



Araştırma Makalesi

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Tuğba DURSUN ÇAPAR^{1*}

ÖZ

Fenolik bileşikler gibi bazı fitokimyasallar, antioksidan özellikleri nedeni ile iltihaplanma, kalp damar hastalıkları ve belirli kanser türlerine karşı olası koruma sağladıklarından büyük ilgi görmektedir. Murt meyvesi (*Myrtus communis* L.) içerdiği biyoaktif bileşiklerden dolayı insan sağlığı üzerinde potansiyel pozitif etki göstermektedir. Bu çalışmada, murt meyvesinin biyoaktif bileşikleri ultrasonik-destekli ekstraksiyonu (USE) yöntemi ile optimize edilmiştir. Murt meyvesi ekstraktlarının toplam fenolik madde içeriği (TFM) ve antioksidan aktivite (AA) açısından optimal ekstraksiyon koşulları, Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM) Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. Ultrasonikasyon gücü, ultrasonikasyon süresi ve katı-sıvı oranı gibi ekstraksiyon parametrelerinin TFM ve AA üzerindeki etkisi, ikinci dereceden regresyon denklemi kullanılarak modellenmiştir. En yüksek istenebilirlik 70 W sonikasyon gücü, % 7 katı-sıvı oranı ve 15 dakika sonikasyon süresinde gözlenmiştir. Sonikasyon gücü ve katı-sıvı oranı ekstraksiyon işleminde istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Optimum koşullar altında TFM ve DPPH radikal süpürme aktivitesi sırası ile 1.164 g GAE/L ve % 100.34 olarak tahminlenirken, bu değerler deneysel olarak 1.07 g GAE/L ve % 96.41 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, deneysel tasarım ile murt meyvesinden biyoaktif bileşiklerin USE yöntemi ile ekstraksiyonunun zaman ve çözen açısından fayda sağladığını ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: murt, biyoaktif bileşikler, ultrases-destekli ekstraksiyon, optimizasyon

Bioactive Compounds of Myrtle Berrys' Ultrasound-Assisted Extraction Conditions Optimized by Response Surface Methodology

ABSTRACT

Phytochemicals, such as phenolic compounds, are of great interest due to their health beneficial antioxidant properties and possible protection against inflammation, cardiovascular diseases and certain types of cancer. The bioactive compounds in myrtle berries have shown a potentially positive effect on human health. In this study, bioactive compounds of myrtle berries were optimized by using ultrasound-assisted extraction (USE) technique. The optimal extraction conditions in term of total phenolic content (TPC) and total antioxidant activity (AA) were determined using Response Surface Methodology (RSM) Box–Behnken design. The influence of extraction parameters including, ultrasonication power, sonication time and solid-solvent ratio on TPC and AA were modeled by using a second-order regression equation. The highest desirability was observed with an ultrasonic power of 70, a solid/solvent ratio of 7 %, and an extraction time of 15 min. Sonication power and solid-solvent ratio were the significant parameters for the extraction process ($p<0.05$). Under these optimized conditions, the predicted value for TPC and DPPH radical scavenging activity were 1.07 g GAE /L extract, and 96.41 %, whereas the observed experimental values were found as 1.164 g GAE /L extract and 100.34 %, respectively. These findings show that extraction of bioactive compounds from myrtle berries using USE technique consumes less solvent and time.

Keywords: Myrtle berry, bioactive compounds, ultrasound-assisted extraction, optimization

ORCID ID: 0000-0002-1075-0054

Yayın Kuruluna Geliş Tarihi: 14.10.2022

Kabul Tarihi: 14.02.2023

¹Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

*E-posta: tugbadursun@erciyes.edu.tr

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Giriş

Murt meyvesi, (*Myrtus communis* L.) Akdeniz bölgesinde yetişen *Myrtaceae* familyasında önemli aromatik bitkilerden birisidir (Yangui ve ark., 2021). Geleneksel olarak, murt meyvesinin yaprakları, meyveleri, çiçekleri ve kökleri gibi farklı kısımları tıp, kozmetik ve gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Giampieri ve ark., 2020; Alipour ve ark., 2014; Zam ve ark., 2017). Murt meyvesinin tedavi edici özellikleri meyvenin içerdiği biyolojik aktif sekonder metabolitlerden kaynaklanmaktadır (Yangui ve ark., 2017). Antosiyaninler, flavanoidler ve yağ asitleri meyvedeki ana fitokimyasallardır (Tuberoso ve ark. 2010, Medda ve Mulas, 2021). Yaprak kısmı ise fenolik asitler, flavonoidler ve esas olarak uçucu yağlar bakımından zengindir (D'urso ve ark. 2019).

Solvent ekstraksiyonu, biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılan geleneksel bir ekstraksiyon yöntemidir (Ameer ve ark., 2017; Heleno ve ark., 2016; Ozbek ve ark., 2020; Zermane ve ark., 2016). Ancak bu yöntem; uzun süre gerektirmekte ve işlemin yüksek sıcaklıklarda yapılması nedeni ile biyoaktif bileşiklerde bozunmaya neden olabilmektedir. Solvent ekstraksiyonunda gerek çevre gerekse de sağlık sorunlarına neden olan ve maliyeti yüksek organik çözücüler kullanılmaktadır. Yöntemin belirtilen dezavantajları nedeni ile alternatif ekstraksiyon yöntemleri dikkat çekmektedir (Dang ve ark., 2017). Nitekim son araştırmalar modern, alternatif ve doğa dostu yeşil ekstraksiyon tekniklerinin daha fazla tercih edildiğini ortaya koymaktadır (Capar ve ark., 2021). Bu ekstraksiyon yöntemleri arasında ultrases-destekli ekstraksiyon (USE), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE), süper kritik ekstraksiyon (SFE) ve mikrodalga-destekli ekstraksiyon (MAE) en çok kullanılan yöntemlerdir (Dang ve ark., 2017; Amiri ve ark., 2010; Tian ve ark., 2013). Bu teknikler arasında,

çözelti içerisinde kavitasyon oluşturan USE yönteminin, klasik ekstraksiyon yöntemine göre birçok avantajı vardır (Chanioti ve Tzia, 2017; Jalili ve ark., 2018). Bu avantajlar arasında, yüksek ekstraksiyon verimi, düşük çalışma sıcaklığı ve az solvent tüketimi, daha kısa çalışma süresi ve enerji tasarrufu sayılabilir. USE yöntemi bitkilerden, hayvanlardan ve bunların atıklarından veya yan ürünlerden; yağların, proteinlerin veya farklı biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılmaktadır (Cavdar ve ark., 2017). USE'yi ultrasonik güç, frekans, sonikasyon süresi, çözücü özellikleri ve katı:sıvı oranı etkilemektedir (Sharayei ve ark., 2019). Bu nedenlerle, mevcut çalışmada klasik ekstraksiyona kıyasla daha yüksek antioksidan ve fenolik içeriğine sahip ekstrakt elde etmek amacıyla proses koşullarının optimizasyonu deneysel tasarım yöntemi ile belirlenmiştir. Yanıt Yüzey Yöntemi (RSM), optimizasyonla ilgili sorunlara uygulanan istatistiksel bir araç olmakla birlikte işleme koşullarının geliştirilmesini ve iyileştirilmesini sağlamaktadır (Khuri ve Mukhopadhyay, 2010). Son yıllarda, daha az sayıda deneyin yapıldığı RSM, kimyasal ve biyokimyasal sistemlerin optimizasyonu için kullanılmaktadır (Bas ve Boyaci, 2007).

Literatürde murt meyvesinin fenolik ve antioksidan özelliklerini araştıran bazı çalışmalara rastlanmaktadır (Pereira ve ark., 2017; Yılmaz, 2020; Aksay, 2016). Bununla birlikte, murt meyvesinin biyoaktif özelliklerinin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonuna yönelik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla, bu çalışmada murt meyvesinin fenolik ve antioksidan özelliklerinin USE ile optimizasyonu sağlanmıştır. Optimizasyon prosesi RSM kullanılarak gerçekleştirilmiştir. USE ile elde edilen optimum nokta TFM ve AA değerleri, tahminlenen değerler ile karşılaştırılarak model doğrulaması yapılmıştır.

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Materyal ve metod

Materyal

Murt meyvesi (*Myrtus communis* L.) (beyaz) 2020 yılı Ekim ayında Antalya bölgesinden temin edilmiştir. Murt meyvesi sap ve çekirdeklerinden ayrıldıktan sonra blender yardımıyla parçalanmıştır. Murt meyvesinin başlangıç nem içeriği AOAC 934.01 yöntemine göre yapılmış ve % 78 ± 0.1 olarak hesaplanmıştır.

Ultrases-destekli ekstraksiyon (USE)

Ultrasonik-destekli ekstraksiyon için US 400S (Hielscher, Almanya) ultrasonik güç cihazı kullanılmıştır. USE işlemi RSM dizayna göre yapılmış ve farklı ultrasonik güç, ultrasonikasyon süresi ve katı-sıvı oranı kullanılmıştır. Dizayn Çizelge 1'de verilmiştir. Çalışmada çözgen olarak metanol (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Örnek ve çözgen beher içerisine konulmuş ve sonikasyon sırasında ısınmanın engellenmesi için etrafı buz ile çevrilmiştir. Sonikasyon süresi sonunda örnek kaba filtre kağıdından geçirilmiş ve örnekler 45 µm'lik membran filtre (Sartorius) ile süzülmüştür. Elde edilen ekstraktlar amber şişelerde -80°C'de muhafaza edilmiş ve analizler için kullanılmıştır.

Toplam fenolik bileşen analizi (TFM)

Toplam fenolik madde analizi Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak Hayta and İşçimen (2017)'e göre yapılmıştır. Bu amaçla 30 µL örnek ekstraktı, 150 µL Folin-Ciocalteu (10 kat seyreltilmiş) ve 120 µL Na₂CO₃ mikro okuyucu plakasına konulmuştur. Örnek absorbansları Mikro okuyucu (MultiScan FC, Thermo Fisher, ABD) içinde 60 dakika bekleme süresi sonunda 750 nm'de ölçülmüştür. Sonuçlar g Gallik asit eşdeğeri (GAE)/L olarak hesaplanmıştır.

Toplam antioksidan aktivite analizi (AA)

Örneklerin antioksidan aktivite analizi Hayta and İşçimen (2017)'de belirtilen 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 30 µL örnek ekstraktı ve 270 µL DPPH (0.1 mM etanolik) çözeltisi mikro okuyucu plakasına konulmuştur. Örnek absorbansları mikro okuyucu (MultiScan FC, Thermo Fisher, ABD) içinde 5 dakika karıştırma ve 55 dakika bekletme sonunda 520 nm'de okunmuştur. % süpürme aktivitesi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{Inhibisyon} = \left[1 - \frac{\text{örnek absorbansı}}{\text{kontrol absorbansı}} \right] \times 100$$

Optimizasyon ve istatistiksel analiz

Verileri optimize etmek için RSM-Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. Optimizasyon Design Expert (13.0) programı yardımıyla gerçekleştirilmiştir. Proses parametreleri biyoaktif özellikleri optimize etmek için X₁:güç (W), X₂:zaman (dakika), ve X₃:oran (katı-sıvı, %) seçilmiştir. Ekstraksiyon süresi, gücü, katı-sıvı oranı gibi USE değişkenleri; literatür taramalarına ve yapılan ön deneme sonuçları değerlendirilerek belirlenmiştir. USE için 17 noktadan oluşan deney tasarımı Çizelge 1'de, üç kodlu faktör ise Çizelge 2'de verilmiştir. Verilerin en iyi uyduğu model aşağıda belirtilen ikinci dereceden polinomial modeldir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot X_{ii}^2 + \sum_{i < j}^k \beta_{ij} \cdot X_i \cdot X_j + \varepsilon$$

Y, tahminlenen farklı cevapları; X_i, X₁, X₂,...,X_k, bağımsız dizayn değişkenlerini; β₀, β_i, β_j, j=0,1,...,k, regresyon katsayılarını ve ε rastgele hatayı belirtmektedir.

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Çizelge 1. Murt meyvesinin USE ile biyoaktif özelliklerinin optimizasyonunda kullanılan deney tasarım çizelgesi

Deneme	Faktör 1	Faktör 2	Faktör 3	Cevap 1	Tahminlenen	Cevap 2	Tahminlenen
	X ₁	X ₂	X ₃	TFM	TFM	AA	AA
	W	min	%	g GAE/L	g GAE/L	%	%
						İnhibisyon	İnhibisyon
1	50	15	10	0.86	0.87	96.32	94.89
2	30	15	5.5	0.84	0.78	80.23	64.73
3	50	10	5.5	0.77	0.75	77.4	85.77
4	70	15	5.5	1.16	1.15	95.35	101.43
5	30	5	5.5	0.65	0.66	75.37	52.29
6	70	10	10	0.84	0.84	95.07	95.42
7	70	10	1	0.75	0.70	31.1	71.17
8	50	5	1	0.24	0.23	18.42	53.85
9	70	5	5.5	0.66	0.72	77.39	94.89
10	50	10	5.5	0.81	0.75	82.44	85.77
11	50	10	5.5	0.78	0.75	84.45	85.77
12	50	10	5.5	0.74	0.75	88.21	85.77
13	50	15	1	0.36	0.42	24.9	66.75
14	30	10	10	0.79	0.84	94.13	63.06
15	30	10	1	0.26	0.26	24.57	24.22
16	50	10	5.5	0.64	0.75	96.36	85.77
17	50	5	10	0.56	0.50	98.67	88.82

X₁:Güç, X₂:Süre, X₃:Kati-sıvı oranı, TFM:Toplam fenolik madde, AA: Antioksidan aktivite

Çizelge 2. RSM bağımsız değişken parametreleri

Bağımsız değişkenler	Bağımsız değişken parametreleri		
	-1	0	+1
X ₁ Güç (W)	30	50	70
X ₂ (Dakika)	5	10	15
X ₃ (%)	1	5.5	10

X₁:Güç, X₂:Süre, X₃:Kati-sıvı oranı

Bulgular ve Tartışma

RSM Optimizasyonu ve Model Uyumu

Model uygunluğu, sistemin doğru tahminini incelemek için gereklidir. Eğer model kabul edilebilir düzeyde ise optimize edilmiş cevaplar doğru sonuç vermektedir. Çizelge 3 ve 4, TFM ve AA için ikinci dereceden modellerin ANOVA (p değerleri) sonuçlarını özetlemektedir. Çizelgelerden görüldüğü gibi modellerin p değerleri istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Uyum eksikliği p değerinin 0.05'ten büyük olması

deneysel ve tahmin edilen değerlerin deneysel hata ile açıklanabileceğini göstermektedir. Çizelge 3 ve 4 incelendiğinde her iki model için de R^2 ve Adj- R^2 değerlerinin kabul edilebilir değerler olduğu anlaşılmaktadır.

Çoklu yanıtların optimizasyonuna uygulanan faydalı bir optimizasyon tekniği de $0 \leq d \leq 1$ aralığında değişen istenebilirlik fonksiyonlarını (d) kullanmaktır (Derringer ve Suich, 1980). RSM optimizasyon aşamasında belirtildiği gibi en yüksek performansı elde etmek için her bir

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

faktörün (sonikasyon gücü, sonikasyon süresi ve katı-sıvı oranı) istenen seviyesi “aralık içinde” seçilirken, yanıtlar “maksimum” olarak seçilmiştir. En yüksek istenebilirlik değerini ($d=1$) veren değer optimum sonuç olarak seçilmiş olup, 70 W ultrasonik güç, 15 dakika sonikasyon süresi ve % 7 katı-sıvı oranında elde edilmiştir. Elde edilen optimum koşullar altında TFM ve AA sırasıyla 1.164 g GAE/L ve % 100.34 olarak tahminlenirken, deneysel olarak 1.07 g GAE/L ve % 96.41 olarak bulunmuştur.

Toplam Fenolik Madde (TFM)

Murt meyvesinin toplam fenolik içeriğinin deneysel tasarımı ve karşılık gelen yanıt verileri Çizelge 1’de sunulmuştur. Modelin kesişim, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayıları en küçük kareler tekniği kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 3’te verilmiştir. Üç doğrusal parametrenin, güç (X_1), zaman (X_2) ve katı-sıvı oranı (X_3), ve X_3 ’ün kuadratik (ikinci dereceden) parametresi $p<0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak oldukça önemli bulunmuştur. Diğer etkileşim parametrelerinden sadece X_1X_3 istatistiksel olarak önemli ($p<0.05$) bulunurken, diğerleri önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 3’te verilen varyans analizi (ANOVA) deneysel sonuçları, modelin 17.40 F değerinde anlamlı olduğunu göstermektedir. Elde edilen analiz sonuçlarına göre, model $p<0.05$ olduğu ve uyum eksikliği $p>0.05$ olduğu için istatistiksel olarak anlamlı çıkmıştır. R^2 değeri % 96 bulunmuş olup murt meyvesi polifenollerinin USE verimliliğinin % 96’lık örnek varyasyonlarının bağımsız değişkenlere atfedildiğini ve toplam varyasyonların sadece %4’ünün model tarafından açıklanamayacağını ifade etmektedir. Bununla birlikte, yüksek R^2 değeri, her zaman regresyon modelinin tamamen uygun olduğunu göstermez. İyi bir istatistiksel modelde, $Adj-R^2$, R^2 ile karşılaştırılabilir olmalıdır. Çizelge 3’te gösterildiği gibi model için R^2 ve $Adj-R^2$ değerleri birbirine yakındır. Varyasyon katsayısı değeri

(C.V.%) % 3.51 ve “Yeterli Kesinlik” oranı 16.59 olarak bulunmuş ve modelin literatüre (Dahmoune ve ark.,2015) uygun, güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, modelin murt meyvesinden USE ile TFM ekstraktının tahmininde güvenilir sonuçlar verdiği göstermiştir.

Bağımsız değişkenlerin etkileşimli etkilerini ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu üzerindeki karşılıklı etkileşimlerini araştırmak için, çoklu doğrusal olmayan regresyon modellerinin üç boyutlu tepki yüzey profilleri çizilmiştir (Şekil 1). Şekil 1 toplam fenolik içeriğinin güç:süre, güç:katı-sıvı oranı ve süre:katı-sıvı oranı faktörlerinin etkileşimlerini göstermektedir. Murt meyvesinin fenolik içeriği sonikasyon süresinin 15 dakika ve sonikasyon gücünün 70 W’a çıkması ile 0.65 g GAE/L’den 1.16 g GAE/L’ye kadar artmıştır. Katı-sıvı oranı ve sonikasyon gücünün ikili etkileşimi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Katı-sıvı oranı % 1’den % 10’a arttığında düşük sonikasyon gücü (30 W) TFM’yi önemli derecede artırırken, sonikasyon gücü 70 W olduğunda TFM’de fazla artış olmamıştır. Sonikasyon süresinin ve katı-sıvı oranının birlikte artması toplam fenolik içeriğini artırırken, bu etkileşim istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Katı-sıvı oranı TFM’yi istatistiksel olarak önemli derecede etkilemektedir ve bu oran arttıkça TFM’de artmaktadır. Bu artış esas olarak katı-sıvı arasında değişen konsantrasyon ve katı ile sıvının oranının artması ile gerçekleşen kütle transferi ile tutarlıdır (Pinelo, 2005). Ekstraksiyon süresi TFM’yi önemli ölçüde etkilemiş ve süre arttıkça TFM artmıştır. Bu ilişki, katı moleküllerinin çözücü içindeki difüzyonu ve temas süresinin artması ile ilişkili olması ile açıklanabilir (Djemaa-Landri ve ark. 2020). Bu bulgular literatür ile uyum sağlamaktadır (Pinelo, 2005; Djemaa-Landri ve ark. 2020).

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Çizelge 3. Toplam fenolik madde analizine ait varyans analiz çizelgesi

Kaynak	KT	Sd	KTO	F değeri	p değeri Prop>F
Model	0.82	9	0.09	17.40	0.0005**
Doğrusal					
X ₁	0.09	1	0.09	18.04	0.0038**
X ₂	0.15	1	0.15	29.37	0.0010**
X ₃	0.26	1	0.26	49.43	0.0002**
Etkileşimli					
X ₁ X ₂	0.02	1	0.02	4.58	0.0696
X ₁ X ₃	0.05	1	0.05	9.23	0.0189*
X ₂ X ₃	0.01	1	0.01	1.54	0.2539
İkinci derece					
X ₁ ²	0.06	1	0.06	11.04	0.0127*
X ₂ ²	0.01	1	0.01	1.14	0.3202
X ₃ ²	0.18	1	0.18	33.83	0.0007**
Rezidual	0.04	7	0.01		
Uyum eksikliği	0.02	3	0.01	1.53	0.3362
Saf Hata	0.02	4	0.00		
Düzeltilmiş toplam	0.86	16	0.09	17.40	
Standart Hata	0.072				
Ortalama	0.69				
C.V.	3.51				
PRESS	0.34				
R ²	0.96				
Adj-R ²	0.90				
Tahmini R ²	0.60				
Yeterli Kesinlik	16.59				

KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi, KTO: Kareler toplamının ortalaması, *p>0.05; **p<0.01, X₁:Güç, X₂:Süre, X₃:Kati-sıvı oranı

Murt meyvesi fenolik içeriği etil asetat ve etanol kullanıldığında sırasıyla 3.21 ve 1.78 g GAE/L olarak bildirilmiştir (Aggul ve ark. 2022). Farklı sonuçların elde edilmesi ekstraksiyon koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

TFM'ye ait tahmini denklemi aşağıdaki gibi elde edilmiştir:

$$\text{TFM (g GAE/L)} = +0.42 - 0.02 X_1 + 8.2E-003 X_2 + 0.19 X_3 + 7.75E-004 X_1X_2 - 1.22E-003 X_1X_3 + 2.00E-003 X_2X_3 + 2.93 E-004 X_1^2 - 1.51E-003 X_2^2 - 0.01 X_3^2$$

X₁, sonikasyon gücü, X₂ sonikasyon süresi (dakika), ve X₃ kati-sıvı oranı (%)'dir.

Toplam Antioksidan Analizi (AA)

RSM-Box-Behnken Design tarafından oluşturulan deney tasarımı ve karşılık gelen DPPH (%) değerleri Çizelge 1'de sunulmuştur.

Box-Behnken dizaynında üç faktör için kullanılan matematiksel model, ikinci dereceden modele uyum sağlamaktadır. Bu model kullanılarak AA için (% DPPH) için aşağıda verilen tahmin denklemi elde edilmiştir.

$$\text{AA (% DPPH)} = -17.72 + 0.17 X_1 + 1.71 X_2 + 22.46 X_3 + 0.03 X_1X_2 - 0.02 X_1X_3 - 0.09 X_2X_3 - 2.56E-003 X_1^2 - 0.11 X_2^2 - 1.16 X_3^2$$

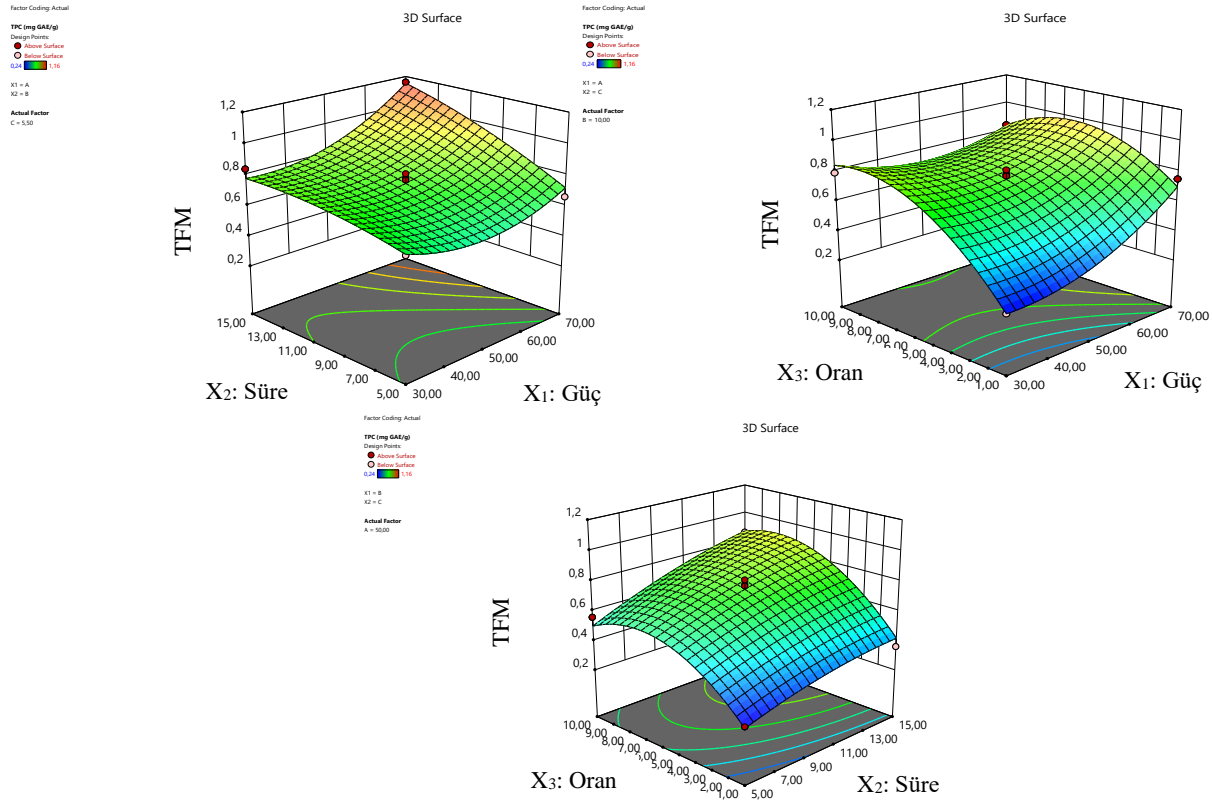
X₁, sonikasyon gücü, X₂ sonikasyon süresi (dakika), ve X₃ kati-sıvı oranı (%)'dir. USE tekniği kullanılarak elde edilen BBD ikinci dereceden modelin varyans analizi Çizelge 4'te özetlenmiştir. Modelin R² ve Adj-R² değerleri sırasıyla 0.96 ve

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

0.92 olarak bulunmuştur. Bu değerler 1.0'e yakın olup gözlemlenen ve tahmin edilen değerler arasında iyi uyum olduğunu göstermektedir. Ayrıca modelin USE verimliliğinde %96'lık örnek varyasyonlarının bağımsız değişkenlere atfedildiğini ve toplam varyasyonların sadece %4'ünün model tarafından açıklanamayacağını ifade etmektedir. Uyum eksikliğinin p değeri > 0.05 olup, istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Varyasyon katsayısı değeri (C.V.%) % 3.60 ve "Yeterli Kesinlik" oranı 17.33 bulunmuş ve modelin literatüre (Dahmoune ve ark., 2015) uygun, güvenilir ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, modelin murt

meyvesinin USE yöntemi ile antioksidan aktivite tahmininde güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Modelin kesişim, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayıları en küçük kareler tekniği kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 4'de verilmiştir. İki doğrusal parametrenin, güç (X_1), katı-sıvı oranı (X_3) ve bunların kvadratik (ikinci dereceden) parametreleri $p < 0.01$ düzeyinde istatistiksel olarak oldukça önemli bulunmuştur.



Şekil 1. Toplam fenolik maddenin ultrases-destekli ekstraksiyon parametrelerine bağlı olarak değişimi

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Çizelge 4. Toplam antioksidan aktivite analizine ait varyans analiz çizelgesi

Kaynak	KT	Sd	KTO	F değeri	p değeri Prop>F
Model	6512.47	9	723.61	21.44	0.0003**
Doğrusal					
X ₁	3144.64	1	3144.64	93.17	<0.0001**
X ₂	180.03	1	180.03	5.33	0.0542
X ₃	1990.81	1	1990.81	58.98	0.0001**
Etkileşimli					
X ₁ X ₂	8.70	1	8.70	0.26	0.6272
X ₁ X ₃	53.22	1	53.22	1.58	0.2495
X ₂ X ₃	11.66	1	11.66	0.35	0.5751
İkinci derece					
X ₁ ²	423.03	1	423.03	12.53	0.0095**
X ₂ ²	28.17	1	28.17	0.83	0.3913
X ₃ ²	635.04	1	635.04	18.81	0.0034**
Rezidual	236.27	7	33.75		
Uyum eksikliği	35.28	3	11.76	0.23	0.8687
Saf Hata	200.99	4	50.25		
Düzeltilmiş toplam	6748.74	16			
Standart Hata	5.81	9			
Ortalama	76.49	1			
C.V.	3.60				
PRESS	878.50				
R ²	0.96				
Adj-R ²	0.92				
Tahmini R ²	0.87				
Yeterli Kesinlik	17.33				

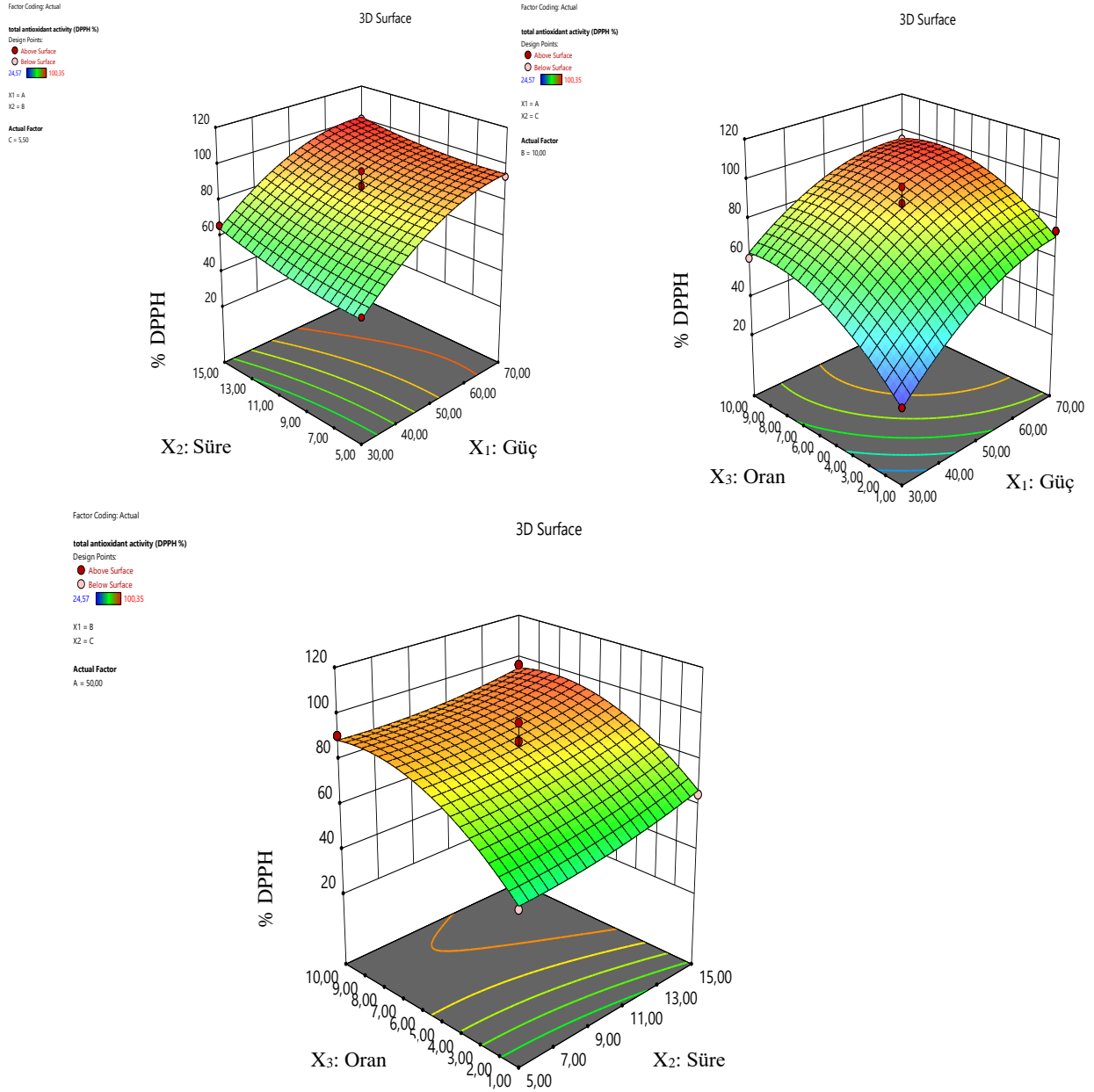
KT: Kareler toplamı, sd:serbestlik derecesi, KTO: Kareler toplamının ortalaması, * $p > 0.05$; ** $p < 0.01$
X₁:Güç, X₂:Süre, X₃:Katı-sıvı oranı

Güç ve katı-sıvı oranının toplam antioksidan aktivite üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) bulunurken, sürenin etkisi istatistiksel olarak önemsiz ($p > 0.05$) bulunmuştur. Şekil 2 toplam antioksidan aktivitenin güç:süre, güç:katı-sıvı oranı ve süre:katı-sıvı oranı faktörlerinin etkileşimlerine değişimini göstermektedir.

Ekstraksiyon süresi ve gücü arttıkça AA artmıştır (Şekil 2A). Katı-sıvı oranının artması da toplam AA'yi artırmıştır (Şekil 2). Elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile uyum sağlamaktadır (Hammi ve ark., 2015; Yılmaz ve ark. 2021).

Aynı sonikasyon gücü (30 W) ve süresinde (10 dakika), katı-sıvı oranı % 1'den % 10'a yükseltince % DPPH % 24.57'den % 60.13'e artmıştır. Aynı sonikasyon gücü (70 W) ve katı-sıvı oranında (% 5.5) ise, ekstraksiyon süresi 5 dakikadan 15 dakikaya çıkınca AA % 93.39'dan % 100.35'e yükselmiştir. Murt meyvesi antioksidan aktivitesi araştırılan bir çalışmada, DPPH radikal süpürme aktivitesi % 93.76 - 98.37 arasında bulunmuştur (Özcan ve ark. 2020). Bir başka çalışmada ise, murt meyvesinin % DPPH radikal süpürme aktivitesi etanolik ekstraksiyon ile % 80.95 olarak bildirilmiştir (Zam ve ark. 2017). Farklı sonuçların elde edilmesi ekstraksiyon koşullarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu



Şekil 2. Toplam antioksidan aktivitenin ultrases-destekli ekstraksiyon parametrelerine bağlı olarak değişimi

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

Optimizasyon doğrulama

Optimizasyon sonrasında deneysel elde edilen sonuçlar tahminlenen değerler ile doğrulanmıştır. TFM ve AA için dizayn tarafından tahminlenen değerler sırasıyla 1.16 g GAE/L ve % 100.34 iken deneysel olarak 1.07 g GAE/L ve % 96.41 olarak bulunmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 5. Deneysel elde edilen sonuçlar ile tahmini değerlerin karşılaştırılması

Faktörler	Tahminlenen	Bulunan	% Hata
TFM	1.16	1.07	% 7.8
AA	100.34	96.41	% 3.9

Bu değerler nokta tahmin değerlerine göre (% 95 PI) kabul edilebilir düzeydedir. Deneysel değerlerin uygunluğu, tahmin aralığı (% 95 PI) değerleri kullanılarak test edilmiştir. Eğer örnek ortalaması tahmin aralığı içindeyse, model doğrulanmış demektir. % 95 PI düşük ve % 95 PI yüksek değerleri, deneysel olarak bulunacak değerlerin en yüksek ve en düşük limitlerini belirtmektedir. TFM için, % 95 PI yüksek ve % 95 PI düşük değerleri sırasıyla 0.94 ve 1.36 g GAE/L olarak bulunmuş olup, optimum nokta sonucu bu değerler arasındadır (Çizelge 5 ve 6). AA için, % 95 PI düşük değeri 79.73 ve % 95 PI yüksek değeri % 120.95 olarak bulunmuştur (Çizelge 6). Optimum noktanın deneysel sonucu, bu değerler arasında olup, kabul edilebilirliğini doğrulayan % 96.41 olarak bulunmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 6. Dizayn sonucu optimum noktaya ait tahmini değerler ve alt-üst sınırlar

Cevaplar	Tahmin	SE ortalama	% 95 CI düşük	% 95 CI yüksek	SE tahmini	% 95 PI düşük	% 95 PI yüksek
TFM	1.16	0.06	1.01	1.32	0.09	0.94	1.36
AA	100.34	5.79	86.65	114.03	8.72	79.73	120.95

TFM:Toplam fenolik madde, AA:Antioksidan aktivite

Sonuç

Bu çalışmada, murt meyvesi biyoaktif bileşiklerinin ultrason-destekli ekstraksiyon koşulları RSM-Box Behnken deney tasarımı ile optimize edilmiştir. Ultrasonik gücün, sürenin ve katı-sıvı oranının toplam fenolik ve toplam antioksidan aktivite üzerine etkileri incelenmiştir. Toplam fenolik madde (TFM) ve antioksidan aktivite (AA) içeriği ultrason gücü ve katı-sıvı oranı arttıkça istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır. En yüksek TFM ve AA'ye sahip optimum ekstraksiyon koşulları 70 W sonikasyon gücü, 15 dakika sonikasyon süresi ve % 7 katı-sıvı oranında elde edilmiştir. Optimum nokta TFM ve DPPH radikal süpürme aktivitesi sırasıyla 1.07 g GAE/L ve % 96.41 olarak bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, yeşil ekstraksiyon tekniği olan USE'nin biyoaktif bileşik ekstraksiyonunda solvent

tüketimini ve ekstraksiyon süresini azaltan etkili bir yol olduğunu ortaya koymaktadır.

Kaynaklar

- Aggul, A.G., Demir, G.M. & Gulaboglu, M. (2022). Ethanol Extract of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries as a Remedy for Streptozotocin-Induced Oxidative Stress in Rats. *Applied Biochemistry Biotechnology* 194, 1645–1658.
- Aksay, S. (2016). Murt (*Myrtus communis* L.) meyvesinin farklı ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan özellikleri. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31(2), 43-50.
- Alipour, G., Dashti, S., Hosseinzadeh, H. (2014). Review of pharmacological effects of *Myrtus communis* L. and its active

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

- constituents. *Phytotherapy Research*, 28(8), 1125-1136.
- Ameer, K., Shahbaz, H.M. , Kwon, J.H. (2017). Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2), 295-315.
- Amiri, S., Shakeri, A., Sohrabi, M.R., Khalajzadeh, S., Ghasemi, E. (2019). Optimization of ultrasonic assisted extraction of fatty acids from *Aesculus hippocastanum* fruit by response surface methodology. *Food Chemistry*, 271, 762-766.
- Bas, D., Boyaci, İ.H. (2007). Modeling and optimization L: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845.
- Capar, T.D., Dedevas, T., Yalcin H., Ekici, L. (2021). Extraction method affects seed oil yield, composition, and antioxidant properties of European cranberrybush (*Viburnum opulus*). *Industrial Crops and Products*, 168, 113632.
- Cavdar, H.K., Yanik, D.K., Gok, U., Gogus, F. (2017). Optimisation of microwave-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil and evaluation of its physicochemical and bioactive properties. *Food Technology and Biotechnology*, 55(1), 86-94.
- Chanioti, S., Tzia, C. (2017). Optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from olive pomace sing response surface technology: Oil recovery, unsaponifiable matter, total phenol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 79, 178-189.
- Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166, 585-595.
- Dang, T.T., Vuong, Q.V., Schreider, M.J., Bowyer, M.C., Altena, I.A.V., Scarlett, C.J. (2017). Optimisation of ultrasound-assisted extraction conditions for phenolic content and antioxidant activities of the alga *Hormosira banksii* using response surface methodology. *Journal of Applied Phycology*, 29(6), 3161-3173.
- Derringer, G., Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219.
- Djemaa-Landri, K., Hamri-Zeghichi, S., Valls, J., Cluzet, S., Tristan, R., Boulahbal, N., Kadri, N., Madani, K. (2020). Phenolic content and antioxidant activities of *Vitis vinifera* L. leaf extracts obtained by conventional solvent and microwave-assisted extractions. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(6), 3551-3564.
- D'Urso, G., Montoro, P., Lai, C., Piacente, S., Sarais, G. (2019). LC-ESI/LTQOrbitrap/MS based metabolomics in analysis of *Myrtus communis* leaves from Sardinia (Italy). *Industrial Crops and Products*, 128, 354-362.
- Giampieri, F, Cianciosi, D, Forbes-Hernández, TY. (2020). Myrtle (*Myrtus communis* L.) berries, seeds, leaves, and essential oils: New undiscovered sources of natural compounds with promising health benefits. *Food Frontiers*, 1: 276– 295.
- Hammi, K.M., Jdey, A., Abdelly, C., Majdoub, H., Ksouri, R. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food Chemistry*, 184, 80-89.
- Hayta, M., İşçimen, E.M. (2017). Optimization of ultrasound-assisted antioxidant compounds extraction from germinated chickpea using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 208-216.

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

- Heleno, S.A., Diz, P., Prieto, M.A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M.F., Ferreira, I. C.F.R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197,1054-1063.
- Jalili, F., Jafari, S.M., Emam-Djomeh, Z., Malekjani, N., Farzaneh, V. (2018). optimization of ultrasound-assisted extraction of oil from canola seeds with the use of response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 11(2), 598-612.
- Khuri, A.I., Mukhopadhyay, S. (2010). Response surface methodology. Wiley Interdisciplinary Reviews: *Computational Statistics*, 2(2), 128-149.
- Medda, S., Mulas, M. (2021). Fruit quality characters of myrtle (*Myrtus communis* L.) selections: Review of a domestication process. *Sustainability*, 13(16), 8785.
- Ozbek, H.N., Yanık, D.K., Fadiloglu, S., Gogus, F. (2020). Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from pistachio (*Pistacia vera* L.) hull. *Separation Science and Technology*, 55(2), 289-299.
- Özcan, M. M., Al Juhaimi, F., Ahmed, I. A. M., Babiker, E. E., & Ghafoor, K. (2020). Antioxidant activity, fatty acid composition, phenolic compounds and mineral contents of stem, leave and fruits of two morphs of wild myrtle plants. *Food Measurement and Characterization*, 14, 1376–1382.
- Pereira, P., Cebola, M.J., Olivera, M.C., Gil, M.G.B. (2017). Antioxidant capacity and identification of bioactive compounds of *Myrtus communis* L. extract obtained by ultrasound-assisted extraction. *Journal of Food Science and Technology*, 54(13), 4362-4369.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. (2005). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2111-7.
- Sharayei, P., Azarpazhooh, E., Zomorodi, S., Ramaswamy, H.S. (2019). Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel. *LWT-Food Science and Technology*, 101, 342-350.
- Tian, Y., Xu, Z., Zheng, B., Lo, Y.M. (2013). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 202-208.
- Tuberoso, C.I.G., Rosa, A., Bifulco, E., Melis, M.P., Atzeri, A., Pirisi, F.M., Dessi, M.A. (2010). Chemical composition and antioxidant activities of *Myrtus communis* L. berries extracts. *Food Chemistry*, 123(4), 1242-1251.
- Yangui, I., Boutiti, M.Z., Boussaid, M., Messaoud, C. (2017). Essential oils of myrtaceae species growing wild in Tunisia: chemical variability and antifungal activity against *biscogniauxia mediterranea*, the causative agent of charcoal canker. *Chemistry & Biodiversity*, 14(7), 1-13.
- Yangui, I., Youndi, F., Ghali, W., Boussaid, M., Messaoud, C. (2021). Phytochemicals, antioxidant and anti-proliferative activities of *Myrtus communis* L. genotypes from Tunisia. *South African Journal of Botany*, 137, 35-45.
- Yılmaz, S. (2020). *Myrtus communis* L. meyvesinin bazı kimyasal ve antioksidatif özelliklerinin belirlenmesi. Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 55s.
- Yılmaz, M.S., Kutlu Kantar, N., Erdem, G.M., Şakıyan Demirkol, Ö., İşçi Yakan, A. (2021). Fenolik bileşiklerin alıç meyvesinden (*Cretegus monogyna*)

Murt Meyvesinin Biyoaktif Bileşiklerinin Ultrases Destekli Ekstraksiyon Koşullarının Yanıt Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

- mikrodalga ve ultrases destekli yöntemler ile ekstraksiyonu. *Gıda*, 46(4), 1002-1015.
- Zam, W., Ali, A., Ibrahim, W. (2017). Improvement of polyphenolic content and antioxidant activity of Syrian myrtle berries (*Myrtus communis* L.) hydroalcoholic extracts using flavoring additives. *Progress in Nutrition*, 26, 112-120.
- Zermane, A., Larkeche, O., Meniai, A.H., Crampon, C., Badens, E. (2016). Optimization of Algerian rosemary essential oil extraction yield by supercritical CO₂ using response surface methodology. *Comptes Rendus Chimie*, 19(4), 538-543.