




Acı Biber Salçası Atıklarından Ultrason Destekli Ekstraksiyon İşlemiyle Karotenoid Ekstraksiyonu

Merve Civan , Seher Kumcuoğlu  ✉, Şebnem Tavman 

Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü 35100 Bornova, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 22.12.2017, Kabul Tarihi (Accepted): 15.09.2018

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): seher.kumcuoglu@ege.edu.tr (S. Kumcuoğlu)

☎ 0 232 311 30 23 📠 0 232 311 48 31

ÖZ

Bu çalışmada, acı biber salçasının atığı olan posadan karotenoid eldesi için yeşil ekstraksiyon tasarımı kullanılarak düşük enerji ile yüksek verimli ekstraksiyon gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Biber salçasının üretiminde Jalapeno (*Capsicum annuum L.*) cinsi biber kullanılmıştır. Posa çekirdekleri ayrılmış bir şekilde kurutulup öğütülerek toz haline getirilmiştir. Katı:çözgen oranınının 0.4 (g/mL) olarak belirlendiği ekstraksiyon işleminde, çözücü olarak rafine zeytinyağı kullanılmış ve 80W ultrason gücünde ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır. Farklı sıcaklıklarda (30, 40, 50 ve 60°C) ve işlem sürelerinde (5, 10, 15 ve 20 dk.) gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ekstraktlarda β-karoten, kapsaisin, antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarı analizleri gerçekleştirilmiştir. Sıcaklığın ve işlem süresinin ekstraksiyon üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek β-karoten miktarına 50 ve 60°C'de 10 dk.'da, kapsaisin miktarına 40°C'de 15 dk.'da toplam fenolik madde miktarına 50°C'de 20 dk.'da, antioksidan aktiveye ise 60°C'de 20 dk.'da uygulanan ekstraksiyon işlemleriyle ulaşılmıştır. Yapılan bu çalışma, gıda atığı olan posanın biyolojik olarak değerli ürüne çevrilmesi, literatürdeki diğer geleneksel ekstraksiyon çalışmalarına göre düşük enerji ile kısa sürede yüksek kalitede ekstrakt sağlanması, az miktarda çözücünün kullanılması ve kullanılan çözücünün toksik madde içermemesi açısından yeşil teknolojinin tanımlanan prensiplerini yansıtmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Acı biber, β-karoten, Kapsaisin, Ultrason, Yeşil ekstraksiyon

Ultrasound Assisted Extraction of Carotenoids from Hot Pepper Paste Wastes

ABSTRACT

In this study, it is aimed to perform high efficiency extraction with low energy by using green extraction design for carotenoid extraction from waste of hot pepper paste. Jalapeno (*Capsicum annuum L.*) pepper was used in the production of pepper paste. The pulp was separated from seeds, then dried and ground into powder. Solid:solvent ratio was 0.4 (g/mL), and olive oil was used as solvent. Ultrasound assisted extraction was applied with an ultrasonic power of 80 W. Ultrasonic extractions were carried out at 4 different temperatures(30, 40, 50 and 60°C) and 4 different processing times (5, 10, 15 and 20 min). The β-carotene, capsaicin and total phenolic contents of extracts as besides their antioxidant activity were determined. In terms of the effect of temperature and duration on extraction, maximum levels were achieved by extracting for 20 min at 50 and 60°C for β-carotene, 10 min at 40°C for capsaicin, 20 min at 50°C for total phenolic substance and 20 min at 60°C for antioxidant activity. This study reflected the principles defined in green technology in terms of conversion of food waste into biologically valuable product, ensuring high quality extract with low energy in a short time according to conventional extraction studies in the literature, use of solvent in small quantity and solvent used toxic substance.

Key Words: Hot pepper, β-carotene, Capsaicin, Ultrasound, Green extraction

GİRİŞ

Yeşil ekstraksiyon; enerji tüketimini azaltan, alternatif çözücü ve yenilebilir doğal ürünlerin kullanımına izin veren, güvenli ve yüksek kaliteli ekstrakt/ürün sağlayan ekstraksiyon prosesi tasarımı olarak tanımlanmıştır [12]. Geleneksel yöntemlerin yüksek miktarda çözücü ve uzun işlem süresi gerektirmesi, karmaşık bir matris molekülünden sürdürülebilir bir şekilde moleküllerin ekstraksiyonunda sorunlara yol açması, ekstrakte edilen molekülün ısı ve hidrolizin etkisiyle bazı bileşenlerinin bozulması ve uçucuların kısmi kayıplara neden olması nedeniyle yeşil ekstraksiyon teknikleri bu yöntemlere alternatif olmaktadır [32].

Bitkisel kaynakların değerlendirilmesi ve endüstri atıklarının ürün/yan ürün olarak değerlendirilmesi, toksik olmayan alternatif çözücü kullanımı, yeni teknolojiler kullanılmasıyla enerji tüketimini ve işlem süresinin düşürülmesi, işlem basamaklarının azaltılması, biyolojik olarak parçalanabilir olan ekstraktlar elde etmek yeşil ekstraksiyonun prensipleri olarak belirlenmiştir [12].

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan birçok çözücü; pahalı, çevreye zararı olan ve toksik kimyasal içerene maddelerdir [39]. Yeşil ekstraksiyon prensipleri kapsamında toksik olmayan alternatif çözücüler tanımlanmıştır. Bunlar; su, karbondioksit ve diğer gazlar, bitkisel yağlar, terpenler, iyonik sıvılar gibi çözücülerdir [12]. Son yıllarda ekstraksiyon işleminde çözücü olarak zeytinyağı, susam yağı, hardal yağı, mısır yağı, üzüm çekirdeği yağı, Hindistan cevizi yağı ve soya yağı gibi birçok bitkisel yağ çeşitleriyle yapılan çalışmalar literatürde yer almıştır [30, 32, 47]. Yapılan bir çalışmada, havuçtan β -karoten ekstraksiyonunda çözücü olarak hegzan ve ayçiçek yağı kullanılmış ve bu çözücülerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Hegzan ile gerçekleştirilen 1 saatlik ultrasonik ekstraksiyondan elde edilen sonuçlar (321 mg β -karoten/L), ayçiçek yağı ile gerçekleştirilen 20 dakikalık ekstraksiyondan elde edilen sonuçlara (334.75 mg β -karoten/L) yakın çıkmıştır [32].

Turbo ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon, hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, darbeli elektrik alan, ani dekompresyon, ekstrüzyon–indüksiyon yöntemleri yeşil ekstraksiyon olarak kabul edilen sistemlerdir [12]. Bu teknolojilerin kullanılmasıyla, işlem basamaklarında azalma, işlem süresinde kısımla, enerji tüketiminde ve çözücü miktarında azalma sağlanmaktadır [12]. Mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi kullanılarak gerçekleştirilen çaydan polifenol ve kafein ekstraksiyonu işleminden 4 dakika işlem süresiyle elde edilen ekstraksiyon verimi ile 45 dakikalık Soxhlet yönteminden elde edilen ekstraksiyon verimi yakın çıkmıştır [40]. Yapılan diğer bir çalışmada ise üzüm kabuğundan antosiyanin ekstraksiyonunda, geleneksel ekstraksiyon, darbeli elektrik alan ekstraksiyonu (3 kV cm), yüksek hidrostatik basınç ekstraksiyonu (600 MPa), ultrason destekli ekstraksiyon (35 kHz) yöntemlerini 70°C'de 1 saat uygulayarak bu yöntemleri birbiriyle karşılaştırmışlardır. Ultrasonikasyon, yüksek hidrostatik basınç ve darbeli elektrik alan ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen

ekstraktların antosiyanin içerikleri arasında fark görülmemiş ve elde edilen antosiyanin miktarının geleneksel ekstraksiyon işleminden elde edilen antosiyanin miktarından yaklaşık iki kat fazla olduğu bulunmuştur [15]. Üzümde aminoasit ekstraksiyonu işleminde, 70°C'de 6 dakika ultrason uygulaması maserasyon yöntemiyle karşılaştırılmış ve ultrasonik ekstraksiyonun daha yüksek verim sağladığı görülmüştür [11]. Ayrıca; yeşil ekstraksiyon yöntemleri olarak kabul edilen bu teknolojilerin birlikte kullanılmasının ekstraksiyon işleminde verim artışına neden olduğu belirtilmiştir [7, 45].

Meyve ve sebze işleminin yan ürünleri; fitokimyasal (karotenoidler, fenolikler, ve flavonoidler), antioksidanlar, antimikrobikler, vitaminler, olumlu teknolojik faaliyetler veya besin özelliklerine sahip diyet yağlar gibi değerli maddeler içermektedir [52]. Çevresel faktörler ve ekonomik nedenlerden dolayı bu atıkların değerlendirilmesi yeşil ekstraksiyonun prensipleri arasındadır [12, 31]. Karides atığından karotenoid [47], kahve atığından kafein ve polifenoller [20], kavun kabuğundan pektin [42], Hindistan cevizi atığından yağ [55], mısır koçanından selüloz [60], tavuk kemiğinden kalsiyum [53], peynir altı suyundan laktos ve protein [33], balık kılıcı ve derisinden jelatin [37] eldesi gibi çalışmalar gıda endüstrisinin yan ürünlerinin besin değeri yüksek maddeler içerdiğini göstermiştir.

Salça üretimi domates ve biberleri daha kolay tüketilir hale getirmeyi ve tüketim zamanına kadar da onları uzun süre bozulmadan saklamayı amaçlamaktadır. Gıda sanayi içinde salça üretim işletmeleri dünyada ve Türkiye'de artan ihtiyacı karşılamak amacıyla her geçen zaman sürecinde daha fazla üretim yapılmakta ve dolayısıyla salça atığında da zamana bağlı olarak artış sağlanmıştır. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) tarafından Türkiye düzeyine göre hazırlanan raporda; salça üretimi için kullanılan kopya biberinin üretim miktarı, 2004 yılında 615.000 ton iken her yıl sürekli artış göstererek 2016 yılında ise 957.030 tona ulaştığı belirtilmektedir [58]. Salça atığı olan posa, genellikle hayvan yemi olarak kullanılsa da, domates ve biberin özellikle kabuk ve çekirdek kısımlarının besin değeri yüksektir [29]. Bu nedenle salça atığı, balık fileto kaplamasına, tarhana ve kraker gibi gıdaların üretimine ilave edilmiştir ve protein, yağ, toplam diyet lifi, mineral, toplam fenolik madde ve toplam antioksidan aktivite değerlerinde artışı sağladığı görülmüştür [2, 29]. Bunların yanı sıra salçada kullanılan olgun kırmızıbiber, karotenoid ve kapsaisinoid içeriğinden dolayı gıda sanayisinde ve ilaç endüstrisinde önemli bir hammaddedir [57]. Kırmızıbiber karotenoid kaynağıdır başta β -karoten, α -karoten, β -kriptoksantin, zeaksantin, lutein, kapsantin, kapsorubin ve kriptokapsin olmak üzere yaklaşık 25 farklı karotenoidin olduğu tespit edilmiştir [14]. Kırmızı fraksiyon *Capsicum*'a özgü kapsanthin, kapsanthin -5, 6-epoksit ve kapsorubin pigmentleri içerir. Bu tür biber yıllarca doğal renk maddesi olarak kullanılmıştır [19]. Kapsaisinoid, acı biberdeki acı tadı oluşturan alkaloid gruplarıdır ve bu birleşimler, bazı otçullar ve mantarlara karşı caydırıcı olarak, biberler tarafından ikincil bir metabolit olarak üretilir [41]. 12 çeşit kapsaisinoid olduğu keşfedilmiştir. Ancak acı biberdeki toplam kapsaisinoid miktarının %80-

90'ını oluşturan iki önemli kapsaisinoid vardır: kapsaisin (trans-8-metil, N-vanilil-6-nonenamid) ve dihidrokapsaisin (8-metil-N-vanillylnonanamid DHC) [25, 61]. Yapılan çalışmalar bu bileşenlerin antioksidan özelliklerinin dışında kapsaisinin çeşitli farmasötik formlarda nöropati ağrılarının hafifletilmesinde, kas ve eklem ağrılarının semptomatik tedavisinde, Herpes zoster gibi nörojenik ağrılarının tedavisinde, obezite ve ülser tedavisinde de etkili olduğunu göstermiştir [13].

Bu çalışmada, acı biber salçası atığı olan acı biber posasından zeytinyağı içerisinde ultrasonik ekstraksiyon yöntemi ile karotenoid ekstraksiyonu gerçekleştirilerek elde edilen ekstraktların β -karoten, toplam fenolik madde, kapsaisin içerikleri ve antioksidan aktivite değerleri belirlenmiştir. Kavitasyonun şiddetine bağlı olarak istenmeyen tepkimeler sonucu ekstrakt kalitesinde düşüşleri önlemek amacıyla ekstraksiyon parametrelerinden katı:çözgen oranı, sıcaklık ve süre üzerinde çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Acı biber posası, geleneksel yöntemle yapılan salçadan elde edilmiştir. Biber çeşidi olarak acı biber soslarının yapımında sıklıkla kullanılan kırmızı Jalapeno biberi (*Capsicum annuum L.*) seçilmiştir. Renk bozukluğuna sahip biberler elle ayıklanmış ve tam olarak kızarmış biberler salça üretiminde kullanılmıştır. Yıkama işleminden sonra biberler ortadan ikiye kesilerek çekirdekleri çıkartılmıştır. Diğer kısımlar yumuşaması için 30 dakika su ile haşlama işlemine tabi tutulmuştur (100-105°C). Isıtma işleminden sonra 3 mm çaplı elek yardımıyla salçalık kısım süzülümüş ve üste kalan kısım posa olarak ayrılmıştır. Nem miktarı, 86.63 ± 0.23 olan acı biber posası, 5.56 ± 0.21 nem içeriğine kadar 70°C'lik fırında (Vestel, model no: Pyro BO67, Türkiye) kurutulmuştur. Kurutulan posa öğütülerek (Bosch, model no: MKM 6000, Almanya) toz haline getirilmiştir ve elde edilen toz ürün diğer analizlere kadar -18°C'de depolanmıştır.

Ekstraksiyon işleminde kullanılan rafine zeytinyağı Verde Yağ Besin Mad. San. ve Tic. A.Ş tarafından temin edilmiştir. Çalışmada analitik saflıkta β -karoten standardı ($\geq 97.0\%$), ABTS ve Trolox®, HPLC saflıkta trifloroasetik asit, kapsaisin (%99.0) standardı (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD); sodyum karbonat, Folin-Ciocalteu reaktifi, aseton, gallik asit standardı, potasyum persülfat, HPLC saflıkta metanol, isopropanol, asetonitril (Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılmıştır.

Metot

Hammadde Analizleri

Yaş ve kuru posanın nem miktarı klasik etüv yöntemiyle belirlenmiştir [3]. Kurutulmuş posanın su aktivitesi Testo 400 cihazı (Almanya) kullanılarak, renk özellikleri ise L* (açıklık), a*(yeşil-kırmızı), b*(mavi-sarı) olmak üzere 3

renk özelliği HunterLab Colorflex (VA CFLX 45-2 Hunterlab, Reston) renk ölçüm cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Bu çalışmanın yeşil ekstraksiyon uygulamasına uygun olabilmesi için; materyal olarak acı biber salçası atığı, yöntem olarak ultrasonik ekstraksiyon ve çözücü olarak toksik olmayan bir alternatif çözücü olan rafine zeytinyağı kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 400 W ve 24 kHz'lik yüksek yoğunluklu ultrasonik ekstraksiyon cihazında (Hielscher UP400S, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Ultrason kabineye sabit bir şekilde yerleştirilmiş 105 W/cm² akustik güç yoğunluğuna sahip 14 mm çaplı H14/Tip prob kullanılmıştır. Prob, ucu örneğin sıvı yüksekliğinin yarısına gelecek şekilde beherin içine daldırılmış ve beher duvarına ortalanarak merkeze yerleştirilmiştir. Voltcraft Energy Check 3000 (İrlanda) cihazı ile enerji kontrolü yapılarak ultrasonik güç 80 W olacak şekilde ayarlanmıştır ve işlem boyunca bu cihazla güç kontrolü sağlanmıştır. Sabit ultrason gücü ve sabit katı:çözgen oranında 4 farklı sıcaklık (30-60°C) ve 4 farklı süre (5-20 dk.) olmak üzere 2 faktör ile çalışılmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyon işleminde prob kullanımının dezavantajı: ultrason işlemi doğrudan örneğin içerisinde gerçekleştiğinden sıcaklığın kontrol altına alınması zordur ve işlem sırasında kısa sürede yüksek sıcaklıklara ulaşılabilir. Bunun önlenmesi için ekstraksiyonun bir buz banyosu içerisinde gerçekleştirilmesi, çift ceketli beher kullanılması veya cihazın darbeli modda çalıştırılması izlenen stratejilerdendir [50]. Bu nedenle ekstraksiyon sırasında sıcaklığı sabit tutmak için, ekstraksiyonun içerisinde gerçekleştiği 250 mL'lik ceketli beher, 4°C'de su banyosuna bağlanmış ve ekstraksiyon işlemi darbeli mod kullanılarak 0.4 darbe sayısı ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işleminde kullanılan sistem Şekil 1'de gösterilmiştir.

Katı:çözgen Oranının Belirlenmesi

Ekstraksiyon sırasında difüzyonun etkin bir şekilde gerçekleşmesinin sağlanması amacıyla ekstraktların absorbans değerlerinin sabitlendiği noktayı belirten toz numune:zeytinyağı oranı ekstraksiyon işleminde kullanılacak katı:çözgen oranı olarak belirlenecektir. Bu oranı belirlemek için 50 mL rafine zeytinyağına; 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 g toz numune eklenerek 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 0.5, 0.6, 0.7 g/mL katı çözgen oranları elde edilmiştir. Bu oranlarda 40°C, 0.4 darbe sayısı ve 80 W ultrason gücünde, 10 dakika ultrasonik ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve işlem tamamlandıktan sonra karışım filtre kağıdından geçirilmiştir. Elde edilen ekstraktlar zeytinyağı ile 100 kat seyreltilerek absorbansları zeytinyağı koruna karşı spektrofotometrede (Agilent Cary 60 UV-Vis, ABD) 460 nm'de okunmuştur. Absorbans-katı:çözgen oranı grafiğinden absorbansın değişiklik göstermediği nokta belirlenerek en uygun katı:çözgen oranı seçilmiştir.



Şekil 1. Ultrason destekli ekstraksiyon düzeneği

Toplam Karotenoid Miktarının Belirlenmesi

Ekstraktlardaki toplam karotenoid miktarı Sachindra ve ark. [47] tarafından kullanılan yöntemde uygun değişiklikler yapılarak belirlenmiştir. 100 µL ekstrakt 10 mL yağ ile tamamlanmıştır. 100 kat seyreltilen ekstraktların absorbansları spektrofotometrede (Agilent Cary 60 UV-Vis, ABD) 460 nm'de yağ körüne karşı okunmuştur. Sonuçlar β-karoten standart eğrisi kullanılarak (Tablo 1), toplam karotenoid miktarı β-karoten cinsinden (µg/mL) hesaplanmıştır.

Kapsaisin Miktarının Belirlenmesi

Farklı koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ekstraktların kapsaisin içerikleri Caporaso ve ark. [10]'de verilen yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemde belirtildiği üzere 10 g ekstraktın üzerine 10 mL hegzan ve 10 mL metanol-su karışımı (60:40) eklenerek 10 dk 1048 g'de santrifüjlenmiştir. Alt kısma çöken metanol fazı toplanıp 50°C'de döner vakumlu evaporatörde buharlaştırılmıştır. Son olarak kalıntıya 2 mL metanol eklenip 0.45 µm gözenek çapına sahip şırınga filtrelerinden geçirilerek HPLC'ye verilmiştir.

Analiz için Agilent Technologies Infinity II (ABD) cihazının OpenLab CSE "A Agilent Chrometographic Software" yazılımı ve 4.6*150 mm boyutlarındaki Poroshell 120 EC-C18 4 µm kolonu (ABD) kullanılmıştır. Mobil A fazı 97:3 hacim oranında su:TFA (trifloroasetik asit); mobil B fazı ise, metanol:isopropanol (25:63.4) %1.6 asetonitril ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Metot, %20 B fazı ile başlayıp 18 dakika sonunda B fazından %98 kullanılacak şekilde ayarlanmıştır. Akış hızı 0.7 mL/dakika, enjekte edilen örnek miktarı 20µL, kolon sıcaklığı oda koşullarında olacak şekilde ayarlanmıştır ve DAD detektöründe dalga boyu 280 nm'de okuma yapılmıştır.

Kapsaisin standardının (%99.0 saflıkta) metanolde çözündürülmesi ile hazırlanan 1-20 µg/mL derişimindeki standart çözeltilerin yukarıdaki yöntem takip edilerek

kapsaisin standart eğrisi çizdirilmiş (Tablo 1) ve bu standart eğri kullanılarak ekstraktların kapsaisin içeriği hesaplanmıştır.

Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmede Gutfinger [24] tarafından önerilen yöntem temel alınmıştır. Yağ ekstraksiyonu için 3 mL ekstrakt, 5 mL hegzan ile çözündürülmüştür. Fenolik maddeleri ayırmak için 5 mL etanol/su (60:40 v/v) karışımı eklenerek 10 dakika vorteks'de (WiseMix, Kore) çalkalanmıştır. Hegzan ve etanolü su karışımını birbirinden ayırmak için 10 dakika 2054 g'de santrifüj işlemine maruz bırakılmıştır. Altta kalan etanolü kısımdan 3.5 mL, 10 mL'lik balon jöjeye alınarak üzerine 0.5 mL Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilmiştir. 3 dakika bekleme sonrasında 1 mL sodyum-karbonat çözeltisi (%20 w/v) eklenmiş ve saf suyla 10 mL'ye tamamlanarak 1 saat boyunca karanlıkta bekletilmiştir. 1 saat sonunda mavimsi renge dönen çözeltilerin absorbans değeri, aynı işlem basamaklarıyla hazırlanan kör çözeltilere karşı 760 nm dalga boyunda okunmuştur. Ekstraktların toplam fenolik madde içeriği, gallik asit kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem (Tablo 1) ile hesaplanarak gallik asit cinsinden (µg/mL) ifade edilmiştir.

Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

Antioksidan aktiviteyi belirlemek için "Trolox® Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAC)" yöntemi kullanılmıştır. ABTS radikal çözeltisi hazırlarken Re ve ark. [43]'ün yöntemi takip edilmiştir. 7 mM ABTS'nin distile sudaki çözeltisinden 50 mL ve 2.45 mM potasyum persülfat sudaki çözeltisinden 25 mL alınarak karıştırılmış ve karanlıkta 12-16 saat bekletilerek ABTS+ radikali oluşması sağlanmıştır. Kullanıma hazır hale gelen mavi yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi, 734 nm'de absorpsiyon 0.70±0.02 olacak şekilde etil alkolle 1:80 oranında seyreltilmiştir. 200 µL ekstrakt 800 µL etanol ile karıştırılıp, bu karışımdan 10 µL alınarak 990 µL ABTS ile karıştırılarak 6. dakika sonunda absorbans

değeri spektrofotometrede (Agilent Cary 60 UV-Vis, ABD) 734 nm dalga boyunda okunmuştur [23]. Bulunan absorbans değerleri kullanılarak aşağıda verilen denklemden (1) %inhibisyon değerleri hesaplanmıştır. Örnek konsantrasyonu; belli derişim aralığındaki Trolox® standardı ile hazırlanan, Trolox® standart

eğrisine geçirilerek (Tablo 1) antioksidan aktivite değeri, µmol TEAC/g KM olarak belirlenmiştir.

$$\% \text{inhibisyon} = [(A_{\text{ABTS}^+} - A_{\text{örnek}})] * 100 \quad (1)$$

A_{ABTS^+} : AABTS+ radikalinin absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: Örneğin 6. dakika sonunda okunan absorbans değeri

Tablo 1. Analizlerde kullanılan standart eğrilerinin regresyon eğrileri ve R²leri

Bileşen	Regresyon Eğrisi	R ²
β-karoten	y=0.1331x+0.0298	0.9948
Kapsaisin	y=32.844x+48.963	0.9907
Gallik Asit	y=0.116x+0.2412	0.9963
Trolox®	y=3.2958+1	0.9968

İstatistiksel Analizler

Yapılan analiz sonuçlarının ortalama farklılıkları, SPSS 16.0 Windows paket programı yardımıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey çoklu karşılaştırma testi ile %95 güven aralığında yorumlanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

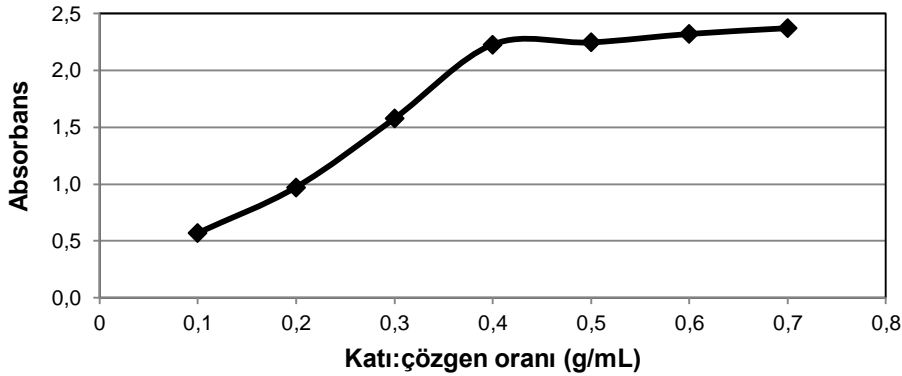
Hammadde Analizleri

Acı biber posasının nem içeriği %86.63±0.23, kurutulup öğütüldükten sonra elde edilen toz örneğin nem içeriği ise % 5.56±0.21 olarak bulunmuştur. Kurutulmuş toz posanın su aktivitesi 0.415±0.002 olarak tespit edilmiştir. HunterLab Colorflex (Hunterlab, Reston, VA CFLX 45-2

Modeli kolorimetre) cihazıyla ölçülen posanın toz formunun L* değeri 42.08±0.96, a* değeri 37.37±1.04, b* değeri 41.03±1.82 olarak bulunmuştur.

Katı:Çözgen Oranı

Farklı katı/çözgen oranları kullanılarak elde edilen ekstraktların absorbans–katı:çözgen oranı grafiği Şekil 2’de verilmiştir. Şekil 2’de absorbans değerlerinin 0.4 (g/mL) katı:çözgen oranına kadar artış gösterdiği ve bu orandan sonar katı:çözgen oranının arttırılması absorbans değerinde belirgin bir artışa neden olmadığı görülmektedir. Bu nedenle ekstraksiyon işleminde kullanılacak katı:çözgen oranı 0.4 olarak seçilmiş ve böylece ekstraksiyonda kullanılacak toz numune miktarı, 50 mL zeytinyağı içerisinde 20 g olarak belirlenmiştir.



Şekil 2. Farklı katı:çözgen oranlarında elde edilen ekstraktların absorbans değerleri

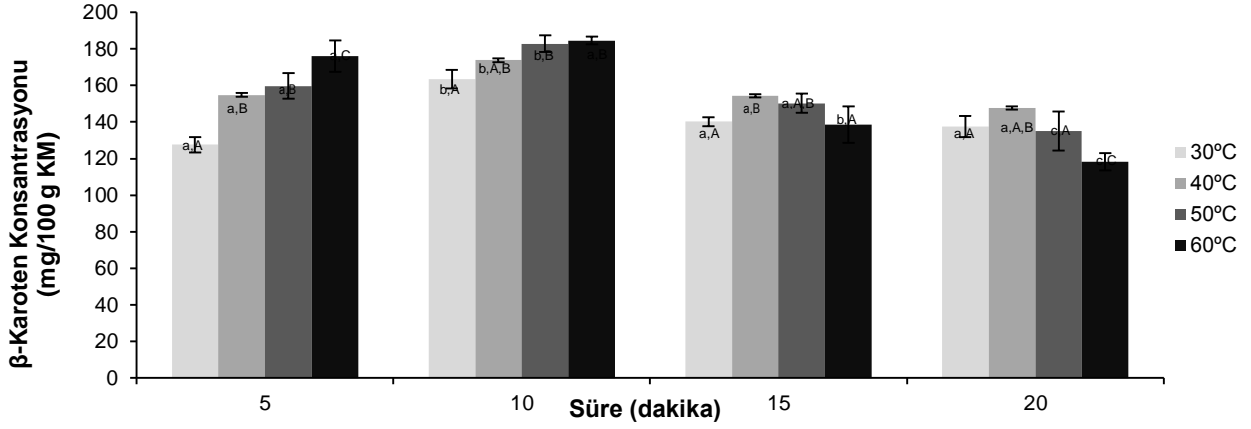
Toplam Karotenoid Miktarı

Elde edilen ekstraktların toplam karotenoid miktarları β-karoten cinsinden hesaplanarak Şekil 3’te verilmiştir. Şekil 3’teki sonuçlara bakıldığında; her sıcaklıkta, ekstraksiyon süresinin 5 dakikadan 10 dakikaya çıkarılması, β-karoten miktarını arttırmış ve 10 dakikadan sonra sürenin 15 ve 20 dakikaya çıkarılması sonuçları olumsuz etkileyerek ekstraktlardaki β-karoten içeriğinde düşüşe neden olmuştur. Böylece en yüksek β-karoten miktarı 10 dakika süreyle 50 ve 60°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlardan sağlanmıştır (p<0.05) ve bu koşullarda elde edilen ekstraktların toplam β-karoten miktarları 182.90±4.6–184.6±2.1 mg β-karoten/100 g KM aralığında bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda; biberin cinsi, olgunluk seviyesi, yetiştirme koşulları biber içeriğini değiştirdiği belirtilmiştir. Taze kırmızı biberin β-karoten içeriği, 5 farklı çeşitte 100 g kuru madde başına 681.8–1320.8 mg aralığında kaydedilmiştir [27]. Doğal yollarla kurutulmuş kırmızı biberler, 862.9 mg β-karoten/100 g KM içeriğine sahip olduğu tespit edilmiştir [17]. *Capsicum annuum L.* cinsi kırmızı biberin 4 olgunluk döneminde içeriğindeki değişimin incelendiği bir çalışmada; kırmızı renge dönüşen olgun biberin β-karoten içeriği, ham dönemde yeşil biberdeki β-karoten içeriğinden yaklaşık olarak 4 kat fazla bulunmuştur [34]. Olgunlaşma evresi sırasında yeşilden kırmızıya dönen biberlerin her 100 g kuru ağırlığında β-karoten miktarı 1.9 mg’dan 112 mg’a yükseldiği de farklı bir çalışmada görülmüştür [35]. *Capsicum annuum L.* cinsi yeşil biberde β-karoten

miktarı, 100 g kuru ağırlıkta 50.88 mg iken, olgunlaşarak kırmızıya döndüğünde 910.8 mg, fazla olgunlaşması durumunda 1570 mg'a yükselirken bu biberin kurutulması β -karoten içeriğini 443.8 mg'a düşürmüştür

[21]. Ayrıca kurutma sıcaklığının 25°C'den 100°C'ye kadar yükseltilmesi, β -karoten içeriğini yarıya düşürmüştür [16].



Şekil 3. Ekstraksiyon sıcaklığının ve süresinin β -karoten miktarı üzerine etkisi. ^{a-d} Aynı sıcaklık değerlerindeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). ^{A-D} Aynı sürelerdeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

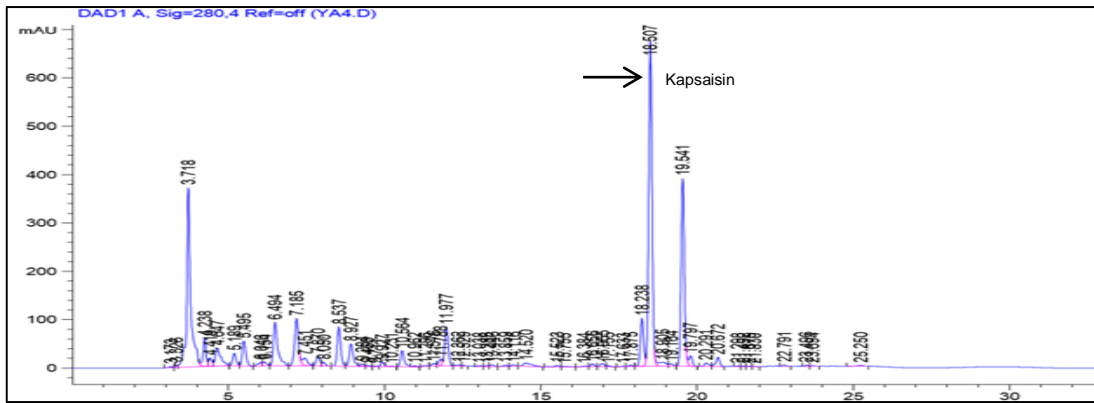
Jalapeno cinsi biberde, hegzan, aseton ve etil asetat ile 8 saat boyunca uygulanan Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda çözgen çeşidine göre sırasıyla 27.30, 29.20 ve 0.32 mg β -karoten/100 g KM içeriği elde edilmiştir [6]. Çözücü olarak mısır, ayçiçek ve aspir yağı kullanılarak 60–80°C sıcaklıkta 5 ve 10 dakika yapılan geleneksel ekstraksiyonla sağlanan β -karoten miktarı 46.2 mg/100 g KM olarak bulunmuştur [23].

Yeşil ekstraksiyon teknolojisi olan süperkritik ekstraksiyonu ile kapy biberi tozundan karotenoid madde ekstraksiyonunda, geleneksel yöntem ile elde edilen karotenoid miktarı kg başına 1.2 g iken, CO₂ kullanılarak uygulanan süperkritik ekstraksiyonu sonucunda elde edilen karotenoid madde ekstraksiyon koşullarına bağlı olarak kg başına 90–200 g bulunmuştur [5]. Yapılan bir diğer çalışmada ise yine yeşil ekstraksiyon yöntemi olan enzim ekstraksiyonu sonucunda kırmızıbiberdeki β -karoten içeriğinde %85 geri kazanım sağlanmıştır [49].

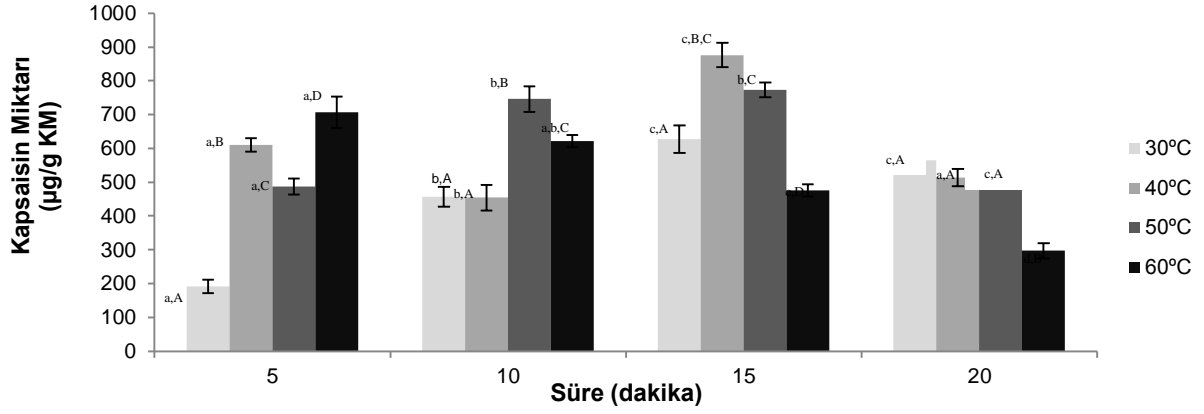
Kapsaisin Miktarı

280 nm'de DAD dedektörü ile tespit edilen kapsaisinin alıkonma zamanı, 18-20 s arasında bulunmuştur (Şekil 4).

Denemelerden elde edilen ekstratların kapsaisin miktarları Şekil 5'te görülmektedir. Kapsaisin miktarının tüm sıcaklıklarda 15. dakikada yüksek olduğu (60°C hariç) ve ekstraksiyon süresinin 20 dakikaya çıkarılmasının kapsaisin miktarında düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 5 dakika hariç ekstraksiyon sıcaklığının 60°C'ye çıkarılması kapsaisin içeriği üzerinde olumsuz etki yaratmıştır. 5 dakikalık ekstraksiyonda 60°C'de; 10 dakikalık ekstraksiyonda 50°C'de; 15 dakikalık ekstraksiyonda 40°C'de ve 20 dakikalık 30°C'de yüksek kapsaisin içeriğine ulaşılmıştır. Bu ultrason gücünde ulaşılan en yüksek kapsaisin miktarı 875.78±35.7 μ g/g KM olup 40°C ekstraksiyon sıcaklığında 15 dakikalık ekstraksiyon ile sağlanmıştır.



Şekil 4. Ekstratların 280 nm dalga boyundaki UV kromatogramı



Şekil 5. Kapsaisin miktarının sıcaklık ve süre ile değişimi. ^{a-d} Aynı sıcaklık değerlerindeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). ^{A-D} Aynı sürelerdeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$).

Sricharoen ve ark. [54] tarafından gerçekleştirilen çalışmada 14 farklı acı biber örneği kurutulmuş ve ekstrakte edilmiştir. 35 kHz frekansta, 360 W güce sahip ultrasonik banyo kullanılarak su:metanol içerisinde gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminden elde edilen ekstraktların içerdiği kapsaisin miktarı $614 \pm 28 - 15003 \pm 151$ mg/kg KM olarak bulunmuştur. *Capsicum annuum* L. cinsi biberlerin farklı türleri kurutulmuş, etanol içerisinde 80°C sıcaklıkta 8 saat su banyosunda ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların kapsaisin içeriği g kuru madde başına; acı kırmızı biber türünde 4249.0 ± 190.3 µg, yeşil acı biber türünde 138.5 ± 5.2 µg, kırmızı biberde 309.3 ± 4.2 µg olarak bulunmuştur [1].

Diğer bir acı biberden kapsaisin ekstraksiyonu çalışmasında ise, 11 farklı kuru biber örneği 50 mL etanol:su kullanılarak 130 W güce sahip prob tipi ultrasonik ekstraksiyon cihazında ekstrakte edilmiştir. Gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde farklı süre (5-25 dk), sıcaklık ($25-50^\circ\text{C}$), örnek miktarı (0.25-0.5 g) ve genlik (%40-80) parametreleri kullanılmıştır. Kapsaisin için optimum koşullar; 25 dakika, 0.25 g örnek, %60 genlik, 50°C olarak bulunmuştur. Örneklerden ekstrakte edilen kapsaisin miktarı 101-6800 µg/g KM olarak bulunmuştur [41].

Kapsaisin ekstraksiyonu optimizasyonu konusunda yapılan iki farklı çalışmada 0.5 g örneğin 25 mL etanol içerisinde mikrodalga ve ultrasonik banyo kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Optimum koşullar mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi için 500 W'da 125°C sıcaklıkla 5 dakika işlem süresi olarak [9], ultrasonik banyoda 360 W güç, 50°C sıcaklık ve 10 dakika işlem süresi olarak bulunmuştur [8].

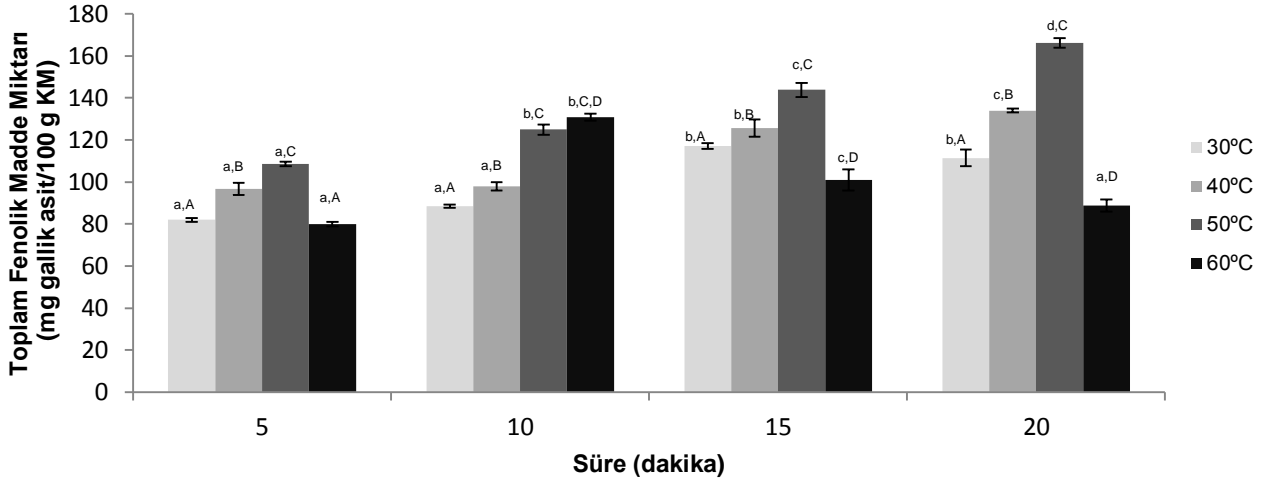
Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları sonuçları Şekil 6'da verilmiştir. Bu grafiğe göre 30 ve 40°C 'de 15 dakikada fenolik madde içeriğinde artış görülürken sıcaklığın 50 'ye çıkarılmasıyla toplam fenolik madde miktarında belirgin artış 10 dakika ve üzeri sürelerde gözlenmiştir ($p < 0.05$). Ekstraksiyon sıcaklıkları birbiriyle

kıyaslandığında 5 dakikalık işlem süresi hariç tüm sürelerde 50°C 'de en yüksek fenolik madde içeriğine ulaşılmış ve bu sıcaklık değerinden 60°C 'ye çıktığında toplam fenolik madde miktarlarında düşüş görülmüştür ($p < 0.05$). Böylece elde edilen maksimum toplam fenolik madde miktarı, 50°C 'de gerçekleştirilen 20 dakikalık ekstraksiyonla sağlanmıştır ve değeri 166.22 ± 0.67 mg galik asit/100 g KM olarak bulunmuştur. 60°C 'de ise; sonuçlarda 10 dakikaya kadar artış sağlanmış ve ekstraksiyon süresinin artmasıyla toplam fenolik madde miktarında düşüş gözlenmiştir.

Taze ve işlenmiş Jalapeno biberlerinin yetiştirildikleri bölgeye göre toplam fenolik madde içeriğinin değişimi incelendiği bir çalışmadaki sonuçlar, 100 g kuru maddede 201–389 mg GAE aralığında bulunmuştur [4]. Olgun *Capsicum annuum* cinsi biberlerin toplam fenolik madde içeriği 0.70–426 mg GAE/100 g KM olarak belirlenmiştir [18, 38, 46, 59]. Tarhana üretiminde fenolik ve antioksidan özelliklerinin iyileştirilmesi için kullanılacak olan biber salçası atığının toplam fenolik madde içeriğine bakılmıştır. Biber posasından 168 mg GAE/100 g; biber çekirdeklerinden 186 mg GAE/100 g fenolik madde miktarı içeriğine ulaşılmıştır [28].

Ultrasonik ekstraksiyonda yapılan optimizasyon çalışmalarında, işlem süresi, sıcaklık ve katı:çözgen oranının artırılması, toplam fenolik madde miktarını artış sağlamıştır [44, 48]. Bazı çalışmalarda ise, yüksek sıcaklık ve uzun sürede gerçekleştirilen ultrasonik ekstraksiyon için düşük geri kazanımlar veya yüksek bozunma oranları kaydedilmiştir. Bunun sebebi, ultrason dalgalarının serbest radikal oluşumunu artırarak oksidasyon reaksiyonları oluşumuna neden olup fenolik maddelerin reaktif oksijen türleriyle birleşmesi olarak ifade edilmiştir [11, 44, 51]. Yine de klasik yöntemle kıyaslandığında, ultrason ile ekstraksiyon yöntemi 6 dakika gibi kısa sürede fenolik madde miktarı veriminde yüksek sonuç vermiştir [11].

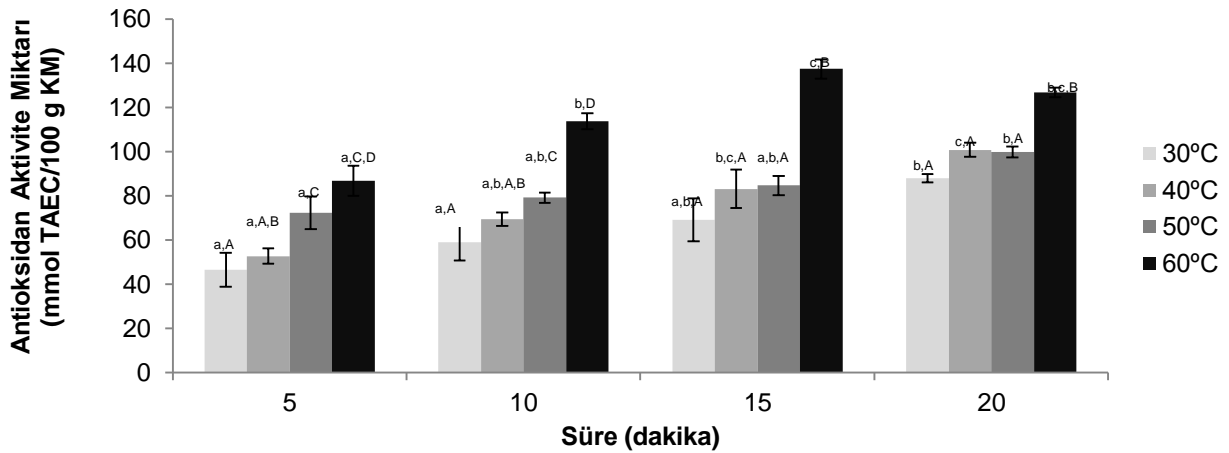


Şekil 6. Toplam fenolik madde miktarının sıcaklık ve süre ile değişimi. ^{a-d} Aynı sıcaklık değerlerindeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). ^{A-D} Aynı sürelerdeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Antioksidan Aktivite

Farklı koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite değerleri Şekil 7’de görülmektedir. Ekstraksiyon sıcaklığının artması antioksidan aktivite değerlerinde artış sağlamıştır. İşlem süresinin 15 ve 20 dakika olduğu ekstraksiyonlarda, 30, 40 ve 50°C sıcaklıklarda gerçekleştirilen denemelerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelelerinde fark görülmemiştir. Sıcaklığın 60°C’ye çıkarılması, antioksidan aktivite üzerinde belirgin bir artış sağlamıştır. Ekstraksiyon süresinin artmasıyla antioksidan aktivite değerlerinde yavaş bir şekilde artış görülmüştür. En yüksek antioksidan aktivite değerleri tüm sıcaklıklarda 20 dakikada gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde sağlanmıştır. Bu denemelerden elde edilen en yüksek antioksidan aktivite değeri 126.62 ± 1.57 $\mu\text{mol TAEC/g KM}$ olup 60°C’de 20 dakikalık ekstraksiyon işleminden elde edilmiştir.

Acı *Capsicum annuum* cinsi biberlerin 4 türünde yapılan çalışmada, antioksidan aktiviteleri 26–80 $\mu\text{mol TAEC/g KM}$ aralığında bulunmuştur [26]. Literatürde mevcut diğer bir çalışmada ise, *Capsicum annuum* cinsi biberlerin antioksidan aktivitesi 3.4 mmol TAEC/g KM olarak belirlenmiştir [36]. Kuru acı biberin ekstraksiyonunda, yeşil teknolojilerden olan mikrodalga ve ultrason destekli ekstraksiyon kullanılarak maserasyon yöntemiyle gerçekleştirilen ekstraksiyonun sonuçları karşılaştırılmıştır. Ultrason destekli ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite değerleri, ekstraksiyonun akustik olarak desteklendiği durumlarda yani sıcaklığa ve süreye göre artış göstermiştir [22, 56]. Ultrasonik ekstraksiyonun 20 dakika uygulanmasıyla ulaşılan antioksidan aktiviteye maserasyon yöntemiyle 7 günde, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ise 60 saniyede ulaşılmıştır [39].



Şekil 7. Antioksidan aktivitenin sıcaklık ve süre ile değişimi. ^{a-d} Aynı sıcaklık değerlerindeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$). ^{A-D} Aynı sürelerdeki farklı harfler sonuçlar arasında istatistiksel fark olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

SONUÇ

Tüm ekstraksiyon denemelerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; ekstraksiyon süresinin ekstraktlardaki β -karoten miktarını etkilediği görülmektedir. Tüm sıcaklık değerlerinde en yüksek β -karoten miktarı 10 dakikalık ekstraksiyon işleminden elde edilmiştir ve sürenin artması β -karoten miktarında düşüğe neden olmuştur. En yüksek β -karoten miktarı, 50 ve 60°C'de 10 dakikalık ekstraksiyonla sağlanmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığının 50°C'ye kadar artması ile ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının arttığı, sıcaklığın 60°C'ye yükselmesi ile fenolik madde miktarlarının tüm ekstraksiyon sürelerinde düştüğü ve en yüksek değerin 50°C'de 20 dakika süre ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminden elde edildiği bulunmuştur. Fenolik yapıya sahip kapsaisin içeriğinde de 60°C sıcaklıkta düşüş görülmüş olup en yüksek kapsaisin miktarına 40°C'de 15 dakikalık ekstraksiyon işlemi ile ulaşılmıştır. Toplam antioksidan aktivite miktarında ise, hem sıcaklık hem de süre faktörü antioksidan aktivite sonuçlarını olumlu etkilemiş ve en yüksek antioksidan aktivite değeri 60°C sıcaklıkta 15 dakika uygulanan ekstraksiyon işleminden sağlanmıştır.

Atık olarak seçilen acı biber posasından karotenoidlerin ekstraksiyonu sağlanması, çözücünün toksik olmayan rafine zeytinyağı seçilmesi, ekstraksiyon işleminde problu ultrason yöntemi kullanılarak düşük enerji ile az miktarda çözücü kullanılması, kısa sürede yüksek verim elde edilmesi nedeniyle bu çalışma hem ekolojik hem de çevre dostu olan yeşil ekstraksiyon disipliniyi yansıtmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi (Proje No: 16MÜH046) tarafından maddi olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Abdullah, Z., Othman, A., Badjah, Y., Ahmed, H., Habila, M.A. Ghafar, A.A. (2011). Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in capsicum fruit samples using high performance liquid chromatography, *Molecules*, 16, 8919-8929.
- [2] Aldemir, Ö. (2013). Balık filetoalarının kaplanması salça üretim atıklarının kullanımı. Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- [3] Alibas, İ. Okursoy, R. (2012). Karalahana (*Brassica oleracea* L. var. *acephala*), pazı (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) ve ıspanak (*Spinacia oleracea* L.) yapraklarının bazı teknik özellikleri. *U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26(1), 39-48.
- [4] Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L.A., Amarowicz, R. Shahidi, F. (2012). Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. *Food Chemistry*, 133(3), 827-834.
- [5] Ambrogi, A., Cardarelli, D.A., Eggers, R. (2002). Fractional extraction of paprika using supercritical carbon dioxide and on-line determination of carotenoids. *Journal of Food Science*, 67(9), 3236-3241.
- [6] Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Jifon, J. Patil, B. S. (2012). Variation of antioxidant activity and the levels of bioactive compounds in lipophilic and hydrophilic extracts from hot pepper (*Capsicum* spp.) cultivars. *Food Chemistry*, 134(4), 1912-1918.
- [7] Bagherian, H., Zokaei Ashtiani, F., Fouladitajar, A. Mohtashamy, M. (2011). Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 50(11), 1237-1243.
- [8] Barbero, G.F., Liazi, A., Palma, M. Barroso, C. G. (2008). Ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from peppers. *Talanta*, 75(5), 1332-1337.
- [9] Barbero, G.F., Palma, M. Barroso, C.G. (2006). Determination of capsaicinoids in peppers by microwave-assisted extraction-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 578(2), 227-233.
- [10] Caporaso, N., Paduano, A., Nicoletti, G., Sacchi, R. (2013). Capsaicinoids, antioxidant activity, and volatile compounds in olive oil flavored with dried chili pepper (*Capsicum annuum*), *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(12), 1434-1442.
- [11] Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- [12] Chemat, F., Rombaut, N., Pierson, J.T., Bily, A. (2015). Green extraction: from concepts to research, education, and economical opportunities. *Green Extraction of Natural Products: Theory and Practice*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr, 12, 69469, Weinheim, Germany, 1-30.
- [13] Cilt, D. (2010). Kapsaisin: Farmakokinetik, Toksikolojik ve Farmakolojik Özellikleri, 149-164.
- [14] Collera-Zúñiga, O., Jiménez, F.G., Gordillo, M. R. (2005). Comparative study of carotenoid composition in three Mexican varieties of *Capsicum annuum* L. *Food Chemistry*, 90(1-2), 109-114.
- [15] Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- [16] Daood, H.G., Kapitány, J., Biacs, P., Albrecht, K. (2006). Drying temperature, endogenous antioxidants and capsaicinoids affect carotenoid stability in paprika (red pepper spice). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2450-2457.
- [17] Daood, H.G., Palotás, G., Palotás, G., Somogyi, G., Pék, Z., Helyes, L. (2014). Carotenoid and antioxidant content of ground paprika from indoor-cultivated traditional varieties and new hybrids of

- spice red peppers. *Food Research International*, 65(PB), 231-237.
- [18] Dias, A.L.B., Arroio Sergio, C.S., Santos, P., Barbero, G.F., Rezende, C.A., Martínez, J. (2016). Effect of ultrasound on the supercritical CO₂ extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L. var. pendulum). *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 284-294.
- [19] Dong, X., Li, X., Ding, L., Cui, F., Tang, Z., Liu, Z. (2014). Stage extraction of capsaicinoids and red pigments from fresh red pepper (*Capsicum*) fruits with ethanol as solvent. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 396-402.
- [20] Esquivel, P., Jiménez, V.M. (2012). Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International*, 46(2): 488-495.
- [21] Gnayfeed, M.H., Daood, H.G., Biacs, P.A., Alcaraz, C.F. (2001). Content of bioactive compounds in pungent spice red pepper (paprika) as affected by ripening and genotype. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(15), 1580-1585.
- [22] González-Centeno, M.R., Comas-Serra, F., Femenia, A., Rosselló, C., Simal, S. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506-514.
- [23] Guadarrama-lezama, A.Y., Dorantes-alvarez, L., Jaramillo-flores, M.E., Pérez-alonso, C., Niranjan, K., Gutiérrez-lópez, G.F. Alamilla-beltrán, L. (2012). Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli (*Capsicum annum* L.) and their microencapsulates obtained by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 112(1-2), 29-37.
- [24] Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(11), 966-968.
- [25] Henderson, D.E., Henderson, S.K. (1992). Thermal decomposition of capsaicin. 1. Interactions with oleic acid at high temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2263-2268.
- [26] Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G., Goni, I. (2010). Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3399-3406.
- [27] Hornero-Méndez, D., Gómez-Ladrón De Guevara, R., Mínguez-Mosquera, M.I. (2000). Carotenoid biosynthesis changes in five red pepper (*Capsicum annum* L.) cultivars during ripening. Cultivar selection for breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(9), 3857-3864.
- [28] Isik, F., Yapar, A. (2014). Fatty acid composition and sensory properties of tarhanas prepared by processed tomato and paprika waste materials. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(1), 607-614.
- [29] Isik, F., Yapar, A. (2017). Effect of tomato seed supplementation on chemical and nutritional properties of tarhana. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 667-674.
- [30] Krichnavaruk, S., Shotipruk, A., Goto, M., Pavasant, P. (2008). Supercritical carbon dioxide extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* with vegetable oils as co-solvent. *Bioresource Technology*, 225(2), 239-247.
- [31] Kumcuoğlu, S., Yılmaz, T., Tavman, Ş. (2011). Salça üretim atıklarından ultrason destekli ekstraksiyon işlemiyle likopen ekstraksiyonu. *Akademik Gıda*, 9(6), 23-28.
- [32] Li, Y., Fabiano-Tixier, A.S., Tomao, V., Cravotto, G., Chemat, F. (2013). Green ultrasound-assisted extraction of carotenoids based on the bio-refinery concept using sunflower oil as an alternative solvent. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 12-18.
- [33] Madureira, A.R., Amorim, M., Gomes, A.M., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465-470.
- [34] Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. (2004). Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 3861-3869.
- [35] Márkus, F., Daood, H. G., Kapitány, J., Biacs, P. A. (1999). Change in the carotenoid and antioxidant content of spice red pepper (Paprika) as a function of ripening and some technological factors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 100-107.
- [36] Mokhtar, M., Russo, M., Cacciola, F., Donato, P., Giuffrida, D., Riazzi, A., Mondello, L. (2016). Capsaicinoids and carotenoids in *Capsicum annum* L.: optimization of the extraction method, analytical characterization and evaluation of its biological properties, *Food Analytical Methods*, 9(5), 1381-1390.
- [37] Muyonga, J.H., Cole, C.G.B., Duodu, K.G. (2004). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chemistry*, 86(3), 325-332.
- [38] Oboh, G., Batista, J. (2007). Polyphenols in red pepper [*Capsicum annum* var. *aviculare* (Tepin)] and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver, 225, 239-247.
- [39] Paduano, A., Caporaso, N., Santini, A., Sacchi, R. (2014). Microwave and ultrasound-assisted extraction of capsaicinoids from chili peppers (*Capsicum annum* L.) in flavored olive oil. *Journal of Food Research*, 3(4), 51.
- [40] Pan, X., Niu, G., Liu, H. (2003). Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chemical Engineering and Processing*, 42(2), 129-133.
- [41] Peña-Alvarez, A., Alvarado, L.A., Vera-Avila, L.E. (2012). Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Instrumentation Science & Technology*, 40(5), 429-440.

- [42] Raji, Z., Khodaiyan, F., Rezaei, K., Kiani, H., Hosseini, S.S. (2017). Extraction optimization and physicochemical properties of pectin from melon peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709-716.
- [43] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [44] Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., Fernandes, F.A.N. (2008). Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(1), 95-100.
- [45] Rombaut, N., Avignon, N., Vaucluse, P.D. (2014). Green extraction processes of natural products as tools for biorefinery. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(4), 530-544.
- [46] Roy, S.A. (2014). Effect of thermal processing on in vitro antioxidant potential of *Capsicum* (*Capsicum annuum*) of different ripening stages. *Journal of Pharmacy Research*, 8(12), 1751-1756.
- [47] Sachindra, N.M. Mahendrakar, N.S. (2005). Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. *Bioresource Technology*, 96(10), 1195-1200.
- [48] Salarbashi, D., Mortazavi, S.A., Rezaei, K., Rajaei, A. Karimkhani, M.M. (2012). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from yarrow (*Achillea beibrestinii*) by response surface methodology. *Food Science and Biotechnology*, 21(4), 1005-1011.
- [49] Santamaría, R.I., Reyes-Duarte, M.D., Bárzana, E., Fernando, D., Gama, F.M., Mota, M. López-Munguía, A. (2000). Selective enzyme-mediated extraction of capsaicinoids and carotenoids from chili guajillo puya (*Capsicum annuum* L.) using ethanol as solvent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(7), 3063-3067.
- [50] Santos, H. M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J.L. (2009). *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Portugal, 16.
- [51] Santos, P., Aguiar, A.C., Barbero, G.F., Rezende, C.A. Martínez, J. (2015). Supercritical carbon dioxide extraction of capsaicinoids from malagueta pepper (*Capsicum frutescens* L.) assisted by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 78-88.
- [52] Schieber, A., Stintzing, F. Carle, R. (2001). By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 2(11), 401-413.
- [53] Sittikulwitit, S., Sirichakwal, P.P., Puwastien, P., Chavasit, V. Sungpuag, P. (2004). In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(3-4), 321-329.
- [54] Sricharoen, P., Lamaiphan, N., Patthawaro, P. Limchoowong, N. (2017). Ultrasonics Sonochemistry Phytochemicals in *Capsicum oleoresin* from different varieties of hot chilli peppers with their antidiabetic and antioxidant activities due to some phenolic compounds. *Ultrasonics - Sonochemistry*, 38, 629-639.
- [55] Sulaiman, S., Abdul Aziz, A.R., Kheireddine Aroua, M. (2013). Optimization and modeling of extraction of solid coconut waste oil. *Journal of Food Engineering*, 114(2), 228-234.
- [56] Tian, Y., Zeng, H., Xu, Z., Zheng, B., Lin, Y., Gan, C., Lo, Y.M. (2012). Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activity of polysaccharides recovered from white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 522-529.
- [57] Topak, H., Erbil, N. & Diğrak, M. (2008). Doğu Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen biberlerin (*Capsicum annuum* L.) antimikrobiyal aktivitesinin araştırılması. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(2), 257-264.
- [58] TÜİK. (2017). Bitkisel üretim istatistikleri, 2004-2016. Retrieved from <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>
- [59] Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Bonesi, M., Conforti, F., Statti, G. Menichini, F. (2011). Comparative study on the chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activities of two *Capsicum annuum* L. cultivars (*Acuminatum* small and *Cerasiferum*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 261-269.
- [60] Wang, Y., Wang, H., Feng, X., Wang, X., Huang, J. (2010). Biohydrogen production from cornstalk wastes by anaerobic fermentation with activated sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(7), 3092-3099.
- [61] Zewdie, Y. Bosland, P.W. (2001). Capsaicinoid profiles are not good chemotaxonomic indicators for *Capsicum* species. *Biochemical systematics and Ecology*, 29(2), 161-169.