



## ÇEMEN OTU TOHUMUNDAN FENOLİK BİLEŞENLERİN EKSTRAKSİYONU İÇİN OPTİMİZASYON ÇALIŞMASI

**Sedanur Daştan, İzzet Türker, Hilal İşleroğlu\***

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Tokat,  
Türkiye

Geliş / Received: 14.04.2021; Kabul / Accepted: 07.06.2021; Online baskı / Published online: 02.07.2021

Daştan, S., Türker, İ., İşleroğlu, H. (2021). Çemen otu tohumundan fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için optimizasyon çalışması. *GIDA* (2021) 46 (4) 959-970 doi: 10.15237/gida.GD21071.

Daştan, S., Türker, İ., İşleroğlu, H. (2021). An optimization study on the extraction of phenolic compounds from fenugreek seeds. *GIDA* (2021) 46 (4) 959-970 doi: 10.15237/gida.GD21071.

### ÖZ

Bu çalışmada, çemen otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) tohumundan saf su kullanılarak farklı sıcaklıklarda mekanik karıştırma ile fenolik ekstraktlar elde edilmiştir. Ekstraktların toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TFL) ve antioksidan kapasiteleri (AK) üzerine ekstraksiyon sıcaklığı (30-80°C), ekstraksiyon süresi (10-120 dakika) ve karıştırma hızının (3600-20000 rpm) etkileri incelenmiştir. TFM, TFL ve AK'nin en yüksek değerlere ulaşabilmesi için optimum işlem koşulları Merkezi Kompozit Tasarım kullanılarak 'desirability' fonksiyonu yaklaşımı ile belirlenmiştir. Optimizasyon sonuçlarına göre, 45°C ekstraksiyon sıcaklığı, 65 dakika ekstraksiyon süresi ve 20000 rpm karıştırma hızında ekstraktların TFM içeriği 137.37±1.87 mg gallik asit/g kuru örnek, TFL içeriği 86.96±1.44 mg kuersetin/g kuru örnek ve AK'si 18.11±0.55 mM Trolox/g kuru örnek olarak belirlenmiştir. Çemen otu tohumu ekstraktlarının, yüksek fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesi ile farklı gıda formülasyonlarında kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Çemen otu tohumu, mekanik karıştırma, toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antioksidan kapasite, optimizasyon

## AN OPTIMIZATION STUDY ON THE EXTRACTION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM FENUGREEK SEEDS

### ABSTRACT

In this study, phenolic compounds (PCs) were extracted from fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum* L.) by mechanical agitation using pure water at different temperatures. The effects of the extraction temperature, extraction time, and agitation rate on the total PCs (TPCs), total flavonoids (TFLs), and antioxidant capacities (ACs) of the extracts were investigated. Optimum conditions for which TPCs, TFLs, and ACs reached their highest value were determined using the desirability function of the central composite design. Optimization results at 45°C extraction temperature, 65 min extraction time, and 20000 rpm agitation rate showed that TPCs were 137.37 ± 1.87 mg gallic acid/g dry sample, TFLs were 86.96 ± 1.44 mg quercetin/g dry sample, and ACs were 18.11±0.55

\* Yazışmalardan sorumlu yazar / Corresponding author

✉: hilal.isleroglu@gop.edu.tr

☎:(+90) 356 252 1616/2888

☎:(+90) 356 252 1729

Sedanur Daştan; ORCID no: 0000-0003-1393-5270

İzzet Türker; ORCID no: 0000-0003-0107-1962

Hilal İşleroğlu; ORCID no: 0000-0002-4338-9242

mM Trolox/g dry sample. The fenugreek seed extracts having high amounts of phenolic compounds and high antioxidant capacity are believed to have the potential for use in different food formulations.

**Keywords:** Fenugreek seeds, mechanical agitation, total phenolic compounds, total flavonoid, antioxidant capacity, optimization

## GİRİŞ

Çemen otu tohumu sert köşeli, pürüzlü ve esmer kırmızı görünüme sahip *Trigonella foenum-graecum* L. (Leguminosae) bitkisinin içerisinde yer alan bir tohumdur. Kokusuz olan tohumunun öğütülmüş hali 3-Hydroxy-4,5-Dimethyl-2(5H)-Furanon bileşiği sayesinde kuvvetli bir kokuya sahiptir (Baytop, 1984). Çemen otu tohumu fenolik maddeler, diyet lifi, protein, yağ, azotlu bileşikler, çeşitli mineraller ve vitaminler bakımından oldukça zengin bileşime sahip bir üründür. Zengin bileşiminden dolayı çemen otu tohumunun insan sağlığı üzerinde önemli ve olumlu etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Srinivasan, 2006; Dixit vd., 2005).

Çemen otu tohumunun ekstraksiyonu sonucu elde edilen fenolik ekstraktların önemli oranda antioksidan madde içerikleri bilinmektedir. Çemen otu tohumunda vitesin, trisin, narinjenin, kuersetin ve luteolin gibi flavonoidlerin varlığı yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir (Khorshidian vd., 2016). Aynı zamanda yapılan çalışmalar ile çemen otu tohumu fenolik ekstraktlarının, askorbik asit, glutatyon,  $\beta$ -karoten, alfa tokoferol gibi antioksidan etkiye sahip molekülleri içerdiği de bulgulanmıştır (Kenny vd., 2013; Yadav ve Chowdhury, 2017).

Zengin bileşime sahip çemen otu tohumu, uluslararası ticarete gıda sanayinde kullanılmak üzere lezzet verici ve doğal antibakteriyel ürün olarak kendine yer bulmaktadır. Bunlara ek olarak birçok ürünün formülasyonunda kullanım potansiyeline sahiptir. Ayrıca pastırma yapımında kullanılan kaplamanın da temel bileşenlerinden biridir. Çemen otu tohumundan sağlık alanında ise tahriş giderici, bağırsak yumuşatıcı, gaz giderici, sindirimi kolaylaştırıcı, süt artırıcı olarak yararlanılmaktadır (Abdelgani vd., 1999; Dixit vd., 2005; Gökçe ve Efe, 2016).

Fenolik maddeler, bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden oluşan ikincil metabolitlerdir ve

flavonoidler, lignanlar, stilbenler ve tanenler olarak sınıflandırılmaktadır (Atak ve Uslu, 2018). Fenolik maddeler tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katılmaları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları sebebiyle oldukça önemli gıda bileşenleri olarak değerlendirilirler (Hakkinen, 2000; Tenderis, 2010; Atak ve Uslu, 2018). Fenolik maddelerin alt gruplarından biri olan flavonoidlerin ise tüketildiklerinde özellikle kanser ve kalp rahatsızlıklarının yayılma hızlarını azalttıkları bilinmektedir (Ignat vd., 2011; Birman, 2012). Sağlık açısından etkileri düşünüldüğünde, doğal ürünlerde bulunan fenolik bileşikler gibi biyoaktif bileşenlerin yüksek verimde ekstraksiyonu üzerine birçok araştırma yapılmaktadır. Çemen otu tohumunun bileşimi göz önünde bulundurulduğunda ise çemen otu tohumundan elde edilecek sulu ekstraktların fenolik bileşik açısından zengin olacağı ve bu ekstraktların farklı gıdalarda kullanılabilmesi düşünülmektedir. Dünyada ve Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan çemen otu tohumundan fenolik madde ekstraksiyonu ile ilgili literatürde çalışmalar bulunmaktadır (Belguith-Hadriche vd., 2013; Kenny vd., 2013; Al-Juhaimi vd., 2016). Ancak yapılan literatür araştırmasında, çemen otu tohumlarından fenolik ekstrakt elde edilebilmesi amacıyla farklı sıcaklıklarda karıştırma işleminin uygulandığı ve işlem parametrelerinin ekstraktta bulunan fenolik maddelerin miktarı üzerine etkilerinin incelenerek optimizasyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Fenolik maddeler gibi biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon koşullarından önemli oranda etkilendiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur. Ekstraksiyon verimini en fazla etkileyen parametreler çözgen çeşidi, çözgen konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi, ekstraksiyon sıcaklığı ve karıştırma hızı olarak bildirilmiştir (Goli vd., 2005; Belguith-Hadriche vd., 2013; Ballard vd., 2009; Zuorro vd., 2016). Literatürde, ekstraksiyon sıcaklığının artması ile fenolik

maddelerin ekstraksiyon veriminin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (Benmeziane vd., 2014; Dorta vd., 2012). Yang vd. (2009), gardenya meyvesinden fenolik madde ekstraksiyonunda ekstraksiyon sıcaklığındaki artışın fenolik madde ekstraksiyonuna doğrusal olarak etki ettiğini bildirerek yaptıkları çalışmada optimum ekstraksiyon sıcaklığını 73°C olarak tespit etmişlerdir. Mokrani ve Madani (2016), şeftali ile ilgili yaptıkları ekstraksiyon çalışmasında ise farklı ekstraksiyon sıcaklıklarının fenolik madde ekstraksiyonunu önemli ölçüde etkilediğini belirtmişlerdir. Sıcaklığın artması ile birlikte toplam fenolik madde veriminin düştüğünü, bununla birlikte sıcaklığın artışına bağlı olarak toplam flavonoid veriminin arttığını gözlemlemişlerdir. Sıcaklık, bitki dokusunun yumuşamasına ve fenol-protein ve fenol-polisakarit etkileşimlerin zayıflamasına ve böylece daha fazla polifenolün çözücüye geçmesine neden olabilmektedir. Benzer şekilde genellikle glikozit yapıda olan ve bitki dokularında bulunan flavonoidlerin, ekstraksiyon sıcaklığının belirli bir düzeye kadar artırılması ile ekstraksiyon verimlerinin arttığı bildirilmiştir (Mokrani ve Madani 2016). Bazı çalışmalarda ise sıcaklık artışının belli bir noktadan sonra fenolik maddeler üzerinde olumsuz etki yaparak azaltma eğilimine neden olduğu sonucuna varılmıştır (Silva vd., 2007; Sun vd., 2011; Yim vd., 2011; Ballard vd., 2009).

Bu çalışmanın amacı, çemen otu tohumunda bulunan fenolik maddelerin mekanik karıştırma işlemi ile farklı sıcaklıklarda ve sürelerde ekstraksiyonunun sağlanması ve en yüksek fenolik madde ekstraksiyonunun sağlandığı optimum işlem koşullarının tespit edilmesidir.

## MATERYAL VE YÖNTEM

### Materyal

Çalışmada Tokat ilinde yetiştirilmiş çemen otu (*Trigonella foenum-graecum* L.) bitkisinin tohum kısımları kullanılmıştır. Tohumlar bir blender (Sinbo SHB 3020, Türkiye) yardımı ile toz hale getirilmiş ve 630 µm gözenek çapına sahip elek kullanılarak elek altında kalan toz örnekler toplanmıştır. Kullanıma hazır hale getirilen toz tohum örnekleri analizler yapıncaya kadar oda sıcaklığında karanlık bir ortamda depolanmıştır.

### Ekstraksiyon işlemi ve Optimizasyon

Toz forma getirilmiş çemen otu tohumu örneklerinden fenolik maddelerin ekstraksiyonu amacı ile çözügen olarak yalnızca saf su kullanılmıştır. Yapılan ön denemeler ile toz örnek/saf su karışım oranı 0.5 g/50 mL olarak belirlenmiş ve tüm koşullarda sabit tutulmuştur. Ekstraksiyon işlemi için mekanik bir homojenizatör (IKA-Works, Ultra Turrax T-18 Basic, Almanya) kullanılmış ve farklı karıştırma hızları (3600, 11200 ve 20000 rpm) ve sıcaklıklarda (30, 55 ve 80°C) ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TFL) ve antioksidan kapasite (AK) değerlerini sağlayacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu 'Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design)' kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan deneysel tasarım Çizelge 1'de gösterilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde ekstraksiyon yöntemine özgü işlem değişkenlerinin TFM, TFL ve AK üzerine etkisi incelenerek en yüksek değerlere sahip ekstrakt eldesini sağlayacak ekstraksiyon işlemi 'desirability' fonksiyon yaklaşımına göre optimize edilmiştir. Oluşturulan matematiksel modellere göre ekstraksiyon verimi için modeldeki anlamlı terimler varyans analizi ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen yanıtların regresyon analizi için Eşitlik (1)'de verilen model kullanılmıştır.

$$\begin{aligned} \text{TFM, TFL ve AK} = & \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \\ & \sum_{i=1}^k \beta_i X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_{ij} \quad k=1, 2 \end{aligned} \quad (1)$$

Eşitlikte  $\beta_0$  sabit katsayıyı,  $\beta_i$  i'inci gözlemin katsayısını,  $\beta_{ij}$  i'inci gözlemin j'inci katsayısını,  $k$  bağımsız değişken sayısını,  $X_i$  i'inci bağımsız değişkeni,  $X_{ij}$  ise i'inci gözlemin j'inci bağımsız değişkenini ifade etmektedir.

Ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra örneklerin analizlerde kullanılabilir hale getirilebilmesi için elde edilen süspansiyonlara öncelikle 6000 rpm ve 5 dakika süre ile santrifüj işlemi uygulanmıştır (Hettich EBA 21, Almanya).

Sonrasında süpernatant faz kaba filtre kâğıdı ile süzülerek toplanmış ve analizler süpernatant fazlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **Toplam fenolik madde tayini**

Örneklerin TFM miktarları Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Folin-Ciocalteu çözeltisi, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve örnekleri içeren karışımlar 25 dakika süre ile oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra 3800 rpm ve 10 dakika süre ile santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Süpernatant fazların 725 nm dalga boyunda absorbanları okunarak (P&G Instruments T80+, Birleşik Krallık) TFM miktarları gallik asit (Sigma-Aldrich, Almanya) ekivalanı (mg gallik asit /g kuru örnek) cinsinden ifade edilmiştir (Claus vd., 2015).

#### **Toplam Flavonoid tayini**

Örneklerin TFL miktarı alüminyum klorür yöntemi kullanarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Örneklerin absorban değerleri 510 nm'de okunarak TFL miktarları kuersetin (BLD Pharmatech Ltd., Çin) ekivalanı (mg kuersetin/g kuru örnek) cinsinden hesaplanmıştır (Gaafar ve Salama, 2013).

#### **Antioksidan kapasite tayini**

Örneklerin antioksidan kapasitesi 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal söndürücü kapasite yöntemi ile belirlenmiştir. DPPH (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisi ile karıştırılan örnekler 30 dakika süre ile oda sıcaklığında karanlıkta bekletilerek 515 nm dalga boyunda absorbanları okunmuştur. Antioksidan kapasite trolox (Sigma-Aldrich, Almanya) cinsinden (mM Trolox/g kuru örnek) ifade edilmiştir (Brand-Williams vd., 1995).

#### **İstatistiksel analiz**

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 ve Design Expert 7.0 paket programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tahminlenen değerler ile deneysel veriler arasında fark olup olmadığını belirlemeye yönelik tek örnek t-testi ve örnekler arasındaki Pearson katsayılarının hesaplanması SPSS 22.0 paket programı kullanılarak, işlem değişkenlerinin TFM, TFL ve AK üzerine etkisini belirlemede uygulanan regresyon analizi, istatistiksel analizler, izohips grafikleri, yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon işlemleri Design Expert

7.0 (Stat-Ease Inc., ABD) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **SONUÇ VE TARTIŞMA**

Deneysel tasarımda belirlenen tüm koşullar için uygulanan ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir. Elde edilen ekstraktların TFM değerleri 21.01-136.33 mg gallik asit/g kuru örnek, TFL değerleri 12.31-88.26 mg kuersetin/g kuru örnek ve AK değerleri 2.69-17.67 mM Trolox/g kuru örnek aralığında belirlenmiştir. Çemen otu tohumu ile yapılan ekstraksiyon çalışmaları incelendiğinde, metanol, etil asetat ve etanol gibi organik çözümler kullanılarak 78.1-85.9 mg gallik asit/g kuru örnek TFM içeren ekstraktlar elde edildiği görülmüştür (Belguith-Hadriche vd., 2013; Kenny vd., 2013). Ayrıca, literatürde çemen otu tohumunun TFL içeriğini yalnızca saf su kullanarak belirleyen bir çalışmada TFL değeri 17.49 mg kuersetin/g kuru örnek olarak tespit edilmiştir ve çemen otu tohumunda TFM içeriğinin yaklaşık %37'sinin TFL olduğu bildirilmiştir (Dixit vd., 2005). Farklı bir çalışmada, çemen otu tohumunun yetiştiği bölgenin iklim koşullarına bağlı olarak 100 mg/g kuru örnek düzeyine kadar flavonoid içerebileceği belirtilmiştir (Gupta ve Nair, 1999). Bu çalışmada ise 55°C ekstraksiyon sıcaklığı, 65 dakika ekstraksiyon süresi ve 20000 rpm karıştırma hızında 88.26 mg kuersetin/g kuru örnek düzeyinde TFL elde edilmiştir. Tüm koşullarda örneklerin TFL içeriği TFM içeriğinin ortalama olarak yaklaşık %60'ını oluşturmaktadır.

Elde edilen sonuçlara göre, 80°C'de yapılan ekstraksiyon işlemlerinde TFM, TFL ve AK değerlerinin, 30 ve 55°C'de gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerine kıyasla daha düşük olduğu bulgulanmıştır (Çizelge 1). Bu durumun yüksek sıcaklığın bazı flavonoidler üzerine olumsuz etkisinden ileri geldiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Silva vd. (2007), *Inga edulis* yapraklarından fenolik madde ekstraksiyonu gerçekleştirdikleri çalışmada flavonoid veriminin olumsuz etkilenmediği en yüksek ekstraksiyon sıcaklığını 62.5°C olarak belirlemişlerdir.

Çizelge 1 incelendiğinde, genel olarak 10 dakikalık ekstraksiyon işleminin TFM, TFL ve AK değerlerinin en yüksek seviyede elde edilmesi için

yeterli olmadığı görülmektedir. Buna karşın, yüksek karıştırma hızında 10 dakikalık ekstraksiyon işlemi ile TFM, TFL ve AK değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir. Yüksek karıştırma hızlarında sağlanan mekanik etki ile fenolik bileşenlerin hücre çeperinden çıkması daha kolay olabilmekte ve böylece daha yüksek TFM içeriğine sahip ekstraktlar elde edilebilmektedir. Çizelge 1’de en yüksek TFM, TFL ve AK değerlerinin en yüksek karıştırma hızında (20000 rpm), 30-55°C ekstraksiyon sıcaklıklarında ve 65 dakikalık ekstraksiyon süresinde elde edildiği görülmektedir. Ekstraktların fenolik madde içeriğine etki eden parametrelerden ekstraksiyon süresi, optimizasyon işlemleri için büyük önem taşır. Elde edilen sonuçlara göre, 30 ve 55°C’de gerçekleşen 120 dakikalık ekstraksiyon işleminin 65 dakikalık ekstraksiyon işlemine oranla TFM, TFL ve AK değerlerini düşürücü yönde etkisi olduğu tespit edilmiştir. Karıştırma hızının artması ile çözgen damlacıklarının boyutu küçülür ve katı faz ile çözgen arasındaki temas yüzeyi artış gösterir. Ayrıca, yüksek hızda mekanik karıştırma işlemi hücre yapısını bozan mekanik bir işlem olarak tanımlanır ve hücre içinde bulunan, mekanik etki olmaksızın çözüme geçmesi mümkün olmayan hücre bileşenlerinin (bazı fenolik maddeler vb.) geçişini kolaylaştırır (Zhu vd., 2016; Javaldi, 2020). Bu doğrultuda, çalışmada uygulanan 20000 rpm karıştırma hızında en yüksek TFM, TFL ve AK değerleri elde edilmiştir. Yapılan çalışmada, TFM-TFL ve TFM-AK değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ve korelasyon katsayıları sırasıyla 0.997 ve 0.995 olarak hesaplanmıştır ( $P < 0.05$ ).

Gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda işlem değişkenlerinin TFM, TFL ve AK değerleri üzerine etkisi varyans analizi (ANOVA) çizelgesi ile verilmiştir (Çizelge 2). Her üç analiz için oluşturulan kuadratik modeller istatistiksel olarak %99 seviyesinde anlamlıdır ( $P < 0.01$ ) ve model uygunsuzluğu %95 güven seviyesinde istatistiksel olarak anlamsızdır ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 2). Oluşturulan modellerin deneysel verileri yüksek doğruluk ile açıklayabilmesi için gereken kriterlerden biri, model uygunsuzluğu verilerinin istatistiksel olarak önemsiz bulunmasıdır (Myers

ve Montgomery, 1995) ve yapılan çalışmada model uygunsuzluğu verilerinin istatistiksel olarak önemsiz olması ( $P > 0.05$ ), TFM, TFL ve AK için oluşturulan ikinci dereceden polinomial modellerin başarısını ortaya koymaktadır.

Sonuçlara göre, TFM, TFL ve AK için oluşturulan modellerde her bir işlem değişkeninin doğrusal ve kuadratik etkileri %99 seviyesinde anlamlıdır ( $P < 0.01$ ) (Çizelge 2). Buna karşın ekstraksiyon sıcaklığı-karıştırma hızı interaksiyonunun TFM, TFL ve AK modelleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir etkisi bulunmamaktadır ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 2).

Model uygunsuzluğu değerlerine ek olarak, modelin deneysel verileri ne ölçüde karşıladığı  $R^2$ , düzeltilmiş  $R^2$  (Düz- $R^2$ ), yeterli tahminleme, tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı (PRESS) ve varyasyon katsayısı C.V. (%) ile belirlenmiştir (Çizelge 3). Oluşturulan modellerin tümü için varyasyonun oldukça önemli bir kısmı model tarafından açıklanabilmektedir ( $R^2 > 0.99$ ). Buna karşın modele eklenebilecek yeni terimlerin her zaman  $R^2$  değerini artırma eğiliminde olması nedeniyle, model uygunluğunun ifadesinde Düz- $R^2$  değerlerinin kullanılması önerilir (Myers ve Montgomery, 1995). Sonuçlara göre, TFM, TFL ve AK için oluşturulan modellerde  $R^2$  ve Düz- $R^2$  değerleri birbirine oldukça yakın olarak belirlenmiştir (Çizelge 3) ve bu durum modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir.

Ekstraksiyon işlemleri için oluşturulan ve optimizasyon çalışmasında regresyon analizi ile elde edilen ikinci dereceden polinomial modeller TFM için Eşitlik (2), TFL için Eşitlik (3) ve AK için Eşitlik (4) ile verilmiştir (20000 rpm karıştırma hızı için). Ek olarak, en yüksek değerlerin sağlandığı 20000 rpm karıştırma hızı sabit tutularak ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin TFM, TFL ve AK üzerine etkisini gösteren 3D Yanıt Yüzey Grafikleri Şekil 1’de gösterilmiştir. Ayrıca, deneysel veriler ile modellerden tahminlenen veriler arasındaki ilişki Şekil 2’de verilmiştir.

$$\text{TFM (mg gallik asit/g kuru örnek)} = +18.94+4.08X_1+0.86X_2+3.98\times 10^{-3}X_1X_2-0.05X_1^2-7.47\times 10^{-3}X_2^2 \quad (2)$$

$$\text{TFL (mg kuersetin/g kuru örnek)} = +10.69+2.67X_1+0.55X_2+2.72\times 10^{-3}X_1X_2-0.03X_1^2-4.85\times 10^{-3}X_2^2 \quad (3)$$

$$\text{AK (mM Trolox/g kuru örnek)} = +2.75+0.52X_1+0.11X_2+5.18\times 10^{-4}X_1X_2-6.30\times 10^{-3}X_1^2-9.97\times 10^{-4}X_2^2 \quad (4)$$

Çizelge 1. Deneysel tasarım ve elde edilen toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite değerleri

Table 1. Experimental design and obtained total phenolic compounds, total flavonoid and antioxidant capacity values

Deneme No.	Ekstraksiyon	Ekstraksiyon	Karıştırma Hızı (rpm) (X <sub>3</sub> ) <i>Agitation Rate</i> (rpm) (X <sub>3</sub> )	TFM	TFL	AK
	Sıcaklığı (°C) (X <sub>1</sub> ) <i>Extraction</i> <i>Temperature</i> (°C) (X <sub>1</sub> )	Süresi (dak) (X <sub>2</sub> ) <i>Extraction</i> <i>Time</i> (min) (X <sub>2</sub> )		(mg gallik asit/g kuru örnek) <i>TPC</i> (mg gallic acid/g dry sample)	(mg kuersetin/g kuru örnek) <i>TFL</i> (mg quercetin/g dry sample)	(mM Trolox/g kuru örnek) <i>AC</i> (mM Trolox/g dry sample)
	1	55 (0)		65 (0)	20000	134.88
2	30 (-1)	65 (0)	20000	130.05	83.31	16.91
3	55 (0)	65 (0)	11200	126.92	81.16	16.45
4	30 (-1)	120 (+1)	3600	96.04	61.90	12.56
5	55 (0)	65 (0)	3600	115.94	74.29	15.01
6	55 (0)	65 (0)	11200	128.61	82.44	16.70
7	55 (0)	65 (0)	20000	133.07	85.35	17.32
8	30 (-1)	10 (-1)	3600	81.93	52.29	10.67
9	55 (0)	10 (-1)	3600	80.00	51.30	10.36
10	55 (0)	65 (0)	11200	125.23	80.28	16.24
11	80 (+1)	65 (0)	11200	66.24	42.52	8.88
12	30 (-1)	120 (+1)	11200	103.15	66.26	13.38
13	80 (+1)	120 (+1)	20000	63.95	40.89	8.26
14	55 (0)	10 (-1)	11200	92.06	58.99	11.69
15	80 (+1)	65 (0)	3600	60.58	37.80	7.86
16	55 (0)	65 (0)	3600	114.73	73.53	14.86
17	55 (0)	65 (0)	3600	116.06	74.64	15.17
18	80 (+1)	10 (-1)	20000	40.55	25.93	5.50
19	55 (0)	120 (+1)	20000	116.66	74.81	15.12
20	55 (0)	65 (0)	3600	110.51	70.97	14.55
21	30 (-1)	10 (-1)	20000	105.45	67.31	13.89
22	55 (0)	65 (0)	20000	136.33	87.44	17.57
23	55 (0)	120 (+1)	11200	112.20	71.56	14.55
24	80 (+1)	120 (+1)	11200	65.88	42.63	8.47
25	80 (+1)	120 (+1)	3600	56.96	36.23	7.45
26	30 (-1)	65 (0)	11200	122.69	78.66	15.94
27	30 (-1)	65 (0)	3600	105.69	67.66	13.89
28	55 (0)	10 (-1)	20000	102.43	65.10	13.33
29	30 (-1)	120 (+1)	20000	104.00	65.27	13.53
30	80 (+1)	10 (-1)	3600	21.01	12.31	2.49
31	55 (0)	65 (0)	20000	135.36	86.51	17.67
32	80 (+1)	10 (-1)	11200	32.83	19.59	4.12
33	80 (+1)	65 (0)	20000	73.72	47.58	9.70
34	55 (0)	65 (0)	11200	125.11	80.92	16.45
35	30 (-1)	10 (-1)	11200	89.04	56.77	11.38
36	55 (0)	120 (+1)	3600	104.72	67.71	13.63
37	55 (0)	65 (0)	11200	124.38	79.18	16.19
38	55 (0)	65 (0)	3600	113.05	72.72	14.66
39	55 (0)	65 (0)	20000	135.12	88.26	17.47

TFM: Toplam Fenolik Madde, TFL: Toplam Flavonoid, AK: Antioksidan Kapasite

TPC: Total Phenolic Compounds, TFL: Total Flavonoid, AC: Antioxidant Capacity

Çizelge 2. Lineer, kuadratik ve interaksiyon terimlerinin etkisini gösteren ANOVA tablosu

Table 2. ANOVA table representing the effect of linear, quadratic and interaction terms

Varyasyon Kaynağı Source	SD DF	Kareler Toplamı Sum of Squares			F Değeri F Value			P - Değeri P - Value		
		TFM	TFL	AK	TFM	TFL	AK	TFM	TFL	AK
		TPC	TFL	AC	TPC	TFL	AC	TPC	TFL	AC
Model Model	11	35245.9	14823.6	599.4	567.4	492.9	747.9	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>1</sub>	1	11567.5	4800.0	196.2	2048.3	1755.6	2692.9	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>2</sub>	1	1765.7	769.2	30.8	312.7	281.3	422.0	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>3</sub>	2	2133.0	878.2	36.3	188.9	160.6	249.1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	1	358.8	167.8	6.1	63.5	61.4	83.4	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	2	23.0	3.3	0.3	2.0	0.6	1.9	0.1507	0.5582	0.1657
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	2	139.7	70.7	3.4	12.4	12.9	23.3	0.0002	0.0001	< 0.0001
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	1	7846.3	3315.3	128.5	1389.4	1212.5	1764.1	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	1	4228.5	1785.2	75.5	748.8	652.9	1035.8	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
Kalıntı Residual	27	152.5	73.8	2.0						
Model Uygunsuzluğu Lack of Fit	15	113.6	54.3	1.5	2.3	2.22	2.4	0.0723	0.0849	0.0641
Saf Hata Pure Error	12	38.9	19.5	0.5						
Toplam Total	38	35398.4	14897.5	601.3						

X<sub>1</sub>: Ekstraksiyon sıcaklığı (°C), X<sub>2</sub>: Ekstraksiyon süresi (dak), X<sub>3</sub>: Karıştırma hızı (rpm), TFM: Toplam fenolik madde, TFL: Toplam Flavonoid, AK: Antioksidan kapasite, SD: Serbestlik derecesi

X<sub>1</sub>: Extraction temperature (°C), X<sub>2</sub>: Extraction time (min), X<sub>3</sub>: Agitation rate (rpm), TPC: Total phenolic compounds, TFL: Total flavonoid, AC: Antioxidant capacity, DF: Degrees of freedom

Çizelge 3. Ekstraksiyon modeli için elde edilen istatistiksel parametreler

Table 3. Statistical parameters for the extraction model

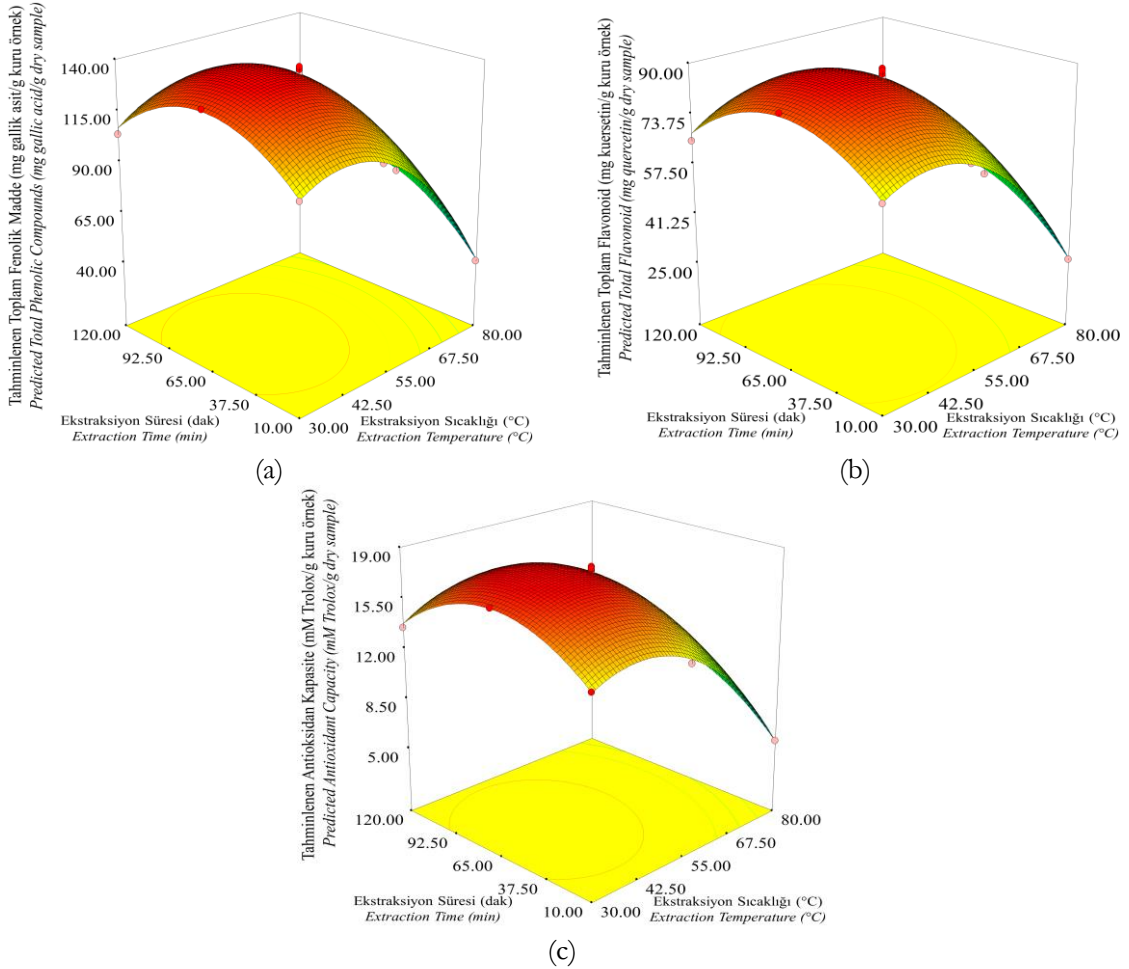
Parametre Parameter	TFM TPC	TFL TFL	AK AC
R <sup>2</sup>	0.9957	0.9950	0.9967
Düz-R <sup>2</sup> Adj- R <sup>2</sup>	0.9939	0.9930	0.9954
Yeterli Tahminleme Adequate Precision	86.108	80.930	99.744
PRESS	397.55	189.54	5.11
C.V. (%)	2.37	2.58	2.07

TFM: Toplam fenolik madde, TFL: Toplam Flavonoid, AK: Antioksidan kapasite, Düz-R<sup>2</sup>: Düzeltilmiş R<sup>2</sup>, PRESS: Tahminlenmiş kalıntı hata kareler toplamı, C.V. (%): Varyasyon katsayısı

TPC: Total phenolic compounds, TFL: Total flavonoid, AC: Antioxidant capacity, Adj- R<sup>2</sup>: Adjusted R<sup>2</sup>, PRESS: Predicted residual error sum of squares, C.V. (%): Coefficient of Variation

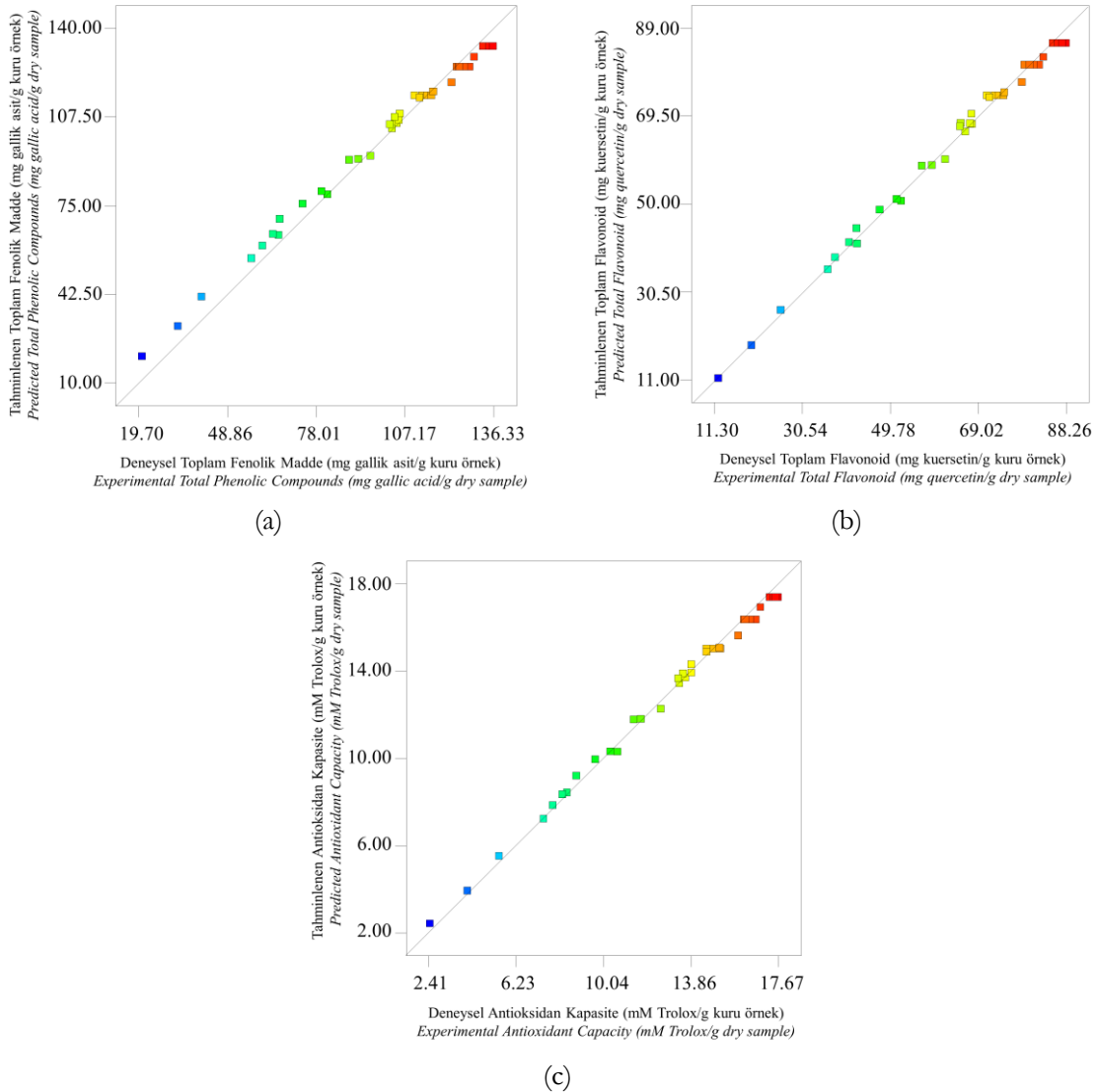
Şekil 1’de ekstraksiyon sıcaklığının artması ile birlikte TFM, TFL ve AK değerlerinin azaldığı görülmektedir. TFM içeriğinin azalmasına paralel olarak TFL ve AK değerleri de azalmıştır. Böylelikle TFL ve AK üzerine sıcaklığın etkisi, TFM için elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermiştir. Bu doğrultuda TFM, TFL ve AK için en yüksek değerlerin elde edildiği noktalar

birbirine oldukça yakındır. Şekil 2’de ise TFM, TFL ve AK için elde edilen deneysel veriler ile oluşturulan polinomiyal modellerden tahminlenen veriler kıyaslanmış ve verilerin 45° doğrusu üzerinde toplandığı görülmüştür. Bu durum, oluşturulan üç farklı modelin de uygunluğunu desteklemektedir.



Şekil 1. 20000 rpm karıştırma hızında ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin etkisini gösteren 3D Yanıt Yüzey Grafikleri: (a) toplam fenolik madde (b) toplam flavonoid (c) antioksidan kapasite  
Figure 1. 3D Response Surface Graphs showing the effects of temperature and time at 20000 rpm of agitation rate: (a) total phenolic compounds, (b) total flavonoid, (c) antioxidant capacity





Şekil 2. Deneysel veriler ile tahminlenen veriler arasındaki ilişki: (a) toplam fenolik madde (b) toplam flavonoid (c) antioksidan kapasite  
 Figure 2. The relationship between experimental and estimated values: (a) total phenolic compounds, (b) total flavonoid, (c) antioxidant capacity

3D Yanıt Yüzey Grafiğinde gösterildiği gibi, yanıt olarak seçilen TFM, TFL ve AK değerlerinin tümünün en yüksek oranda sağlanabileceği koşul için nümerik optimizasyon çalışması yapılmıştır. Design Expert 7.0 paket programı kullanılarak 'desirability' fonksiyonu yaklaşımına göre optimum noktayı veren ve birbirine yakın 11 adet çözüm belirlenmiştir. Elde edilen bu çözümlerden 45°C ekstraksiyon sıcaklığı, 65 dakika ekstraksiyon süresi ve 20000 rpm karıştırma hızı

ekstraksiyon işlemi için optimum işlem koşulları olarak belirlenmiştir. Bu noktada TFM, TFL ve AK değerleri sırası ile 139.04 mg gallik asit/g kuru örnek, 89.09 mg kuersetin/g kuru örnek ve 18.11 mM Trolox/g kuru örnek olarak tahminlenmiştir. TFM, TFL ve AK için üç tekrarlı gerçekleştirilen optimum nokta doğrulama denemelerine göre değerler sırası ile  $137.37 \pm 1.87$  mg gallik asit/g kuru örnek,  $86.96 \pm 1.44$  mg kuersetin/g kuru örnek ve  $18.11 \pm 0.55$  mM Trolox/g kuru örnek

olarak tespit edilmiştir. Tahminlenen ve deneysel veriler arasında istatistiksel olarak önemli bir fark olup olmadığı ise tek örnek t-testi ile tespit edilmiş, değerler arasında istatistiksel bir fark bulunmadığı görülmüştür ( $P > 0.05$ ).

Bu çalışma ile çemen otu tohumundan mekanik karıştırma işlemi ile fenolik ekstraktlar elde edilmiş, işlem koşullarının (ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve karıştırma hızı) ekstraksiyona etkisi belirlenerek bu parametrelerin en yüksek TFM, TFL ve AK değerlerinin elde edildiği noktada optimizasyonu sağlanmıştır. Sonuçlara göre seçilen işlem değişkenleri ekstraktların TFM, TFL ve AK değerlerini önemli oranda etkilemişlerdir. Çemen otu tohumundan elde edilen ekstraktların yüksek fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitesi ile gıda endüstrisi için önemli bir doğal antioksidan kaynağı olabileceği düşünülmektedir. Çözgen olarak yalnızca saf su kullanılarak üretilen ve karmaşık sistemler gerektirmeyen bu ekstraktların üretimi ve optimizasyonu, ilerleyen zamanlarda ürünün model gıdalarda kullanılmasına fayda sağlayabilecektir.

#### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu makale ile ilgili çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

#### YAZAR KATKILARI

Sedanur DAŞTAN ve İzzet TÜRKER analizlerin gerçekleştirilmesi, sonuçların istatistiksel analizi ve makalenin yazım aşamalarında; Hilal İŞLEROĞLU fikir, tasarım, yöntem, danışmanlık ve makalenin yazım aşamalarında katkı sağlamıştır. Makalenin son hali tüm yazarlar tarafından okunarak onaylanmıştır.

#### TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (Proje No: 2020/125) tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

#### KAYNAKLAR

Abdelgani, M.E., Elsheikh, E.A.E, Mukhtar, N.O. (1999). The effect of rhizobium inoculation and chemical fertilization on seed quality of

fenugreek. *Food Chem*, 64(3): 289-293, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00098-3.

Al-Juhaimi, F., Adiamo, O.Q., Ghafoor, K., Babiker, E.E. (2016). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed. *CyTA-J Food*, 14(3): 369-374, doi: 10.1080/19476337.2015.1110202.

Atak, E., Uslu, M.E. (2018). Fenolik bileşikler, ekstraksiyon metotları ve analiz yöntemleri. *MCBÜ Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimleri Dergisi*, 27(3): 40-48.

Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S.F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *J Agric Food Chem*, 57(8): 3064-3072, doi: 10.1021/jf8030925.

Baytop, T. (1984). Türkiye'de bitkiler ile tedavi. *İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları* No: 3255, İstanbul.

Belguith-Hadriche, O., Bouaziz, M., Jamoussi, K., Simmonds, M. S., El Feki, A., Makni-Ayedi, F. (2013). Comparative study on hypocholesterolemic and antioxidant activities of various extracts of fenugreek seeds. *Food Chem*, 138(2-3): 1448-1453, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.003.

Benmeziane, F., Djamai, R., Cadot, Y., Seridi, R. (2014). Optimization of extraction parameters of phenolic compounds from Algerian fresh table grapes, (*Vitis Vinifera*). *Int Food Res J*, 21(3): 1025-1029.

Birman, H. (2012). Bioactivities of plant flavonoids and the possible action mechanisms. *J Ist Faculty Med*, 75(3): 46-49.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.W.T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol*, 28(1): 25-30, doi: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

Claus, T., Maruyama, S.A., Palombini, S.V., Montanher, P.F., Bonafé, E.G., Junior, O.D.O.S., Matsushita, M., Visentainer, J.V. (2015). Chemical characterization and use of artichoke parts for protection from oxidative stress in canola oil.

- LWT-Food Sci Technol*, 61(2): 346-351, 10.1016/j.lwt.2014.12.050.
- Dixit, P., Ghaskadbi, S., Mohan, H., Devasagayam, T.P. (2005). Antioxidant properties of germinated fenugreek seeds. *Phytother Res*, 19(11): 977-983, doi: 10.1002/ptr.1769.
- Dorta, E., Lobo, M. G., Gonzalez, M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *J Food Sci*, 77(1): C80-C88, doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02477.x.
- Gaafar, A.A., Salama, Z.A. (2013). Phenolic compounds from artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-products and their antimicrobial activities. *J Biol Agric Healthcare*, 3(12): 1-6.
- Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A. (2005). Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts. *Food Chem*, 92(3): 521-525, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.08.020.
- Gökçe, Z., Efe, L. (2016). Çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.) bitkisinin kullanım alanları ve tıbbi önemi. *Neşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5: 355-363, doi: 10.17100/nevbittek.210988.
- Gupta, R., Nair, S. (1999). Antioxidant flavonoids in common Indian diet. *South Asian Journal of Preventive Cardiology*, 3: 83-94.
- Hakkinen, S. (2000). Flavonols and fenolic acids in berries and berry products. Doctoral Thesis. Kuopio University Publications D. Medical Sciences. 90 p.
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*, 126(4): 1821-1835, doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.026.
- Kenny, O., Smyth, T. J., Hewage, C. M., Brunton, N. P. (2013). Antioxidant properties and quantitative UPLC-MS analysis of phenolic compounds from extracts of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and bitter melon (*Momordica charantia*) fruit. *Food Chem*, 141(4): 4295-4302, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.016.
- Khorshidian, N., Yousefi Asli, M., Arab, M., Adeli Mirzaie, A., Mortazavian, A. M. (2016). Fenugreek: potential applications as a functional food and nutraceutical. *Nutr Food Sci Res*, 3(1): 5-16.
- Mokrani, A., Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Sep Purif Technol*, 162: 68-76, doi: 10.1016/j.seppur.2016.01.043.
- Myers, R.H., Montgomery, D.C. (eds.) (1995). *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, 2nd ed. John Wiley and Sons, New York, USA, 700 p.
- Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. (2007). Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* Leaves using response surface methodology. *Sep Purif Technol*, 55(3): 381-387, doi: 10.1016/j.seppur.2007.01.008.
- Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A review of health beneficial physiological effects. *Food Rev Int*, 22(2): 203-224, doi: 10.1080/87559120600586315.
- Sun, Y., Xu, W., Zhang, W., Hu, Q., Zeng, X. (2011). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from kudingcha made from *Ilex kudingcha* C.J. Tseng by using response surface methodology. *Sep Purif Technol*, 78(3): 311-320, doi: 10.1016/j.seppur.2011.01.038.
- Tenderis, B. (2010). Üzüm çekirdeğinden fenolik madde ekstraksiyonu (Yüksek Lisans Tezi), Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, 1-62.
- Yadav, R., Chowdhury, P. (2017). Screening the Antioxidant activity of *Trigonella Foenum graecum* seeds. *International Journal of Pharmaceutical Research and Applications*, 2(1): 65-70.
- Yang, B., Lu, X., Gao, Y. (2009). Extraction optimization of bioactive compounds (crocin, geniposide and total phenolic compounds) from gardenia (*gardenia jasminoides* ellis) fruits with response surface methodology. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 10(4): 610-615, doi: 10.1016/j.ifset.2009.03.003.
- Yim, H.S., Chye, F.Y., Koo, S.M., Matanjun, P., How, S.E., Ho, C.W. (2011). Optimization of

extraction time and temperature for antioxidant activity of edible wild mushroom, *Pleurotus porrigens*. *Food Bioprod Process*, 90(2): 235-242, doi: 10.1016/j.fbp.2011.04.001.

Zuorro, A., Maffei, G., Lavecchia, R. (2016). Reuse potantial of artichoke (*Cynara scolymus* L.)

waste for the recovery of phenolic compounds and bioenergy. *J Clean Prod*, 111, Part A: 279-284, doi: 10.1016/j.jclepro.2015.06.01.