150	300	450
X_2: Ekstraksiyon süresi (dk)	3	9	15
X_3: Etanol yüzdesi (%)	20	40	60
X_4: Örnek: çözücü oranı (g:mL)	1:10	1:20	1:30

Çizelge 3.4. Vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda uygulanan Box-Behnken deney tasarımı (X_1: Vakum değeri (mmHg), X_2: Süre (dk), X_3: Etanol oranı (%), X_4: örnek: çözücü oranı (g:mL))

	Bağımsız Değişkenler			
Deney No.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**
1	1	-1	0	0
2	-1	0	-1	0
3	-1	1	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	-1	0	1
7	-1	-1	0	0
8	1	0	0	1
9	1	0	-1	0
10	0	0	0	0
11	0	1	0	-1
12	0	1	-1	0
13	-1	0	0	1
14	-1	0	1	0
15	0	0	1	-1
16	1	0	1	0
17	0	0	-1	1
18	1	0	0	-1
19	0	-1	0	-1
20	0	0	1	1
21	-1	0	0	-1
22	0	-1	1	0
23	0	0	0	0
24	0	1	1	0
25	0	1	0	1
26	0	-1	-1	0
27	0	0	-1	-1
28	0	0	0	0
29	1	1	0	0

Çizelge 3.4'te verilmiş olan şartlara uygun olarak gerçekleştirilen 29 deney sonucu elde edilen ekstrakt örneklerinde, Y_1: toplam betalain miktarı (TBM), Y_2: toplam fenolik madde miktarı (TFM), Y_3 ve Y_4: toplam antioksidan kapasitesi (TAK_{CUPRAC} ve TAK_{DPPH}) değerleri bağımlı değişkenler (yanıtlar) olarak ölçülmüştür. Optimum şartların

belirlenmesinde bu değerlerin maksimize edilmesi hedeflenmiştir. Optimizasyon için Design Expert 13 (Stat-Ease, Minneapolis, ABD) programı kullanılmıştır.

3.4.Horozibiği Çiçeği Ekstraktlarının Analizi

3.4.1.Toplam Betalain Miktarı (TBM)

KE ve VMDE deneylerinin gerçekleştirilmesinin ardından elde edilen ekstrakt örneklerinde toplam betalain miktarının belirlenmesi için iki dalga boyunda spektrofotometre (Thermoscientific, Genesys 10S UV-Vis)kullanılarak absorbans ölçümleri yapılmıştır. 535 nm betasiyanin ve 483 nm betaksantin miktarının belirlenmesinde kullanılmış ve hesaplamada Lambert Beer'in yasası göz önünde bulundurularak aşağıdaki eşitlik (3.3) kullanılmıştır (Castellanos-Santiago & Yahia, 2008).

$$\text{TBM (mg/kg)} = \frac{A \times D_F \times M_W \times V_d \times 1000}{\varepsilon \times l \times W_d} \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte, A: 535 nm (betasiyanin) veya 483 nm (betaksantin) dalga boyunda okunan absorbans değeri, D_F: dilüsyon faktörü, M_W: moleküler ağırlık (betasiyanin: 550 g/mol ve betaksantin: 308 g/mol), V_d: çözelti hacmi (mL), W_d: örnek miktarı (g), ε: molar absorpsiyon katsayısı, betasiyanin için 60000 L/mol cm, (su içerisinde) ve betaksantin için 48000 L/mol cm, (su içerisinde), l: Küvet çapı (1 cm).

Elde edilen TBM sonuçları, her bir deneyden elde edilen 3 tekrarın ortalaması olarak belirlenmiştir.

3.4.2.Toplam Fenolik Madde (TFM)

KE ve VMDE yöntemlerinde gerçekleştirilen deneylerden elde edilen ekstrakt örneklerinde toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi için Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Ekstrakt örnekleri, deney koşulunda kullanılmış olan etanol yüzdesindeki çözelti ile 1:20 oranında seyreltilmiştir. Bu yönteme göre 0.5 mL ekstrakt 2.5 mL 0.2 N Folin-Ciocalteu kimyasalı ile vorteks yardımıyla 5 saniye karıştırılmış ve 5 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Ardından, 2 mL sodyum karbonat çözeltisi (75 g/L)

eklenmiştir ve çözelti 5 saniye vortekslendikten sonra 1 saat karanlıkta oda koşullarında bekletilmiştir. Kör örnek olarak 2.5 mL Folin-Ciocalteu, 2 mL sodyum karbonat ve 0.5 mL etanol çözeltisi (deney koşulunda kullanılmış olan etanol yüzdesinde) kullanılmış ve 765 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır (B. Akdeniz, 2017).

TFM miktarı (mg GAE/kg), gallik asit eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Bunun için farklı konsantrasyonlarda (20-40-60-80-100 ppm) gallik asit (3,4,5-trihydroxybenzoic acid), farklı konsantrasyonlarda etanol (%20, 40, 60) ile seyreltilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur (Şekil A1-A4) (Doğan, 2015). Bu kalibrasyon eğrilerine göre sonuçlar her bir deneyde 3 tekrarın ortalaması olarak belirlenmiştir.

3.4.3.Toplam Antioksidan Kapasite (TAK)

KE ve VMDE yöntemleriyle gerçekleştirilen deneylerden elde edilen ekstrakt örneklerinde toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve CUPRAC yöntemleri kullanılmıştır.

TAK miktarı (mmol TE/kg) her iki yöntem için de troloks eşdeğeri cinsinden verilmiştir. DPPH ve CUPRAC için farklı konsantrasyonlarda troloks kalibrasyon eğrileri hazırlanmış ve hesaplamalarda bu kalibrasyon eğrileri kullanılmıştır (Şekil A5-A8 ve (Şekil A9-A12) (Tufan et al., 2013).

3.4.3.1.DPPH Yöntemi (TAK_{DPPH})

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için DPPH yönteminde, deney koşullarında kullanılan çözeltilerdeki etanol yüzdesi baz alınarak ekstrakt örnekleri 1:20 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Analizde kullanılacak olan 25 ppm'lik DPPH radikal solüsyonu 2.5 mg DPPH, 10 mL metanol ve 90 mL etanol kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltisinden 3.9 mL alınarak üzerine 100 μL metanol eklenmiş ve vorteks yardımıyla karıştırılmıştır. Bu çözeltinin absorpsiyonu (A1) 517 nm'de kör örnek olarak metanole karşı spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Seyreltilmiş numunelerden de 100 μL alınarak 3.9 mL DPPH radikal solüsyonuna eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra 1 saat karanlıkta bekletildikten sonra spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır (A2) (B. Akdeniz et al., 2018).

DPPH kalibrasyon eğrileri kullanılarak (Şekil A5-A8), A1 ve A2 için konsantrasyonlar (C1 ve C2) belirlenmiş ve aşağıdaki eşitlik (3.4) kullanılarak toplam antioksidan kapasite hesaplanmıştır.

$$\mathrm{TAK_{DPPH}(mg\ DPPH/kg\ kuru\ madde)} = \left(\frac{(C1-C2)\times DF\times V}{m}\right) \times Mw \qquad (3.4)$$

Bu eşitlikte, DF: dilüsyon faktörü, V: ekstrakt hacmi (mL), m: örneğin ağırlığı (mg), M_W: DPPH moleküler ağırlığıdır.

Elde edilen TAK_{DPPH} sonuçları, her bir deneyden elde edilen 3 tekrarın ortalaması olarak belirlenmiştir.

3.4.3.2. CUPRAC Yöntemi (TAK_{CUPRAC})

Toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için CUPRAC yöntemi uygulanmadan önce, gerekli çözeltiler hazırlanmıştır (Yiğit, 2018). Bu çözeltiler;

Bakır (II) Klorür Çözeltisi: $CuCl_2.2H_2O$ bileşiğinden 0.4264g alınarak saf su ile 250 mL stok çözelti 1.0 x 10^{-2} M olacak şekilde; *Amonyum Asetat Tamponu:* 19.27 g Amonyum asetat saf su ile 250 mL'ye tamamlanarak 1 M çözelti (pH 7) ve *Neokuproin çözeltisi:* 0.156 g 2,9- dimetil-1,10-fenantrolin tartılarak 100 mL etanol ile 7.5x 10^{-3} M olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ekstrakt örnekleri, 1:20 oranında deney koşulundaki etanol yüzdesine bağlı olarak seyreltilerek hazırlanmıştır. Bakır (II) Klorür, Neokuproin ve Amonyum asetat çözeltilerinden 1'er mL alınarak, bu çözeltiye 0.4 mL ekstrakt örneği ilave edilmiş üzerine ve 0.7 mL deney koşulundaki etanol yüzdesine bağlı olmak koşulu ile etanol çözeltisi eklenmiştir. Kör örnek olarak hazırlanmış çözeltilerin üzerine deney koşulundaki etanol yüzdesine bağlı olarak 1.1 mL etanol çözeltisi eklenmiştir. 1 saat karanlıkta bekletildikten sonra 450 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapılmış ve toplam antioksidan kapasite değeri aşağıda verilen eşitlik (3.5) kullanılarak hesaplanmıştır (Yiğit, 2018).

$$\mathrm{TAK_{CUPRAC}(mmol\ TE/kg\ kuru\ ağırlık)} = \left(\frac{A}{\varepsilon}\right) \times \left(\frac{V_t}{V_{ö}}\right) \mathrm{xDFx1000} \qquad (3.5)$$

Bu eşitlikte; A: 450 nm'de ölçülen absorbans, Ɛ: Trolox molar absorplama katsayısı, Vt: CUPRAC ölçümündeki toplam çözelti hacmi (4.1 mL), Vö: örnek hacmi (0.4 mL), DF: dilüsyon faktörüdür. Kalibrasyon eğrisi Şekil A9-A12'de verilmiştir. Elde edilen TAK_{CUPRAC} sonuçları, her bir deneyden elde edilen 3 tekrarın ortalaması olarak belirlenmiştir.

3.4.4. KE ve VMDE Şartlarının Optimizasyonu

KE ve VMDE için tasarlanan 29'ar deney gerçekleştirilmiş ve iki metot için de dört yanıt (TBM, TFM, TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC}) alınmıştır. Elde edilen bu yanıtlar Design Expert 13 programı kullanılarak değerlendirilmiş, ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve çoklu regresyon analizi ile ikinci dereceden model eşitlikleri belirlenmiştir. İkinci dereceden model eşitliklerin genel formu Eş. 3.6'daki gibidir;

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^{p} \beta_j x_j + \sum_{j=1}^{p} \beta_{jj} x_j^2 + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \qquad (3.6)$$

Bu eşitlikte y, bağımlı değişkeni (yanıt) ifade eder. x_j ve x_i, bağımsız değişkenlerdir. β_0, tüm bağımsız değişkenlerin etkisiz olduğu durumda yanıtın değeridir. βj, bağımsız değişkenlerin lineer etkilerini temsil eden katsayılardır. βjj, bağımsız değişkenlerin ikinci dereceden etkilerini gösteren katsayılardır. βij, bağımsız değişkenlerin ikili etkileşim katsayılarıdır. ε, hata terimini ifade eder.

İki yöntem için de yapılan deneyler sonucunda elde edilen yanıtların, seçilen modelle uyumu varyans analizi (ANOVA) yapılarak belirlenmiş ve modelin deneysel veriler ile uyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla uyum eksikliği testi uygulanmıştır. Bağımsız değişkenlerin yanıtlar üzerindeki etkileşimlerini gösteren yanıt yüzey grafikleri de Design Expert 13 programı ile oluşturulmuştur. Yapılan varyans analizleri sonucunda; oluşturulan modellerin gerçek cevaplara uygunluklarına ise, modelin önemli bulunması ($p<0.05$), uyum eksikliğinin önemsiz ($p>0.05$) olması ve ilgili modele ait regresyon katsayısı (R^2) değerinin; 0.75'ten büyük olması durumu dikkate alınarak karar verilmiştir.

İki yöntem için de yanıtlar için model eşitlikleri oluşturulup varyans analizleri gerçekleştirildikten sonra, KE ve VMDE için optimum deney koşulları belirlenmiştir. İlgili program kullanılarak istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu yardımıyla optimum deney koşulları belirlenmiş ve iki yöntem için de optimum koşullarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen yanıtların programın verdiği yanıtlarla uyumluluğu karşılaştırılmıştır.

3.4.5.Renk Analizi

KE ve VMDE deneylerinin tamamlanmasının ardından iki yöntem içinde elde edilen optimum koşullarındaki ekstraktların renk değerleri renk ölçüm cihazı kullanılarak CIE L*, a* ve b* renk skalası ile ifade edilmiştir.

3.4.6.LC-MS-Q-TOF ile Analizi

KE ve VMDE deneylerinin tamamlanmasının ardından iki yöntem içinde elde edilen optimum koşullarındaki ekstrakt örneklerinin betalain kompozisyon analizi LC/MS Q-TOF (Agilent Technologies 6530, ABD) gerçekleştirilmiştir. İyonizasyon, Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu (APCI) modunda uygulanmıştır. Cihazın çalışma koşulları kapsamında MMI (Seg) gaz sıcaklığı 345°C, buharlaştırıcı sıcaklığı 245°C olarak belirlenmiş, kurutma gazı akışı 10.0 L/dk ve nebülizör basıncı 35 psi olarak ayarlanmıştır. MMI (Expt) modunda VCap voltajı 3500 V, Corona+ akımı 4 µA, kapiler akımı 5.438 µA, Corona voltajı 6.31 V ve oda akımı 39.98 µA olarak uygulanmıştır. Kütle spektrometresi ayarlarında, fragmentör voltajı 150 V, skimmer voltajı 50 V ve Oct 1 RF Vpp değeri 750 V olarak belirlenmiştir. Analiz, belirlenen bu koşullar altında gerçekleştirilerek hedef bileşiklerin yüksek hassasiyetle tespiti sağlanmıştır.

Hesaplamalarda kullanılmak üzere betanin standart eğrisi hazırlanmış (Şekil A13) ve ekstraktlardaki betalain miktarları betanin eşdeğeri şeklinde sonuç verilmiştir (Li et al., 2015).

3.4.7. Isıl Kararlılık

KE ve VMDE optimum koşul ekstrakt örneklerinin ısıya dayanıklılığının test edilmesi için 70°C'de 30 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletilmesinin ardından TBM ölçümü (bkz. 3.4.1.) gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen TBM sonuçları ekstrakt örneklerinin TBM değerinden çıkartılarak ekstraktların ısıl kararlılığı eşitlik 3.7'ye göre hesaplanmıştır.

$$\text{Isıl Kararlılık } (\%) = \left(\frac{\text{TBM}_{\text{Isıl İşlem Öncesi}}}{\text{TBM}_{\text{Isıl İşlem Sonrası}}}\right) \times 100 \qquad (3.7)$$

3.4.8.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Morfolojik Analiz

KE ve VMDE için optimum koşullardaki ekstraktlar elde edildikten sonra ekstraksiyon işlemlerinin örnek üzerindeki etkisinin, yüzey yapılarının ve morfolojisinin incelenmesi için SEM analizi (Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS) gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi örnekler dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu amaçla, örnekler liyofilizatör (Christ, Almanya) kullanılarak 24 saat kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından numuneler iletkenlik sağlamak amacıyla ince bir altın (Au) tabakası ile kaplanmıştır. SEM görüntüleme işlemi sırasında, hızlandırma voltajı 5 kV olarak ayarlanmış ve büyütmeler 75X ile 10.000X arasında değiştirilerek yüzey morfolojisi detaylı olarak incelenmiştir.

3.5.Niyozom Yöntemi ile Enkapsülasyon

VMDE yöntemi sonucu optimum koşullarda elde edilen ekstrakt örneği kullanılarak niyozom yöntemiyle enkapsülasyon gerçekleştirilmiştir. Niyozomların oluşturulmasında ince film hidrasyon yöntemi kullanılmıştır ve bu yöntemde kullanılacak olan sürfektanlar literatür kaynakları incelenerek Span60 ve Tween80 olarak belirlenmiştir (Elmi et al., 2021; Nadzir et al., 2017). Niyozom stabilitesinin arttırılabilmesi için kolesterol kullanılmıştır (Baek et al., 2017). Niyozom veziküllerinin homojen olarak oluşabilmesine destek olarak ultrason uygulaması gerçekleştirilmiştir.

Niyozom oluşturulmasında deney parametrelerinin optimizasyonu için yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla belirlenen 4 bağımsız değişken (Elmi et al., 2021); X_1: sürfektanların molar oranı (Span60:Tween80), X_2: ekstrakt miktarı (mg ekstrakt/ 100 mg sürfektan), X_3: kolesterol miktarı (mg/ 100 mg sürfektan) ve X_4: ultrason süresi (s)'dir ve kodlanmış ve gerçek değerleri Çizelge 3.5'te verilmiştir. Box-Behnken deney tasarımına göre toplam 29 deneyden oluşan deney tasarımı Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.5. Niyozom yöntemi ile enkapsülasyonda kullanılan bağımsız değişken derecelerinin kodlanmış ve gerçek değerleri

	Derecelerin kodlanmış ve gerçek değerleri		
Bağımsız değişkenler	**-1**	**0**	**1**
X_1: Sürfektan molar oranı (Span60:Tween80)	1:1	2:1	3:1
X_2: Ekstrakt miktarı (mg /100 mg sürfektan)	5	10	15
X_3: Kolesterol miktarı (mg/100 mg sürfektan)	0.1	0.2	0.3
X_4: Ultrason süresi (s)	0	45	90

Çizelge 3.6. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinin enkapsülasyonunda gerçekleştirilen deneyler (X_1: Sürfektan molar oranı (Span60:Tween80), X_2: Ekstrakt miktarı (mg /100 mg sürfektan), X_3: Kolesterol miktarı (mg/100 mg sürfektan), X_4: Ultrason süresi (s))

	Bağımsız Değişkenler			
Deney No.	**X_1**	**X_2**	**X_3**	**X_4**
1	0	0	1	-1
2	0	0	0	0
3	0	-1	-1	0
4	1	0	0	1
5	0	0	-1	-1
6	0	0	0	0
7	-1	0	0	-1
8	0	1	-1	0
9	0	0	1	1
10	0	0	0	0
11	0	-1	1	0
12	-1	1	0	0
13	1	0	-1	0
14	0	0	0	0
15	-1	0	1	0
16	1	0	0	-1
17	0	0	-1	1
18	0	1	0	-1
19	0	0	0	0
20	-1	0	-1	0
21	0	-1	0	-1
22	1	0	1	0
23	-1	-1	0	0
24	0	-1	0	1
25	-1	0	0	1
26	1	1	0	0
27	0	1	1	0
28	0	1	0	1
29	1	-1	0	0

İnce film hidrasyon yöntemi uygulanırken Thabet ve arkadaşlarının 2022'de yaptıkları çalışma modifiye edilerek kullanılmıştır ve bu yönteme göre Çizelge 3.6'da verilen deney

şartlarında uygun miktarlarda sürfektan ve kolesterol 250 mL'lik bir cam balona alınarak 2:1 (v/v) oranında kloroform:etanol içinde manyetik karıştırıcı yardımıyla çözdürülmüş ve çözünmeden sonra, cam balon döner buharlaştırıcıya (Heidolph, Almanya) alınarak organik çözücünün 50 ºC sıcaklık, 250 mmHg basınçta ve 120 rpm hızda buharlaştırılması sonucu oda sıcaklığına getirilen cam balonun tabanında ince bir film tabaka oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Ardından deney koşuluna uygun miktarda ekstrakt film tabakasının üzerine eklenmiş ve 50 ºC sıcaklıkta vakum uygulanmadan 120 rpm hızda 30 dakika karıştırılarak çok katmanlı niyozom vezikülleri üretilmiş ve bu veziküller %70'lik bir güçte ultrasonik prob (Bandelin Sonopuls, Berlin, Almanya) yardımıyla deney koşullarında belirlenmiş süre ultrason uygulaması ile tek katmanlı hale getirilmiştir (Thabet et al., 2022). Elde edilen niyozomal veziküller analizleri yapılıncaya kadar +4ºC'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Niyozom veziküllerinin oluşturulmasında ince film hidrasyon yöntemi ile oluşan ince film tabakası

3.5.1.Ekstrakt Yüklü Niyozomal Veziküllerin Analizi ve Optimizasyonu

Deney koşullarına göre elde edilmiş tüm ekstrakt yüklü niyozomal veziküllerde toplam betalain miktarı (TBM_N), toplam fenolik madde (TFM_N), toplam antioksidan kapasite (TAK_N), renk tayini (a*) ve enkapsülasyon verimi (%EE) ölçümü yapılmıştır. Design Expert 13 programı kullanılarak 5 yanıta göre optimizasyon yapılmıştır ve değerlendirilmiştir. Yanıtlar için ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve niyozom

oluşturmak için optimum koşul parametreleri belirlenmiştir. Bu optimum koşul parametreleri istenen hedefe ulaşma fonksiyonu en yüksek olan deney koşulu seçildikten sonra o koşullarda deneyler gerçekleştirilmiştir. Ardından elde edilen yanıtlarla program tarafından verilen yanıtlar karşılaştırılarak optimum koşullarda diğer analizler gerçekleştirilmiştir. Yanıtların analizi için yüzey yanıt grafikleri de Design Expert 13 programı ile oluşturulmuştur.

3.5.1.1.Niyozomlarda Toplam Betalain Miktarı (TBM_N)

Ekstrakt yüklü niyozomal veziküllerin içerdiği toplam betalain miktarının belirlenmesinde, öncelikle 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj (Sigma 3-18K, Almanya) işlemi yapılmış ve niyozom vezikülleri çöktürülmüştür. Ardından süpernatant çöken veziküllerden ayrılmış ve süpernatantta ölçüm yapılmıştır. Süpernatanttan elde edilen sonuçların enkapsülasyon öncesi TBM değeri ile farkı kullanılarak TBM_N hesaplanmıştır.

Ekstrakt yüklü niyozom veziküllerinde TBM belirlenmesi aşamasında süpernatantta oluşan bulanıklığın giderilebilmesi amacıyla McIlvaine tampon çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözelti, 0.1M sitrik asit (30 mL) ve 0.2M fosfat dibazik (70 mL) kullanılarak (pH 6.5) hazırlanmıştır (Bhagya Raj & Dash, 2020; Wong & Siow, 2015). 50 kat seyreltme için örneklerden 0.1 mL, tampon çözeltiden 4.9 mL eklenmiş ve kör örnek olarak McIlvaine tampon çözeltisi kullanılmıştır. 535 ve 483 nm'de sırasıyla betasiyanin ve betaksantin için absorbans ölçümü yapılmıştır ve Eş.3.3 kullanılarak TBM_N hesaplanmıştır.

3.5.1.2.Niyozomlarda Toplam Fenolik Madde (TFM_N)

Ekstrakt yüklü niyozomal veziküllerin TFM içeriğinin belirlenmesi için, oluşmuş olan veziküllerin parçalanması ve içerikteki fenolik bileşiklerin açığa çıkması gerekmektedir. Bu parçalama için niyozom örneklerine 1:1 oranında etanol çözeltisi (%50) ilave edilmiş ve 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj uygulanmıştır. Süpernatant ayrıldıktan sonra elde edilen süpernatantta Folin-Ciocalteu yöntemi (Bkz. 3.4.2.) kullanılarak ölçüm yapılmış ve enkapsülasyon öncesi ekstrakttaki TFM'den farkı alınarak belirlenmiştir (Gorjian et al., 2021; Heidari et al., 2020; Tyagi et al., 2023).

3.5.1.3.Niyozomlarda Toplam Antioksidan Kapasite (TAK_N)

Ekstrakt yüklü niyozomal veziküllerde TAK miktarının belirlenmesi için CUPRAC metodu kullanılmıştır. Niyozom örneği içeriğindeki antioksidan miktarının tayini için örnekler 5.1.2'de açıklandığı şekilde parçalanmış ve süpernatantta TAK_{CUPRAC} metodu (Bkz. 4.3.2.2.) kullanılarak ölçüm yapılmış ardından enkapsülasyon öncesi ekstrakttaki TAK ile farkı alınarak TAK_N hesaplanmıştır (Gorjian et al., 2021; Heidari et al., 2020; Tyagi et al., 2023).

3.5.1.4.Niyozomlarda Renk Analizi

Ekstrakt yüklü niyozomal veziküllerin renk değerleri, renk ölçüm cihazı (Minolta, CM-3600d, Japonya) kullanılarak CIE L*, a* ve b* renk skalası ile ifade edilmiştir. Örneklerde deney yanıtı olarak renk ölçümünde kırmızılığın ölçütü olan a* değeri kullanılmıştır.

3.5.1.5.Enkapsülasyon Verimi (%)

Enkapsülasyon verimi niyozom içeriğine yüklenebilen toplam betalain miktarına göre belirlenmiştir. Enkapsülasyon öncesinde ekstraktta bulunan ve sonrasında elde edilen niyozom örneklerindeki betalain miktarları ($TBM_{Serbest}$ ve TBM_N) belirlenmiş ve ardından aşağıdaki eşitlik (3.8) kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır (Elmi et al., 2021).

$$\text{Enkapsülasyon Verimi (\%)} = \frac{\mathrm{TBM_N}}{\mathrm{TBM_{Serbest}+TBM_N}} \times 100 \qquad (3.8)$$

3.6.Optimum Şartlarda Elde Edilen Niyozomal Veziküllerin Karakterizasyonu

3.6.1.Niyozomal Veziküllerin Isıl Kararlılığı

Kapsüllerin ısıya dayanıklılığının test edilmesi için 70°C'de 30 dakika boyunca sıcak su banyosunda bekletilmesinin ardından TBM ölçümü için Elmi ve arkadaşlarının metodu modifiye edilip kullanılmıştır (Elmi et al., 2021). Buna göre 2 mL niyozomal süspansiyona 2 mL etanol (50%) eklenmiş ardından 10000 rpm'de 10 dk santrifüj

uygulanmış ve sonrasında kapsüllerin parçalanması amacıyla altta kalan pellet kısmı kloroform ile 1:1 oranında karıştırılmış ve üstte biriken kısımda TBM analizi gerçekleştirilmiştir. Hesaplamalarda eşitlik (3.9) kullanılmıştır.

$$\text{Isıl Kararlılık } (\%) = \left(\frac{\text{TBM}_{\text{Isıl İşlem Öncesi}}}{\text{TBM}_{\text{Isıl İşlem Sonrası}}}\right) \times 100 \quad (3.9)$$

3.6.2.Enkapsülasyon Stabilitesi

Optimizasyon sonrası optimum koşuldaki kapsülde enkapsülasyon stabilitesinin (%ES) belirlenmesi için örnekler 30 gün boyunca +4°C'de muhafaza edilmiş, ardından 1, 15 ve 30. günlerde örneklerdeki betalain miktarları bölüm 3.2.4.3'te belirtilen şekilde spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon stabilitesi aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır (Eş. 3.10) (Elmi et al., 2021; Javani et al., 2021).

$$\text{Enkapsülasyon Stabilitesi } (\%\text{ES}) = \left(\frac{\text{TBM}_{\text{n.gün}}}{\text{TBM}_{\text{0.gün}}}\right) \times 100 \quad (3.10)$$

3.6.3.Morfolojik analiz (TEM)

Kapsüllerin morfolojik analizi için TEM analizi (FEI Tecnai G^2 Spirit BioTwin), gerçekleştirilmiştir. Kapsüllerin 0. gün ve +4°C karanlıkta 30 gün depolanmasının ardından morfolojik özellikleri belirlenmiştir. Örnekler analizden önce fosfotungstik asit çözeltisi ile 1 dakika boyanmış ve yaklaşık 5-10µL olacak şekilde bakır gridler üzerine damlatılmıştır. Örneğin fazlası filtre kâğıdı ile alınmış ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Analiz 120 kV hızlandırıcı voltajda gerçekleştirilmiştir (Elmi et al., 2021; Gutiérrez et al., 2016).

3.6.4.FT-IR analizi

Optimum koşullarda elde edilen niyozom örneklerinin yapısal analizi için FT-IR spektrometre cihazı (Nicolet is50, Thermo Fisher) kullanılmış ve bu analiz için örnekler 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında 4 cm^{-1} çözünürlük değerinde spektra incelenmiştir (Javani et al., 2021). FT-IR analizinde, VMDE yönteminde optimum koşullarda elde

edilen ekstrakt örneği, bu örnekte kullanılmış olan etanol çözeltisi (%30), optimum niyozomal enkapsülasyon şartlarındeki boş vezikül örneği ve ekstrakt yüklü optimum niyozomal vezikül olarak toplamda 4 ayrı örnek analiz edilmiştir. Cihazda yapılan taramalar; 4000-500 cm^{-1} dalga boyları arasında, 32 tekrarlı olarak ve 4 cm^{-1} çözünürlükte gerçekleştirilmiştir (Elmi et al., 2021; Javani et al., 2021).

3.6.5.Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Optimum koşullarda elde edilen niyozom örneklerinin parçacık boyutu ve zeta potansiyeli analizleri, numunelerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS) ve elektroforetik ışık saçılımı teknikleri kullanan Malvern Zetasizer Nano cihazı (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK) ile yapılmıştır. Numunelerin ölçümleri, 25 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiş olup, analizlerde saf su dispersiyon ortamı olarak kullanılmıştır. Dağıtıcı ortamın kırılma indisi 1,330, viskozitesi 0,8872 cP ve dielektrik sabiti 78,5 olarak belirlenmiştir. Parçacık boyutu ölçümünde şeffaf tek kullanımlık kuvet, zeta potansiyeli ölçümünde ise şeffaf tek kullanımlık zeta hücresi kullanılmıştır. Parçacık boyutu analizi 60 saniye ölçüm süresiyle yapılmıştır. Hem parçacık boyutu hem de zeta potansiyeli için alınan ölçümler örnek 1:20 oranında saf su ile seyreltikten sonra 3 tekrar şeklinde alınmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. İşlem Görmemiş Horozibiği Çiçeklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Herhangi bir işlem uygulanmamış horozibiği çiçeklerinin fizikokimyasal özellikleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Rutubet analizi sonucunda örneklerin rutubet değeri %13.65 bulunmuştur. Suda çözünür kuru madde (^{0}Brix) dijital bir refraktometre kullanılarak 16.34° olarak ölçülmüştür ve bu değer literatür kaynaklarında geçen 11.1-22.0 arasında toprak yapısına ve kalitesine göre değişmektedir ifadesine uyumludur (Corke, Cai, and Wu 2016; Onyango et al. 2008). pH değeri 6.47 olarak ölçülmüş ve bu değerin literatürdeki kaynaklarla uyumlu olduğu görülmüştür (Corke et al., 2016; Onyango et al., 2008). Toplam titrasyon asitliği 0.038 g/100 ml sitrik asit olarak bulunmuştur. İşlem görmemiş, kuru horozibiği çiçeklerinde renk analizinde L* (parlaklık), a* (kırmızı-yeşil ekseni), ve b* (sarı-mavi ekseni) değerlerine odaklanılmıştır. Sırasıyla bu değerler, 51.46 ± 0.45, 6.53 ± 1.18, 4.74 ± 1.4 olarak elde edilmiştir. L* değerinin yüksek olması çiçeklerin kuru halde parlak bir renge sahip olduğunu, pozitif a* değeri kırmızı tonunun vurgusunu ve pozitif b* değeri sarı tonunun vurgusunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.1. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerinin fizikokimyasal özellikleri

Fizikokimyasal Özellik	**Sonuç**
Rutubet	% 13.65
Suda Çözünür Kuru Madde	16.34° Brix
pH	6.47
Toplam Titrasyon Asitliği	0.038 g/100 ml sitrik asit
Renk	L*: 51.46 ± 0.45, a*: 6.53 ± 1.18, b*: 4.74 ± 1.4
TBM	7024.84 ± 0.1 mg/kg kuru ağırlık
TFM	27.27 ± 0.01 mg GAE/g kuru ağırlık
TAK_{CUPRAC}	253.22 ± 0.005 mmol TE/kg kuru ağırlık

4.2. Horozibiği Çiçeğinden Betalain ve Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu ve Optimizasyonu

4.2.1. Konvansiyonel Ekstraksiyon (KE)

Materyal ve yöntem kısmındaki Çizelge 3.1'de horozibiği çiçeklerinden konvansiyonel yöntemle betalain ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri verilmiştir. KE ile gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen tüm yanıtlar ekler kısmı Çizelge B1'de görülmektedir.

Konvansiyonel ekstraksiyonda horozibiği çiçeklerinden elde edilen TBM değerleri incelendiğinde maksimum 2918.67 ve minimum ise 1554.67 mg betalain/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Maksimum ve minimum TFM miktarı sırasıyla, 14.81 ve 9.19 mg GAE/g kuru ağırlık olarak elde edilmiştir. Örneklerden elde edilen TAK_{DPPH} değerleri maksimum 109.55 ve minimum 34.08 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ve elde edilen TAK_{CUPRAC} değerleri maksimum 167.02 ve minimum 107.53 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Tüm yanıtlar için ANOVA tablosu ekler kısmı Çizelge C1'de verilmektedir.

4.2.1.1. Toplam Betalain Miktarı (TBM_{KE})

Konvansiyonel ekstraksiyon sonrasında bağımsız değişkenlerin TBM (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.1 aşağıdaki şekildedir.

$$Y_1(TBM_{KE})=2481.36-58.51X_1-294.86X_2-377.13X_3+95.82X_4-201.43X_1X_2-127.52X_1X_3+287.14X_1X_4+125.07X_2X_3+21.89X_2X_4+36.09X_3X_4-3.85(X_1)^2-66.78(X_2)^2-316.39(X_3)^2+149.35(X_4)^2 \quad (4.1)$$

Çoklu regresyona göre belirlenmiş olan TBM'nin model eşitliğine ait R^2 değeri 0.9999 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması hesaplanan Y_1 değerleri ile deneysel olarak elde edilen Y_1 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Ayrıca yapılan ANOVA analizine göre Y_1 yanıtı için model önemli ($p<0.05$), modele ait uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitliği 4.1 incelendiğinde, X_1 (süre) arttıkça betalain veriminin azaldığı bu nedenle kısa süreli ekstraksiyon daha verimli sonuçlar sağladığı, X_2 (sıcaklık) arttıkça

betalain veriminin olumsuz etkilendiği, bu yüzden düşük sıcaklıklarda işlem yapılması daha avantajlı olduğu söylenebilir. X_3 (etanol yüzdesi), artan etanol yüzdesinin betalain verimini azalttığı, bu nedenle daha düşük etanol konsantrasyonları tercih edilmesi gerektiğini; buna karşın X_4 (örnek:çözücü oranı) arttıkça, betalain veriminin arttığını gösterir.

İkili etkiler incelendiğinde ise; X_1X_2 birlikte arttığında, betalain veriminin düştüğü, bu nedenle her iki faktörün de optimum seviyede tutulması gerektiği, X_1X_3 arttıkça, betalain veriminin düştüğü ve bu yüzden süreyi kısa tutarak düşük etanol konsantrasyonun kullanılmasının gerektiği; X_1X_4 arttıkça, betalain veriminin arttığı, bu yüzden uzun süreli ekstraksiyon ile yüksek çözücü oranları kullanılması gerektiğini gösterir. X_2X_3 arttıkça, betalain verimi artış gösterir ancak her iki faktörün de optimum seviyede tutulması gerekmektedir. X_2X_4 birlikte arttığında da betalain verimi artmaktadır ancak çok yüksek sıcaklık ve çözücü oranlarından kaçınılmalıdır. X_3X_4 arttıkça, betalain verimi artmaktadır, fakat aşırı etanol ve çözücü kullanımı verimi olumsuz etkileyebilir.

Kareli terimler incelendiğinde de etanol oranının TBM_{KE} için en kritik değişkenlerden biri olduğu görülmektedir çünkü katsayısı en yüksek ve negatif olan değişkendir, etanol oranındaki artışın betalainlerin ekstraksiyonunu negatif yönde etkileyeceği görülmektedir. Süre ve sıcaklık artışı da TBM miktarını negatif yönde etkilese bile katsayıları nispeten etanol oranından düşüktür bu sebeple artışları TBM üzerinde olumlu etki yapmasa da etanol oranı kadar bariz bir negatif etki olmayabilir. Buna karşın pozitif katsayılı örnek:çözücü oranındaki artış TBM miktarında artışa neden olur.

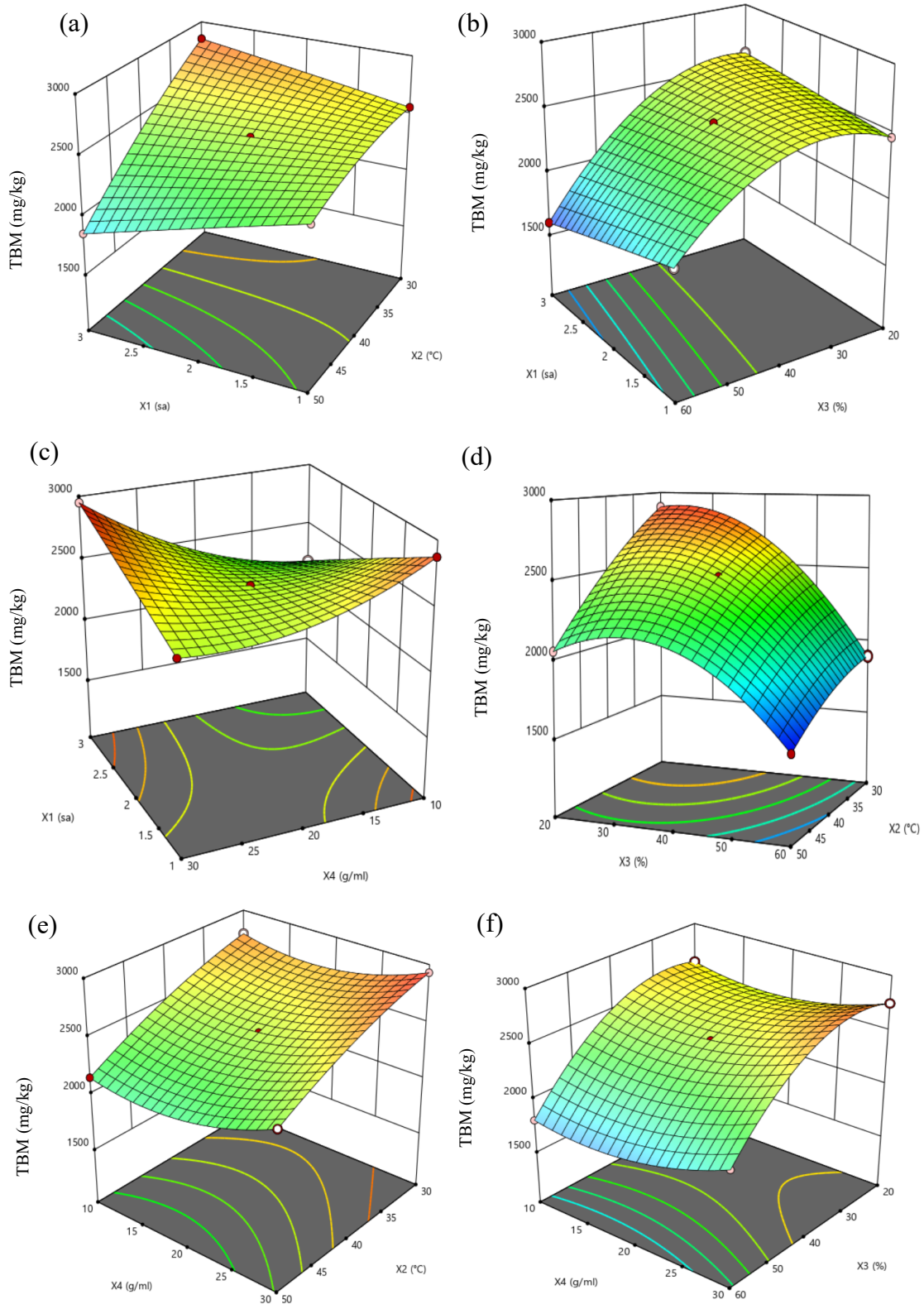
Horozibiği çiçeği örneklerinin KE sonucu TBM yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, Grafik (a)'da süre ve sıcaklık ikilisinin etkisi görülmektedir ve düşük sıcaklıkta süre uzadıkça TBM artmış, yüksek sıcaklıkta süre uzadıkça TBM azalmıştır. Daha yüksek sıcaklıklar betalainlerin stabilitelerinin azalması ve TBM için ekstraksiyon veriminin azalmasına neden olmuştur. Bu yüzden uzun süreli fakat düşük sıcaklıkta ekstraksiyon yapılması daha avantajlıdır. Süre ve etanol ikilisinin etkilerini gösteren Grafik (b) incelendiğinde, yüksek etanol oranı genel olarak TBM veriminin minimum düzeylerde olduğu görülmüş ve ortalama etanol değerlerinde de sürenin belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Betalainler suda çözünen bileşikler oldukları için artan etanol miktarının TBM veriminde azalmaya neden olduğu söylenebilir. %20 etanol oranında tüm süreler için genel olarak daha yüksek TBM ölçülmüştür.

Grafik (c) süre ve örnek:çözücü oranı ikilisinin etkisini göstermekte ve bu orandaki artışla uzun sürenin maksimum değeri verdiği, düşük örnek:çözücü oranı ile kısa sürenin de verimi arttırdığı görülmüştür. Buna göre yüksek örnek:çözücü oranı ile ekstraksiyon yapılığında uzun sürede daha fazla materyalin çözündüğünü düşündürebilir fakat düşük örnek:çözücü oranlarında da kısa süreli ekstraksiyon sonucu yüksek TBM eldesi mümkündür, süre ve çözücü oranı göz önüne alınarak iki koşul da maksimum verim için değerlendirilebilir.

Etanol oranı ve sıcaklık ikilisinin etkisini gösteren Grafik (d) incelendiğinde, yüksek etanol oranının TBM verimini negatif etkilediği, düşük etanol oranı ve düşük sıcaklıkta TBM verimi artmaktadır. Bu sonuç grafik (b)'dekine benzer şekilde betalainlerin suda çözünen maddeler olmasından kaynaklanır ve düşük sıcaklıkta betalainlerin kaybı daha az meydana gelir. Yüksek etanol oranıyla beraber uygulanan yüksek sıcaklıkların TBM için en düşük verimi verdiği çıkartılabilir.

Grafik (e)'de örnek:çözücü oranı ile sıcaklık ilişkisinde genel olarak sıcaklık düşükken tüm oranlarda daha verimli sonuçlar alındığı görülmüş, artan sıcaklığın TBM'de azalışa sebep olduğu görülmüştür. Sıcaklığın betalainlerin stabilitesi konusunda önemli bir değişken olduğu Grafik (a) ve (e)'den yola çıkarak söylenebilir.

Grafik (f) ise örnek:çözücü oranı ve etanol oranı ikilisinin etkisi göstermekte olup genel olarak etanol oranının düşük olmasının verim için daha iyi olduğunu göstermiştir. Genel olarak düşük etanol oranının betalain ekstraksiyonunda verimi arttırdığı görülmektedir. Betalainlerin suda çözünen bileşikler olması düşük etanol oranlarında ekstraksiyonun veriminin daha iyi olmasının bir sonucudur (Echegaray et al., 2023) Horozibiği çiçeğinin betasiyaninlerce zengin olması sebebiyle düşük sıcaklıklarda daha yüksek betalain sonucu vermesi betasiyaninlerin, betaksantinlerden daha düşük stabiliteye sahip olmasından kaynaklandığı söylenebilir (Herbach et al., 2006; Lombardelli et al., 2021).



Şekil 4.1. KE'de bağımsız değişkenlerin TBM_{KE} (Y_1) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.1.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_{KE})

Horozibiği çiçeği için yapılan konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerden TFM (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.2 aşağıdaki şekildedir.

$$Y_2(TFM_{KE})=12.33-0.2113X_1+1.25X_2+0.3857X_3+0.7170X_4-1.10X_1X_2+0.1246X1X_3 +0.9827X_1X_4+0.6012X_2X_3-0.0395X_2X_4+0.3210X_3X_4+0.5037(X_1)^2+0.6355(X_2)^2 -0.7447(X_3)^2-0.3865(X_4)^2 \quad (4.2)$$

Uygulanan çoklu regresyondan alınan sonuçlara göre, Y_2 değişkeni için model eşitliğe ait regresyon katsayısı değeri R^2 = 0.9997 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_2 değerleri ile, yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanan Y_2 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir. Horozibiği çiçekleri için yapılan modelleme çalışmasında Y_2 yanıtına ait varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre, model önemli ($p<0.05$), uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitliği 4.2 incelendiğinde, X_1 (süre) arttıkça TFM veriminin azaldığı, dolayısıyla kısa süreli ekstraksiyonların daha verimli sonuçlar verebileceği söylenebilir. X_2 (sıcaklık) arttıkça TFM artmaktadır, bu nedenle sıcaklık artırıldıkça fenolik bileşiklerin daha verimli bir ekstraksiyonu yapılabilir. X_3 (etanol yüzdesi) arttıkça TFM artmaktadır, bu da etanol oranının yükselmesinin fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunu artırdığını gösterir. X_4 (örnek:çözücü oranı) arttıkça TFM veriminin arttığı görülmektedir, bu da yüksek çözücü oranlarının daha fazla fenolik bileşik elde edilmesini sağladığını göstermektedir.

İkili etkileşimler incelendiğinde, X_1X_2 arttıkça TFM veriminin azaldığı, bu yüzden her iki faktörün de optimum seviyede tutulması gerektiği söylenebilir. X_1X_3 ikilisi arttıkça TFM artmaktadır, bu yüzden uzun süreli ekstraksiyon ve yüksek etanol oranı ile daha verimli sonuçlar alınabilir. X_1X_4 arttıkça TFM artmaktadır, bu da uzun süreli ekstraksiyon ve yüksek çözücü oranı kullanımının daha yüksek verim sağladığını göstermektedir.

X_2X_3 arttıkça TFM artmaktadır, bu nedenle her iki faktörün de artırılması ile ekstraksiyon verimi daha da iyileştirilebilir. X_2X_4 birlikte arttıkça TFM'de azalış gözlenir, çok yüksek sıcaklık ve çözücü oranlarında fenolik bileşiklerin yapısal bozunmaları sebebi TFM'de

azalış meydana gelebilir. X_3X_4 arttıkça TFM artış gösterir fakat aşırı etanol ve çözücü kullanımı verimi olumsuz etkileyebilir.

Kareli terimler incelendiğinde, $(X_1)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da uzun süreli ekstraksiyonun verimi olumlu yönde etkilediğini gösterir, aynı şekilde $(X_2)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da yüksek sıcaklıkların ekstraksiyon verimini artırdığını göstermektedir. $(X_3)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek etanol oranlarının verimi olumsuz etkileyebileceğini gösterir. $(X_4)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek çözücü oranlarının verimi olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir.

Konvansiyonel ekstraksiyonda deney tasarımındaki 4 bağımsız değişkenin ikili kombinasyonların TFM (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.2'de verilmiştir.

Sıcaklık ve sürenin TFM üzerinde birlikte etkisini gösteren Şekil 4.2'de verilen Grafik (a)'da görüldüğü üzere yüksek sıcaklık uygulaması TFM miktarını arttırmaktadır, sürenin artması ise azaltmaktadır. Literatürde yer alan bilgiye göre, yüksek sıcaklıklar hücre duvarlarında ve hücre altı bölmelerinde termal tahribata yol açarak fenolik bileşiklerin salınımını kolaylaştırmaktadır (Juániz et al., 2016).

Grafik (b) etanol oranı ve sürenin birlikte etkisini gösterir ve keskin bir değişimin gözlenmediği grafikte ortalama değerlerin daha verimli sonuçlar verdiği söylenebilir. Buna göre yüksek veya düşük etanol oranları yerine ortalama (%40) etanol oranında ekstraksiyon TFM verimi açısından daha avantajlı görünmektedir.

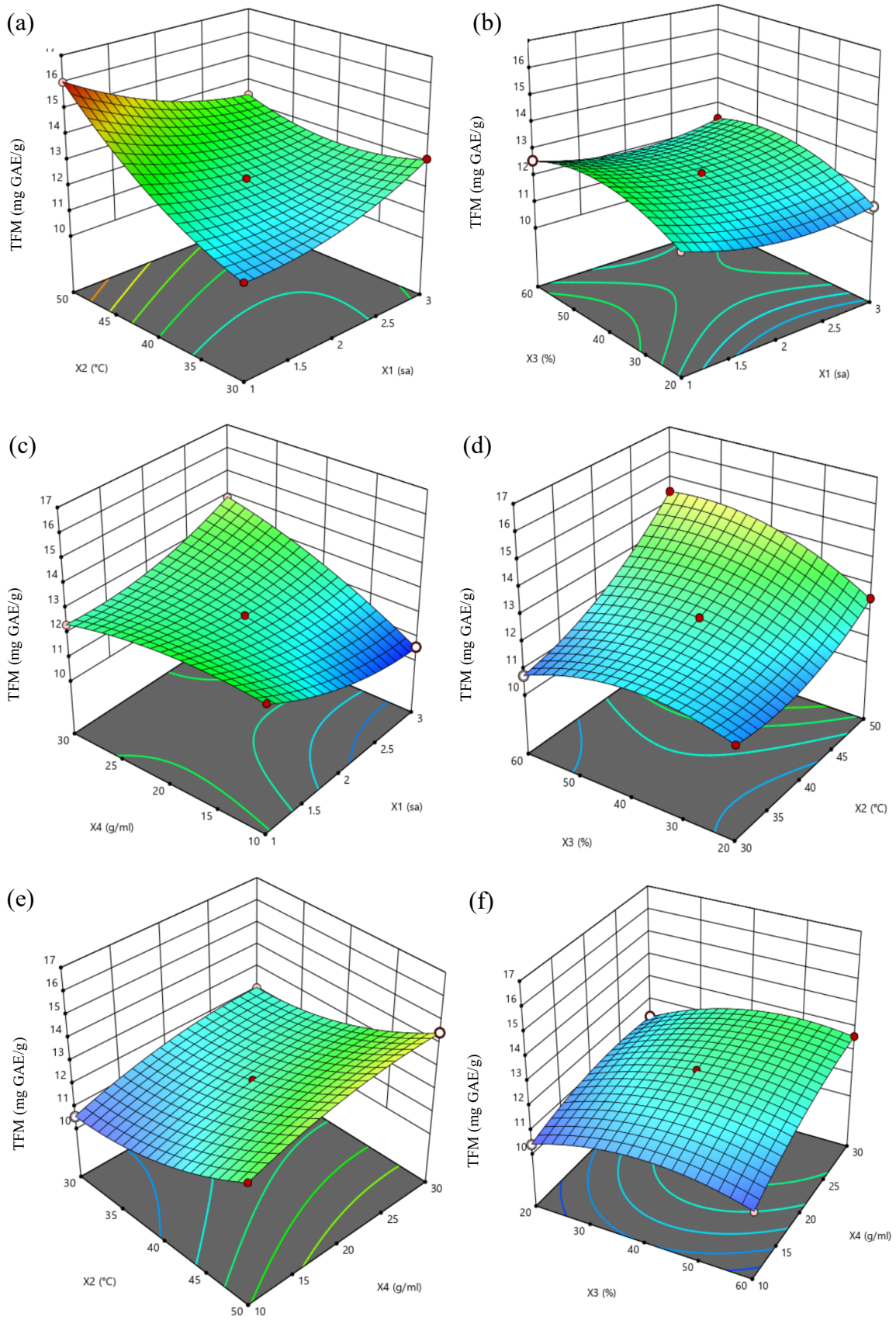
Örnek:çözücü oranı ve süre ilişkisini gösteren Grafik (c) örnek:çözücü oranı düşükken ekstraksiyon süresindeki uzamanın verimi azalttığı ve örnek:çözücü oranı yüksekken ekstraksiyon süresindeki uzamanın verimi arttırdığı görülmektedir. Yüksek çözücü oranının, çözünürlük kapasitesini artırarak fenolik bileşiklerin etkin bir şekilde ekstraksiyonu sağladığı söylenebilir.

Grafik (d) etanol oranı ve sıcaklık arasındaki ilişkiyi göstermekte ve yüksek etanol içeren çözücünün yüksek sıcaklıkta TFM verimini arttırdığını göstermektedir. Etanol oranındaki artışın fenolik bileşiklerin çözünmesini yüksek sıcaklıkta kolaylaştırmakta olduğu gözlenmiştir. Sıcaklık ve örnek:çözücü oranı arasındaki ilişkiyi gösteren Grafik (e)'ye göre yüksek sıcaklık yüksek örnek:çözücü oranı TFM miktarında artışa sebep olmuştur. Bu bulgu, sıcaklık ve çözücü oranı arttıkça fenolik bileşiklerin daha etkin şekilde salındığını gösterir; yüksek sıcaklık ve yüksek çözücü oranı kombinasyonu, özellikle

fenolik bileşiklerin hücre içinden çözünür hale gelmesini artırarak ekstraksiyon verimini iyileştirdiği gözlenmiştir.

Sıcaklığı içeren 3 grafikten de görüldüğü üzere yüksek sıcaklık uygulaması TFM miktarında artışa sebep olmuştur. Yüksek sıcaklık uygulamasının hücre duvarlarında ve hücre altı bölmelerinde termal olarak tahribe neden olduğu ve fenolik bileşiklerin salınmasını kolaylaştırdığı bilgisine uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Juániz et al., 2016).

Etanol oranı ve örnek:çözücü oranı arasındaki ilişkiyi gösteren grafik (f) incelendiğinde ise keskin bir değişimin olmadığı fakat yüksek etanol oranı ile yükselen örnek:çözücü oranı TFM miktarında artışa sebep olduğu görülmektedir. Keskin değişimlerin gözlenmediği bu grafiğe göre düşük etanol oranlarında tüm örnek:çözücü oranları için TFM veriminde önemli bir değişim söz konusu değildir.



Şekil 4.2. KE'de bağımsız değişkenlerin TFM_{KE} (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.1.3. Toplam Antioksidan Kapasite-DPPH ($TAK_{KE\text{-}DPPH}$)

Horozibiği çiçeği ile yapılan konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerin diğer yanıtı olan TAK_{DPPH} (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.3 aşağıdaki şekildedir;

$$Y_3(TAK_{KE\text{-}DPPH})=77.78+2.48X_1+7.77X_2+7.06X_3+7.81X_4+12.75X_1X_2-1.28X_1X_3+6.66X_1X_4+7.92X_2X_3+1.61X_2X_4+5.12X_3X_4+5.63(X_1)^2+12.06(X_2^2)-26.63(X_3)^2-8.07(X_4)^2 \quad (4.3)$$

Programdan alınan sonuçlara göre; Y_3 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri 0.9978 olarak belirlenmiştir. Horozibiği çiçeğinin Y_3 yanıtına ait gerçekleştirilen yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre model önemli ($p<0.05$), uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitliği 4.3 incelendiğinde, X_1 (süre) arttıkça TAK_{DPPH} veriminin arttığı görülür ve bu da daha uzun süreli ekstraksiyonların antioksidan miktarını artırabileceğini göstermektedir benzer şekilde X_2 (sıcaklık) arttıkça da TAK_{DPPH} verimi artmaktadır ve yüksek sıcaklıkların fenolik bileşiklerin salınımını kolaylaştırarak antioksidan kapasitenin arttığını gösterir. X_3 (etanol yüzdesi) arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır ve etanol oranının yükselmesinin fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü artırarak antioksidan kapasiteyi güçlendirdiği söylenebilir. X_4 (örnek:çözücü oranı) arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır, bu da yüksek çözücü oranlarının daha fazla fenolik bileşik elde edilmesini sağlayarak antioksidan kapasitenin artmasına sebep olduğunu göstermektedir.

İkili etkileşimler incelendiğinde, X_1X_2 arttıkça TAK_{DPPH} veriminin arttığı, bu da her iki faktörün birlikte artırılmasının antioksidan kapasiteyi daha da iyileştirebileceğini, buna karşın X_1X_3 arttıkça TAK_{DPPH} verimi azalmakta, bu da uzun süreli ekstraksiyonların yüksek etanol oranıyla birlikte antioksidan kapasiteyi olumsuz etkileyebileceğini gösterir. X_1X_4 arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır, bu da uzun süreli ekstraksiyon ve yüksek çözücü oranı kullanımının antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermektedir. X_2X_3 arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır, bu da her iki faktörün birlikte artırılmasının antioksidan kapasiteyi daha da iyileştirebileceğini göstermektedir. X_2X_4 arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır, ancak aşırı sıcaklık ve çözücü oranlarından kaçınılmalıdır.

X_3X_4 arttıkça TAK_{DPPH} verimi artmaktadır, fakat çok yüksek etanol ve çözücü kullanımı antioksidan kapasiteyi olumsuz etkileyebilir.

Kareli terimlerden $(X_1)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da uzun süreli ekstraksiyonun antioksidan kapasiteyi artırdığına işaret eder. $(X_2)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da yüksek sıcaklıkların antioksidan kapasiteyi artırdığını göstermektedir. $(X_3)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da aşırı etanol oranlarının antioksidan kapasiteyi olumsuz etkileyebileceğini gösterir. $(X_4)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek çözücü oranlarının antioksidan kapasiteyi olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir.

KE ile deney tasarımındaki 4 bağımsız değişkenin ikili kombinasyonların TAK_{DPPH} (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.3'te verilmiştir. Süre ve sıcaklık ilişkisinin etkisini gösteren Grafik (a) incelendiğinde süre uzadıkça ve sıcaklık arttıkça verimin arttığını görülmektedir. Literatürde de yer aldığı gibi yüksek sıcaklığın antioksidan kapasite üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu görülmüştür (Jeong et al., 2004).

Grafik (b) süre ve etanol oranı ilişkisini gösterir ve düşük etanol oranında süre değişse bile TAK_{DPPH}'de belirgin bir değişimin olmadığı ve ortalama etanol içeren çözücü ile daha verimli sonuçlar alındığı fakat artan etanol oranının yine verimde azalışa sebep olduğu söylenebilir. Etanol oranındaki artışın antioksidan kapasitede artış olduğu düşünülse de ortalama etanol oranlarında daha avantajlı sonuçlar alındığı görülmektedir.

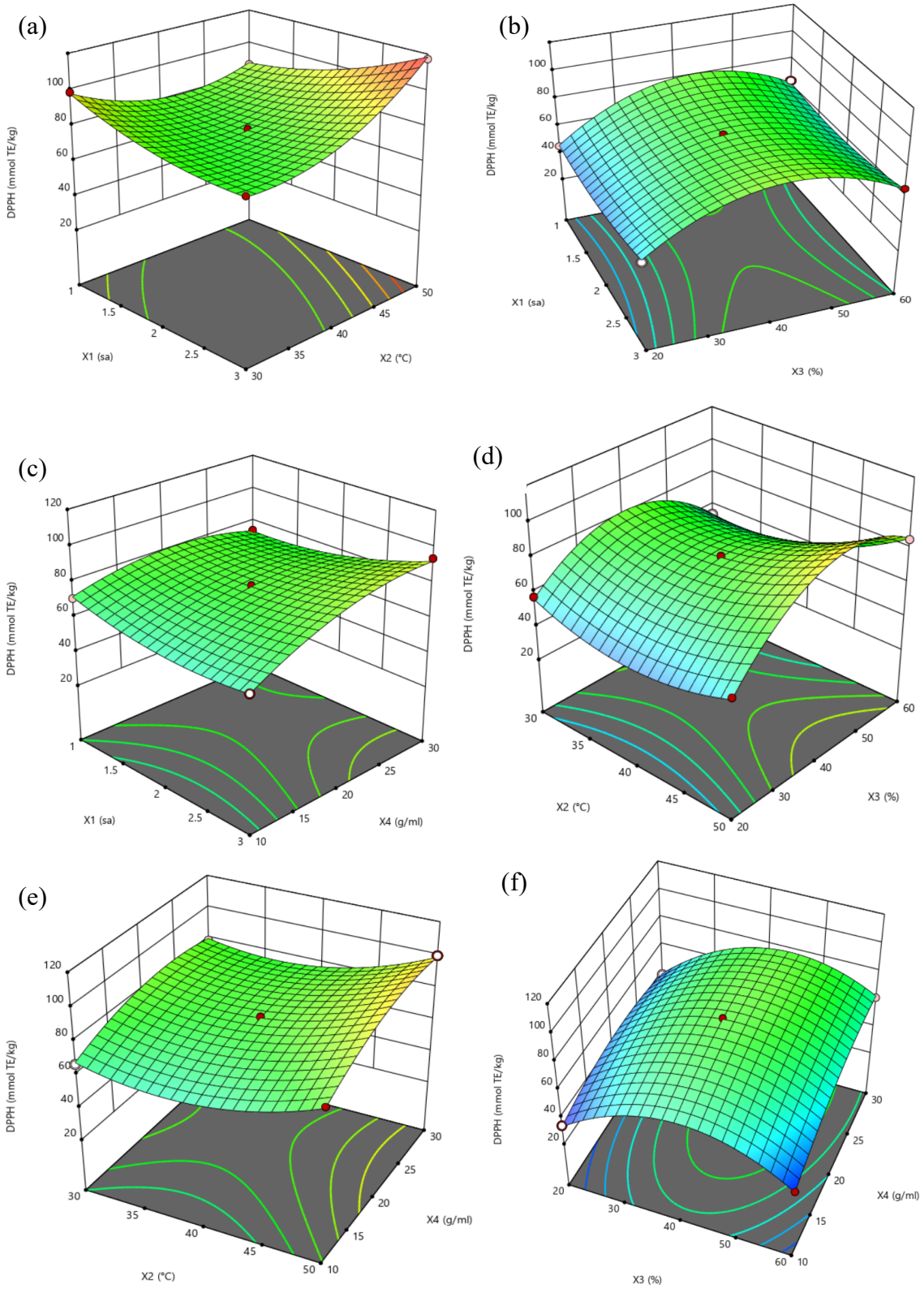
Grafik (c)'de süre ve örnek:çözücü oranı ikilisinin belirgin bir etkiye neden olmadığı fakat süre uzayınca örnek:çözücü oranındaki artışın pozitif etkiye neden olduğu görülmüştür. Buna göre uzun sürelerde çözücüye daha fazla miktarda antioksidan bileşiklerin geçişi olduğu düşünülebilir.

Grafik (d)'deki sıcaklık ve etanol oranı grafiği incelendiğinde grafik (b)'dekine benzer şekilde düşük etanol oranının sıcaklık değişimine rağmen sonuçlar üzerinde etkisinin neredeyse olmadığını gösterir ve yine yüksek etanol oranının verimde azalmaya neden olduğu görülmüştür.

Sıcaklık ve örnek:çözücü oranının ilişkisini gösteren (e) grafiği incelendiğinde yüksek sıcaklık ve artan örnek:çözücü oranının verimi arttırdığı fakat belirgin değişikliklere sebep olmadığı görülmüştür.

Grafik (f) etanol oranı ve örnek:çözücü oranı arasındaki ilişkiyi gösterir, etanol oranının grafik (b) ve (d) ile benzer olarak etanol oranının düşük olduğu koşullarda diğer değişkenden bağımsız olarak verimi minimize ettiğini göstermiştir. Buna göre etanol

oranı TAK_{DPPH} için önemli bir değişkendir çünkü düşük etanol oranında (%20) DPPH orta polar antioksidanları (flavonoidler, polifenoller) bağlamakta başarılı değildir (Liang et al., 2010; Zheng et al., 2015).



Şekil 4.3. KE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{KE\text{-}DPPH}$ (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.1.4. Toplam Antioksidan Kapasite- CUPRAC ($TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$)

Horozibiği çiçeğiyle yapılan konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerin diğer yanıtı olan TAK_{CUPRAC} (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.4;

$$Y_4(TAK_{KE\text{-}CUPRAC})=136.06+5.79X_1+12.32X_2+5.40X_3+7.07X_4-5.11X_1X_2-3.3X_1X_3+27.48\ X_1X_4+7.39\ X_2X_3-8.66\ X_2X_4-3.77\ X_3X_4+4.03\ (X_1)^2+4.88(X_2)^2-7.52\ (X_3)^2-13.31\ (X_4)^2 \quad (4.4)$$

Design Expert 13'ten alınan sonuçlara göre; Y_4 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı, $R^2 = 0.9797$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_4 değerleri ile, hesaplanan Y_4 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir. Varyans analizi tablosunda verilen sonuçlara göre; model önemli ($p<0.05$), modele ait uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak ifade edilmiştir.

Model eşitliği 4.4 incelendiğinde, X_1 (süre) arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ veriminin arttığı, bu nedenle daha uzun süreli ekstraksiyonların daha verimli sonuçlar verebileceği söylenebilir. X_2 (sıcaklık) arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi artmaktadır, bu da sıcaklık arttıkça antioksidan bileşiklerin daha verimli ekstraksiyon yapıldığını göstermektedir. X_3 (etanol yüzdesi) arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi artmaktadır, bu da etanol oranının artmasının ekstraksiyon verimini artırdığına işaret eder. X_4 (örnek:çözücü oranı) arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi artmaktadır, bu da yüksek çözücü oranlarının daha fazla antioksidan bileşik elde edilmesini sağladığını göstermektedir.

İkili etkileşimler incelendiğinde, X_1X_2 arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ veriminin azaldığı görülmektedir, bu yüzden her iki faktörün de optimum seviyede tutulması gerektiği söylenebilir. X_1X_3 arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi azalmaktadır, bu da uzun süreli ekstraksiyon ve yüksek etanol oranı kombinasyonunun daha düşük verimli sonuçlar vereceğini göstermektedir. X_1X_4 arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi artmaktadır, bu da uzun süreli ekstraksiyon ve yüksek çözücü oranının verimi artırdığına işaret eder. X_2X_3 arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi artmaktadır, bu da her iki faktörün artırılmasının ekstraksiyon verimini daha da iyileştirebileceğini gösterir. X_2X_4 birlikte arttıkça $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi azalmakta olup çok yüksek sıcaklık ve çözücü oranlarından kaçınılmalıdır. X_3X_4 arttıkça

$TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimi azalmaktadır çünkü aşırı etanol ve çözücü kullanımı verimi olumsuz etkileyebilir.

Kareli terimler incelendiğinde, $(X_1)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da uzun süreli ekstraksiyonun $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimini olumlu yönde etkileyebileceğini gösterir. $(X_2)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da yüksek sıcaklıkların $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ verimini artırdığını gösterir. $(X_3)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek etanol oranlarının verimi olumsuz etkileyebileceğini gösterir. $(X_4)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek çözücü oranlarının verimi olumsuz etkileyebileceğini göstermektedir.

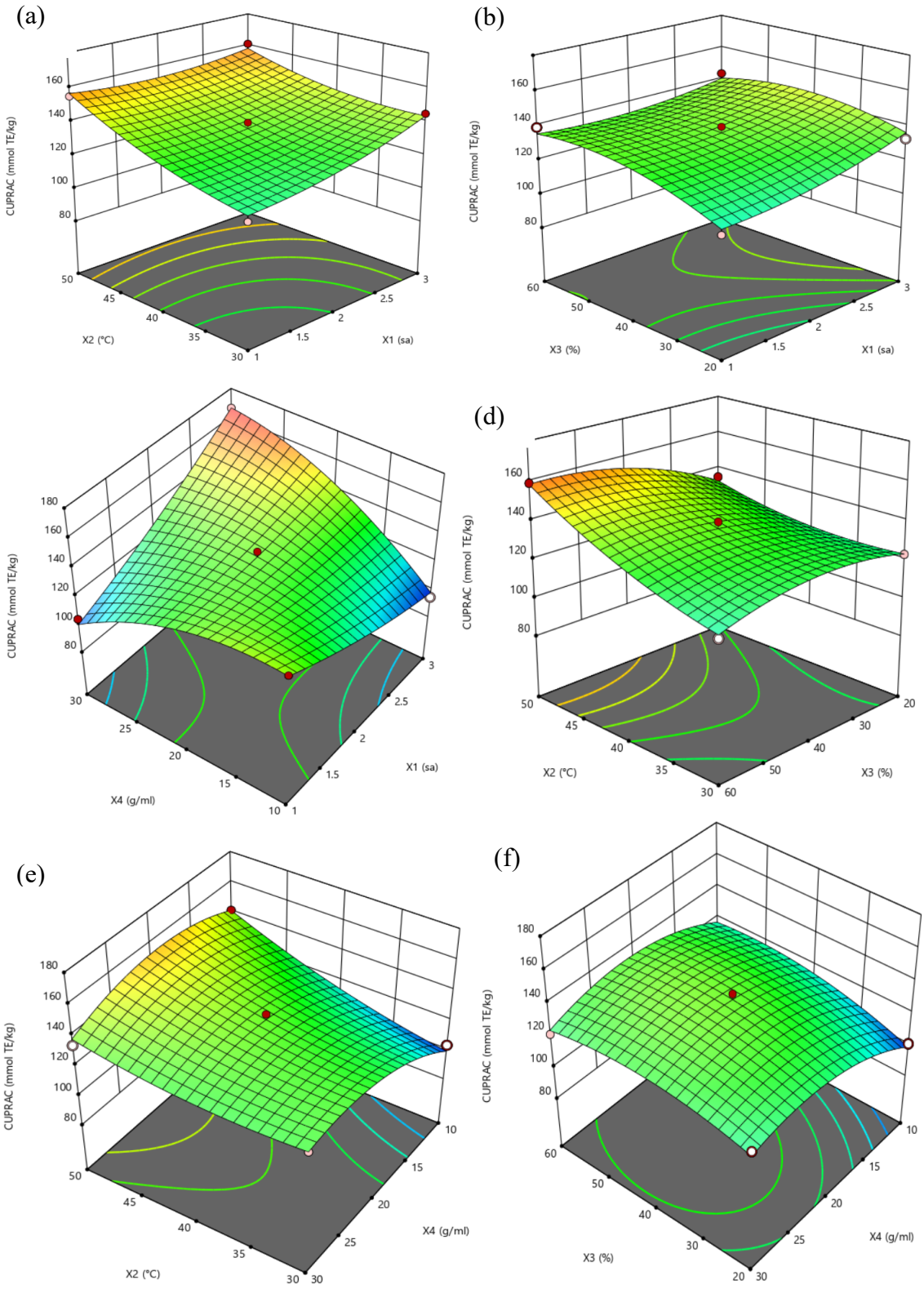
Horozibiği çiçeği örneklerinin KE sonucu elde edilen TAK_{CUPRAC} yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.4'te verilmiştir. Sıcaklık süre ilişkisinin etkilerini gösteren Grafik (a) incelendiğinde yüksek sıcaklıkta süre değişiminin antioksidan miktarında belirgin etkisi olmadığı ancak düşük sıcaklıkta süre arttıkça artış olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklık ve kısa sürelerde minimum antioksidan kapasite verimi alınırken her iki değişken için de artan değerlerde antioksidan kapasitede belirgin olmasa da artış olduğu görülmektedir. Grafik (b)'de etanol oranı ve süre ilişkisi incelendiğinde de belirgin bir değişim gözlenmemiş, düşük etanol içeren çözücü ve kısa sürede minimum verim alınmıştır. Etanol oranı diğer yanıtlara kıyasla TAK_{CUPRAC} için daha az etkili bir bağımsız değişken olduğu söylenebilir.

Grafik (c) örnek:çözücü oranı ve sürenin etkisini göstermekte ve düşük örnek:çözücü oranında süre uzadıkça minimum verim alınmışken yüksek örnek:çözücü oranında süre uzadıkça maksimum verim alınmıştır. Bu bulgu, yüksek çözücü oranlarının daha fazla fenolik bileşik elde edilmesini sağladığını ve süre arttıkça bu bileşiklerin daha verimli bir ekstraksiyon sağladığını göstermektedir.

Grafik (d)'de yüksek sıcaklık ve yüksek etanol ile TAK_{CUPRAC} veriminde artış olduğu, azalan etanol oranı ile düşük sıcaklığın verimi azalttığı görülmektedir ve bu bulgu, sıcaklığın antioksidan bileşiklerin daha verimli ekstraksiyonunda olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bu grafik ayrıca sıcaklığın etkisinin pozitif olduğunu ve doğru sıcaklık aralığının verimi artırabileceğini ortaya koymuştur.

Grafik (e) sıcaklık ve örnek:çözücü oranının beraber etkisini gösterir ve düşük örnek:çözücü oranında ve düşük sıcaklıkta minimum verim alındığını, artan sıcaklıkla genel bir artışın gözlendiğini ortaya koymuştur. Sıcaklık antioksidan kapasite üzerinde literatür kaynaklarına uyumlu olarak pozitif etki göstermiştir (Jeong et al., 2004).

Grafik (f)'de etanol oranı ve örnek:çözücü oranı ikilisinin etkisinde de düşük örnek:çözücü oranının düşük etanol ile minimum verimi verdiği, örnek:çözücü oranındaki artışın TAK_{CUPRAC} verimini arttığı görülmektedir. TAK_{CUPRAC} için örnek:çözücü miktarının düşük olmasının önemli bir etken olduğu söylenebilir, daha yüksek miktarlardaki çözücü oranı antioksidan kapasitede artışa sebep olmaktadır.



Şekil 4.4. KE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{KE\text{-}CUPRAC}$ (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.1.5. Konvansiyonel Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Box-Behnken tasarımına göre belirlenmiş olan 29 deney tamamlandıktan sonra konvansiyonel ekstraksiyonda çalışma koşullarının optimizasyonu Design Expert 13 programı ile gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda, istenen sonuca ulaşma fonksiyonu 0.866'dır. KE için optimum koşullar X_1: 1 sa, X_2: 50 °C, X_3: % 40.99 ve X_4: 1:10 g/mL'dir. Buna göre, optimum şartlarda elde edilen deneysel veriler ve teorik değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 Konvansiyonel ekstraksiyon için optimum deney koşullarında elde edilen yanıtlar ve program çıktısı tarafından verilen teorik değerler

	KE Optimizasyonu	
	Deneysel değer	**Teorik değer**
Y_1	2687.42±0.001	2685.85
Y_2	14.72±0.004	15.97
Y_3	78.52±0.003	77.69
Y_4	168.24±0.046	173.34

Y_1= TBM (mg betalain/ kg kuru ağırlık)

Y_2= TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)

Y_3= TAK_{DPPH} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Y_4= TAK_{CUPRAC} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

4.2.2. Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (VMDE)

Materyal ve Yöntem kısmındaki Çizelge 3.3'te horozibiği çiçeklerinden VMDE yöntemiyle betalain ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri verilmiştir. VMDE kullanılarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen yanıtlar Çizelge B2'de verilmiştir.

Horozibiği çiçeklerinden VMDE ile elde edilen TBM değerleri incelendiğinde, horozibiği çiçeklerinde maksimum TBM değeri 3153.58 mg betalain/kg kuru madde ve minimum değer ise 993.54 mg betalain/kg kuru madde olarak ölçülmüştür. VMDE ile elde edilen maksimum ve minimum TFM miktarı sırasıyla, 17.04 ve 5.54 mg GAE/g kuru ağırlık olarak elde edilmiştir. TAK_{DPPH} miktarları maksimum 101.42 ve minimum 21.86 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür ve elde edilen TAK_{CUPRAC} miktarları maksimum 195.39 ve minimum 69.42 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Tüm yanıtlar için ANOVA tablosu Çizelge C2'de verilmiştir.

4.2.2.1. Toplam Betalain Miktarı (TBM_{VMDE})

Konvansiyonel ekstraksiyon sonrasında bağımsız değişkenlerin TBM (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitliği 4.5;

$$Y_1(TBM_{VMDE})=2404.01+233.04X_1+521.93X_2-686.83X_3+91.45X_4-286.11X_1X_2+151.70X_1X_3+32.55X_1X_4+82.95X_2X_3+23.55X_2X_4-313.79X_3X_4+211.99(X_1)^2-145.67(X_2)^2-144.61(X_3)^2-45.21(X_4)^2 \quad (4.5)$$

Her TBM değerlerinin modeline ait R^2 değeri 0.9993 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması hesaplanan Y_1 değerleri ile deneysel olarak elde edilen Y_1 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir. Ayrıca yapılan ANOVA analizine göre Y_1 yanıtı için model önemli ($p<0.05$), modele ait uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitlik 4.5 incelendiğinde, X_1 (basınç değeri) arttıkça TBM_{VMDE} değerinin arttığı görülmektedir, bu da yüksek basıncın betalainlerin ekstraksiyonuna pozitif etki sağladığını göstermektedir aynı şekilde X_2 (süre) de TBM_{VMDE} üzerinde pozitif bir etkiye sahiptir; ekstraksiyon süresi uzadıkça verim artmaktadır, bu da sıcaklığın bileşiklerin çözünürlüğünü ve ekstraksiyon verimini artırdığını düşündürmektedir. Buna karşın X_3 (etanol yüzdesi) ise negatif bir katsayıya sahiptir, yani etanol yüzdesinin artması TBM_{VMDE} değerini düşürmektedir. Bu durum, belirli bir seviyenin üzerinde etanol kullanımının betalainlerin suda çözünen bileşikler olması sebebiyle ekstraksiyon verimini azalttığını gösterebilir. X_4 (örnek/çözücü oranı) pozitif bir etkiye sahiptir ve arttıkça

TBM_{VMDE} değeri de artmaktadır, bu da yüksek örnek/çözücü oranının elde edilen betalain miktarını artırdığını göstermektedir.

İkili etkileşimler değerlendirildiğinde, X_1X_2 negatif bir etkiye sahiptir, yani bu iki değişkenin birlikte artışı TBM_{VMDE} değerinde azalmaya neden olmaktadır. Bu, çok yüksek basınç ve uzun süreli ekstraksiyonun betalainlerde bozulmaya neden olabileceğini düşündürmektedir. X_1X_3 pozitif bir etkiye sahip olup, yüksek basınç altında ekstraksiyon ile belirli bir etanol oranının birleşmesi TBM_{VMDE} değerini artırmaktadır. X_1X_4 da pozitif bir katsayıya sahiptir, yani basınç ve örnek/çözücü oranı arttıkça verim artmaktadır. X_2X_3 de pozitif bir etkiye sahiptir, bu da belirli sürelerde etanol yüzdesinin artırılmasının TBM_{VMDE} verimini destekleyebileceğini göstermektedir. X_2X_4 pozitif etkili olup, süre ve örnek/çözücü oranının birlikte artışı ekstraksiyon verimini artırmaktadır. X_3X_4 negatif bir katsayıya sahiptir, yani yüksek etanol oranı ve yüksek örnek:çözücü oranı birleştiğinde TBM_{VMDE} veriminin düştüğünü gösterir. Bu durum, fazla çözücü ve yüksek etanol içeriğinin betalainlerin suda çözünen bileşikler olması sebebiyle ekstraksiyon verimini düşürebileceğini düşündürmektedir.

Kareli terimler incelendiğinde, $(X_1)^2$ pozitif bir etkiye sahiptir, bu da ekstraksiyon basıncının belirli bir seviyeye kadar artırılmasının TBM_{VMDE} üzerinde olumlu bir etkisi olabileceğini göstermektedir. $(X_2)^2$ negatif bir katsayıya sahiptir, yani çok uzun sürelerde ekstraksiyon yapılması TBM_{VMDE} değerini olumsuz etkileyebilir. $(X_3)^2$ negatif bir etkiye sahiptir, bu da çok yüksek etanol yüzdelerinin TBM_{VMDE} verimini azaltabileceğini göstermektedir. $(X_4)^2$ negatif bir katsayıya sahiptir, yani çok yüksek örnek/çözücü oranlarının TBM_{VMDE} üzerinde olumsuz bir etkisi olabileceği görülmektedir.

VMDE sonucu elde edilen TBM yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.5'te verilmiştir. Grafik (a)'da basınç ve süre ikilisinin etkileri görülmektedir ve kısa sürede düşük basınçta verim azalırken uzun sürede tüm basınç değerleri için yüksek verim alınmıştır. Buna göre kısa sürelerde elde edilen betalain miktarının düşük olduğunu ve sürenin artmasının bileşiklerin daha iyi çözünmesini sağladığını göstermektedir.

Etanol oranı ve basınç etkilerini gösteren Grafik (b)'de yüksek etanol oranı tüm basınç değerleri için düşük verim verirken düşük etanol oranı ile tüm basınç değerlerinde daha yüksek verim alındığı görülmektedir. Bu bulgu, etanol yüzdesinin fazla olmasının betalainlerin ekstraksiyonunu engelleyebileceğini ve çözünürlüğü olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir çünkü betalainler suda çözünen bileşiklerdir.

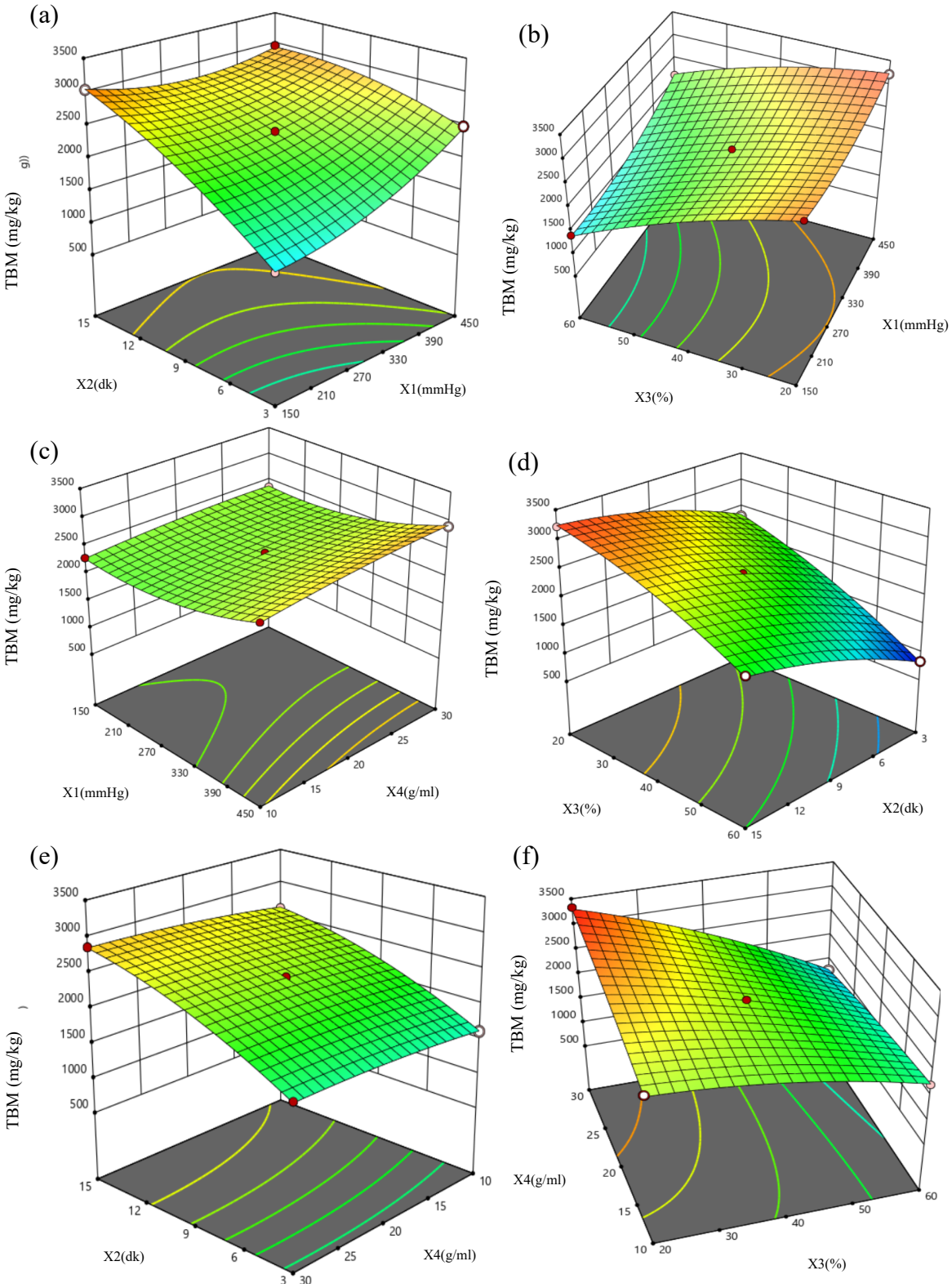
Grafik (c)'de basınç ve örnek:çözücü oranı ikilisinin etkileri görülmektedir ve tüm örnek:çözücü oranları için artan basınçla birlikte artan TBM verimi sonucu çıkartılabilir. Bu durum, yüksek basıncın ekstraksiyon sürecini hızlandırarak hedef bileşiklerin daha etkili bir şekilde çözücüye geçmesine yardımcı olduğunu göstermektedir.

Grafik (d)'de etanol oranı ve sürenin TBM üzerine etkileri görülmektedir, yüksek etanol oranı ile en düşük sürede en düşük TBM verimi alınmış, düşük etanol oranı ile ekstraksiyonda süre uzadıkça verimde artış olduğu görülmektedir. Bu sonuç, düşük etanol içeriğinin belirli bileşiklerin ekstraksiyonunu desteklediğini ve sürenin uzamasının çözünme sürecini iyileştirdiğini göstermektedir. Grafik (b)'de olduğu gibi artan etanol oranlarının betalain ekstraksiyonu için negatif bir sonuç doğurduğu söylenebilir.

Süre ve örnek:çözücü ikilisinin etkilerini gösteren Grafik (e) uzun sürelerde yüksek örnek:çözücü oranının yüksek verim verdiğini, kısa sürede örnek:çözücü oranındaki değişimin TBM üzerinde belirgin bir değişime sebep olmadığını göstermektedir. Bu durum, kısa süreli ekstraksiyonda betalainlerin çözücü içerisinde tam çözünemediğini ve ekstraksiyon sürecinin tamamlanabilmesi için daha çok zamanın gerektiğini düşündürmektedir.

Grafik (f) örnek:çözücü oranı ve etanol oranı ikilisinin birlikte etkilerini gösterir, yüksek etanol oranı tüm örnek:çözücü oranları için düşük sonuç verirken düşük etanol oranı yüksek örnek:çözücü oranlarında yüksek TBM sonuçları vermiştir. Bu sonuç, düşük etanol içeriğinin betalainlerin ekstraksiyonunda daha avantajlı olduğunu ve örnek:çözücü oranının artırılmasının ekstraksiyon verimi üzerinde pozitif bir etkisi olduğunu göstermektedir.

KE ve VMDE yanıt yüzey grafiklerinden çıkarılan yorumlar kıyaslandığında, ekstraksiyon süresinin her iki yöntem için de yüksek olmasının verimi olumlu etkilediği görülmektedir. Yine her iki yöntemde de betalain ekstraksiyonu için etanol oranının düşük tutulması gerektiği ve örnek:çözücü oranının da düşük olmaması gerektiği söylenebilir. Fakat KE'de TBM için yüksek verim alınabilen süreler 3 saati bulabilecekken, VMDE için daha yüksek sonuç alınan süreler 12-15 dakika civarıdır. Buradan yeni nesil yöntemlerin ekstraksiyon için zamandan tasarrufta ne kadar başarılı olduğu görülür.



Şekil 4.5. VMDE'de bağımsız değişkenlerin TBMVMDE (Y1) üzerine etkıierını gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_{VMDE})

Horozibiği çiçeği için yapılan konvansiyonel ekstraksiyon deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerin ilk yanıtı olan TFM (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitliği 4.6 aşağıdaki şekildedir;

$$Y_2(TFM_{VMDE}) = 11.73 + 2.19X_1 + 2.96X_2 - 1.23X_3 + 0.1266X_4 - 0.4621X_1X_2 + 0.4895X_1X_3 - 0.4276X_1X_4 - 0.1627X_2X_3 + 0.5213X_2X_4 - 0.6203X_3X_4 + 1.17(X_1)^2 - 1.15(X_2)^2 - 0.9079(X_3)^2 - 0.4422(X_4)^2 \quad (4.6)$$

İlgili programdan alınan sonuçlara göre; Y_2 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri horoz ibiği çiçeği için $R^2 = 0.9850$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_2 değerleri ile, yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanan Y_2 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir. Horozibiği çiçekleri için yapılan modelleme çalışmasında Y_2 yanıtına ait varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre, model önemli ($p<0.05$), uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitlik 4.6 incelendiğinde, X_1 (basınç) katsayısı pozitif olup, basıncın artmasının TFM verimini artırdığını göstermektedir ve buradan daha yüksek basıncın bileşiklerin çözücüye daha iyi dağılmasını sağlayarak verimi yükselttiği çıkarılabilir. Yüksek basınç, hücre duvarlarını parçalayarak çözücü penetrasyonunu kolaylaştırmakta ve daha fazla fenolik bileşiğin ekstraksiyonuna yol açar. Benzer şekilde, X_2 (süre) değişkeni de pozitif bir katsayıya sahiptir, yani sürenin uzaması TFM verimini artırmaktadır. Bunun sebebinin örneğin çözücü ile daha uzun süre ekstraksiyona tabii tutulması sonucu fenolik bileşiklerin daha fazla çözünmesi olarak yorumlanabilir.

Öte yandan, X_3 (etanol oranı) negatif bir katsayıya sahiptir ve etanol oranının artmasının TFM verimini azalttığı görülmektedir. Bu durum, etanol konsantrasyonunun fenolik bileşiklerin çözünürlüğü üzerinde olumsuz bir etkisi olabileceğini göstermektedir. X_4 (örnek:çözücü oranı) değişkeninin katsayısı ise oldukça düşük ve pozitif olduğundan, bu değişkenin tek başına büyük bir etkisi olmadığı ancak örnek/çözücü oranının artmasının verimi hafif de olsa artırdığı söylenebilir.

İkili etkileşim terimlerine bakıldığında, X_1X_2 değişkeninin negatif katsayısı, bu iki faktörün birlikte belirli bir noktadan sonra verimi düşürebileceğini göstermektedir. Yani

yüksek basınç ve uzun süre kombinasyonu, belirli bileşiklerin bozunmasına veya farklı reaksiyonlara girmesine sebep olabilir. X_1X_3 değişkeninin pozitif katsayısı ise, artan ekstraksiyon basıncı ile belirli bir etanol oranı kombinasyonunun verimi artırabileceğini gösterirken; X_1X_4 negatif katsayılı olup, bu iki faktör birlikte olduğunda verimin azaldığını gösterir.

Benzer şekilde, X_2X_3 negatif bir katsayıya sahiptir, yani uzun süre ve yüksek etanol oranı kombinasyonu TFM verimini düşürmektedir ancak X_2X_4 pozitif bir katsayıya sahip olup, süre ile örnek/çözücü oranının artışının verimi olumlu etkilediği anlaşılmaktadır. X_3X_4 değişkeninin negatif katsayısı ise, yüksek etanol oranı ve yüksek örnek:çözücü oranı kombinasyonunun verimi düşürdüğünü göstermektedir.

Kare terimleri incelendiğinde, $(X_1)^2$ pozitif bir katsayıya sahip olup ekstraksiyon basıncının optimum bir noktaya kadar artırılmasının verimi artıracağını göstermektedir. $(X_2)^2$ katsayısının negatif olması ise, çok uzun süreli ekstraksiyonda verimde azalma görülebileceğini işaret etmektedir. Benzer şekilde, $(X_3)^2$ negatif katsayıya sahip olup, etanol oranının aşırı artırılmasının verimi düşürebileceği anlaşılmaktadır. $(X_4)^2$ değişkeni ise negatif bir katsayıya sahip olup, örnek:çözücü oranındaki artışın belirli bir noktaya kadar olumsuz etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

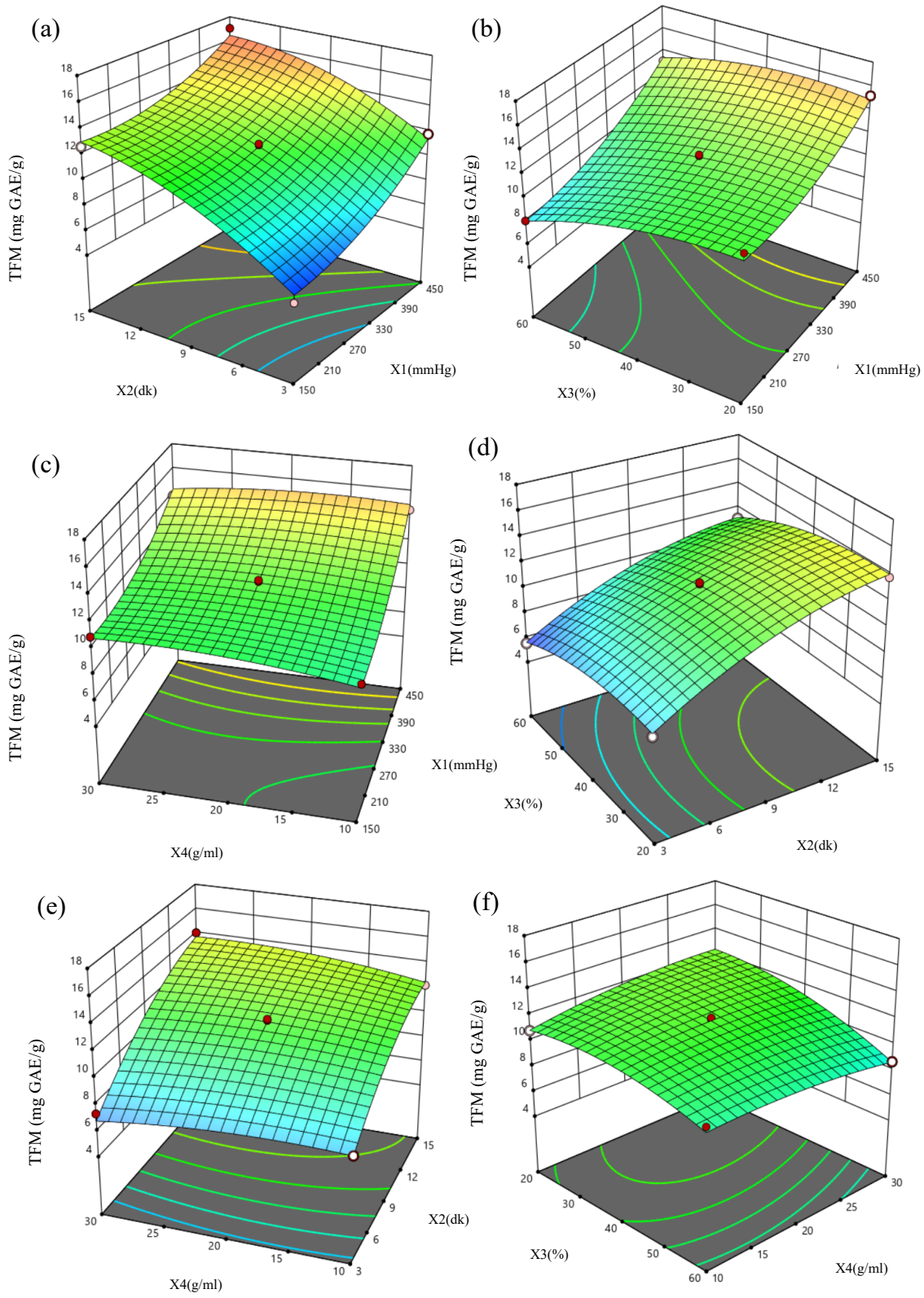
VMDE deney tasarımındaki 4 bağımsız değişkenin ikili kombinasyonların TFM (Y_1) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.6'da verilmiştir. Grafik (a) basınç ve süre ikilisinin TFM üzerindeki etkisini gösterir, bu grafiğe göre yüksek basınç ve uzun sürenin sonucu maksimize ettiği görülmektedir. Bu bulgudan yola çıkarak, yüksek basıncın hücrenin yapısını bozarak fenolik bileşiklerin daha etkin bir şekilde çözücüye geçişini sağladığını ve sürenin uzamasının bu süreci desteklediğini söylemek mümkündür.

Etanol oranı ve basınç ilişkisini gösteren Grafik (b)'de düşük etanol oranının tüm basınç oranlarında yüksek etanolden verimli sonuç verdiğini gösterir, buna göre düşük etanol oranlarının basıncın pozitif etkisiyle daha verimli ekstraksiyon sağladığı gözlemlenmiştir. Grafik (c)'de örnek:çözücü ve basınç ikilisinin etkisi görülmektedir ve yüksek basınç uygulamasında tüm örnek:çözücü oranları daha verimli sonuçlar verdiğini gösterir ve bu da çözücü miktarının yeterli olduğu durumlarda basınç artışının verim üzerinde olumlu etkisi olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Grafik (d)'deki etanol oranı süre ilişkisini gösteren grafikte görüldüğü üzere yüksek etanol oranı kısa sürede minimum verim verirken, düşük etanol oranında uzun sürede maksimum verim alınmıştır. Bu sonuçtan yola çıkarak düşük etanol oranlarında bileşiklerin çözücüde daha iyi çözündüğü için sürenin uzamasının verimi önemli ölçüde arttırdığı yorumu yapılabilir.

Örnek:çözücü oranı ve süre ikilisinin etkilerini gösteren Grafik (e) incelendiğinde kısa sürede tüm örnek:çözücü oranlarında minimum değerler alınmışken, uzun sürede örnek:çözücü oranı arttıkça TFM verimi artmıştır çünkü ekstraksiyon süresinin uzaması ile çözücünün fenolik bileşiklerle etkileşim süresi artar ve çözünmenin daha etkin hale gelir. Özellikle yüksek örnek/çözücü oranlarında, uzun süreli ekstraksiyonun verimi artırdığı görülmektedir. Grafik (f)'de ise etanol oranı ve örnek:çözücü oranı ikilisinin birlikte etkisi görülmektedir ve bu grafik incelendiğinde yüksek etanolde yüksek örnek:çözücü oranının minimum sonuç verdiği fakat grafiğin tamamında belirgin değişimlerin olmadığı görülmektedir.

KE ile VMDE'nin TFM üzerindeki yanıt yüzey grafiklerinden alınan sonuçlar karşılaştırıldığında, KE'ye kıyasla süredeki bariz azalmaya ek olarak VMDE ile düşük etanol oranlarında daha verimli sonuçlar alındığı görülmektedir.



Şekil 4.6. VMDE'de bağımsız değişkenlerin TFM_{VMDE} (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.2.3. Toplam Antioksidan Kapasite DPPH ($TAK_{VMDE-DPPH}$)

Horozibiği çiçeği ile yapılan VMDE deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerin diğer yanıtı olan TAK_{DPPH} (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.7;

$$Y_3(TAK_{DPPH})= 100.68+9.06X_1+10.18\ X_2-2.62\ X_3+8.60X_4-14.00\ X_1X_2+2.35X_1X_3-4.21\ X_1X_4-1.93X_2X_3+1.99X_2X_4-6.70X_3X_4-8.74(X_1)^2-18.56(X_2)^2-29.66(X_3)^2-19.70(X_4)^2 \quad (4.7)$$

Programdan alınan sonuçlara göre; Y_3 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri horozibiği çiçeği için 0.9988 olarak belirlenmiştir. Horozibiği çiçeği örneklerinin Y_3 yanıtına ait gerçekleştirilen yapılan varyans analizi (ANOVA) sonuçlarına göre model önemli ($p<0.05$), uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak bulunmuştur.

Model eşitlik 4.7 incelendiğinde, X_1 (basınç) katsayısı pozitif olup, basıncın artması DPPH kapasitesini artırmaktadır. Yüksek basınç, hücre yapılarını bozarak çözücü penetrasyonunu artırmakta ve daha fazla antioksidan bileşiğin serbest hale gelmesini sağlamaktadır. Ancak belirli bir noktadan sonra basıncın daha da artırılması, bazı antioksidan bileşiklerin kaybına yol açarak DPPH kapasitesinde düşüşe neden olabilir.

X_2 (süre) de pozitif bir katsayıya sahiptir, yani ekstraksiyon süresinin artması DPPH kapasitesini yükseltmektedir. Daha uzun süre boyunca gerçekleştirilen ekstraksiyon, bileşiklerin çözücüye geçişini kolaylaştırmakta ve antioksidan kapasitesinin artmasına katkıda bulunmaktadır. Ancak sürenin aşırı uzaması, bazı hassas antioksidan bileşiklerin kaybına neden olarak verimde düşüşe sebep olabilir.

Öte yandan, X_3 (etanol oranı) negatif bir katsayıya sahiptir ve etanol oranının artmasının DPPH kapasitesini azalttığını göstermekte olup bu durum, yüksek etanol konsantrasyonlarının belirli antioksidanların çözünürlüğünü olumsuz yönde etkilemesiyle ilişkilendirilebilir.

X4 (örnek:çözücü oranı) değişkeninin katsayısı ise pozitiftir ve örnek miktarının çözücüye oranla artırılmasının DPPH kapasitesini yükselttiği çıkarılabilir. Daha fazla örnek kullanımı, çözücü içerisinde daha fazla aktif bileşiğin ekstraksiyonunu sağlayarak antioksidan kapasitesini artırmaktadır.

Modeldeki ikili etkileşimler incelendiğinde, X_1X_2 etkileşiminin negatif katsayıya sahip olması, bu iki faktörün belirli bir seviyenin üzerine çıktığında DPPH kapasitesinde azalmaya neden olduğunu göstermektedir. Yüksek basınç ve uzun süre kombinasyonu, bazı antioksidan bileşiklerin kaybına veya farklı kimyasal dönüşümlere uğramasına sebep olabilir. X_1X_3 değişkeninin pozitif etkisi, basınç altındaki belirli fenolik bileşiklerin daha iyi çözünebileceğini düşündürmektedir. Ancak X_1X_4 negatif katsayılı olup, yüksek basınç ve fazla örnek kullanımının belirli bir seviyeden sonra antioksidan kapasitesinde düşüşe yol açabileceğini göstermektedir.

Benzer şekilde, X_2X_3 negatif bir katsayıya sahiptir ve bu durum, etanol oranının artmasının sürenin olumlu etkisini azalttığını ortaya koymaktadır. X_2X_4 değişkeninin pozitif katsayısı, bu iki değişkenin birlikte artmasının DPPH kapasitesini artırdığını göstermektedir. Ancak X_3X_4 negatif katsayılı olup, yüksek etanol oranı ve yüksek örnek:çözücü oranı kombinasyonunun antioksidan kapasitesini düşürdüğünü ortaya koymaktadır.

Kare terimleri incelediğimizde, $(X_1)^2$ ve $(X_2)^2$ negatif katsayılara sahip olup, basınç ve sürenin belirli bir noktaya kadar artırılmasının DPPH kapasitesini azalttığını göstermektedir. Ayrıca $(X_3)^2$ ve $(X_4)^2$ negatif katsayılara sahip olup, etanol oranı ve örnek:çözücü oranının aşırı artırılmasının antioksidan kapasitesini olumsuz etkilediği yorumu yapılabilir.

VMDE deney tasarımındaki 4 bağımsız değişkenin ikili kombinasyonların TAK_{DPPH} (Y_2) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu grafiklerden basınç ve süre ikilisinin etkilerini gösteren Grafik (a) incelendiğinde kısa süre ve minimum basınçta verimin en az olduğu, orta-yüksek sürelerde verimin tüm basınç değerleri için daha yüksek sonuçlar verdiği fakat süre için en yüksek değerlerde verimde azalış olduğu görülmüştür. Bu bulgular, uzun süreli ekstraksiyonun bazı fenolik ve antioksidan bileşiklerin kaybına neden olabileceğini; ayrıca, çok yüksek basınçların da hücre yapılarını bozarak çözünürlük mekanizmasını olumsuz etkileyebileceği ve bazı bileşiklerin kaybına neden olabileceğini düşündürmektedir.

Grafik (b)'de etanol oranı basınç ikilisinin etkileri görülmektedir, yüksek ve düşük etanol oranında DPPH veriminin tüm basınçlar için düşük olduğu, orta değerlerde yüksek basınçta verimin arttığı bunun da etanol oranı ve DPPH radikallerinin antioksidan bağlaması arasındaki etkileşimden kaynaklandığı söylenebilir.

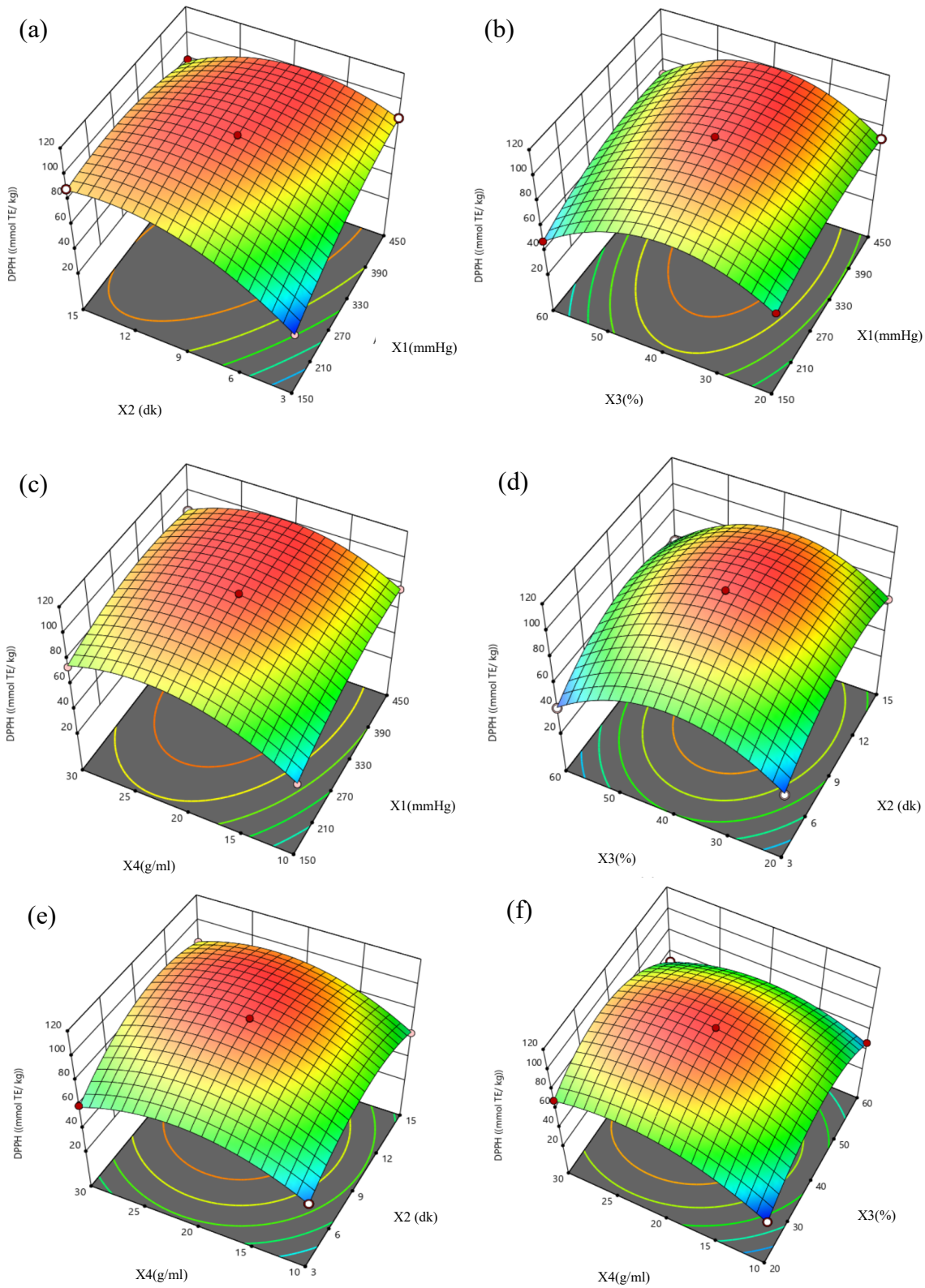
Grafik (c)'de örnek:çözücü oranı ve basınç ikilisinin etkisi verilmiştir, buna göre düşük örnek:çözücü oranı ve düşük basınçta minimum verim alınırken artan örnek:çözücü oranı ile yüksek basınç verimi arttırmıştır. Yüksek basıncın hücre duvarları üzerinde daha fazla penetrasyon sağladığı ve böylece daha fazla antioksidan bileşik çözücüye geçtiği söylenebilir. Bununla birlikte, çok yüksek örnek:çözücü oranlarında çözücünün doygun hale gelerek ekstraksiyon kapasitesini sınırlayabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır.

Etanol oranı ve sürenin birlikte etkisini gösteren Grafik (d), kısa sürede düşük veya yüksek etanol oranlarında minimum verimin alındığını, ortalama sürelerde ve ortalama etanol oranlarında verimin maksimum olduğunu göstermiştir. Bu bulgulardan çıkarılabilecek sonuç; çok kısa sürelerde ekstraksiyon veriminin düşük kalırken, çok uzun süreler ise antioksidanların kaybına neden olabileceğidir. Benzer şekilde, çok yüksek veya çok düşük etanol oranlarının da optimum çözünürlüğü engelleyerek verimi azalttığı söylenebilir.

Grafik (e) örnek:çözücü oranının süre ile etkisini göstermektedir ve iki değişken de en düşük seviyedeyken minimum verime sebep olurken ortalama değerlerde sonuç artmıştır. Daha uzun süreler, çözücünün matrise daha fazla nüfuz etmesini sağlarken, örnek:çözücü oranının artması ise daha fazla aktif bileşiğin ekstraksiyonuna olanak tanır fakat; çok uzun sürelerde olduğu gibi, aşırı yüksek örnek:çözücü oranları da çözücünün ekstraksiyon kapasitesini aşarak verimi sınırlayabilir.

Grafik (f)'de görülen örnek:çözücü oranı ve etanol oranı grafiği incelendiğinde her iki değişken de düşük değerlerdeyken verimin minimum olduğunu, ortalama değerlerde ise daha iyi sonuçlar alındığını göstermiştir. Çok düşük çözücü oranı, antioksidanların yeterince bağlanmasını engellerken, çok yüksek çözücü oranları ise ekstraksiyon veriminde düşüşe sebep olabilmektedir.

KE ve VMDE'nin TAK_{DPPH} üzerindeki yanıt yüzey grafikleri yorumlamaları karşılaştırıldığında, her ikisinde de ortalama etanol değerlerinin verimi arttırdığı, VMDE'de daha düşük sürelerde ekstraksiyonda KE'ye kıyasla daha verimli sonuçlar alındığı görülmüştür.



Şekil 4.7. VMDE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{VMDE\text{-}DPPH}$ (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.2.4. Toplam Antioksidan Kapasite CUPRAC ($TAK_{VMDE\text{-}CUPRAC}$)

Horozibiği çiçeğiyle yapılan VMDE deneylerinden sonra bağımsız değişkenlerin diğer yanıtı olan TAK_{CUPRAC} (Y_4) üzerindeki etkilerini gösteren ikinci dereceden model eşitlik 4.8;

$$Y_4(TAK_{CUPRAC})=141.90+27.38X_1+32.96X_2-14.06X_3+6.85X_4-13.02X_1X_2+0.6204X_1X_3-8.72X_1X_4+4.42X_2X_3+7.30X_2X_4-2.16X_3X_4+9.01(X_1)^2-5.76(X_2)^2-12.83(X_3)^2-9.41(X_4)^2 \quad (4.8)$$

Design Expert 13'ten alınan sonuçlara göre; Y_4 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı, $R^2 = 0.9930$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_4 değerleri ile, hesaplanan Y_4 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir. Varyans analizi tablosunda verilen sonuçlara göre; model önemli ($p<0.05$), modele ait uyum eksikliği ise önemsiz ($p>0.05$) olarak ifade edilmiştir.

Model eşitlik 4.8 incelendiğinde, X_1 (basınç) pozitif katsayıya sahiptir ve basınçtaki artış antioksidan miktarını arttırabilir ve bunun sebebi olarak basıncın örnek ve çözücü arasındaki etkiyi arttırarak daha fazla antioksidan bileşiğin salınması gösterilebilir. X_2 (süre) de pozitif bir katsayıya sahiptir ve ekstraksiyon süresinin artmasının TAK_{CUPRAC} kapasitesini arttırdığını gösterir buna göre daha uzun ekstraksiyon süresi, bileşiklerin çözücüye geçişini kolaylaştırarak antioksidan kapasitesinin yükselmesine katkıda bulunur. X_3 (etanol oranı) ise negatif bir katsayıya sahiptir ve etanol oranının artmasının TAK_{CUPRAC} değerini azalttığı görülmektedir. Bu durum, yüksek etanol konsantrasyonlarının belirli antioksidan bileşiklerin çözünürlüğünü olumsuz etkilemesiyle ilişkilendirilebilir. X_4 (örnek:çözücü oranı) pozitif bir katsayıya sahip olup TAK_{CUPRAC} kapasitesini yükseltir ve buna göre, daha yüksek örnek:çözücü oranı ile daha fazla antioksidan bileşiğin ekstraksiyonu sağlanır ve antioksidan kapasite artar.

Horozibiği çiçeği örneklerinin TAK_{CUPRAC} yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Basınç süre ikilisinin birlikte etkilerini gösteren Grafik (a) incelendiğinde, minimum süre ve minimum basınçta minimum verim alınırken, maksimum süre ve maksimum basınçta maksimum verim alındığı görülmüştür. Bu bulguya göre yüksek basınç, hücre duvarlarını bozarak çözücünün aktif bileşikleri daha etkili bir şekilde çözmesini sağlarken, ekstraksiyon süresinin uzun olması da çözünme sürecini destekler.

Etanol oranı ve basıncın etkileri grafik (b) ‘de görülmektedir ve bu grafiğe göre minimum etanol oranı maksimum basınç ile maksimum sonuç verirken maksimum etanol oranı minimum basınç ile minimum sonuç vermiştir. Bu durum, yüksek etanol konsantrasyonunun bazı antioksidanların çözünürlüğünü olumsuz etkilemesi ve düşük basıncın ekstraksiyon sürecini yeterince destekleyememesiyle açıklanabilir.

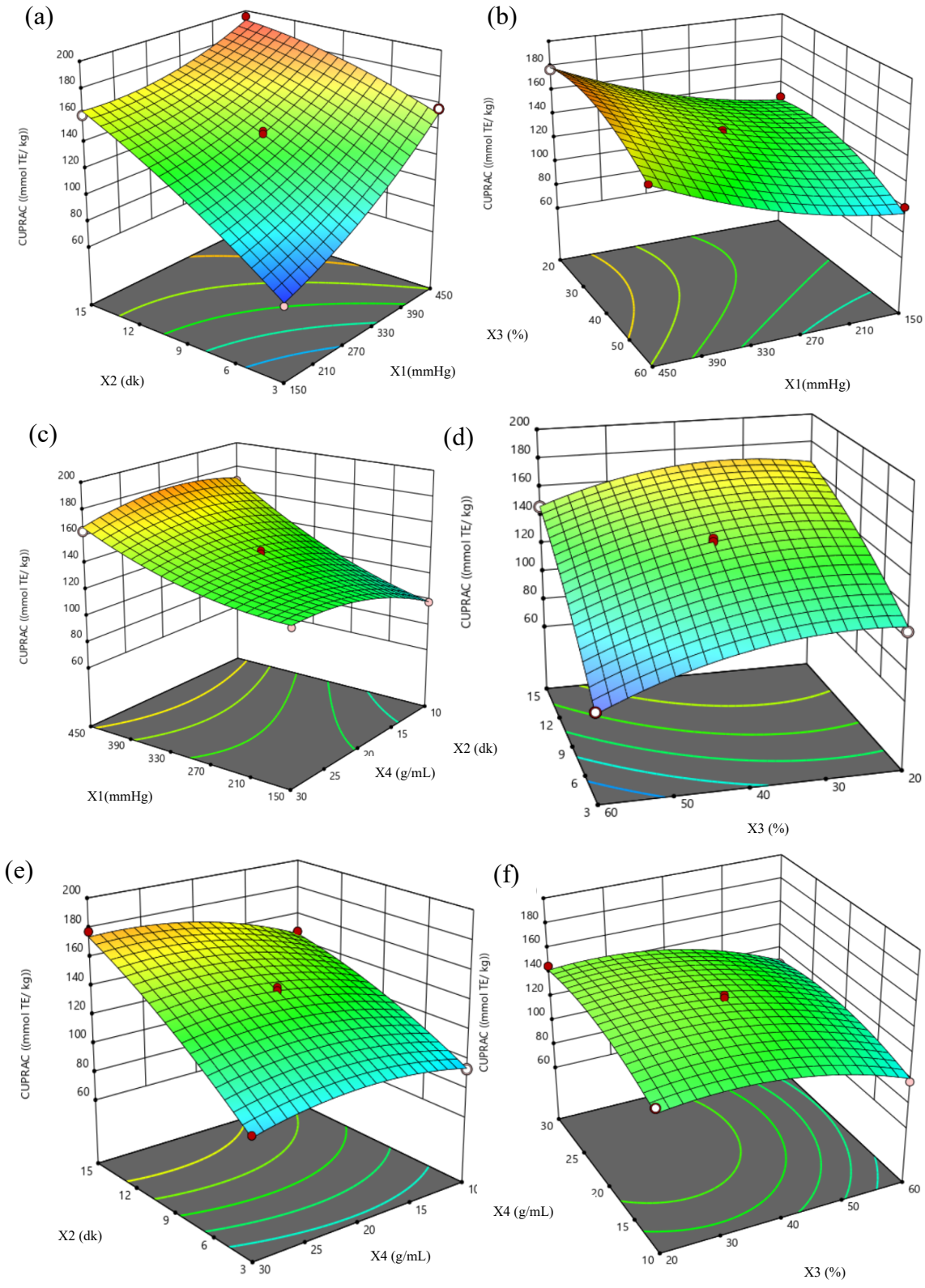
Grafik (c)’de basınç ve örnek:çözücü oranı ikilisinin etkileri görülmektedir, yüksek basınçta tüm örnek:çözücü oranlarında daha yüksek sonuçlar alınmıştır. Böylece basıncın ekstraksiyon sürecindeki belirgin olumlu etkisi görülmektedir çünkü yüksek basınç, çözücünün örnek içine daha iyi nüfuz etmesini sağlarken, yüksek örnek konsantrasyonu da çözücü içinde daha fazla antioksidan bileşiğin bulunmasını destekleyerek antioksidan kapasiteyi artırabilir.

Grafik (d)’de süre ve etanol oranı ikilisinin etkileri görülmektedir, etanol oranı düşükken süre uzadıkça verim artmıştır ayrıca etanol oranının yüksek olması kısa süreli ekstraksiyonda minimum sonucu vermiştir. Bu bulgu yüksek etanol oranının antioksidan bileşiklerin çözünürlüğünü olumsuz etkileyerek kısa sürede ekstraksiyon verimini sınırlamasıyla açıklanabilir.

Grafik (e)’de süre ve örnek:çözücü oranı ikilisinin etkileri verilmiştir ve bu grafiğe göre süre uzadıkça yüksek örnek:çözücü oranı maksimum verim alınmasını sağlarken kısa süreli ekstraksiyonda tüm örnek:çözücü oranlarında minimum verim alınmıştır yani sürenin yetersiz olması nedeniyle antioksidan bileşiklerin tam olarak ekstraksiyonunun gerçekleştirilemediği söylenebilir.

Grafik (f)’de örnek:çözücü oranı ve etanol oranı ikilisinin etkileri görülmektedir, bu grafiğe göre etanol oranı artması TAK_{CUPRAC} sonucunu azaltmıştır fakat belirgin değişimler gözlenmemiştir. Bu durum, etanol oranının daha yüksek konsantrasyonlarda çözünürlüğü sınırlamasıyla açıklanabilir.

KE’ye göre TAK_{CUPRAC} için VMDE yönteminde daha az etanol ile daha verimli sonuçlar alındığı sonucu çıkartılabilir ve böylece ekstraksiyon sürecinde VMDE yöntemi daha az çözücü kullanılarak çevresel ve ekonomik açıdan daha verimli bir işlem gerçekleştirilmesine olanak sağlayabilir.



Şekil 4.8. VMDE'de bağımsız değişkenlerin $TAK_{VMDE\text{-}CUPRAC}$ (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.2.2.5. Vakum Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

29 deney tamamlandıktan sonra VMDE için koşulların optimizasyonu amacıyla Design Expert 13 programı kullanılarak optimizasyon yapılmıştır. Bunun sonucunda istenen sonuca ulaşma fonksiyonu 0.923'tür. VMDE için optimum koşullar X_1: 450 mmHg, X_2:12.001 dk, X_3: 30.74%, X_4: 23.907 g/mL ve elde edilen deneysel veriler Çizelge 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 VMDE için optimum deney koşullarında elde edilen yanıtlar ve program çıktısı tarafından verilen teorik değerler

	VMDE Optimizasyonu	
	Deneysel değer	**Teorik değer**
Y_1	3109.92±0.004	3230.93
Y_2	16.90±0.002	16.27
Y_3	101.03±0.03	88.97
Y_4	176.74±0.003	188.92

Y_1= TBM (mg betalain/ kg kuru ağırlık)
Y_2= TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)
Y_3= TAK_{DPPH} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)
Y_4= TAK_{CUPRAC} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

4.3. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Fonksiyonel Özellikleri

4.3.1. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Renk Analizi

KE ve VMDE optimizasyonu sonucu elde edilen optimum koşul ekstraktlarının L*, a*, b* değerleri sırasıyla; 21.12 ± 1.95, 0.22 ± 0.14, -0.82 ± 0.43 ve 25.59 ±1.85, 1.02 ± 1.01, -0.92 ± 0.12. Bu sonuçlara göre KE elde edilen ekstraktlar düşük seviyede kırmızı bir eğilim göstermektedir, bununla birlikte mavi eğilim mevcuttur. VMDE ile elde edilen ekstraktlar ise daha parlak bir ton göstermiş ve kırmızı eğilim artmıştır. Renk analizine göre VMDE yönteminin kırmızı, pembe veya mor gibi tonların elde edilmesi için daha etkili olduğu söylenebilir.

4.3.2. Optimum Koşullardaki Betalain Ekstraktlarının LC-MS-Q-TOF ile Nicel Analizi

KE ve VMDE optimum koşullarda elde edilen ekstraktların kompozisyonlarının analizi için ekstraktlardan elde edilen farklı betalainlerin miktarları betanin standardı (Sigma Aldrich, Darmstadt, Almanya) üzerinden verilmiştir (Li et al., 2015). Hesaplamalarda betanin standardının farklı konsantrasyonlarında çizdirilen standart eğri (10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 ppm) kullanılmıştır. Analizde kullanılan standart eğri Şekil A13'te verilmiştir.

Standart eğri kullanılarak betanin cinsinden her iki ekstraksiyon yöntemi için elde edilen değerler optimum KE için 6393.17 ppm, optimum VMDE için 9256.50 ppm olarak hesaplanmıştır.

4.3.3. Optimum Koşullardaki Ekstraktların Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Analizi

İşlem görmemiş horozibiği çiçeği, KE optimum koşul ekstraktı ve VMDE optimum koşul ekstraktının Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile örneklerin yüzey morfolojisi, partiküllerinin bütünlük, gözeneklilik ve kalıntı varlığı açısından farklılıklarının analizi 75X, 500X ve 1000X büyütmeler için gerçekleştirilmiş ve görüntüler Şekil 4.9'da verilmiştir.

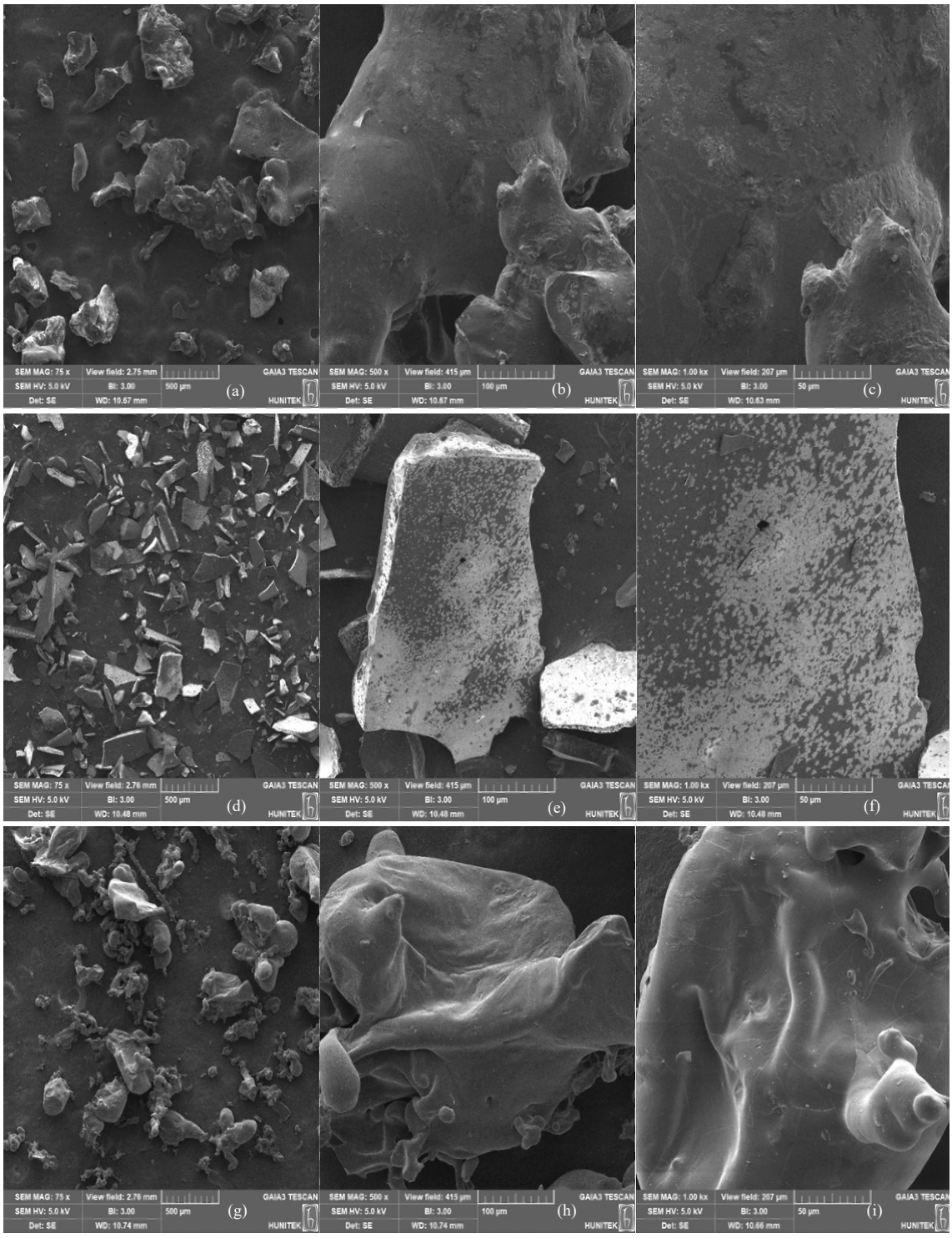
İşlem görmemiş horozibiği çiçeği örneklerinin SEM görüntüleri (Şekil 4.9 a-b-c) incelendiğinde partiküllerde yapının korunduğu, yüzeyin pürüzsüz ve gözenek dağılımının homojen olduğu görülmektedir (Martinez-Lopez et al., 2020; Peter & Gandhi, 2017). Partiküllerde yapı bozulmadığından kalıntı ve birikim görünmemektedir (Filip et al., 2017).

KE optimum koşulda elde edilen ekstraktın SEM görüntüleri (Şekil 4.9 d-e-f) incelendiğinde partiküllerde parçalanmalar olduğu ve yüzeyde bozulmaların meydana geldiği ve yapı bütünlüğünün azaldığı görülmektedir. Gözeneklilik işlenmemiş örneklere kıyasla artmıştır ancak düzensiz ve sert kopuşlar meydana gelmiştir (Gu et al., 2016; A. Sharma et al., 2023).

VMDE optimum koşulda elde edilen SEM görüntüleri (Şekil 4.9 g-h-i) incelendiğinde partiküllerde yapının KE'ye kıyasla daha iyi korunduğu ve gözenekliliğin belirgin şekilde

arttığı görülmektedir bu durum hücre dışına biyoaktif bileşiklerin daha verimli salınımını sağlayabilir. Yüzeyde kalan beyaz lekelerin ekstraksiyon sonrası yapının dışına fenolik bileşikler ve betalainlerin birikimi ile ilişkilendirilmiştir (Martinez-Lopez et al., 2020; Wang et al., 2008).

Horozibiği çiçeğinin yetiştirildiği topraklara bağlı olarak, betalain miktarı, fenolik bileşikler ve mineraller gibi tüm biyoaktif bileşiklerinin değişiklik gösterdiği birden fazla çalışma ile ortaya konmuş olup Türkiye'de yetiştirilen çiçeklerde de bu özelliklerin farklı olması kaçınılmazdır ve SEM görüntülerindeki bu beyaz lekelerin ekstraksiyon sırasında hücre dışına salınan bu betalainler, fenolik bileşikler ve mineraller olabileceği düşünülse de bu konuda SEM analizinden daha ileri görüntüleme tekniklerinin (Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi) kullanılarak detaylı araştırmalar yapılması önerilmektedir (E. Akin-Idowu et al., 2017; Mérida-López et al., 2023).



Şekil 4.9. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerin, KE ve VMDE ile elde edilen ekstraktların SEM görüntüleri; (a) (b) (c) sırasıyla işlenmemiş çiçek örneklerinin 75X, 500X,1000X büyütmeleri; (d), (e), (f) sırasıyla KE 75X, 500X, 1000X; (g), (h), (i) sırasıyla VMDE 75X, 500X, 1000X büyütmelerini gösterir.

4.4.Enkapsülasyon ve Optimizasyon

4.4.1. Niyozom Metodu ile Enkapsülasyon

Materyal ve yöntem kısmındaki Çizelge 3.5'te horozibiği çiçeklerinin niyozom metodu ile enkapsülasyonu için kullanılan bağımsız değişkenlerin gerçek ve kodlanmış değerleri verilmiştir. Çizelge 3.6'da belirtilen koşullarda gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen yanıtlar Ekler kısmındaki Çizelge B3'te verilmiştir.

Horozibiği çiçek ekstraktları kullanılarak oluşturulan niyozomal veziküllerden elde edilen TBM değerleri incelendiğinde maksimum 3029.56 ve minimum ise 2954.95mg betalain/kg kuru madde olarak ölçülmüştür. Maksimum ve minimum TFM miktarı sırasıyla, 12.623 ve 7.51 mg GAE/g kuru ağırlık olarak elde edilmiştir. Örneklerden elde TAK_{CUPRAC} değerleri maksimum 129.526 ve minimum 86.423 mmol TE/kg kuru ağırlık olarak ölçülmüştür. Maksimum ve minimum a* değerleri; 14.942 ve 3.578; son olarak enkapsülasyon verimi (%) için maksimum ve minimum değerler; % 97.513 ve % 94.984'tür. Tüm yanıtlar için ANOVA tablosu ekler kısmı Çizelge C1'de verilmektedir.

4.4.2 Niyozomal Veziküllerin Analizleri ve Karakterizasyonu

4.4.2.1. Niyozomlarda Toplam Betalain Miktarı (TBM_N)

TBM_N değerleri (Y_1) incelendiğinde ise bu yanıt için minimum ve maksimum değerlerin sırasıyla 2954.95 ve 3029.56 mg betalain/kg kuru madde olarak ölçüldüğü görülmektedir (Çizelge B3).

Y_1 için türetilen model eşitliği ise Eşitlik 4.9 olarak aşağıda verilmektedir. Ayrıca Y_1 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı (R^2) değeri; 0.9700 olarak belirlenmiştir.

$$Y_1 (TBM_N) = 2991.31 - 5.34X_2 - 6.62X_3 + 5.08X_4 + 23.01X_1X_3 + 13.60X_2X_3 + 7.27X_3X_4 - 4.42(X_1)^2 + 11.26(X_2)^2 + 15.51(X_4)^2 \quad (4.9)$$

Model eşitliliği 4.9 incelendiğinde, X_1 (sürfektan molar oranı) modelde doğrudan bir katsayıya sahip olmasa da karesel terimi $(X_1)^2$ negatif katsayıya sahiptir ve bu durum sürfektan molar oranının yüksek olduğu durumlarda niyozom oluşumunda olumsuz

etkilere neden olabileceğini gösterir çünkü sürfektan molar oranındaki artış, oluşturulmak istenen tabakanın stabilitesini bozarak niyozomların yapısını olumsuz etkileyebilir.

X_2 (ekstrakt miktarı) negatif bir katsayıya sahiptir, ekstrakt miktarının artmasının oluşturulan niyozomal veziküllerin taşıyabileceğinden daha fazla ekstrakt bulunması sebebiyle kapsüllerin stabilitesinin negatif etkilenebileceğini gösterir. Buna karşın karesel terimi $(X_2)^2$ pozitif olup, belirli bir ekstrakt miktarının üzerinde stabilite açısından olumlu etkiler sağlayabileceğini düşündürmektedir.

X_3 (kolesterol oranı) negatif katsayıya sahiptir, aslında kolesterol, niyozom oluşumunda membran stabilitesini artırmak amaçlı kullanılmaktadır fakat model eşitliğinde görüldüğü üzere fazla miktarda kullanıldığında niyozomal veziküllerin stabilitesini olumsuz etkileyebilir, çünkü kolesterol stabiliteyi arttırması için eklense bile yüksek miktarda eklendiğinde tabakaların sertleşmesine ve ekstraktların veziküller içine geçişini zorlaştırabilir. Modeldeki X_1X_3 pozitif katsayıya sahiptir, bu da belirli bir sürfektan oranı ve kolesterol oranı kombinasyonunun niyozom stabilitesini olumlu yönde etkileyebileceğini; ek olarak X_2X_3 de pozitif olup, bu iki faktörün belirli seviyelerde uyumlu çalışabildiğini göstermektedir. Kaplama materyaline eklenen kolesterol gibi kaplama materyalini stabilize edici ajanlar da kapsülde elde edilen TBM'nin korunması için bir başka önemli etmen olduğu belirlenmiştir (Bhardwaj et al., 2020).

X_4 (ultrason süresi) ve karesel terimi $(X_4)^2$ pozitif bir katsayıya sahiptir, yani sürenin artması niyozom oluşumunu olumlu yönde etkilemektedir çünkü ultrason, niyozomların homojen bir şekilde oluşmasını destekleyebilir. X_3X_4 de pozitif katsayılı olup, belirli bir ultrason süresi ile kolesterol miktarının dengeli kombinasyonunun niyozom stabilitesini artırabileceğini göstermektedir. X_1X_3, X_2X_3 ve X_3X_4 gibi ikili etkileşimler de pozitif katsayıya sahip olup, bu faktörlerin birlikte belirli seviyelerde niyozom oluşumunu artırabileceğini gösterir.

İlk yanıt olan TBM için bağımsız değişkenlerin ikili etkilerinin görüldüğü yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Grafik (a)'da keskin değişimler görülmemekle birlikte, düşük ekstrakt miktarı tüm sürfektan oranlarında daha verimli sonuç vermiştir. Bunun sebebi, ekstraktın yüksek miktarlarda kullanılmasının sürfektan ve kolesterol arasındaki dengenin bozulması sonucunda niyozomal veziküllerin yapısının olumsuz etkilenmesi olabilir.

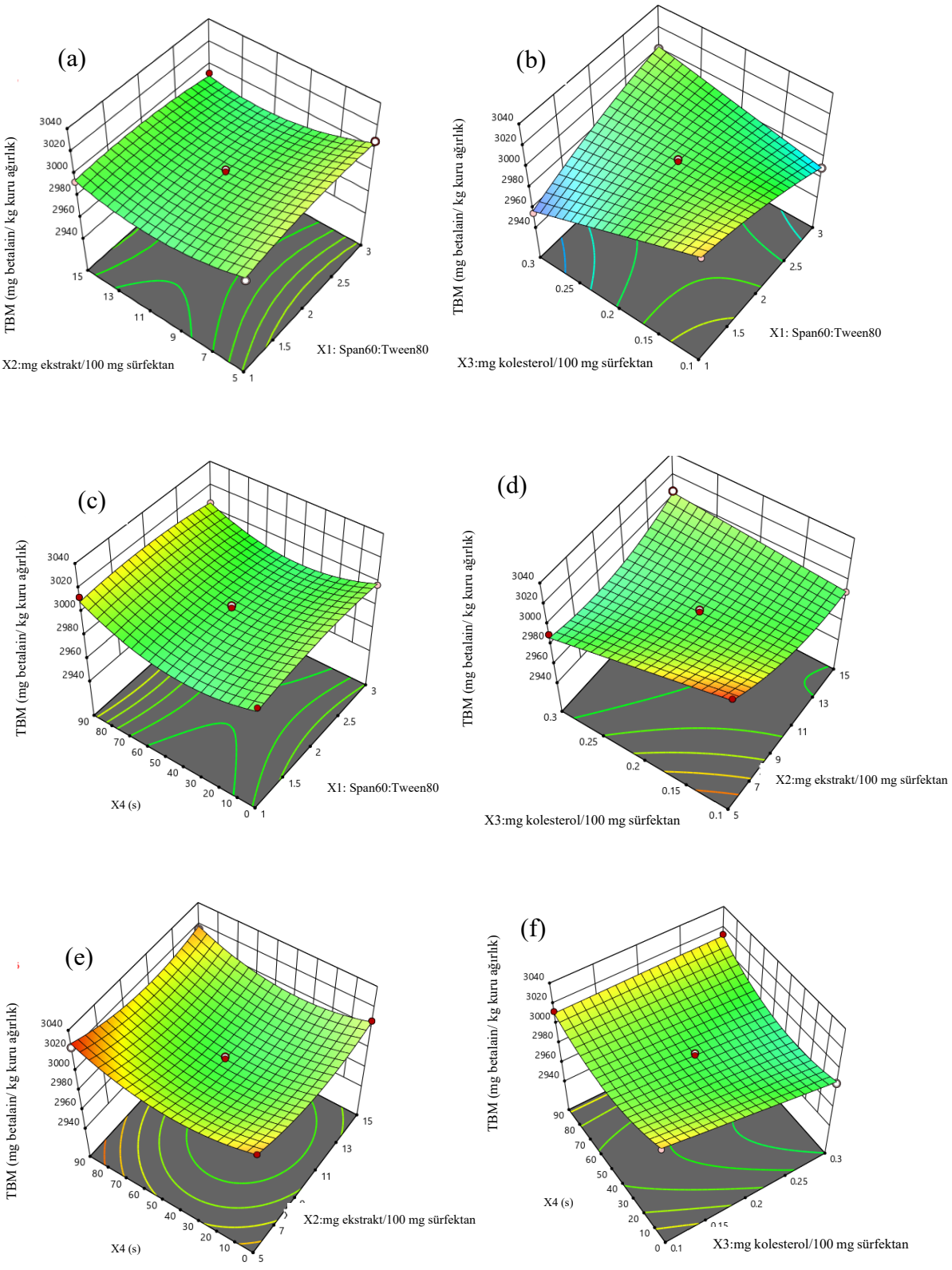
Grafik (b)'de yüksek kolesterol ve sürfektan oranı minimum değerleri vermişken, iki değişkenin de minimum koşullarda uygulanması TBM miktarında artışa neden olmaktadır. Bu bulguya göre, niyozomların stabilitesini koruyacak şekilde optimum düzeyde sürfektan ve kolesterol kombinasyonunun bulunmasının gerekli olduğu söylenebilir.

Grafik (c)'de tüm sürfektan oranlarında uzun süreli ultrason uygulamasının TBM miktarında artışa neden olduğu görülmektedir. Ultrasonun niyozomların homojen dağılımını sağlayarak kapsülleme verimini arttırdığı söylenebilir çünkü bu yolla ultrasonik dalgalar sayesinde lipit çift tabakalarının daha iyi organize olması ve ekstraktın daha etkin şekilde kapsüllenmesi mümkün olabilir.

Grafik (d) düşük ekstrakt miktarı ve düşük kolesterol miktarıyla birlikte TBM veriminde artışa neden olduğu göstermektedir. Düşük kolesterol seviyesi, niyozomların daha esnek olmasını sağlayarak TBM miktarının artışına katkıda bulunabilir, kolesterol seviyesinin artışı Grafik (b)'dekindeki sonuca benzer şekilde veziküllerin stabilitesinin bozulmasına sebep olabilir.

Grafik (e) düşük ekstrakt miktarı ve yüksek ultrason uygulamasının TBM üzerinde pozitif etkisi olduğunu gösterir. Ultrason süresinin uzaması, niyozomların homojen dağılımını artırarak kapsülleme verimini desteklerken, düşük ekstrakt miktarı sistemin stabilitesini koruyarak TBM miktarının optimizasyonunu sağlayabilir.

Grafik (f) uzun süreli ultrason uygulamasının tüm kolesterol oranları için TBM miktarında artışa neden olduğunu göstermektedir. Ultrason uygulaması niyozom enkapsülasyonu için zorunlu bir prosedür olmasa da parçacık boyutunun homojenleştirilmesi ve küçültülmesi için gerek duyulan bir işlem olduğu belirtilmiştir. Literatürde farklı sürelerde ultrason uygulamasının yapıldığı niyozomlarda farklı sürelerde ultrason uygulanması ve sürenin optimize edilmesi ile enkapsülasyon veriminin artacağı ve kabuk materyalinin daha iyi korunabileceği rapor edilmiştir (Ugorji et al., 2022).



Şekil 4.10. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TBM_N (Y_1) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.4.2.2. Niyozomlarda Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFM_N)

İkinci yanıt olan TFM değerleri incelendiğinde, bu değerlerin 7.51 ile 12.62 mg GAE/g kuru ağırlık arasında değiştiği Çizelge B3'te görülmektedir. Enkapsülasyonda kullanılan sürfektanların molar oranı (X_1) değişkeninin TFM üzerinden önemli ölçüde değişiklik yaptığı belirlenmiştir. Minimum ve maksimum değerlerin elde edildiği deney koşulları incelendiğinde kolesterol miktarı değerlerinin aynı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca TFM'de elde edilen minimum ve maksimum koşullardaki enkapsülasyonda kullanılan sürfektanların molar oranı (X_1) ve enkapsülasyonda kullanılan ekstrakt miktarı (X_2) değişkenlerinin aynı olduğu da belirlenmiştir. Fenolik özellikte olan biyoaktif bileşiklerin aynı zamanda antioksidan özelliği de olduğundan benzer enkapsülasyonda deney koşullarında minimum ve maksimum değerlerin elde edilmesi literatür kaynakları ile de uyumludur (Grgić et al., 2020).

Optimizasyon çalışmasındaki ikinci yanıt olan TFM (Y_2) için türetilen model eşitlik 4.10'da belirtilmiştir.

$$Y_2(TFM_N) = 12.05 - 0.76X_1 + 0.60X_2 + 0.66X_4 - 0.26X_1X_2 + 1.13X_1X_3 + 0.60X_1X_4 - 1.15X_2X_4 + 0.86X_3X_4 - 0.63(X_1)^2 - 1.11(X_2)^2 - 0.89\,(X_3)^2 - 0.94(X_4)^2 \quad (4.10)$$

Design Expert 13'ten alınan sonuçlara göre; Y2 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri; $R^2 = 0.9699$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_2 değerleri ile, hesaplanan Y_2 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Model eşitlik 4.10 incelendiğinde, X_1 (sürfektan molar oranı) değişkeni negatif katsayıya sahiptir, bu da sürfektan molar oranının artmasının TFM değerinde azalmaya neden olacağını gösterir. Ayrıca, X_1'in diğer değişkenlerle olan etkileşimleri incelendiğinde X_1X_3 ve X_1X_4 arasındaki pozitif ilişkiler, belirli koşullarda TFM miktarında artış sağlayabileceğini gösterir, hatta X_1 ve X_3'ün birlikte artması, modelde en yüksek pozitif etkileşimlerden birini göstermektedir, buradan yola çıkarak sürfektan molar oranı ve kolesterol miktarının uyumlu seçildiği durumlarda niyozomal veziküllerde kapsüllenebilecek fenolik madde miktarında artış olacağı söylenebilir.

X_2 (ekstrakt miktarı) değişkeni tek başına pozitif bir etkiye sahip olmasına rağmen, X_2X_4 etkileşimi güçlü bir negatif etki göstermektedir. Bu durum, X_2 ve X_4'ün birlikte arttığı

senaryolarda TFM miktarında azalma olabileceğine işaret eder. Bu bulguya göre ekstrakt miktarındaki artışla birlikte ultrason süresi arttığında kapsülleme verimi TFM için düşüş gösterir. Ayrıca X_2'nin karesi (X_2^2) negatif bir katsayıya sahiptir, bu da X_2 değerinin aşırı artırılmasının TFM veriminde negatif bir etkiye neden olacağını gösterir, yüksek ekstrakt miktarı kapsülde o kadar fenolik bileşiğin tutulmasını zorlaştırabilir.

X_3 (kolesterol miktarı) değişkeninin modelde doğrudan bir etkisi görülmemiştir fakat diğer değişkenlerle olan etkileşimleri incelendiğinde, X_3X_4'ün pozitif katsayısı, bu iki değişkenin birlikte artmasının TFM miktarını artırabileceğini gösterirken, X_3'ün karesi negatif bir değere sahip olduğundan, X_3'ün fazla artması durumunda TFM miktarında düşüş meydana gelebilir. Kolesterol miktarı direkt olarak etkili görünmese bile niyozomların kararlılığını arttırmada önemli bir role sahiptir çünkü karesindeki negatif artış bunu gösterir ayrıca diğer değişkenlerle beraber de stabiliteyi güçlendirebileceği söylenebilir.

X_4 (ultrason süresi) değişkeni tek başına pozitif etkiye sahip olup sadece X_2 ile etkileşimi negatif olduğu için, bu iki değişkenin birlikte artması durumunda TFM miktarında düşüş beklenebilir. X_4'ün karesi de negatif bir değere sahip olduğundan, bu değişkenin aşırı artışı da TFM üzerinde istenmeyen bir azalışa neden olabilir.

Deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin TFM (Y_2) üzerindeki etkilerinin görüldüğü yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.11'de sunulmuştur. Sürfektan oranı ve ekstrakt miktarının ikili etkilerini gösteren Grafik (a) incelendiğinde sürfektan oranı minimumken artan ekstrakt miktarı TFM verimini arttırdığı görülmektedir ve buna göre sürfektan molar oranındaki artışın tüm ekstrakt seviyeleri için negatif bir durum olduğu söylenebilir. sürfektan molar oranı düşükken de oluşturulan niyozomların TFM tutma kapasitesinin yüksek olduğu söylenebilir.

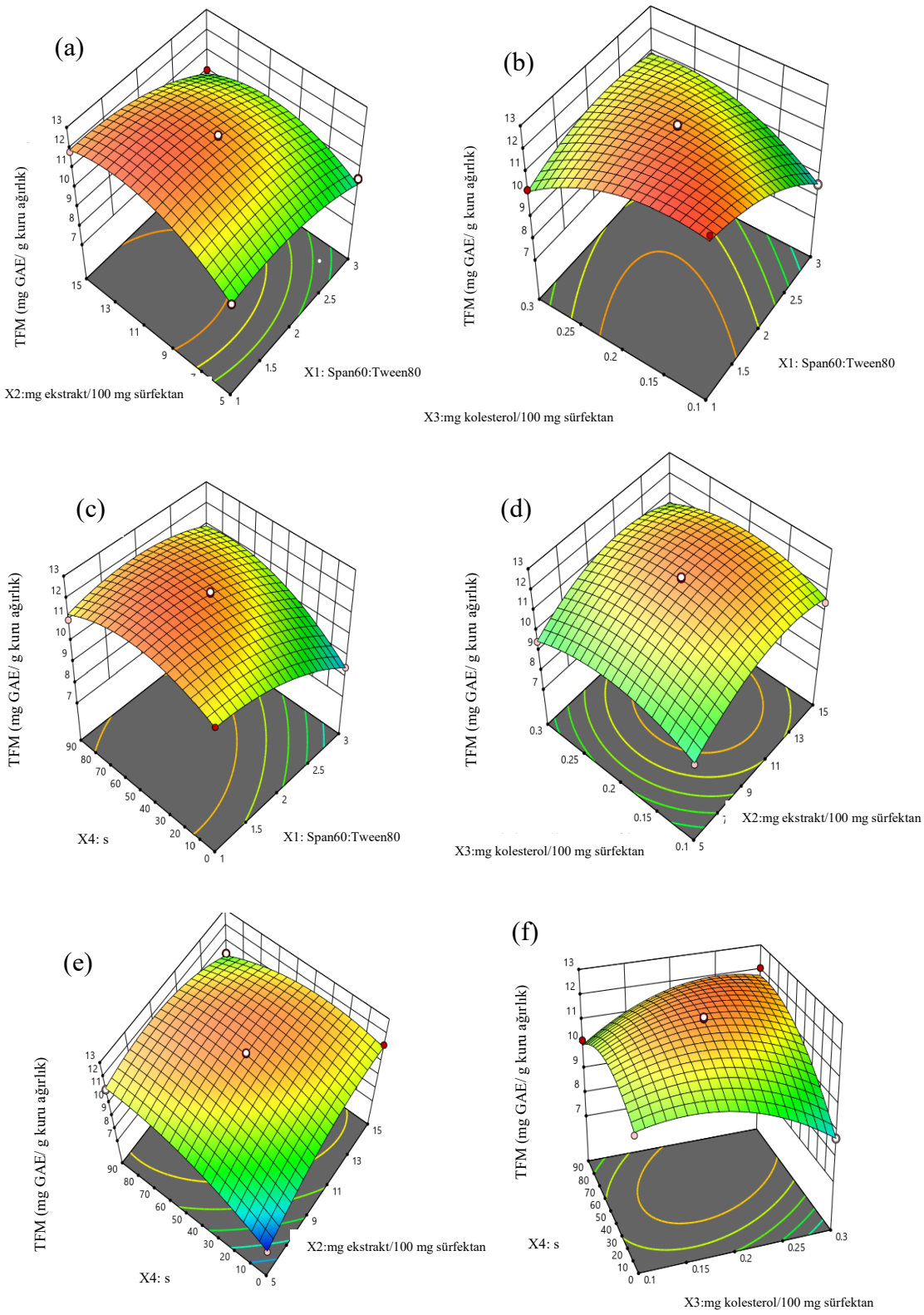
Grafik (b) sürfektan oranı ve kolesterol miktarının ikili etkilerini göstermektedir ve bu grafik incelendiğinde düşük sürfektan oranında ve düşük kolesterol ile TFM veriminin arttığı görülmüştür. Ayrıca bu materyallerin doğru oranlarda ve kombinasyonlarda kullanılmaları ile kapsül içeriğindeki biyoaktif bileşiklerin daha iyi korunabileceği de rapor edilmiştir (Ge et al., 2019).

Grafik (c) incelendiğinde düşük sürfektan oranında ultrason süresi uzadıkça daha verimli sonuçlar alınmış fakat maksimum ultrason süresinde TFM veriminde azalma görülmüştür. Buna göre ultrason süresinin optimizasyonu niyozom stabilizasyonu için

önemli bir parametre olarak görünmektedir ve doğru sürede uygulanması TFM için verim artışı sağlar.

Grafik (d)'de görüldüğü üzere düşük ekstrakt miktarı tüm kolesterol oranlarında düşük TFM verimine sebep olmuş, artan ekstrakt miktarı verimde artışa neden olsa da ortalama değerlerdeki değişkenler daha makul sonuçlar vermiştir. Bu bulguya göre maksimum olmasa da artan ekstrakt miktarı, ortalama kolesterol seviyelerinde niyozomal veziküller için olumlu sonuçlar meydana getirebilir.

Grafik (e)'de ultrason uygulamasının ekstrakt miktarıyla birlikte TFM üzerinde keskin değişimlere sebep olduğu görülmektedir, ultrason uygulanmadığında tüm ekstrakt miktarları için minimum değerler alınmış, genellikle ortalama ekstrakt miktarları için artan ultrason sürelerinde TFM verimi artış göstermiştir. Grafik (f) ultrason süresi ve kolesterol miktarı ikilisinin etkilerini göstermektedir ve düşük kolesterolde tüm ultrason değerlerinde TFM miktarının azaldığını, iki değişken için de ortalama ve üst değerlerin TFM'de artışa neden olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.11. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TFM_N (Y_2) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.4.2.3. Niyozomlarda Toplam Antioksidan Kapasite ($TAK_{CUPRAC-N}$)

Farklı koşullarda gerçekleştirilen 29 deney sonrasında bağımsız değişkenlerin, TAK_{CUPRAC} (Y_3) üzerindeki etkilerini gösteren; ikinci dereceden model eşitlik, Eş. 4.11'de verilmiştir. Diğer yandan TAK değerlerinin 86.42 ile 129.53 mmol TE/g kuru ağırlık arasında değiştiği belirlenmiştir ve tüm değerler Çizelge B3'te verilmiştir. Ayrıca, Y_3 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı (R^2) değeri; 0.9929 olarak belirlenmiştir.

$$Y_3(TAK_{CUPRAC-N}) = 121.95 - 7.60X_1 + 8.76X_2 + 3.52X_3 + 2.27X_4 - 8.61X_1X_2 + 8.47X_1X_3 - 4.80X_1X_4 + 6.19X_2X_3 - 6.91X_2X_4 - 2.09X_3X_4 - 4.30(X_1)^2 - 14.46(X_2)^2 - 3.56(X_3)^2 - 3.77(X_4)^2 \quad (4.11)$$

Model eşitlik 4.11 incelendiğinde, X_1 (sürfektan molar oranı) değişkeni negatif katsayıya sahip olup bu değişkendeki artışın TAK_{CUPRAC} değerinde azalmaya neden olduğu ve özellikle X_1X_2 ve X_1X_4 etkileşimlerinin de negatif olması, X_1'in ekstrakt miktarı ve kolesterol miktarıyla birlikte arttığında antioksidan kapasitenin daha fazla düşebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, X_1X_3 etkileşimi pozitif bir etkiye sahiptir, yani sürfektan molar oranı ve ultrason süresi birlikte arttığında niyozomlarda TAK_{CUPRAC} değeri yükselebilir. Ancak X_1'in karesi de negatif bir katsayıya sahiptir, bu da X_1'in fazla artırılmasının ters etki yaratabileceğini gösterir.

X_2 (ekstrakt miktarı) pozitif bir katsayıya sahiptir ve tek başına TAK_{CUPRAC} değerini artırıcı bir etki gösterir ancak X_2'nin X_1 ve X_4 ile olan etkileşimleri negatif olup, bu değişkenlerle birlikte artışı TAK_{CUPRAC} değerinde düşüşe neden olabilir. Fakat, X_2X_3 etkileşimi pozitif bir katsayıya sahiptir ve ekstrakt miktarının kolesterol miktarıyla birlikte artırılması TAK_{CUPRAC} seviyesini yükseltebilir. X_2'nin karesi en büyük negatif katsayıya sahip olup, X_2 değerinin aşırı yükseltilmesi niyozomlarda antioksidan kapasitenin ciddi şekilde azalmasına neden olur.

X_3 (kolesterol miktarı) tek başına pozitif bir etkiye sahiptir ve X_3'ün artışı TAK_{CUPRAC} değerini yükseltmektedir. Ek olarak X_3'ün X_1 ve X_2 ile olan etkileşimleri de pozitif olduğu için, bu değişkenlerin birlikte artırılması antioksidan kapasiteyi olumlu yönde etkileyebilir. Fakat X_3'ün karesi negatif bir katsayıya sahip olduğundan çok yüksek X_3 değerlerinin TAK_{CUPRAC} seviyesini düşürebileceğini göstermektedir.

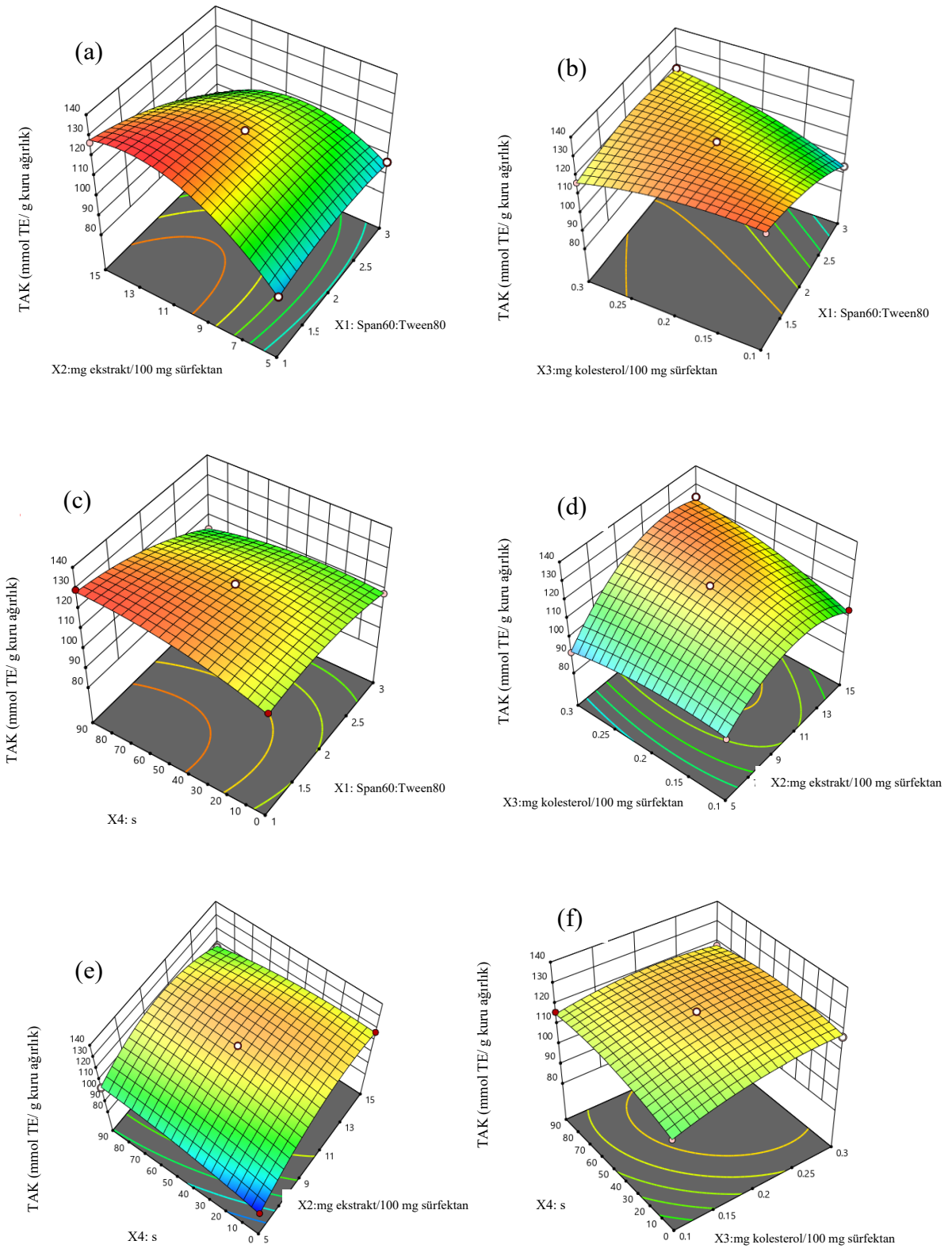
X_4 değişkeni pozitif bir etkiye sahiptir, ancak diğer değişkenlerle olan etkileşimleri farklı etkiler gösterir, örneğin X_4'ün X_1 ve X_2 ile olan etkileşimleri negatif olduğu için, bu değişkenlerle birlikte artışı TAK_{CUPRAC} değerinde düşüşe neden olabilir ve X_4'ün karesi de negatif bir katsayıya sahiptir, bu da X_4'ün aşırı artırılmasının antioksidan kapasite üzerinde olumsuz bir etki yaratabileceğini gösterir. Ultrason süresinin asgari düzeyde tutulması kapsüllerin stabilizasyonu için önem taşımaktadır.

Deney tasarımındaki bağımsız değişkenlerin TAK (Y_3) üzerindeki etkilerinin yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.12'de görülmektedir. Grafik (a)'da düşük ekstrakt miktarının tüm sürfektan oranları için minimum değerler verdiği ve düşük sürfektan oranlarında maksimum ekstrakt değeri TAK değerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Buna göre sürfektan oranı minimumdayken niyozomal veziküllerde ekstrakt miktarının artması antioksidan kapasitedeki artışla sonuçlanmaktadır.

Grafik (b)'de sürfektan molar oranının düşük tutulduğu takdirde düşük miktarda kolesterol ile TAK veriminde artış olduğu görülmektedir. Bu bulgudan, iki bağımsız değişkenin de minimum düzeydeyken niyozomal veziküllerin antioksidan kapasitesinin maksimizasyonu için yeterli seviyeler olduğu çıkarılabilir.

Sürfektan oranının düşük tutulması ile artan ultrason süresi ile TAK miktarının arttığı Grafik (c)'de görülmektedir, artan sürfektan oranı ise verimde azalmaya sebep olmaktadır. Grafik (d)'de düşük ekstrakt miktarında tüm kolesterol oranlarında düşük TAK sonuçları alındığı, artan ekstrakt miktarı ile artan kolesterol miktarı TAK sonuçlarında artışa neden olduğu görülmektedir. Literatürde liyofilizasyon yöntemi ile yapılan enkapsülasyonda kabuk materyali olarak farklı miktarda böğürtlen ekstraktı koyulan bir çalışmada, koyulan ekstrakt miktarının artması ile ölçülen antioksidan kapasite değerlerinin artış gösterdiği rapor edilmiştir (Romero-González et al., 2020).

Grafik (e)'de minimum ekstrakt miktarı ve ultrason uygulanmadığında TAK veriminin minimum düzeyde olduğu görülmüştür, artan ekstrakt miktarı ve ultrason süresi TAK miktarında artışa neden olsa da maksimum değerlerde sonuçlarda azalma olduğu görülmüştür. Grafik (f)'de ultrason uygulanmadığı koşul haricinde belirgin değişimler olmadığı görülmektedir ve bu Eşitlik 4.11'de verilen model eşitlikte bağımsız değişkenlerin ikili etkilerinin katsayıları incelendiğinde ultrason süresi ve kolesterol miktarı (X_3- X_4) etkileşiminin katsayısının diğer ikili etkilere göre daha küçük olması yanıt yüzey grafiğinden de doğrulanmıştır.



Şekil 4.12. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin TAK_N (Y_3) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.4.2.4. Niyozomlarda Renk Analizi

Çizelge B3'te görüldüğü üzere, horozibiği çiçeği ekstraktının renk analizinde kırmızılık değerinin bir ölçüsü olan a* değerleri kaydedilmiştir. Dördüncü yanıt olan renk analizinde ölçülen a* değerleri incelendiğinde bu yanıtın 3.57 ile 14.94 arasında olduğu görülmektedir. a* değerleri genel olarak örnekteki kırmızılık değerini göstermekte olup, niyozom veziküllerinde kullanılan ekstrakt miktarı (X_2) değişkeninin minimum olduğu deney koşullarında yüksek olarak ölçülmüştür. Bu durum daha az miktarda ekstrakt kullanılınca daha konsantre bir kapsül oluşumu olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Renk analizi esnasında ölçülen a* değeri (Y_4) yanıtı için türetilen ikinci dereceden model eşitliği, Eşitlik 4.12 aşağıda görülmektedir.

$$Y_4\,(a^*) = 10.17 + 2.51X_1 - 2.16X_2 - 0.19X_3 - 0.40X_4 + 0.56X_1X_2 + 0.25X_1X_3 - 0.85X_1X_4 + 0.18X_2X_3 + 2.73X_2X_4 + 0.26X_3X_4 - 1.89(X_1)^2 + 0.50(X_2)^2 - 1.25\,(X_3)^2 - 1.00\,(X_4)^2 \quad (4.12)$$

Y_4 değerleri için modele ait R^2 değeri 0.9998 olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e oldukça yakın olması Eş. 4.12'ye göre hesaplanan Y_4 değerleri ile deneysel olarak elde edilen Y_4 değerlerinin birbirlerine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Model eşitliği 4.12 incelendiğinde, X_1 (sürfektan molar oranı) pozitif bir katsayıya sahip olup sürfektan molar oranının artmasının a* rengini, yani kırmızı rengin artmasına neden olduğunu gösterir buna göre sürfektan molar oranındaki artış niyozomal veziküllerin stabilitesinin artmasını sağladığından kapsüllerdeki renk tutulma kapasitesini de arttırabilir. X_2 (ekstrakt miktarı) negatif bir katsayıya sahiptir ve ekstrakt miktarının artması a* değerinin azalmasına, yani kırmızı renginin yoğunluğunun düşmesine neden olduğunu gösterir, ekstrakt miktarındaki artışın enkapsülasyon stabilitesini etkileyen diğer etkenlerle uyumlu seçilmesi gerekir çünkü sürfektan oranı ve kolesterol miktarı veziküllerde taşınabilecek ekstrakt miktarını doğrudan etkiler buna göre de renk yoğunluğu değişebilir.

X_3 (kolesterol miktarı) negatif bir katsayıya sahiptir ve bu da kolesterol miktarının artmasının kırmızı rengin (a*) yoğunluğunu azalttığını gösterir, buna göre yüksek

miktarda kolesterolün niyozomal veziküllerin stabilitesini olumsuz etkileyebileceği ve dolayısıyla renk yoğunluğunun da değişebileceğini gösterir.

X_4 (ultrason süresi) de negatif bir katsayıya sahiptir ve ultrason süresindeki uzama renk maddelerinde bölünmelere ve diğer bileşiklerle daha homojen bir karıştırmaya neden olabileceğinden renk yoğunluğu düşebilir.

İkili etkileşimler incelendiğinde ise X_1X_2 etkileşiminin pozitif katsayısı vardır, bu da sürfektan molar oranı ve ekstrakt miktarı birlikte arttığında kırmızı renk yoğunluğunun arttığını gösterir. Bu etkileşim, sürfektan molar oranı ve ekstrakt miktarının uyumlu olduğu ortamlarda renk yoğunluğunun artırılabileceğini gösterir ve X_1X_3 etkileşiminin pozitif katsayısı sürfektan molar oranı ve kolesterol miktarı birlikte arttığında kırmızı renk yoğunluğunun artabileceğini gösterir. Bunlara karşın, X_1X_4 negatif bir katsayıya sahiptir ve bu da sürfektan molar oranı ve ultrason süresi birlikte arttığında kırmızı renk yoğunluğunun azalmasına neden olduğunu ekstrakt miktarı ve kolesterol miktarının beraber artması durumunda kırmızı renk yoğunluğunun arttığını göstermektedir ve X_2X_4 pozitif bir katsayıya sahiptir, bu da ekstrakt miktarı ve ultrason süresindeki artışının kırmızı renk yoğunluğunu belirgin şekilde artırdığını gösterir. X_3X_4 de pozitif bir katsayıya sahiptir ve kolesterol miktarı ve ultrason süresinin birlikte artmasının kırmızı rengin yoğunluğunu artırdığını gösterir.

Karesel terimler incelediğinde, X_1'in karesi negatif bir katsayıya sahiptir, bu da sürfektan molar oranının çok yüksek olmasının kırmızı renk yoğunluğunu olumsuz etkileyebileceğini, X_2'nin karesi pozitif olup bu da ekstrakt miktarını artırmanın belirli bir noktada kırmızı rengin yoğunluğunu artırabileceğini gösterir. Ayrıca X_3 ve X_4'ün kare terimleri negatif katsayılar taşır, bu da kolesterol miktarı ve ultrason süresinin aşırı artışının kırmızı renk yoğunluğunu azaltacağını göstermektedir.

Bağımsız değişkenlerin renk analizinde ölçülen a değeri üzerindeki etkilerinin görüldüğü yanıt yüzey grafikleri Şekil 4.13'te verilmiştir. Grafik (a) incelendiğinde artan sürfektan oranı düşük ekstrakt miktarı ile maksimum kırmızılık vermiştir burada ekstrakt miktarının düşük olması, çözünürlük ve taşıma kapasitesinin aşılmamasını sağlayarak daha yoğun ve konsantre bir kırmızı renk elde edilmesini sağlayabilir.

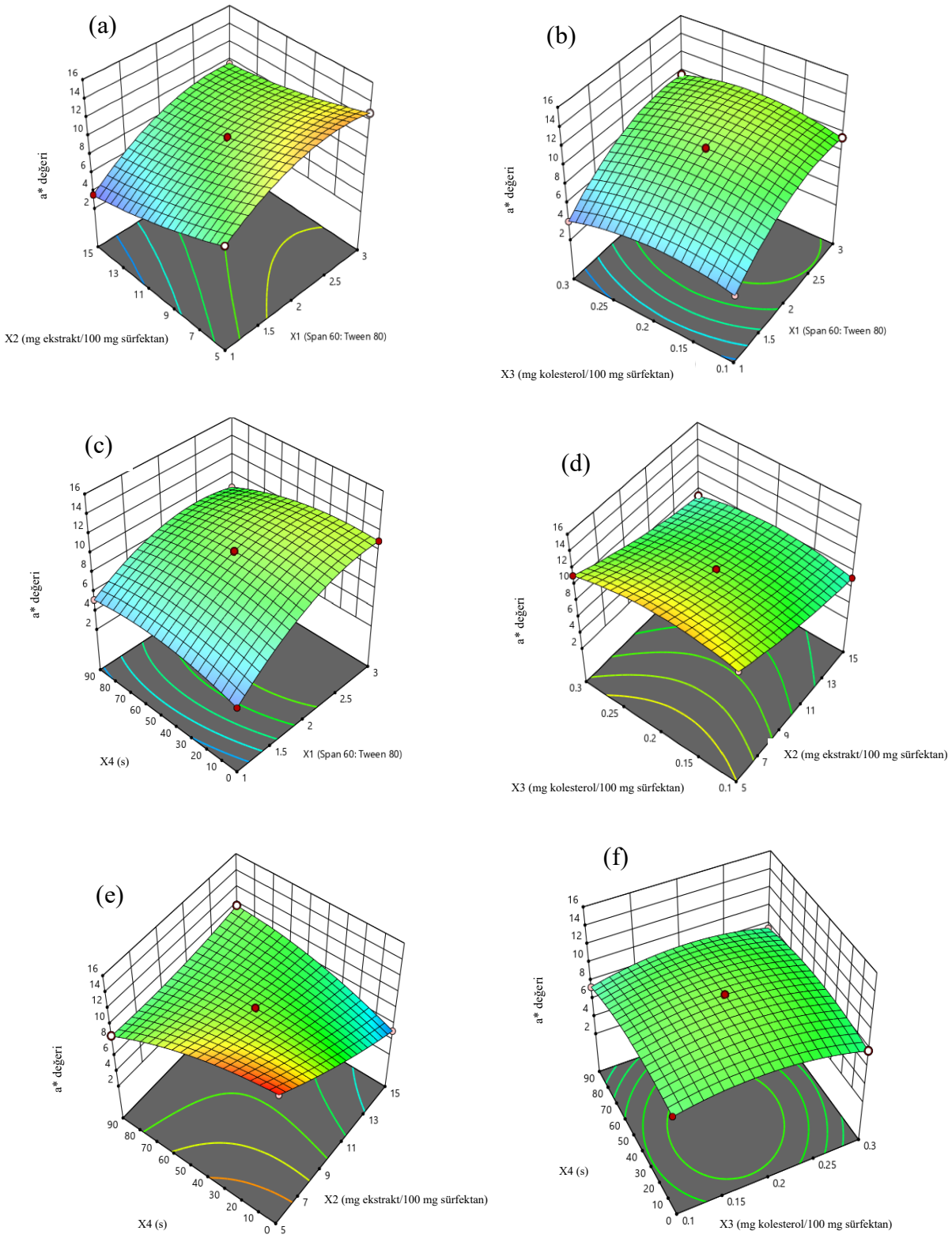
Grafik (b)'de görüldüğü üzere artan sürfektan oranı tüm kolesterol değerlerinde kırmızılığın artmasını sağlamıştır çünkü kolesterol oranının artması, pigmentlerin daha

stabil bir şekilde niyozomal veziküllerde tutulmasını sağlayabilir böylece daha yoğun bir kırmızı renk meydana gelebilir.

Grafik (c)'de artan sürfektan oranı ultrason uygulanmadığında kırmızılık üzerine pozitif etki yapmıştır bu durumu açıklamak için ultrasonun pigmentleri parçalayarak bunların homojenleşmesini sağlarken kırmızı yoğunluğunu azalttığı düşünülebilir.

Grafik (d)'de düşük ekstrakt miktarında tüm kolesterol miktarları için a* değeri daha yüksektir ve ortalama kolesterol değerlerinde daha verimli sonuçlar alınmıştır. Kolesterolün niyozomal veziküllerin stabilizasyonunu arttırması sebebiyle renk yoğunluğunun da daha stabil olduğu söylenebilir.

Grafik (e) düşük ekstrakt miktarı ve ultrason uygulaması olmadığında maksimum kırmızılığı vermektedir. Enkapsülasyonda kullanılan ekstrakt miktarının az olduğu durumlarda kaplama materyali daha konsantre haldeki biyoaktif içeriği kapladığından renk oluşumu daha yoğun kırmızı olarak gözlenmektedir. Bu durumda kırmızı renk yoğunluğu ile doğrudan ilişkili olan a değerinin de artmasına neden olacağı literatürde doğrulanmıştır (Lombardelli et al., 2021). Grafik (f) ultrason süresi ve kolesterolün ikili etkilerinin kırmızılık üzerinde belirgin bir değişime neden olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.13. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin a* değeri (Y_4) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.4.2.5. Enkapsülasyon Verimi (% EE)

Gerçekleştirilen 29 deney sonrasında belirlenen 5 yanıt için bulunan değerlerden son olarak enkapsülasyon verimi (Y_5) değerleri incelendiğinde, % 94.98 ile 97.51 arasında değiştiği görülmektedir. Minimum ve maksimum enkapsülasyon verimi değerlerinin elde edildiği deney koşulları incelendiğinde maksimum değerde ekstrakt miktarının (X_2) minimum olduğu ve kolesterol miktarı (X_3) merkez noktada olduğu belirlenmiştir. Minimum Y_5 değerlerinin bulunduğu koşullarda ise ekstrakt miktarının merkez nokta değerinde olduğu ve kolesterol miktarının maksimum olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her iki koşul için de enkapsülasyonda kullanılan sürfektanların oranı (X_1) ve kapsüllere uygulanan ultrason süresi (X_4) değişkenlerinin enkapsülasyon verimi ile doğrudan ilişkili olduğu bulunmuştur.

Enkapsülasyon optimizasyon çalışmasındaki bağımsız değişkenlerin, son yanıt olan enkapsülasyon verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren; ikinci dereceden model eşitlik, Eş. 4.13'te verilmiştir.

$$Y_5\,(\%\ EE) = 96.19 - 0.23X_2 - 0.24X_3 + 0.21X_4 - 0.16X_1X_2 + 0.71X_1X_3 - 0.11X_1X_4 + 0.42X_2X_3 + 0.22X_3X_4 - 0.16(X_1)^2 + 0.38(X_2)^2 + 0.55(X_4)^2 \quad (4.13)$$

Programdan alınan sonuçlara göre; Y_5 değişkeni için modele ait regresyon katsayısı değeri $R^2 = 0.9751$ olarak belirlenmiştir. R^2 değerinin 1'e yakın olması deneysel olarak elde edilen Y_5 değerleri ile, Eş.4.13 kullanılarak hesaplanan Y_5 değerlerinin birbirine çok yakın olduklarını göstermektedir.

Model eşitliği 4.13 incelendiğinde, X_1(sürfektan molar oranı) değişkeninin önemli derecede etkisi olmadığı ancak $(X_1)^2$ karesinin negatif etkisi olduğu görülür bu sebeple sürfektan molar oranındaki artışın kontrollü olması gerekmektedir, aşırı artış negatif verimle sonuçlanabilir. Diğer bağımsız değişkenlerin (X_2, X_3 ve X_4) lineer etkilerinin önemli olduğu eşitlikte görülmektedir. Ayrıca X_1X_2 ve X_1X_4 de birlikte negatif katsayılara sahiptir ve sürfektan molar oranının ekstrakt miktarı ve ultrason süresi ile birlikte de enkapsülasyon verimi için negatif sonuçlar verebileceği görülmektedir. Buna karşın X_1X_3 pozitif katsayıya sahiptir ve sürfektan molar oranı kolesterol miktarı

ikilisinin verimi arttırma amacıyla birlikte olumlu etkiye sahip olduğu görülmektedir çünkü niyozomal veziküllerin stabilitesi bu iki değişkenin uyumuna bağlıdır.

X_2 (ekstrakt miktarı) negatif katsayıya sahip olup artışı enkapsülasyon veriminde düşüşe sebep olabilir fakat karesi pozitif etkiye sahiptir buradan niyozomal veziküllerin taşıyabileceği oranda ekstrakt eklenmesinin önemli olduğu çıkarılabilir. X_3 (kolesterol miktarı) da negatif katsayıya sahip olup bu durumda kolesterol miktarının artmasının enkapsülasyon verimini düşürebileceğini gösterir. Kolesterol, enkapsülasyon işlemi sırasında taşıma materyalinin durumunu etkileyebilir ve yüksek kolesterol oranı, kapsül yapısının bozulmasına veya kararsız hale gelmesine neden olabilir, bu da verimi olumsuz etkileyebilir.

X_4 (ultrason süresi) pozitif bir etkiye sahip olup ultrason süresi arttıkça enkapsülasyon verimi artar. Ultrason uygulaması sayesinde partikül boyutu homojenizasyonu sağlanır bu da enkapsülasyon verimini artırabilir. Ayrıca bu değişkenin karesi de pozitif etkiye sahiptir.

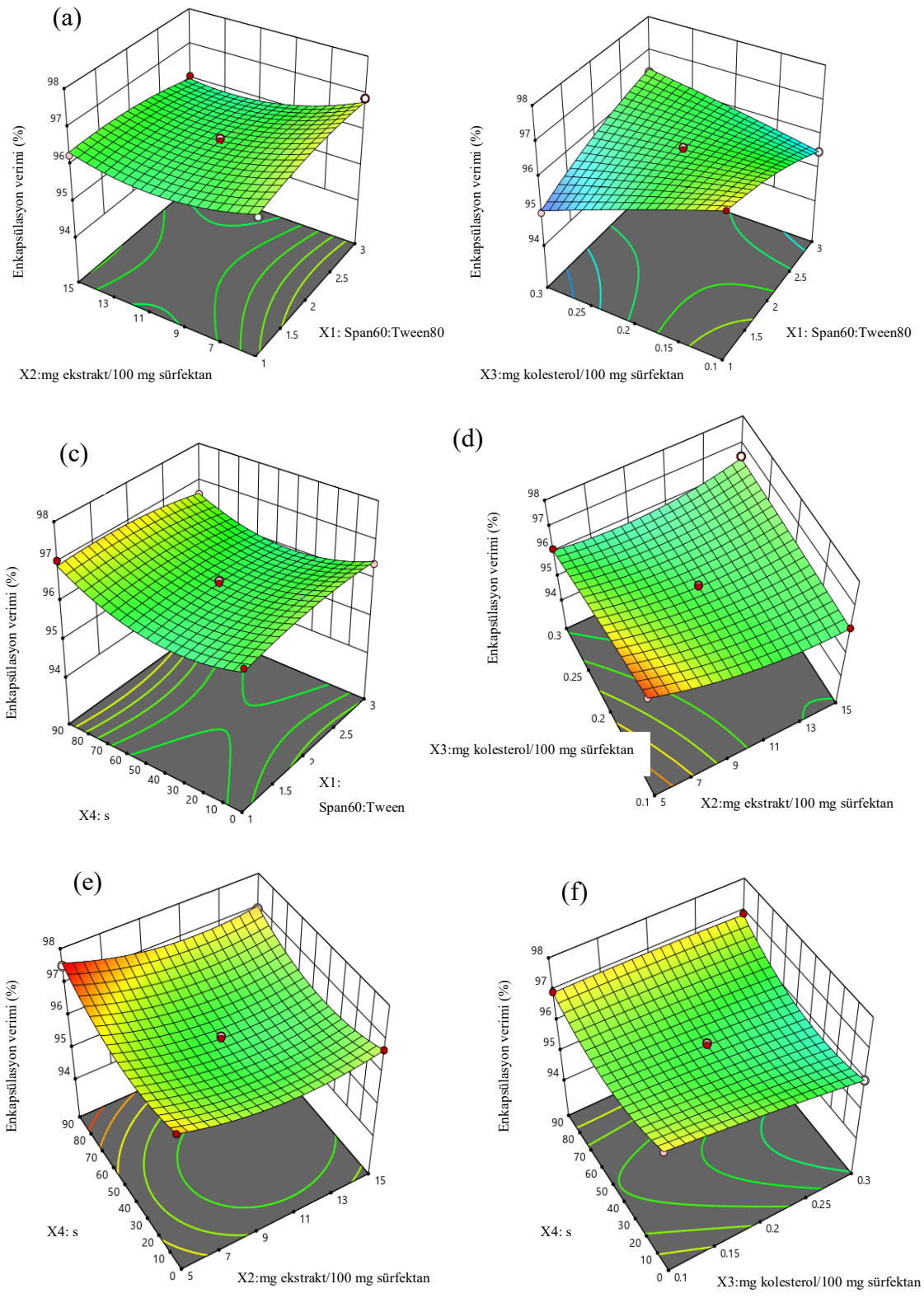
Deney tasarımındaki 4 bağımsız değişkenin ikili kombinasyonların enkapsülasyon verimi (Y_5) üzerindeki etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri, Şekil 4.14'te görülmektedir. Sürfektan oranı ve ekstrakt miktarının ikili etkilerini gösteren grafik (a) incelendiğinde, düşük miktarlarda ekstrakt kullanımı ile tüm sürfektan oranlarında verimin arttığı, fakat genel manada belirgin değişimlerin olmadığı görülmüştür. Bu bulgu, düşük ekstrakt miktarlarının daha verimli bir enkapsülasyon sağlayabileceğini ancak sürfektan oranının, bu etkiyi belirgin şekilde değiştirmediğini ortaya koymaktadır.

Sürfektan oranının kolesterol ile ikili etkilerini göstermekte olan grafik (b) ise iki değişken için de yüksek koşulların verimi azalttığını, düşük sürfektan oranı ve düşük kolesterol miktarının verimi arttırdığı sonucunu vermiştir. Grafik (a)'ya benzer şekilde yine düşük sürfektan molar oranının enkapsülasyon verimi için daha avantajlı olduğu görülür ve düşük sürfektan molar oranı ve yeterli kolesterol oranı niyozomal veziküllerin stabilitesini ve verimini olumlu etkiler.

Grafik (c) sürfektan oranı ve ultrason süresi ikilisinin etkilerini göstermektedir ve artan ultrason süresinin genel anlamda verimi arttırdığını, belirgin olmasa da düşük sürfektan oranının daha verimli sonuçlar verdiğini göstermiştir. Uzun süreli ultrason uygulaması, parçacık boyutunun homojenleşmesini ve küçülmesini sağlar, bu da daha iyi enkapsülasyon sağlayabilir.

Kolesterol ve ekstrakt miktarının ikili etkileşimlerini gösteren Grafik (d) incelendiğinde düşük kolesterol ve düşük ekstrakt miktarlarının verimde artışa neden olduğu görülmüştür. Kolesterolün düşük seviyelerde daha verimli sonuçlara neden olması sadece stabilizasyon için yeterli düzeyde kullanıldığında amacına hizmet ettiğini göstermektedir, ayrıca düşük ekstrakt miktarı da veziküllerin taşıma kapasitenin aşılmaması için önemli olabilir.

Ultrason süresi ve ekstrakt miktarı ikilisinin etkileri grafik (e)'de görülmektedir ve düşük ekstrakt miktarında uzayan ultrason süresinin enkapsülasyon verimini arttırdığı görülmüştür. Ekstrakt miktarının düşük olması, biyoaktif bileşiklerin daha verimli bir şekilde kapsüllenmesine olanak tanıyabilir, ultrason süresindeki artış da veziküllerin homojenizasyonu için önemlidir. Grafik (f) ultrason süresi ve kolesterol miktarının ikili etkisi gösterir, bu grafiğe göre kolesterol miktarındaki artış verimde azalmaya neden olmaktadır ve uzun süreli ultrason uygulaması tüm değerler için verimde artışa neden olmuştur.



Şekil 4.14. Horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlar için bağımsız değişkenlerin enkapsülasyon verimi (Y_5) üzerine etkilerini gösteren yanıt yüzey grafikleri

4.4.2.6. Niyozom Metodu Optimizasyonu

Horozibiği çiçeğinden elde edilen betalain ve fenolik bileşiklerin enkapsülasyonu için yapılan optimizasyon çalışmasında, seçilen bağımsız değişkenlerin her bir bağımlı değişken üzerindeki etkilerini gösteren model eşitliklerin türetilmeleri amacıyla, Design Expert 13 programı kullanılarak, çoklu regresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Anılan eşitliklerin türetilmelerinde, söz konusu program tarafından önerilen; ikinci dereceden bir model eşitlikler türetilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilen her bir modelleme çalışması için yine aynı program kullanılarak varyans analizleri de (ANOVA) yapılmıştır. Her bir yanıt için ANOVA tabloları Ek Çizelge C3-C7'de verilmiştir. Yapılan varyans analizleri sonucunda; oluşturulan modellerin gerçek cevaplara uygunluklarına ise, modelin önemli bulunması ($p<0.05$), uyum eksikliğinin önemsiz ($p>0.05$) olması durumu dikkate alınarak karar verilmiştir. Her bir yanıt için model önemli uyum eksikliği ise önemsiz olarak bulunmuştur.

Optimizasyon uygulaması sırasında, yanıtlar için programda yer alan; istenilen hedefe ulaşma fonksiyonu kullanılmış enkapsülasyon koşulları için program tarafından belirlenen optimum koşullar ve yanıtlar için öngörülen değerler elde edilmiştir. Program tarafından, toplamda 100 farklı çözüm oluşturmuştur.

Verilen çözümler arasından, istenilen hedefe ulaşma fonksiyonunun; 0.913 olduğu ilk çözüm seçilerek verilen koşullarda optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Buna göre vakum niyozom enkapsülasyonu için optimum deney koşulları; X_1=1.00, X_2= 8.109 mg ekstrakt/100 mg sürfektan, X_3= 0.1 mg kolesterol/100 mg sürfektan ve X_4= 81.88 sn olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda deney gerçekleştirildiğinde elde edilen sonuçlar aşağıdaki Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Deneysel olarak elde edilen sonuçlar program çıktısı ile benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4.4. Horozibiği çiçeği enkapsülasyonu için bağımlı değişkenlerin program çıktısından elde edilen teorik değerleri ile deneysel değerleri.

	Deneysel değer	**Teorik değer**
Y_1	3001.845±0.005	3034.25
Y_2	10.667±0016	10.945
Y_3	130.428±0.01	127.464
Y_4	4.803±0.032	4.760
Y_5	96.664±0.005	97.671

Y_1: Toplam betalain miktarı (mg betalain/kg kuru ağırlık)

Y_2: Toplam fenolik madde (mg GAE/g kuru ağırlık)

Y_3: CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasitesi (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Y_4: Renk analizinde ölçülen a değeri

Y_5: Enkapsülasyon verimi (EE%)

4.5. Optimum Koşullardaki Niyozomların Analizleri ve Karakterizasyonu

4.5.1. Niyozomların Isıl Kararlılığı

Niyozom yöntemi ile optimum koşullarda enkapsüle edilmiş örneğin ısıl kararlılığının belirlenmesi için örneklere 70°C'lik su banyosunda 30 dakika boyunca ısıl işlem uygulanmıştır. Yapılan ısıl işlem öncesinde ve sonrasında ölçülen TBM'ye göre horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomların ısıl kararlılığı %97.974 olarak bulunmuştur. Isıl kararlılığın yüksek bulunması optimum enkapsülasyon formülasyonuna katılan kolesterol ile ilişkilidir. Normalde kolloidal yapıdaki nanoveziküler sistemler yüksek sıcaklık koşullarında stabilitesini büyük ölçüde kaybetmektedir. Bu nedenle niyozom formülasyonuna kolesterol gibi bir stabilizatör eklenmesi kaplama materyalinin daha dirençli olması ve kapsülden sızıntı olmasını minimize eden önemli bir kriter olduğu ifade edilmiştir (Nasseri, 2005). KE ve VMDE optimum koşul ekstrakt örneklerinde ise ısıl kararlılık değerleri sırasıyla %67.35 ve %65.73 olarak elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre niyozomal veziküllerin TBM için ekstraktlarda ısıl kararlılığı arttırdığı çıkarılabilir.

4.5.2. Depolama Sürecinde Enkapsülasyon Stabilitesi

Optimum koşullarda hazırlanan horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozom örnekleri karanlık ortamda +4°C'de 30 gün boyunca depolandıktan sonra içeriğinde bulunan TBM miktarı her 5 günde bir ölçülerek betalain stabilitesi hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon stabilitesi 1., 15. ve 30.günlerde sırasıyla; % 100, % 98.84 ve % 98.40 olarak hesaplanmıştır. Stabilitenin depolama sürecinde korunmuş olma sebepleri arasında sürfektan tipi ve kullanılan sürfektanların molar oranı gösterilebilir çünkü stabilite sürfektan tipi ve kullanılan sürfektanların molar oranı ile doğrudan ilişkili olup bu değişkenlerin faz geçiş sıcaklığının arttırması ile arttığı ifade edilmektedir (Junyaprasert et al., 2012).

Literatür bilgileri ve elde edilen deneysel verilere göre horozibiği çiçeğinin betasiyanin içeriği betaksantinden yüksektir (Roriz et al., 2021), VMDE optimum koşullarda elde edilen betasiyanin miktarı (2194.13 mg/kg) betaksantin miktarının (915.79) yaklaşık 2.4 katı olarak bulunmuştur. Niyozomal veziküllerde de bu değerler sırasıyla 2116.22 mg/kg ve 885.63 mg/kg olarak bulunmuştur.

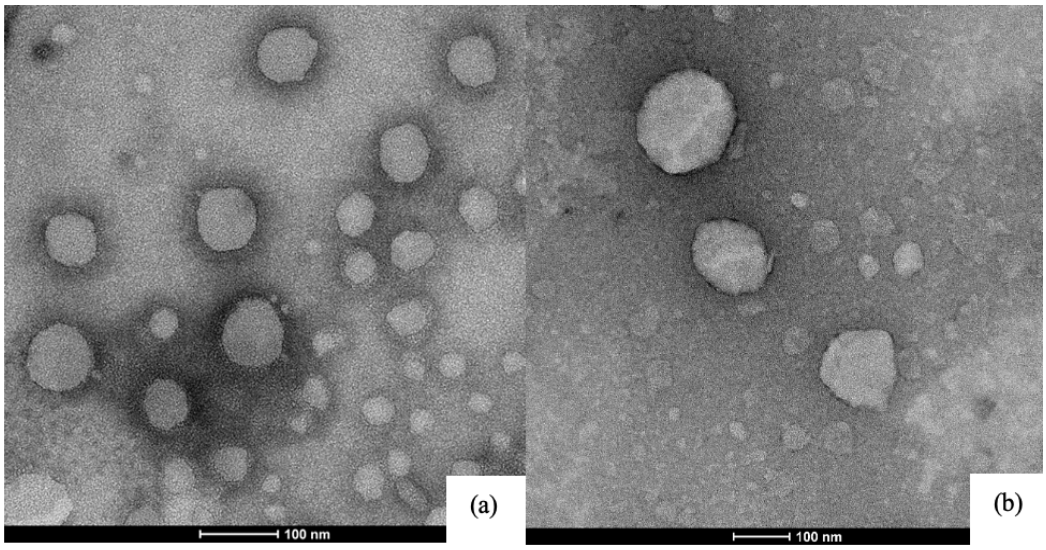
Betaksantinler bozunma hız sabiti, yarı ömür ve aktivasyon enerjisi açısından betasiyaninlere göre daha kararlı bileşiklerdir (Lombardelli et al., 2021. Ayrıca literatürde betasiyaninlerin degradasyonu ile pembe-mor renklerinin turuncu-sarı renkli betalamik aside dönüşebildiği bildirilmiştir . Bu sebeple horozibiği çiçeği ekstraktı yüklü niyozomal veziküllerin depolama sürecinde betasiyanin miktarındaki azalmanın pembe-mor rengin turuncu-sarıya dönebilmesi sebebiyle betalamik asit miktarı artmış ve bu da betaksantin miktarındaki azalışı pozitif yönde etkileyerek nihayetinde toplam betalain miktarında bariz bir azalma gözlenmemesine neden olduğu düşünülebilir (Miguel, 2018).

4.5.3. Transmisyon Elektron Mikroskopu (TEM, Transmission Electron Microscopy)

TEM enkapsülasyon çalışmalarında niyozomların veya diğer enkapsülasyon sistemlerinde morfolojik özelliklerinin incelenmesinde kullanılır ve TEM kullanılarak elde edilen görsellerde elde edilen küresel ve düzgün yüzeyli niyozomların görünmesi enkapsülasyon için kullanılan materyallerin yeterliliği ve veziküllerin stabilitesi hakkında bilgi verir (Winey et al., 2014).

Optimum koşullarda elde edilen horozibiği çiçeği ekstraktı içeren niyozomlarda hem 1. günde hem de +4 ºC'de 30 gün depolama sonucunda elde edilen TEM analizi sonuçları Şekil 4.17'de verilmiştir. Şekil 4.17'de (a) kapsüllerin 1. gün sonuçları iken, Şekil 4.17'de (b) depolama sonrasındaki sonuçları ifade etmektedir. Şekil incelendiğinde, 1. günde kapsüllerin daha yoğun ve sık bir dağılıma sahip olduğu görülmektedir. Bu, kapsüllerin başlangıçta yüksek sayıda ve düzenli bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.

30 günlük depolama sonucunda ise kapsüllerin morfolojisinin büyük ölçüde korunduğu, fakat kapsül dağılımının 1. güne kıyasla biraz daha seyrek olduğu dikkat çeker. TEM görsellerine göre kapsüller hala net bir şekilde gözlemlenebilir durumdadır, ancak zamanla bir miktar azalma veya agregasyon meydana gelmiş olabilir. Hem deneysel sonuçlar hem de TEM analizleri, depolama süresince niyozomların stabilitesinin yüksek olduğunu ve yapısal dayanıklılıklarını büyük ölçüde koruduklarını göstermektedir.

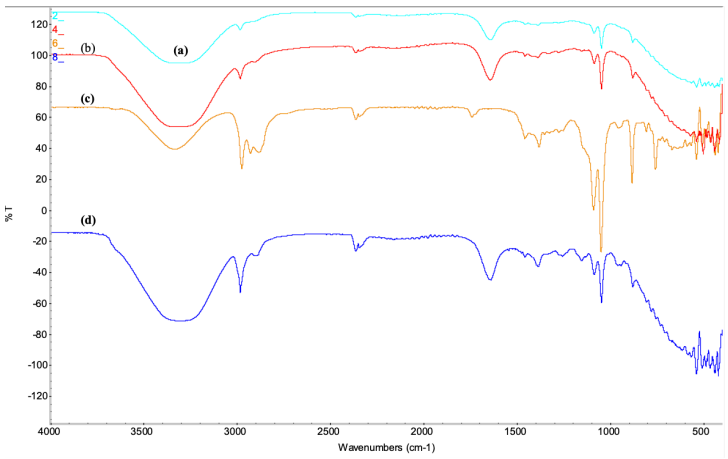


Şekil 4.17. Horozibiği çiçeklerinden optimum koşullarda elde edilen kapsüllerde TEM sonuçları: (a) 1. Gün için 68,000 x büyütme; (b) 30.gün için 49,000 x büyütme

4.5.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FTIR)

Şekil 4.18'de horozibiği çiçeğinden hem vakum mikrodalga ekstraksiyonunun optimum koşulunda elde edilen ekstrakt ile bu ekstraktta kullanılan solvent (%30 etanol), hem de optimum enkapsülasyon koşullarında elde edilen ekstrakt eklenmemiş boş niyozom

vezikülü ve ekstrakt eklenmiş dolu niyozom örneği elde edilen FT-IR spektrumu görülmektedir.



Şekil 4.18. Horozibiği çiçeği için FT-IR spektrumları: (a) ekstrakt eklenmiş kapsül, (b) ekstrakt, (c) boş niyozom vezikülü, (d) ekstraktta kullanılan solvent

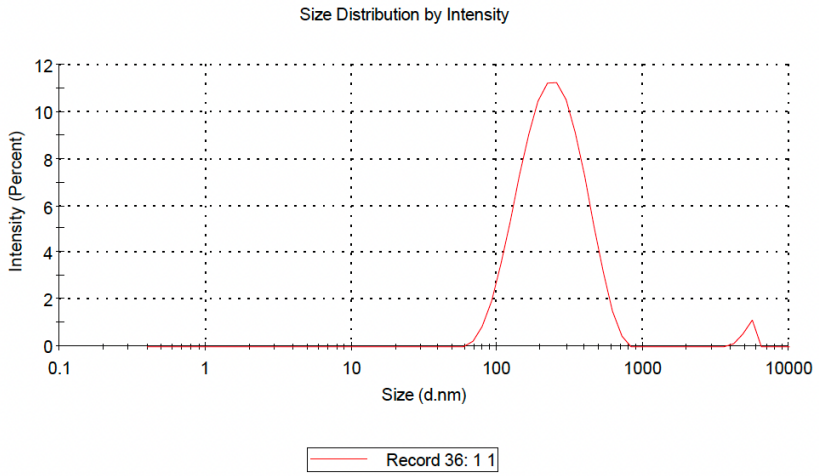
FT-IR spektrumları üzerinde yapılan incelemelerde, niyozom ve ekstrakt örneklerinde (Şekil 4.18 a-b) 876.23 ve 878.25 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler, glikoz titreşim bölgesi ile ilişkilendirilebilir ve glikoz türevlerinin varlığına işaret edebilir (Ramirez-Velasquez et al., 2022). 1042.34 ve 1084.88 cm^{-1}'deki pikler ise C–O gerilme moduna uyum göstererek ekstraktların fenolik bileşik içerdiğini ve sürfektanların bir kısmının alkol veya fenol yapılarından gelebileceğini düşündürmektedir (Kushwaha et al., 2018).

1275.31 cm^{-1} dalga boyundaki pik C–N asimetrik gerilmesiyle ilişkilendirilirken(Ramirez-Velasquez et al., 2022), 1386.73 ve 1457.63 cm^{-1} dalga boylarındaki pikler amin gruplarına işaret ederek azot içeren fonksiyonel grupların ve betalainlerin varlığını desteklemektedir(Kushwaha et al., 2018). Bunun yanı sıra, 1641.98 ve 1644.00 cm^{-1} pikleri, özellikle betalainlerde karakteristik olan azotlu fonksiyonel grupları C=C gerilme modlarını gösterir (Kushwaha et al., 2018).

Boş niyozom vezikül örneklerinde (Şekil 4.18 c) özellikle 400–500 cm^{-1} bandında daha belirgin sonuçlar gözlemlenmiş olup, bu durum, sürfektanlar (Tween 80 ve Span 60) ve kolesterol gibi bileşiklerin yapısal titreşimlerine bağlanabilir. Etanol gibi çözücülerin bu spektral bölgeye etkisi de göz ardı edilmemelidir. Bu veriler, kullanılan yardımcı bileşiklerin niyozom vezikülünün yapısındaki katkısını göstermekte ve ekstraktlarla kıyaslandığında spesifik titreşim farklılıklarını ortaya koymaktadır.

4.5.5. Parçacık Boyutu ve Zeta Potansiyeli

Optimum koşullarda elde edilen biyoaktif ekstraktı yüklenmiş niyozomal veziküller için için parçacık boyutu ve zeta potansiyeli sırasıyla 235.06 nm ve -11.33 mV olarak bulunmuştur. Literatürde niyozomal kapsüller, parçacık boyutlarına göre 3'e ayrılmaktadır: büyük tek katmanlı misel (>100 nm), çok katmanlı veziküller (>50 nm) ve küçük tek katmanlı veziküller (25–50 nm) (Baek et al., 2017). Bu tez çalışmasında yapılan enkapsülasyon optimizasyonu sonucu elde edilen optimum koşuldaki niyozom örnekleri parçacık boyutu analizine göre büyük tek katmanlı misel kategorisine girmektedir (Şekil 19). Yüzey aktif maddelerin yapısındaki daha küçük yapılı hidrofilik grupların varlığı ve alkil zincirlerinin uzunluğundaki artış, daha büyük katmanlı misellerin oluşumuna yol açmıştır (Bayindir et al., 2010).



Şekil 4.19. Parçacık boyutu analiz grafiği

Literatürde parçacık boyutu ve emülsiyon stabilitesinin bir göstergesi olan zeta potansiyeli değerleri kullanılan enkapsülasyonda sürfektan cinsi, sürfektanların molar oranları, kolesterol gibi bir stabilizatör kullanımı ya da ultrason uygulaması gibi değişkenlere bağlı olarak farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca yine literatür kaynaklarında HLB değerinin artması ile, parçacık boyutunun da artacağı ifade edilmektedir (Esmaeili Rad et al., 2022).Bu yönden incelendiğinde optimum enkapsülasyon koşullarında, Span 60'ın Tween 80'e göre daha fazla oranda emülsiyona katılması hem küresel şekilli ve parçacık boyutu daha küçük kapsüller elde edilmesi açısından doğrulanmıştır. Ayrıca kapsüllere uygulanan ultrason ile homojen dağılımlı bir parçacık boyutu profili sağlandığı da ifade edilmiştir (Amoabediny et al., 2018).

Bir dispersiyondaki zeta potansiyelinin büyüklüğü, benzer yükle yüklenmiş parçacıklar arasındaki elektrostatik itmenin derecesini gösterir. Potansiyel küçükse, çekici kuvvetler itmeyi yenebilir ve kolloidal dispersiyon daha stabil yapıdadır (Elmi et al., 2021). Negatif zeta potansiyeline sahip niyozomlar, su içinde iyi bir şekilde dağılabilmekte ve bu sayede stabil kalmaları kolaylaşmaktadır (Bayindir et al., 2010). Elde edilen örneğin zeta potansiyeli sonuçlarına göre bu örnek orta düzeyde stabiliteye sahip olduğu söylenebilir. Literatürdeki benzer bir niyozom enkapsülasyonu çalışmasında parçacık boyutunun 194 nm ve zeta potansiyelinin -20 mV olarak bulunduğu rapor edilmiştir (Murugesan et al., 2022).

5. YORUM

Bu tez çalışmasında, doğal kaynaklı gıda renklendiricilerinden son yıllarda hem içerdiği betalainler sebebiyle potansiyel gıda renklendiricisi olması hem de fenolik bileşiklerce zengin olması ve antioksidan kapasitesinin yüksek olması sebebiyle dikkat çeken kırmızımor renkli horozibiği çiçeği *(Amaranthus caudatus L.)* incelenmiştir.

Horozibiği çiçeklerinde konvansiyonel ekstraksiyon (KE) ve modern ekstraksiyon yöntemlerinden olan vakum mikrodalga-destekli ekstraksiyon (VMDE) yöntemi ile Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak iki yöntemle de 5 merkez noktada 29 adet deney gerçekleştirilmiştir. 4 bağımsız değişken KE için süre(sa), sıcaklık(°C), etanol oranı (%) ve örnek:çözücü oranı (g/mL) iken VMDE için süre(dk), basınç(mmHg), etanol oranı (%) ve örnek:çözücü oranı (g/mL) olarak seçilmiştir. Ekstraktlarda Toplam Fenolik Madde (TFM), Toplam Antioksidan Kapasite (TAK_{DPPH} ve TAK_{CUPRAC}) ve Toplam Betalain Miktarı (TBM) değerleri ölçülmüştür. Deney optimizasyonu Design Expert 13 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

KE ile elde edilen maksimum ve minimum değerler sırasıyla TFM için 14.81 ve 9.19 mg GAE/g kuru ağırlık, TAK_{DPPH} için 109.55 ve 34.08 mmol TE/kg kuru ağırlık, TAK_{CUPRAC} için 167.02 ve 107.53 mmol TE/kg kuru ağırlık; TBM için 2918.67 ve 1554.67 mg betalain/kg kuru madde olarak ölçülmüştür. VMDE sonucunda maksimum ve minimum değerler sırasıyla TFM için 17.04 ve 5.54 mg GAE/g kuru ağırlık, TAK_{DPPH} için 101.42 ve 21.86 mmol TE/kg kuru ağırlık, TAK_{CUPRAC} için 195.39 ve 69.42 mmol TE/kg kuru ağırlık, TBM için 3153.58 ve 993.54 mg betalain/kg kuru madde olarak ölçülmüştür. İşlem görmemiş horozibiği çiçeklerinin TBM, TFM ve TAK_{CUPRAC} değerleri ile kıyaslandığında her yanıt için KE ile kıyaslandığında alınan verimler; %38.26, %53.97, %66.44 ve VMDE ile kıyaslandığında alınan verimler; %44.27, %61.95, %69.79 olarak bulunmuştur.

Optimizasyonların tamamlanmasının ardından optimum ekstraksiyon koşulları KE için 1 sa, 50 °C, %40.99 etanol, 1:10 g/mL; VMDE için 450 mmHg, 12 dk, %30.74 etanol, 1:23.907 g/mL olarak belirlenmiştir. Bu değerler incelendiğinde VMDE'nin KE'ye göre 5 kat daha kısa sürede, daha düşük oranda etanol ile daha verimli sonuçlar verdiği görülmektedir.

Ayrıca optimum koşullardaki ekstraktlarda karakterizasyon amacıyla Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak ekstraksiyon yöntemlerinin horozibiği çiçeğinde hücresel anlamda yarattığı değişiklikler incelenmiştir. KE sonucunda hücre yapısı daha parçalı ve düzensiz görünürken, VMDE sonucunda daha pürüzsüz ve gözenekli yapılar görülmüştür. VMDE deney sonuçlarında da görüldüğü üzere, bu yöntemin hücre yapısından fenolik madde ve renk bileşiklerini açığa çıkarmada daha verimli olduğu söylenebilir.

KE ve VMDE optimum koşullarda elde edilen ekstraktların kompozisyonlarının analizi için Q-TOF LC/MS kullanılmış ve ticari betanin kullanılarak standart eğri oluşturulmuş ve optimum ekstraktların içeriği betanin cinsinden KE için 6393.17 ppm, optimum VMDE için 9256.50 ppm olarak hesaplanmıştır.

Elde edilen doğal renk bileşikleri ve fenolik bileşiklerin çevresel koşullardan olumsuz etkilenmesinin minimize edilebilmesi için, VMDE optimum koşullarda elde edilen ekstraktlar kullanılarak niyozom yöntemiyle enkapsülasyon yapılmıştır. 5 merkez noktada 29 deney yapılmış ve bağımsız değişkenler Sürfektan molar oranı (Span60: Tween 80), Ekstrakt miktarı (mg ekstrakt/ 100 mg sürfektan), kolesterol miktarı (mg kolesterol/ 100 mg sürfektan) ve ultrason süresi (s) olarak seçilmiştir. Niyozom içeren süspansiyonlardan alınan yanıtlar minimum ve maksimum olacak şekilde, enkapsülasyon verimi (EE%) 94.984 ve 97.513, TFM 7.51 ve 12.623 mg GAE/g kuru madde, TAK_{CUPRAC} 86.423 ve 129.526 mmol TE/kg kuru madde, kırmızı renk değeri (a*) 3.578 ve 14.942 ve TBM 2970.17 ve 3029.56 mg/kg kuru ağırlık. Optimum koşullar 0.913 uyum oranıyla Design Expert 13 tarafından şöyle belirlenmiştir; 1:1 sürfektan molar oranı (Span60: Tween 80), 8.109 mg ekstrakt/ 100 mg sürfektan, 0.1 mg kolesterol/ 100 mg sürfektan, 81.877s (ultrason süresi). Ayrıca optimum koşuldaki niyozom süspansiyonunda ısıl karalılık, 30 günlük depolama sonucu stabilite, TEM, FT-IR, parçacık boyutu ve zeta potansiyeli analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Niyozomların 70°C'deki ısıl kararlılığı TBM üzerinden %97.974 olarak bulunmuştur ve bu değer KE ve VMDE optimum koşul ekstraktlarının sırasıyla ısıl kararlılık değerleri olan %67.35 ve %65.73'ün enkapsülasyon sayesinde yükseltilebileceğini göstermiştir. Ayrıca bu değerin yüksek olmasının stabilizasyonun artışında önemli rolü olan kolesterol varlığından kaynaklandığı söylenebilir. Kapsüllerin depolama süresince 1,15 ve 30.günlerde TBM üzerinden degradasyonu incelenmiş ve sırasıyla %100, %98.84 ve %98.40 olarak bulunmuştur.

Niyozomların, 1.gün ve 30.gündeki karakterizasyonu için Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılmış ve kapsüllerde bariz şekilsel değişimlerinin görülmemesi sonucunda stabilitenin yüksek olduğu yorumu hem deneysel sonuçlara hem de TEM analizine göre yapılabilir. Niyozom yöntemi ile enkapsülasyonun horozibiği çiçeği için stabilizasyonu önemli ölçüde arttıran bir yöntem olduğu, potansiyel bir gıda renklendiricisi olarak kullanımının mümkün olduğu söylenebilir.

Literatürde horozibiği çiçeği ile ultrason destekli ekstraksiyon çalışması mevcuttur fakat Türkiye'de yetiştirilen horozibiği çiçeğinin betalain ve biyoaktif bileşiklerinin VMDE ile ekstraksiyonu ve niyozom metodu ile enkapsülasyonunu içeren başka bir çalışma bulunmamaktadır. Bu sebeple de bu tez çalışması horozibiği çiçeği, doğal gıda renklendiricilerinin yeni nesil ekstraksiyon yöntemlerinin gelenekselle kıyaslanması ve niyozom metodu ile enkapsülasyon çalışması ile literatürdeki boşluğu doldurmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Abeyrathne, E. D. N. S., Nam, K., Huang, X., & Ahn, D. U. (2022). Plant-and Animal-Based Antioxidants' Structure, Efficacy, Mechanisms, and Applications: A Review. In *Antioxidants* (Vol. 11, Issue 5). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox11051025

Ajeeshkumar, K. K., Aneesh, P. A., Raju, N., Suseela, M., Ravishankar, C. N., & Benjakul, S. (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. In *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* (Vol. 20, Issue 2, pp. 1280–1306). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725

Akdeniz, B. (2017). *Evaluation of Different Coating Materials for Encapsulation of Phenolic Compounds Extracted from Onion (Allium Cepa) Skin*. Middle East Technical University.

Akdeniz, B., Sumnu, G., & Sahin, S. (2018). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from onion (Allium cepa) skin. *Journal of Food Processing and Preservation*, *42*(7). https://doi.org/10.1111/jfpp.13648

Akdeniz, N. S., & Yolaçaner, E. T. (2025). Screening of the process parameters for vacuum microwave-assisted extraction of bioactive compounds from amaranth flowers. *Food and Health*, *11*(1), 57–66. https://doi.org/10.3153/FH25005

Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. In *Current Research in Food Science* (Vol. 4, pp. 200–214). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011

Albuquerque, B. R., Heleno, S. A. 8., Oliveira, M. B. P. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. In *Food and Function* (Vol. 12, Issue 1, pp. 14–29). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/d0fo02324h

Ali, S. S., Ahsan, H., Zia, M. K., Siddiqui, T., & Khan, F. H. (2020). Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. In *Journal of Food Biochemistry* (Vol. 44, Issue 3). Blackwell Publishing Ltd. https://doi.org/10.1111/jfbc.13145

Ameer, K., Shahbaz, H. M., & Kwon, J. H. (2017). Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review. In

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety (Vol. 16, Issue 2, pp. 295–315). Blackwell Publishing Inc. https://doi.org/10.1111/1541-4337.12253

Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, *256*, 156–162. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.114

Amoabediny, G., Haghiralsadat, F., Naderinezhad, S., Helder, M. N., Akhoundi Kharanaghi, E., Mohammadnejad Arough, J., & Zandieh-Doulabi, B. (2018). Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, *67*(6), 383–400. https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1332623

Anonim. (2009). AACC Technical methods (44-15.02) Moisture Air Oven Methods. In *AACC International Approved Methods*. AACC International. https://doi.org/10.1094/aaccintmethod-44-15.02

Asaithambi, K., Muthukumar, J., Chandrasekaran, R., Ekambaram, N., & Roopan, M. (2020). Synthesis and characterization of turmeric oil loaded non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and its enhanced larvicidal activity against mosquito vectors. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *29*. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101737

Ateş, M. (2018). *Nanoparçacıkların Ölçme ve İnceleme Teknikleri*. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/608610

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, *117*(4), 426–436. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014

Baek, J. S., Yeo, E. W., Lee, Y. H., Tan, N. S., & Loo, S. C. J. (2017). Controlled-release nanoencapsulating microcapsules to combat inflammatory diseases. *Drug Design, Development and Therapy*, *11*, 1707–1717. https://doi.org/10.2147/DDDT.S133344

Baş, D., & Boyacı, I. H. (2007). Modeling and optimization i: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, *78*(3), 836–845. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024

Bayindir, Z. S., & Yuksel, N. (2010). Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*(4), 2049–2060. https://doi.org/10.1002/jps.21944

Bhagya Raj, G. V. S., & Dash, K. K. (2020). Ultrasound-assisted extraction of phytocompounds from dragon fruit peel: Optimization, kinetics and thermodynamic studies. *Ultrasonics Sonochemistry*, *68*. https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105180

Bhardwaj, P., Tripathi, P., Gupta, R., & Pandey, S. (2020). Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 56). Editions de Sante. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581

Bitwell, C., Indra, S. Sen, Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. In *Scientific African* (Vol. 19). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585

Calva-Estrada, S. J., Jiménez-Fernández, M., & Lugo-Cervantes, E. (2022). Betalains and their applications in food: The current state of processing, stability and future opportunities in the industry. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, *4*. https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100089

Cardoso-Ugarte, G. A., Sosa-Morales, M. E., Ballard, T., Liceaga, A., & San Martín-González, M. F. (2014). Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (Beta vulgaris). *Lwt*, *59*(1), 276–282. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.025

Carreón-Hidalgo, J. P., Franco-Vásquez, D. C., Gómez-Linton, D. R., & Pérez-Flores, L. J. (2022). Betalain plant sources, biosynthesis, extraction, stability enhancement methods, bioactivity, and applications. In *Food Research International* (Vol. 151). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110821

Castellanos-Santiago, E., & Yahia, E. M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruits of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance

liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5758–5764. https://doi.org/10.1021/jf800362t

Castro Coelho, S., Nogueiro Estevinho, B., & Rocha, F. (2021). Encapsulation in food industry with emerging electrohydrodynamic techniques: Electrospinning and electrospraying – A review. In *Food Chemistry* (Vol. 339). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127850

Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: From plants to foods. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 11, Issues 2–3, pp. 153–177). https://doi.org/10.1007/s11101-012-9242-8

Corke, H., Cai, Y. Z., & Wu, H. X. (2016). Amaranth: Overview. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00032-9

Coy-Barrera, E. (2020). Analysis of betalains (betacyanins and betaxanthins). *Recent Advances in Natural Products Analysis*, 593–619. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00017-2

Desai, M., Parikh, J., & Parikh, P. A. (2010). Extraction of natural products using microwaves as a heat source. *Separation and Purification Reviews*, *39*(1–2), 1–32. https://doi.org/10.1080/15422111003662320

Dobroslavić, E., Elez Garofulić, I., Šeparović, J., Zorić, Z., Pedisić, S., & Dragović-Uzelac, V. (2022). Pressurized Liquid Extraction as a Novel Technique for the Isolation of Laurus nobilis L. Leaf Polyphenols. *Molecules*, *27*(16). https://doi.org/10.3390/molecules27165099

Doğan, E. (2015). *Increasing the total antioxidant capacity bound to insoluble dietary fiber*. Hacettepe University.

E. Akin-Idowu, P., A. Odunola, O., A. Gbadegesin, M., T. Ademoyegun, O., O. Aduloju, A., & O. Olagunju, Y. (2017). Nutritional evaluation of Five Species of Grain Amaranth – An Underutilized Crop. *International Journal of Sciences*, *3*(01), 18–27. https://doi.org/10.18483/ijsci.1131

Echegaray, N., Guzel, N., Kumar, M., Guzel, M., Hassoun, A., & Lorenzo, J. M. (2023). Recent advancements in natural colorants and their application as coloring in food

and in intelligent food packaging. *Food Chemistry*, *404*(PA), 134453. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134453

Elmi, N., Ghanbarzadeh, B., Ayaseh, A., Sahraee, S., Heshmati, M. K., Hoseini, M., & Pezeshki, A. (2021). Physical properties and stability of quercetin loaded niosomes: Stabilizing effects of phytosterol and polyethylene glycol in orange juice model. *Journal of Food Engineering*, *296*(December 2020), 110463. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110463

Esmaeili Rad, M., Egil, A. C., Ozaydin Ince, G., Yuce, M., & Zarrabi, A. (2022). Optimization of curcumin loaded niosomes for drug delivery applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *654*. https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129921

Filip, S., Pavlić, B., Vidović, S., Vladić, J., & Zeković, Z. (2017). Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Ocimum basilicum by Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*, *10*(7), 2270–2280. https://doi.org/10.1007/s12161-017-0792-7

Gadapa, S., Battula, S. N., Mor, S., Pushpadass, H. A., Naik, L. N., & Emerald, M. E. (2022). Green tea catechin loaded niosomes: formulation and their characterization for food fortification. *Journal of Food Science and Technology*, *59*(9), 3669–3682. https://doi.org/10.1007/s13197-022-05384-6

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., & García-Carmona, F. (2009). The role of phenolic hydroxy groups in the free radical scavenging activity of betalains. *Journal of Natural Products*, *72*(6), 1142–1146. https://doi.org/10.1021/np900131r

Ge, X., Wei, M., He, S., & Yuan, W. E. (2019). Advances of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) and their application in drug delivery. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 2). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020055

Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: Natural plant pigments with potential application in functional foods. *Lwt*, *64*(2), 645–649. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.052

Gorjian, H., Raftani Amiri, Z., Mohammadzadeh Milani, J., & Ghaffari Khaligh, N. (2021). Preparation and characterization of the encapsulated myrtle extract nanoliposome and nanoniosome without using cholesterol and toxic organic

solvents: A comparative study. *Food Chemistry*, *342*(October 2020), 128342. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128342

Grgić, J., Šelo, G., Planinić, M., Tišma, M., & Bucić-Kojić, A. (2020). Role of the encapsulation in bioavailability of phenolic compounds. *Antioxidants*, *9*(10), 1–36. https://doi.org/10.3390/antiox9100923

Gu, H., Chen, F., Zhang, Q., & Zang, J. (2016). Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from Sorbus tianschanica leaves. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1014*, 45–55. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.01.045

Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In *Archives of Toxicology* (Vol. 94, Issue 3, pp. 651–715). Springer. https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3

Gutiérrez, G., Matos, M., Barrero, P., Pando, D., Iglesias, O., & Pazos, C. (2016). Iron-entrapped niosomes and their potential application for yogurt fortification. *LWT*, *74*, 550–556. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.025

Heidari, F., Akbarzadeh, I., Nourouzian, D., Mirzaie, A., & Bakhshandeh, H. (2020). Optimization and characterization of tannic acid loaded niosomes for enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. *Advanced Powder Technology*, *31*(12), 4768–4781. https://doi.org/10.1016/j.apt.2020.11.008

Herbach, K. M., Stintzing, F. C., & Carle, R. (2006). Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects. In *Journal of Food Science* (Vol. 71, Issue 4). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00022.x

Hurma, Y. (2024). *Kanser tedavisinde silimarin yüklü niyozomların in vitro etkinliği*. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi.

Javani, R., Hashemi, F. S., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2021). Quercetin-loaded niosomal nanoparticles prepared by the thin-layer hydration method: Formulation development, colloidal stability, and structural properties. *Lwt*, *141*(January), 110865. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110865

Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus

peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(11), 3389–3393. https://doi.org/10.1021/jf049899k

Jimoh, M. O., Afolayan, A. J., & Lewu, F. B. (2019). Antioxidant and phytochemical activities of Amaranthus caudatus L. harvested from different soils at various growth stages. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-49276-w

Juániz, I., Ludwig, I. A., Huarte, E., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., Cid, C., & De Peña, M. P. (2016). Influence of heat treatment on antioxidant capacity and (poly)phenolic compounds of selected vegetables. *Food Chemistry*, *197*, 466–473. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.139

Karamać, M., Gai, F., Longato, E., Meineri, G., Janiak, M. A., Amarowicz, R., & Peiretti, P. G. (2019). Antioxidant activity and phenolic composition of amaranth (Amaranthus caudatus) during plant growth. *Antioxidants*, *8*(6). https://doi.org/10.3390/antiox8060173

Khan, M. I. (2016). Stabilization of betalains: A review. In *Food Chemistry* (Vol. 197, pp. 1280–1285). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.043

Khan, S. U., Khan, S. U., Alissa, M., Kamreen, H., Khan, W. U., Alghamdi, S. A., A.Al-Shahari, E., Albakri, G. S., Abouzied, A. S., & Khan, D. (2025). Comparative analysis of polyphenol contents in green tea infusions extracted by conventional and modern extraction techniques and optimization of the ultrasonic-assisted extraction parameters by response surface methodology. *Microchemical Journal*, *208*. https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112380

Krishna, S. A., & Ruth, J. C. (2023). Aspirin Loaded Niosomes A Novel Drug Delivery System by Ether Injection Method. *Nanomedicine & Nanotechnology Open Access*, *8*(3), 1–5. https://doi.org/10.23880/nnoa-16000237

Kuşdemir, B. C. (2021). *Multifonksiyonel Teranöstik Ajan Olarak Likopen'in Niyozomlarla Nanoenkapsülasyonu Ve Kanser Hücreleri Üzerindeki Antitümör Aktivitesinin Belirlenmesi*. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi.

Kushwaha, R., Kumar, V., Vyas, G., & Kaur, J. (2018). Optimization of Different Variable for Eco-friendly Extraction of Betalains and Phytochemicals from Beetroot Pomace. *Waste and Biomass Valorization*, *9*(9), 1485–1494. https://doi.org/10.1007/s12649-017-9953-6

Li, H., Deng, Z., Liu, R., Zhu, H., Draves, J., Marcone, M., Sun, Y., & Tsao, R. (2015). Characterization of phenolics, betacyanins and antioxidant activities of the seed, leaf, sprout, flower and stalk extracts of three Amaranthus species. *Journal of Food Composition and Analysis*, *37*, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.09.003

Liang, X. L., Wang, X. L., Li, Z., Hao, Q. H., & Wang, S. Y. (2010). Improved in vitro assays of superoxide anion and 1,1-diphenyl- 2-picrylhydrazyl (dpph) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(22), 11548–11552. https://doi.org/10.1021/jf102372t

Lombardelli, C., Benucci, I., Mazzocchi, C., & Esti, M. (2021). Betalain Extracts from Beetroot as Food Colorants: Effect of Temperature and UV-Light on Storability. *Plant Foods for Human Nutrition*, *76*(3), 347–353. https://doi.org/10.1007/s11130-021-00915-6

López-Salazar, H., Camacho-Díaz, B. H., Arenas Ocampo, M. L., & Jiménez-Aparicio, A. R. (2023). Microwave-assisted Extraction of Functional Compounds from Plants: A Review. *BioResources*, *18*(3), 6614–6638. https://doi.org/10.15376/biores.18.3.Lopez-Salazar

Lu, W., Shi, Y., Wang, R., Su, D., Tang, M., Liu, Y., & Li, Z. (2021). Antioxidant activity and healthy benefits of natural pigments in fruits: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9). https://doi.org/10.3390/ijms22094945

Martinez-Lopez, A., Millan-Linares, M. C., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., & Montserrat-de la Paz, S. (2020). Nutraceutical value of kiwicha (Amaranthus caudatus L.). In *Journal of Functional Foods* (Vol. 65). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103735

Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Coloring attributes of betalains: A key emphasis on stability and future applications. In *Food and Function* (Vol. 8, Issue 4, pp. 1357–1372). Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c7fo00144d

Masjedi, M., & Montahaei, T. (2021). An illustrated review on nonionic surfactant vesicles (niosomes) as an approach in modern drug delivery: Fabrication, characterization, pharmaceutical, and cosmetic applications. In *Journal of Drug*

Delivery Science and Technology (Vol. 61). Editions de Sante. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102234

Matos, M., Pando, D., & Gutiérrez, G. (2019). Nanoencapsulation of food ingredients by niosomes. In *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes: Volume 2 in the Nanoencapsulation in the Food Industry series* (pp. 447–481). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815673-5.00011-8

Mawazi, S. M., Ge, Y., & Widodo, R. T. (2025). Niosome Preparation Techniques and Structure—An Illustrated Review. In *Pharmaceutics* (Vol. 17, Issue 1). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17010067

Mérida-López, J., Pérez, S. J., Bergenståhl, B., Purhagen, J., & Rojas, C. C. (2023). Nutritional Composition of Six Amaranth (Amaranthus caudatus) Andean Varieties. *Crops*, *3*(1), 78–87. https://doi.org/10.3390/crops3010008

Miguel, M. G. (2018). Betalains in some species of the amaranthaceae family: A review. In *Antioxidants* (Vol. 7, Issue 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/antiox7040053

Murugesan, N., Damodaran, C., & Krishnamoorthy, S. (2022). Niosomal formulation of Quercetin and Resveratrol and in-vitro release studies. In *J. Integr. Sci. Technol* (Vol. 2022, Issue 2). Article. http://pubs.iscience.in/jist

Nabi, B. G., Mukhtar, K., Ahmed, W., Manzoor, M. F., Ranjha, M. M. A. N., Kieliszek, M., Bhat, Z. F., & Aadil, R. M. (2023). Natural pigments: Anthocyanins, carotenoids, chlorophylls, and betalains as colorants in food products. In *Food Bioscience* (Vol. 52). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102403

Nadzir, M. M., Fen, T. W., Mohamed, A. R., & Hisham, S. F. (2017). Size and stability of curcumin niosomes from combinations of tween 80 and span 80. *Sains Malaysiana*, *46*(12), 2455–2460. https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4612-22

Naghdi, S., Rezaei, M., & Abdollahi, M. (2021). A starch-based pH-sensing and ammonia detector film containing betacyanin of paperflower for application in intelligent packaging of fish. *International Journal of Biological Macromolecules*, *191*, 161–170. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.045

Onyango, C. M., Shibairo, S. I., Imungi, J. K., & Harbinson, J. (2008). The physico-chemical characteristics and some nutritional values of vegetable amaranth sold in

Nairobi-Kenya. *Ecology of Food and Nutrition*, *47*(4), 382–398. https://doi.org/10.1080/03670240802003926

Osorio-Tobón, J. F. (2020). Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. In *Journal of Food Science and Technology* (Vol. 57, Issue 12, pp. 4299–4315). Springer. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04433-2

Peter, K., & Gandhi, P. (2017). Rediscovering the therapeutic potential of Amaranthus species : A review. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, *4*(3), 196–205. https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2017.05.001

Petrotos, K., Giavasis, I., Gerasopoulos, K., Mitsagga, C., Papaioannou, C., & Gkoutsidis, P. (2021). Optimization of the vacuum microwave assisted extraction of the natural polyphenols and flavonoids from the raw solid waste of the pomegranate juice producing industry at industrial scale. *Molecules*, *26*(4). https://doi.org/10.3390/molecules26041033

Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 97, pp. 55–74). Elsevier Masson SAS. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040

Prajapati, R. A., & Jadeja, G. C. (2022). Natural food colorants: Extraction and stability study. *Materials Today: Proceedings*, *57*, 2381–2395. https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.12.151

Prakash Maran, J., Manikandan, S., & Mekala, V. (2013). Modeling and optimization of betalain extraction from Opuntia ficus-indica using Box-Behnken design with desirability function. *Industrial Crops and Products*, *49*, 304–311. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.012

Rahman, M. M., Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlafi, M. A., Alghamdi, S. Q., Alruwaili, A. S., Hossain, M. S., Ahmed, M., Das, R., Emran, T. Bin, & Uddin, M. S. (2022). Role of phenolic compounds in human disease: Current knowledge and future prospects. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 1). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules27010233

Ramirez-Velasquez, I. M., Velez, E., Bedoya-Calle, A., & Caro-Lopera, F. J. (2022). Mechanism of Antioxidant Activity of Betanin, Betanidin and Respective C15-

Epimers via Shape Theory, Molecular Dynamics, Density Functional Theory and Infrared Spectroscopy. *Molecules*, *27*(6). https://doi.org/10.3390/molecules27062003

Rezagholizade-shirvan, A., Soltani, M., Shokri, S., Radfar, R., Arab, M., & Shamloo, E. (2024). Bioactive compound encapsulation: Characteristics, applications in food systems, and implications for human health. In *Food Chemistry: X* (Vol. 24). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101953

Rezvankhah, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2020). Encapsulation and delivery of bioactive compounds using spray and freeze-drying techniques: A review. *Drying Technology*, *38*(1–2), 235–258. https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1653906

Riccardi, D., Baldino, L., & Reverchon, E. (2024). Liposomes, transfersomes and niosomes: production methods and their applications in the vaccinal field. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05160-4

Rodríguez-Mena, A., Ochoa-Martínez, L. A., González- Herrera, S. M., Rutiaga-Quiñones, O. M., & Morales-Castro, J. (2021). Degradation kinetics and thermodynamic analysis of betalains on microencapsulated beetroot juice using maltodextrin and sweet potato starch. In *Scientia Agropecuaria* (Vol. 12, Issue 3, pp. 311–317). Universidad Nacional de Trujillo. https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.034

Romero-González, J., Shun Ah-Hen, K., Lemus-Mondaca, R., & Muñoz-Fariña, O. (2020). Total phenolics, anthocyanin profile and antioxidant activity of maqui, Aristotelia chilensis (Mol.) Stuntz, berries extract in freeze-dried polysaccharides microcapsules. *Food Chemistry*, *313*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126115

Roriz, C. L., Alves, M. J., Patricia, M., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2018). Amaranthus caudatus L. as a source of betacyanins with coloring and antimicrobial properties. *UNIFOOD Conference, Belgrade Octobre 5-6 2018*.

Roriz, C. L., Xavier, V., Heleno, S. A., Pinela, J., Dias, M. I., Calhelha, R. C., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R., & Barros, L. (2021). Chemical and bioactive features of amaranthus caudatus l. Flowers and optimized ultrasound-assisted extraction of betalains. *Foods*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/foods10040779

Routray, W., & Orsat, V. (2014). MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods. *Industrial Crops and Products*, *58*, 36–45. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.03.038

Ruth, O. N., Unathi, K., Nomali, N., & Chinsamy, M. (2021). Underutilization versus nutritional-nutraceutical potential of the amaranthus food plant: A mini-review. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 15). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/app11156879

Sadowska-Bartosz, I., & Bartosz, G. (2021). Biological properties and applications of betalains. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 9). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules26092520

Saubhik Das. (2016). *Amaranthus: A Promising Crop of Future*. https://doi.org/10.1007/978-981-10-1469-7

Sharma, A., Mazumdar, B., & Keshav, A. (2023). Valorization of unsalable Amaranthus tricolour leaves by microwave-assisted extraction of betacyanin and betaxanthin. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *13*(2), 1251–1267. https://doi.org/10.1007/s13399-020-01267-y

Sharma, R., Singh, D. J., D.N., P., Sahil, K., & Anchal, P. (2019). Formulation and Evaluation of Clindamycin phosphate Niosomes by using Reverse Phase Evaporation Method. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, *9*(3-S), 515–523. https://doi.org/10.22270/jddt.v9i3-s.2895

Sigurdson, G. T., Tang, P., & Giusti, M. M. (2017). Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. In *Annual Review of Food Science and Technology* (Vol. 8, pp. 261–280). Annual Reviews Inc. https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923

Sridhar, A., Vaishampayan, V., Senthil Kumar, P., Ponnuchamy, M., & Kapoor, A. (2022). Extraction techniques in food industry: Insights into process parameters and their optimization. *Food and Chemical Toxicology*, *166*. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113207

Stevanović, A., Bošković, J., Zečević, V., Pešić, V., Ćosić, M., Todosijević, L. Š., Burić, M., & Popović, V. (2023). Variability and heritability of technological

characteristics of Amaranthus leaves and seeds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *51*(2). https://doi.org/10.15835/nbha51213128

Stintzing, F. C., & Carle, R. (2007). Betalains - emerging prospects for food scientists. *Trends in Food Science and Technology*, *18*(10), 514–525. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.04.012

Stintzing, F. C., Schieber, A., Carle, R., Stintzing, F. C., Schieber, A., & Carle, R. (2001). Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. In *Eur Food Res Technol* (Vol. 212). Springer-Verlag.

Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, *62*(3), 247–269. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00564-2

Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic Potential of Phenolic Compounds in Medicinal Plants—Natural Health Products for Human Health. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 4). MDPI. https://doi.org/10.3390/molecules28041845

Thabet, Y., Elsabahy, M., & Eissa, N. G. (2022). Methods for preparation of niosomes: A focus on thin-film hydration method. *Methods*, *199*, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.05.004

Tomasi, I. T., Santos, S. C. R., Boaventura, R. A. R., & Botelho, C. M. S. (2023). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from chestnut processing waste using response surface methodology. *Journal of Cleaner Production*, *395*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136452

Tufan, A. N., Çelik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method. *Talanta*, *108*, 136–142. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.02.061

Tyagi, R., Waheed, A., Kumar, N., Mujeeb, M., Naved, T., Rashid Khan, M., Alhosaini, K., Alqarni, Y. A., Rahat, R., Alam, P., & Madan, S. (2023). In-vitro and ex-vivo antidiabetic, and antioxidant activities of Box-Behnken design optimized Solanum xanthocarpum extract loaded niosomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *31*(10). https://doi.org/10.1016/j.jsps.2023.101785

Týskiewicz, K., Konkol, M., & Rój, E. (2018). The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. In

Molecules (Vol. 23, Issue 10). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules23102625

Ugorji, O. L., Umeh, O. N. C., Agubata, C. O., Adah, D., Obitte, N. C., & Chukwu, A. (2022). The effect of noisome preparation methods in encapsulating 5-fluorouracil and real time cell assay against HCT-116 colon cancer cell line. *Heliyon*, *8*(12). https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12369

Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds: Structure, Classification, and Antioxidant Power. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications* (pp. 33–50). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00002-5

Wang, J. X., Xiao, X. H., & Li, G. K. (2008). Study of vacuum microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds and pigment from Chinese herbs. *Journal of Chromatography A*, *1198–1199*(1–2), 45–53. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.045

Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 25, Issue 3, pp. 319–323). https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863

Wong, Y. M., & Siow, L. F. (2015). Effects of heat, pH, antioxidant, agitation and light on betacyanin stability using red-fleshed dragon fruit (Hylocereus polyrhizus) juice and concentrate as models. *Journal of Food Science and Technology*, *52*(5), 3086–3092. https://doi.org/10.1007/s13197-014-1362-2

Xiao, X. H., Wang, J. X., Wang, G., Wang, J. Y., & Li, G. K. (2009). Evaluation of vacuum microwave-assisted extraction technique for the extraction of antioxidants from plant samples. *Journal of Chromatography A*, *1216*(51), 8867–8873. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.087

Xu, B. J., & Chang, S. K. C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, *72*(2). https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00260.x

Yang, J., Ou, X. Q., Zhang, X., Zhou, Z. Y., & Ma, L. Y. (2017). Effect of Different Solvents on the Measurement of Phenolics and the Antioxidant Activity of Mulberry

(Morus atropurpurea Roxb.) with Accelerated Solvent Extraction. *Journal of Food Science*, *82*(3), 605–612. https://doi.org/10.1111/1750-3841.13638

Yiğit, Ü. (2018). *Kırmızı Lahana Antosiyaninlerinin Mikrodalga ve Konvansiyonel Yöntemler ile Özütlenmesi* [Yüksek Lisans Tezi]. Hacettepe Üniversitesi.

Yolmeh, M., & Jafari, S. M. (2017). Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food and Bioprocess Technology*, *10*(3), 413–433. https://doi.org/10.1007/s11947-016-1855-2

Zagoskina, N. V., Zubova, M. Y., Nechaeva, T. L., Kazantseva, V. V., Goncharuk, E. A., Katanskaya, V. M., Baranova, E. N., & Aksenova, M. A. (2023). Polyphenols in Plants: Structure, Biosynthesis, Abiotic Stress Regulation, and Practical Applications (Review). In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 18). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). https://doi.org/10.3390/ijms241813874

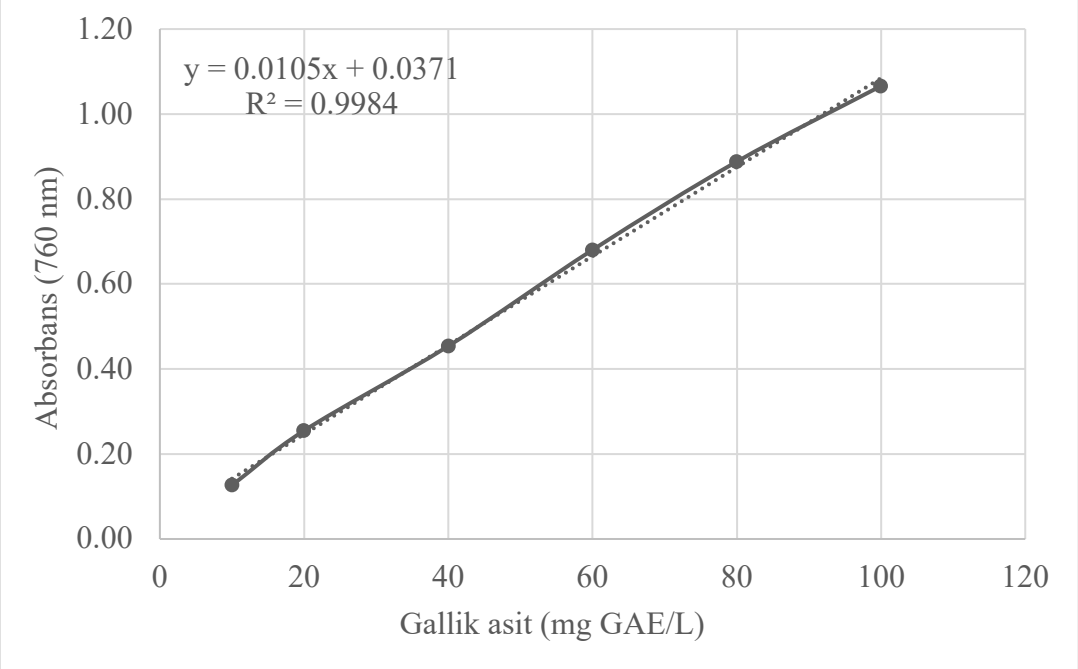
Zhang, Y. J., Gan, R. Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A. N., Xu, D. P., Li, H. Bin, & Kitts, D. D. (2015). Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. In *Molecules* (Vol. 20, Issue 12, pp. 21138–21156). MDPI AG. https://doi.org/10.3390/molecules201219753

Zheng, L., Lin, L., Su, G., Zhao, Q., & Zhao, M. (2015). Pitfalls of using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. *Food Research International*, *76*, 359–365. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.045

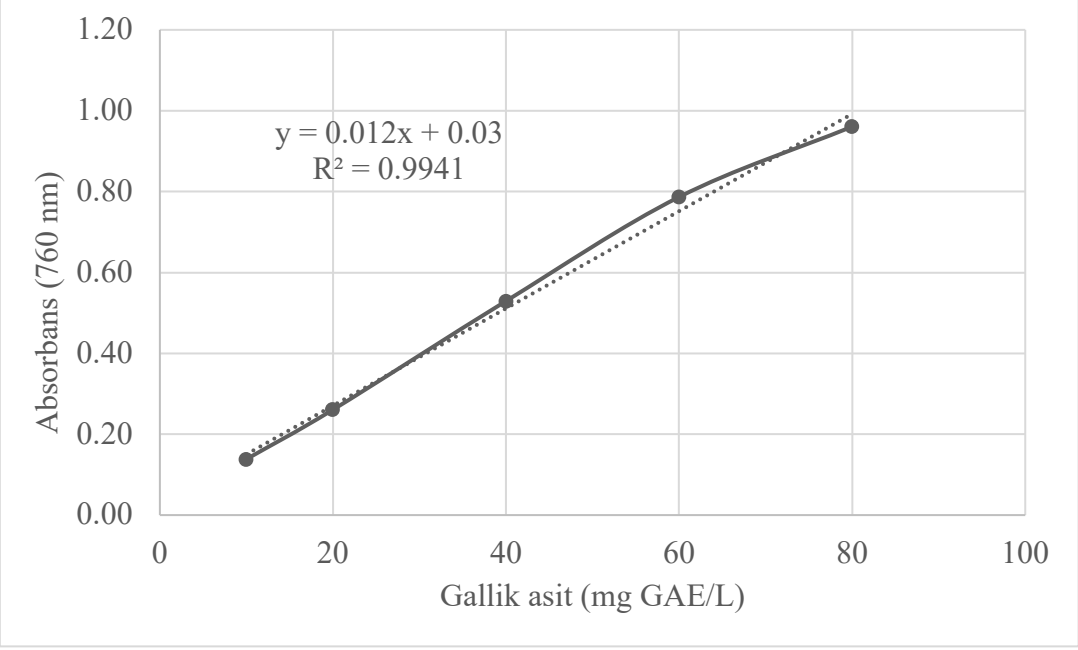
Zin, M. M., Anucha, C. B., & Bánvölgyi, S. (2020). Recovery of phytochemicals via electromagnetic irradiation (Microwave-Assisted-Extraction): Betalain and phenolic compounds in perspective. *Foods*, *9*(7). https://doi.org/10.3390/foods9070918

EKLER

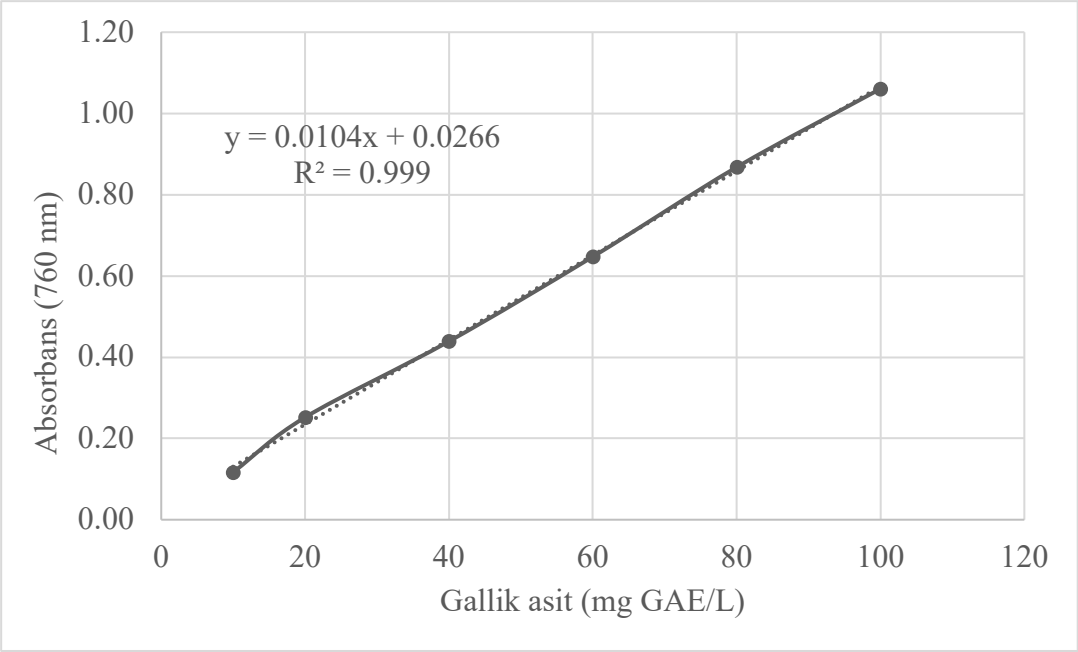
EK A. KALİBRASYON EĞRİLERİ



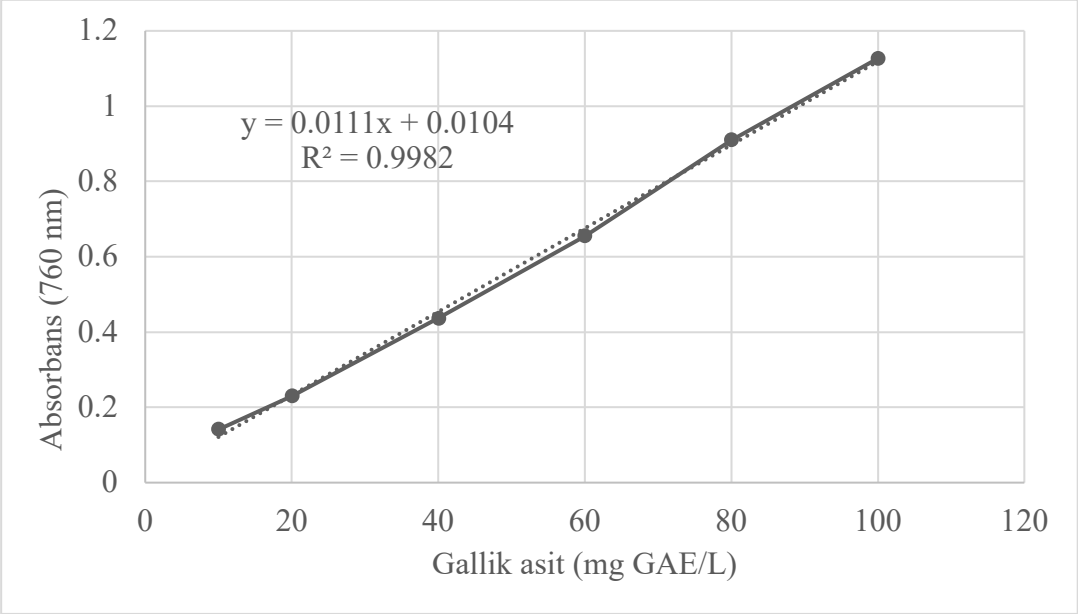
Şekil A1. TFM hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi



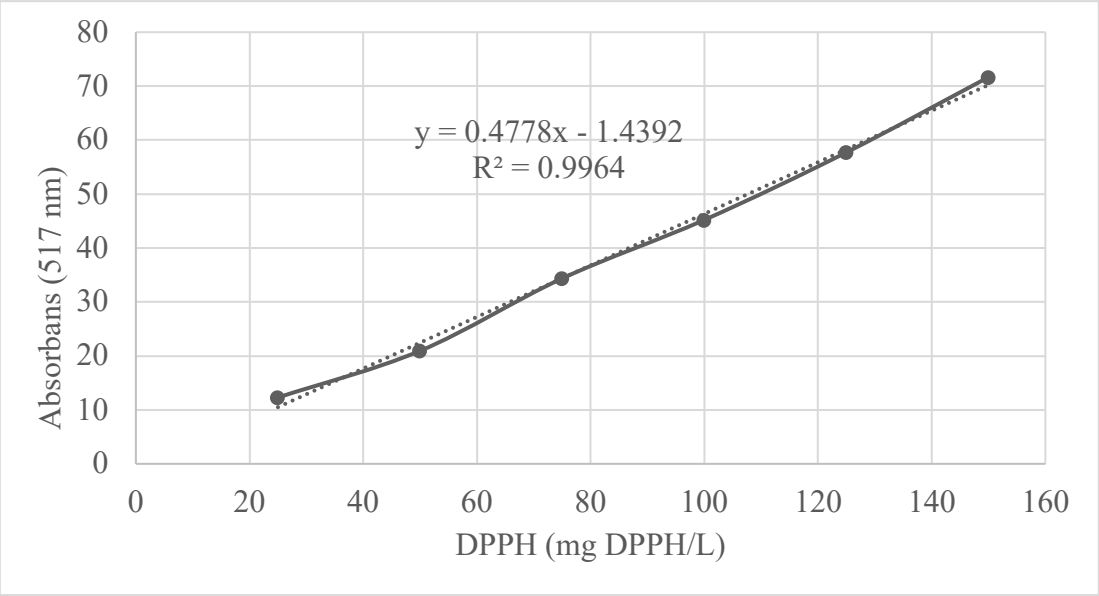
Şekil A2. TFM hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi



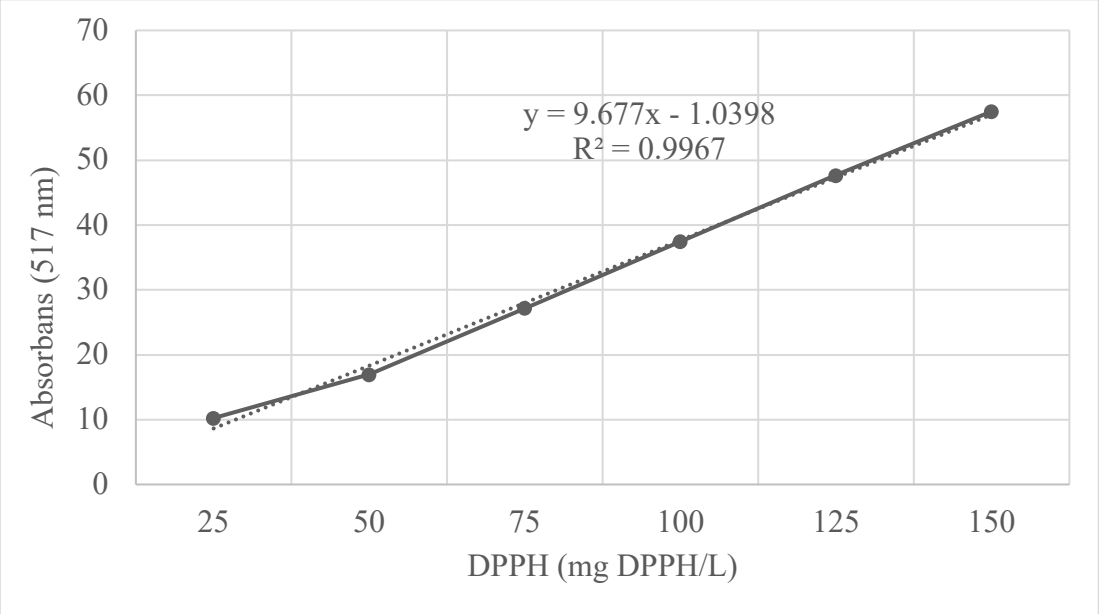
Şekil A3. TFM hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi



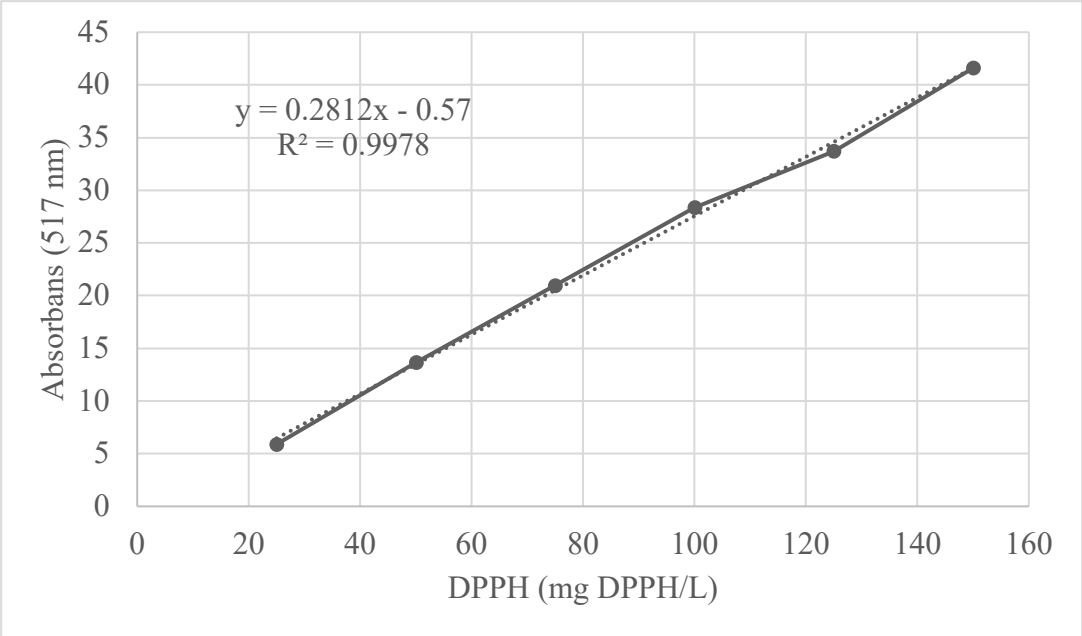
Şekil A4. TFM hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan Gallik asit kalibrasyon eğrisi



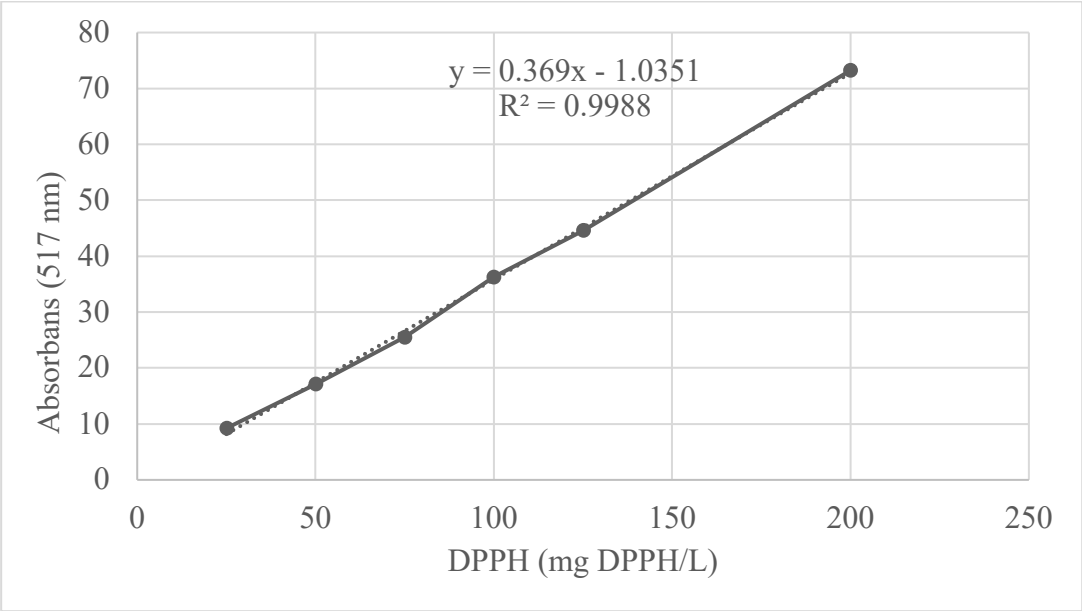
Şekil A5. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi



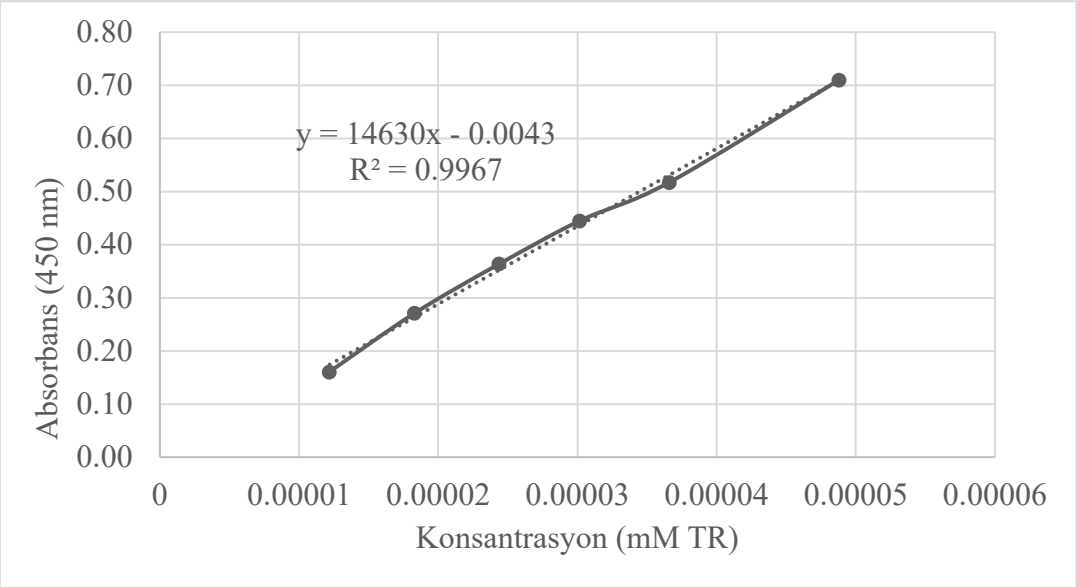
Şekil A6. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi



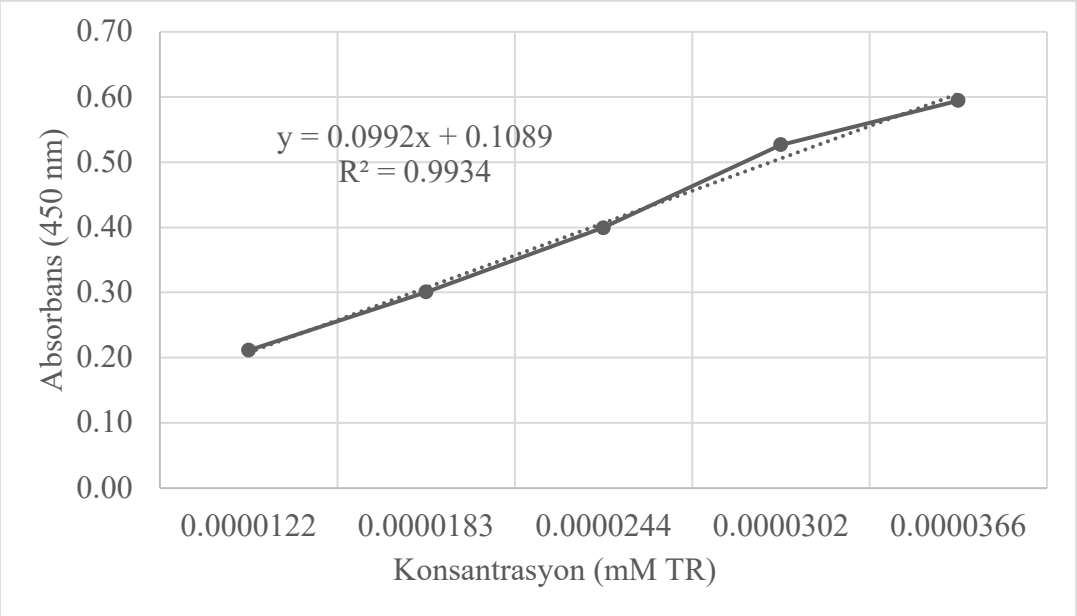
Şekil A7. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi



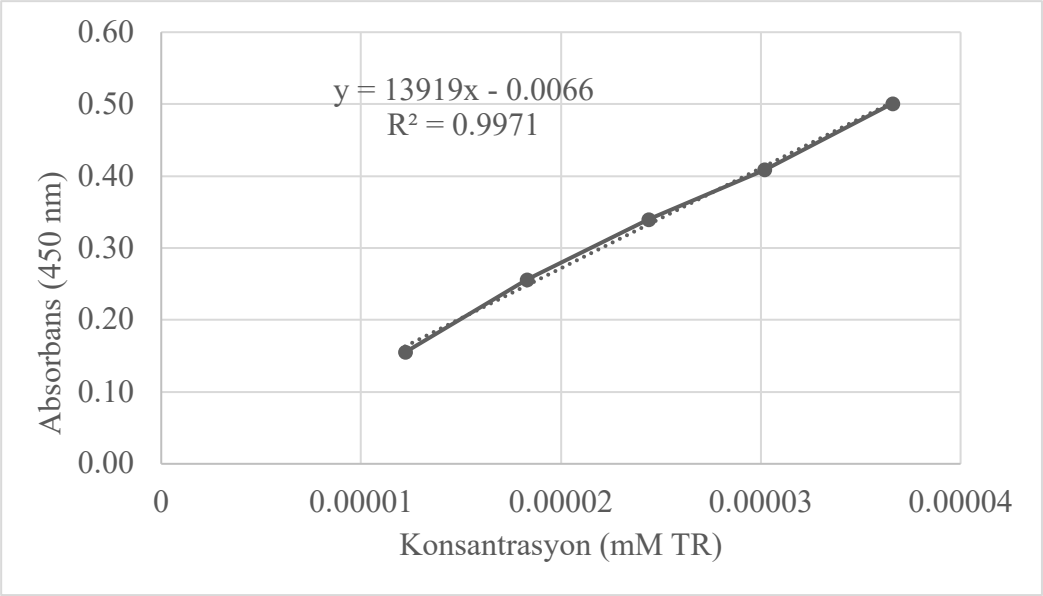
Şekil A8. TAK_{DPPH} hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan DPPH kalibrasyon eğrisi



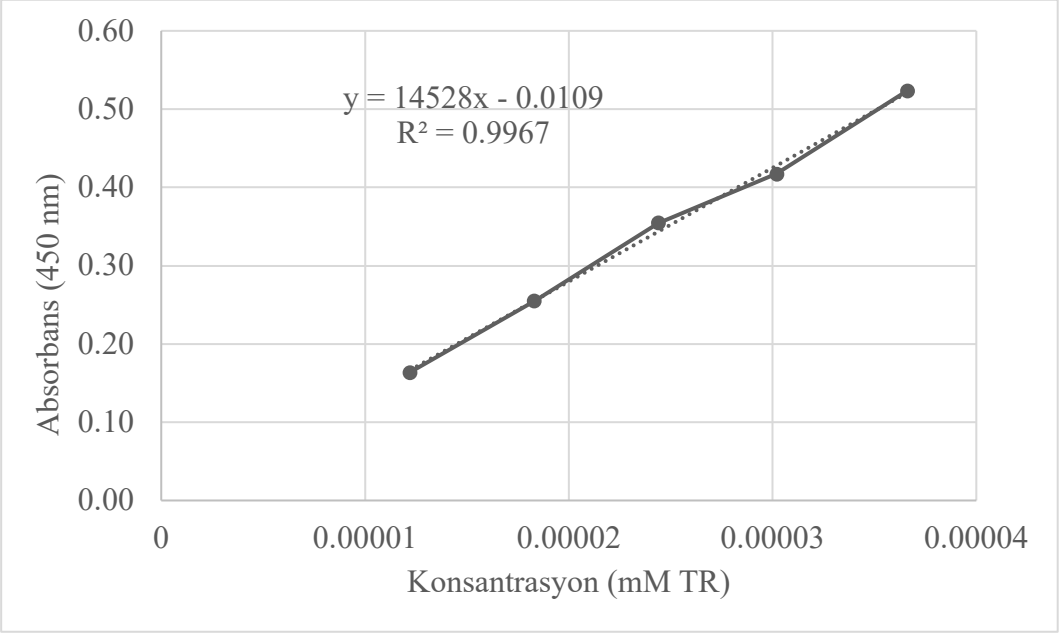
Şekil A9. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %20 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi



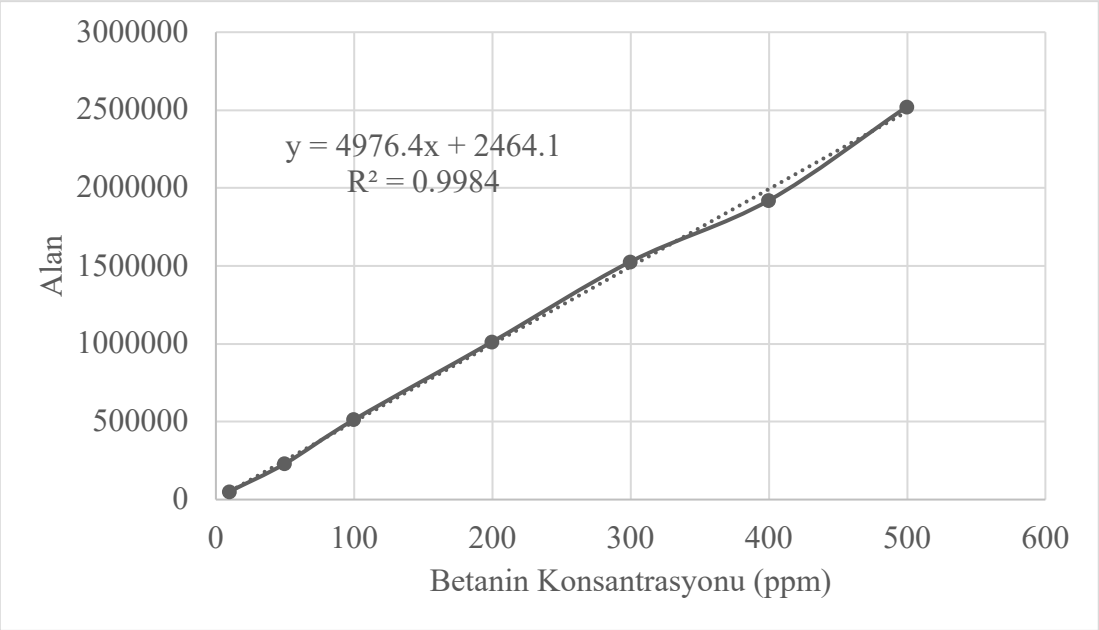
Şekil A10. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %30 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi



Şekil A11. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %40 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi



Şekil A12. TAK_{CUPRAC} hesaplamalarında kullanmak için %60 etanol ile hazırlanan CUPRAC kalibrasyon eğrisi



Şekil A13. Ticari betanin örneği kullanılarak LC-MS-Q-TOF verileriyle hazırlanan standart eğri

EK B. DENEYLERİN YANITLARI

Çizelge B1. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinde KE sonucu elde edilen yanıtlar

	Yanıtlar			
Deney no	**Y_1**	**Y_2**	**Y_3**	**Y_4**
1	2556.950±0,002	14.812±0,027	102.486±0,001	112.228±0,003
2	1968.267±0,030	12.862±0,009	63.278±0,006	139.225±0,061
3	2326867±0,002	14.297±0,014	83.430±0,006	154.939±0,014
4	2603.211±0,018	11.133±0,006	42.475±0,007	122.561±0,005
5	2481.111±0,022	12.336±0,008	78.987±0,002	135.302±0,014
6	1988.800±0,003	13.204±0,006	55.058±0,004	107.523±0,003
7	2184.539±0,014	10.668±0,006	63.602±0,002	136.382±0,020
8	2480.867±0,007	12.310±0,008	78.684±0,003	135.105±0,002
9	2282.928±0,008	12.783±0,012	83.860±0,007	141.684±0,019
10	2494.433±0,038	11.965±0,001	74.293±0,006	134.467±0,004
11	2915.489±0,040	12.733±0,003	80.503±0,006	144.826±0,009
12	1730.544±0,015	9.194±0,001	38.223±0,009	109.076±0,012
13	2481.600±0,012	12.297±0,006	78.078±0,003	135.007±0,006
14	2468.522±0,010	10.728±0,007	40.400±0,002	114.994±0,031
15	2005.056±0,011	12.504±0,005	58.064±0,005	135.079±0,004
16	2717.122±0,009	11.849±0,020	99.194±0,002	118.414±0,009
17	2574.917±0,019	10.985±0,003	75.208±0,004	130.933±0,005
18	2896.117±0,032	13.812±0,010	93.558±0,003	167.016±0,009
19	1602.578±0,014	11.079±0,009	109.55±0,006	160.929±0,016
20	2481.478±0,011	12.323±0,009	78.684±0,003	135.596±0,003
21	2784.100±0,002	9.211±0,001	34.088±0,012	112.005±0,011
22	2890.067±0,006	11.310±0,002	69.436±0,003	122.841±0,004
23	2918.667±0,013	11.328±0,011	35.747±0,023	133.537±0,006
24	2481.722±0,007	12.349±0,008	78.381±0,006	135.302±0,004
25	1892.000±0,003	10.574±0,008	54.153±0,004	117.330±0,008
26	1554.667±0,010	14.448±0,009	83.361±0,002	159.129±0,005
27	1853.256±0,018	12.490±0,011	66.134±0,012	149.573±0,012
28	2415.967±0,006	10.386±0,007	65.723±0,010	113.750±0,007
29	2877.233±0,011	13.053±0,013	68.789±0,010	141.880±0,025

Y_1= TBM (mg betalain/ kg kuru ağırlık)
Y_2= TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)
Y_3= TAK_{DPPH} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)
Y_4= TAK_{CUPRAC} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Çizelge B2. Box-Behnken deneysel tasarımına göre horozibiği çiçeği örneklerinde VMDE sonucu elde edilen yanıtlar

	Yanıtlar			
Deney no	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
1	2948.489±0,009	13.400±0,002	86.664±0,001	156.314±0,009
2	3090.511±0,012	12.123±0,001	64.203±0,002	137.974±0,012
3	2835.311±0,016	11.721±0,003	96.370±0,006	141.586±0,016
4	2414.378±0,001	11.426±0,004	101.417±0,002	141.979±0,001
5	2392.622±0,002	11.515±0,005	100.893±0,006	140.309±0,002
6	1775.400±0,048	7.331±0,003	66.643±0,008	94.701±0,048
7	1398.956±0,046	5.541±0,002	39.969±0,004	69.418±0,046
8	2486.183±0,008	11.754±0,009	73.726±0,009	169.23±0,008
9	3153.578±0,011	15.234±0,005	71.686±0,005	176.929±0,011
10	2418.167±0,011	11.836±0,002	100.631±0,002	142.862±0,011
11	2603.517±0,015	12.232±0,005	61.039±0,003	151.159±0,015
12	3016.322±0,009	13.799±0,003	66.341±0,004	161.141±0,009
13	2377.650±0,010	10.927±0,006	74.802±0,002	128.134±0,010
14	1415.578±0,017	8.106±0,001	48.376±0,010	106.959±0,017
15	1661.978±0,020	10.041±0,005	47.741±0,005	76.198±0,020
16	2075.456±0,013	13.175±0,017	70.256±0,005	152.395±0,013
17	2780.433±0,009	11.951±0,005	69.580±0,004	153.995±0,009
18	2687.117±0,061	13.726±0,014	76.648±0,014	161.763±0,061
19	1554.422±0,014	7.578±0,002	45.977±0,003	93.572±0,014
20	1165.450±0,008	8.681±0,010	58.278±0,006	106.677±0,008
21	2288.794±0,019	9.988±0,003	48.728±0,016	98.089±0,019
22	993.544±0,005	5.547±0,004	8.993±0,010	73.093±0,005
23	2396.778±0,014	11.951±0,005	100.369±0,004	140.015±0,014
24	2026.689±0,004	11.157±0,011	53.782±0,006	146.375±0,004
25	2858.717±0,028	14.850±0,005	83.055±0,004	177.473±0,028
26	1915.956±0,006	7.539±0,008	27.837±0,006	91.547±0,006
27	2522.300±0,006	10.830±0,002	39.239±0,007	128.866±0,006
28	2398.122±0,005	11.913±0,004	100.107±0,007	144.335±0,005
29	3061.422±0,028	17.041±0,003	95.806±0,003	195.392±0,028

Y_1= TBM (mg betalain/ kg kuru ağırlık)
Y_2= TFM (mg GAE/g kuru ağırlık)
Y_3= TAK_{DPPH} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)
Y_4= TAK_{CUPRAC} (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Çizelge B3. Horozibiği çiçeği için Box-Behnken tasarım yöntemine göre gerçekleştirilen niyozom deneylerinde elde edilen yanıtlar

	Yanıtlar				
Deney No.	**Y_1**	**Y_2**	**Y_3**	**Y_4**	**Y_5**
1	2986.22±0.002	8.72±0.005	116.889±0.003	7.88±0.05	96.022±0.002
2	2991.43±0.01	12.07±0.001	121.586±0.003	10.15±0.03	96.19±0.010
3	3029.56±0.005	9.27±0.001	96.965±0.002	11.946±0.15	97.416±0.005
4	3005.44±0.003	10.68±0.001	103.70±0.004	8.54±0.19	96.64±0.003
5	3014.36±0.001	10.28±0.006	106.61±0.002	8.81±0.01	96.927±0.001
6	2993.40±0.009	12.12±0.003	120.88±0.002	10.12±0.04	96.25±0.009
7	2998.41±0.007	11.21±0.003	115.041±0.007	4.34±0.13	96.353±0.007
8	2989.81±0.008	10.05±0.005	104.10±0.001	7.27±0.03	96.14±0.008
9	3013.96±0.002	12.06±0.002	118.27±0.002	7.549±0.30	96.91±0.002
10	2991.46±0.016	11.95±0.002	121.59±0.003	10.20±0.02	96.19±0.016
11	2990.99±0.004	9.51±0.002	91.94±0.002	11.21±0.11	96.158±0.004
12	2993.79±0.012	11.84±0.006	126.893±0.004	3.578±0.40	96.27±0.012
13	2970.17±0.002	8.59±0.002	94.15±0.004	9.59±0.15	95.51±0.339
14	2990.23±0.009	12.17±0.002	121.89±0.006	10.23±0.06	96.15±0.009
15	2954.95±0.017	10.26±0.002	116.66±0.009	4.05±0.12	94.984±0.017
16	2998.13±0.031	8.45±0.002	108.417±0.002	11.052±0.22	96.41±0.031
17	3013.02±0.004	10.19±0.003	116.36±0.003	7.42±0.26	96.95±0.004
18	3007.74±0.013	11.247±0.002	117.47±0.002	5.16±0.01	96.714±0.013
19	2990.05±0.010	11.93±0.004	122.79±0.006	10.16±0.02	96.15±0.010
20	3015.73±0.001	12.623±0.004	125.956±0.002	4.92±0.12	96.97±0.001
21	3019.43±0.006	7.51±0.001	86.423±0.002	14.942±0.35	97.09±0.006
22	3001.43±0.508	10.74±0.002	118.756±0.001	9.63±0.06	96.356±0.508
23	2998.62±0.016	10.21±0.001	93.852±0.003	9.043±0.02	96.421±0.016
24	3023.91±0.005	11.09±0.001	103.388±0.002	8.74±0.27	97.513±0.005
25	3013.13±0.001	11.04±0.004	129.526±0.004	5.22±0.29	97.05±0.001
26	2992.94±0.026	10.07±0.002	95.16±0.005	9.636±0.12	96.0881±0.026
27	3005.63±0.005	10.43±0.002	123.84±0.002	7.27±0.03	96.547±0.005
28	3015.75±0.003	10.24±0.001	106.806±0.002	9.88±0.15	96.972±0.003
29	3007.27±0.016	9.49±0.004	96.547±0.004	12.87±0.23	96.882±0.016

Y_1: Toplam betalain miktarı (TBM) (mg betalain/kg kuru ağırlık)

Y_2: Toplam fenolik madde (TFM) (mg GAE/g kuru ağırlık)

Y_3: CUPRAC yöntemi ile ölçülen toplam antioksidan kapasitesi (TAK_{CUPRAC}) (mmol TE/ kg kuru ağırlık)

Y_4: Renk analizinde ölçülen a* değeri

Y_5: Enkapsülasyon verimi (%)

EK C. ANOVA ÇİZELGELERİ

Çizelge C1. Horozibiği çiçeği ile yapılan konvansiyonel ekstraksiyonda X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin Y_1, Y_2 ,Y_3 ve Y_4 üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (TBM)	4489000	14	557200	< 0.0001
X_1	41075.97	1	71383.36	< 0.0001
X_2	1043000	1	1813000	< 0.0001
X_3	1707000	1	2966000	< 0.0001
X_4	110200	1	191500	< 0.0001
X_1X_2	162300	1	282100	< 0.0001
X_1X_3	65042.85	1	113000	< 0.0001
X_1X_4	329800	1	573200	< 0.0001
X_2X_3	62568.77	1	108700	< 0.0001
X_2X_4	1916.69	1	3330.89	< 0.0001
X_3X_4	5208.81	1	9052.07	< 0.0001
X_1^2	96.28	1	167.31	< 0.0001
X_2^2	28926.12	1	50268.90	< 0.0001
X_3^2	649300	1	1128000	< 0.0001
X_4^2	144700	1	251400	< 0.0001
Uyum Eksikliği	7.55	10	5.94	0.0503
Hata	0.51	4		
Genel	4489000	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (TFM)	48.76	14	3964.76	< 0.0001
X_1	0.5359	1	609.96	< 0.0001
X_2	18.78	1	21380.03	< 0.0001
X_3	1.78	1	2031.74	< 0.0001

X_4	6.17	1	7021.74	< 0.0001
X_1X_2	4.81	1	5473.82	< 0.0001
X_1X_3	0.0622	1	70.75	< 0.0001
X_1X_4	3.86	1	4396.98	< 0.0001
X_2X_3	1.45	1	1645.94	< 0.0001
X_2X_4	0.0062	1	7.09	0.0186
X_3X_4	0.4123	1	469.31	< 0.0001
X_1^2	1.65	1	1873.65	< 0.0001
X_2^2	2.62	1	2982.37	< 0.0001
X_3^2	3.6	1	4094.44	< 0.0001
X_4^2	0.9691	1	1103.13	< 0.0001
Uyum Eksikliği	0.0115	10	5.56	0.0563
Hata	0.0008	4		
Genel	48.78	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (DPPH)	10660.56	14	452.73	< 0.0001
X_1	73.58	1	43.75	< 0.0001
X_2	724.58	1	430.8	< 0.0001
X_3	597.81	1	355.43	< 0.0001
X_4	731.1	1	434.68	< 0.0001
X_1X_2	649.91	1	386.41	< 0.0001
X_1X_3	6.55	1	3.9	0.0685
X_1X_4	177.57	1	105.58	< 0.0001
X_2X_3	250.9	1	149.18	< 0.0001
X_2X_4	10.37	1	6.17	0.0263
X_3X_4	104.81	1	62.32	< 0.0001
X_1^2	205.63	1	122.26	< 0.0001
X_2^2	943.92	1	561.21	< 0.0001
X_3^2	4600.67	1	2735.35	< 0.0001

X_4^2	422.16	1	251	< 0.0001
Uyum Eksikliği	21.77	10	4.91	0.0694
Hata	1.77	4		
Genel	10684.11	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (CUPRAC)	8972.38	14	48.25	< 0.0001
X_1	402.29	1	30.29	< 0.0001
X_2	1822.74	1	137.23	< 0.0001
X_3	350.34	1	26.38	0.0002
X_4	599.44	1	45.13	< 0.0001
X_1X_2	104.27	1	7.85	0.0141
X_1X_3	43.69	1	3.29	0.0912
X_1X_4	3021.39	1	227.48	< 0.0001
X_2X_3	218.48	1	16.45	0.0012
X_2X_4	299.96	1	22.58	0.0003
X_3X_4	56.89	1	4.28	0.0575
X_1^2	105.47	1	7.94	0.0137
X_2^2	154.31	1	11.62	0.0042
X_3^2	367.16	1	27.64	0.0001
X_4^2	1148.84	1	86.49	< 0.0001
Uyum Eksikliği	170.28	10	4.35	0.0848
Hata	15.67	4		
Genel	9158.33	28		

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C2. Horozibiği çiçeği ile yapılan vakum mikrodalga destekli ekstraksiyonda X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin Y_1, Y_2 ,Y_3 ve Y_4 üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (TBM)	11230000	14	1346.27	< 0.0001
X_1	651700	1	1094.02	< 0.0001
X_2	3269000	1	5487.88	< 0.0001
X_3	5661000	1	9503.14	< 0.0001
X_4	100100	1	168.11	< 0.0001
X_1X_2	327400	1	549.67	< 0.0001
X_1X_3	92055.61	1	154.54	< 0.0001
X_1X_4	4238.52	1	7.12	0.02
X_2X_3	27520.49	1	46.20	< 0.0001
X_2X_4	2219.35	1	3.73	0.07
X_3X_4	393900	1	661.20	< 0.0001
X_1^2	291500	1	489.36	< 0.0001
X_2^2	137700	1	231.09	< 0.0001
X_3^2	135600	1	227.70	< 0.0001
X_4^2	13258.68	1	22.26	0.00
Uyum Eksikliği	7814.84	10	5.96	0.05
Hata	524.55	4		
Genel	11240000	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (TFM)	214.5	14	65.65	< 0.0001
X_1	57.35	1	245.74	< 0.0001
X_2	105.46	1	451.86	< 0.0001
X_3	18.18	1	77.9	< 0.0001
X_4	0.1922	1	0.8237	0.3795

X_1X_2	0.8542	1	3.66	0.0764
X_1X_3	0.9584	1	4.11	0.0622
X_1X_4	0.7312	1	3.13	0.0985
X_2X_3	0.1059	1	0.4536	0.5116
X_2X_4	1.09	1	4.66	0.0488
X_3X_4	1.54	1	6.59	0.0223
X_1^2	8.95	1	38.36	< 0.0001
X_2^2	8.54	1	36.6	< 0.0001
X_3^2	5.35	1	22.91	0.0003
X_4^2	1.27	1	5.44	0.0352
Uyum Eksikliği	3.04	10	5.23	0.0625
Hata	0.2323	4		
Genel	217.77	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (DPPH)	12120.99	14	803.9	< 0.0001
X_1	985.25	1	914.82	< 0.0001
X_2	1243.56	1	1154.67	< 0.0001
X_3	82.47	1	76.57	< 0.0001
X_4	888.53	1	825.02	< 0.0001
X_1X_2	784.23	1	728.18	< 0.0001
X_1X_3	22.08	1	20.5	0.0005
X_1X_4	70.98	1	65.91	< 0.0001
X_2X_3	14.88	1	13.82	0.0023
X_2X_4	15.8	1	14.67	0.0018
X_3X_4	179.61	1	166.77	< 0.0001
X_1^2	495.88	1	460.44	< 0.0001
X_2^2	2233.61	1	2073.96	< 0.0001
X_3^2	5705.61	1	5297.79	< 0.0001
X_4^2	2516.53	1	2336.66	< 0.0001

Uyum Eksikliği	14.06	10	5.53	0.0569
Hata	1.02	4		
Genel	12136.06	28		

Varyans Kaynağı	**KO**	**SD**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model (CUPRAC)	28852.29	14	141.56	< 0.0001
X_1	8995.77	1	617.89	< 0.0001
X_2	13033.74	1	895.25	< 0.0001
X_3	2373.21	1	163.01	< 0.0001
X_4	563.85	1	38.73	< 0.0001
X_1X_2	678.32	1	46.59	< 0.0001
X_1X_3	1.54	1	0.1058	0.7498
X_1X_4	304.24	1	20.9	0.0004
X_2X_3	78.21	1	5.37	0.0361
X_2X_4	212.94	1	14.63	0.0019
X_3X_4	18.7	1	1.28	0.2761
X_1^2	526.16	1	36.14	< 0.0001
X_2^2	214.95	1	14.76	0.0018
X_3^2	1068.48	1	73.39	< 0.0001
X_4^2	574.27	1	39.45	< 0.0001
Uyum Eksikliği	190.88	10	5.9	0.051
Hata	12.95	4		
Genel	29056.11	28		

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C3. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TBM (Y_1) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (TBM)	6897.40	14	492.67	65.60	< 0.0001
X_1	0.0451	1	0.0451	0.0060	0.9393
X_2	342.54	1	342.54	45.61	< 0.0001
X_3	526.40	1	526.40	70.09	< 0.0001
X_4	309.20	1	309.20	41.17	< 0.0001
X_1X_2	22.58	1	22.58	3.01	0.1049
X_1X_3	2117.52	1	2117.52	281.93	< 0.0001
X_1X_4	13.75	1	13.75	1.83	0.1975
X_2X_3	739.84	1	739.84	98.50	< 0.0001
X_2X_4	3.11	1	3.11	0.4138	0.5304
X_3X_4	211.43	1	211.43	28.15	0.0001
X_1^2	126.74	1	126.74	16.87	0.0011
X_2^2	822.06	1	822.06	109.45	< 0.0001
X_3^2	0.0200	1	0.0200	0.0027	0.9596
X_4^2	1561.27	1	1561.27	207.87	< 0.0001
Uyum eksikliği	98.02	10	9.80	5.50	0.0574
Hata	7.13	4	1.78		
Genel	7002.55	28			

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C4. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TFM (Y_2) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (TFM)	45.74	14	3.27	65.46	< 0.0001
X_1	7.00	1	7.00	140.20	< 0.0001
X_2	4.35	1	4.35	87.21	< 0.0001
X_3	0.0069	1	0.0069	0.1375	0.7163
X_4	5.18	1	5.18	103.76	< 0.0001
X_1X_2	0.2756	1	0.2756	5.52	0.0340
X_1X_3	5.09	1	5.09	102.03	< 0.0001
X_1X_4	1.44	1	1.44	28.85	< 0.0001
X_2X_3	0.0210	1	0.0210	0.4213	0.5268
X_2X_4	5.26	1	5.26	105.40	< 0.0001
X_3X_4	2.94	1	2.94	58.93	< 0.0001
X_1^2	2.60	1	2.60	52.11	< 0.0001
X_2^2	8.00	1	8.00	160.20	< 0.0001
X_3^2	5.13	1	5.13	102.83	< 0.0001
X_4^2	5.78	1	5.78	115.81	< 0.0001
Uyum eksikliği	0.6546	10	0.0655	5.94	0.0503
Hata	0.0441	4	0.0110		
Genel	46.44	28			

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C5. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin TAK_{CUPRAC} (Y_3) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (TAK)	4239.53	14	302.82	281.42	< 0.0001
X_1	693.09	1	693.09	644.11	< 0.0001
X_2	921.31	1	921.31	856.19	< 0.0001
X_3	148.47	1	148.47	137.97	< 0.0001
X_4	61.66	1	61.66	57.30	< 0.0001
X_1X_2	296.36	1	296.36	275.41	< 0.0001
X_1X_3	287.23	1	287.23	266.93	< 0.0001
X_1X_4	92.18	1	92.18	85.66	< 0.0001
X_2X_3	153.28	1	153.28	142.44	< 0.0001
X_2X_4	190.79	1	190.79	177.30	< 0.0001
X_3X_4	17.50	1	17.50	16.26	0.0012
X_1^2	119.70	1	119.70	111.24	< 0.0001
X_2^2	1355.48	1	1355.48	1259.68	< 0.0001
X_3^2	82.42	1	82.42	76.60	< 0.0001
X_4^2	91.99	1	91.99	85.49	< 0.0001
Uyum eksikliği	14.08	10	1.41	5.74	0.0533
Hata	0.9808	4	0.2452		
Genel	4254.59	28			

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C6. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin a* değeri (Y_4) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (a*)	206.95	14	14.78	9672.61	< 0.0001
X_1	75.48	1	75.48	49390.44	< 0.0001
X_2	56.15	1	56.15	36739.59	< 0.0001
X_3	0.4393	1	0.4393	287.45	< 0.0001
X_4	1.95	1	1.95	1274.73	< 0.0001
X_1X_2	1.24	1	1.24	814.23	< 0.0001
X_1X_3	0.2406	1	0.2406	157.43	< 0.0001
X_1X_4	2.88	1	2.88	1882.17	< 0.0001
X_2X_3	0.1354	1	0.1354	88.61	< 0.0001
X_2X_4	29.82	1	29.82	19514.21	< 0.0001
X_3X_4	0.2804	1	0.2804	183.46	< 0.0001
X_1^2	23.13	1	23.13	15132.15	< 0.0001
X_2^2	1.66	1	1.66	1083.29	< 0.0001
X_3^2	10.19	1	10.19	6670.93	< 0.0001
X_4^2	6.44	1	6.44	4213.05	< 0.0001
Uyum eksikliği	0.0198	10	0.0020	5.07	0.0657
Hata	0.0016	4	0.0004		
Genel	206.97	28			

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Çizelge C7. Horozibiği çiçeği için X_1, X_2, X_3 ve X_4 bağımsız değişkenlerinin enkapsülasyon verimi (EE%) (Y_5) üzerindeki etkilerine ait ANOVA testinin sonuçları

Varyans kaynağı	KT	SD	KO	F-değeri	p-değeri
Model (EE%)	8.17	14	0.5837	79.22	< 0.0001
X_1	0.0023	1	0.0023	0.3150	0.5835
X_2	0.6325	1	0.6325	85.83	< 0.0001
X_3	0.7164	1	0.7164	97.23	< 0.0001
X_4	0.5343	1	0.5343	72.51	< 0.0001
X_1X_2	0.1020	1	0.1020	13.85	0.0023
X_1X_3	2.01	1	2.01	273.08	< 0.0001
X_1X_4	0.0531	1	0.0531	7.21	0.0178
X_2X_3	0.6947	1	0.6947	94.29	< 0.0001
X_2X_4	0.0068	1	0.0068	0.9237	0.3528
X_3X_4	0.1866	1	0.1866	25.33	0.0002
X_1^2	0.1591	1	0.1591	21.59	0.0004
X_2^2	0.9313	1	0.9313	126.39	< 0.0001
X_3^2	0.0079	1	0.0079	1.08	0.3169
X_4^2	1.94	1	1.94	263.90	< 0.0001
Uyum eksikliği	0.0958	10	0.0096	5.21	0.0629
Hata	0.0074	4	0.0018		
Genel	8.28	28			

KT: Kareler toplamı, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

EK 4 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

Akdeniz, N. S., & Turabi Yolacaner, E. (2025) “Screening of the Process Parameters for Vacuum Microwave-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Amaranth Flowers.” *Food and Health* 11(1):57–66. doi: 10.3153/FH25005.

EK 5 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Akdeniz, N. S., & Turabi Yolacaner, E. (2024). An Optimization Study for Vacuum Microwave-Assisted Extraction of Betacyanin-Rich Bioactives from *Amaranthus Caudatus* L. Flowers. International Food Innovation and Sustainability Congress (IFIS), 16-18 May 2024, (Sözlü Sunum).