



Siyah Kuşburnu Meyvesinden Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu ile Doğal Pigment Eldesinin Yüzey Yanıt Yöntemi Kullanılarak Modellenmesi ve Optimizasyonu

Kadriye Nur Kasapoğlu¹, Evren Demircan², Mine Gültekin-Özgülven^{3*}, Beraat Özçelik⁴

¹ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-6070-4948), kasapogluk@itu.edu.tr

² İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0001-8533-6037), evrendemircan@itu.edu.tr

^{3*} İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-2073-8075), gultekinmi@itu.edu.tr

⁴ İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İstanbul, Türkiye (ORCID: 0000-0002-1810-8154), ozcelik@itu.edu.tr

(İlk Geliş Tarihi 3 Haziran 2020 ve Kabul Tarihi 8 Ekim 2020)

(DOI: 10.31590/ejosat.747799)

ATIF/REFERENCE: Gültekin-Özgülven, M., Demircan E., Kasapoğlu K.N., Özçelik B. (2020). Siyah Kuşburnu Meyvesinden Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu ile Doğal Pigment Eldesinin Yüzey Yanıt Yöntemi Kullanılarak Modellenmesi ve Optimizasyonu. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (20), 16-23.

Öz

Bu çalışmada siyah kuşburnu meyvesi içerdiği antosiyaninlerden dolayı doğal pigment kaynağı olarak kullanılmıştır. Söz konusu pigmentleri elde etmek için yeşil teknoloji olarak değerlendirilen ve organik çözen kalıntısı bırakma riski içermeyen süperkritik karbon dioksit (SK-CO₂) ekstraksiyonundan yararlanılmıştır. Ekstraksiyon parametreleri olan karbon dioksit basıncı (150-350 bar), sıcaklık (40-60°C) ve yardımcı solvent (etanol) konsantrasyonunun (%20-100) toplam antosiyaninlerin eldesi üzerine etkileri Box-Behnken modeline göre Yanıt-Yüzey Yöntemi ile model oluşturularak optimize edilmiştir. Antosiyaninlerin SK-CO₂ ekstraksiyonu sulu etanolün yardımcı çözen olarak kullanımıyla başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bağımsız değişkenler içinde en önemli değişkenin yardımcı çözen kompozisyonu ile sıcaklık ve basınç interaksyonu olduğu görülmüştür. Optimum proses koşulları olarak basıncı (350 bar) ve sıcaklığın (60°C) en yüksek olduğu, etanol konsantrasyonunun %60 olan merkez noktası değerlerine yakın olduğu (%54-55) değerler bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre özellikle etanol konsantrasyonunun %60'ın altında kalması gerektiği anlaşılmıştır. Ayrıca, saf etanol kullanılan işlemlerde ekstraksiyon veriminin çok düşük çıktığı görülmüştür. Son olarak; modelin validasyonu gerçekleştirilmiş, tahminlenen toplam antosiyanin miktarı ile gerçek ölçülen değerlerle karşılaştırıldığında değerlerin birbirine yakın olduğu (R²=0.8936) sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Siyah kuşburnu, antosiyanin, süperkritik CO₂ ekstraksiyonu, yanıt yüzey yöntemi

Modeling and Optimization of Supercritical CO₂ Extraction of Natural Pigments from Black Rosehip Using Response Surface Methodology

Abstract

In this work, black rosehip was used as potent natural pigment source due to its anthocyanin content. To obtain these pigments, supercritical carbon dioxide extraction considered as a green extraction technique was employed. The effects of carbon dioxide pressure (150-350 bar), temperature (40-60°C) and co-solvent (ethanol) concentration (20-100%) on extraction of total anthocyanins were optimized using the Response-Surface Method according to the Box-Behnken model. Extraction of anthocyanins was successfully achieved when aqueous ethanol used as co-solvent. The most effective variables were co-solvent composition and pressure and temperature interaction (p<0.05). Optimum extraction conditions were elicited as the highest pressure (350 bar) and temperature (60°C) conditions and the ethanol concentration close to the center point values of 60% (54-55%). According to the results obtained, it was understood that the ethanol concentration should remain below 60%. In addition, extraction efficiency was found to be very low in processes using absolute ethanol. Finally; the model was validated. When the estimated total anthocyanin amount (R₂ = 0.8936) was compared to the actual measured values, the values were found to be close to each other.

Keywords: Black rosehip, anthocyanins, supercritical CO₂ extraction, response surface methodology

* Sorumlu Yazar: gultekinmi@itu.edu.tr

1. Giriş

Kuşburnu, Rosaceae familyasından Rosa cinsine ait çalı formunda, kışın yaprağını döken bir bitki türüdür. Anavatanının Batı Asya, Anadolu, Kuzey ve Orta Avrupa olduğu bilinmektedir. Anadolu'da özellikle Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yaygın olarak bulunmaktadır (Öz ve diğ., 2018). Meyveleri geleneksel olarak pek çok ülkede tıbbi amaçlı toplanmaktadır. İçerdiği antosiyaninler, askorbik asit, flavonoidler, fenolik asitler, tanenler, tokoferoller, aminoasitler ve pektinler gibi biyolojik olarak aktif bileşikler (Fascella ve diğ., 2019) sayesinde influenza, enfeksiyonlar, iltihaplı hastalıklar, kronik ağrı, ülser gibi katalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ercişli & Eşitken, 2004). Farklı türleri bulunmakla birlikte "siyah kuşburnu" (*Rosa pimpinellifolia* L.) olarak adlandırılan türü diğer kuşburnu türlerine göre daha az yaygındır. Ancak, potansiyel bir antosiyanin deposudur. Antosiyaninler meyve, sebze ve çiçeklerin kırmızı, mor ve pembe renklerinden sorumludurlar. Asidik pH değerlerinde kara havuç gibi kırmızı-mor renkli meyvelerin ekstraktları parlak kırmızı bir renge sahip olduğu için meyve suları ve nektarları, alkolsüz içecekleri, konserveleri ve şekerlemeleri renklendirmek için iyi bir seçimdir. Doğal bir renklendirici olduğundan, gıda etiketlerinde bir E numarası ile herhangi bir beyan gerektirmez. Siyah kuşburnu içerdiği antosiyaninler nedeniyle doğal pigment yani renklendirici kaynağı olarak kullanılabilir. Renklendirici özelliklerine ek olarak, güçlü antioksidan özellikleri nedeniyle ateroskleroz, kanser, diyabet ve nörodejeneratif bozukluk riskini azaltarak insan sağlığına olası olumlu katkısı nedeniyle antosiyaninlere olan ilgi günden güne artmaktadır (Khandare ve diğ., 2011).

Geleneksel olarak antosiyaninler polar moleküller olup asitlendirilmiş etanol yardımıyla katı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilirler. Ancak, daha hızlı sonuç veren ve organik solvent kullanmayan süperkritik akışkanlarla gerçekleştirilen ekstraksiyon yöntemlerine ilgi duyulmaya başlanmıştır (Seabra ve diğ., 2010). Yeşil teknolojilerden biri olan süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu herhangi bir çözücü kalıntısı içermeyen ve düşük sıcaklıklarda gerçekleştiği için bozulma reaksiyonlarının görülmediği ürünler elde edilmesini sağlamaktadır. Süperkritik durumun en önemli özelliği, çözme gücünün güçlü bir şekilde akışkan yoğunluğuna bağlı olması ve kimyasal bileşimi değiştirmeden basınç ve sıcaklığı kontrol ederek ayarlanabilmesidir. Bu özellik seçici ekstraksiyon ve saflaştırma imkanı sunmaktadır. Karbondioksit, nispeten düşük kritik sıcaklık (31.3°C) ve basıncı (72.9 bar), düşük toksisite ve uygun maliyeti nedeniyle en önemli ekstraksiyon ortamıdır. Ayrıca, süperkritik CO₂ akışkanı birçok organik çözücü ile karışabilir. Bu karışımları oluşturma yeteneği süperkritik akışkan CO₂'in çözüme gücünü ve polaritesini büyük ölçüde arttırmaktadır (Bristow ve diğ., 2001). Bu çalışmada CO₂ gazı etanolle birlikte kullanılacaktır. Nitekim, Zulkafli ve diğ. (2014) yaptıkları çalışmada etanolün yardımcı solvent olarak kullanılmasının toplam fenolik miktarını arttırdığını rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, antosiyaninler kolay bozulan, pH, sıcaklık gibi çevre koşullarına duyarlı pigmentlerdir. Süperkritik CO₂ ekstraksiyonu sırasında karbonik asit ve/veya alkil karbonik asidin doğal olarak oluşumu sayesinde pH'deki düşüş ve ortamda oksijen bulunmamasından ötürü antosiyaninlerinin stabilitesi artabilmektedir (Seabra ve diğ., 2010). Tüm bu

nedenlerden dolayı bu çalışmada konvansiyonel ekstraksiyon yöntemleri yerine SK-CO₂ ekstraksiyonu tercih edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, siyah kuşburnu meyvesinden doğal pigmentlerin (antosiyaninlerin) gıdalarda güvenle kullanılacak şekilde ekstraksiyonu için hızlı, basit, güvenli ve kolayca uygulanabilen bir SK-CO₂ ekstraksiyon yöntemi geliştirmek ve Yanıt-Yüzey Yöntemini (response surface methodology) kullanarak optimize etmektir. Bu amaçla antosiyanin pigmentlerin SK-CO₂ ile ekstraksiyonunda önemli olan basınç, sıcaklık ve yardımcı çözücü olarak kullanılan etanol konsantrasyonu parametrelerinin toplam antosiyanin miktarı üzerindeki etkileri araştırılmış ve optimize edilmiştir. Ayrıca, metanol kullanılarak konvansiyonel çözgen ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve elde edilen TA sonuçları SK-CO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Böylece yöntemin verimi de değerlendirilebilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Materyal

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO) temin edilmiştir. Sadece etanol teknik saflıkta olup Emboyl, Türkiye'den tedarik edilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyon dereceli %99.9 saflıktaki karbon dioksit daldırma tüplü bir silindir içinde Linde Gaz'dan satın alınmıştır.

2.2. Metot

2.2.1. Numunenin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan siyah kuşburnu meyve numuneleri Gümüşhane yöremizden Eylül ayında toplanmıştır. Soğuk zincir bozulmadan laboratuvara ivedilikle getirilmiştir. Meyveler iyice yıkandıktan sonra ve işlem süresine kadar -80°C'de saklanmıştır. Meyveler herhangi enzimatik bozulmanın önlenmesi için sıvı azot ile öğütülerek toz hale getirilmiştir. Daha sonra ise yüksek sıcaklık uygulamasından kaçınılarak dondurucu kurutucuda sabit nem içeriğine kadar (%5, g/g) kurutularak SK-CO₂ ekstraksiyon işlemine hazır hale getirilmiştir. Kuru halde toz numuneler deneyler süresince karanlıkta -18°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.2. Çözgen Ekstraksiyonu

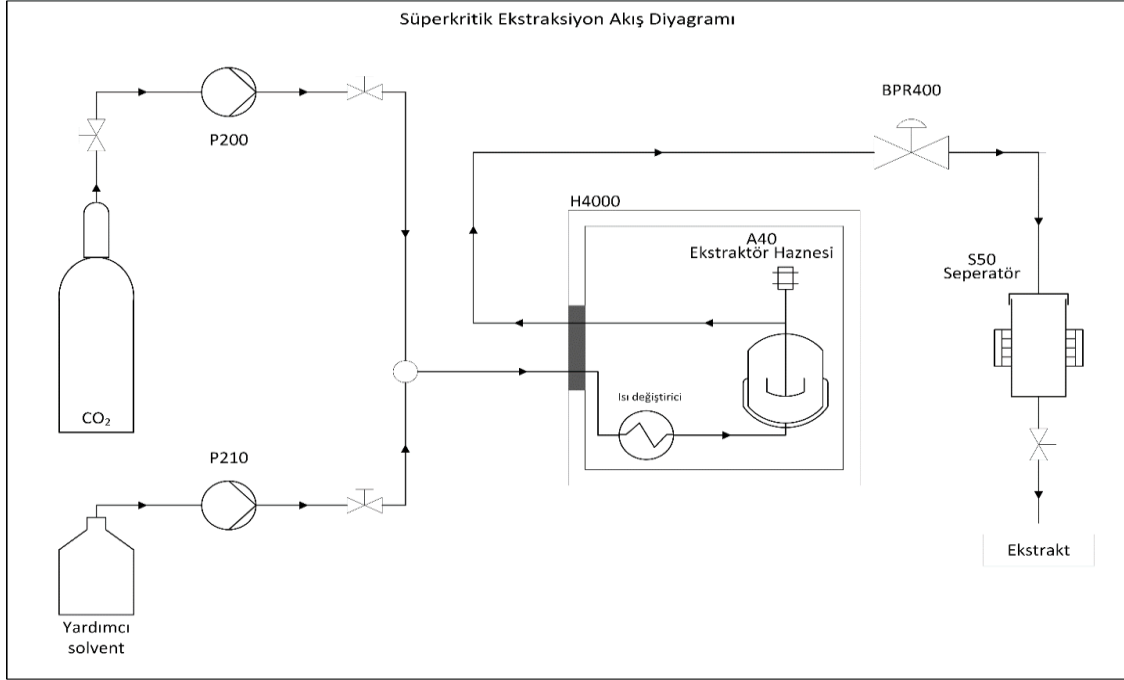
Siyah kuşburnu örnekleri absolut metanol ile SK-CO₂ ekstraksiyonunda kullanılan örnek: çözgen oranı (1:25, ml/ml) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Örnekler, ultrasonik homojenizatörde (Bandelin, Almanya) oda sıcaklığında 20 sn süreyle bekletildikten sonra 2800 g'de 15 dk santrifüjlenmiştir (Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Almanya). İki kere tekrarlanan ekstraksiyon işleminden sonra üstte toplanan ekstraktlar birleştirilerek metanol içerikleri vakumlu evaporatörde (Bibby Sterilin RE-100, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, İngiltere) uçurulmuştur.

2.2.3. Süperkritik Karbondioksit Ekstraksiyonu

Şekil 1'de kurulumu verilen Separex (Fransa) marka SFE100 model SK-CO₂ ekstraktörü; P200 CO₂ pompası, P210 yardımcı solvent pompası, yüksek sıcaklıklara çıkan H4000 fırın, S50 separatör (maks. 200 bar basınç ve maks. 150°C 300 ml kapasite), yüksek basınçlı A40 ekstraktör haznesi (500 ml) ve BPR 400 geri basınç regülatöründen meydana gelmektedir. Fırının içinde bulunan otoklava toz haline getirilen numune

yerleştirilerek istenen sıcaklığa ulaşması beklenmiştir. Sıvı haldeki CO₂ kriyojenik banyoda 277°K'e soğutulup ekstraktöre pompalanarak istenen çalışma basıncına ulaşması sağlanmıştır. Basınç bir basınç ölçerle kontrol edilmiştir. Ekstraktörün basıncı manuel olarak geri basınç regülatörü ile ayarlanmıştır. Genleşme supabı açıldıktan sonra CO₂ akışı sabit sıcaklık, basınç ve akış hızında başlatılmıştır. Çalışmada CO₂ akış hızı 90 g/dk, yardımcı çözgen ise 10 g/dk olarak ayarlanmıştır. CO₂ gaz haline

geçtikten sonra ekstrakte edilen bileşikler toplama haznesinde birikmiştir. Yardımcı solvent olarak kullanılan etanol ekstraktör girişinde CO₂ ile karıştırılmıştır. Ekstraksiyonun bitişinde ekstraktör haznesinin basıncı ve sıcaklığı çevre koşullarına düşürülmüştür. Separatör sayesinde ekstrakt ve solvent CO₂'ten ayrılıp bir toplayıcıda toplanmıştır. Ayrılan CO₂ CE2000 kondensörüne bir pompayla gönderilerek geri dönüştürülmüştür.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan SFE100 model SK-CO₂ ekstraktörü düzeneği.

2.2.4. Antosiyanin Pigmenti Miktarının Belirlenmesi

Örneklerin toplam antosiyanin (TA) miktarları pH-diferansiyel yöntemiyle belirlenmiştir. Ekstraktın 1 ml'si potasyum klorür tampon (pH 1.0) ve sodyum asetat tampon (pH 4.5) ile sırasıyla seyreltilmiştir. 15 dakika dengeye gelmesi için bekletilen seyreltimlerin her birinin absorbans değerleri 520 ve 700 nm dalga boylarında UV/Vis spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. Antosiyanin miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Vatai ve diğ., 2009). Sonuçlar milligram siyanidin-3-glikozit/ ml ekstrakt cinsinden verilmiştir.

$$\text{Antosiyanin konsantrasyonu } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \cdot MA \cdot SF \cdot 10^3}{\epsilon \cdot l} \quad (1)$$

A: absorbans ($A_{pH1.0} - A_{pH4.5}$), MA: siyanidin-3-glikozidin molekül ağırlığı (449.2 g/mol), SF: seyreltme faktörü, ϵ : siyanidin-3-glikozidin molar emiciliği (26.900 L/cm.mol).

2.2.5. Ekstraksiyon Veriminin Hesaplanması

SK-CO₂ ekstraktöründen elde edilen siyah kuşburnu ekstraktlarının ekstraksiyon verimi, bu ekstraktların TA

miktarlarının metanol kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel çözgen ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen siyah kuşburnu ekstraktının TA miktarına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

2.2.6. Yanıt-Yüzey Yöntemine Göre Deneysel Tasarım

Süper kritik ekstraksiyonda basınç, sıcaklık ve etanol konsantrasyonunun (bağımsız değişkenler ya da faktörler) kara kuşburnu antosiyaninlerinin eldesi (cevap) üzerine etkisi "Yüzey-Yanıt Yöntemi" kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel tasarımda Box-Behnken istatistiksel modeli kullanılarak 3 faktörlü, her bir faktör için 3 seviyeli olarak tasarlanmıştır. Bu faktörlerin seviyeleri literatürde geçen benzer çalışmalar ve ön denemelere göre belirlenmiş olup kodlu (-1, 0, +1) ve gerçek değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Tasarımda deneysel hatayı tahminleyebilmek için merkez nokta (0, 0, 0; 250 bar, 50°C, %60) 5 kere tekrar edilmek üzere model tarafından toplam 17 koşul belirlenmiştir. Bağımsız değişkenlerden basınç (150-350 bar), sıcaklık (40-60°C) ve etanol konsantrasyonu (%20-100) arasında değişmektedir. Deney dizisinin sıralaması kontrolsüz faktörlerin etkilerini en aza indirmek için randomize edilmiştir.

Tablo 1. Süperkritik ekstraksiyonda bağımsız değişkenlerin kodlu ve gerçek değerleri.

Bağımsız Değişkenler	-1 (Düşük)	0 (Merkez)	1 (Yüksek)
Basınç (P, bar)	150	250	350
Sıcaklık (T, °C)	40	50	60
Etanol konsantrasyonu (EtOH:H ₂ O, %)	20	60	100

2.2.7. İstatistiksel Analiz

İkinci dereceden polinom eşitliğin tüm bağımsız değişkenlere uyması için elde edilen deneysel veriler çoklu regresyonla analiz edilmiştir. Bağımsız değişkenlerin lineer, kuadratik ve interaksiyon etkilerinin yanı sıra üzerindeki istatistiksel önemlilikleri %95 güven seviyesinde Fischer (F-testi) testi uygulanarak bulunmuştur. Modelin uygunluğunu değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) gerçekleştirilmiştir. R² katsayısı ve uyum eksikliği (lack of fit) testleri ile modelin yeterliliği değerlendirilmiştir. Bağımsız değişkenler ile cevap arasındaki ilişkiyi görmek için yüzey yanıt ve kontur grafikleri ve hedeflenen cevaplara ulaşmak için tahminlenen optimum koşullar Design Expert Version Software Trial 12.0 (Stat Ease Inc., Minneapolis, USA) paket programı ile oluşturulmuştur.

2.2.8. Optimizasyon ve Validasyon

Optimum koşulların belirlenmesinde toplam antosiyanin miktarının maksimum olduğu değerler dikkate alınmıştır. Optimize edilmiş koşulların geçerliliğini belirlemek için, belirlenen optimal koşullar altında üç kere daha deneyler yapılmıştır. Bu deneylerin ortalama değerleri model tarafından

tahmin edilen optimize değerlerle karşılaştırılarak, söz konusu optimum koşulların ve matematiksel modellerin doğruluğu ve uygunluğu anlaşılabilmektedir (Maran ve diğ., 2014).

3. Araştırma Sonuçları ve Tartışma

BBD'ye göre belirlenen ve 17 adet denemeye ait olan bağımsız değişkenler (faktörler) ve cevaplar (bağımlı değişken veya sonuç) Tablo 2'de verilmiştir. Buna göre gerçekleştirilen denemelerden elde edilen siyah kuşburnu ekstraktlarının TA miktarlarının 15.15 ile 155.13 mg syn-3-gl/ mL ekstrakt arasında geniş bir aralıkta değiştiği görülmektedir. Bu değişim bağımsız değişkenler olan basınç, sıcaklık ve etanol konsantrasyonu ile bunların interaksiyonuna bağlı olarak gerçekleşmiştir.

3.1. Basınç, Sıcaklık, Etanol Konsantrasyonu Değişkenlerinin Antosiyaninler Üzerine Etkisi

Elde edilen modelin istatistiksel önemi ANOVA testi ile değerlendirilmiştir ve Tablo 3'te TA miktarının optimizasyonu için ANOVA sonuçları verilmiştir.

Tablo 2. BBD'ye göre belirlenen bağımsız ve bağımlı değişkenler.

Deney Sırası	Bağımsız Değişkenler			Cevap
	Basınç (bar) (X1)	Sıcaklık (°C) (X2)	Etanol konsantrasyonu (%) (X3)	TA Miktarı (mg syn-3-gl/ mL ekstrakt)
1	250	50	60	117.90
2	250	50	60	113.60
3	250	40	100	27.02
4	250	40	20	29.66
5	350	50	100	23.50
6	350	40	60	93.74
7	250	50	60	130.0
8	350	60	60	155.13
9	150	60	60	117.52
10	250	60	20	42.48
11	250	50	60	112.50
12	150	50	100	15.15
13	250	50	60	100.0
14	150	40	60	133.67
15	150	50	20	74.41
16	350	50	20	79.36
17	250	60	100	16.69

TA: toplam antosiyanin; syn-3-gl: siyanidin-3-glikozit eşdeğeri

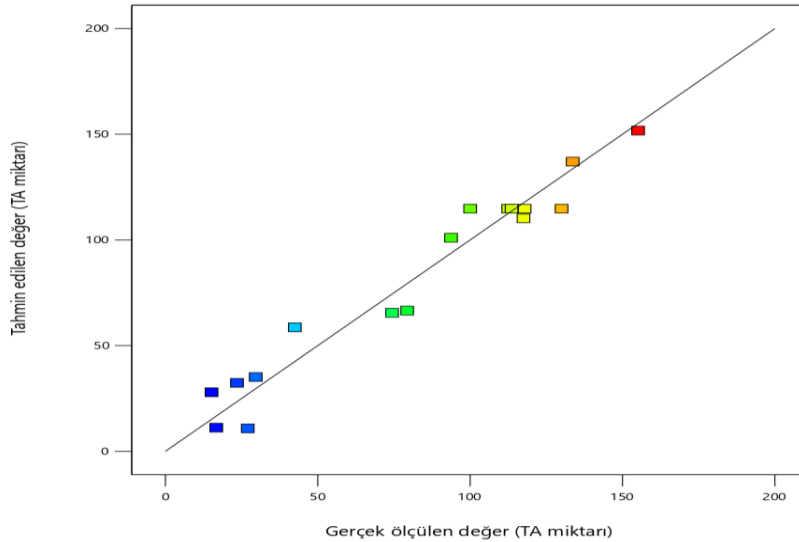
Tablo 3. TA miktarının optimizasyonu için BBD ANOVA sonuçları.

Cevap	Faktörler	Katsayı	P değeri	Model uyumu
TA miktarı	Basınç (L)	1.3725	0.8085	R ² =0.9522
	Sıcaklık (L)	5.96625	0.3101	F=15.48
	Etanol konsantrasyonu (L)	-17.9438	0.0133	P=0.0008
	Basınç X Sıcaklık	19.385	0.0402	
	Basınç X Etanol konsantrasyonu	0.85	0.9153	
	Sıcaklık X Etanol konsantrasyonu	-5.7875	0.4774	
	Basınç (K)	14.6788	0.0917	
	Sıcaklık (K)	-4.46375	0.5712	
	Etanol konsantrasyonu (K)	-81.3737	< 0.0001	
Kesişim (Intercept)		+114,80		

L: lineer, K: kuadratik

Tablo 3'te de görüldüğü gibi F ve p dikkate alındığında modelin p değerinin 0.05'den küçük olduğu için önerilen modelin bu çalışma için uygun olduğu anlaşılmıştır. Kuadratik model için gerçekleştirilen ANOVA sonuçlarına göre TA miktarının (p=0.0008) önemli olduğu görülmektedir. Ayrıca

regresyon katsayısı (R²)'nin 1'e yakın olduğu (TA miktarı için R²=0.9522) yani gözlenen ve tahmin edilen değerler arasındaki ilişkinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 2). TA miktarı için etanol konsantrasyonu (L) (p=0.0133), basınç ve sıcaklık interaksyonu (p=0.0402) ve etanol konsantrasyonu (K) (p<0.0001) p önemli olduğu p değerlerine bakılarak anlaşılmaktadır.



Şekil 2. TA miktarı için model tarafından tahminlenen sonuçlar ve deneysel olarak elde edilen gerçek sonuçlar arasındaki ilişki.

TA miktarını basınç, sıcaklık ve etanol konsantrasyonu parametrelerinden sadece önemli çıkan etanol konsantrasyonu (L), etanol konsantrasyonu (K) ve basınç ve sıcaklık interaksyonu parametrelerinin bir fonksiyonu olarak veren model eşitliği Eşitlik 1'de verilmiştir. Yazılım tarafından e-ISSN: 2148-2683

oluşturulan bu eşitliklerde önemli çıkmayan parametreler eşitliğe dahil edilmemiştir (Jiao, 2018).

$$TA \text{ miktarı} = +114,80 - 17,94C + 19,38AB - 81,37C^2 \quad (1)$$

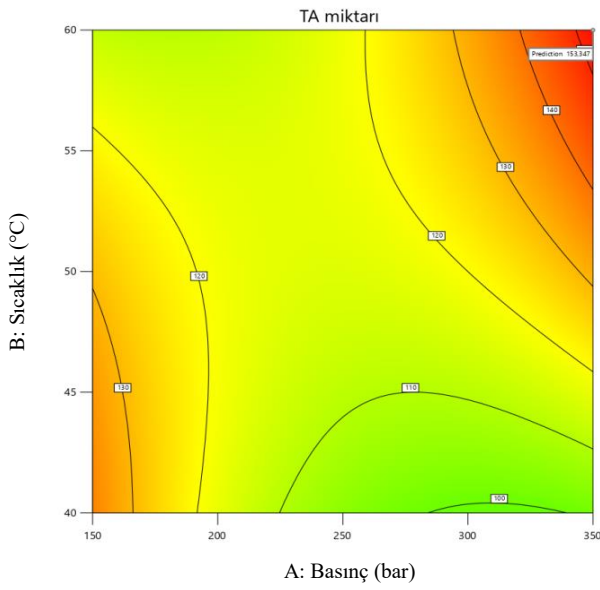
Eşitlik 1'den de anlaşıldığı üzere TA miktarını etanol konsantrasyonunun birinci ve ikinci dereceden değişkenleri negatif olarak etkilerken basınç ve sıcaklık interaksiyonu ise pozitif olarak etkilemektedir.

3.2. Tepki Yüzey Grafikleri

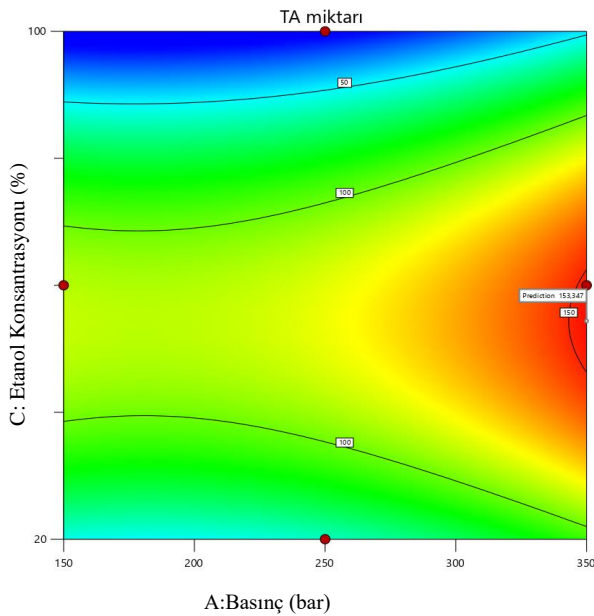
Faktörlerin etkileşimlerinin yanıt entegrasyonu üzerindeki etkisi kontur çizimleri ile değerlendirilebilir. TA miktarı için kontur ve üç boyutlu grafikler sırasıyla Şekil 3'te verilmiştir. Şekil 3 (A)'da görüldüğü üzere etanol konsantrasyonu sabit tutulduğunda basınç ve sıcaklık değerleri arttıkça elde edilen TA miktarı artmıştır. Ancak bu artış cevap yüzeyinin orta

noktasından sonra başlamıştır. Basınç 150 bar iken sadece sıcaklığın artırılmasının antosiyanin ekstraksiyonuna önemli bir etkisi görülmemiştir. Ancak, basınç 350 bara çıktığında sıcaklığın 40°C'den 60°C'ye yükseltilmesi ile maksimum TA miktarına ulaşmak mümkün olmuştur. Antosiyaninler 70°C'nin üzerinde bozulmaya başladığından deneme deseninde maksimum 60°C'de çalışılmıştır (Zhou ve diğ., 2018). Şekil 3 (B) ve (C)'de verildiği üzere antosiyanin miktarı 350 bar basınçta veya 60°C sıcaklıkta, etanol konsantrasyonu %60'ın altında iken elde edilmiştir. Literatürde sulu etanol çözgen olarak kullanıldığında da etanol konsantrasyonunun % 80'in altında olduğunda ekstraksiyon veriminin daha iyi olduğu gözlenmiştir (Khazaei ve diğ., 2016; Xu ve diğ., 2017).

(A)



(B)



(C)

(D)

(E)

(F)

(G)

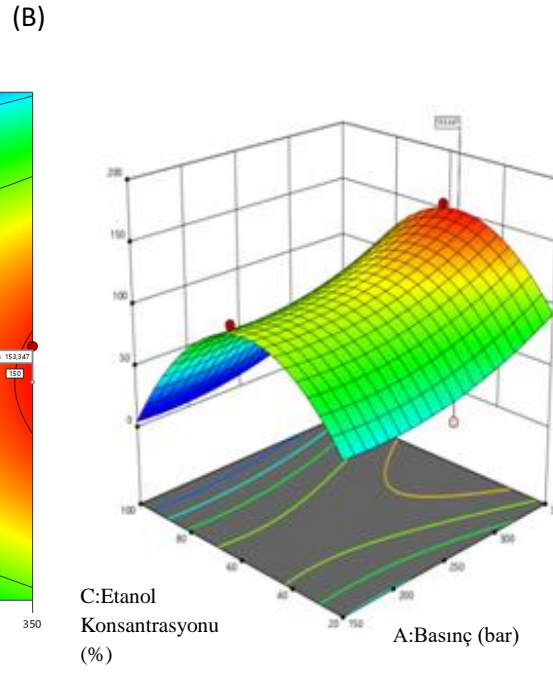
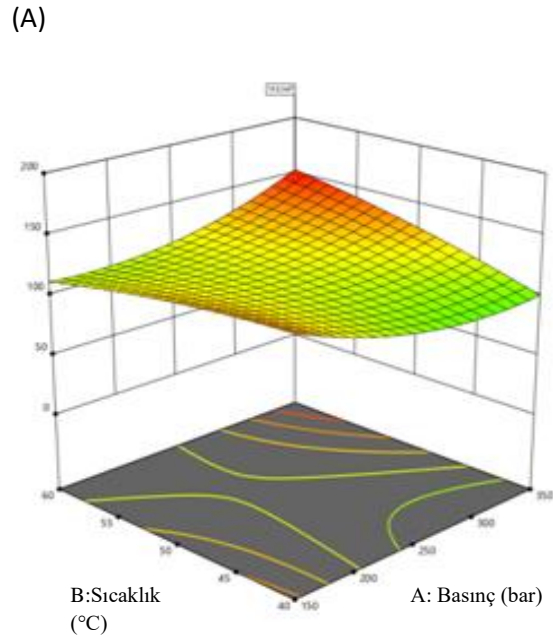
(H)

(I)

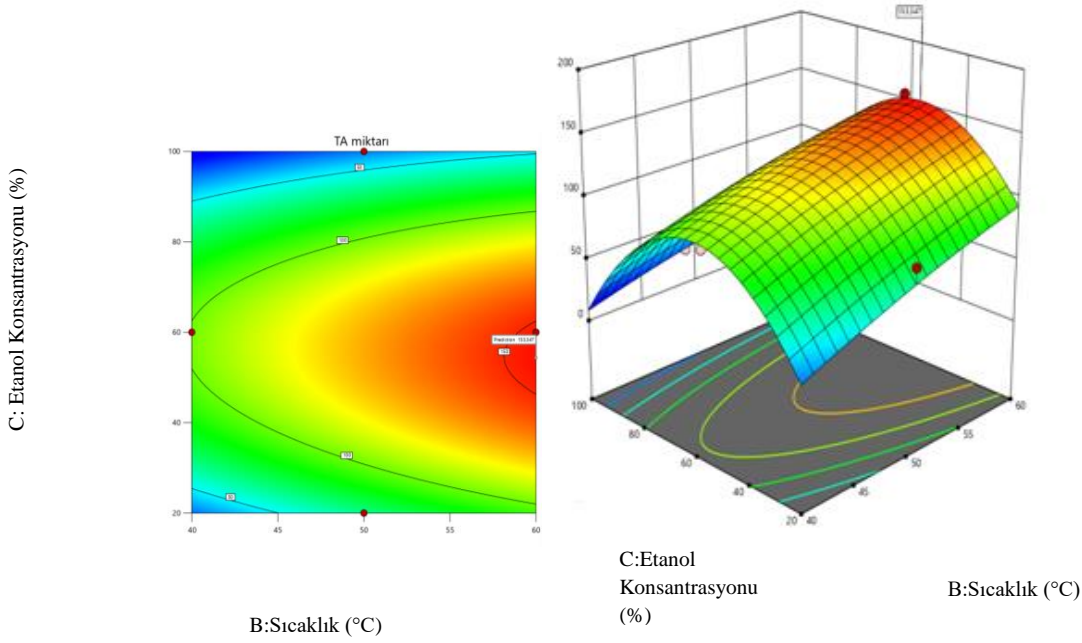
(J)

(K)

(L)



(C)



Şekil 3. TA miktarının kontur ve üç boyutlu gösterimi. Basıncı ve sıcaklığın fonksiyonu olarak (A), etanol konsantrasyonu ve basıncın fonksiyonu olarak (B), etanol konsantrasyonu ve sıcaklığın fonksiyonu olarak (C).

3.3. Validasyon

Modelin belirlediği optimum koşullardan 3 tanesi seçilerek bu koşullarda çalışılmıştır. Tablo 4'te model tarafından tahminlenen ve deneysel olarak ölçülen cevaplar özetlenmiştir.

Tablo 4. Optimum koşulların validasyonu.

Örnekler	Basıncı (bar)	Sıcaklık (°C)	Etanol konsantrasyonu (%)	Tahmin edilen TA Miktarı (mg syn-3-gl/ mL ekstrakt)	Ölçülen deneysel TA Miktarı (mg syn-3-gl/ mL ekstrakt)
Optimum 1	350	60	54.40	115.62	90.10
Optimum 2	350	59.99	53.92	153.34	110.20
Optimum 3	350	60	54.82	153.34	120.20

3.4. Ekstraksiyon Verimi

Metanollü geleneksel çözgen ekstraksiyonu kullanılarak TA miktarı 210.71 ± 1.32 mg siyanidin-3-glukozit/ml ekstrakt olarak bulunmuştur. SK-CO₂ ekstraksiyonla elde edilen sonuçlarla elde edilen verim Şekil 4'te görülmektedir. Buna göre 12 ve 17. örneklerin verimi sırasıyla %7.2 ve %7.9 olmak üzere en düşük çıkmıştır. Bu örnekler etanol konsantrasyonunun %100 olduğu örneklerdir. Susuz etanol kullanılan yöntemlerde verim düşük çıkmaktadır. En yüksek verimse 8. örnekte %73.6 olarak görülmektedir. Bu noktada en yüksek basınç (350 bar), en yüksek sıcaklık (60°C) değerlerinde yardımcı çözgen olarak %60 etanol içeren sulu etanol uygulanmıştır.

4. Sonuç

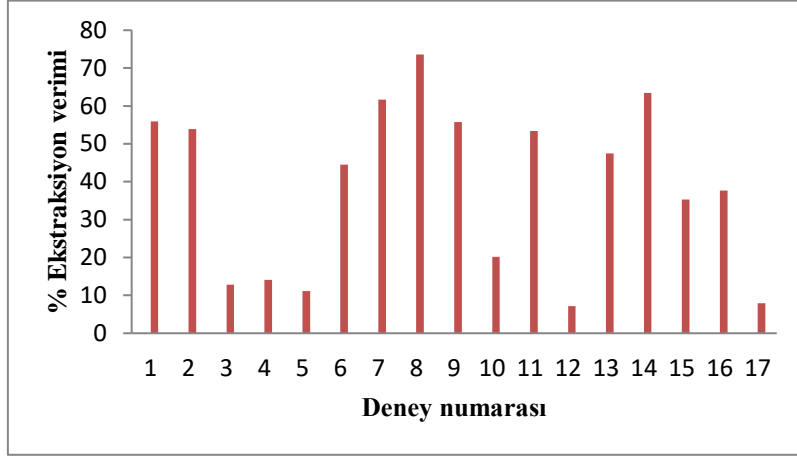
Siyah kuşburnu meyvesi doğal renk pigmentlerinin elde edilebilmesi için iyi bir kaynaktır. Bu doğal pigmentlerin eldesinde SK-CO₂ ekstraksiyonu kullanılmıştır. Yanıt-Yüzey

Görüldüğü gibi tahminlenen ve deneysel olarak ölçülen cevaplar birbirine oldukça yakın çıkmıştır. TA miktarı için $R^2=0.9147$, TA verimi için $R^2=0.8936$ olarak hesaplanmıştır. Böylece model doğrulanmıştır.

Yöntemine göre yardımcı çözgende etanol konsantrasyonunun birinci ve ikinci dereceden değişkenleri ile basınç ve sıcaklık interaksiyonunun antosiyanin miktarı üzerine önemli etkilerinin olduğu, sıcaklık ve basınç parametrelerinin, sıcaklık ile etanol konsantrasyonu interaksiyonunun ve basınç ile etanol konsantrasyonu interaksiyonunun ise ekstrakttaki antosiyanin miktarı üzerine önemli etkilerinin bulunmadığı gözlenmiştir.

Diğer taraftan, her ne kadar yeşil teknoloji olarak adlandırılan SK-CO₂ ekstraksiyonu kullanılarak organik solvent kalıntısı kalmasının ve oksidasyonun önüne geçmek istenmesine rağmen bu uygulamanın ticari boyutta ekonomik olmaması ve ekstraksiyon veriminin metanol kullanılarak gerçekleştirilen geleneksel çözgen yöntemine göre daha düşük kalması söz konusu yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Daha düşük basınçlarda çalışılması, yardımcı solvent kullanımından vazgeçilmemesi ve çözünen antosiyanin pigmentinin süperkritik akışkandan ayrılmasında membranlardan yararlanılması gibi yöntemlerle bu teknolojinin maliyeti diğer geleneksel yöntemlere yarışabilir hale getirilebilmesi mümkün olabilir.

Ekstraksiyon veriminin artırılması içinse daha sonraki gerçekleştirilmesi önerilmektedir. çalışmalarda metot değişimine gidilerek farklı denemelerin



Şekil 4. BBD deney numaralarına göre ekstraksiyon verimi.

5. Teşekkür

Yazarlar siyah kuşburnu numunelerinin tedarik eden Bayburt Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Dr. Öğretim Üyesi Ayla Arslaner'e teşekkür eder.

Kaynakça

- Bristow, S., Shekunov, B. Y., & York, P. (2001). Solubility analysis of drug compounds in supercritical carbon dioxide using static and dynamic extraction systems. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 40(7), 1732–1739. Doi:10.1021/ie0002834
- Ercişli, S. & Eşitken, A. (2004) Fruit characteristics of native rose hip (*Rosa* spp.) selections from the Erzurum province of Turkey, *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32(1), 51-53. DOI: 10.1080/01140671.2004.9514279
- Fascella, G., D'Angiolillo, F., Mammano, M. M., Amenta, M., Romeo, F. V., Rapisarda, P., & Ballistreri, G. (2019). Bioactive compounds and antioxidant activity of four rose hip species from spontaneous Sicilian flora. *Food Chemistry*, 289, 56-64. Doi: 10.1016/j.foodchem.2019.02.127
- Jiao, G. (2018). Extraction of anthocyanins from haskap berry pulp using supercritical carbon dioxide: Influence of co-solvent composition and pretreatment. *LWT-Food Science and Technology*, 98, 237-244. Doi:10.1016/j.lwt.2018.08.042
- Khandare, V., Walia, S., Singh, M., & Kaur, C. (2011). Black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice: Processing effects on antioxidant composition and color. *Food and Bioprocess Technology*, 89(4), 482–486. Doi:10.1016/j.fbp.2010.07.007
- Khazaei, K. M., Jafari, S. M., Ghorbani, M., Kakhki, A. H., & Sarfarazi, M. (2016). Optimization of anthocyanin extraction from saffron petals with response surface methodology. *Food Analytical Methods*, 9(7), 1993-2001. Doi: 10.1007/s12161-015-0375-4

- Maran, J. P., Priya, B., & Manikandan, S. (2014). Modeling and optimization of supercritical fluid extraction of anthocyanin and phenolic compounds from *Syzygium cumini* fruit pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1938–1946. Doi:10.1007/s13197-013-1237-y
- Öz, M., Baltacı, C., & Deniz, İ. (2018).Gümüşhane Yöresi Kuşburnu (*Rosa canina* L.) ve Siyah Kuşburnu (*Rosa pimpinellifolia* L.) Meyvelerinin C Vitamini ve Şeker Analizleri. *GÜFBED/GUSTIJ*, 8 (2), 284-292. Doi: 10.17714/gumusfenbil.327635
- Seabra, I. J., Braga, M. E. M., Batista, M. T., & De Sousa, H. C. (2010). Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace. *Journal of Supercritical Fluids*, 54(2), 145–152. Doi:10.1016/j.supflu.2010.05.001
- Vatai, T., Škerget, M., & Knez, Ž. (2009). Extraction of phenolic compounds from elder berry and different grape marc varieties using organic solvents and/or supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90(2), 246–254. Doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.06.028
- Xu, D. P., Zheng, J., Zhou, Y., Li, Y., Li, S., & Li, H. B. (2017). Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. *Food Chemistry*, 217, 552-559. Doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.013
- Zhou, F., Wang, T., Zhang, B., & Zhao, H. (2018). Addition of sucrose during the blueberry heating process is good or bad? Evaluating the changes of anthocyanins/anthocyanidins and the anticancer ability in HepG-2 cells. *Food Research International*, 107, 509-517. Doi:10.1016/j.foodres.2018.02.071
- Zulkafli, Z. D., Wang, H., Miyashita, F., Utsumi, N., & Tamura, K. (2014). Cosolvent-modified supercritical carbon dioxide extraction of phenolic compounds from bamboo leaves (*Sasa palmata*). *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 123-129. Doi:10.1016/j.supflu.2014.07.008