

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BİTKİSİNİN TATLI BİLEŞİKLERİNİN
DEKANTÖR EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİYLE ELDE EDİLMESİ**

Aşlı ARSLAN KULCAN

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2016

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BİTKİSİNİN TATLI BİLEŞİKLERİNİN
DEKANTÖR EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİYLE ELDE EDİLMESİ**

Aslı ARSLAN KULCAN

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2014.03.0121.011 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BİTKİSİNİN TATLI BİLEŞİKLERİNİN
DEKANTÖR EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİYLE ELDE EDİLMESİ**

Aslı ARSLAN KULCAN

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 16/08/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/~~Oyçokluğu~~ ile kabul edilmiştir.

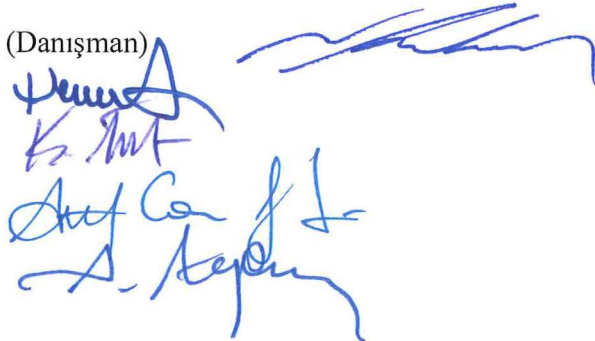
Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)

Prof. Dr. Nevzat ARTIK

Prof. Dr. Kenan TURGÜT

Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ



ÖZET

STEVIA (*Stevia rebaudiana*) BİTKİSİNİN TATLI BİLEŞİKLERİNİN DEKANTÖR EKSTRAKSİYONU YÖNTEMİYLE ELDE EDİLMESİ

Aslı ARSLAN KULCAN

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Ağustos 2016, 105 Sayfa

Bu çalışmada stevia bitkisinin yapraklarından steviol glikozidlerin ekstraksiyonu için ekonomik ve hızlı bir yöntem olan dekantör ekstraksiyonunun uygunluğunun saptanması amaçlanmıştır. Yöntemde ekstraksiyon çözgeni olarak patentli yöntemlerdeki organik çözücüler yerine su kullanılması çevreci bir yaklaşımın yanında prosesin ekonomik olmasını sağlamıştır. Elde edilen sulu ekstrakttan steviosidlerin zenginleştirme ve saflaştırma çalışmalarında bilinen fiziksel metotlar dışında farklı ayırma sınırındaki membranlardan yararlanılmıştır. Steviol glikozidler stevia yapraklarından yaygın olarak kesikli ekstraksiyon sistemlerinde etanol ile ekstrakte edilmektedir. Bu çalışmada ise dünyada ilk defa steviol glikozidlerin ekstraksiyonunda çözgen olarak su kullanılan dekantör ekstraksiyonu denenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında dekantör ekstraksiyonu sıcaklık, süre, bitki/su oranı ve dekantör devir hızı parametreleri kullanılarak Cevap Yüzey Metodu ile optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonunda en uygun kombinasyon 25 °C sıcaklık, 1/27.6 bitki/su oranı, 105 dakika ekstraksiyon süresi ve 5280 devir/dak dekantör devir hızı olarak belirlenmiştir. Bir sonraki aşamada ise enzim ve adsorber uygulanan örneklerin ultrafiltrasyonu 50, 30, 10 ve 5 kDa olmak üzere 4 farklı ayırma sınırına sahip filtre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Araştırma sonuçları PVPP uygulamasının ekstraktın steviosid ve rebaudiosid A açısından saflık düzeyini artırdığını göstermiştir. Ultrafiltrasyon işleminin hedef steviol glikozidlerin miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranlarının en yüksek olduğu ekstrakt, lakkaz ve % 2 dozajında PVPP uygulandıktan sonra 30 kDa ayırma sınırına sahip filtre ile ultrafiltrasyon sonrası elde edilmiştir. Bu örneğin steviosid ve rebaudiosid A açısından saflık oranları sırasıyla % 26.39 ve % 19.80 olarak belirlenmiştir. Bu örneğin toplam fenolik madde miktarı 187.51 mg GAE/L, antioksidan kapasitesi ise 117.42 TE/L olarak belirlenmiştir. Lakkaz ve PVPP uygulanan tüm örneklerin toplam fenolik madde ve buna bağlı olarak antioksidan kapasite miktarlarında kontrole göre önemli seviyede azalma meydana gelmiştir. UF işlemi gerçekleştirilen örneklerde transmittans değerleri 5 kDa'a kadar ayırma sınırı küçüldükçe artmıştır. Ekstraktların renginde açıklık-koyuluk düzeyini ifade eden *L* değeri ultrafiltrasyon sonrası artış göstermiştir. Lakkaz uygulanan örneklerde kırmızılığı ifade eden *a* değeri daha yüksek olurken, PVPP uygulanan örneklerde sarılığı gösteren *b* değeri daha yüksek olmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Dekantör, Rebaudiosid A, Stevia, Steviosid, Ultrafiltrasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)
Prof. Dr. Nevzat ARTIK
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ



ABSTRACT

OBTAINMENT OF SWEET COMPOUNDS FROM STEVIA (*Stevia rebaudiana*) PLANT BY DECANter EXTRACTION METHOD

Aslı ARSLAN KULCAN

PhD. in Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

August 2016, 105 Pages

The aim of this research is to determine the availability of decanter extraction that can be a fast and affordable method for isolation steviol glycosides from stevia leaves. Usage of water as the extraction solvent in this study instead of organic solvents used in patented methods, has enabled the process to be economical in addition to be an environmentalist approach. In order to enrich steviosides from aqueous extracts, ultrafiltration membrane filters different in cut-off size were used except from conventional physical separation techniques. Steviol glycosides are extracted from stevia leaves by using batch system with ethanol as solvent, generally. In this research decanter extraction system with water as solvent in the extraction of steviol glycosides was experienced first time.

In the first stage of the study, Response Surface Methodology was used to optimize decanter extraction parameters such as temperature, time, plant/water ratio and decanter speed. The optimal combination that was determined as a result of optimization studies was 25 °C temperature, 1/27.6 plant/water ratio, 105 minutes extraction time and 5280 rpm decanter speed. In the next stage, ultrafiltration of enzyme and adsorbent applied examples were performed by using filters having 4 different membrane cut-off rates as 50, 30, 10 and 5 kDa.

The results from this study showed that PVPP application enhanced the purity level of extract in terms of stevioside and rebaudioside A. Effect of ultrafiltration on concentration of target steviol glycosides was found significant, statistically. Sample, which was highest in purity of stevioside and rebaudioside A, was obtained by ultrafiltration with membrane having 30 kDa cut-off rate after laccase and 2 % PVPP treatments. Purity levels of this sample in terms of stevioside and rebaudioside A were determined as 26.39 % and 19.80 %, respectively. Total phenolic compounds content and total antioxidant capacity of this sample were determined as 187.51 mg GAE/L and 117.42 TE/L. A significant reduction has occurred in amount of total phenolic compounds and antioxidant capacity of samples that were treated with laccase and PVPP compared to control. Transmittance values of samples were enhanced with decreasing cut-off rate up to 5 kDa by ultrafiltration process. *L* value, expressing lightness-darkness level of extract colour, showed increment after the ultrafiltration. *a* value representing redness was higher in laccase applied samples, while *b* value indicating yellowness was higher in PVPP applied samples.

KEY WORDS: Decanter, Rebaudioside A, Stevia, Stevioside, Ultrafiltration

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Supervisor)
Prof. Dr. Nevzat ARTIK
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ



ÖNSÖZ

Endüstride tıbbi ve aromatik bitkilere ilgi giderek artmaktadır. Şekerotu olarak da bilinen Stevia bitkisi doğal tatlandırıcı özelliği dolayısıyla ticari anlamda oldukça değerli bir üründür. Tüketicilerin sağlıklı yaşam beklentilerinin artmasıyla doğal ürünlere rağbet etmeleri kaçınılmazdır. Bununla birlikte Dünya’da doğal tatlandırıcı kategorisi ciddi ölçüde büyüme göstermiştir. Stevia ürünleri de bu kategoride toz, tablet ve sıvı formlarda piyasaya sunulmaktadır. Kişisel kullanımın yanı sıra endüstriyel olarak da içecek ve gıda firmalarının ilgi alanları içerisinde yer almaktadır. Son yıllarda üretici ülkelerde bu tür ürünlerin ihracatı oldukça yüksek bir hızla artış göstermektedir.

Bu çalışma kapsamında ülkemizde üretimi son yıllarda üretimi denenmeye başlayan stevia bitkisinden tatlı bileşiklerin elde edilmesinde ekonomik ve çevreci yeni bir işleme modelinin ortaya konması ve elde edilen verilerin optimize edilerek endüstriyel üretime aktarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla gerçekleştirilen işleme teknolojisi, başlıca stevia ekstraksiyonunda daha önce uygulanmamış dekantör ekstraksiyonu tekniği ve ultrafiltrasyon prosesini kapsamaktadır. Dekantör ekstraksiyonunda sıcaklık, süre, bitki/su oranı ve devir hızı gibi değişkenlerden yararlanılarak uygun parametreler saptanmıştır. Elde edilen sulu ekstraktta ise meyve-sebze suyu berraklaştırmada uygulanan fiziksel metodlar uygulanmış ve sonrasında tatlı bileşiklerin zenginleştirilmesi için uygun ayırma sınırındaki ultrafiltrasyon sistemi belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların aynı konuda araştırma yapacak diğer araştırmacılara ışık tutacağı ve ülkemizde bu bitkiyi işleyecek olan tatlandırıcı sektörünün gelişmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bana bu konuda çalışma fırsatı veren ve araştırmanın gerçekleşmesi sırasında beni yönlendiren, her türlü imkanı sağlayarak benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Mustafa KARHAN’a, çalışmanın zaman içerisinde gelişiminde katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM ve Doç. Dr. İrfan TURHAN’a, çalışmayı materyal ve teknik imkanlarla destekleyen Kuzey Agripark Bitki Araştırma ve Biyolojik Mücadele San. ve Tic. Ltd. Şti. yetkililerine ve projeyi maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte beni hiç yalnız bırakmayan, her zaman destekleyen hayat arkadaşım, sevgili eşim Muharrem KULCAN’a, bana tüm imkanlarını sunan bugünlere gelmemi sağlayan ailem, başta rahmetli annem Yasemin ARSLAN’a, babam Ahmet ARSLAN ve kardeşim Asım ARSLAN’ a, dostluklarıyla bana her zaman güç veren Gıda Yüksek Mühendisi Ferhan BALCI TORUN’ a, Gıda Yüksek Mühendisi Negin AZARABADI’ ye ve Yrd. Doç. Dr. Kübra Sultan ÖZDEMİR’e, son olarak da onu hissetmeye başladığımdan beri içimdeki varlığıyla kalbimi ısıtan minik kızıma en içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. Stevia Bitkisinin Orijini ve Botanik Özellikleri	3
2.2. Stevia'nın Kimyasal Bileşimi	4
2.3. Stevia'nın Kullanımı ile İlgili Yasal Düzenlemeler ve Sağlık Üzerine Etkileri	7
2.4. Stevia Bitkisinden Tatlı Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri	8
2.5. Steviol Glikozidlerin Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması	9
2.6. Araştırma Kapsamında Kullanılan Bazı Teknikler	10
2.6.1. Dekantör sistemi	10
2.6.2. Durultma	12
2.6.3. Lakkaz enzimi.....	14
2.6.4. Adsorbsiyon (PVPP uygulaması)	16
2.6.5. Ultrafiltrasyon.....	17
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntem	21
3.2.1. Stevia yapraklarının dekantör sisteminde ekstraksiyonu.....	21
3.2.2. Sıcak durultma	23
3.2.3. Lakkaz enzimi uygulaması	24
3.2.4. Adsorber ve filtre yardımcı madde uygulamaları	24
3.2.5. Ultrafiltrasyon	26
3.2.6. Analiz metodları	28
3.2.6.1. Lakkaz aktivite testi.....	28
3.2.6.2. Toplam kuru madde miktarı	29
3.2.6.3. Toplam fenolik madde (TFM) miktarı	29
3.2.6.4. Renk tayini.....	30
3.2.6.5. Transmittans	30
3.2.6.6. HPLC ile steviosid ve rebaudiosid A tayini	30
3.2.6.7. Toplam antioksidan aktivite tayini	31
3.2.5.8. İstatistiksel analizler	32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	33
4.1. Dekantör Ekstraksiyonunun Optimizasyonu	33
4.1.1. Ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi için yapılan ön denemeler	33
4.1.2. Cevap yüzey metodu.....	36
4.1.3. Cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemeleri	37
4.1.3.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkisi	38

4.1.3.2. Sürenin ekstraksiyon üzerine etkisi	39
4.1.3.3. Bitki/su oranının ekstraksiyon üzerine etkisi.....	40
4.1.3.4. Cevap yüzey metodunun modellenmesi	40
4.1.3.5. Cevap yüzey metodu ile belirlenen optimum işlem koşulları ..	46
4.1.4. Dekantör ekstraksiyonu ve dekantör devir sayısı değişiminin ekstraksiyon üzerine etkisi.....	47
4.2. Lakkaz ve PVPP Uygulamalarının Dekantör Ekstraktının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	49
4.2.1. Lakkaz enziminin uygulama koşullarının belirlenmesi	50
4.2.2. PVPP uygulamasının ekstraktlarda toplam kuru madde (TKM) miktarı üzerine etkisi	51
4.2.3. PVPP uygulamasının ekstraktlarda steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin saflık düzeylerine etkisi	52
4.2.4. PVPP uygulamasının ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı (TFM) üzerine etkisi	56
4.2.5. PVPP uygulamasının ekstraktlarda antioksidan kapasite (TEAK) üzerine etkisi.....	58
4.2.6. PVPP uygulamasının ekstraktların transmittans değerleri üzerine etkisi.....	59
4.2.7. PVPP uygulamasının ekstraktların renk (L , a , b) değerleri üzerine etkisi.....	61
4.3. Farklı Ayırma Sınırına Sahip Membran Filtreler Kullanılarak Yapılan Ultrafiltrasyonun Stevia Ekstraktının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi	63
4.3.1. Toplam kuru madde	63
4.3.2. Steviosid ve rebaudiosid A	66
4.3.3. Toplam fenolik madde (TFM)	76
4.3.4. Antioksidan aktivite	79
4.3.5. Transmittans.....	83
4.3.6. Renk (L , a , b)	85
5. SONUÇ	90
6. KAYNAKLAR	93
7. EKLER.....	103
EK-1 Steviosid standardına (200 ppm) ait kromatogram.....	103
EK-2 Rebaudiosid A standardına (200 ppm) ait kromatogram.....	104
EK-3 Stevia'nın dekantör ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullarda (25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi, 1/27,6 bitki/su oranı, 5280 devir/dak dekantör devir hızı) gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakta ait kromatogram.....	105
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

cm	Santimetre
dak	Dakika
g	Gram
kg	Kilogram
L	Litre
mM	Milimolar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ mol	Mikromol
μ M	Mikromolar
M	Molarite
MWCO	Molekül ağırlığı ayırma sınırı
nm	Nanometre
N	Normalite

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit)
CYM	Cevap yüzey metodu
DPPH	2,2-difenil-1-pikrihidrazil
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
GAE	Gallik asit eşdeğeri
KO	Kareler ortalaması
PVPP	Polivinilpolipirrolidon
SD	Serbestlik derecesi
SE	Standart hata
TEAK	Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite
TFM	Toplam fenolik madde
TKM	Toplam kuru madde
TMP	Trans membran basıncı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. S. rebaudiana'nın önemli glikozitlerinin kimyasal yapısı; Glc=Glukoz, Rha=Ramnoz, Xyl=Ksiloz (Geuns 2003).	5
Şekil 2.2. Steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin kimyasal yapısı (Vanneste vd 2011)	5
Şekil 2.3. Bir dekantörün kesiti, 1) Helezon, 2) Tambur, 3) Sıvı çıkışı, 4) Besleme, 5) Posa çıkışı (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).....	12
Şekil 2.4. Makromoleküllerin çökmesi (Cabaroğlu ve Canbaş 1994)	13
Şekil 2.5. Polifenol oksidazların fenolik bileşiklere etki mekanizması (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)	15
Şekil 2.6. Esmer renkli melaninlerin oluşma sürecinde gelişen spontan reaksiyonlar (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)	15
Şekil 2.7. PVPP ile fenolik bileşikler arasında hidrojen köprüsü oluşumu (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)	16
Şekil 2.8. Geleneksel dikey filtrasyon ile teğet akış (çapraz akış) filtrasyon uygulamaları şematik gösterimi (Anonim 2016)	18
Şekil 2.9. Geleneksel ve membran filtrasyon ile ayrılan maddelerin büyüklükleri (Anonim 2016).....	18
Şekil 3.1. Kuru stevia yaprakları.....	21
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan dekantör sistemi	22
Şekil 3.3. Ekstraksiyonun gerçekleştiği kırıcı ve malaksör ünitesi.....	22
Şekil 3.4. Malaksörde stevia ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi.....	22
Şekil 3.5. Durultma ön denemeleri	23
Şekil 3.6. Sıcak durultma işlemi	23
Şekil 3.7. Farklı dozajlarda adsorber veya filtre yardımcı madde a) aktif kömür, b) PVPP, c) perlit, d) kizelgur uygulanmış ekstraktların kontrole göre içerdiği steviosid, rebaudiosid A ve TFM oranları	25
Şekil 3.8. Ekstraktların santrifüjlenmesi ve santrifüj sonrası örnekler	26
Şekil 3.9. 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip UF filtrelerinde uygulanan transmembran basıncına karşılık su debisinde meydana gelen değişim (25 °C)	27
Şekil 3.10. Ultrafiltrasyon sistemi.....	28
Şekil 3.11. 0,5 mM ABTS çözeltisinin lakkaz tarafından oksitlenmesiyle elde edilen absorbans değerleri.....	29

Şekil 3.12. Gallik asit standart çözeltileri ile elde edilmiş kurve.....	30
Şekil 3.13. Standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kurveler, a) steviosid, b) rebaudiosid A	31
Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda trolox standartlarıyla elde edilen kurve.....	32
Şekil 4.1. 1/10 bitki/su oranı, 25 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 15 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları.....	33
Şekil 4.2. 1/10 bitki/su oranı, 25 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 15 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri	34
Şekil 4.3. 1/10 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları.....	34
Şekil 4.4. 1/40 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları.....	35
Şekil 4.5. 1/10 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri	35
Şekil 4.6. 1/40 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri	36
Şekil 4.7. Cevap yüzey yöntemi deneme desenine göre gerçekleştirilen stevia ekstraksiyonları sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosid saflık oranı değerleri	42
Şekil 4.8. Cevap yüzey yöntemi deneme desenine göre gerçekleştirilen stevia ekstraksiyonları sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen rebaudiosid A saflık oranı değerleri.....	42
Şekil 4.9. Ekstraksiyonda steviosid saflık düzeyi değerine bağlı cevap yüzey grafikleri.....	43
Şekil 4.10. Ekstraksiyonda rebaudiosid A saflık düzeyi değerine bağlı cevap yüzey grafikleri.....	44
Şekil 4.11. Lakkaz uygulanmış stevia ekstraktının 420 nm’de ölçülen absorbans değerinde zamana bağlı gerçekleşen değişim	50
Şekil 4.12. Lakkaz uygulanmış stevia ekstraktının TFM içeriğinde zamana bağlı gerçekleşen değişim	51

Şekil 4.13. Lakkaz ve PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının TFM içeriğinde meydana gelen değişimler.....	58
Şekil 4.14. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonuyla toplam kuru madde miktarında meydana gelen değişim	65
Şekil 4.15. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosid miktarındaki değişim ...	69
Şekil 4.16. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası rebaudiosid A miktarındaki değişim	69
Şekil 4.17. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosidin saflık oranında meydana gelen değişim	72
Şekil 4.18. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası rebaudiosid A'nın saflık oranında meydana gelen değişim	72
Şekil 4.19. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonunda filtrelerin toplam steviol glikozidler açısından seçicilik değerlerinin ayırma sınırına bağlı olarak değişimi	75
Şekil 4.20. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonunda toplam steviol glikozid veriminin filtre ayırma sınırına bağlı olarak değişimi	75
Şekil 4.21. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası TFM miktarında meydana gelen değişim	79
Şekil 4.22. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası antioksidan kapasitelerinde meydana gelen değişim	82
Şekil 4.23. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası transmittans değerinde meydana gelen değişim	84
Şekil 4.24. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası <i>L</i> değerlerinde meydana gelen değişim	87
Şekil 4.25. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası <i>a</i> değerlerinde meydana gelen değişim	87

Şekil 4.26. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası b değerlerinde meydana gelen değişim 87



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kuru stevia yapraklarının bileşim öğeleri (g/100 g kuru ağırlık)	4
Çizelge 2.2. Stevia bitkisi yapraklarında bulunan tatlılık etkeni glikozidlerin miktarı	6
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan filtrelerin genel özellikleri.....	27
Çizelge 4.1. Stevia ekstraksiyonunun optimizasyonu için cevap yüzey metodunda kullanılan parametreler.....	37
Çizelge 4.2. Stevia ekstraksiyonu için cevap yüzey metodunun oluşturduğu ekstraksiyon şartları	37
Çizelge 4.3. Cevap yüzey metodunun oluşturmuş olduğu şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinden elde edilen stevia ekstraktlarının steviosid, rebaudiosid A, toplam kuru madde miktarları ve steviosid, rebaudiosid A açısından saflık oranları	38
Çizelge 4.4. Steviosidin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	40
Çizelge 4.5. Rebaudiosid A'nın saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları...	41
Çizelge 4.6. Stevia için belirlenen optimum ekstraksiyon koşullarında steviosid ve rebaudiosid A için tahmin edilen ve gerçekleşen saflık oranı değerleri	46
Çizelge 4.7. Dekantör devir sayısına bağlı olarak stevia ekstraktlarının içerdiği steviosid, rebaudiosid A, toplam kuru madde miktarları ve hedef bileşenlerin saflık oranları.....	47
Çizelge 4.8. Dekantör devir sayısına bağlı olarak stevia ekstraktlarının TKM miktarı, steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonu ve bu bileşiklerin saflık oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları.....	48
Çizelge 4.9. Dekantörden 5280 devir/dak devir hızında elde edilen stevia ekstraktının bazı fizikokimyasal özellikleri	49
Çizelge 4.10. Farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının içerdiği toplam kuru madde miktarları.....	51
Çizelge 4.11. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak TKM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları.....	52
Çizelge 4.12. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak TKM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	52
Çizelge 4.13. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının içerdiği steviosid, rebaudiosid A miktarları ve bu bileşenlerin saflık oranları	53

Çizelge 4.14. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	54
Çizelge 4.15. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	54
Çizelge 4.16. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları.....	54
Çizelge 4.17. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.18. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	55
Çizelge 4.19. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	55
Çizelge 4.20. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları ...	56
Çizelge 4.21. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	56
Çizelge 4.22. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TFM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	57
Çizelge 4.23. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	57
Çizelge 4.24. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının TEAK değerleri.....	58
Çizelge 4.25. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TEAK değerlerine ait varyans analizi sonuçları	59
Çizelge 4.26. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak antioksidan kapasite değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	59
Çizelge 4.27. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının transmittans değerleri	60
Çizelge 4.28. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları	60

Çizelge 4.29. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak transmittans değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	61
Çizelge 4.30. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının renk (L , a , b) değerleri.....	61
Çizelge 4.31. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları.....	62
Çizelge 4.32. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak L , a , b değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	62
Çizelge 4.33. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası toplam kuru madde miktarı	64
Çizelge 4.34. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam kuru madde miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	65
Çizelge 4.35. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam kuru madde miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	66
Çizelge 4.36. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve steviosid ve rebaudiosid A açısından saflık oranları	67
Çizelge 4.37. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	67
Çizelge 4.38. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	68
Çizelge 4.39. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	68
Çizelge 4.40. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	68
Çizelge 4.41. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	70

Çizelge 4.42. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları	70
Çizelge 4.43. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	71
Çizelge 4.44. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	71
Çizelge 4.45. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonu ile farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilen steviosid ve rebaudiosid A verimleri ve filtrelerin steviosid ve rebaudiosid A açısından seçicilik değerleri	74
Çizelge 4.46. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası TFM miktarı	77
Çizelge 4.47. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak TFM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları	78
Çizelge 4.48. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	78
Çizelge 4.49. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası antioksidan kapasite değerleri	80
Çizelge 4.50. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite değerlerine ait varyans analizi sonuçları	80
Çizelge 4.51. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	81
Çizelge 4.52. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası transmittans değerleri	83
Çizelge 4.53. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları	84
Çizelge 4.54. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak transmittans değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları	85

Çizelge 4.55. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası renk (L , a , b) değerleri ...	86
Çizelge 4.56. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları.....	88
Çizelge 4.57. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak L , a , b değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları.....	88



1. GİRİŞ

Düşük enerjili veya diyabetik ürünlerin üretiminde yaygın olarak şeker alkoller ve yapay tatlandırıcılar kullanılmaktadır. Şeker alkoller doğal formda birçok meyve ve sebzenin yapısında bulunmakla birlikte endüstriyel olarak şekerlerin türevlendirilmesiyle elde edilmektedir. Formülasyonunda kullanıldığı gıdada sakkaroz çok yakın tatlılık sağlamakla birlikte laksatif etki göstermekte ve bu yüzden gıda üretiminde kullanımı ve tüketimi sınırlandırılmaktadır. Bunun yanında, aynı tatlılığı vermek için miktar olarak diğer şekerlerle hemen hemen aynı düzeyde kullanılması gerekmektedir. Yapay tatlandırıcılar şekerlere ve şeker alkollere göre yüzlerce kat daha yüksek bağıl tatlılığa sahip olmalarına rağmen sentetik olmaları ve dolayısıyla insan sağlığını tehdit ettiği konusunda devam eden şüpheler nedeniyle sınırlı miktarda kullanılmaktadır. Birçok ülkenin gıda kodeksinde olduğu gibi Türk Gıda Kodeksi'nde de bu katkıların gıda formülasyonlarında kullanım düzeyleri sınırlandırılmıştır. Dolayısıyla yasal olarak izin verilen miktarlar çoğu kez gıdanın yeterince tatlandırılmasına yetmemekte; farklı özelliklerdeki birçok tatlandırıcıyı aynı formülde birlikte kullanma zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Bununla beraber gıdanın hazırlanması ve ısıtma işlemi sırasında yüksek sıcaklıklarda yapıları bozulabilmekte ve tatlılıklarını kaybederek acımsı bir tat bırakmaktadırlar.

Proje materyali olan stevia bitkisi (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ise doğal olarak tatlı bileşikler içermekte; bu bileşikler sakaroz göre en az 300 kat bağıl tatlılık sağlamaktadır. Stevia bitkisi bu yüzden “şekerotu” olarak ta bilinmektedir. Stevia bitkisinin içerdiği farklı fraksiyonlardaki tatlı bileşiklerle ilgili devam eden bazı araştırmalar olmasına rağmen sağlığı olumsuz etkilediği yönünde önemli bir bulguya rastlanmamıştır. Ayrıca bu bileşikler gıdanın işlenmesi sırasında yüksek sıcaklıkları tolere edebilmekle beraber bağıl tatlılıkları çok yüksek olduğu için formülasyonlarda düşük miktarlarda kullanılmaktadır.

Stevia bitkisinin fonksiyonel bileşiklerinin izole edilmesi ve saflaştırılması ile ilgili tamamlanmış ve devam eden; bazıları patentle sonuçlanmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların önemli bir kısmı bitkinin geleneksel yollarla ve solvent ekstraksiyonu ile ekstrakte edildikten sonra farklı tekniklerle saflaştırılmasına dayanmaktadır.

Bitkisel kaynaklardan fonksiyonel bileşiklerin ayrılmasında en önemli basamaklar ekstraksiyon ve saflaştırma aşamaları olarak bilinmekte; bu basamaklar durultma, filtrasyon, renk ve koku giderme, konsantrasyon, dondurarak kurutma ve püskürtmeli kurutma gibi bilinen birçok yardımcı uygulama ile desteklenmektedir. Ekstraksiyon amacıyla yaygın olarak çözücü gücü yüksek organik çözücüler kullanılmakta, etkinliğin artırılması için presleme, vurgulu elektriksel alan, basınçlı solvent ekstraksiyonu ve ultrasonik uygulamalar gibi birçok teknik denenmekte ve uygulanmaktadır. Bu tekniklerin bazıları ekonomik olmadığı için henüz endüstriyel üretime aktarılmamışken temel araştırma projelerine konu olmaya devam etmektedir. Stevia bitkisinin fonksiyonel bileşikleri olan tatlı maddelerin ekstraksiyonunda da yaygın olarak katı-sıvı ekstraksiyonu modeli ve ekstraksiyon verimini artırmak için alkollü çözeltiler kullanılmaktadır. Kesikli veya sürekli sistemde (kontinü) uygulanabilen katı-sıvı ekstraksiyonunun başarısı kuşkusuz difüzyon hızına bağlı olarak

değerlendirilmekte, difüzyon hızını artırmak için mikrodalga ve vurgulu elektriksel alan gibi tekniklerle desteklenebilmektedir. Bu yöntemin dezavantajlarından birisi kütle transferinin gerçekleşmesi için belirli bir sürenin geçmesinin gerekliliğidir. Ayrıca karışım dengeye ulaştığında katı faz içerisindeki çözünmüş maddeyi içeren çözeltinin elde edilmesi için presleme gibi ilave bir yardımcı procesten yararlanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında ise yukarıda bahsedilen dezavantajları içermeyen dekantör ekstraksiyonunun uygulanması ekstraksiyon açısından yenilikçi yönlerden birisi olarak görülmektedir. Dekantör sistemi yaygın olarak kanalizasyon çamurlarının kurutulmasında kullanılmaktadır. Bunun yanında elma gibi bazı meyvelerin suyunun elde edilmesinde preslemeye alternatif olarak denenmiştir. Ancak meyve suyuna işlenen meyveler genel olarak % 80 ve üzerinde su içerdiği için dekantör ekstraksiyonu preslemeye karşı güçlü bir alternatif olarak değerlendirilmemektedir. Ancak su içeriği çok düşük olan ve çözgen olarak sıcak su kullanılan hurma ve keçiboynuzu gibi ürünlerin ekstraksiyonunda dekantör kullanılmaya başlamıştır. Bunların dışında, zeytinden zeytinyağı üretiminde geleneksel presleme tekniği yerini dekantör ekstraksiyonuna bırakmaya başlamıştır. Bu yöntemle kırılarak hamur haline getirilen zeytinden zeytinyağını içeren sulu kısım ve prina sürekli sistemde çok kolay ve hızlı bir şekilde ayrılabilir. Bu yöntemle kırılarak hamur haline getirilen zeytinden zeytinyağını içeren sulu kısım ve prina sürekli sistemde çok kolay ve hızlı bir şekilde ayrılabilir.

Paraguay ve Brezilya gibi tropik-yarı tropik özellikli ülkelerde yoğun olarak yetişmesi nedeniyle, bitkinin yayılımı ve üretimi de özellikle bu tür iklim kuşaklarındaki alanlarda iyi neticeler vermektedir. Ülkemizde Akdeniz Bölgesi, yarı tropik (sıcak ve nemli) bir iklim özelliğine sahip olduğundan, stevia yetiştiriciliği için de uygun ortam özellikleri taşımaktadır. Uluslararası stevia pazarı çok yaygın olup, bitkinin dekar başına getirisi oldukça yüksektir. Gelecekte de yüksek getirisi ve talebi olan tarımsal ürünler arasında en ön sıralarda bulunacağı öngörülmektedir.

Özellikle diyabet ve obeziteye karşı mücadele potansiyeli ve insan sağlığını olumsuz etkilememesi stevia'nın gelecekte çok daha önemli olacağını göstermektedir. Günümüzde obezite ve diyabetin Türkiye'de de önemli sağlık sorunlarının başında geldiği ve ulusal sağlık giderlerinin yükselmesinin nedenlerinden olduğu düşünülürse stevia üretimi ve pazarının arttırılması önemi ortaya çıkmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Stevia Bitkisinin Orijini ve Botanik Özellikleri

Stevia rebaudiana Bertoni, Asteraceae (Compositae) familyasına ait, Güney Amerika'nın kuzey bölgelerine (Paraguay, Brezilya) özgü çok yıllık bir çalıdır (Geuns 2003). *S. rebaudiana*, Asteraceae familyasına ait 950 türden biridir. Stevia cinsi içerisinde yaklaşık 230 tür olmasına rağmen sadece *S. rebaudiana* tatlı niteliktedir (Soejarto vd 1982). Stevia'nın 1500 yıldan daha uzun zamandır Brezilya ve Paraguay'da yerli halk tarafından "tatlı ot" anlamına gelen "kaa he-he" olarak adlandırıldığı, tatlandırmanın yanı sıra mide yanması ve diğer rahatsızlıkları tedavi amaçlı tüketilen çaylarda da kullanıldığı bilinmektedir (Brandle ve Telmer 2007).

S. rebaudiana Bertoni botanik olarak 1899 yılında Moisés Santiago Bertoni tarafından sınıflandırılmıştır. Başlangıçta *Eupatorium rebaudianum* olarak adlandırılmış, 1905 yılında adı *Stevia rebaudiana* Bertoni olarak değiştirilmiştir. Tatlılık bileşenleri ilk olarak 1909 yılında izole edilmiş ve 1931'de ekstrakt saflaştırılarak steviosid üretilmiştir. Steviosidin kimyasal olarak diterpen glikozid yapıda olduğu 1952 yılında ortaya konmuş, bir aglikona (steviol) bağlı üç glukoz molekülü içeren bir glikozid olarak tanımlanmıştır. Rebaudiosid A ve diğer glikozidlerin izolasyonu ise 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Barriocanal vd 2008).

Bitkinin ana vatanı Paraguay'un kuzeydoğusunda bulunan Amambey tepeleri olup, geleneksel olarak uzun yıllardır yetiştiriciliği yapılan Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Brezilya, Meksika, Singapur, Endonezya ve Malezya gibi ülkelere son yıllarda Rusya, Çek Cumhuriyeti, Hindistan, İsrail, Ukrayna, İngiltere, Filipinler, Kanada, Havai, Kaliforniya ve Güney Amerika'nın tüm bölgeleri eklenmiştir (Sivaram ve Mukundan 2003). Türkiye'de ise ilk defa Antalya ilinde bitkinin yetiştirilmesi için çalışmalara başlanmış ve 2012 yılında ilk hasad yapılmıştır. Bitki, 2004 yılından beri Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın pozitif bitkiler listesinde yer almaktadır.

Stevia, boyu 1 m'ye kadar uzayan, geniş bir kök sistemi ve küçük elips şeklinde yapraklar üreten kırılğan bir gövdeye sahip çok yıllık bir bitkidir. Üst yüzeyi hafif tüylü olan yapraklar 3-4 cm uzunluğunda ve sapsızdır. Sürekli nem ve yeterli drenaj sağlanan geniş bir toprak çeşitliliğinde iyi gelişim göstermektedir. Genel olarak 9 °C'nin altındaki sıcaklıkları tolere edememekte ve soğuktan zarar görmektedir. Ancak nadiren de olsa sifıra yakın sıcaklık derecelerini tolere edebildiği bildirilmektedir. Hızlı bir büyüme için 20-24 °C civarı sıcaklık gerekmektedir (Frederico vd 1996; Singh ve Rao 2005). Diğer yandan bitki önemli düzeyde suya ihtiyaç duymaktadır. Aksi takdirde yaprakları hızlı bir şekilde solmaya başlamakta, ancak stres koşullarının devam etmediği durumda düzelmesi de yine hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir. Buna bağlı olarak yetiştirilebileceği alanlar sınırlanmaktadır. Stevia nispeten fakir topraklarda yetiştirilebilmektedir. Hasat edilebilir kuru yaprak miktarı bitki başına 15-35 g arasında değişim göstermektedir (Mishra 2010). Bir hektar dikili alandan 60-70 kg civarı steviosid içeren 1000-1200 kg kuru yaprak elde edilebileceği bildirilmektedir. *S. rebaudiana*'nın farklı iklim gerekliliklerine bağlı olarak tüm dünyada yetişen yaklaşık 90 çeşidi bulunmaktadır (İbrahim vd 2008).

2.2. Stevianın Kimyasal Bileşimi

Stevia yaprakları düşük yağ oranının yanı sıra önemli miktarda protein içermektedir. Esansiyel amino asit içeriği 7,7 g/100 g olarak bildirilmektedir. Potasyum en fazla miktarda bulundurduğu mineral madde iken bunu kalsiyum takip etmektedir. Sulu ekstraktlarında glukoz ve fruktoz gibi monosakkaritleri çok düşük oranda içermektedir. Lipid fraksiyonunun ise linoleik asit ve linolenik asit gibi doymamış yağ asitleri açısından zengin olduğu belirlenmiştir (Tadhani ve Subhash 2006; Abou-Arab vd 2010). Savita vd (2004) yaptıkları çalışmada stevia yapraklarını kuru ağırlık bazında analiz etmişler ve enerji değerini 2,7 kcal/g olarak bildirmişlerdir. Karbonhidrat, protein ve ham lif açısından iyi bir kaynak olan stevia yapraklarının farklı araştırmacılar tarafından analiz edilmiş olan besin bileşimi Çizelge 2.1’de verilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise stevia yaprak ve köklerinde önemli fonksiyonel özelliklere sahip olduğu bilinen fruktooligosakkaritlerin izole edildiği bildirilmektedir. Bu durum ekstraktların gıda takviyesi olarak kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır (De Oliveira vd 2011).

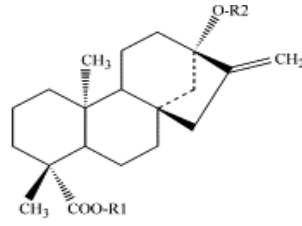
Stevia yapraklarından elde edilen ekstrakt tatlı diterpen glikozidler, flavonoidler, alkoloidler, suda çözünebilen klorofiller ve ksantofiller, hidroksisinamik asitler (kafeik, klorojenik vb.) nötral suda çözünebilen oligosakkaritler, serbest şekerler, amino asitler, lipidler, esansiyel yağlar ve iz elementler içermektedir (Tadhani ve Subhash 2006).

Çizelge 2.1. Kuru stevia yapraklarının bileşim öğeleri (g/100 g kuru ağırlık)

Bileşen	Kaynaklar						
	Mishra (2010)	Goyal ve Goyal (2010)	Serio (2010)	Savita vd (2004)	Abou-Arab vd (2010)	Tadhani vd (2007)	Kaushik vd (2010)
Nem	7	4,7	TE	7,0	5,4	TE	7,7
Protein	10	11,2	11,2	9,8	11,4	20,4	12,0
Yağ	3	1,9	5,6	2,5	3,7	4,3	2,7
Kül	11	6,3	TE	10,5	7,4	13,1	8,4
Karbonhidrat	52	TE	53,0	52,0	61,9	35,2	TE
Ham lif	18	15,2	15,0	18,5	15,5	TE	TE

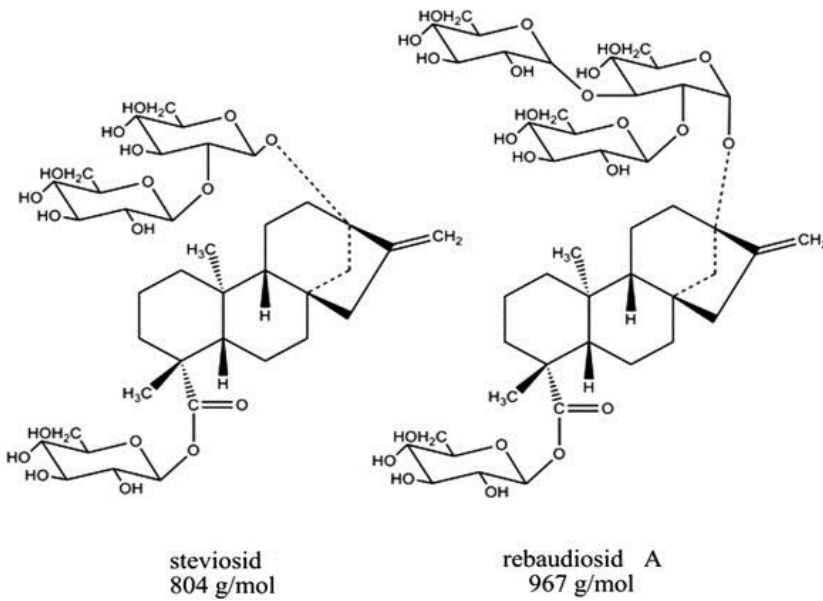
TE: Tespit edilemedi (Lemus-Mondaca vd 2012)

Stevia yapraklarında bulunan tatlı bileşikler diterpen glikozid yapıda bileşiklerdir. Steviosid, rebaudiosidler A, B, C, D, E ve dulcosidler A, B adlarıyla bilinen 8 farklı diterpen glikozid tanımlanmıştır. Bu glikozidler, gövdede çok düşük miktarda bulunmakla birlikte köklerde tespit edilemezken neredeyse sadece yapraklarda birikmekte ve miktarı yaprak yaş ağırlığının % 10 undan % 20’sine kadar değişebilmektedir. *S. rebaudiana*’nın bileşiminde tatlılık etkeni olan sekiz adet glikozid, steviol (13-hidroksi-*ent*-kaur-16-en-19-oik asit) olarak adlandırılan ortak aglikon yapıyı içermekte, farklılık C-13 ve/veya C-19’a bağlı glikozidik bileşenlerden kaynaklanmaktadır (Kohda vd 1976) (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2).



Bileşen adı	R1	R2
1 steviol	H	H
2 steviolbioside	H	β -Glc- β -Glc(2→1)
3 stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
4 rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
5 rebaudioside B	H	β -Glc(3→1)
		β -Glc- β -Glc(2→1)
6 rebaudioside C (dulcoside B)	β -Glc	β -Glc(3→1)
		β -Glc- α -Rha(2→1)
7 rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc(3→1)
		β -Glc- β -Glc(2→1)
8 rebaudioside E	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc(3→1)
		β -Glc- β -Glc(2→1)
9 rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2→1)
10 dulcoside A	β -Glc	β -Glc(3→1)
		β -Glc- α -Rha(2→1)

Şekil 2.1. S. rebaudiana'nın önemli glikozitlerinin kimyasal yapısı; Glc=Glukoz, Rha=Ramnoz, Xyl=Ksiloz (Geuns 2003).



Şekil 2.2. Steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin kimyasal yapısı (Vanneste vd 2011)

Steviol glikozidler bitkilerde büyüme ve gelişme etmeni olarak görev yapan ve polisiklik bir diterpen olan gibberellik asit ile benzer bir metabolik iz yoluna sahiptir. Bitki hücrelerinde diterpen biyosentezi genellikle plastidlerde gerçekleşmektedir. Steviol glikozidler hücre içinde depolandığı yer olan kofula taşınmakta ve yapraklarda birirmektedir (Brandle ve Rosa 1992; Totté vd 2000).

Steviol glikozidlerin sulu çözeltilerde geniş bir pH değeri ve sıcaklık aralığında yüksek stabilite gösterdiği bildirilmektedir (Panpatil ve Polasa 2008). Sıcaklığın 60 °C’de tutulduğu 2 saatin üzerindeki ısı işlem uygulamalarında pH değeri 1-10 aralığında olduğunda steviosid degradasyonu gözlenmezken, 80 °C sıcaklıkta yaklaşık % 5 oranında kayıp belirlenmiştir. Yüksek asidik koşullar altında (pH=1) 80 °C sıcaklıkta 2 saat süreyle gerçekleştirilen inkübasyon ise tamamının parçalanmasıyla sonuçlanmıştır. Benzer bir çalışmada steviosidin, pH değeri 3-9 aralığında 1 saat süresince 100 °C’ye kadar sıcaklığa oldukça dayanıklıyken, pH değeri 9’un üzerine çıktığında aynı koşullarda hızlı bir şekilde paraçalandığı bildirilmiştir (Abou-Arab vd 2010).

Crammer ve Ikan (1986) steviosidin 95 °C sıcaklıkta stabil olması nedeniyle, pişmiş ya da fırınlanmış gıdalar için uygun bir katkı maddesi olduğunu bildirmiştir. Saflaştırılmış stevia ekstraktları 200 °C’ye kadar ısıya dayanıklıdır. Bu doğal tatlandırıcı yüksek sıcaklıklarda 1 saat boyunca 120 °C’ye kadar stabilitesini korurken, 140°C üzerinde yapısı bozulmaya başlamakta, sıcaklığın 200 °C’ye yükseltilmesi ise yapısının tamamen parçalanmasıyla sonuçlanmaktadır. Bunların yanında steviol glikozidlerin gıda işleme sürecinde fermente olmadığı, pişirme ve fırınlama gibi proseslerde esmerleşme ve karamelizasyon reaksiyonlarına katılmadığı bildirilmiştir (Abou-Arab vd 2010).

Bitkide tatlılığa neden olan glikozitlerden en fazla bulunanı steviosiddir ve sakarozdan 250-300 kat daha tatlı olduğu bildirilmiştir. Yapraklardaki miktarı çeşit ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değişim gösterse de kuru yaprak ağırlığında % 5-22 arasında bulunmaktadır (Kim ve Dubois 1991). Steviosidden sonra en fazla miktarda bulunan tatlılık bileşeni olan rebaudiosid A kuru ağırlıkta % 3 oranında bulunurken bunu % 0.5 oranında bulunan dulcosid A izlemektedir (Brusick 2008) (Çizelge 2.2). Yapılan araştırmalarda Stevia yapraklarından elde edilen ekstraktın % 0.4’lük sakaroz çözeltisinden 300 kat daha tatlı olduğu bildirilmiştir (Geuns 2003).

Çizelge 2.2. Stevia bitkisi yapraklarında bulunan tatlılık etkeni glikozidlerin miktarı

Glikozid	Miktar, % (kuru yaprak ağırlığında)		
	(Gardana vd 2010)	(Goyal ve Goyal 2010)	(Kinghorn ve Soejarto 1985)
Steviosid	5,8	9,1	5-10
Rebaudiosid A	1,8	3,8	2-4
Rebaudiosid C	1,3	0,6	1-2
Dulcosid A	TE	0,3	0,4-0,7

TE: Tespit edilemedi (Lemus-Mondaca vd 2012)

Steviol glikozidlerin tatlılık özellikleri birbirinden farklılık göstermektedir. Örneğin stevioside göre fazladan bir glukoz ünitesi içeren rebaudiosid A hem tatlılık hem de tat kalitesi açısından stevioside göre daha üstün olmaktadır. Saf steviosid ağızda belirgin bir acı tat bırakmaktadır (De Oliveira vd 2007). Yoshikawa vd (1979) steviosidin sonradan ağızda bıraktığı hafif acı ve asidik tattan dolayı genel kabul edilebilirliğinin rebaudiosid A'ya göre daha düşük olduğunu bildirmiştir. Stevia türlerinin çoğunda genel olarak bulunan acı tadın seskiterpen laktonlardan kaynaklandığı, bunların yanısıra içerdiği uçucu aromatik ya da esansiyel yağların, tanenlerin ve flavonoidlerin de stevianın arzu edilmeyen aromasının oluşumuna katkıda bulunduğu rapor edilmektedir (Soejarto vd 1983).

2.3. Stevianın Kullanımı ile İlgili Yasal Düzenlemeler ve Sağlık Üzerine Etkileri

Stevia rebaudiana Bertoni bitkisinin yapraklarından elde edilen ekstrakt doğal tatlandırıcı özelliğe sahiptir. Bitki ekstraktları, Japonya'da 1968 yılından beri gıda sektöründe düşük kalorili tatlandırıcı olarak ve alternatif tıpta diyabet tedavisinde kullanılmakla birlikte artık tüm dünyada popüler hale gelmiştir. Ekstraktlar; meşrubatlar, gazlı içecekler, kurutulmuş deniz ürünleri, şekerleme, dondurma, sakız, yoğurt gibi ürünlerin yanı sıra diş macunu, ağız gargarası gibi ürünlerde de yaygın bir kullanım alanı bulmaktadır. Bunun yanında antioksidan özelliğe sahip yapraklardan elde edilen toz ürünler ya da rafine edilmiş ekstraktlar gıda takviyesi olarak tüketilmektedir (Geuns 2003; Tosun 2013).

Stevia bitkisinin yapraklarından ekstrakte edilen steviol glikozidler olan steviosid ve rebaudiosid A'nın Avustralya, Arjantin, Brezilya, Çin, Hindistan, İsrail, Japonya, Yeni Zelanda, Paraguay, Rusya, Güney Kore ve diğer birçok ülkede kullanımı onaylanmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde rebaudiosid A ve saflaştırılmış steviol glikozidler sırasıyla 2008 ve 2009 yıllarında GRAS (genel olarak güvenilir kabul edilen) statüsüne alınmıştır ve gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA), steviol glikozidler için saflık düzeyinin en az % 95 olarak belirlendiği düzenlemeler getirmiştir. Aynı zamanda JECFA 2008 yılında % 95 saflıkta steviol glikozidler için steviol eşleniği olarak ifade edilen günlük alım miktarını 2 mg/kg vücut ağırlığından 4 mg/kg vücut ağırlığına artırmıştır. Avrupa Birliği steviol glikozidlerin gıda katkı maddesi olarak kullanımı konusuna uzun süre temkinli yaklaşmıştır ve hem stevia yaprakları hem de steviol glikozidlerin kullanımına izin verilmemiştir (Woelwer-Rieck vd 2010). Avrupa Birliği Komisyonu uzun bir inceleme sürecinden sonra EFSA'nın (Avrupa Birliği Gıda Güvenliği Otoritesi) stevia kullanımının herhangi bir sakınca taşımadığı ve güvenli olduğu yönünde yaptığı bilimsel değerlendirmeye dayanarak Kasım 2011'de E 960 koduyla gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin vermiştir. Ülkemizde ise 30.06.2013 tarihinde Resmi Gazete'de yayınlanan Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği'ne göre steviol glikozidlerin (E 960) tatlandırıcı olarak kullanımına izin verilmiştir (Yücesan 2015).

Yapılan toksikolojik çalışmalarda steviosidin mutajenik, teratojenik ya da kanserojen etkisinin olmadığı, tatlandırıcı olarak kullanılmasıyla herhangi bir alerjik reaksiyon gözlemlenmediği bildirilmektedir (Abou-Arab vd 2010; Gardana vd 2010). Steviol glikozidler tamamen normal şekilde sindirilirler. Bağırsaklarda bağırsak

mikroflorası tarafından steviole indirgendikten sonra emilen steviol, steviol glukuronide metabolize edilerek vücuttan bu formda atılmaktadır böylelikle vücutta herhangi bir birikim gerçekleşmemektedir (Geuns vd 2007; Sheet vd 2014).

Stevianın sağlık üzerine etkisini inceleyen araştırmalar sonucu elde edilen bulgular, steviol glikozidlerinin insanlar tarafından uzun süre ve düzenli tüketiminin güvenli olduğunu desteklemektedir (Koyama vd 2003; Maki vd 2008; Wheeler vd 2008). Ayrıca herhangi bir karsinojenik veya mutajenik etkisi bildirilmemektedir (Mahidol vd 1997; Toyoda vd 1997; Curry ve Roberts 2008). Hem sağlıklı kişiler hem de diyabet hastaları tarafından tüketilebilmektedir (Li vd 2004). Ekstraktların kullanımı diyetle alınan antioksidan miktarını arttırmakta, ayrıca obezite hastalarının şeker yerine steviosid alımı kilo vermeyi de kolaylaştırmaktadır. Bunların yanında bu bileşiklerin düzenli tüketimi kan şekeri ve kolesterol düzeyini düşürmekte (Atteh vd 2008), hücre yenilenmesini ve kan pıhtılaşması özelliğini geliştirmekte, kan damarlarını güçlendirmekte ve kan basıncını düşürmektedir (Jeppesen vd 2003; Barriocanal vd 2008).

Yapılan bir dizi çalışma steviosidin tatlılığın ötesinde aynı zamanda antioksidan, antidiyabetik, antihiperlipidemik, insülinotropik, glukagonostatik, antihipertansif, diüretik, antikarsinojenik, antiviral, antimikrobiyal, antienflamatuar ve bağışıklık düzenleyici olarak terapötik yararlar sağlayabileceği rapor edilmektedir (Chatsudthipong ve Muanprasat 2009; Boonkaewwan ve Burodom 2013; Shivanna vd 2013).

2.4. Stevia Bitkisinden Tatlı Bileşiklerin Elde Edilme Yöntemleri

Son yıllarda özellikle gelişmiş ülkelerde çalışma koşullarının ağırlaşmasına bağlı olarak farklılaşan yaşam şartlarıyla birlikte hareketsizliğin artması ve değişen beslenme alışkanlıkları obezite, şeker hastalığı, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıklarında hızlı bir artışa neden olmuştur. Teknolojinin gelişmesiyle beraber gıda endüstrisinde diğer tatlandırıcılar ortaya çıkmıştır (İrat 2010). Aynı miktardaki şekerden daha tatlı olan ve daha az enerji içeren kimyasal maddeler tatlandırıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Tatlandırıcıların çoğunluğunu sentetik olarak üretilen siklamat, glisirhizin, aktilol, maltitol, sulfam, sukraloz, sakarin ve aspartam gibi maddeler oluşturmakta ve birçok gıdanın üretiminde kullanılmaktadırlar. Sukroz, glukoz, fruktoz ve hidrolize nişasta şurupları ve yüksek fruktozlu mısır şurupları tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır (Erkmen 2010). Tatlandırıcılar, ilk olarak şeker hastalarının tatlandırma gereksiniminin giderilmesi için kullanılmış olmakla birlikte, günümüzde fazla kilo problemi olanlar ya da düşük kalorili diyetlerle beslenenler ve şekerin dış sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmak isteyenler tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Öncelikle ideal bir tatlandırıcının; şekerin duyuşal özelliklerini içeren, çözelti halindeyken renksiz, kokusuz, suda çabuk çözünebilen, ekonomik, fonksiyonel, ısıya dayanıklı, düşük kalorili, ağızda acı ve metalik tat bırakmayan hoş bir tada sahip olması gerektiği vurgulanırken, ayrıca toksik ve kanserojen olmaması gerektiği de belirtilmektedir (İrat 2010).

Günümüzde doğal maddelerin insan sağlığına etkileri konusunda bilincin ve ilginin giderek artmasıyla tatlandırıcılar arasında da bitkisel kaynaklı olanlar daha fazla

rağbet görmeye başlamış ve bu ürünlerin tüketimi de artmıştır. Buna bağlı olarak bu tip ürünlerin elde edilmesinde ekonomik ve güvenilir süreçlerin geliştirilmesi gereklidir. Ekstraksiyon prosesinde diğer gıda proseslerinde olduğu gibi enerji tasarrufu sağlama, kapasite kullanım oranını artırma ve maliyeti azaltma gibi gerekçelerle kaliteden ödün vermeden işlemlerde hızlilik ve verimde yükseklik istenmektedir (Çolak ve Tülek 2003).

Endüstriyel olarak stevia yapraklarından yaprak tozu üretiminde, saplar ve yabancı maddeler ayrıldıktan sonra yapraklar kurutulmakta, kuru yapraklar ise öğütülerek son ürün elde edilmektedir. Kurutma işlemi 40-50 °C’de 24-48 saat süreyle yapılmaktadır ve işlem sonunda yaklaşık % 25 oranında kuru yaprak elde edilmektedir. Stevia yapraklarından steviosidlerin ekstraksiyonunu içeren geleneksel metodlar su veya alkolle ekstraksiyonu izleyen çöktürme, koagülasyon ve kristalizasyon basamaklarından oluşmaktadır (Puri vd 2012). Geleneksel metotlardan biri olan çözgen ekstraksiyonu, ilk yatırım ve işletme maliyetlerinin düşük olması nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak çözgen ekstraksiyonunda, pahalı organik çözgenlerin fazla miktarda kullanılması, ekstraksiyon süresinin uzun olması, yoğun işlem basamakları, ekstrakt içinde çözgen kalması ve çözgenlerin olumsuz çevresel etkileri göz önüne alındığında alternatif yöntemlerin gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Çözgen ekstraksiyonunda en büyük problemlerden biri ekstraksiyon sonrası geri kalan çözgendir. Bu problem hem ekonomik açıdan hem de çevre kirliliği bakımından önemlidir. Saf ve kaliteli çözgenler pahalı ve büyük miktarlarda kullanıldığında ciddi bir maddi yük getirmektedir. Ayrıca çözgen kalıntıları ürünün içerisinde iz miktarda da olsa bulunabilmekte ve son ürünün saflığını düşürmektedir. Buna rağmen, ürün saflaştırılabilmekte ancak maliyeti yükselmektedir. Bu yöntemle elde edilen ürünlerin ilaç ve gıda sanayilerinde kullanılabilmeleri için ilave saflaştırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Ekstraksiyonun ardından filtrasyon ve temizleme işlemleri; adsorpsiyon kromatografisi, koagülasyon, renk giderme, elektroliz, iyon değişimi, çöktürme ve çözgen ayırma basamaklarından bazılarının birlikte uygulanmasıyla gerçekleştirilir. Stevia yapraklarından suyla ekstraksiyon işleminin uygulanmasından sonra ise ekstrakta klarifikasyon, dekolorasyon ve kristalizasyon işlemleri uygulanmakta böylece kristal stevia ardından stevia tozu (pudra) elde edilmektedir. Toz stevia, stevianın en yaygın ticari tipidir. Genellikle stevia üretimi bu yöntemle yapılmakta ve elde edilen ürünler yaygın bir şekilde satılmaktadır.

Biyoaktif bileşenlerin elde edilmesinde çözgen ekstraksiyonuna alternatif olarak katı faz (adsorbant) ekstraksiyonu, ultrosonik yardımcı ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, mikrodalga yardımcı ekstraksiyon gibi modern tekniklerden faydalanılmaktadır (Kovylyayeva vd 2007; Pól vd 2007; Puri vd 2012). Bunların yanı sıra son yıllarda özellikle bitkisel kaynaklı biyoaktiflerin ekstrakte edilmesinde enzim-yardımlı ekstraksiyon metodlarının kullanımı gündemdedir (Puri vd 2012).

2.5. Steviol Glikozidlerin Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması

Endüstriyel olarak stevia bitkisinden ekstraksiyon sonucu elde edilen ham ekstrakt hafif acımsı, ağızda sonradan bıraktığı arzu edilmeyen tadı ve koyu rengi nedeniyle saflaştırılmadan ticari olarak kabul edilebilir kalitede değildir. Ham ekstraktın içerdiği safsızlıkları genellikle organik pigmentler ve inorganik tuzlar oluşturmaktadır.

Ekstraktların saflaştırılması için iyon değiştirme, polimerik veya inorganik adsorbentlerle adsorbsiyon, kolon kromatografisiyle ayırma ve membran filtrasyon teknikleri gibi farklı prosesler kullanılmaktadır. Pratikte saflaştırma aşaması bu yöntemlerden iki yada daha fazlasının kombinasyonuyla gerçekleştirilmektedir.

Stevia yapraklarında tatlılığa neden olan steviosid ve rebaudiosid A bileşenleri kimyasal yapı açısından yüksek benzerlik göstermelerine rağmen, bu bileşenlerin tat kaliteleri belirgin olarak farklıdır. Sakkarozla karşılaştırıldıklarında rebaudiosid A'nın bağıl tatlılığının steviosidden daha yüksek olduğu ve bunun yanında tatlılık kalitesinin glukozla daha yakın olduğu bilinmektedir (Chatsudhipong ve Muanprasat 2009). Bu nedenle endüstriyel anlamda rebaudiosid A oranı yüksek ekstrakt üretimi ve rebaudiosid A'nın saflaştırılması gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Ancak, steviosid ve rebaudiosid A'nın her ikisi de benzer glikozid yapı ve polariteye sahip olduklarından birbirlerinden ayrılmaları oldukça zordur. Rebaudiosid A'nın steviosidden ayrılmasında benimsenmiş olan metotlar rekristalizasyon ve HPLC'dir. Ancak endüstriyel uygulamalarda her iki metodunda dezavantajları mevcuttur. Rekristalizasyon prosesi oldukça kompleks olmasının yanısıra fazla miktarda kimyasal girdi kullanımı söz konusudur. Bu olumsuzluklar nedeniyle rekristalizasyon endüstriyel üretim açısından tercih edilmemektedir. HPLC metoduyla yüksek saflıkta ürün basit olarak elde edilebilir, ancak ürün verimi dūřuk olduğundan endüstriyel açıdan uygun bir yöntem değildir.

Stevia glikozidlerinin ekstraksiyon ve saflaştırma basamaklarının endüstriyel olarak uygulanmasına rağmen yüksek kalitede ürün veren, basit ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar halen devam etmektedir. Günümüzde steviosidin saflaştırılmasıyla ilgili farklı metodların geliştirildiği bir çok patent mevcuttur. Kumar'ın (1986) tanımladığı proses suyla ekstraksiyonun ardından şelatlama ajanı ilavesi, bunu izleyen kalsiyum içeren çöktürme ajanı ilavesi ve son olarak kristalizasyonla ürün eldesini sağlayan bir dizi basamaktan oluşmaktadır. Giovanetto (1990) yaptığı patent çalışmasında sulu ekstraktı santrifüjlendikten sonra kalsiyum hidroksitle muamele edip iyon değiştirici reçineler kullanarak saflaştırmıştır. Payzant vd (1999) ise çalışmalarında Stevia ekstraktından safsızlıkların uzaklaştırılması için iyon değiştirici kolon kullandıktan sonra steviosidin ayrımını metanolle gerçekleştirmeyi amaçlamışlardır. Mantovaneli vd (2004) araştırmasında stevia ekstraktını kalsiyum zeolit kullandığı kolonda saflaştırmıştır. Ayrıca araştırma sonucu akış hızındaki artışın kütle taşınım katsayısını da arttırdığı belirlenmiştir. Belirtilen prosesler uzun zaman harcamayı gerektiren, pahalı, organik çözücü ve kimyasal girdi kullanımından dolayı gıda ürünleri için uygun olmayan aşamalardan oluşmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelebilmek için membran ayırma teknikleri ilgi çekici bir alternatif durumundadır.

2.6. Araştırma Kapsamında Kullanılan Bazı Teknikler

2.6.1. Dekantör sistemi

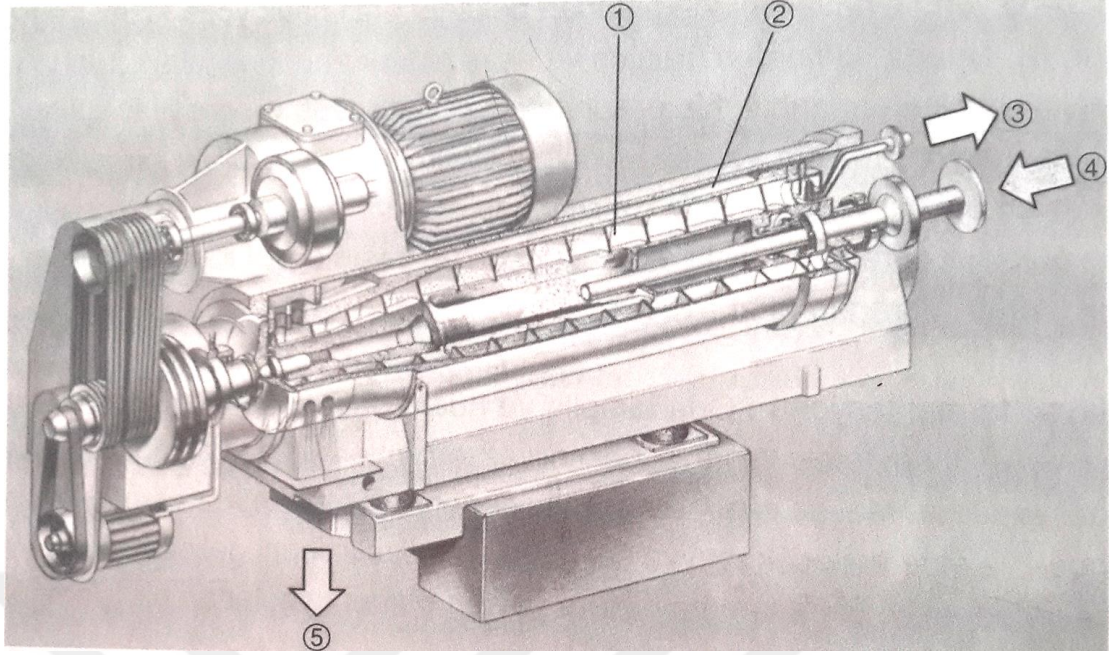
Endüstride çeşitli proseslerde, özellikle arıtma tesislerinde dekantör sisteminden yararlanılmaktadır. Meyve ve sebze sularının üretiminde geleneksel ekstraksiyon metotlarına alternatif olarak dekantör ekstraksiyonundan bahsedilse de, su miktarı % 80 dolayında olan birçok meyve presleme ve pulp üretimi yoluyla kolaylıkla işlenebildiği

için uygulama şansı bulamamaktadır. Bu sistemde verim hammaddeye göre değişmekle birlikte % 60 ile % 95 arasında değişebileceği düşünülmektedir. Sistem enzim ilavesiyle kombine edilerek kullanıldığında üstün bir ekstraksiyon verimine ulaşabilmek mümkündür. Dekantörler yatay konumlu, silindirik-konik trommelli ve vidalı santrifüjler olup sürekli çalışmaya uygundur. Sıvı karışımların birbirinden ayrılmasında, katı sıvı karışımlarının ayrıştırılmasında, katı sıvı karışımların susuzlaştırılmasında, konsantre edilmesinde, sınıflandırılmasında ve bileşenlerin ekstraksiyonunda uygulanmaktadır.

Dekantör yatay olarak durmakta ve yatay eksen etrafında dönmektedir. Cihazın haznesinin merkezinde; hazneden hafifçe hızlı veya yavaş dönen ve çöken katıları çıkış tarafına taşıyan vidalı bir konveyör bulunmaktadır. Haznenin hızı ve hazne ile vida arasındaki diferansiyel hız, belli bir dönme hızına ayarlanabilen kayışlı dönüş/aktarım sistemiyle kontrol edilir. Alternatif olarak üzerine binen yükü algılayabilen ve hazne hızından bağımsız olarak diferansiyel hızı ayarlanabilen bağımsız vida sistemleri de mevcuttur. Dekantörde en önemli noktalardan biri tambur ile helezon devirleri arasındaki fark, yani diferansiyel hızdır. Bu hız, ayrılan katıda kalan nemi tayin ettiği gibi, ayrılan sıvının da ne kadar berrak olduğunu belirler. Bu yüzden, istenen ürün kalitesine göre bu hız ayarlanarak istenen ürün özellikleri elde edilebilmektedir (Beveridge ve Rao 1997).

Şekil 2.3'te görüldüğü gibi dekantörlerde katı ve sıvının ayrılacağı materyal, merkezi bir besleme borusuyla hızla dönmekte olan tambura verilir. Materyal hızlı bir şekilde tamburun dönme hızına ulaşırken, tamburun iç duvarına içi boş bir sıvı silindiri şeklinde yapışır. Merkezkaç kuvveti etkisiyle katı parçacıklar haznenin yüzeyine yerleşirken, sıvı kısım en içte ileriye doğru hareket eder. Tamburun içinde tamburla aynı yönde fakat daha hızlı dönmekte olan helezon tarafından katı parçacıklar devamlı olarak konik uca doğru itilmekte ve katı içindeki sıvı sıkıştırılarak alınmaktadır. Katı kalıntı dışarı atılırken, sıvı helezonun kanatları arasından tamburun zıt yönüne doğru hareket ederek dışarı alınır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Dekantör ekstraksiyonu daha yaygın olarak atık su arıtma ve atıkların işlenmesi gibi çevresel projelerde kullanılmaktadır. Gıda sanayinde ise bu sistemden genellikle zeytinden yağ ekstraksiyonunda yararlanılmaktadır. Bunun dışında meyve ve sebze suları (turunçgil suyu, üzüm suyu, elma suyu, tropikal meyve suları, şekerpancarı suyu, havuç suyu) ve hamur haline getirilmiş çeşitli sert meyvelerden pekmez üretimi gibi uygulamalarda yararlanılabilmektedir. Dekantasyonun stevia bitkisinden steviol glikozidlerin ekstraksiyonu için endüstride kullanılan metotlara kıyasla daha basit, yüksek verimlilik, enerji ve zaman tasarrufu sağlayan ayrıca çevresel koruma gerekliliklerinin her geçen gün daha fazla önem kazandığı dünyada kimyasal çözenlerin kullanımının yarattığı olumsuzlukları da ortadan kaldıran oldukça avantajlı bir yöntem olacağı düşünülmektedir.



Şekil 2.3. Bir dekantörün kesiti, 1) Helezon, 2) Tambur, 3) Sıvı çıkışı, 4) Besleme, 5) Posa çıkışı (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)

2.6.2. Durultma

Durultma, üründe bulunan ve bulanıklık etmeni olan proteinler ve polifenoller gibi bileşenleri uygun durultma yardımcı maddeleri vasıtasıyla uzaklaştırmak ve istenen berraklıkta ürün elde etmek amacıyla özellikle meyve suyu ve şarap endüstrisinde kullanılan bir prosestir.

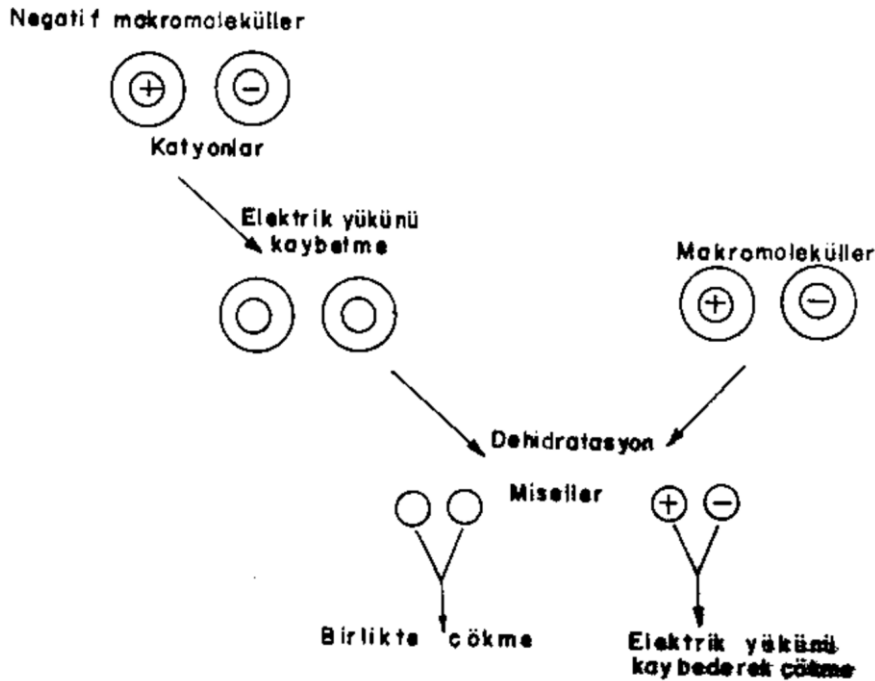
Geleneksel durultma işleminde bentonit, jelatin ve kizelsol gibi bazı durultma yardımcı maddeleri kullanılmaktadır. Berraklaştırma amacıyla kullanılan durultma yardımcı maddelerinin etki mekanizmaları farklılık göstermektedir. Bunlardan kizelsol ve bentonit negatif yük taşıırken, jelatin meyve suyu pH'sında pozitif yüklüdür. Meyve suyunda bulunan ve bulanıklık sorunu yaratan fenolik bileşiklerin negatif, meyve suyu proteinlerinin ise pozitif yüklü olduğu dikkate alındığında, uygun miktar, kombinasyon ve koşullarda eklenecek durultma yardımcı maddeleri ile etkin bir berraklaştırma işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Meyve suyuna ön denemelerle belirlenen miktarlarda durultma yardımcı maddelerinin eklenmesiyle floklaşma gerçekleşir. Floklaşma, koloidal halde çözünen unsurların iri agregatlar halinde kümeleşip, toplanmasıdır. Böylece, daha önce filtrasyon gibi fiziksel bir işlem ile ayrılamayan bulanıklık unsurları üzerine zıt yük taşıyan durultma kimyasallarının eklenmesi ile daha önce aynı tür yük taşıdığı için birbirini iten parçacıklar floklar halinde çökmeye başlamakta ve oluşan floklar sedimentasyon veya filtrasyon gibi bir uygulamayla ayrılabilir nitelik kazanmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Durultma yardımcı maddelerinden jelatin; kemik, deri, kıkırdak gibi hayvansal kaynaklardan elde edilen kollagen tipi bir proteindir. Ekstraksiyon yöntemine göre asidik hidrolizasyon (Tip-A) ve bazik hidrolizasyon ile elde edilen (Tip-B) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Durultma açısından jelatinin izoelektrik noktası ve bloom sayısı gibi

özellikleri önemlidir (Ekşi 1988). A tipi jelatinin izoelektrik noktası pH 7.0-9.0 arasındır. Bu izoelektrik noktadaki pH değerinde A tipi jelatin eşit miktarda pozitif ve negatif yükler içereceği için dışarıya karşı nötr olarak davranmakta, bu pH derecesinin altında pozitif, üstünde ise negatif yük kazanmaktadır. B tipi jelatin ise, izoelektrik noktası pH 4.5-5.0 olan jelatindir. Bu jelatinin izoelektrik noktasındaki pH derecesi ile meyve suyunun pH derecesi arasındaki fark arttıkça jelatinin pozitif yükü de arttığı için meyve suyu durultmasında A tipi jelatin kullanımı tercih edilmektedir.

Jelatinin izoelektrik noktası hariç diğer bir özelliği de bloom sayısıdır. Bloom sayısı ile jelatinin molekül ağırlığı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bir jelatin preparatının molekül ağırlığı ne kadar yüksekse o kadar sert bir jel oluşturur, yani bloom sayısı o kadar yüksektir. Durultmada en iyi sonuç veren jelatinlerin bloom sayısı 80–100 arasında olan jelatinler olduğu belirtilmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Jelatin durultulacak meyve suyuna çözelti olarak eklenir ve meyve suyu pH sınırlarında pozitif yük kazanarak, karşılaştığı negatif yüklü fenolik bileşiklerin yükünü yok eder ve bunlarla agregasyona girerek floklar oluşturur. Jelatinin polifenollerle reaksiyona girmesi sonucu, polifenol-jelatin kompleksi oluşmaktadır. Bu reaksiyon, polifenollerin yapısında bulunan hidroksil grupları ile proteinlerin peptit bağları arasında oluşan hidrojen bağları ile gerçekleşmektedir. Polifenol-protein kompleksi sayesinde oluşan partiküller kritik boyuta ulaştıktan sonra çökelmeye başlamaktadır. Bu floklar çökelirken, diğer bulanıklık unsurlarını da aşağı doğru sürüklerler (Dıblan ve Özkan 2013) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Makromoleküllerin çökmesi (Cabaroğlu ve Canbaş 1994)

Meyve suyu durultmada kullanılan diğ er bir durultma yardımcı maddesi bentonittir. Bentonit doğal kildir ve en önemli bileşen olarak % 60-80 oranında montmorillonit içermektedir. Bentonitin durultmadaki asıl etkisi adsorbsiyon gücüyle ilişkilidir. Bentonitin etki mekanizması elektrostatiktir. Bir bentonit hidratı negatif yüklü durumdadır. Ortamda bulunan pozitif yüklü bileşenler ise, bu negatif yüklü y zeyeye adsorbsiyon ile tutunur. Pozitif yük taşıyan proteinler ile bentonitin orta katmanındaki katyonlar yer değiştirir ve böylece proteinler ortamdan uzakla tırılmı  olur (Dıblan ve  zkan 2013).

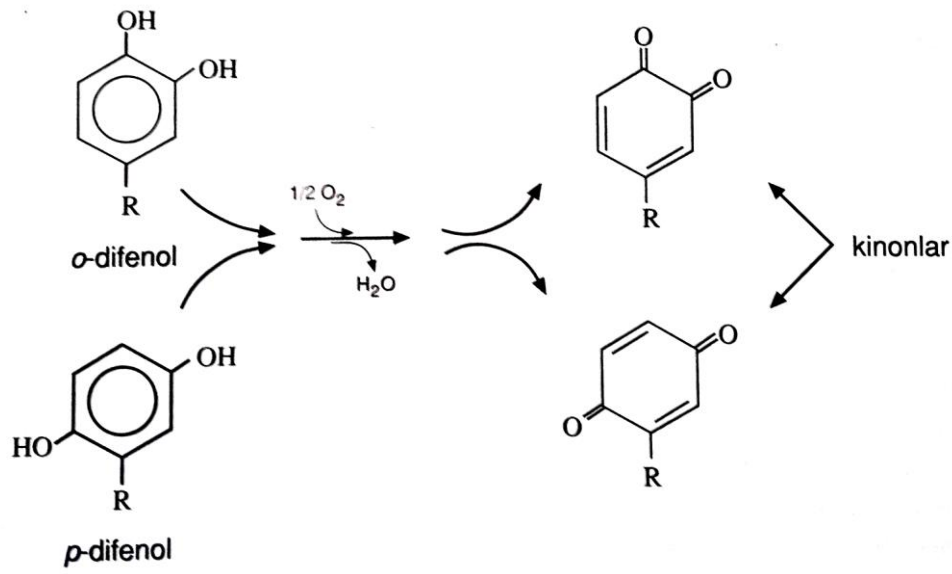
Durultma işleminde yaygın olarak kullanılan diğ er durultma yardımcı maddesi ise kizelzoldur. Kizelzol; saf silisyum dioksidin sudaki sol formudur. Meyve suyunun asit ortamında negatif yük kazanmakta ve protein gibi pozitif yüklü bileşikler ile sıkı bir tortu oluşturmaktadır. Özellikle sıcak durultmada jelatin kullanıldığı zaman kizelzolun da kullanılması gerekmektedir. Aksi takdirde meyve suyu için gereken optimum jelatin dozu açılmakta ve üründe jelatin kalıntısı bulanıklığı meydana gelmektedir (Bayindirli vd 1994). Bununla birlikte jelatinin negatif yüklü parçacıklar ve fenoliklerle sıkı bir flok oluşturabilmesi için 10  C'ye kadar soğutulmuş olması gerekmektedir. Ancak tek başına kullanıldığında 40  C'nin üzerinde flokla ma yapamaması nedeniyle bu, sadece soğutma ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple 40-50  C'de m kemm l ve hızlı bir flok oluşturabilmek amacıyla da kizelzol ile beraber kullanılması gerekliliği söz konusudur (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

2.6.3. Lakkaz enzimi

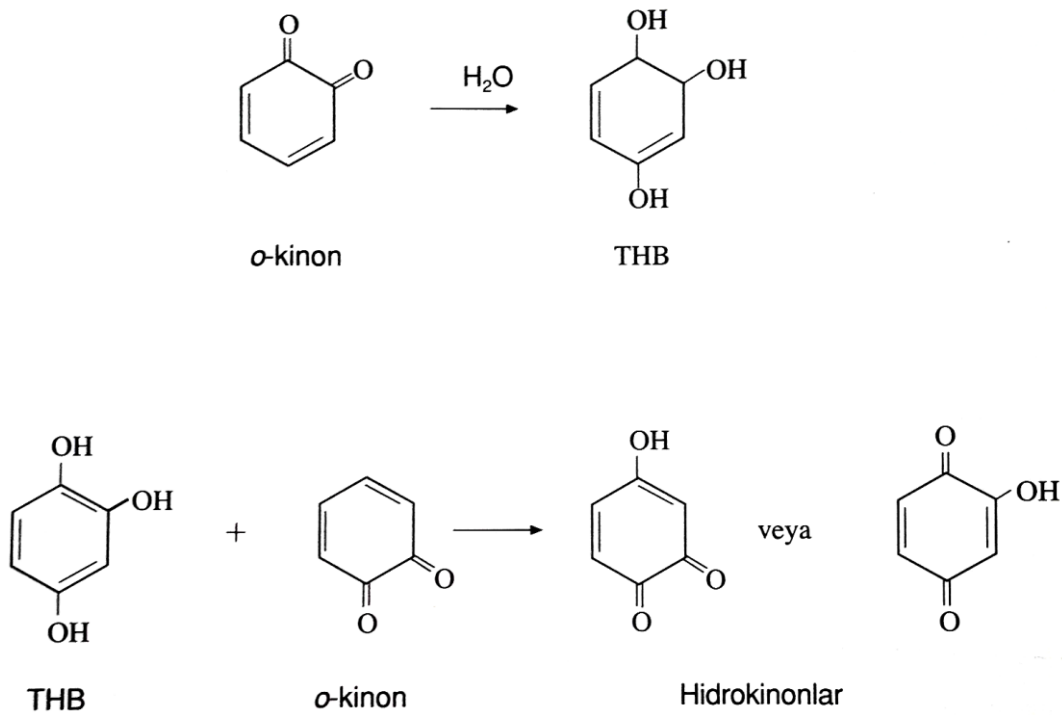
Lakkaz, polifenol oksidaz enzimlerinden birisidir. Polifenol oksidazlar, bakır içeren oksidoredüktazlar olup substratları fenolik bileşiklerdir. Substratlarını oksijen eşliğinde esmer renkli bileşiklere oksitlemektedirler ( ekil 2.5 ve  ekil 2.6).

Lakkaz enziminin etki mekanizması polifenollerin okside edilerek büyük moleküllere dönüştürülmesi ve filtrasyonla uzaklaştırılması esasına dayanmaktadır. Enziminin oksidasyon yeteneği yüksektir. Lakkaz, difenoller, polifenoller, diaminler, aromatik aminler ve bazı inorganik bileşikler de dahil olmak üzere pek çok substratın oksidasyonunu katalizlemektedir.

Literatürde lakkaz enziminin ultrafiltrasyon işlemiyle birlikte meyve sularındaki istenmeyen fenolik bileşikleri uzaklaştırmak amacıyla kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Gökmen vd 1998; Alper ve Acar 2004; Artik vd 2004; Neifar vd 2011).



Şekil 2.5. Polifenol oksidazların fenolik bileşiklere etki mekanizması (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)



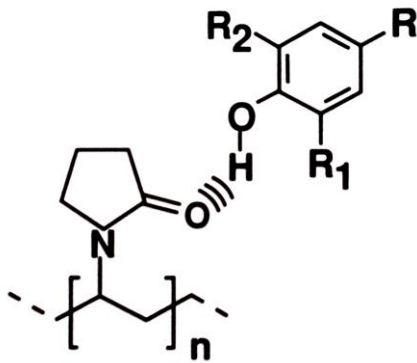
Şekil 2.6. Esmer renkli melaninlerin oluşma sürecinde gelişen spontan reaksiyonlar (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)

2.6.4. Adsorbsiyon (PVPP uygulaması)

Adsorbsiyon, çeşitli komponentlerden oluşan bir karışımdan bir veya daha çok özel nitelikli bileşiklerin ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu ayırma tekniğinde bir katı maddenin (adsorber) yüzey özelliklerinden yararlanılmaktadır. Hangi tip bileşiklerin adsorbe edilebileceği adsorberin kimyasal yapısı ve materyal özelliğine bağlıdır. Adsorbsiyon, materyalin yüzey aktivitesiyle ilişkili olduğundan iyi bir adsorberin olabildiğince fazla molekül bağlayabilmek için yeterli yer sunabilen büyük yüzey alanına sahip bir materyal olması gerekmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Meyve suyu endüstrisinde özellikle renk açmak amacıyla kullanılan polivinilpolipirrolidon (PVPP), yüksek molekül ağırlıklı, bir durultma yardımcı maddesi olup etki mekanizması adsorbsiyona dayanmaktadır. En önemli özelliği fenolik maddeleri ve pigmentleri adsorbe edebilmesidir. PVPP, modifiye bir polietilen olup N-vinilpirrolidondan oluşan üç boyutlu ağ yapmış bir polimerdir. PVPP suda çözünmeyen bir madde olmasına karşın hidrofiliktir ve bu özelliği ile başta flavonoidler olmak üzere, polifenollere hidrojen bağı ile bağlanabilmektedir (Dıblan ve Özkan 2013).

PVPP, fenolik bileşikleri intermoleküler hidrojen köprüsü oluşturmak suretiyle adsorbe etme özelliğine sahiptir. Sentetik bir durultma yardımcı maddesi olan PVPP gerek meyve suyu gerekse şarap endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. PVPP, polifenolleri uzaklaştırabildiğinden dolayı berraklaştırma amacıyla da kullanılmaktadır. Geleneksel durultmada jelatin uygulamasıyla esas olarak yüksek düzeyde kondanse olmuş polifenolik bileşikler (tanenler) uzaklaştırılırken, küçük molekül ağırlıklı fenolik bileşikler yeterince uzaklaştırılamamaktadır. PVPP'nin polifenoller ve özellikle de flavonoid yapıdaki polifenoller üzerine etkisi hidrojen köprüsü oluşturarak adsorbe etme üzerine olmakta ve bu köprü düşük molekül ağırlıklı polifenollerle daha güçlü kurulmaktadır (Şekil 2.7). PVPP uygulamasıyla küçük molekül ağırlığına sahip, acılık veren veya daha sonra esmerleşmeye neden olabilecek fenolik bileşiklerin (kateşin, proantosiyanidin vb.) ortamdan uzaklaştırılması sağlanabilmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004; Dıblan ve Özkan 2013).



Şekil 2.7. PVPP ile fenolik bileşikler arasında hidrojen köprüsü oluşumu (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004)

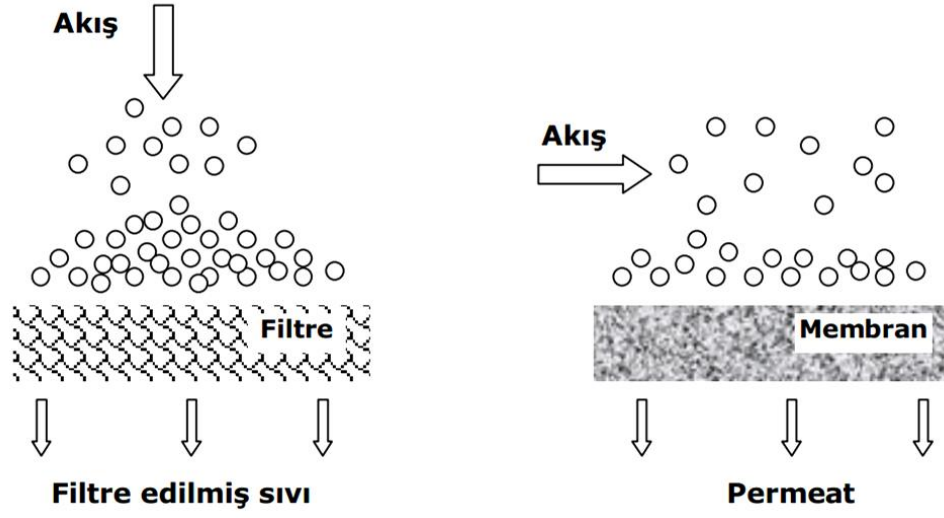
2.6.5. Ultrafiltrasyon

Günümüzde gıda endüstrisinde suyun saflaştırılması, meyve sularının, süt ürünlerinin, alkollü içeceklerin ve atık suların berraklaştırılması ve konsantrasyonu amacıyla membran ayırma sistemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Membran teknolojisi, moleküler ve iyonik düzeylerde ayırım yapılan bir teknoloji olarak tanımlanabilir. Gıda endüstrisinde membran filtrasyon uygulamaları teğet akış düzenlerinin geliştirilmesi ile hızla yaygınlaşmıştır (Şekil 2.8). Membranlardan sıvı akışı için konsantrasyon, basınç, sıcaklık ve elektrik potansiyelindeki farklarından yararlanılmaktadır.

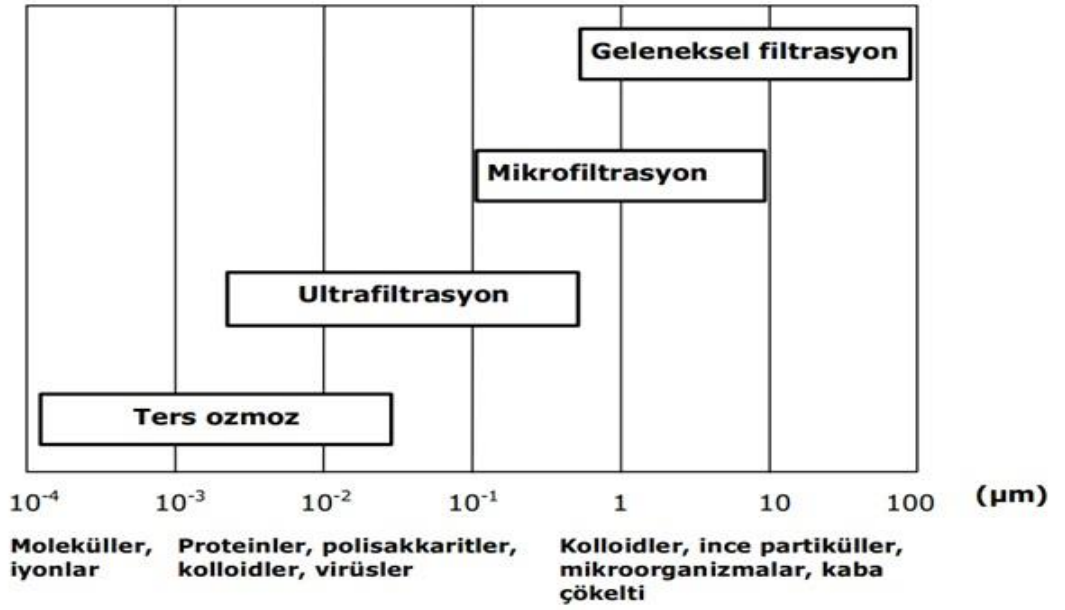
Farklı fazların birbirinden ayrılması amacıyla değişik filtrasyon teknikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Filtrasyon genel olarak bir akışkan sistemden boyut farkına dayanarak iki veya daha fazla bileşenin ayrılması olarak tanımlanmaktadır (Girard ve Fukumoto 2000). Ultrafiltrasyon membranları temel olarak fraksiyonlandırma, yani büyük molekül ağırlıklı çözünenleri küçük molekül ağırlıklı olanlardan ayırmak amacıyla kullanılmaktadır. Tipik olarak UF membranları büyüklüğü 0.002'den 0.2 mikrona kadar değişiklik gösteren veya 500 ile 300,000 Dalton arası ağırlığındaki molekülleri tutma kabiliyetine sahiptirler (Şekil 2.9).

UF uygulamalarında basınç 2-10 bar arasındadır. Genelde UF membran tarafından geçirilmeyen maddeler şekerleri, biyomolekülleri, polimerleri ve kolloidal partikülleri ihtiva ederler. Çoğunlukla UF membranlar "en son tutulan molekül ağırlığı" ile tanımlanırlar (MWCO= molecular weight cut-off), ki tutulan kısım % 90'dan çok olmalıdır. Kullanılan membranın çeşidi, sıcaklık, basınç farkı, permeat/konsantrat oranı gibi filtrasyon parametreleri filtrasyonun etkinliğini ve üretilecek ürünün kalitesini etkilemektedir.

Membran ayırma sistemlerinde sıvı çözelti yarı geçirgen bir membranla temas ettiğinde, bazı moleküller membran yüzeyinin hemen yanındaki sınır katmanında birikim yaparlar. Bu nedenle alıkonulan bileşenlerin membran yüzeyine bitişik olan sınır katmanındaki konsantrasyonu yığındaki konsantrasyonundan fazla olmaktadır. Bu olay konsantrasyon polarizasyonu olarak adlandırılır ve membran sisteminin performansını doğrudan etkilemektedir. Ultrafiltrasyon membranlarında oluşan konsantrasyon polarizasyonu sonucu büyük moleküller membran yüzeyinde tutulur ve tutulan bu moleküller çökelmeye yol açarak membran yüzeyinde katı bir jel tabakası oluşumuna neden olur. Bu jel tabakası, geçirgenliğe karşı membran tarafından gösterilen dirence ilave bir direnç yaratmakta ve bu da sistem performansını olumsuz etkilemektedir (Onsekizoğlu 2015).



Şekil 2.8. Geleneksel dikey filtrasyon ile teğet akış (çapraz akış) filtrasyon uygulamaları şematik gösterimi (Anonim 2016)



Şekil 2.9. Geleneksel ve membran filtrasyon ile ayrılan maddelerin büyüklükleri (Anonim 2016)

Ultrafiltrasyon sistemlerinde genel olarak kullanılan filtrasyon modülleri plakalı, borulu, spiral sarımlı ve silindir fiberli olmak üzere dört çeşittir. Membranlarda başlıca kullanılan materyaller ise poliakrilonitril, polivinil klorid-poliakrilonitril kopolimerleri, polisülfon, polietersülfon, polivinilidenflorid, bazı aromatik poliamidler ve selüloz asetattır. Bu materyallerden polietersülfon yapılı membranlar rutin uygulamalarda yüksek sıcaklıklara ve geniş pH aralıklı solüsyonlara dayanıklı, klorlu bileşiklere yüksek derecede direnç gösteren, farklı ölçü ve şekillerde kolaylıkla kullanılabilen, ultrafiltrasyon ve mikrofiltrasyon uygulamaları için geniş bir gözenek çapı aralığına sahip ($10 \text{ Å} - 0.2 \mu$) ve alifatik hidrokarbonlara, halojene hidrokarbonlara, alkollere ve asitlere karşı iyi düzeyde kimyasal dayanıklılığa sahiptir ve gıda uygulamalarında çok tercih edilen membranlardandır. UF membranların geçirgenliğini filtre edilecek sıvıda bulunan moleküllerin boyutu ve şekli, membran materyalinin yapısı, sıvıdaki diğer çözünen bileşiklerin varlığı, pH ve iyonik kuvvet gibi faktörler etkilemektedir (Cheryan 1998).

Membran teknikleri, düşük maliyetli, faz değişikliği veya kimyasal madde ilavesi gerektirmeyen ve termal olmayan ayırma teknikleridir. UF tekniğinin avantajları şu şekilde özetlenebilir (Cassano vd 2007);

- Randıman artırılabilir.
- Ürün kalitesinde sürdürülebilirlik sağlanabilmektedir.
- Enzim kullanılan metotlarda enzimin geri kazanılması ve enzim kullanımında azalma sağlanması mümkündür.
- Otomasyon nedeniyle işçilik ve zaman tasarrufu sağlanmaktadır.
- Yüzey filtrasyonu (teğet akış) nedeniyle işlem devresi çok uzundur.
- Kapasite çalışma süresince sabit kalmaktadır.
- Isıl işlem gerekliliği ortadan kalkabilmektedir vb.

Literatürde stevia ekstraktının saflaştırılması amacıyla mikrofiltrasyon ve ultrafiltrasyon gibi membran ayırma tekniklerinin kullanıldığı bir takım çalışmalar mevcuttur. Fuh ve Chiang (1990) yaptıkları çalışmada ultrafiltrasyon işleminde ayırma sınırları 25000-100000 Da arasında değişen membranlardan yararlanarak steviosidler açısından % 46 oranında saflığa ulaştıklarını bildirmişlerdir. Ardından ters osmoz yöntemiyle konsantrasyon ve iyon değiştiricide daha ileri düzeyde saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Zhang vd (2000) stevia ekstraktının tatlandırıcıya işlenmesinde 0.35 mikron seramik filtre kullanarak yapılan mikrofiltrasyonun ön işlem olarak kullanıldığı basamağı izleyen 2500 Da ayırma sınırında ultrafiltrasyon işleminin uygulandığı ileri düzeyde bir klarifikasyon prosesi ortaya koymuşlardır. Başka bir çalışmada ise mikrofiltrasyon işleminin ön basamağı olarak ham ekstraktta modifiye edilmiş zeolit kullanılmıştır (Silva vd 2007). Stevia ekstraktlarında değişen boyutlarda gözenek çaplarına sahip membranların farklı çalışma basınçlarında kullanılmasıyla yaklaşık olarak ekstraktların % 80-100 oranında temizlenmesi sağlanabilmektedir. Bu amaçla Reis vd (2009) seramik mikrofiltrasyon membranı kullanarak yaptıkları çalışmada, 0.1 μ m membran ve 4 bar basınçta prosesteki steviosid veriminin maksimum olduğunu belirtmişlerdir. Farklı araştırmacıların stevia ekstraktının ultrafiltrasyonu yönünde yürütmüş oldukları çalışmalarda 30 kDa ayırma sınırına sahip filtre hem akış hem de elde edilen ekstraktın kalitesi açısından denemelerde kullanılan diğer filtrelerle kıyasla daha başarılı bulunmuştur (Chhaya vd 2012a; Chhaya vd 2012b; Das vd 2015b). Mondal vd (2012) yaptıkları çalışmada stevia ekstraktında 30 kDa ayırma sınırında

filtre kullanılarak gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işleminin performansını araştırmışlar ve permeatta maksimum steviosid veriminin düşük basınç aralığında (276-414 kPa) belirlendiğini rapor etmişlerdir. Vanneste vd (2011) tarafından yapılan çalışmada stevia ekstraktına sırasıyla mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon uygulanmış, son aşamada toplam steviol glikozidler açısından ulaşılan saflık düzeyinin % 37 olduğu bildirilmiştir. Ayırma sınırı 90 kDa olan CAP-PAN membran kullanarak yapılan başka bir çalışmada ise steviol glikozidlerin ayrımı ancak % 34 saflık düzeyinde gerçekleştirilebilmiştir (Roy ve De 2014).

Ülkemizde, özellikle Akdeniz Bölgesi gibi bitkinin yetişmesi için uygun olan yerlerde üretimi son yıllarda denemeye başlayan stevia bitkisinden tatlı bileşiklerin elde edilmesinde düşük maliyetli alternatif ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi bitkiyi işleyecek olan tatlandırıcı sektörünün gelişmesine katkı sağlayacaktır. Bu noktadan hareketle bu çalışmada stevia yapraklarından steviol glikozidlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan kesikli sistemde etanol ekstraksiyonuna alternatif olarak bu amaçla daha önce hiç denenmemiş olan, ekstraksiyonda sadece suyun kullanıldığı dekantör ekstraksiyonu metodunun denenmesi ve alternatif, çevre dostu ve ekonomik bir işleme modelinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu aşamada elde edilecek sulu ekstraktta bulunan makro safsızlıkların giderilerek saflaştırma işlemi öncesi ekstraktın tatlı bileşikler açısından zenginleştirilmesi için meyve-sebze suyu berraklaştırmada kullanılan durultma, lakkaz enzimi ve ultrafiltrasyon gibi metotların uygulanabilirliğinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında Antalya’ da Kuzey Agripark Bitki Araştırma ve Biyolojik Muc. San. Tic. Ltd. Şti.’den sağlanan kurutulmuş stevia yaprakları kullanılmıştır. Kuru yapraklar kullanılmadan önce ayıklama işlemi gerçekleştirilmiş ve yabancı maddeler uzaklaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Kuru stevia yaprakları

3.2. Yöntem

3.2.1. Stevia yapraklarının dekantör sisteminde ekstraksiyonu

Tez çalışmasının ilk aşamasını stevia yapraklarından steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu oluşturmaktadır. Bu amaçla optimizasyon parametrelerinin belirlenmesi için ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler sonucunda farklı sıcaklık, süre ve bitki/su oranı değişkenleri kullanılarak oluşturulacak deneme deseniyle anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmüştür.

Optimizasyon için Cevap Yüzey Metodu (CYM) Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır. Dizaynın oluşturulması için sıcaklık (°C), bitki/su oranı (w/v) ve ekstraksiyon süresi (dak) gibi değişkenlerin minimum ve maksimum noktaları belirlenmiştir. Ön denemeler sonucu elde edilen tüm örneklerde hedef bileşenlerin (steviosid ve rebaudiosid A) miktarları HPLC cihazında tespit edilmiştir. Ayrıca örneklerde toplam kuru madde analizi yapılarak steviosid ve rebaudiosid A bileşenleri açısından saflık düzeyleri hesaplanmıştır. Ekstraktların kuru ağırlığı üzerinden steviosid ve rebaudiosid A miktarlarındaki değişim dikkate alınarak Box-Behnken dizaynı için uygun minimum ve maksimum noktalar belirlenmiştir.

CYM metodunun oluşturduğu şartlarda ekstraksiyon denemeleri 2 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Ekstraksiyonda çözücü olarak demineralize su kullanılmıştır. Dekantör ekstraksiyonu sisteminde yer alan ve ekstraksiyonun gerçekleştiği bölüm olan malaksördeki bıçakların yaratacağı parçalama etkisinin laboratuvar ortamında yapılan ekstraksiyon denemelerinde de sağlanabilmesi için hesaplanmış miktarda su ilave edilen yapraklar el blendırı (Philips, HR1315 550W) vasıtasıyla parçalanmıştır. Aynı seviyede parçalama sağlamak için her bir örneğe sabit sürede (30 saniye) parçalama işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon denemeleri çalkalamalı su banyosu kullanılarak (Jeio Tech,

BS-06/31, Seoul, Korea) hedef sıcaklık ve sürede 150 rpm karıştırma hızında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan dekantör sistemi

Dekantasyon çalışmaları laboratuvar koşullarında belirlenmiş optimum ekstraksiyon şartlarında yürütülmüştür. Bu amaçla Antalya ilinde Kuzey Agripark Bitki Araştırma ve Biyolojik Müc. San. Tic. Ltd. Şti. bünyesinde bulunan dekantör (Polat Makina, S 200, Aydın, Türkiye) kullanılmıştır (Şekil 3.2). İlk olarak sistemin malaksör kısmında optimum ekstraksiyon koşullarında ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ardından 3 farklı devir sayısında dekantasyon denemeleri yapılmıştır (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4).



Şekil 3.3. Ekstraksiyonun gerçekleştiği kırıcı ve malaksör ünitesi



Şekil 3.4. Malaksörde stevia ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi

Dekantasyon denemelerinin her birinden yaklaşık 35 L ham ekstrakt alınmış ve Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarına getirilerek daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C’de dondurularak saklanmıştır.

3.2.2. Sıcak durultma

Dekantör ekstraksiyonu sonrası elde edilen ham stevia ekstraktına makro moleküllerden oluşan safsızlıkların giderilmesi ve ultrafiltrasyon basamağında ekstraktın filtrasyon kabiliyetini artırmak için durultma yardımcı maddeleri kullanılarak ön temizleme uygulanmıştır. Durultma yardımcılarının dozajı ön denemelerle saptanmıştır.



Şekil 3.5. Durultma ön denemeleri

Bu amaçla bentonit (% 5), jelatin (% 5) ve kizelzol (% 3) durultma yardımcı maddelerinin stok çözeltilerinden sırasıyla 2,5 g/L, 0,5 g/L ve 0,6 mL/L kullanılmıştır. Su banyosunda (Jeio Tech, BS-06/31, Seoul, Korea) 50 °C’de tutulan stevia ekstraktına durultma yardımcı maddeleri ilave edilip bu sıcaklıkta 3 saat bekletildikten sonra durultma sonlandırılmış, dipte oluşan tortu alınmadan üst taraftaki berrak kısım kaba filtereden süzülerek ayrılmıştır. Bu aşamada elde edilen berrak ekstrakt kontrol örneği olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.6. Sıcak durultma işlemi

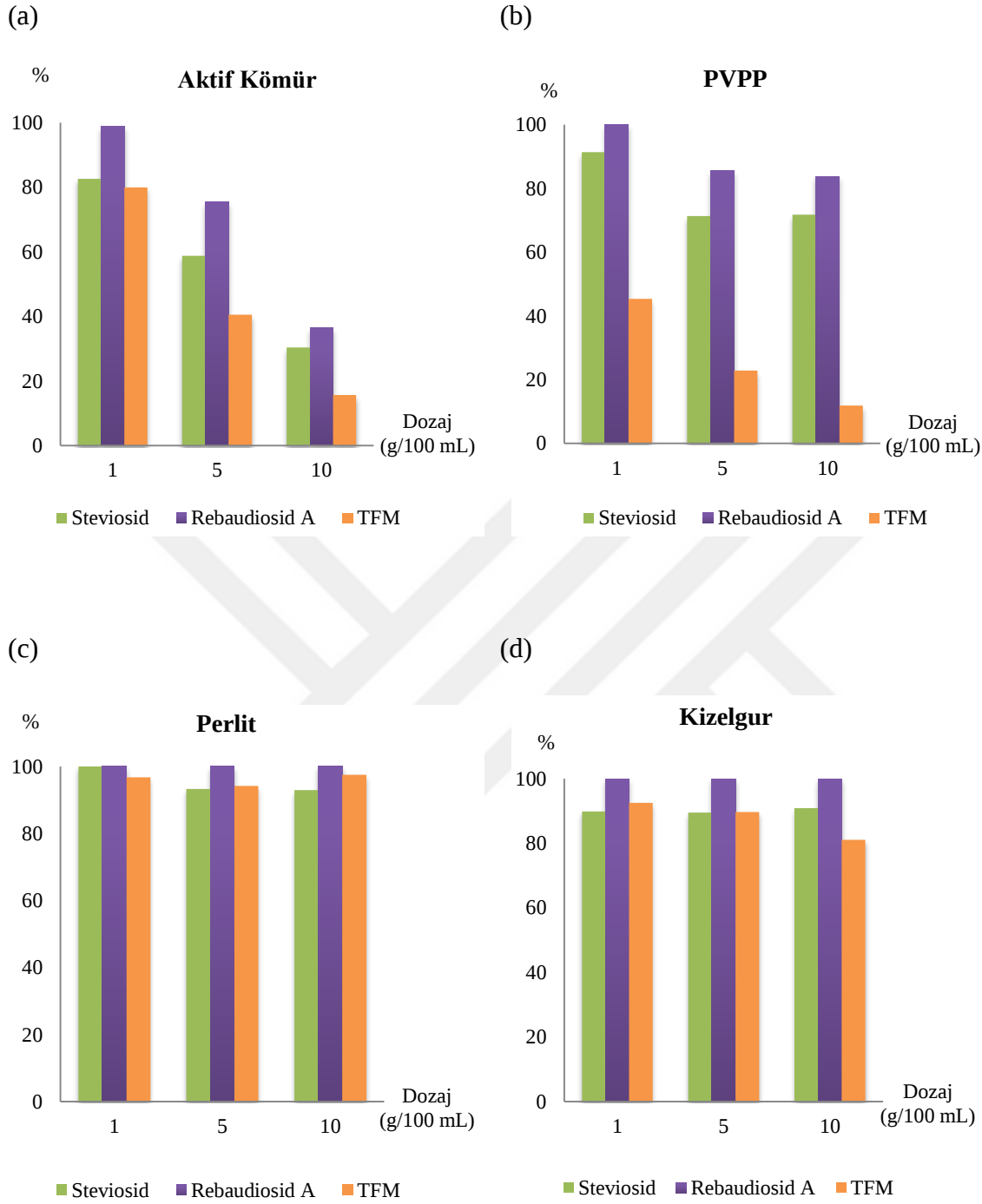
3.2.3. Lakkaz enzimi uygulaması

Çalışma kapsamında sıvı formda lakkaz enzimi (Novozymes, Danimarka) kullanılmıştır. Enzimin aktivite değeri “3.2.6. Analiz metotları” kısmında açıklanan lakkaz aktivite testi uygulanarak 750 U/mL olarak belirlenmiştir. Durultma sonrası elde edilen ekstraktın sıcaklığı 50 °C’ye getirildikten sonra gerekli miktarda lakkaz enzimi ekstrakta ilave edilip çalkalamalı inkübatörde 50 °C’de 150 devir/dak çalkalama hızında hedeflenen süre kadar inkübasyona bırakıldıktan sonra oksidasyon sonucu renkte oluşan kararırma net bir şekilde gözlemlenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ekstrakt su banyosunda (Jeio Tech, BS-06/31, Seoul, Korea) 95 °C’de 5 dakika süreyle bekletilerek enzimin inaktivasyonu sağlanmıştır.

3.2.4. Adsorber ve filtre yardımcı madde uygulamaları

Sıcak durultma sonrası elde edilen berrak ekstrakta fenolik maddeler, renk maddeleri vb. safsızlıkların azaltılması amacıyla çeşitli adsorber ve filtre yardımcı madde uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu basamakta kullanılacak adsorber ve filtre yardımcı madde çeşit ve miktarına karar vermek için kullanılması düşünülen her bir madde (aktif kömür, polivinilpolipirrolidon-PVPP, kizelgur ve perlit) farklı dozajlarda (% 1, % 5, % 10) uygulanarak ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Ekstraktın fenolik maddeleri giderilirken hedef steviol glikozidlerin kaybının en az olduğu uygulama ve dozu belirlemek için uygulanan maddelerin artan miktarları sabit miktarda ekstrakta ilave edilmiştir. Uygulama yapılan ekstraktlar manyetik karıştırıcı yardımıyla sabit hızda 20 dak karıştırıldıktan sonra Whatman 42 filtreden süzölmüştür. Süzöntülerin HPLC’de steviosid ve rebaudiosid A analizlerinin yanı sıra toplam fenolik madde miktarları da spektrofotometrik olarak belirlenerek farklı yardımcı madde ve dozaj uygulamalarının bu parametreler üzerine etkileri incelenmiştir.

Ekstraktlara uygulanan maddelerin artan dozlarının ekstraktların steviosid, rebaudiosid A ve toplam fenolik madde miktarları üzerine etkileri Şekil 3.7’de yer alan grafiklerde gösterilmiştir. Herhangi bir uygulama yapılmamış durultma sonrası ekstraktın (kontrol) içerdiği steviosid, rebaudiosid A ve TFM miktarları (başlangıç) % 100 kabul edilmiştir. Yapılan uygulamaların ardından ekstraktların içerdiği steviosid, rebaudiosid A ve TFM miktarları kontrolün içerdiği miktarlara oranlanarak kontroldeki madde miktarlarının uygulamalardan sonra ekstraktlarda bulunma oranı hesaplanmıştır.



Şekil 3.7. Farklı dozajlarda adsorber veya filtre yardımcı madde a) aktif kömür, b) PVPP, c) perlit, d) kizelgur uygulanmış ekstraktların kontrole göre içerdiği steviosid, rebaudiosid A ve TFM oranları

Şekil 3.7’de görüldüğü gibi incelenen parametrelerden steviol glikozidlerin en yüksek oranda, TFM’ nin ise en düşük oranda olmasını sağlayan madde ve uygulama dozu en uygun yöntem olarak belirlenmiştir. Ekstraktan en fazla oranda TFM uzaklaştırılırken aynı zamanda steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin de en yüksek oranda korunduğu % 5’in altında PVPP uygulamalarının başarılı olacağı düşünülmüştür. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında kontrol örneğine ve lakkaz ile muamele edilmiş örneğe uygulanacak PVPP oranları % 0,1, % 0,5, % 1 ve % 2 olarak belirlenmiştir.

PVPP uygulamalarında ekstrakta hesaplanan miktarda PVPP ilave edilip, çalkalamalı inkübatörde (Sartorius Stedim Biotech, ABD) 25 °C’de 200 devir/dak karıştırma hızında 20 dakika süreyle muamele edilmiştir. Süre sonunda PVPP’nin ayrılması için örnekler 25 °C sıcaklıkta 4000 devir/dak’da 15 dak süre ile santrifüjlenip (VWR Mega Star 3.0R, Almanya) üstte kalan berrak kısım Whatman 42 filtre kağıdının kullanıldığı vakum manifold düzeneğinde filtre edilmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ekstraktların santrifüjlenmesi ve santrifüj sonrası örnekler

3.2.5. Ultrafiltrasyon

Kontrol örneğinde ve lakkaz ve/veya PVPP uygulamalarının ardından elde edilen örneklerde 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip 4 farklı membran kullanılarak ultrafiltrasyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Denemeler laboratuvar tipi ultrafiltrasyon sistemi (Sartorius, Göttingen, Almanya) ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Kullanılan membran filtrelerin genel özellikleri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. 1-14 pH aralığında kullanılabilen membranlar, en fazla 4 bar basınca kadar dayanabilme özelliğine sahiptir. Filtrelerin su geçirgenliği değerleri sabit sıcaklıkta (25 °C) uygulanan transmembran basıncına (TMP) karşılık hesaplanan su akış debisi grafiğinde her bir filtre için elde edilen eğrinin eğim değeri olarak belirlenmiştir (Şekil 3.9). Transmembran basıncı (Eşitlik 3.1) ve akış debisi (Eşitlik 3.2) değerleri ise aşağıda yer alan formüller vasıtasıyla hesaplanmıştır.

$$TMP = \frac{P_1 + P_2}{2} \quad (3.1)$$

P_1 = Besleme (giriş) basıncı, bar

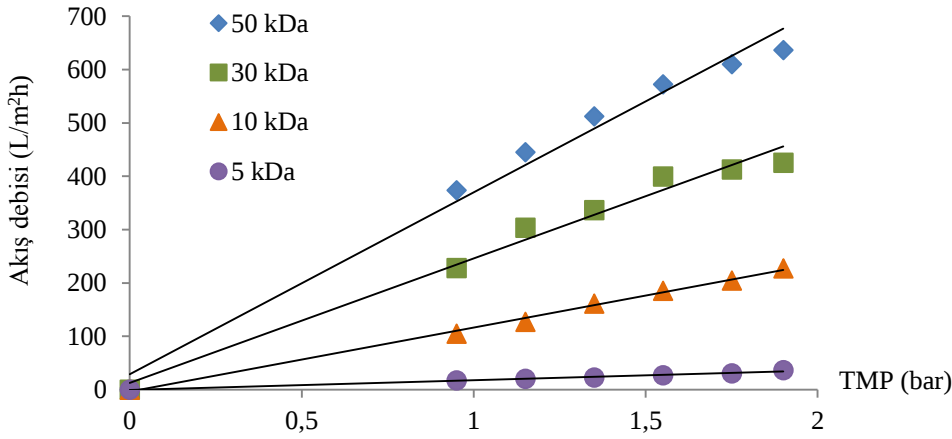
P_2 = Retentat (çıkış) basıncı, bar

$$J = \frac{V}{A \times t} \quad (3.2)$$

J = Akış debisi, L/m²h

V = Permeat (su) hacmi, L

t = Süre (saat), h



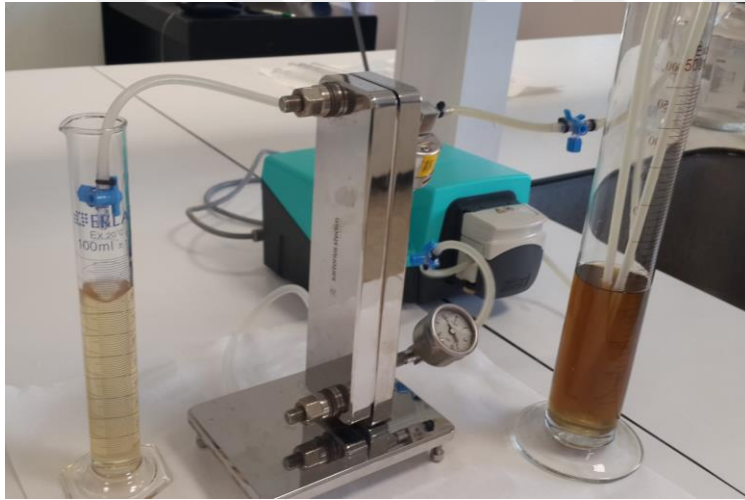
Şekil 3.9. 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip UF filtrelerinde uygulanan transmembran basıncına karşılık su debisinde meydana gelen değişim (25 °C)

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan filtrelerin genel özellikleri

Filtre ayırma sınırı	50 kDa	30 kDa	10 kDa	5 kDa
Filtre materyali	PESU	PESU	PESU	Hydrosart
Yüzey alanı (m ²)	0,02	0,02	0,02	0,1
Su geçirgenliği (L/m ² h)	341,09	233,31	119,98	18,23

Çalışmada kullanılan 50, 30 ve 10 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerin materyali polietersülfondur (PESU). 5 kDa ayırma sınırına sahip filtrenin gözenek çapı çok küçük olduğundan akışın zorlanmaması ve filtre tıkanmadan istenilen miktarda örnek alınabilmesi adına sadece bu ayırma sınırı için yüzey alanı geniş olan hydrosart filtre tercih edilmiştir. Hydrosart membranlar sağlamlaştırılmış selüloz bazlı membranlardır ve hidrofilik özellik gösterir. Bu nedenle tıkanma eğilimi daha düşük ve permeat akışı daha yüksektir.

UF, beslemenin % 90'ı permeat, % 10'u retentat olarak ayrılacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10). Her işlem sonrası membrandan ilk olarak 2000 mL su geçirilip bunun 1000 mL'si permeat olarak atılmıştır. Ardından uygulanan temizlik prosedürüne göre sistemden 50 °C'de 1 M NaOH çözeltisi 1 saat sirküle edilmiş ve süre sonunda permeat çıkışından atılmıştır. Sistemden tekrar 2000 mL su geçirilerek NaOH uzaklaştırılmıştır. Ardından 1 dak süreyle sistemden geçen su hacmi ölçülerek temizlik sonrası akış başlangıçtaki akışla karşılaştırılmıştır. Başlangıçtaki akışın % 70'ine ulaşmak temizliğin yeterli olduğunu göstermektedir. Membran filtre % 20 (v/v)'lik etil alkol çözeltisi yaklaşık 5 dak geçirildikten sonra sistemden çıkarılmıştır. Ayrıca membranlar bir sonraki kullanımlarına kadar yine aynı çözeltide 4 °C'de saklanmıştır.

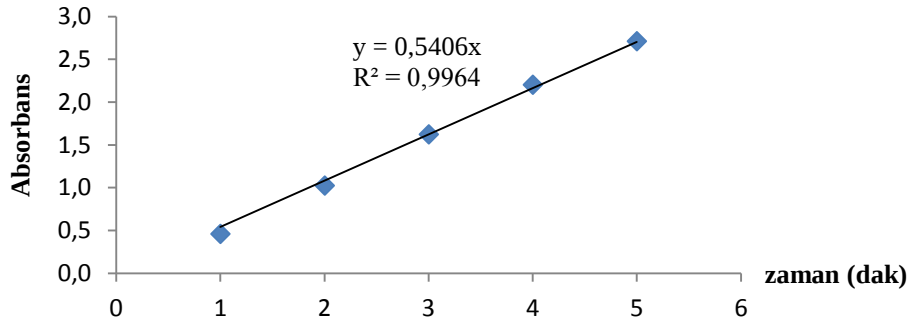


Şekil 3.10. Ultrafiltrasyon sistemi

3.2.6. Analiz metodları

3.2.6.1. Lakkaz aktivite testi

Lakkaz aktivite tayininde 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in (Sigma Aldrich, ABD) oksidasyon hızının saptanmasına dayanan yöntem kullanılmıştır (Bendl vd 2008). Bu amaçla 0,1 M pH 5,0 sodyum asetat tamponunda hazırlanmış 0,5 mM ABTS çözeltisinden 990 µL spektrofotometre küvetine aktarılmış ve üzerine 10 µL enzim ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Kör olarak 990 µL ABTS ve 10 µL tampon çözelti karışımı kullanılmıştır. ABTS'in lakkaz tarafından oksitlenmesiyle oluşan renk değişimi 420 nm dalga boyunda 5 dakika süresince 1 dakika aralıklarla ölçülerek zamana bağlı olarak absorbans değerindeki artış grafiğe aktarılmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. 0,5 mM ABTS çözeltisinin lakkaz tarafından oksitlenmesiyle elde edilen absorbans değerleri

Grafikten elde edilen eğrinin eğim değeri kullanılarak aşağıda yer alan formül yardımıyla lakkaz aktivitesi hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1).

$$\frac{U}{mL} = \left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right) * \frac{1}{\varepsilon} * \frac{1}{b} * \frac{1000 \mu mol}{mmol} * \frac{V}{v} \quad (3.1)$$

$\Delta A/\Delta t$ = Grafikten elde edilen kurvenin eğimi

ε = ABTS için molar absorpsiyon katsayısı, 36000 M⁻¹ cm⁻¹

b = Spektrofotometre küvet genişliği, 1 cm

V = Toplam reaksiyon hacmi, 1000 μ L

v = Enzim miktarı, 10 μ L

Bir Ünite (U), 1 dakikada 1 μ mol ABTS'in oksidasyonunu katalizleyen lakkaz miktarı olarak ifade edilmiştir.

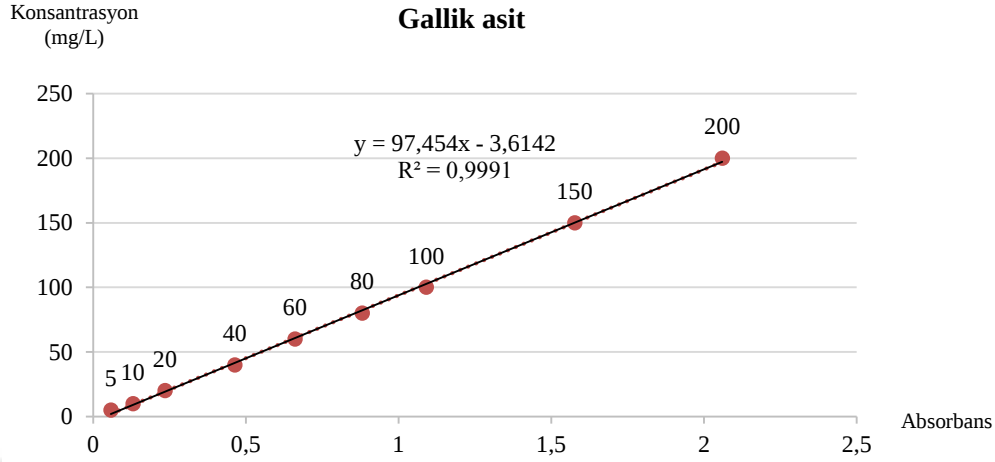
3.2.6.2. Toplam kuru madde miktarı

Örneklerden 10 mL alınarak önceden kurutulup sabit tartıma geldikten sonra darası alınmış petrilere aktarılmıştır. Etüvde (Memmert, Almanya) 105 °C sıcaklıkta sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Ağırlık farkından kuru madde miktarı hesaplanıp (g/100 mL ekstrakt) olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.3. Toplam fenolik madde (TFM) miktarı

Örneklerin toplam fenolik madde miktarı analizi spektrofotometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir (Spanos ve Wrolstad 1992). Bu amaçla, uygun oranda seyreltilmiş örnekten 0,5 mL alınarak üzerine önce 2,5 mL 0.2 N Folin-Ciocalteu ayracı (Sigma Aldrich, ABD) eklenmiş ve daha sonra 5 dak bekletilmiştir. Süre sonrasında karışıma 2 mL %7,5'lik Na₂CO₃ (Merck, Almanya) çözeltisi eklenerek, elde edilen yeni karışım vorteksle karıştırılıp 5 dak 50 °C'lik sıcak su banyosunda daha sonra da 10 dak karanlık ortamda bekletilmiştir. Spektrofotometrede (Thermo Scientific, Evolution 201, UV-

Visible Spectrophotometer, USA) 760 nm dalga boyunda yapılan okumalarda ölçülen absorbans değerleri kaydedilmiştir.



Şekil 3.12. Gallik asit standart çözeltileri ile elde edilmiş kurve

Standart gallik asit (Merck, Almanya) çözeltileriyle hazırlanan kurveden yararlanılarak miktar tayinleri yapılmıştır (Şekil 3.12). Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.6.4. Renk tayini

Örneklerin renk yoğunluğunun ölçümünde UltraScan-VIS Hunterlab (Sheet vd) renk ölçüm cihazı kullanılmıştır. Sonuçlar *L* (koyuluk-açıklık), *a* (yeşillik-kırmızılık), *b* (mavilik-sarıklık) renk parametreleri cinsinden ifade edilmiştir.

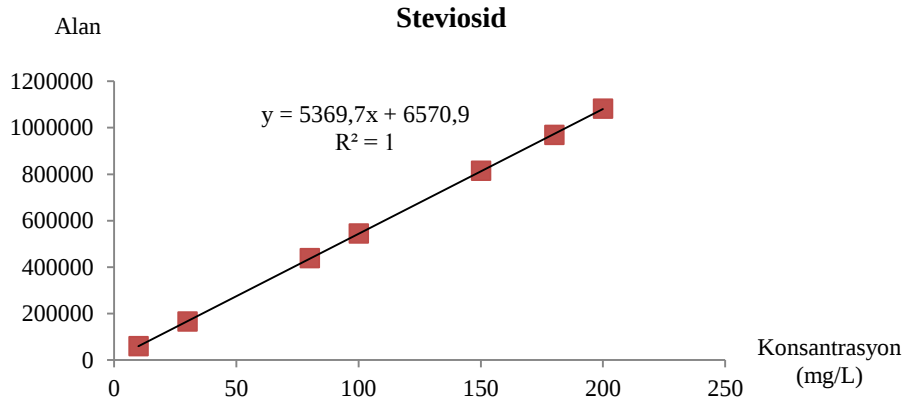
3.2.6.5. Transmittans

Örneklerin transmittans (% T) ölçümü spektrofotometrede (Thermo Scientific, Evolution 201, UV-Visible Spectrophotometer, USA) 660 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Krop ve Pilnik 1974).

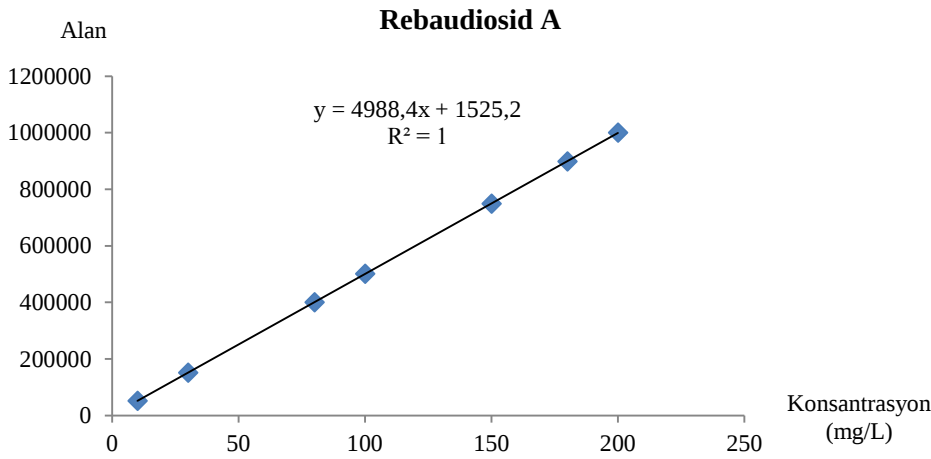
3.2.6.6. HPLC ile steviosid ve rebaudiosid A tayini

Örneklerde steviosid ve rebaudiosid A miktarları HPLC ile harici standart metodu kullanılarak izokratik koşullarda belirlenmiştir (WöLwer-Rieck vd 2010). Analizde Shimadzu marka HPLC cihazı (LC 20 AD), Nucleodur HILIC kolon (5 µm, 250 x 4.6 mm, ID) ve diode array dedektör sistemi (210 nm) ile birlikte kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril (HPLC saflığında, Merck, Almanya) ve HPLC grade su karışımı (86:14) kullanılmıştır. Hareketli faz akış hızı 0,8 mL/dak, örnek enjeksiyon hacmi 20 µL'dir. Örnekler mobil fazla belli oranda seyreltikten sonra 0,45 µm'lik filtreden süzülüp enjekte edilmiştir. Miktar tayini için hedef bileşenlerin saf standartlarından (Sigma Aldrich, ABD) farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak Şekil 3.13'de gösterilen kurveler elde edilmiştir. Doğrusal bir aralıkta elde edilen denklemler kullanılarak hedef bileşenlerin miktarları hesaplanmıştır.

(a)



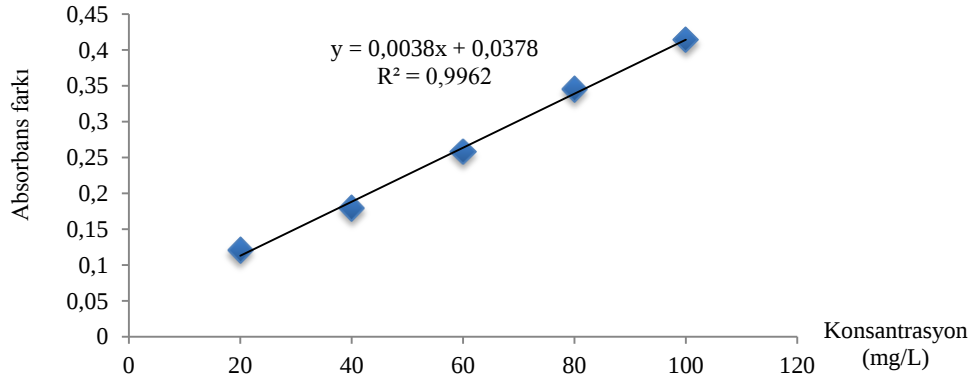
(b)



Şekil 3.13. Standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kurveler, a) steviosid, b) rebaudiosid A

3.2.6.7. Toplam antioksidan aktivite tayini

Elde edilen stevia ekstraktlarının antioksidan aktivite tayini spektrofotometrik olarak DPPH radikalinin (Sigma Aldrich, ABD) inhibisyonuna dayanan yöntemle gerçekleştirilmiştir (Fernández-León vd 2013). Bu amaçla ekstraktlar belli oranda seyreltildikten sonra 50 µL alınarak üzerine 950 µL taze hazırlanmış 60 µM DPPH çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dak bekletilmiştir. Ekstraktlara ilave edilen DPPH çözeltisinin absorbansı analiz süresinin başında 517 nm dalga boyunda saf metanole karşı ölçülerek kaydedilmiştir. 30 dakika sonunda örneklerin 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış ve DPPH çözeltisine göre absorbans farkları belirlenmiştir. Örneklerin antioksidan aktivitesi bu absorbans farkları kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış troloks (Sigma Aldrich, ABD) standartları ile elde edilen eğri yardımıyla (Şekil 3.14) hesaplanmış ve mg troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK)/L olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.14. Farklı konsantrasyonlarda trolox standartlarıyla elde edilen kurve

3.2.5.8. İstatistiksel analizler

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen tüm uygulamalar 2 tekerrürlü yapılmıştır. Analizler ise her tekerrürden 2 paralelli olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilk aşaması olan ekstraksiyon prosesinin koşullarını optimize etmek ve değişken parametrelerin hem bağımsız olarak hem de birbirleriyle interaksiyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu, Stat-Ease, Inc. tarafından hazırlanan Design-Expert® version 7 programında kullanılmıştır.

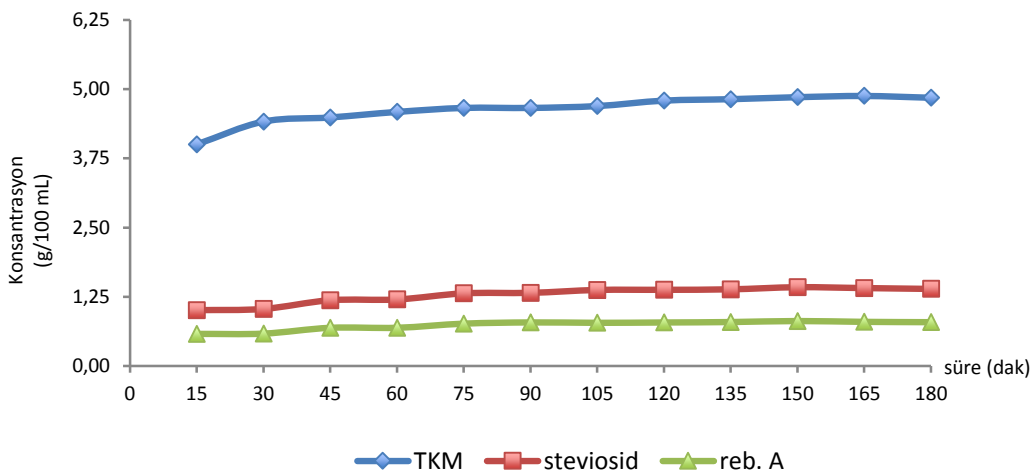
Çalışmanın diğer aşamalarında elde edilen sonuçlar varyans analizine ve önemli bulunan ana varyasyon kaynakları ortalamaları Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine tabi tutulmuştur. Varyasyon kaynaklarına ait ortalamaların karşılaştırılmasında Duncan Testi kullanılmıştır (Düzgüneş vd 1987). Değerlendirme SAS Institute, Inc. tarafından hazırlanan SAS Version 9.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Dekantör Ekstraksiyonunun Optimizasyonu

4.1.1. Ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi için yapılan ön denemeler

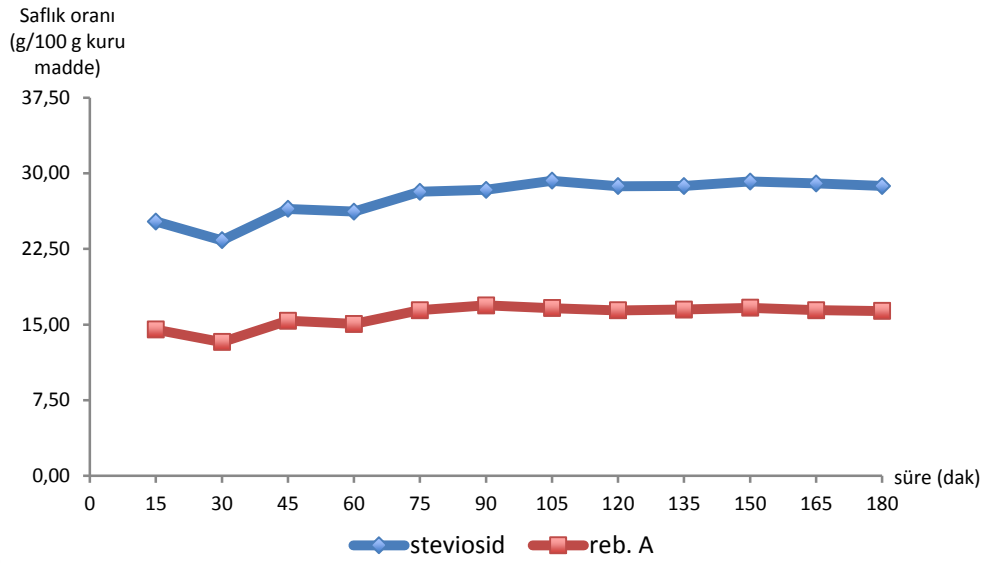
Ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesi için yapılan ön denemelerde ilk olarak çalkalamalı su banyosunda 25 °C’de bitki/su oranı 1/10 olacak şekilde 180 dak boyunca ekstraksiyon yapılmış 15 dak aralıklarla örnek alınıp örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları belirlenmiştir (Şekil 4.1). Bu verilerden hareketle, alınan örneklerde kuru ağırlık bazında stevisid ve rebaudiosid A miktarları, yani bu bileşenler açısından saflık düzeyleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.1. 1/10 bitki/su oranı, 25 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 15 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları

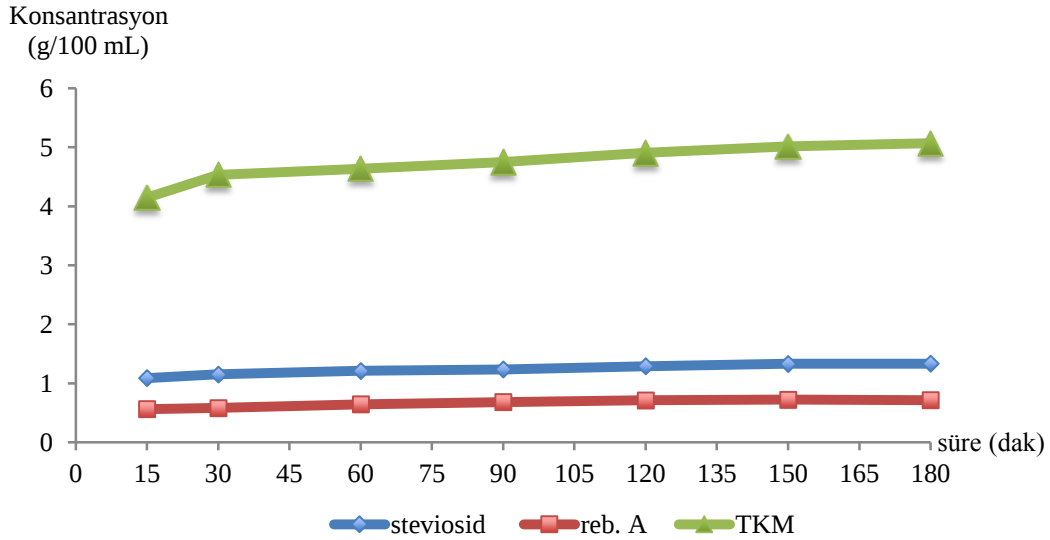
Şekil 4.1’den anlaşıldığı gibi 25 °C’de 1/10 bitki/su oranı kullanıldığında ekstraksiyon süresine bağlı olarak toplam kuru maddenin ekstrakta geçiş hızındaki artış daha fazlayken, steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin ekstrakta geçiş hızındaki artma eğilimi daha azdır. Bu durum steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin ekstraksiyon başlangıcından itibaren hızlı bir şekilde ekstrakte edilebildiğini ve ekstraksiyon süresinin artmasıyla ekstrakttaki miktarların önemli bir artış göstermediğini ortaya koymaktadır. Ekstrakta geçen toplam kuru madde zamana bağlı olarak daha hızlı bir artış gösterdiğinden ekstraktın hedef bileşenler açısından saflık oranının düzenli bir artış göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Bu denemenin devamında hem sıcaklığın hem de bitki/su oranının etkisini gözlemlemek adına 50 °C’de 1/10 ve 1/40 bitki/su oranı değerleri kullanılarak 180 dak süreyle 2 farklı ekstraksiyon denemesi daha gerçekleştirilmiş ve yine aynı şekilde değerlendirilmiştir.



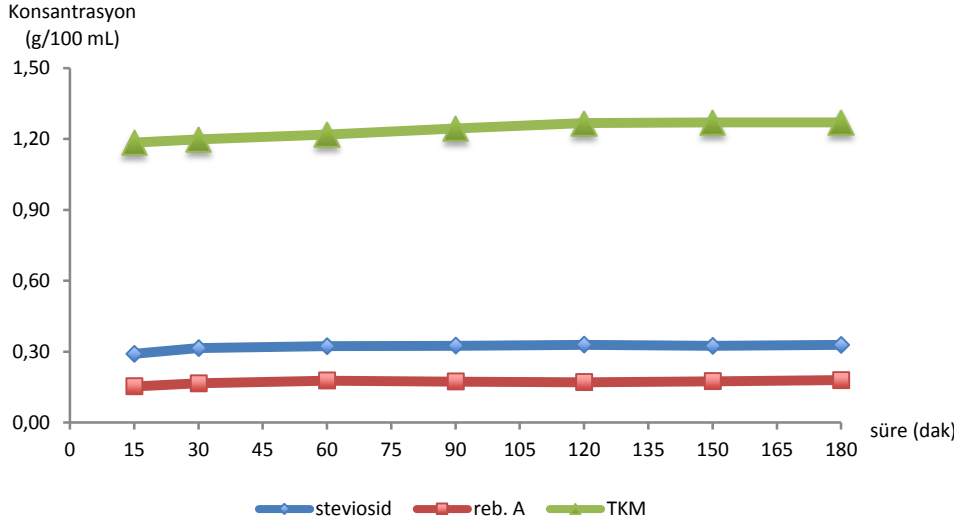
Şekil 4.2. 1/10 bitki/su oranı, 25 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 15 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri

Şekil 4.3' te gösterilen 1/10 bitki/su oranı değeri kullanılarak 25 °C ve 50 °C sıcaklıklarda yapılan ekstraksiyon denemeleri dikkate alındığında 50 °C'de süreye bağlı olarak ekstraktlara geçen toplam kuru madde, steviosid ve rebaudiosid A miktarlarının artış hızının 25 °C'dekine kıyasla azaldığı, yani sıcaklık artışıyla sürenin öneminin azaldığı düşünülmüştür.



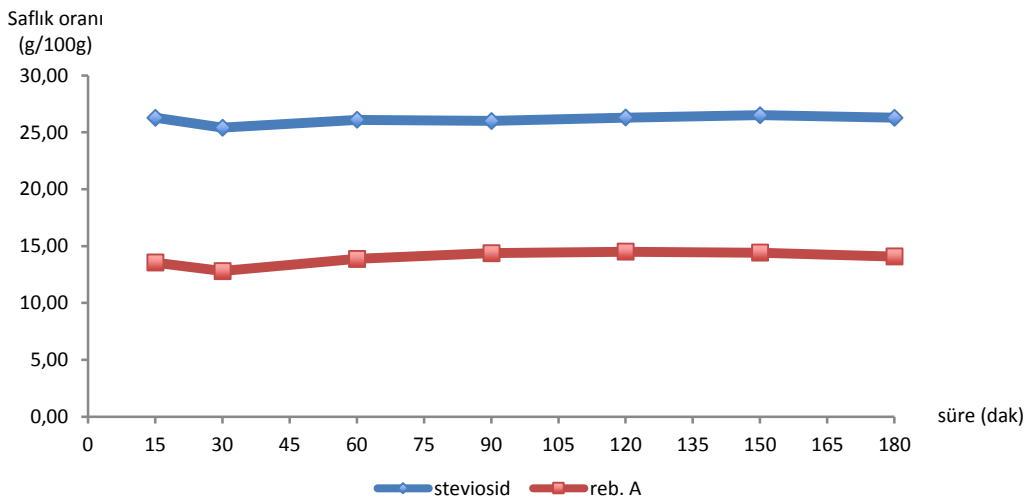
Şekil 4.3. 1/10 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları

Sabit sıcaklıkta (50 °C) farklı bitki/su oranı değerleri kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda çözücü miktarının artması yani bitki/su oranının azalması da yine sıcaklık artışına benzer bir etki yaratarak süreye bağlı madde miktarı değişimini azaltmıştır (Şekil 4.4).

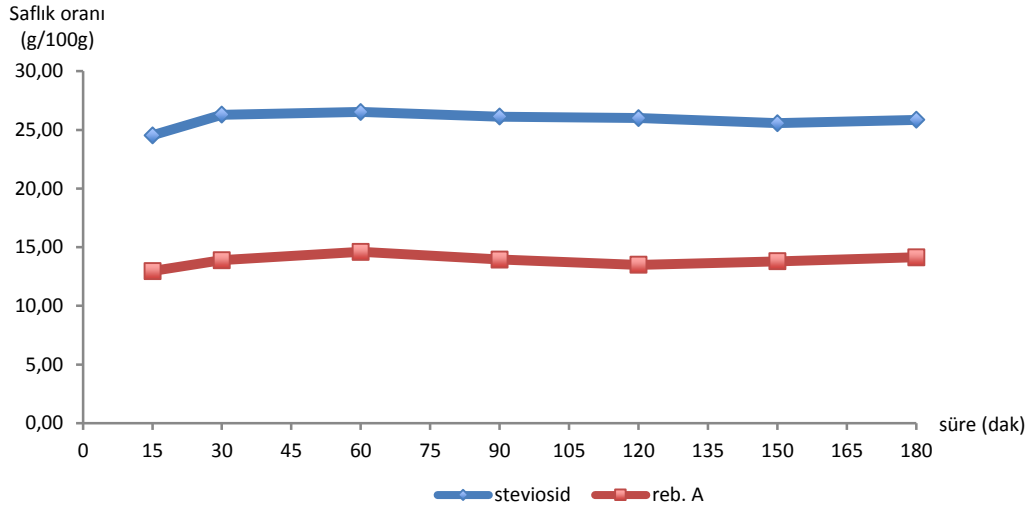


Şekil 4.4. 1/40 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve toplam kuru madde miktarları

Hedef bileşenler 25 °C sıcaklıkta bile kolay ekstrakte edilebilmektedir. Şekil 4.2 ve Şekil 4.5 incelendiğinde 25 °C'de yapılan ekstraksiyon denemesinde toplam kuru maddenin ekstraktlara geçiş miktarı 50 °C'dekinden daha az olduğundan hedef bileşenlerin saflık oranlarının 25 °C'de daha yüksek olduğu görülmüştür.



Şekil 4.5. 1/10 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri



Şekil 4.6. 1/40 bitki/su oranı, 50 °C sıcaklıkta 180 dak ekstraksiyon süresi boyunca 30 dak aralıklarla alınan örneklerin steviosid ve rebaudiosid A bakımından saflık düzeyleri

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6 incelendiğinde 50 °C ekstraksiyonun 15. dakikasından itibaren 30 dak aralıklarla alınan örneklerde çözücü miktarının artmasıyla hedef bileşenlerin saflık oranlarının değişiminin süre artışından neredeyse hiç etkilenmediği görülmüştür.

Yapılan tüm ön denemelerin sonucunda hedef bileşenlerin ekstraksiyonun toplam kuru maddeye kıyasla daha kısa sürede gerçekleşebildiği ve bundan dolayı ekstraksiyon süresinin gereğinden fazla uzamasının elde edilen ekstraktta bu bileşenlerin saflık oranlarını olumsuz etkileyebileceği öngörülmüştür. Ekstraksiyonda kullanılan yapraklar kurutulmuş olduğundan yaprakların ıslanması için çözücü miktarının en az yaprak miktarının 10 katı, en fazla ise 40 katı olacak şekilde seçilmesine karar verilmiştir.

4.1.2. Cevap yüzey metodu

CYM optimizasyon dizaynının değişkenleri sıcaklık, süre ve bitki/su oranı olarak belirlenmiştir. Hedef bileşenler parçalamanın etkisiyle kolaylıkla ekstraktta geçebildiğinden düşük sıcaklıklarda bu bileşenler açısından ekstraktın daha yüksek saflık düzeyinde olduğu bir optimum noktanın yakalanabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla sıcaklık değişkeninin minimum noktası 25 °C ve sıcaklık artışının etkisinin net olarak görülebilmesi için maksimum noktası ise 75 °C olarak seçilmiştir.

Box-Behnken Cevap Yüzey modelinde kullanılmış olan maksimum ve minimum parametreler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Cevap yüzey metodunun oluşturduğu şartlarda ekstraksiyon işlemleri iki tekerrürlü olacak şekilde (toplam 30 ekstraksiyon) gerçekleştirilmiştir. Tüm ekstraksiyon denemeleri çalkalamalı su banyosunda 100 devir/dak karıştırma hızı kullanılarak yürütülmüştür. Ekstraktların içerdiği steviosid ve rebaudiosid A miktarlarına göre optimum ekstraksiyon şartları belirlenecektir. Ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneme deseni Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Stevia ekstraksiyonunun optimizasyonu için cevap yüzey metodunda kullanılan parametreler

Değişken	Minumum	Orta Nokta	Maximum
Sıcaklık (°C)	25	50	75
Su/Bitki Oranı	10	25	40
Süre (dakika)	15	60	105

Çizelge 4.2. Stevia ekstraksiyonu için cevap yüzey metodunun oluşturduğu ekstraksiyon şartları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Su/Bitki Oranı
1	75	15	25
2	75	60	10
3	50	60	25
4	25	15	25
5	25	105	25
6	25	60	40
7	25	60	10
8	75	60	40
9	50	105	40
10	75	105	25
11	50	15	40
12	50	60	25
13	50	60	25
14	50	105	10
15	50	15	10

Cevap yüzey metodunun ortaya koyduğu şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinden elde edilen ekstraktlarda yapılan analizler sonucu ekstraktların içerdiği toplam kuru madde, steviosid ve rebaudiosid A miktarları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilerek ekstraksiyonda kuru madde bazında steviosid ve rebaudiosid A açısından saflık oranının en yüksek olduğu noktada deneme dizaynının ortaya koyduğu optimum koşullar belirlenmiştir.

4.1.3. Cevap yüzey metodunun belirlemiş olduğu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemeleri

Stevia yapraklarından çözücü olarak suyun kullanıldığı steviosid ve rebaudiosid A ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının Box-Behnken cevap yüzey metodu ile optimize edilmesi üzerine sıcaklık, süre ve bitki/su oranının etkisi incelenmiştir. Bu amaçla cevap yüzey metodunun oluşturmuş olduğu şartlarda ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3’de verilmiştir.

4.1.3.1. Sıcaklığın ekstraksiyon üzerine etkisi

Minumum (25 °C), maksimum (75 °C) olarak belirlenen ve cevap yüzey metodunun belirlediği orta değer (50 °C) olmak üzere üç farklı sıcaklıkta ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. 25, 50 ve 75 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinde ekstraktların içerdiği steviosid miktarları sırasıyla 2393-9085 mg/L, 2341-10196 mg/L ve 2529-10655 mg/L, rebaudiosid A miktarları sırasıyla 1711-6192 mg/L, 1716-6714 mg/L ve 1857-7271 mg/L, toplam kuru madde miktarları ise sırasıyla 11,00-41,88 g/L, 12,28-46,49 g/L ve 13,10-50,74 g/L aralığında değişim göstermiştir. Sıcaklığın etkisi, ekstraktın steviosid ve toplam kuru madde miktarları bakımından istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P<0,05$), rebaudiosid A miktarı bakımından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.3. Cevap yüzey metodunun oluşturmuş olduğu şartlarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinden elde edilen stevia ekstraktlarının steviosid, rebaudiosid A, toplam kuru madde miktarları ve steviosid, rebaudiosid A açısından saflık oranları

Sıra	Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Su/Bitki Oranı	Steviosid (mg/L)	Reb. A (mg/L)	Kuru madde (g/L)	Steviosid (g/100 g kuru madde)	Reb. A (g/100 g kuru madde)
1	50	105	10	10195,50	6713,58	46,49	21,93	14,44
2	50	105	40	2521,04	1840,35	12,47	20,22	14,76
3	50	15	40	2340,91	1716,27	12,28	19,06	13,98
4	75	105	25	4399,27	2902,89	21,89	20,10	13,26
5	25	105	25	3949,96	2725,55	17,46	22,62	15,61
6	50	60	25	4194,37	2894,51	19,70	21,29	14,69
7	25	60	10	9084,50	6192,37	41,88	21,69	14,79
8	75	60	10	10654,71	7270,78	50,74	21,00	14,33
9	50	15	10	8971,84	5782,10	41,77	21,48	13,84
10	75	60	40	2529,42	1856,75	13,10	19,32	14,18
11	25	15	25	3790,13	2539,22	16,93	22,39	15,00
12	50	60	25	4110,28	2632,25	19,39	21,20	13,58
13	75	15	25	4135,36	2740,72	19,62	21,08	13,97
14	25	60	40	2392,97	1711,14	11,00	21,75	15,56
15	50	60	25	4099,77	2758,07	19,58	20,94	14,09

25, 50 ve 75 °C sıcaklıklarda elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık oranı sırasıyla kuru maddede % 21,69-22,62, % 19,06-21,93, % 19,32-21,08 aralığında değişim göstermiştir. Sıcaklık, ekstrakttaki steviosidin saflık oranı açısından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Stevia bitkisinin 1/25 bitki/su oranında 25 °C ve 75 °C 15 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyonunda ekstrakta geçen steviosid miktarı açısından değerlendirildiğinde 25 °C’de 3790,13 mg/L, 75 °C’ de ise 4135,36 mg/L olarak belirlenmiştir. Ancak ekstrakta geçen toplam kuru madde miktarı sırasıyla 16,93 ve 19,62 g/L olarak belirlenmiştir. Sıcaklık artışının toplam kuru madde miktarı üzerine etkisi daha fazla olduğundan 25 °C ve 75 °C için ekstraktların steviosid açısından saflık oranları sırasıyla % 22,39 ve % 21,08 olarak hesaplanmıştır. 1/25 bitki su oranında 105 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyon denemeleri içinde benzer

sonuçlar gözlemlenmiştir. 25 °C’de ekstrakttaki steviosid konsantrasyonu 3949.96 mg/L olurken, 75 °C’de 4399.27 mg/L olmuştur. Toplam kuru madde miktarı ise 25 °C’de 17,46 g/L, 75 °C’de 21,89 g/L olarak bulunmuştur. Ekstraktlarda steviosidin saflık oranı hesaplandığında 25 °C sıcaklıkta elde edileninki % 22,62 olurken, 75 °C sıcaklıkta elde edileninki % 20,10 olmuştur. 1/10 ve 1/40 bitki/su oranlarında 60 dak süresince 25 °C ve 75 °C sıcaklıklarda yürütülen ekstraksiyon denemelerinde sıcaklıklar karşılaştırıldığında düşük sıcaklıkta ekstraktların saflık oranı daha yüksek bulunmuştur.

25, 50 ve 75 °C sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerinde ekstraktlardaki rebaudiosid A oranları sırasıyla kuru maddede % 14,79-15,61, % 13,58-14,69, % 13,26-14,33 aralığında değişim göstermiştir. Sıcaklık, ekstrakttaki rebaudiosid A’nın saflık oranını istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilemiştir ($P<0,05$). Çalışmada incelenen diğer bir steviol glikozid olan stevioside benzer olarak aynı bitki/su oranı ve süre koşullarında rebaudiosid A’nın da saflık oranı yüksek sıcaklıkta daha az olurken, düşük sıcaklıkta daha fazla olmuştur.

4.1.3.2. Sürenin ekstraksiyon üzerine etkisi

Katı-sıvı ekstraksiyonu katı haldeki matrikse nüfuz eden seçici bir çözgenin kütle transferi yoluyla katıdan istenen bileşen ya da bileşenleri çözmesi ve ayırması ile gerçekleşmektedir. Katı matrikse çözücü ilave edildiği zaman örnekteki bileşenler çözücüye difüze olmaya başlar ve iki faz arasında denge olduğundan kütle transferi yavaşlar ve zamanla durur. Sıcaklığın artışı bu süreyi kısaltan bir etmendir. 15, 60 ve 105 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda ekstraktların içerdiği steviosid miktarı sırasıyla 2341-8972 mg/L, 2393-10655 mg/L ve 2521-10196 mg/L, rebaudiosid A miktarı sırasıyla 1716-5902 mg/L, 1711-7271 mg/L ve 1760-6714 mg/L, toplam kuru madde miktarı sırasıyla 12,28-41,77 g/L, 11,00-50,74 g/L ve 12,47-46,49 aralığında değişim göstermiştir. Süre, ekstraktın steviosid ve toplam kuru madde miktarları üzerine istatistiksel olarak önemli düzeyde etkili bulunurken ($P<0,05$), rebaudiosid A miktarı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

15, 60 ve 105 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık oranı sırasıyla kuru maddede % 19,06-22,39, % 19,32-21,75, % 20,10-22,62, ekstraktlardaki rebaudiosid A oranları ise sırasıyla kuru maddede % 13,97-15,00, % 13,58-15,56, % 13,26-15,61 aralığında değişim göstermiştir.

25 °C sıcaklık, 1/25 bitki/su oranı koşullarında 15 dak ve 105 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda, ekstraksiyon süreleri kıyaslandığında 15 dakikada elde edilen ekstraktta steviosid ve rebaudiosid A’nın saflık düzeyi sırasıyla % 22,39 ve % 15,0 olurken 105 dakikada elde edilen ekstraktta bu değerler sırasıyla % 22,62 ve % 15,61 olmuştur. Aynı bitki/su oranında 75 °C’de ise 15 dak ekstraksiyon süresinde elde edilen ekstraktta steviosid ve rebaudiosid A’nın saflık düzeyi sırasıyla % 21,08 ve 13,97 iken, 105 dakikada bu değerler sırasıyla % 20,10 ve % 13,26 olarak belirlenmiştir. Denemede kullanılan en düşük sıcaklık değeri olan 25 °C’de ekstraksiyon süresinin artışı hedef bileşenlerin saflık düzeyini artırırken, 75 °C sıcaklıkta azalmasına neden olmuştur. Süre, hem steviosid hem de rebaudiosid A’nın saflık düzeyi açısından istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

4.1.3.3. Bitki/su oranının ekstraksiyon üzerine etkisi

Katı sıvı ekstraksiyonda bitki/su oranının azalması yani çözücü miktarının artması daha fazla maddenin çözülmesini sağladığından ekstraksiyonu olumlu yönde etkileyen değişkenlerden biridir.

1/10, 1/25 ve 1/40 gibi farklı bitki/su oranları kullanılarak yapılan ekstraksiyon denemeleri sonucu elde edilen ekstraktlarda steviosid miktarı sırasıyla 8972-10655 mg/L, 3790-4399 mg/L ve 2341-2529 mg/L, rebaudiosid A miktarı sırasıyla 5902-7271 mg/L, 2539-2902 mg/L ve 1711-1857 mg/L, toplam kuru madde miktarı ise sırasıyla 41,77-50,74 g/L, 16,93-21,89 g/L ve 11,00-13,10 g/L aralığında değişim göstermiştir.

Stevia yapraklarından steviosid ve rebaudiosid A'nın ekstraksiyonunda bitki/su oranındaki değişim steviosidin saflık düzeyi açısından istatistiksel olarak önemli bulunurken ($P<0,05$), rebaudiosid A'nın saflık düzeyi açısından önemli bulunmamıştır. 1/10, 1/25 ve 1/40 bitki/su oranlarında yürütülen ekstraksiyonlar sonucu elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık düzeyi sırasıyla kuru maddede % 21,00-21,93, % 20,10-22,62 ve % 19,06-21,75, rebaudiosid A'nın saflık düzeyi ise sırasıyla kuru maddede % 14,13-14,79, % 13,26-15,61 ve % 13,98-15,56 aralığında değişim göstermiştir.

4.1.3.4. Cevap yüzey metodunun modellenmesi

Stevia yapraklarından steviosid ve rebaudiosid A'nın ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bu çalışmada "Full Quadratic" cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Kullanılan modeldeki değişkenler; sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$), süre (dakika) ve bitki/su oranı olarak belirlenmiştir. "Design-Expert" programındaki Cevap Yüzey Metodu kullanılarak steviosidin (Çizelge 4.4) ve rebaudiosid A'nın (Çizelge 4.5) saflık oranları için geliştirilen regresyon eşitlikleri incelenmiştir.

Çizelge 4.4. Steviosidin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	21,14	0,0549
A	-0,87	0,0074*
B	0,11	0,6164
C	-0,72	0,0157*
AB	-0,31	0,3303
AC	-0,44	0,1843
BC	0,18	0,5629
A ²	0,34	0,3070
B ²	0,068	0,8276
C ²	-0,54	0,1269

* $P<0,05$

Regresyon analizi sonucu sıcaklık (A), süre (B) ve bitki/su oranı (C) faktörlerine bağlı olarak steviosidin saflık oranı (g/100 g kuru madde) için elde edilen ikinci dereceden polinom eşitlik Denklem 4.1'de verilmiştir.

Steviosid saflık oranı

$$= 21,14 - 0,87A + 0,11B - 0,72C - 0,31AB - 0,44AC + 0,18BC + 0,34A^2 + 0,068B^2 - 0,54C^2 \quad (4.1)$$

Bu modelin R^2 değeri 0,89 olarak belirlenmiştir. Bu da; örnek varyasyonlarının % 89'unun model tarafından tam temsil edildiği anlamına gelmektedir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri ise 0,0596 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği değerinin istatistiksel açıdan önemsiz olduğu görülmektedir. Ayrıca ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki/su oranı steviosidin saflık oranını istatistiksel olarak önemli seviyede ($P<0,05$) etkilemiştir (Çizelge 4.4).

Regresyon analizi sonucu sıcaklık (A), süre (B) ve bitki/su oranı (C) faktörlerine bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık oranı (g/100 g kuru madde) için elde edilen ikinci dereceden polinom eşitlik Denklem 4.2'de verilmiştir.

Rebaudiosid A saflık oranı

$$= 14,12 - 0,65A + 0,044B + 0,017C - 0,33AB - 0,23AC - 0,043BC + 0,44A^2 - 0,10B^2 + 0,15C^2 \quad (4.2)$$

Çizelge 4.5. Rebaudiosid A'nın saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

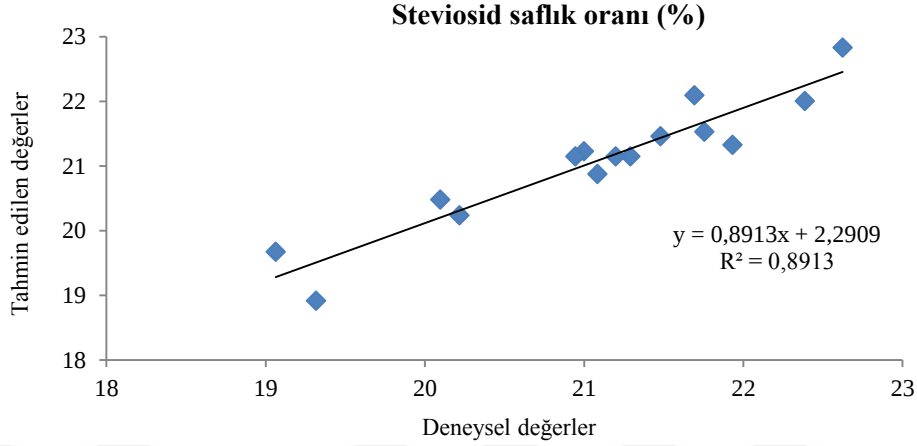
Terim	Katsayılar	P
Sabit	14,12	0,1672
A	-0,65	0,0114*
B	0,044	0,8037
C	0,017	0,9208
AB	-0,33	0,2193
AC	-0,23	0,3741
BC	-0,043	0,8631
A ²	0,44	0,1302
B ²	-0,10	0,6926
C ²	0,15	0,5698

* $P<0,05$

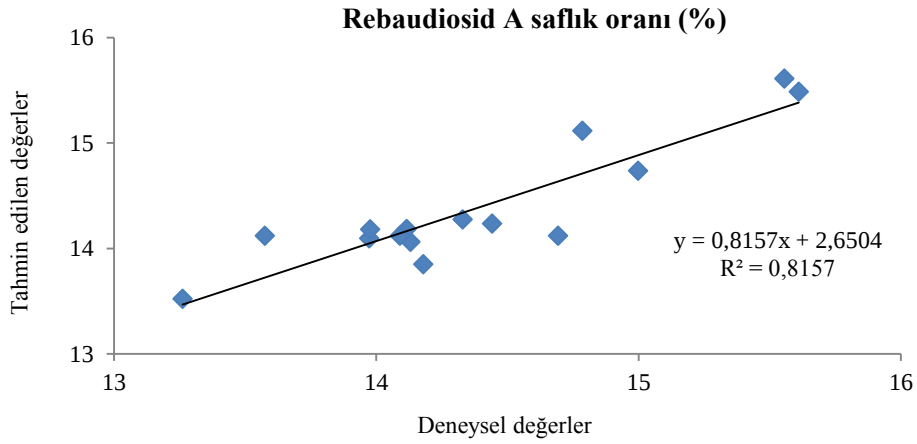
Rebaudiosid A'nın saflık oranı için modelin R^2 değeri 0,82 olarak belirlenmiştir. Buna göre örnek varyasyonlarının % 82'si model tarafından tam temsil edilmektedir. Modelin uyum eksikliği (lack of fit) değeri ise 0,7114 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği değerinin istatistiksel açıdan önemsiz ($P>0,05$) olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon sıcaklığının rebaudiosid A'nın saflık düzeyi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($P<0,05$) bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Cevap yüzey metodunun oluşturduğu deneme deseninde belirlenmiş olan koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda steviosidin saflık oranı için ulaşılan deneysel değerler ile Denklem 4.1'de verilen regresyon eşitliğine göre program tarafından tahmin edilen değerler arasındaki ilişki Şekil 4.7'de, rebaudiosid A'nın

saflık oranı için ulaşılan deneysel değerler ile Denklem 4.2’de verilen regresyon eşitliğine göre program tarafından tahmin edilen değerler arasındaki ilişki ise Şekil 4.8’de verilmiştir.

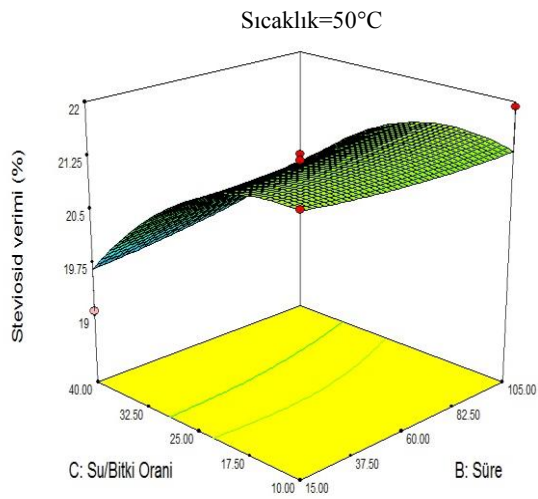
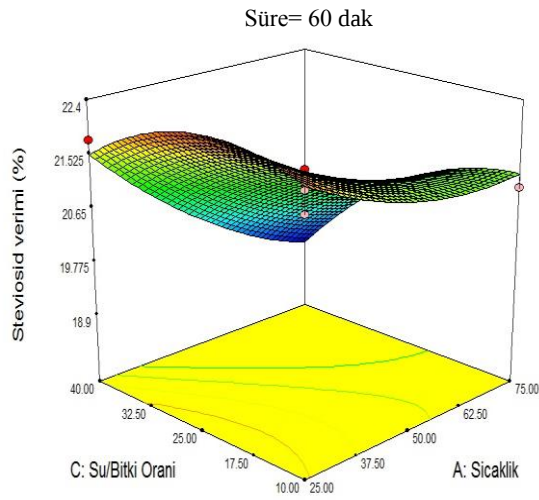
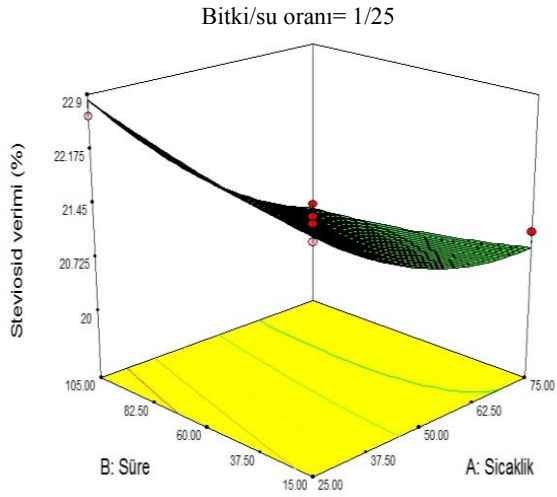


Şekil 4.7. Cevap yüzey yöntemi deneme desenine göre gerçekleştirilen stevia ekstraksiyonları sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosid saflık oranı değerleri

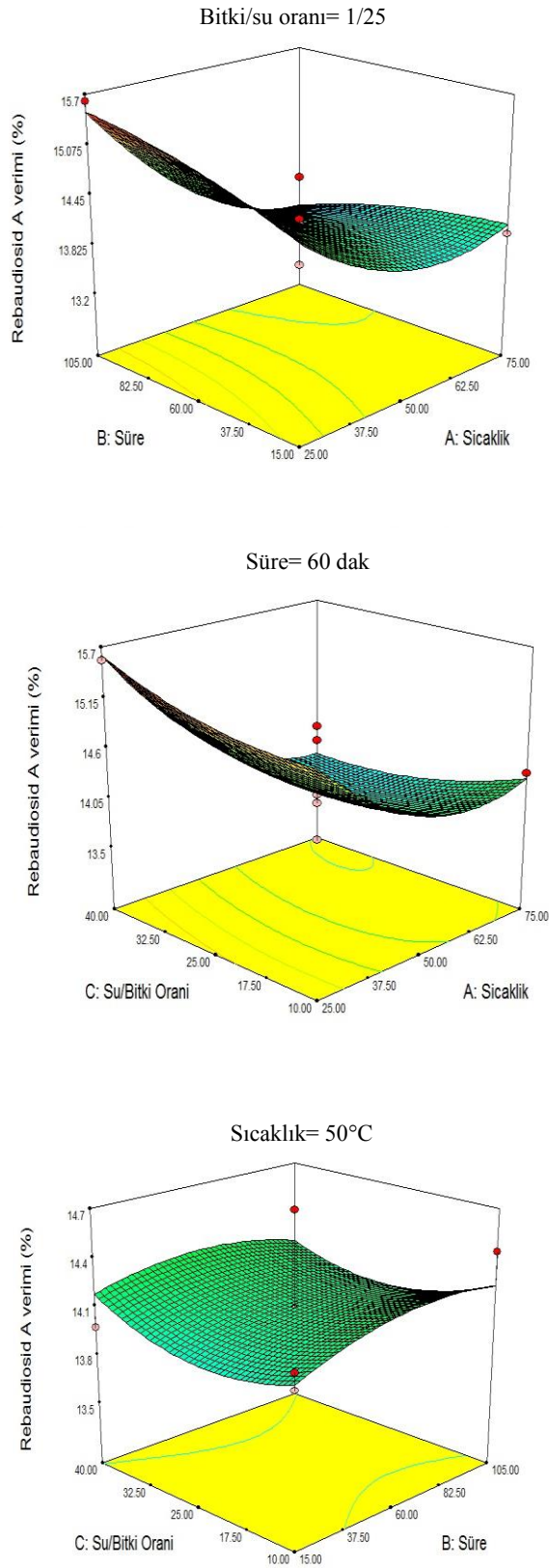


Şekil 4.8. Cevap yüzey yöntemi deneme desenine göre gerçekleştirilen stevia ekstraksiyonları sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen rebaudiosid A saflık oranı değerleri

Deneme desenine göre üç boyutlu cevap yüzey grafikleri Design-Expert programında çizilmiştir (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Grafiklerde, değişkenlerden biri merkez noktada sabit tutulurken, yanıtlar ile diğer iki değişken arasındaki ilişki incelenmiştir.



Şekil 4.9. Ekstraksiyonda steviosid saflık düzeyi değerine bağlı cevap yüzey grafikleri



Şekil 4.10. Ekstraksiyonda rebaudiosid A saflık düzeyi değerine bağlı cevap yüzey grafikleri

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere bitki/su oranının sabit olduğu orta noktada (1/25) steviosidin ekstrakttaki saflık düzeyi sıcaklık artışıyla azalırken, ekstraksiyon süresinin artışıyla artmaktadır. Sürenin orta noktada (60 dak) sabit tutulmasıyla elde edilen grafikte steviosidin saflık düzeyi sıcaklık artışıyla azalmış, su oranının artmasıyla (bitki/su oranının azalmasıyla) ise belli bir noktaya kadar artış göstermiş ardından azalmaya başlamıştır. Sıcaklığın 50 °C’de sabit tutulduğu grafikte ise steviosidin saflık düzeyi ekstraksiyon süresine bağlı olarak ciddi bir değişim göstermezken, su oranının artmasıyla (bitki/su oranının azalması) ekstrakttaki steviosidin saflık düzeyi azalmıştır.

Şekil 4.10’da rebaudiosid A’nın saflık düzeyi incelendiğinde bitki/su oranının sabit olduğu orta noktada (1/25) sıcaklığın artmasıyla belirgin azalmanın ardından sabitleme eğilimi görülmektedir. Sürenin sabit tutulduğu noktada ise (60 dak) sıcaklık artışı rebaudiosid A’nın saflık oranını azaltırken, bir önceki grafikte olduğu gibi belli bir sıcaklıktan sonra sabitleme eğilimi olmuştur. Ekstraksiyonda kullanılan su miktarının artması (bitki/su oranının azalması) ise rebaudiosid A’nın saflık oranını artırmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı için orta değer olan 50 °C’nin sabitlemesiyle elde edilen grafiğe bakıldığında hem süre hem de su oranındaki artış ekstraktın rebaudiosid A açısından saflık düzeyini artırmıştır.

Stevia ekstraksiyonu için mevcut çeşitli yöntemler arasında, herhangi bir kimyasal girdi kullanımı olmadığından, çözgen olarak suyun kullanıldığı ekstraksiyon prosesleri sağlık açısından daha güvenli olmaktadır. Das vd (2015a) rebaudiosid A ekstraksiyonu üzerine yaptıkları çalışmalarında çözgen olarak su kullanmışlardır. Denemeler 50-80 °C sıcaklık, 15-75 dak ekstraksiyon süresi, 2/100-5/100 bitki/su oranı değerleri arasında gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar, 70 °C’ye kadar olan sıcaklık artışının rebaudiosid A verimini artırırken, 70 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda muhtemel bir bozulma nedeniyle rebaudiosid A veriminin düştüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca çalışma kapsamında farklı sıcaklıklarda partiyon katsayısı değerleri de incelenmiş ve 70 °C’den sonra partiyon katsayısının azaldığı rapor edilmiştir. Bu durum steviosid ve rebaudiosid A polar yapıda olduklarından yüksek sıcaklıkta çözünürlüklerinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Aynı çalışmada bitki/su oranının azalması ve ekstraksiyon süresinin artmasıyla rebaudiosid A veriminin arttığı belirlenmiştir. Optimizasyon sonucu en yüksek (% 73,12) verim değerine 71 °C’de % 2,36 bitki/su oranı kullanılarak 51 dak ekstraksiyon süresinde ulaşılabileceği bildirilmiştir.

Afandi vd (2013) çözgen olarak etanol kullandıkları çalışma sonucunda rebaudiosid A ekstraksiyonu için optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğunu ifade etmişlerdir. 50 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda rebaudiosid A’nın muhtemel bir oksidasyon sonucu miktarının azaldığı ortaya konmuştur. Bunun yanında 40 °C’nin üzerindeki sıcaklıklarda istenmeyen bileşiklerin ekstrakta geçişinin artmasına bağlı olarak rebaudiosid A’nın saflık düzeyinde de azalma belirlenmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar 50 °C’de 1/15 bitki/su oranında gerçekleştirilen ekstraksiyonda 90 dak ekstraksiyon süresi sonunda rebaudiosid A veriminin maksimuma (2,24 g/100 g kuru yaprak) ulaştığını, artan sürenin verimi değiştirmediğini bildirmişlerdir.

Abou-Arab vd (2010) rebaudiosid A’nın sudaki çözünürlüğü steviosidin sudaki çözünürlüğünden fazla olduğundan ekstraksiyon için daha iyi bir ortam olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 65 °C ekstraksiyon sıcaklığında 1/15 ile 1/75

aralığında değişen farklı bitki/su oranları kullanmışlardır. Bitki/su oranı azaldıkça yani ekstraksiyonda kullanılan su miktarı arttıkça steviosid içeriğinde artış olurken, toplam çözünür kuru madde içeriğinde azalma olduğunu bildirmişlerdir. Steviosid içeriğinin maksimum (7,53 g/100 g yaprak) olduğu noktada optimum bitki/su oranı 1/35 olarak bulunurken, 1/75 bitki/su oranına kadar gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda steviosid içeriğindeki artışın önemli düzeyde olmadığı rapor edilmiştir.

Rai vd (2012) steviosid ekstraksiyonunun optimizasyonu için bitki/su oranı (1/5-1/20), süre (10-120 dak) ve sıcaklık (30-90 °C) kullandıkları çalışmalarında, optimum steviosid ekstraksiyonunun (10,45 g/100 g kuru yaprak) 78 °C sıcaklık, 56 dak ekstraksiyon süresi ve 1/14 bitki/su oranı koşullarında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ekstraksiyonda kullanılan su miktarı arttıkça yapraklardaki steviosidin daha fazlasının ekstrakte edilebildiği, ancak belli bir sınırın üzerinde su miktarındaki artışın ekstraksiyon verimini önemli düzeyde etkilemediği rapor edilmiştir.

4.1.3.5. Cevap yüzey metodu ile belirlenen optimum işlem koşulları

Cevap yüzey metodu kullanılarak optimum koşulların belirlenmesinde steviosid ve rebaudiosid A için saflık oranı değerleri kullanılmıştır. Bu amaçla cevap yüzey metodunun oluşturduğu deneme desenine göre yürütülen ekstraksiyon denemeleri sonucunda steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin saflık oranlarının maksimum olduğu optimum üretim koşulu Design-Expert programında belirlenmiştir. Model birden fazla optimum koşul belirlemiş ve bu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyonlar sonucu model tarafından tahmin edilen ve deneysel olarak elde edilen saflık oranı değerleri Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir. Programın belirlediği optimum koşullardan, istenilen hedefe ulaşma indeksi olarak bilinen d değeri (desirability) 0,9'un üzerinde olanlar seçilerek uygulanmıştır. Bu değer 0 ile 1 arasında değişmekte olup, 1 ideal koşulları, 0 ise yanıtın kabul edilebilir limitlerin dışında olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.6. Stevia için belirlenen optimum ekstraksiyon koşullarında steviosid ve rebaudiosid A için tahmin edilen ve gerçekleşen saflık oranı değerleri

Koşullar			Steviosid verimi (%)		Rebaudiosid A verimi (%)	
Sıcaklık (°C)	Süre (dak)	Bitki/su oranı	Tahmin edilen	Gerçekleşen	Tahmin edilen	Gerçekleşen
25	105	1/25,9	22,81	21,04	15,62	14,81
25	105	1/20,0	22,81	21,34	15,49	14,49
25	105	1/17,5	22,74	22,75	15,44	14,02
25	103	1/14,4	22,62	21,82	15,40	14,16
25	101	1/27,6	22,71	23,00	15,62	15,67

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde en yüksek steviosid ve rebaudiosid A saflık oranı değerlerine 25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi ve 1/27,6 bitki/su oranı koşullarında ulaşıldığı görülmektedir. Dekantör ekstraksiyonun ilk aşaması olan stevia yapraklarından tatlı bileşiklerin ekstraksiyonu için gerçekleştirilen denemeler sonrası elde edilen bu sonuç pilot ölçekteki dekantör sisteminde uygulanmış ve dekantasyon devir sayısının optimizasyonu bu sistemde yapılmıştır.

4.1.4. Dekantör ekstraksiyonu ve dekantör devir sayısı değişiminin ekstraksiyon üzerine etkisi

Optimizasyon çalışmasında elde edilen sonuçlara göre 25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi ve 1/27,6 bitki/su oranı koşullarında gerçekleştirilen dekantör ekstraksiyonunda 4500, 4900 ve 5280 devir/dak olmak üzere üç farklı devir hızında denemeler gerçekleştirilmiş olup devir hızının etkisi bu aşamada araştırılmıştır. Cihazın minimum çalışma devir hızı 4500 devir/dak, maksimum çalışma devir hızı ise 5280 devir/dak'dır. 4900 devir/dak'da bu iki değer ortalaması olduğundan tercih edilmiştir. İlk olarak sistemde ekstraksiyonun gerçekleştiği malaksör kısmına 7,25 kg kuru stevia yaprağı ve 200 L su beslenmiş ve belirlenen optimum koşullarda ekstraksiyon tamamlandıktan sonra dekantasyon aşamasında 4500, 4900 ve 5280 devir/dak devir hızlarında denemeler gerçekleştirilerek stevia ekstraktları elde edilmiştir.

Üç farklı devir hızında gerçekleştirilen denemelerden elde edilen ekstraktlarda TKM miktarı, steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonu ve bu bileşiklerin saflık oranı değerleri Çizelge 4.7'de, bu değerlere ait varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.8'de verilmiştir. Çizelge 4.8 incelendiğinde devir sayısının incelenen tüm parametreler üzerine oldukça önemli düzeyde etkisi olduğu görülmektedir ($P<0,01$).

Çizelge 4.7. Dekantör devir sayısına bağlı olarak stevia ekstraktlarının içerdiği steviosid, rebaudiosid A, toplam kuru madde miktarları ve hedef bileşenlerin saflık oranları

Devir sayısı (devir/dak)	G-kuvveti (g)	Steviosid (mg/L)	Rebaudiosid A (mg/L)	Toplam kuru madde (g/L)	Steviosid saflık oranı (%)	Reb. A saflık oranı (%)
4500	2264	1080.82 ^c ±14.59	761.34 ^c ±23.03	5.96 ^c ±0.13	18.15 ^c ±0.14	12.77 ^c ±0.11
4900	2684	1919.18 ^b ±12.77	1417.17 ^b ±13.82	9.83 ^b ±0.08	19.53 ^b ±0.28	14.43 ^b ±0.25
5280	3117	2507.35 ^a ±24.20	1801.93 ^a ±24.01	11.44 ^a ±0.03	21.92 ^a ±0.18	15.75 ^a ±0.17

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların $P<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Devir sayısının 4500, 4900 ve 5280 devir/dak (sırasıyla, 2264, 2684 ve 3117 g) olarak uygulandığı denemelerden elde edilen örneklerde steviosid miktarı sırasıyla 1080.82, 1919.18, 2507.35 mg/L, rebaudiosid A miktarı ise sırasıyla 761,34, 1417,17, 1801,93 mg/L olarak belirlenmiştir. Dekantör devir sayısındaki artışa bağlı olarak hedef bileşenlerin hem konsantrasyon hem de verim değerlerinde önemli düzeyde artış meydana gelmiştir ($P<0,05$).

Çizelge 4.8. Dekantör devir sayısına bağlı olarak stevia ekstraktlarının TKM miktarı, steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonu ve bu bileşiklerin saflık oranı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

	Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Steviosid	Devir sayısı	2	2055859,57	1603,17**
	Hata	9	1282,37	
Rebaudiosid A	Devir sayısı	2	1107309,22	639,81**
	Hata	9	1730,69	
Toplam kuru madde	Devir sayısı	2	31,73	1053,86**
	Hata	9	0,03	
Steviosid saflık oranı	Devir sayısı	2	14,55	85,55**
	Hata	9	0,17	
Rebaudiosid A saflık oranı	Devir sayısı	2	8,95	63,63**
	Hata	9	0,14	

(**), P<0.01 seviyesinde farklılık ifade eder.

Çalışmada kullanılan stevia yaprağının kuru madde miktarı % 94,72, kuru yaprağın içerdiği steviosid ve rebaudiosid A miktarları ise sırasıyla % 11,01 ve % 5,46 olarak belirlenmiştir. Yapılan denemelerde dekantasyon sonrası kalan posanın % 93,53 kuru madde içerdiği, ekstraktın katıdan başarılı bir şekilde ayrıldığı görülmüştür. Çalışma hızı 5280 devir/dak olduğunda elde edilen ekstraktta steviosidin saflık düzeyi % 21,92 olurken, rebaudiosid A'nın saflık düzeyi % 15,75 olmuştur. Dekantörde hedef steviol glikozidler açısından verim değeri yaklaşık % 73,1 olarak belirlenmiştir. 100 g kuru yapraktan elde edilen steviol glikozid miktarı ise 12,04 g olarak hesaplanmıştır.

Liu vd (2010) yaptıkları çalışmada kullandıkları kuru stevia yaprağının steviosid ve rebaudiosid A miktarlarını sırasıyla % 16,4 ve % 12,1 olmak üzere toplam % 28,5 oranında steviol glikozid içerdiğini bildirmişlerdir. Stevia yaprağının ultrasonikasyon destekli ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada optimum ekstraksiyon parametreleri 68 °C sıcaklık, 60 W sonikasyon gücü ve 32 dak ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen ekstraktta toplam steviol glikozid verimi 16,90 g/100 g kuru yaprak olarak rapor edilmiştir. Bu sonuç başlangıç steviol glikozid içeriğine oranlandığında optimum ekstraksiyon koşullarında elde edilen verim ancak % 59,3'e ulaşabilmiştir.

Erkucuk vd (2009) süperkritik akışkan ekstraksiyonu metoduyla stevia yapraklarının ekstraksiyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında optimum şartlarda steviosid ve rebaudiosid A verimlerini sırasıyla 41,10 mg/g kuru yaprak ve 18,80 mg/g kuru yaprak olarak bildirmişlerdir.

Yildiz-Ozturk vd (2014) steviol glikozidlerin ekstraksiyonunu subkritik su ekstraksiyonu ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında kuru stevia yaprağından 38,64 mg/g steviosid, 35,68 mg/g rebaudiosid A olmak üzere toplam 74,35 mg/g steviol glikozid verimine ulaştıklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar yaptıkları başka bir çalışmada

ise steviol glikozidlerin mikrodalga ve ultrasonik destekli ekstraksiyonlarını gerçekleştirmiş ve her iki proses için optimum koşullarda sırasıyla 21,21 mg/g kuru yaprak ve 14,90 mg/g kuru yaprak düzeyinde steviol glikozid verimi rapor etmişlerdir (Yildiz-Ozturk vd 2015).

Teo vd (2009) çalışmalarında stevia yapraklarının basınçlı sıcak su ve mikrodalga destekli ekstraksiyonlarını araştırmışlardır. Basınçlı sıcak su ekstraksiyonundan elde edilen en yüksek verim değerleri 1,45 g steviosid/100 g ve 1,44g rebaudiosid A/100 g kuru yaprak olurken, mikrodalga destekli ekstraksiyonda en yüksek verim 2,14 g steviosid/100 g ve 2,08 g rebaudiosid A/100 g olduğu bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada stevia yapraklarının mikrodalga destekli ve ultrases destekli ekstraksiyonları karşılaştırılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda toplam steviol glikozid verimi 10,98 g/100 g kuru yaprak olurken, ultrases destekli ekstraksiyonda bu değer 6,18 g/100 g kuru yaprak olarak bildirilmiştir (Jaitak vd 2009).

Literatürde steviol glikozidlerin gelişmiş ekstraksiyon teknikleri kullanılarak elde edilmesine yönelik yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında, bu çalışmada gerçekleştirilen dekantör ekstraksiyonu ile yapraklarda bulunan hedef steviol glikozidlerin % 73'ünün ekstrakte edilebildiği ve 12,04 g/100 g kuru yaprak düzeyinde toplam steviol glikozid veriminin elde edildiği, bu açıdan dekantör ekstraksiyonunun endüstriyel üretime uygun ve çevre dostu bir yöntem olduğu görülmektedir.

Çalışmanın bundan sonraki basamaklarına istatistiksel olarak hedef bileşenlerin en yüksek saflıkta bulunduğu 5280 devir/dak çalışma hızında elde edilen ekstraktla devam edilmiştir. Bu ekstraktın TFM miktarı, antioksidan kapasitesi, berraklık düzeyi ve renk değerleri Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Dekantörden 5280 devir/dak devir hızında elde edilen stevia ekstraktının bazı fizikokimyasal özellikleri

TFM (mg/L)	TEAK (mg/L)	Transmittans (%)	Renk		
			<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
1144,03±26,41	1915,79±40,56	6,13±0,13	0,25±0,01	0,55±0,01	0,33±0,03

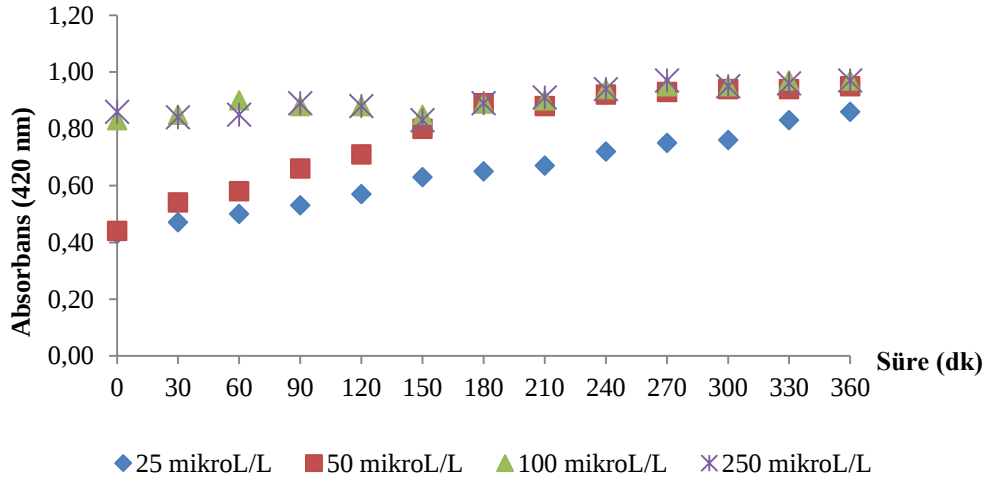
4.2. Lakkaz ve PVPP Uygulamalarının Dekantör Ekstraktının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Dekantörde optimum ekstraksiyon koşullarında (25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi, 1/27.6 bitki/su oranı ve 5280 devir/dak çalışma hızı) elde edilen ekstrakta yalnızca sıcak durultma ve sıcak durultmaya ilaveten lakkaz enzimi ilave edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda PVPP uygulamasıyla denemeler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucu ulaşılan veriler değerlendirilerek uygulanan PVPP konsantrasyonunun incelenen fiziksel ya da kimyasal parametreler üzerine etkisi belirlenmiştir.

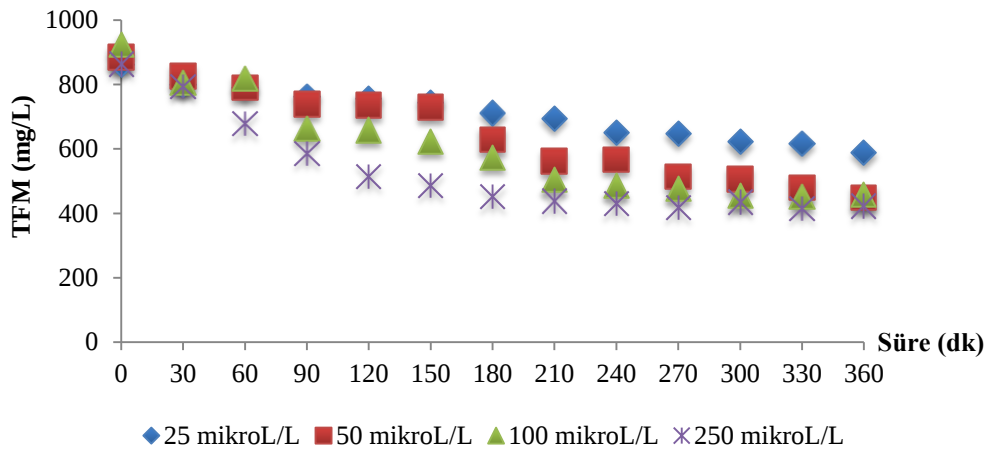
4.2.1. Lakkaz enziminin uygulama koşullarının belirlenmesi

Ekstrakta ilave edilen lakkaz enziminin miktarı ve uygulama süresi ön denemelerle belirlenmiştir. Enzim uygulaması ekstraktın içerdiği fenolik bileşiklerin oksidasyonu ve polikondensasyonunu sağladığından enzim miktarı ve uygulama süresi optimize edilirken belli zaman aralıklarında alınan örneklerde rengin koyulaşmasına bağlı olarak 420 nm’de ölçülen absorbans değerindeki artma (Şekil 4.11) ve örneklerin toplam fenolik madde içeriğindeki azalma (Şekil 4.12) takip edilerek optimum uygulama koşulları belirlenmiştir.

Şekil 4.11 incelendiğinde 100 $\mu\text{L/L}$ ve 250 $\mu\text{L/L}$ dozajlarında enzim uygulamasının 420 nm’de belirlenen absorbans değerini hızlı bir şekilde artırdığı ve uygulamanın 4. saatinden itibaren 50, 100 ve 250 $\mu\text{L/L}$ enzim uygulamalarının verdiği absorbans değerlerin aynı seviyeye ulaşp sabitlenmeye başladığı görülmektedir. Zamana bağlı olarak TFM miktarındaki değişime bakıldığında 100 $\mu\text{L/L}$ ve 250 $\mu\text{L/L}$ dozajında enzim uygulanan örneklerin TFM miktarları 4 saat süre sonunda neredeyse aynı seviyeye ulaşmış ve 6 saate kadar sabit kalmıştır (Şekil 4.12). Bu sonuçlar dikkate alındığında uygulanan enzim miktarını 250 $\mu\text{L/L}$ ’ye çıkarmanın anlamlı bir etkisinin olmadığı; 100 $\mu\text{L/L}$ dozajında lakkazın 4 saat süreyle uygulanmasının yeterli olduğu düşünülerek çalışmanın ana işlem basamaklarında enzim uygulama miktarı ve süresi bu şekilde esas alınmıştır.



Şekil 4.11. Lakkaz uygulanmış stevia ekstraktının 420 nm’de ölçülen absorbans değerinde zamana bağlı gerçekleşen değişim



Şekil 4.12. Lakkaz uygulanmış stevia ekstraktının TFM içeriğinde zamana bağlı gerçekleşen değişim

4.2.2. PVPP uygulamasının ekstraktlarda toplam kuru madde (TKM) miktarı üzerine etkisi

Dekantörden elde edildikten sonra ön temizleme amacıyla durultma uygulanmış stevia ekstraktının bir kısmına lakkaz enzimi uygulanıp, bir kısmına uygulanmadan % 0,1, 0,5, 1 ve 2 oranlarında PVPP ile muamele edilmiştir. Yapılan uygulamalardan elde edilen örneklerde belirlenen toplam kuru madde miktarları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Buna göre lakkaz uygulanmamış örneklerde toplam kuru madde miktarı 8,62-10,60 g/L arasında değişirken lakkaz uygulanmış örneklerde ise 8,97-10,41 g/L arasında değişmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının içerdiği toplam kuru madde miktarları

Uygulama	PVPP dozajı (%)	Toplam kuru madde (g/L)
Durultma	0	10,60 ^a ±0,16
	0,1	9,79 ^c ±0,13
	0,5	9,27 ^d ±0,05
	1	8,84 ^{ef} ±0,11
	2	8,62 ^f ±0,13
Durultma+Lakkaz	0	10,41 ^{ba} ±0,13
	0,1	10,19 ^b ±0,08
	0,5	9,59 ^c ±0,09
	1	9,13 ^{ed} ±0,02
	2	8,97 ^{ed} ±0,07

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Toplam kuru madde miktarının lakkaz enzimi uygulaması ve kullanılan PVPP dozajına göre değişiminin istatistiki olarak incelendiği varyans analizi sonuçları Çizelge 4.11’de, Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.12’de verilmiştir. Varyans analizi sonucu her iki faktörün etkisi de önemli ($P<0,01$) bulunurken, bu iki faktörün ikili interaksyonunun toplam kuru madde miktarındaki değişimi önemli seviyede etkilemediği belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.12 incelendiğinde ise durultma sonrası lakkaz enzimi kullanılmasının örnek grubunun toplam kuru madde içeriği üzerine önemli ($P<0,05$) düzeyde etkisi olduğu görülmektedir. Kontrol grubunda toplam kuru madde miktarı 9,42 g/L iken, lakkaz uygulanmış örnek grubunda 9,66 g/L olmuştur. Artan dozajlarda PVPP uygulamasının da örnek gruplarının toplam kuru madde düzeyinin önemli seviyede azalmasına neden olduğu görülmektedir. PVPP ile muamele edilmemiş kontrol grubunda toplam kuru madde miktarı ortalaması en yüksek (10,50 g/L), % 2 oranında PVPP ile muamele edilmiş örnek grubunun ki en düşüktür (8,79 g/L).

Çizelge 4.11. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak TKM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	0,57	12,31**
PVPP dozajı (D)	4	3,99	86,84**
Y x D	4	0,11	2,5

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.12. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak TKM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	9,42 ^a ±0,17	9,66 ^b ±0,13			
PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
	10,50 ^a ±0,10	9,99 ^b ±0,11	9,43 ^c ±0,08	8,98 ^d ±0,08	8,79 ^d ±0,09

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

4.2.3. PVPP uygulamasının ekstraktlarda steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin saflık düzeylerine etkisi

Yalnızca durultma ve hem durultma hem de lakkaz uygulanmış ekstraktlarda adsorban olarak dört farklı oranda (% 0,1, % 0,5, % 1 ve % 2) PVPP kullanıldıktan sonra elde edilen steviosid ve rebaudiosid A miktarları ve bu veriler kullanılarak hesaplanmış olan hedef bileşenlerin saflık düzeylerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.13 incelendiğinde yapılan uygulamaların hem kontrol grubunda hem de lakkaz uygulanmış örnek grubunda steviosid ve rebaudiosid A miktarlarını azalttığı görülmektedir. Steviosid ve rebaudiosid A'nın kuru madde bazında saflık oranlarının ise kontrol örneğinde % 0,1, 0,5, 1 ve 2 oranlarında PVPP uygulamalarıyla giderek arttığı belirlenmiştir. Lakkaz enziminin uygulandığı örnekte de benzer şekilde PVPP ile muamele edilmiş örneklerde kontrole göre artış belirlenmiştir. PVPP dozajının artışı % 2'ye kadar hedef bileşenlerin saflık düzeyini artırmıştır. Daha önce toplam kuru madde miktarındaki değişimin tartışıldığı kısımda değinildiği üzere toplam kuru madde miktarı, steviosid ve rebaudiosid A miktarlarına göre daha fazla değişim gösterdiğinden ekstraktın hedef bileşenler açısından saflık düzeylerinin oransal olarak arttığı görülmektedir. Hedef bileşenler açısından en yüksek saflıktaki ekstrakt durultma sonrası % 2 oranında PVPP uygulamasıyla elde edilmiştir.

Çizelge 4.13. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının içerdiği steviosid, rebaudiosid A miktarları ve bu bileşenlerin saflık oranları

Uygulama	PVPP dozajı (%)	Steviosid (mg/L)	Rebaudiosid A (mg/L)	Steviosid saflık oranı (%)	Rebaudiosid A saflık oranı (%)
Durultma	0	2384,59 ^a ±30,61	1671,56 ^a ±8,66	22,53 ^{bac} ±0,56	15,79 ^b ±0,28
	0,1	2206,31 ^b ±34,42	1655,02 ^b ±43,86	22,56 ^{bac} ±0,37	16,92 ^{ba} ±0,45
	0,5	2156,62 ^{cb} ±23,51	1611,63 ^{bac} ±41,12	23,27 ^{ba} ±0,23	17,39 ^a ±0,45
	1	2075,74 ^{cbd} ±35,50	1557,78 ^{bac} ±45,13	23,50 ^a ±0,23	17,63 ^a ±0,35
	2	2036,73 ^{cd} ±7,68	1522,47 ^{bc} ±7,69	23,64 ^a ±0,28	17,67 ^a ±0,19
Durultma+ Lakkaz	0	2062,78 ^{cbd} ±84,58	1537,08 ^{bac} ±67,63	19,82 ^d ±0,77	14,77 ^c ±0,59
	0,1	1995,37 ^{cd} ±28,13	1506,31 ^c ±31,92	19,59 ^d ±0,31	14,79 ^c ±0,33
	0,5	2022,07 ^{cd} ±52,56	1497,76 ^c ±39,90	21,08 ^{dc} ±0,61	15,62 ^{bc} ±0,45
	1	1973,71 ^d ±82,06	1496,60 ^c ±55,78	21,62 ^{bc} ±0,87	16,39 ^{ba} ±0,59
	2	1979,54 ^d ±63,45	1507,44 ^c ±55,26	22,06 ^{bac} ±0,71	16,80 ^{ba} ±0,61

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Dekantör ekstraktının yapılan iki farklı uygulama sonrası farklı oranlarda PVPP ile muamelesi sonucu elde edilen örneklerde steviosid miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.14'de, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4.14 incelendiğinde steviosid konsantrasyonu üzerine yöntem (P<0,01) ve PVPP dozajı (P<0,05) faktörlerinin etkisi önemli bulunurken, bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunmamıştır.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre PVPP ile muamele öncesi farklı uygulamalar yapılmış ekstraktların steviosid konsantrasyonları birbirinden önemli düzeyde (P<0,05) farklı bulunmuş ve sadece durultma yapılmış örnek grubunun steviosid konsantrasyonu (2172,00 mg/L) daha yüksek olmuştur. PVPP uygulanmamış ve farklı dozajlarda PVPP uygulanmış örnek grupları kıyaslandığında PVPP

uygulamasının örneklerin steviosid miktarında önemli seviyede ($P<0,05$) azalmaya neden olduğu görülmektedir. Ancak uygulanan farklı PVPP dozajlarının örneklerin steviosid miktarını istatistiki olarak önemli seviyede değiştirmedeği belirlenmiştir (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	273260,74	26,83**
PVPP dozajı (D)	4	57900,12	5,69*
Y x D	4	21609,16	2,12

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder; (*), $P<0,05$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.15. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	2172,00 ^a ±30,12	2006,69 ^b ±27,09			
PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
	2223,68 ^a ±73,71	2100,84 ^b ±44,86	2089,34 ^b ±36,84	2024,73 ^b ±45,66	2008,13 ^b ±31,49

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Örneklerin rebaudiosid A miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.16’da, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.17’de verilmiştir. Çizelge 4.16 incelendiğinde rebaudiosid A konsantrasyonu üzerine yöntem faktörünün etkisi istatistiki olarak önemli ($P<0,01$) bulunurken, PVPP dozajı faktörü ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.16. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	89601,37	11,71**
PVPP dozajı (D)	4	10917,72	1,43
Y x D	4	6169,09	0,81

(**), $P<0.01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.17. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarının PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	1603,79 ^a ±18,74	1509,04 ^b ±20,81			
PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
	1604,32 ^a ±40,52	1580,67 ^a ±37,69	1554,69 ^a ±34,15	1527,19 ^a ±35,17	1514,96 ^a ±25,98

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0.05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre sadece durultma uygulanmış ve durultma işlemine ek olarak lakkaz uygulanmış örnek gruplarının rebaudiosid A konsantrasyonları arasındaki fark önemli ($P < 0.05$) bulunmuştur. Durultma sonrası elde edilen örnek grubunda ortalama 1603,79 mg/L olan rebaudiosid A konsantrasyonu, lakkaz enziminin kullanıldığı örnek grubunda azalarak ortalama 1509,04 mg/L' ye düşmüştür. PVPP ile muamelenin etkisi değerlendirildiğinde ise PVPP uygulanmamış ve farklı dozajlarda PVPP uygulanmış örneklerin rebaudiosid A konsantrasyonlarının istatistiki olarak önemli seviyede değişmediği tespit edilmiştir.

Örneklerde steviosidin saflık düzeyleri değerlerine ait varyans analizi sonuçları ve bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları sırasıyla Çizelge 4.18 ve Çizelge 4.19'da verilmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre dekantör ekstraktına PVPP öncesi durultma ve durultma sonrası lakkaz enzimi uygulamalarını içeren yöntem faktörünün etkisi önemli ($P < 0,01$) bulunurken, PVPP dozajı faktörü ve iki faktörün ikili interaksiyonun etkileri önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.18. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	51,23	42,88**
PVPP dozajı (D)	4	5,19	4,34
Y x D	4	0,65	0,55

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.19. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	23,10 ^a ±0,18	20,83 ^b ±0,35			
PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
	21,17 ^b ±0,68	21,08 ^b ±0,60	22,18 ^{ba} ±0,52	22,55 ^a ±0,55	22,85 ^a ±0,47

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Dekantör ekstraktında lakkaz enzimi kullanılmadan sadece durultma işleminin yapıldığı örnek grubunda steviosidin saflık düzeyi ortalamasının (% 23,10) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra PVPP uygulama dozajının artmasıyla örnek gruplarının steviosid açısından saflık düzeylerinin ortalamaları da artmaktadır (Çizelge 4.19).

Örneklerde rebaudiosid A' nın saflık düzeyleri değerlerine ait varyans analizi sonuçları incelendiğinde durultma ve durultma sonrası lakkaz enzimi uygulamalarını içeren yöntem faktörünün etkisi önemli ($P<0,01$) bulunurken, PVPP dozajı faktörünün ve iki faktörün ikili interaksiyonun etkisi önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.20).

Sadece durultma ve durultmanın ardından lakkaz uygulanmış örnek grupları arasında önemli düzeyde fark bulunurken, lakkaz uygulanmayan örnek grubunda (%17,08) rebaudiosid A' nın saflık düzeyi ortalaması daha yüksek olmuştur. PVPP uygulaması rebaudiosid A' nın saflık düzeyini artırırken, en yüksek ortalama % 2 oranında PVPP uygulanmış örnek grubunda (%17,23) ulaşılmıştır (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.20. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A' nın saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	19,78	24,44**
PVPP dozajı (D)	4	5,26	6,5
Y x D	4	0,55	0,68

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.21. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	17,08 ^a ±0,21	15,67 ^b ±0,28			
PVPP	0	0,1	0,5	1	2
dozajı	15,28 ^c ±0,36	15,86 ^{bc} ±0,48	16,50 ^{ba} ±0,45	17,01 ^a ±0,39	17,23 ^a ±0,34

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

4.2.4. PVPP uygulamasının ekstraktlarda toplam fenolik madde miktarı (TFM) üzerine etkisi

Örneklerin TFM miktarına ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.22'de, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.23'de verilmiştir. Çizelge 4.22 incelendiğinde tek başına durultma ve durultma ardından lakkaz uygulamalarının, kullanılan PVPP dozajlarının bunların ikili interaksiyonunun stevia ekstraktlarının TFM miktarı üzerinde oldukça önemli seviyede ($P<0,01$) etkisinin olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.22. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TFM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	1206700,85	3404,91**
PVPP dozajı (D)	4	364217,12	1027,7**
Y x D	4	23432,33	66,12**

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Örneklerin TFM miktarları ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları incelendiğinde durultmanın ardından lakkaz enzimi uygulanan örneklerin (317,76 mg/L) ve filtre yardımcı maddesi olarak kullanılan PVPP dozajının % 2 olduğu örneklerin (282,90 mg/L) TFM miktarı ortalamalarının diğerlerine göre daha düşük olduğu görülmektedir.

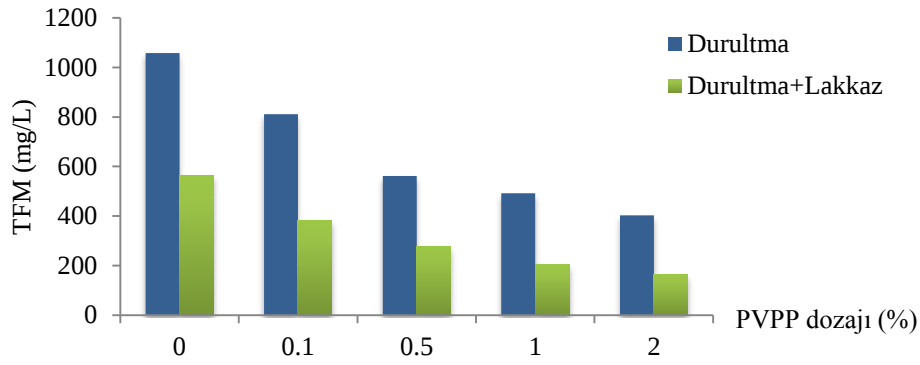
Çizelge 4.23. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	665,14 ^a ±54,92	317,76 ^b ±33,05			
	0	0,1	0,5	1	2
PVPP dozajı	809,88 ^a ±93,98	597,67 ^b ±80,99	419,33 ^c ±53,81	347,46 ^d ±54,96	282,90 ^e ±45,86

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Dekantör ekstraktına sadece durultma ve durultma sonrası lakkaz enzimi uygulanan örneklerin TFM içerikleri önemli düzeyde birbirinden farklı bulunurken ($P < 0,05$), farklı dozajlarda PVPP ile muamale edilen örneklerin TFM içerikleri üzerine etkisi de istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P < 0,05$) (Çizelge 4.23).

Dekantörden elde edilen stevia ekstraktına sadece durultma ve durultma ardından lakkaz enzimi uygulanan ekstraktlarda farklı dozajlarda (% 0,1, % 0,5, % 1 ve % 2) PVPP uygulamaları sonucu toplam fenolik madde miktarındaki değişim Şekil 4.13’de gösterilmiştir. Dekantör ekstraktına durultma işlemi yapıldıktan sonra PVPP uygulanmamış ve % 0,1, % 0,5, % 1, % 2 oranlarında PVPP uygulanmış örneklerin TFM içeriği sırasıyla 1057,29, 811,46, 561,25, 492,30 ve 403,38 mg/L olarak belirlenirken, durultma sonrası lakkaz enzimi uygulanmış örneklerinki ise sırasıyla 562,47, 383,88, 277,42, 202,62, 162,42 mg/L olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.13. Lakkaz ve PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının TFM içeriğinde meydana gelen değişimler

Şekil 4.13’de görüldüğü üzere hem tek başına durultma hem de durultmanın ardından lakkaz enzimi uygulamaları sonrası kullanılan PVPP dozajının artmasıyla ekstraktların içerdiği toplam fenolik madde miktarında azalma meydana gelmiştir. Durultmanın ardından lakkaz enzimi uygulanan örnek sadece durultma uygulanan örneklerle kıyaslandığında lakkaz uygulamasının TFM miktarını neredeyse yarı yarıya azalttığı görülmektedir. Buna bağlı olarak durultma ve lakkaz enziminin birlikte kullanıldığı örneklerde PVPP ile muamele sonrası TFM miktarı, sadece durultma uygulanan örneklerdekine kıyasla daha düşük bulunmuştur.

4.2.5. PVPP uygulamasının ekstraktlarda antioksidan kapasite (TEAK) üzerine etkisi

Kontrol örneği ve lakkaz uygulanmış örneğe % 0,1, 0,5, 1 ve 2 dozajlarında PVPP ile muamele edilmesi sonucu elde edilen örneklerin trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAK) değerleri Çizelge 4.24’de verilmiştir.

Çizelge 4.24. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının TEAK değerleri

Uygulama	PVPP dozajı (%)	TEAK (mg/L)
Durultma	0	1915,79 ^a ±34,29
	0,1	1368,16 ^b ±50,95
	0,5	991,84 ^c ±13,99
	1	770,79 ^d ±12,04
	2	689,08 ^e ±8,40
Durultma+Lakkaz	0	149,14 ^f ±3,80
	0,1	63,13 ^g ±3,43
	0,5	21,35 ^g ±0,56
	1	6,04 ^g ±2,02
	2	4,00 ^g ±0,44

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Lakkaz uygulanmamış örneklerin antioksidan kapasite değerleri 689,08 ile 1915,79 mg TE/L arasında değişirken, lakkaz uygulanmış örneklerde bu değer 6,04 ile 149,14 mg TE/L arasında değişmiştir. En yüksek TEAK değeri PVPP uygulanmamış kontrol örneğinde (1915,79 mg TE/L), en düşük TEAK değeri ise lakkaz uygulamasının ardından % 2 PVPP ile muamele edilmiş örnekte (6,04 mg TE/L) tespit edilmiştir (Çizelge 4.24).

Örneklerin TEAK değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.25'te, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.26'da verilmiştir. Çizelge 4.25 incelendiğinde TEAK değerleri üzerine yöntem, PVPP dozajı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$).

Çizelge 4.25. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak TEAK değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	12064858,55	7157,71**
PVPP dozu (D)	4	636232,22	377,46**
Y x D	4	393884,80	233,68**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.26. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak antioksidan kapasite değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	1147,13 ^a ±104,01	48,73 ^b ±12,55			
PVPP	0	0,1	0,5	1	2
dozajı	1032,47 ^a ±334,25	715,64 ^b ±247,76	506,59 ^c ±183,52	388,42 ^d ±144,64	346,54 ^d ±129,53

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre lakkaz uygulanmamış grubun antioksidan kapasite değeri ortalama 1147,13 mg TE/L olarak bulunmuşken, lakkaz uygulanmış örnek grubunda bu değer önemli ($P<0,05$) düzeyde azalarak 48,73 mg TE/L olarak bulunmuştur. Farklı dozlarda PVPP ile muamele edilen örneklerde antioksidan kapasite değerindeki değişimin önemli ($P<0,05$) olduğu görülmektedir. En yüksek antioksidan kapasite değeri ortalaması PVPP uygulanmamış örnek grubunda (1032,47 mg TE/L), en düşük antioksidan kapasite değeri ortalaması ise % 2 oranında PVPP uygulanmış örnek grubunda (346,54 mg TE/L) tespit edilmiştir.

4.2.6. PVPP uygulamasının ekstraktların transmittans değerleri üzerine etkisi

Lakkaz enzimi uygulanan ve % 0,1, 0,5, 1 ve 2 oranlarında PVPP ile muamele edilen stevia ekstraktlarının berraklık düzeyini ifade eden transmittans değerleri Çizelge

4.27’de verilmiştir. Çizelge 4.27 incelendiğinde örneklerin transmittans değerlerinin PVPP uygulamasına bağlı olarak lakkaz enzimi eklenmemiş örneklerde % 19,90-% 76,43 arasında değişirken, lakkaz enzimi eklenmiş örneklerde % 4,23-% 52,51 arasında değiştiği görülmektedir.

Çizelge 4.27. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının transmittans değerleri

Uygulama	PVPP dozajı (%)	Transmittans (%)
Durultma	0	19,90 ^h ±0,06
	0,1	41,39 ^f ±0,26
	0,5	64,78 ^c ±0,78
	1	72,62 ^b ±0,31
	2	76,73 ^a ±0,26
Durultma+Lakkaz	0	4,23 ^j ±0,09
	0,1	8,79 ⁱ ±0,07
	0,5	22,31 ^g ±0,46
	1	43,08 ^e ±0,08
	2	52,51 ^d ±0,08

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Örneklerin transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.28’de verilmiştir. Çizelge 4.28 incelendiğinde transmittans değerleri üzerine yöntem, PVPP dozajı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ($P<0,01$).

Çizelge 4.28. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	1	8351,29	19372,7**
PVPP dozu (D)	4	3876,03	8991,32**
Y x D	4	197,58	458,34**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Stevia ekstraktlarının enzim ve PVPP uygulamalarına bağlı olarak değişen transmittans değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.29’da verilmiştir. Lakkaz uygulanmamış örnek grubunda % 55,08 olarak belirlenen transmittans değeri lakkaz enzimi uygulanan örnek grubunda önemli ($P<0,05$) seviyede azalarak % 26,18 olarak belirlenmiştir. Farklı oranlarda PVPP uygulanmış örneklerin ortalamaları incelendiğinde ise uygulanan PVPP dozajına bağlı olarak örneklerin transmittans değerinde önemli ($P<0,05$) düzeyde artış meydana geldiği anlaşılmaktadır. Kontrol örneklerinin transmittans değeri ortalamasının en düşük (% 12,06), % 2 oranında PVPP

uygulanan örneklerin tranmittans değeri ortalamasının ise en yüksek olduğu (% 64,62) olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.29. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak transmittans değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
	55,08 ^a ±4,92	26,18 ^b ±4,33			
PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
	12,06 ^e ±2,96	25,09 ^d ±6,16	43,54 ^c ±8,04	57,85 ^b ±5,58	64,62 ^a ±4,58

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

4.2.7. PVPP uygulamasının ekstraktların renk (*L*, *a*, *b*) değerleri üzerine etkisi

Çizelge 4.30'da lakkaz enzimi uygulaması ve PVPP dozajına bağlı olarak stevia ekstraktlarının *L*, *a*, *b* değerlerinde meydana gelen değişimler verilmiştir.

L, açıklık koordinatıdır ve 0-100 arasında değişim gösterir. Değer 100'e yaklaştıkça açıklık, 0'a yaklaştıkça koyuluk artar. *a*, kırmızı/yeşil koordinatıdır, +*a* kırmızıyı, -*a* ise yeşili ifade etmektedir. *b*, sarı/mavi koordinatıdır ve +*b* sarıyı, -*b* ise maviyi ifade etmektedir. Çizelge 4.30'da görüldüğü üzere durultulmuş ekstraktların *L* değeri artan dozajlarda PVPP ile muamele sonrası önemli düzeyde artarken, lakkaz uygulanmış ekstraktın *L* değeri üzerinde PVPP ile muamelenin etkisi uygulanan PVPP dozajı % 2 oluncaya kadar istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır. En yüksek *L* değeri (56,66) lakkaz uygulanmamış örneğin % 2 oranında PVPP ile muamelesi sonucu elde edilmiştir.

Çizelge 4.30. Lakkaz ve farklı oranlarda PVPP uygulanmış stevia ekstraktlarının renk (*L*, *a*, *b*) değerleri

Uygulama	PVPP dozajı (%)	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Durultma	0	2,33 ^e ±0,01	4,19 ^e ±0,03	3,94 ^d ±0,03
	0,1	9,73 ^d ±0,13	12,62 ^c ±0,03	16,56 ^c ±0,23
	0,5	38,69 ^c ±0,69	18,32 ^a ±0,15	61,57 ^b ±0,94
	1	48,20 ^b ±1,25	15,62 ^b ±0,05	68,26 ^a ±1,06
	2	56,66 ^a ±0,32	12,66 ^c ±0,11	69,35 ^a ±0,22
Durultma+Lakkaz	0	0,06 ^f ±0,01	0,02 ^g ±0,01	0,02 ^e ±0,01
	0,1	0,06 ^f ±0,01	0,04 ^g ±0,01	0,01 ^e ±0,01
	0,5	0,07 ^f ±0,01	0,07 ^g ±0,02	0,03 ^e ±0,01
	1	0,54 ^f ±0,01	2,67 ^f ±0,04	0,85 ^e ±0,04
	2	2,00 ^e ±0,02	9,68 ^d ±0,04	3,38 ^d ±0,03

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Ekstraktların rengi a değeri açısından incelenecek olursa lakkaz enzimi uygulanan örneğin içerdiği polifenollerin okside olmasıyla kırmızılık değerinde azalma olduğu görülmektedir. Lakkaz enzimi uygulanan örneğin % 0,1 ve % 0,5 oranında PVPP ile muamele edilmesi a değerinde önemli bir fark oluşturmazken, PVPP oranı % 1 ve % 2'ye çıktığında a değerinde önemli düzeyde artış olmuştur. PVPP okside olarak büyük moleküllere dönüşen polifenoller uzaklaştırdığından renk açılmakta, dolayısıyla a ve b değerleri de artmaktadır. b değeri de a değerine benzer şekilde lakkaz uygulanan ekstraktın % 2 oranında PVPP ile muamelesi sonucu istatistiksel olarak artış göstermiştir. Lakkaz uygulanmayan ekstraktın artan dozajlarda PVPP ile muamelesi sonucu özellikle sarılık düzeyini ifade eden b değerlerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir.

Lakkaz enzimi ve PVPP uygulanan ekstraktların L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.31'de, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.32'de verilmiştir.

Çizelge 4.31. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	L		a		b	
		KO	F	KO	F	KO	F
Yöntem (Y)	1	9348,92	10805,0**	1037,85	58561,2**	18557,57	21992,4**
PVPP dozu (D)	4	1203,08	1390,46**	98,96	5583,60**	2059,14	2440,26**
Y x D	4	1087,15	1256,47**	83,31	4701,03**	1847,25	2189,15**

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.32. Lakkaz uygulanan stevia ekstraktlarında PVPP dozajına bağlı olarak L , a , b değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

L	Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
		31,12 ^a ±4,91	0,55 ^b ±0,17			
	PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
		1,20 ^a ±0,43	4,89 ^b ±1,83	19,38 ^c ±7,31	24,37 ^d ±9,02	29,33 ^e ±10,33
a	Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
		12,68 ^a ±1,09	2,49 ^b ±0,86			
	PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
		2,11 ^d ±0,79	6,33 ^c ±2,38	9,19 ^b ±3,45	9,14 ^b ±2,45	11,17 ^a ±0,57
b	Uygulama	Durultma	Durultma+Lakkaz			
		43,94 ^a ±6,41	0,86 ^b ±0,29			
	PVPP dozajı	0	0,1	0,5	1	2
		1,98 ^e ±0,74	8,28 ^d ±3,13	30,80 ^c ±1,64	34,56 ^b ±12,75	36,37 ^a ±12,47

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.31’den anlaşılabacağı üzere L , a , b değerleri üzerine lakkaz uygulaması, PVPP dozajı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$).

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre en yüksek L , a , b değerleri ortalamaları sırasıyla 31,12, 12,68, 43,94 olmak üzere lakkaz uygulanmayan örnek grubuna aittir. L , a , b değerlerinin PVPP dozajına bağlı değişimi incelenecek olursa % 2 oranında PVPP uygulamasının bu değerlerde önemli seviyede ($P<0,05$) artış meydana getirdiği görülmektedir (Çizelge 4.32).

4.3. Farklı Ayırma Sınırına Sahip Membran Filtreler Kullanılarak Yapılan Ultrafiltrasyonun Stevia Ekstraktının Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi

Stevia yapraklarının dekantörde gerçekleştirilen ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstrakt durultularak ultrafiltrasyon prosesini zorlaştıracak makro safsızlıklar giderilmiştir. Daha ileri boyutta bir klarifikasyon sağlamak ve ekstraktın içerdiği steviol glikozidlerin saflık düzeyini ultrafiltrasyon öncesi arttırmak amacıyla lakkaz enzimi ve PVPP uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda bundan sonraki aşama olan ultrafiltrasyon için ekstrakt 3 kısma ayrılmış ve ultrafiltrasyon öncesi ekstraktlar kontrol (durultma sonrası işlem uygulanmamış), % 2 oranında PVPP uygulanmış ve lakkaz enzimi (100 $\mu\text{L/L}$ düzeyinde, 4 saat) sonrası % 2 oranında PVPP uygulanmış olmak üzere elde edilmiştir. Bu ekstraktların her birinin ultrafiltrasyonu için 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip 4 farklı filtre kullanılmıştır. Bu aşamada filtrelerden elde edilen süzüntüler (permeatlar) ve UF öncesi besleme örnekleri bazı fizikokimyasal özellikleri açısından değerlendirilmiştir.

4.3.1. Toplam kuru madde

Dekantör ekstraksiyonuyla elde edilen stevia ekstraktına durultma yapıldıktan sonra sadece PVPP ya da lakkaz ve PVPP birlikte uygulanmış, elde edilen ekstraktlarda farklı ayırma sınırına sahip filtreler kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm bu işlem basamaklarından elde edilen örneklerin toplam kuru madde içeriği Çizelge 4.33’de verilmiş, Şekil 4.14’de gösterilmiştir.

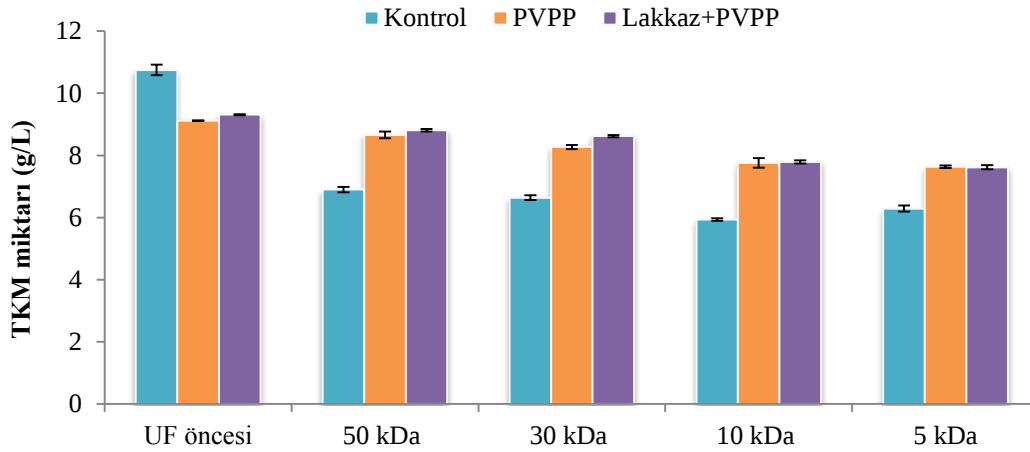
Farklı ayırma sınırında filtrelerle gerçekleştirilen ultrafiltrasyon denemeleri sonrası PVPP uygulanan ekstrakttan 50, 30, 10 ve 5 kDa’ luk filtreler kullanılarak elde edilen permeatlarda toplam kuru madde miktarları sırasıyla 8,66, 8,27, 7,76 ve 7,64 g/L, lakkaz ve PVPP uygulanan ekstrakttan elde edilen permeatlarda sırasıyla 8,81, 8,62, 7,79 ve 7,62 g/L, lakkaz veya adsorban uygulanmayan ekstrakttan (kontrol) elde edilenlerde ise sırasıyla 6,90, 6,64, 5,94 ve 6,29 g/L olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.33. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası toplam kuru madde miktarı

Uygulama	Filtre ayırma sınırı	Toplam kuru madde (g/L)
Kontrol	UF öncesi	10,75 ^a ±0,17
	50 kDa	6,90 ^f ±0,09
	30 kDa	6,64 ^g ±0,08
	10 kDa	5,94 ⁱ ±0,04
	5 kDa	6,29 ^h ±0,10
PVPP	UF öncesi	9,12 ^b ±0,01
	50 kDa	8,66 ^c ±0,11
	30 kDa	8,27 ^d ±0,07
	10 kDa	7,76 ^e ±0,15
	5 kDa	7,64 ^e ±0,04
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	9,31 ^b ±0,02
	50 kDa	8,81 ^c ±0,04
	30 kDa	8,62 ^c ±0,04
	10 kDa	7,79 ^e ±0,05
	5 kDa	7,62 ^e ±0,07

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

UF öncesi sadece PVPP ve lakkaz enzimiyle birlikte PVPP uygulanan ekstraktların TKM miktarı özellikle fenolik maddeler ve renk maddeleri gibi bileşenlerin uzaklaştırılması sonucu azalmıştır. Ancak herhangi bir uygulama yapılmayan ekstraktta (kontrol) bu bileşenlerin yanı sıra filtre ayırma sınırına bağlı olarak diğer bileşenlerin de ayrılmasıyla ultrafiltrasyon aşamasında önemli düzeyde TKM kaybı olduğu görülmektedir. Ultrafiltrasyonda kullanılan her filtre için TKM kaybı kontrol örneğinden elde edilen permeatlarda diğer örneklerden elde edilen permeatlara kıyasla daha fazla olmuştur (Şekil 4.14). Bu durum kontrol örneğinin ultrafiltrasyonu sırasında herhangi bir uygulamayla önceden uzaklaştırılmamış olan büyük molekül ağırlığına sahip bileşenleri daha yüksek miktarda içermesi ve bu bileşenlerin filtre gözenekleri üzerinde yarattığı hızlı blokaj etkisinin filtreyi aşabilecek molekül ağırlığına sahip bileşenlerin dahi rejekte olmasına neden olarak permeta geçebilen madde miktarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.14. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu ile toplam kuru madde miktarında meydana gelen değişim

Enzim ve adsorber madde ile muamele edildikten sonra farklı ayırma sınırında filtrelerden geçirilen ekstraktların toplam kuru madde miktarı değişimlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.34’de, verilmiştir. Çizelge 4.34’te görüldüğü üzere örneklerin toplam kuru madde miktarı üzerinde uygulanan yöntem, filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi oldukça önemli bulunmuştur ($P<0.01$).

Çizelge 4.34. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam kuru madde miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	7,50	266,79**
Filtre (F)	4	13,16	468,20**
Y x F	8	2,87	102,27**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Toplam kuru madde miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.35’te verilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre lakkaz enzimiyle PVPP’nin birlikte uygulandığı ve sadece PVPP uygulanan örnek grubunun TKM miktarına ait ortalamalar, herhangi bir uygulama yapılmayan örnek grubunkine kıyasla önemli seviyede fazla bulunmuştur ($P<0,05$). Yapılan uygulamalar özellikle ultrafiltrasyon sonrası elde edilen örneklerde TKM kaybını azaltmıştır. Ultrafiltrasyon uygulamasının TKM miktarı üzerine etkisi de önemli seviyede olmuştur ($P<0,05$). Ultrafiltrasyonda kullanılan filtrelerin ayırma sınırları açısından toplam kuru madde miktarındaki değişim değerlendirilecek olursa 50, 30 ve 10 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilen örnek gruplarının TKM miktarına

ait ortalamalar arasındaki fark önemli ($P<0,05$) bulunurken, 5 kDa ile 10 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilenlerin ki ise önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.35. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam kuru madde miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	7,30 ^c ±0,40	8,29 ^b ±0,13	8,43 ^a ±0,15		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	9,73 ^a ±0,23	8,12 ^b ±0,26	7,84 ^c ±0,26	7,16 ^d ±0,27	7,18 ^d ±0,19

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Roy ve De (2014) yaptıkları çalışmada 7, 20, 44, 90 ve 104 kDa olmak üzere 5 farklı ayırma sınırında CAP-PAN membran kullanmışlardır. TKM miktarı 24 g/L olan beslemenin kullanılan denemelerde filtreye bağlı olarak elde edilen TKM miktarının 12-19,2 arasında değiştiği bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar bu çalışmanın devamı niteliğinde yapılan başka bir çalışmada 90 kDa ayırma sınırında CAP-PAN membranla 4 farklı transmembran basıncında gerçekleştirdikleri denemelerde TKM miktarının 7,2-15,5 g/L arasında değiştiğini rapor etmişlerdir (Roy ve De 2015).

4.3.2. Steviosid ve rebaudiosid A

Durultma sonrası enzim ve adsorban ya da doğrudan adsorban uygulanan ve 4 farklı ayırma sınırında (50, 30, 10, 5 kDa) filtre kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilen ekstraktların steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonlarındakinin yanı sıra bu bileşenlerin kuru ekstrakt düzeyindeki miktarlarını ifade eden saflık oranlarında meydana gelen değişimler Çizelge 4.36’da verilmiştir.

Çizelge 4.36 incelendiğinde, hedef bileşenler olan steviosid ve rebaudiosid A’nın en yüksek miktarda belirlendiği ekstrakt UF uygulanmamış kontrol örneği (2491,22 mg/L ve 1754,46 mg/L) olurken, en düşük miktarda belirlendiği ekstraktın ise kontrol örneğinin 10 kDa filtreden geçirilmesiyle elde edilen (1308,96 mg/L ve 854,89 mg/L) olduğu görülmektedir. Steviosidin kuru ekstrakt bazında saflık oranı dikkate alınacak olursa lakkaz enzimi ardından % 2 oranında PVPP uygulanan ve 30 kDa filtreden elde edilen ekstraktta en yüksek (% 26,39) olduğu tespit edilmiştir. Rebaudiosid A’nın saflık oranının da aynı örnekte en yüksek düzeyde (% 19,80) olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.36. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları ve steviosid ve rebaudiosid A açısından saflık oranları

Örnek		Steviosid (mg/L)	Rebaudiosid A (mg/L)	Steviosid saflık oranı (%)	Rebaudiosid A saflık oranı (%)
Uygulama	Filtre ayırma sınırı				
Kontrol	UF öncesi	2491,22 ^a ±22,16	1754,46 ^a ±14,10	23,19 ^{fhg} ±0,43	16,34 ^e ±0,35
	50 kDa	1465,31 ^h ±20,21	897,19 ^e ±14,44	21,25 [±] 0,37	13,01 ^g ±0,31
	30 kDa	1474,26 ^h ±26,48	909,70 ^e ±10,02	22,19 ^{ih} ±0,28	13,69 ^{gf} ±0,14
	10 kDa	1308,96 [±] 17,02	854,89 ^e ±4,67	22,06 ^{ih} ±0,32	14,41 ^f ±0,11
	5 kDa	1420,91 ^h ±5,67	890,01 ^e ±1,13	22,61 ^{hg} ±0,37	14,16 ^f ±0,22
PVPP	UF öncesi	2224,60 ^{cbd} ±24,66	1670,27 ^{ba} ±25,94	24,39 ^{fd} ±0,24	18,31 ^{bdc} ±0,26
	50 kDa	2159,84 ^{ed} ±4,88	1637,08 ^b ±6,29	24,97 ^{bdc} ±0,35	18,93 ^{bac} ±0,29
	30 kDa	2113,16 ^e ±9,35	1610,64 ^b ±9,91	25,58 ^{bdac} ±0,24	19,49 ^{ba} ±0,14
	10 kDa	1907,51 ^g ±8,48	1413,86 ^d ±14,53	24,61 ^{de} ±0,52	18,24 ^{dc} ±0,40
	5 kDa	1884,10 ^g ±18,23	1412,43 ^d ±14,24	24,67 ^{dec} ±0,34	18,49 ^{bc} ±0,12
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	2189,49 ^{ced} ±39,01	1611,95 ^b ±77,37	23,52 ^{feg} ±0,38	17,32 ^{ed} ±0,81
	50 kDa	2291,93 ^b ±31,55	1703,76 ^{ba} ±22,68	26,03 ^{ba} ±0,33	19,35 ^{bac} ±0,24
	30 kDa	2272,64 ^{cb} ±62,87	1706,04 ^{ba} ±41,32	26,39 ^a ±0,78	19,80 ^a ±0,43
	10 kDa	2023,48 ^f ±55,54	1513,97 ^c ±58,70	25,96 ^{bac} ±0,61	19,42 ^{bac} ±0,68
	5 kDa	1936,22 ^g ±6,51	1448,37 ^{dc} ±12,95	25,43 ^{bdac} ±0,25	19,02 ^{bac} ±0,23

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Enzim ve adsorban uygulanmış ve farklı ayırma sınırında filtrelerden geçirilmiş ekstraktların steviosid miktarı değişimlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.37’de, rebaudiosid A miktarı değişimlerine ait varyans analizi sonuçları ise Çizelge 4.38’de verilmiştir. Çizelgelerde görüldüğü üzere örneklerin steviosid ve rebaudiosid A miktarı üzerinde PVPP uygulama filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksyonunun etkisi önemli bulunmuştur (P<0,01).

Çizelge 4.37. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	1497223,85	444,09**
Filtre (F)	4	619855,06	183,85**
Y x F	8	256119,92	75,97**

(**), P<0,01 seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.38. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	1756283,38	485,08**
Filtre (F)	4	359276,80	99,23**
Y x F	8	179362,60	49,54**

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Steviosid miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.39’da, rebaudiosid A miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.40’da verilmiştir.

Çizelge 4.39. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosid miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uyg.	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	1632,13 ^c ±98,25	2057,84 ^b ±32,02	2142,75 ^a ±36,56		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	2301,77 ^a ±43,46	1972,36 ^b ±109,91	1953,36 ^b ±106,06	1746,65 ^c ±96,05	1747,08 ^c ±70,10

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre lakkaz ve PVPP uygulanmış örnek grubunun steviosid miktarı değerleri ortalaması (2142,75 mg/L) istatistiksel açıdan önemli seviyede yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Kullanılan filtrelerin ayırma sınırına bağlı olarak değerlendirildiğinde ise ultrafiltrasyon uygulamasının steviosid miktarında önemli düzeyde azalma meydana getirdiği bulunurken, en düşük steviosid miktarı 10 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilmiştir (1746,65 mg/L).

Çizelge 4.40. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

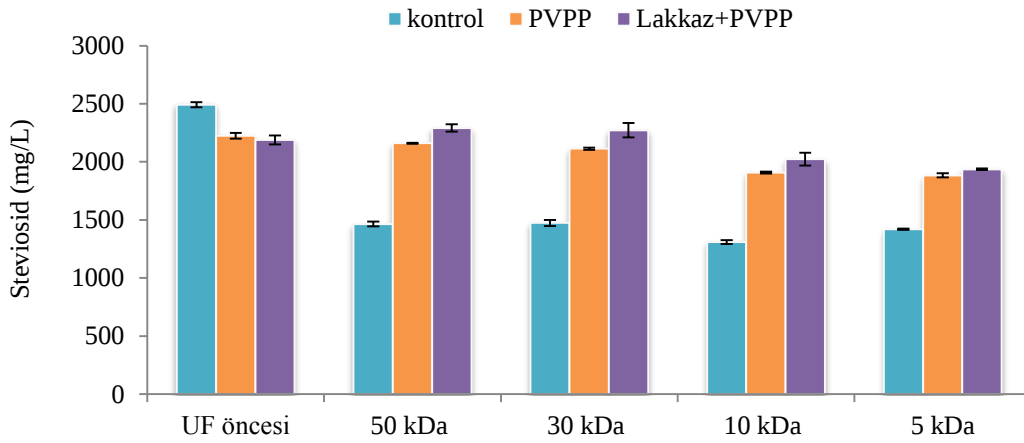
Uyg.	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	1061,25 ^c ±79,73	1548,86 ^b ±26,53	1596,81 ^a ±30,43		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	1678,89 ^a ±30,57	1412,68 ^b ±110,52	1408,79 ^b ±107,86	1260,91 ^c ±89,33	1250,27 ^c ±77,15

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

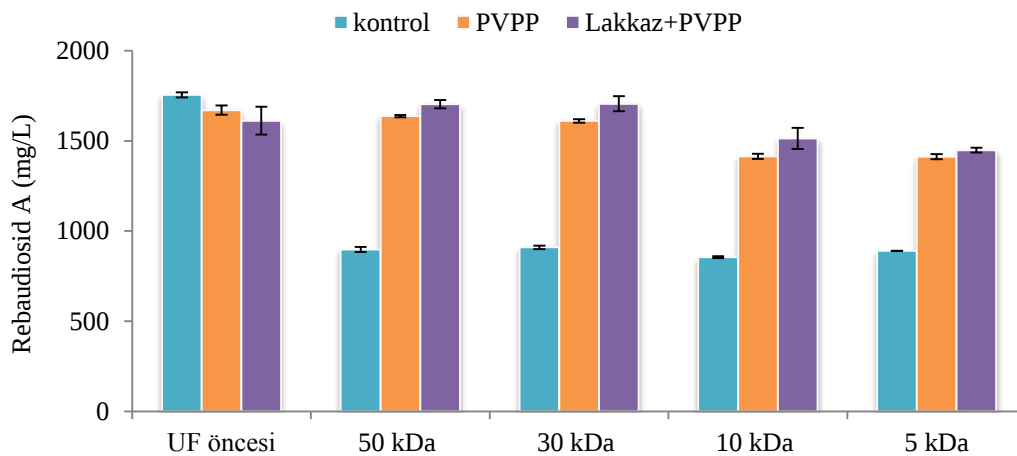
Benzer şekilde lakkaz ve PVPP uygulanan örnek grubunun rebaudiosid A miktarı değerleri ortalaması da (1596,81 mg/L) PVPP uygulanan grubun (1548,86 mg/L) ve kontrol grubunun ortalamasına (1061,25 mg/L) kıyasla önemli düzeyde yüksek bulunmuştur ($P < 0,05$). Ultrafiltrasyonun rebaudiosid A miktarı ortalaması

üzerine etkisi önemli bulunurken en düşük rebaudiosid A miktarı ortalaması 5 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilen grupta tespit edilmiştir (1250,27 mg/L).

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 incelendiğinde lakkaz enzimiyle birlikte PVPP ve sadece PVPP uygulanan ekstraktların 50, 30, 10 ve 5 kDa olmak üzere farklı ayırma sınırına sahip filtreler kullanılarak ultrafiltrasyonu sonucunda elde edilen örneklerin içerdiği steviosid ve rebaudiosid A miktarında başlangıca göre (UF öncesi) meydana gelen değişim daha azken, hiçbir uygulama yapılmayan ekstraktın (kontrol) ultrafiltrasyonu sonucu elde edilen örneklerin steviosid ve rebaudiosid A içeriğinde meydana gelen değişimin daha fazla olduğu görülmektedir. UF öncesi kontrol örneğinin hem steviosid hem de rebaudiosid A miktarı daha fazla olmasına rağmen denemelerde kullanılan tüm filtrelerden elde edilen örneklerin steviosid ve rebaudiosid A içeriği UF öncesi lakkaz ve/veya PVPP ile muamele edilen ekstraktların ultrafiltrasyonu ile elde edilenlerden düşük miktarda kalmıştır.



Şekil 4.15. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosid miktarındaki değişim



Şekil 4.16. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası rebaudiosid A miktarındaki değişim

Stevia ekstraktının majör tatlılık bileşenleri olan steviosid ve rebaudiosid A'nın benzer kimyasal yapı ve molekül büyüklüklerine sahip olmaları nedeniyle hem kontrol örneğinin hem de lakkaz ve/veya PVPP ile muamele edilmiş örneğin farklı filtrelerle ultrafiltrasyonu aşamasında oldukça benzer bir ayrılma eğilimi göstermişlerdir.

Literatürde 30 kDa ayırma sınırına sahip membran filtreyle yapılan çalışmalarda farklı operasyon basınçlarının etkisi incelenmiş ve besleme ekstraktında 16,7 g/L olarak belirlenen steviosid konsantrasyonunun ultrafiltrasyon sonrası uygulanan basınca bağlı olarak 4,67-8,43 g/L arasında değiştiği bildirilmiştir (Chhaya vd 2012b; Mondal vd 2012).

Ekstraktlarda kuru ağırlık üzerinden steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranlarının değişimlerine ait varyans analizi sonuçları sırasıyla Çizelge 4.41 ve Çizelge 4.42'de verilmiştir. Çizelge 4.41'de görüldüğü üzere örneklerde steviosidin saflık oranı üzerinde filtre ayırma sınırı faktörünün etkisi istatistiksel olarak $P<0,05$ düzeyinde önemli bulunurken, uygulanan yöntem faktörü ve uygulanan yöntem filtre ayırma sınırı faktörlerinin ikili interaksiyonunun etkileri ise istatistiksel olarak $P<0,01$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 4.42'den anlaşıldığı üzere ise rebaudiosid A'nın saflık oranı üzerine ise uygulanan yöntem faktörünün ve uygulanan yöntem filtre ayırma sınırı faktörlerinin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunurken ($P<0,01$), filtre ayırma sınırı faktörünün etkisi önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.41. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	57,84	84,57**
Filtre (F)	4	1,58	2,32
Y x F	8	3,26	4,77**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.42. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	136,28	248,17**
Filtre (F)	4	0,53	0,97
Y x F	8	5,26	9,58**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Steviosidin saflık oranı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.43, rebaudiosid A'nın saflık oranı değerlerinin

ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.44'te verilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre steviosidin saflık düzeyi ortalaması kontrol grubunda % 22,26 iken, hem PVPP hem de lakkaz ve PVPP uygulanan grupta önemli seviyede artarak sırasıyla % 24,84 ve % 25,47 olmuştur. UF uygulamasının gruplarda steviosidin saflık düzeyi ortalaması üzerine etkisi önemli bulunurken ($P<0,05$), en yüksek ortalama 30 kDa (% 24,72) filtreden elde edilen grup ortalamasında tespit edilmiştir. Ultrafiltrasyonda ayırma sınırı 50 kDa (% 24,08), 10 kDa (% 24,21) ve 5 kDa (% 24,23) olan filtrelerin kullanıldığı grupların saflık düzeyi ortalaması arasındaki fark ise önemli bulunmamıştır.

Çizelge 4.43. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak steviosidin saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	22,26 ^c ±0,21	24,84 ^b ±0,17	25,47 ^a ±0,31		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	23,70 ^b ±0,24	24,08 ^{ab} ±0,65	24,72 ^a ±0,61	24,21 ^{ab} ±0,55	24,23 ^{ab} ±0,39

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.44. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

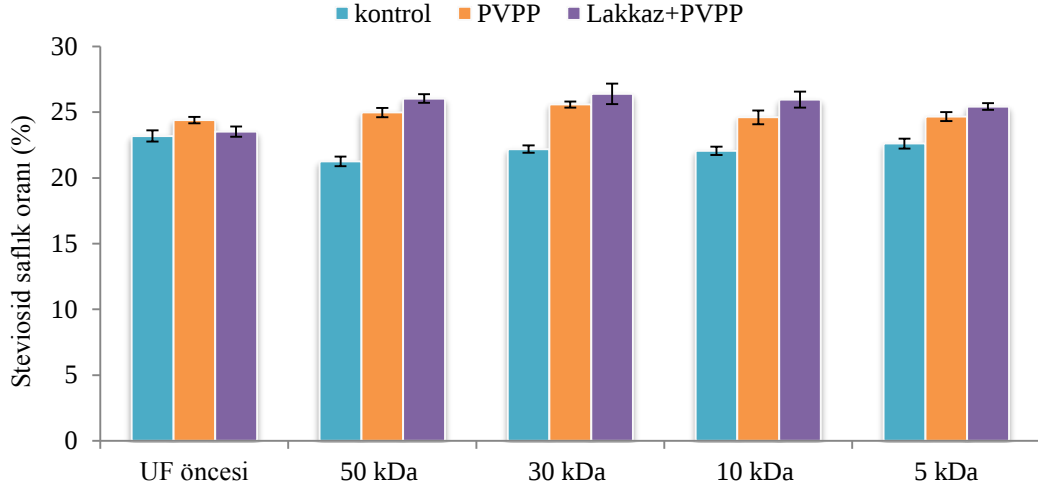
Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	14,32 ^b ±0,27	18,69 ^a ±0,15	18,98 ^a ±0,29		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	17,32 ^a ±0,37	17,10 ^a ±0,88	17,66 ^a ±0,86	17,36 ^a ±0,69	17,22 ^a ±0,66

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

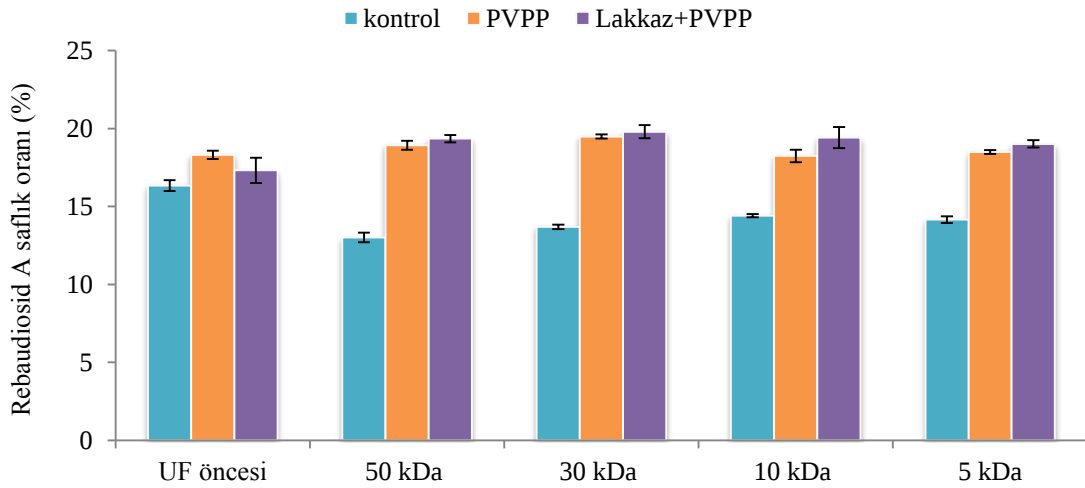
Rebaudiosid A'nın saflık düzeyi değeri lakkaz ve PVPP uygulanan grupta en yüksek seviyede tespit edilmiştir (% 18,98). UF uygulanmayan grupla (% 17,32) farklı ayırma sınırında filtrelerden elde edilen grupların (50, 30, 10, 5 kDa) rebaudiosid A'nın saflık oranı değeri ortalamaları arasında istatistiki açıdan fark gözlenmemiştir. UF uygulamaları sonrası rebaudiosid A verimi açısından en yüksek grup ortalaması (% 17,66) 30 kDa filtreden elde edilmiştir.

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de lakkaz ve/veya PVPP uygulanan ve uygulanmayan (kontrol) ekstraktlarda kuru ekstrakt ağırlığı bazında steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranlarının değişimi gösterilmektedir. PVPP uygulanan ekstraktın ultrafiltrasyonu aşamasında kullanılan membran ayırma sınırına bağlı olarak steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin saflık oranında herhangi bir azalma gözlenmemiştir. En yüksek saflık oranlarına 30 kDa ayırma sınırına sahip filtrede ulaşılmıştır. Lakkaz ve PVPP kullanılan örneklerde ise ultrafiltrasyon işlemiyle filtre ayırma sınırına bağlı olmaksızın hedef bileşenlerin saflık düzeylerinde belirgin bir artış meydana gelmiştir. Kontrol örneğinin ultrafiltrasyonunda ise 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerin kullanılması steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranının filtrasyon öncesine göre azalmasına

neden olmuştur. Yalnızca PVPP ya da lakkaz enziminin ardından PVPP ile muamele edildikten sonra ultrafiltrasyonu gerçekleştirilen ekstraktlarda hedef bileşenlerin saflık oranı kontrole göre daha yüksek olmuştur. Hedef bileşenleri en yüksek oranda içeren filtratlar, lakkaz ve PVPP'nin birlikte uygulandığı ekstraktın ultrafiltrasyonu ile elde edilmiştir.



Şekil 4.17. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası steviosidin saflık oranında meydana gelen değişim



Şekil 4.18. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası rebaudiosid A'nın saflık oranında meydana gelen değişim

Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 incelendiğinde kontrol örneğinin ultrafiltrasyonu ile rebaudiosid A'nın saflık oranında meydana gelen değişimin daha belirgin olduğu görülmektedir. Bu durum rebaudiosid A'nın ekstrakttaki miktarının steviosidin ekstrakttaki miktarına göre daha fazla oranda azalmasının sonucudur. Ultrafiltrasyon prosesinde genel olarak bileşenlerin kullanılan membran filtreyi geçebilme durumu filtrenin ayırma sınırı ve bileşenlerin molekül ağırlığıyla ilgili olduğu kadar filtre edilen sıvı matriksin içerdiği diğer bileşenlerin membranla interaksiyonlarından da etkilenmektedir (Kuberkar ve Davis 2001). UF öncesi fenolik maddeleri ve renk maddelerini uzaklaştırmak amacıyla lakkaz ve/veya PVPP uygulanmamış olan ekstraktın ultrafiltrasyonu sırasında filtre gözeneklerinin uzaklaştırılmamış olan büyük molekül ağırlığına sahip bu gibi bileşenler tarafından tıkanması ve polarizasyon tabakasının hızlı bir şekilde meydana gelmesi sonucu, molekül ağırlığı filtrenin ayırma sınırının oldukça altında olan steviol glikozidlerin rejeksiyonu da artmakta ve bu bileşenler filtreyi aşp permeata istenilen düzeyde geçememektedir. Bu anlamda lakkaz ve/veya PVPP uygulamalarıyla matriksten uzaklaştırılan fenolik maddeler, renk maddeleri ve diğer maddelerin ekstraktta kaldığı takdirde steviosid ve rebaudiosid A'nın filtreden geçişini engellediği düşünülmektedir. Şekil 4.15 ve 4.16'da değinildiği üzere steviosid ve rebaudiosid A'nın filtre ayırma sınırına bağlı olmaksızın kontrol örneğinden elde edilen permeatlardaki konsantrasyonları oldukça düşük seviyede kalmaktadır. Bunun sonucunda kontrol örneğinden elde edilen permeatların steviol glikozidler açısından saflık düzeyi de düşük olmaktadır.

Farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilen permeatların kıyaslanması için steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranlarının yanı sıra verim (Eşitlik 4.3) değerleri ve filtrelerin bu bileşenler açısından seçicilik (Eşitlik 4.4) değerleri aşağıda yer alan formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Verim} = \frac{\text{Permeatın hedef bileşen içeriği}}{\text{UF öncesi beslemenin hedef bileşen içeriği}} \times 100 \quad (4.3)$$

$$\text{Seçicilik} = \frac{\text{Permeattaki hedef bileşen konsantrasyonu}}{\text{Permeattaki DMA sahip bileşenlerin konsantrasyonu}} \quad (4.4)$$

Seçicilik değeri hesaplanırken permeatın içerdiği hedef bileşen konsantrasyonu, hedef bileşenler dışında filtreyi aşabilen düşük molekül ağırlığa (DMA) sahip diğer bileşenlerin miktarına oranlanmıştır. Her bir filtre için permeatın içerdiği DMA sahip bileşen miktarı permeatın toplam kuru madde konsantrasyonundan hedef bileşen konsantrasyonu çıkartılarak hesaplanmıştır (Chhaya vd 2012a). Elde edilen veriler Çizelge 4.45'te gösterilmiştir.

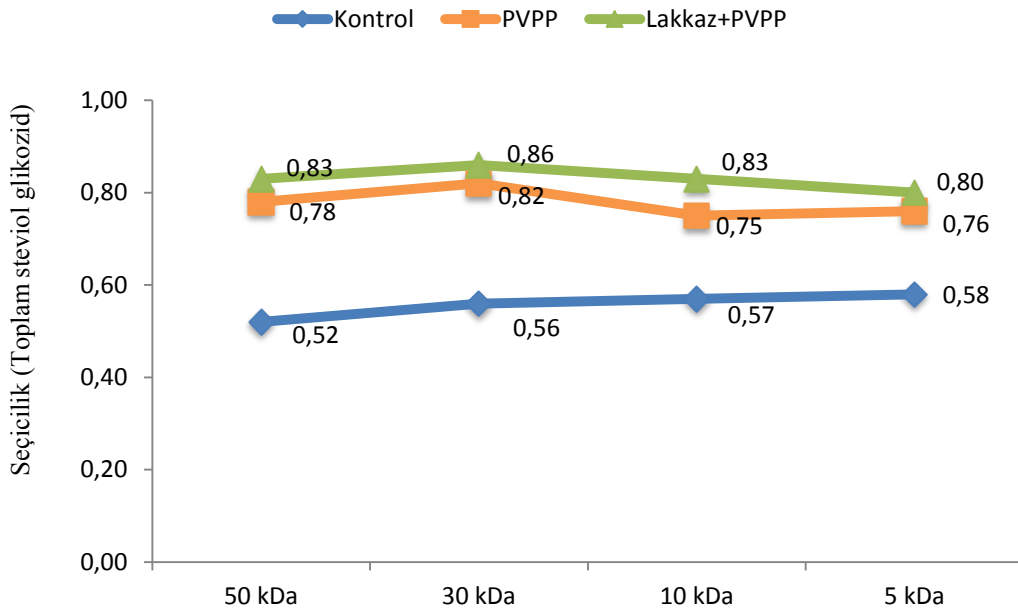
UF öncesi işlem uygulanmamış (kontrol) ekstraktın ultrafiltrasyonu ile elde edilen örneklerin steviosid verimi filtre ayırma sınırına bağlı olarak % 47,29-53,26, rebaudiosid A verimi ise % 43,85-46,67 arasında değişmektedir. UF öncesi % 2 oranında PVPP uygulanan ekstraktın farklı ayırma sınırında filtrelerden ultrafiltrasyonu ile elde edilen steviosid verimi % 76,22-87,38, rebaudiosid A verimi ise % 76,11-88,21 aralığında değişim göstermiştir. UF öncesi lakkaz enzimi ve % 2

oranında PVPP ile muamele edilen ekstraktın ultrafiltrasyonu sonrası elde edilen permeatlarda steviosid verimi %79,59-94,21, rebaudiosid A verimi ise 80,87-95,25 aralığında değişmektedir. Çizelge 4.45'ten anlaşıldığı üzere kontrol örneğinin besleme olarak kullanıldığı UF uygulamalarında hedef bileşenlerin beslemeden permeata geçiş oranı yani verim değerleri diğerlerine kıyasla oldukça düşük olmuştur. Hedef bileşenlerin rejeksiyonuna daha öncede tartışıldığı üzere beslemenin yüksek molekül ağırlıklı bileşenleri fazla miktarda içermesine bağlı olarak filtre gözeneklerinde gerçekleşen hızlı bir blokajın neden olduğu düşünülmektedir. Filtre ayırma sınırına bağlı olarak seçicilik değerleri hem steviosid hem de rebaudiosid A için aynı besleme örneğinden elde edilen permeatlarda fazla değişiklik göstermezken, en yüksek seçicilik değerlerine UF öncesi lakkaz ve PVPP'nin birlikte uygulandığı örneklerde ulaşılmıştır.

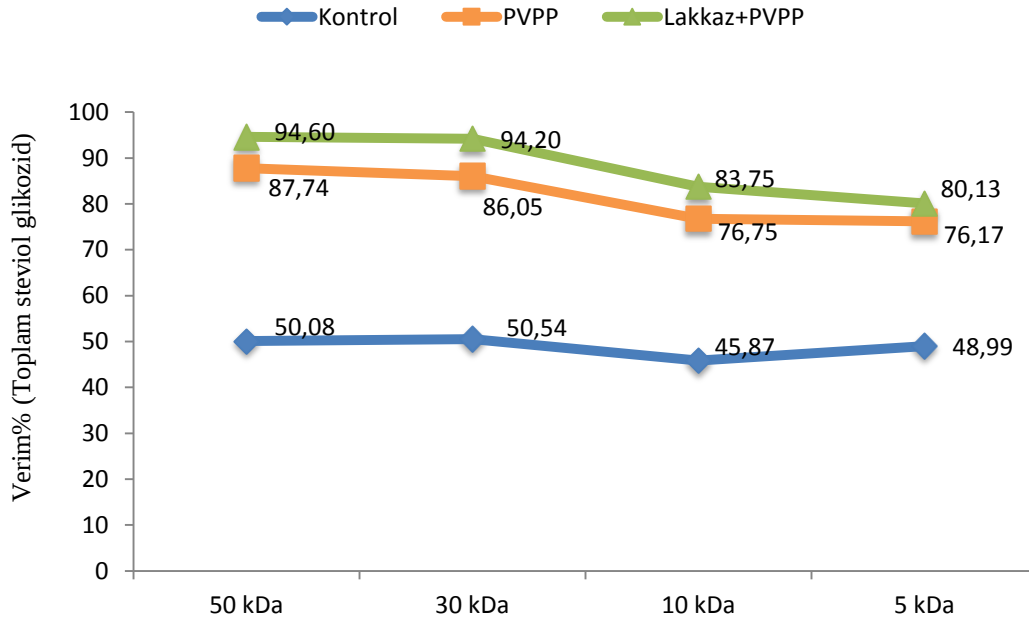
Çizelge 4.45. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonu ile farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilen steviosid ve rebaudiosid A verimleri ve filtrelerin steviosid ve rebaudiosid A açısından seçicilik değerleri

Örnek		Seçicilik		Verim (%)	
Uygulama	Filtre ayırma sınırı	Steviosid	Rebaudiosid A	Steviosid	Rebaudiosid A
Kontrol	50 kDa	0,27	0,15	52,94	46,02
	30 kDa	0,29	0,16	53,26	46,67
	10 kDa	0,28	0,17	47,29	43,85
	5 kDa	0,29	0,16	51,33	45,66
PVPP	50 kDa	0,33	0,23	87,38	88,21
	30 kDa	0,34	0,24	85,49	86,79
	10 kDa	0,33	0,22	77,17	76,18
	5 kDa	0,33	0,23	76,22	76,11
Lakkaz+PVPP	50 kDa	0,35	0,24	94,21	95,13
	30 kDa	0,36	0,25	93,42	95,25
	10 kDa	0,35	0,24	83,18	84,53
	5 kDa	0,34	0,23	79,59	80,87

Ultrafiltrasyon sırasında permeatların toplam steviol glikozid verimi ve filtrelerin toplam steviol glikozidler açısından seçicilik değerleri sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de gösterilmiştir. Kontrol örneğinden elde edilen permeatlarda toplam steviol glikozid açısından seçicilik değeri filtre ayırma sınırındaki azalmayla artarken, lakkaz ve/veya PVPP uygulanmış örneklerden elde edilen permeatlarda en yüksek seçicilik değerine 30 kDa filtrede ulaşılmıştır. Şekil 4.19'dan anlaşıldığı üzere stevia ekstraktının ultrafiltrasyonunda sisteme beslenen ekstraktın kompozisyonu bileşen bazında seçicilik değeri üzerinde oldukça etkilidir. Şekil 4.20 incelendiğinde ise toplam steviol glikozid verimi kontrol örneğinden elde edilen permeatlarda 30 kDa filtrede en yüksek olurken, lakkaz ve/veya PVPP uygulanmış örneklerde en yüksek verim değeri 50 kDa filtrede elde edilmiş ve bu örneklerde filtre ayırma sınırı azaldıkça verim de azalmıştır.



Şekil 4.19. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonunda filtrelerin toplam steviol glikozidler açısından seçicilik değerlerinin ayırma sınırına bağlı olarak değişimi



Şekil 4.20. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonunda toplam steviol glikozid veriminin filtre ayırma sınırına bağlı olarak değişimi

Beslemenin kompozisyonuna bağlı olarak steviol glikozidlerin filtre edilebilirliği farklı ayırma sınırında membranlarda değişiklik göstermektedir. Cut-off değeri 50 kDa olan filtreye kontrol örneği beslendiğinde gözeneklerin büyüklüğü nedeniyle daha fazla bileşen girmekte ve filtrenin tıkanma eğilimi daha fazla olmaktadır. Bu nedenle 50 kDa filtrede elde edilen verim değeri 30 kDa filtrede elde edileninkinden düşük olmaktadır (Rai vd 2006; Mondal vd 2013; Das vd 2015b).

Chhaya vd (2012b) 100, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerden elde ettikleri steviosid verimlerinin 30 kDa'luk filtrede en yüksek olduğunu, bunu sırasıyla 5, 10 ve 100 kDa'luk filtrelerin izlediğini bildirmişlerdir. 414 kPa basınçta 10 kDa filtreden elde edilen steviosid verimi % 20 iken, 5 kDa filtrede bu değerin % 37, 30 kDa'luk filtrede ise yaklaşık % 50 olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada 30 kDa ayırma sınırında filtre kullanılarak 276, 414, 552 ve 690 kPa olmak üzere 4 farklı basınçta gerçekleştirilen UF denemelerinde permeatların steviosid açısından saflığının % 50-67, steviosid veriminin ise % 28,5-50,5 arasında değiştiği bildirilmiştir.

Vanneste vd (2011) tarafından yapılan çalışmada steviosid içeriği kuru ekstrakt ağırlığının % 7'si, rebaudiosid A içeriği ise % 4'ü olmak üzere % 11 saflıkta steviol glikozid içeren başlangıç ekstraktına sırasıyla mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon uygulandığı ancak son aşamada toplam steviol glikozidler açısından ulaşılan saflık düzeyinin % 37, verimin ise % 30 olduğu bildirilmiştir.

CAP-PAN membran kullanarak yapılan başka bir çalışmada 90 kDa ayırma sınırında % 68 verim ve % 34 saflık düzeyinde steviol glikozidlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir (Roy ve De 2014).

Das vd (2015b) 50, 30, 20 ve 10 kDa ayırma sınırına sahip PES filtreler kullanarak yaptıkları çalışmada, farklı basınç değerlerinde üretilen permeatlarda rebaudiosid A verimini karşılaştırmışlar ve en yüksek verimin 30 kDa'luk filtreden elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada 30 kDa ayırma sınırına sahip membran filtrede farklı TMP ve Re sayısı koşullarında gerçekleştirilen denemelerde elde edilen permeatlarda rebaudiosid A'nın saflık düzeyinin %19-31, verimin % 27,28-43,43, seçiciliğin ise 0,23-0,45 aralığında, aynı koşullarda steviosid için saflığın % 38-60, verimin % 29,20-44,22, seçiciliğin ise 0,62-1,51 aralığında değiştiği belirlenmiştir.

4.3.3. Toplam fenolik madde (TFM)

Dekantör ekstraksiyonuyla elde edilen stevia ekstraktına durultma ardından PVPP ve lakkaz enzimiyle birlikte PVPP uygulamaları sonrası farklı ayırma sınırına sahip filtreler kullanılarak gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde içeriği Çizelge 4.46'da gösterilmiştir.

Durultma sonrası enzim ve/veya PVPP uygulaması yapılmamış ekstraktın (1059 mg/L) ultrafiltre edilmesiyle elde edilen örneklerin TFM içeriği 384,62-477,20 mg/L arasında değişirken, PVPP uygulanan ekstraktın (440,66 mg/L) ve lakkaz enzimiyle birlikte PVPP uygulanan ekstraktın (196,77 mg/L) ultrafiltre edilmesiyle elde edilen örneklerin TFM içeriği sırasıyla 319,85-394,36 mg/L ve 155,60-196,77 mg/L aralığında değişmektedir. En düşük toplam fenolik madde içeriği lakkaz enzimi ve PVPP

uygulandıktan sonra 5 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilen örnekte (155,60 mg/L) belirlenmiştir.

Çizelge 4.46. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası TFM miktarı

Uygulama	Filtre ayırma sınırı	TFM (mg/L)
Kontrol	UF öncesi	1059,00 ^a ±17,05
	50 kDa	477,20 ^b ±1,96
	30 kDa	436,75 ^{dc} ±12,56
	10 kDa	384,62 ^f ±2,53
	5 kDa	413,36 ^{de} ±4,85
PVPP	UF öncesi	440,66 ^c ±13,05
	50 kDa	394,36 ^{fe} ±4,65
	30 kDa	337,88 ^g ±5,56
	10 kDa	321,31 ^g ±7,32
	5 kDa	319,85 ^g ±13,63
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	196,77 ^h ±3,69
	50 kDa	168,76 ^{ij} ±5,65
	30 kDa	187,51 ^{ih} ±4,51
	10 kDa	157,55 ^j ±3,45
	5 kDa	155,60 ⁱ ±2,93

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Enzim ve/veya PVPP uygulanan ve 4 farklı ayırma sınırında (50, 30, 10, 5 kDa) filtre edilen örneklerde toplam fenolik madde miktarı değişimlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.47’de verilmiştir. Çizelge 4.47’den anlaşıldığı üzere örneklerin TFM miktarı üzerinde uygulanan yöntem, filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur (P<0,01).

Örneklerin TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları Çizelge 4.48’de verilmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre PVPP uygulanan grubun (362,81 mg/L) ve lakkaz enzimiyle birlikte PVPP uygulanan grubun (173,24 mg/L) TFM miktarı ortalaması kontrol grubununkinden (554,19 mg/L) önemli seviyede düşük bulunmuştur (P<0,05).

Çizelge 4.47. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak TFM miktarı değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	725612,29	2640,70**
Filtre (F)	4	159451,53	580,29**
Y x F	8	88132,44	320,74**

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

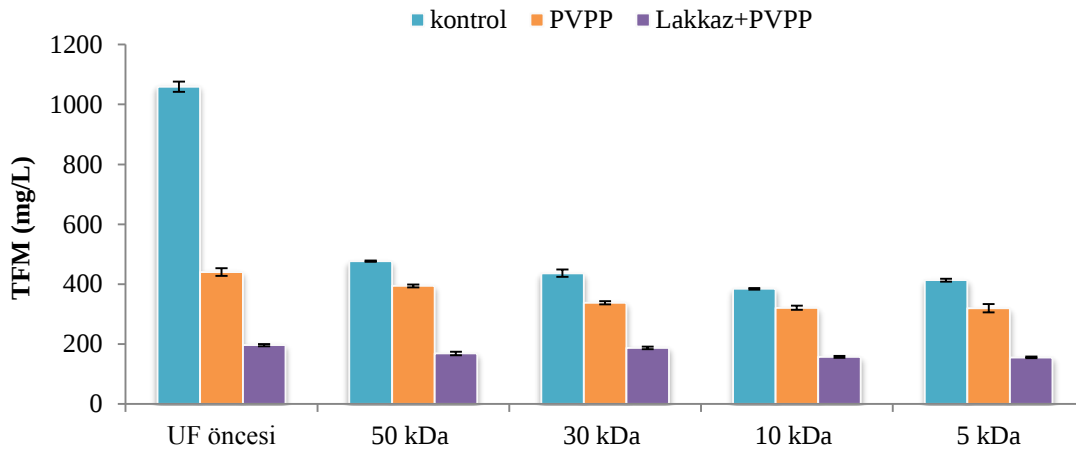
Çizelge 4.48. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak TFM miktarı değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	554,19 ^a ±58,45	362,81 ^b ±11,53	173,24 ^c ±4,10		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	565,48 ^a ±09,62	346,77 ^b ±39,37	320,72 ^c ±31,20	287,83 ^d ±28,96	296,27 ^d ±32,43

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.48 incelendiğinde 50, 30, 10 ve 5 kDa olmak üzere dört farklı şekilde gerçekleştirilen ultrafiltrasyon işleminin TFM miktarında meydana getirdiği değişikliğin önemli ($P < 0,05$) olduğu görülmektedir. Ancak 10 kDa (287,83 mg/L) ve 5 kDa (296,27 mg/L) ayırma sınırına sahip filtrelerden elde edilen örnek gruplarında TFM miktarı ortalamaları arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır.

Lakkaz enzimi uygulamasıyla fenolik bileşiklerin oksidasyonu ve PVPP ile uzaklaştırılması ya da sadece PVPP uygulamasıyla fenolik bileşiklerin azaltılması sonrası ekstraktların farklı filtrelerden geçirilmesiyle elde edilen örneklerin TFM düzeyinde belirgin bir değişim gözlenmezken, hiçbir uygulama yapılmayan ekstraktın filtre edilmesiyle elde edilen örneklerde TFM düzeyi filtrasyon öncesine göre oldukça azalmıştır. Lakkaz ve/veya PVPP uygulamaları ekstraktın TFM miktarını azalttığından ultrafiltrasyonun TFM miktarı üzerine çok fazla etkisi olmamıştır. Ancak filtrasyon sonrası elde edilen tüm örneklerde TFM miktarı kontrole göre daha düşük seviyelerde kalmıştır (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası TFM miktarında meydana gelen değişim

Fenolikler, doğrudan antioksidan aktiviteye katkı sağladıklarından oldukça önemli bitki bileşenleridir (Duh vd 1999). Gıda endüstrisinde, gıdaların kalitesini ve besin değerini artırıcı olumlu özelliklerinden dolayı fenolik maddelere ilgi giderek artmaktadır (Wojdyło vd 2007). Literatürde kurutulmuş stevia yapraklarının fenolik madde içeriğinin 25,18 mg GAE/g (Tadhani vd 2007), 56,74 mg GAE/g (Shukla vd 2012), 0,86 mg GAE/mg (Ghanta vd 2007), 130,67 mg kateşin eşdeğeri/g (Kim vd 2011), 24,01 mg GAE/g (Abou-Arab vd 2010) ve 5,6 g GAE/100 g (Rao vd 2013) olarak bildirildiği farklı çalışmalara rastlamak mümkündür.

4.3.4. Antioksidan aktivite

Lakkaz ve/veya PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının ultrafiltrasyonda kullanılan membran filtrelerin ayırma sınırına bağlı olarak troloks eşdeğeri toplam antioksidan kapasite (TEAK) değerlerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.49'da verilmiş, Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

Dekantör ekstraktı durultulduktan sonra (kontrol) ultrafiltrasyon işleminin gerçekleştirilmesiyle elde edilen örneklerde antioksidan kapasite 582,04-671,84 mg TE/L arasında değişirken, PVPP uygulanan ekstraktın ultrafiltrasyonu ile elde edilen örneklerde bu değer 508,82-603,55 mg TE/L, lakkaz ve PVPP'nin birlikte uygulandığı ekstraktın ultrafiltrasyonu ile elde edilen örneklerde ise bu değer 26,70-117,42 mg TE/L arasında değişmektedir. UF öncesi kontrol örneğinin antioksidan kapasite miktarı diğer iki örneğine kıyasla daha fazladır. UF öncesi gerçekleştirilen uygulamalar antioksidan kapasitesi yüksek olduğu bilinen fenolik maddeleri uzaklaştırdığından ekstraktın antioksidan kapasitesinde beklendiği şekilde bir azalma meydana gelmiştir.

Çizelge 4.49. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası antioksidan kapasite değerleri

Uygulama	Filtre ayırma sınırı	TEAK (mg/L)
Kontrol	UF öncesi	1915,79 ^a ±34,29
	50 kDa	594,87 ^c ±13,91
	30 kDa	597,83 ^c ±9,45
	10 kDa	582,04 ^c ±26,55
	5 kDa	671,84 ^b ±18,44
PVPP	UF öncesi	689,08 ^b ±8,40
	50 kDa	603,55 ^c ±10,87
	30 kDa	592,70 ^c ±4,03
	10 kDa	508,82 ^d ±11,75
	5 kDa	585,13 ^c ±11,87
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	27,62 ^f ±1,18
	50 kDa	26,70 ^f ±1,16
	30 kDa	117,42 ^e ±1,39
	10 kDa	79,26 ^e ±0,93
	5 kDa	91,30 ^e ±2,13

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Uygulanan işlemlerden sonra stevia ekstraktlarının antioksidan kapasite miktarı değişimlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.50’de verilmiştir. Çizelgeden anlaşıldığı üzere örneklerin antioksidan kapasitesi üzerinde uygulanan yöntem, filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun $P < 0,01$ düzeyinde etkili olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.50. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	3337017,70	4174,62**
Filtre (F)	4	506681,16	633,86**
Y x F	8	440913,71	551,58**

(**), $P < 0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.51’de verilen TEAK sonuçlarının ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları incelendiğinde en yüksek ortalamanın (877,49 mg/L) UF öncesi örnek grubuna, en düşük ortalamanın ise (68,46 mg/L) lakkaz ve PVPP’nin birlikte kullanıldığı örnek grubuna ait olduğu görülmektedir. Lakkaz ve/veya PVPP

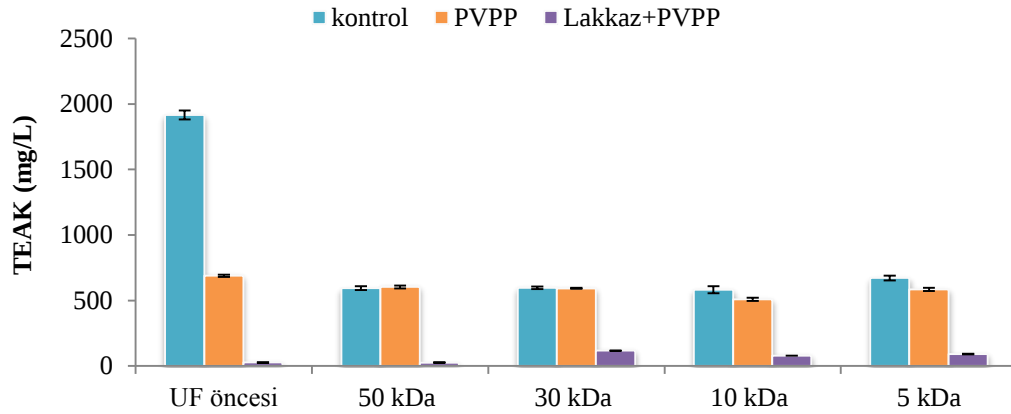
uygulamaları örnek gruplarının TEAK ortalamalarını kontrol grubuna göre önemli seviyede ($P<0,05$) azaltmıştır. Farklı ayırma sınırına sahip filtreler kullanılarak gerçekleştirilen ultrafiltrasyon uygulamasında ultrafiltrasyon uygulanan ve uygulanmayan örnek gruplarına ait ortalamalar arası fark önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Çizelge 4.51. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	872,48 ^a ±120,22	595,86 ^b ±13,73	68,46 ^c ±8,26		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	877,49 ^a ±236,11	408,37 ^c ±81,56	435,98 ^b ±67,99	390,04 ^c ±67,44	449,43 ^b ±77,38

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.22’de görüldüğü üzere PVPP uygulanan ve uygulanmayan ekstraktların 50 ve 30 kDa ayırma sınırında filtreyle ultrafiltrasyonu ile antioksidan kapasitelerinde neredeyse değişim olmazken, 10 ve 5 kDa ayırma sınırında filtrelerin kullanılmasıyla PVPP uygulanmayan ekstraktan elde edilen örneklerin antioksidan kapasitesi daha yüksek olmuştur. Ön işlem uygulanmayan ekstraktın 50, 30, 10 ve 5 kDa olmak ayırma sınırında olmak üzere 4 farklı filtreden ultrafiltrasyonu ile elde edilen örneklerin antioksidan kapasitesi sırasıyla 594,87, 597,83, 582,04 ve 671,84 mg TE/L olarak belirlenmiştir. Cut-off değeri 50, 30 ve 10 kDa olan filtrelerin kullanılmasıyla örneklerin antioksidan kapasitelerinde değişim meydana gelmezken, 5 kDa’ luk filtreden elde edilen örneğin antioksidan kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. PVPP uygulandıktan sonra ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilen örneklerde ise 50, 30 ve 5 kDa filtrelerin kullanılması antioksidan kapasiteyi değiştirmezken (603,55, 592,70 ve 585,13 mg TE/L), 10 kDa’ luk filtreden elde edilen örneğin antioksidan kapasitesinin daha düşük (508,82 mg TE/L) olduğu belirlenmiştir. Lakkaz ve PVPP’nin birlikte uygulandığı ekstraktta (27,62 mg TE/L) antioksidan kapasitenin oldukça düştüğü belirlenmiştir. Bu ekstraktın farklı filtrelerden ultrafiltrasyonu ile elde edilen permeat örneklerinde de diğerlerine göre düşük seviyelerde kalmıştır. UF öncesi örneklerde uygulanan işlemlere bağlı olarak antioksidan aktivitenin düşmesi antioksidan ekstraktlarda antioksidan aktivitenin TFM miktarıyla ilişkisini ortaya koymaktadır. Özellikle lakkaz enzimi tarafından oksidasyonu katalizlenen fenolik bileşenlerin yüksek antioksidan kapasiteye sahip bileşenler olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.22. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası antioksidan kapasitelerinde meydana gelen değişim

Literatürde bitki ekstraktlarının radikal süpürücü etkileri üzerine yapılan çalışmalarda bu etki ekstraktların içerdiği polifenolik bileşenler ile ilişkilendirilmektedir (Benavente-Garcia vd 2000; Shukla vd 2009). Stevia yaprağı ekstraktları da yüksek miktarda fenolik madde içerdiğinden serbest radikalleri inhibe edebilmekte ve indirgen ajan olarak görev yapabilmektedir (Kim vd 2011). Çeşitli stevia ekstraktlarının DPPH radikalini inhibe etme oranının % 33 ile % 57 arasında değiştiği (Tadhani vd 2007), stevia ekstraktının çeşitli hücresel aktiviteler sonucu ortaya çıkan zararlı reaktif oksijen türlerini (ROS) ve diğer serbest radikalleri süpürücü kapasiteye sahip flavonoidler açısından zengin bir kaynak olduğu rapor edilmiştir. Ekstraktların güçlü radikal süpürücü ve oksidatif DNA hasarından koruyucu etkileri de zengin flavonoid içeriğiyle ilişkilendirilmektedir (Ghanta vd 2007).

Yapılan bir çalışmada kullanılan toz haldeki stevia yaprağının 100 µg konsantrasyonda DPPH radikal süpürücü aktivitesi % 52,46, daha düşük konsantrasyonda (20 µg) ise yaklaşık % 30 olarak bildirilmiştir. İnhibisyon oranındaki değişimin fenolik madde içeriğindeki farklılıktan kaynaklandığı rapor edilmiştir (Rao vd 2013). Tadhani vd (2007) yaptıkları çalışmada kuru stevia yapraklarının antioksidan aktivitesini 38,24 mg TE/g, Abou-Arab vd (2010) ise 8,72 mg GAE/g olarak bildirmişlerdir.

Bender vd (2015) yaptıkları çalışmada farklı koşullarda temin edilmiş kuru stevia yapraklarından elde ettikleri ekstraktların ORAC metoduyla ölçtükleri antioksidan aktivite değerlerini 958,8-1071,1 µmol TE/g aralığında belirlerken, saf steviosid ve rebaudiosid A standartlarında ise bu değeri sırasıyla 23,8 ve 22,8 µmol TE/g olarak belirlemişlerdir. Steviosid ve rebaudiosid A bileşenlerinin saflaştırılarak kullanılmasının dışında antioksidan kapasitesi yüksek olan ekstraktların kullanılması doğal tatlandırıcı özelliğın yanı sıra tüketicilerin fonksiyonel ürün yönündeki taleplerini de karşılama potansiyelindedir.

4.3.5. Transmittans

Enzim ve PVPP uygulandıktan sonra 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip 4 farklı filtre kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi gerçekleştirilen örneklerde filtre ayırma sınırına bağlı olarak berraklık düzeyini ifade etmek için kullanılan transmittans değerlerinin değişimi Çizelge 4.52’de verilmiş, Şekil 4.23’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.52 incelendiğinde durultma sonrası lakkaz ve/veya PVPP uygulanmayan örneklerin transmittans değerlerinin % 29,81-98,08, PVPP uygulanan örneklerin transmittans değerlerinin % 73,98-96,03, lakkaz ve PVPP uygulanan örneklerin transmittans değerlerinin ise % 40,02-92,45 arasında değiştiği görülmektedir. En düşük transmittans değeri (% 29,81) UF öncesi kontrol örneğinde belirlenirken, en yüksek transmittans değeri (% 98,08) ise aynı ekstraktın 10 kDa’ luk filtreden ultrafiltrasyonu ile elde edilen örnekte belirlenmiştir.

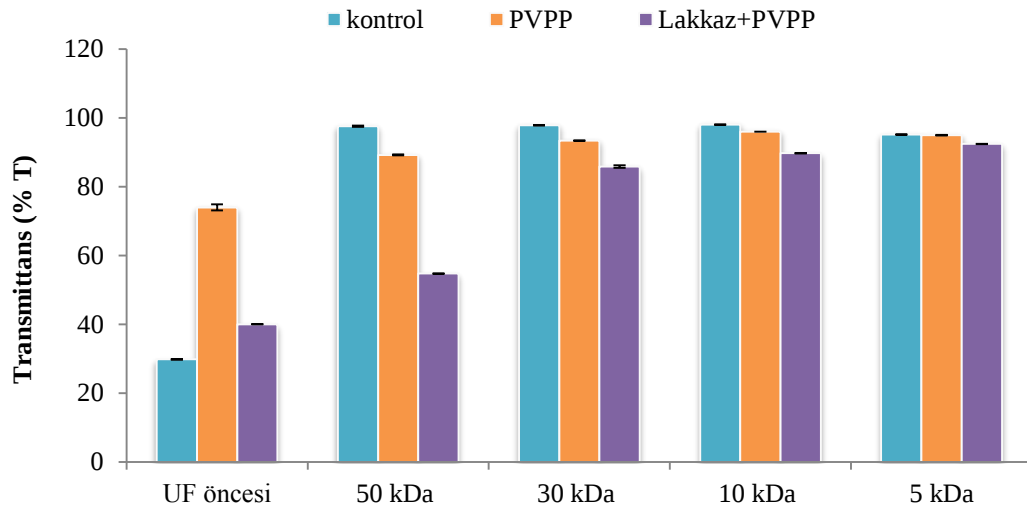
Çizelge 4.52. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası transmittans değerleri

Uygulama	Filtre ayırma sınırı	Transmittans (% T)
Kontrol	UF öncesi	29,81 ^k ±0,01
	50 kDa	97,60 ^a ±0,13
	30 kDa	97,90 ^a ±0,10
	10 kDa	98,08 ^a ±0,00
	5 kDa	95,19 ^c ±0,11
PVPP	UF öncesi	73,98 ^h ±0,89
	50 kDa	89,26 ^f ±0,22
	30 kDa	93,44 ^d ±0,12
	10 kDa	96,03 ^b ±0,11
	5 kDa	95,01 ^c ±0,12
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	40,02 ^j ±0,04
	50 kDa	54,75 ⁱ ±0,05
	30 kDa	85,90 ^g ±0,35
	10 kDa	89,74 ^f ±0,08
	5 kDa	92,45 ^e ±0,08

Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Şekil 4.23 incelendiğinde Tüm örneklerde 50, 30 ve 10 kDa ayırma sınırındaki filtrelerde ayırma sınırı küçüldükçe tutulan madde miktarındaki artışa bağlı olarak berraklık düzeyini ifade eden transmittans değeri artmıştır. Ayırma sınırı 5 kDa olan filtreden elde edilen örneklerde ise transmittans değerleri birbirine çok yakın olmuştur. Ultrafiltrasyon öncesi PVPP uygulanmış örnek en yüksek transmittans değerine sahipken, ultrafiltrasyon sonrası en yüksek transmittans değerleri kontrolden elde edilen permeatlarda belirlenmiştir. Kontrol örneğinin ultrafiltrasyonu ile toplam madde miktarı

belirgin düzeyde azaldığından elde edilen ekstraktların berraklık düzeyi daha yüksek olmuştur.



Şekil 4.23. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası transmittans değerinde meydana gelen değişim

Farklı ayırma sınırına sahip filtreler kullanılarak elde edilen örneklerin transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.53'te, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.54'te verilmiştir. Çizelge 4.53 incelendiğinde uygulanan yöntem, filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun örneklerin transmittans değerleri üzerinde $P<0,01$ düzeyinde etkili olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.53. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak transmittans değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	KO	F
Yöntem (Y)	2	1487,17	5256,25**
Filtre (F)	4	4738,17	16746,5**
Y x F	8	737,18	2605,48**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre PVPP uygulanan grubun (% 89,54) transmittans değeri ortalaması kontrol grubuna (% 83,72) ve lakkazla birlikte PVPP uygulanan gruba (% 72,57) göre önemli seviyede yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Farklı filtrelerle gerçekleştirilen UF işlemi, uygulanan filtrelerin ayırma sınırına bağlı olarak örnek gruplarının transmittans değeri üzerinde önemli düzeyde değişim meydana getirmiştir. UF uygulanmayan örnek grubunun transmittans değeri ortalaması % 47,94 olurken, 50, 30, 10 ve 5 kDa' luk filtrelerden elde edilen örnek gruplarının transmittans

değeri ortalamaları sırasıyla % 80,54, % 92,41, % 94,62 ve % 94,22 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.54. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak transmittans değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP		
	83,72 ^b ±6,19	89,54 ^a ±1,87	72,57 ^c ±4,86		
Filtre	UF öncesi	50	30	10	5
	47,94 ^d ±5,70	80,54 ^c ±5,59	92,41 ^b ±1,49	94,62 ^a ±1,07	94,22 ^a ±0,38

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların P<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Mondal vd (2013) tarafından yapılan çalışmada transmittans değeri % 1,047 olan besleme ekstraktının 100, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırında filtrelerden ultrafiltrasyonuyla elde ettikleri permeatlarda transmittans değerinin farklı basınçlarda sırasıyla % 93,5-95,2, % 59,6-63,1, % 79,1-81,2, % 74,2-75,9 aralıklarında değiştiği rapor edilmiştir. Bu çalışmanın devamı niteliğinde yapılan başka bir çalışmada karıştırmalı ultrafiltrasyon sisteminde 30 kDa ayırma sınırında filtrenin farklı basınç (276, 414, 552, ve 690 kPa) ve karıştırma hızı (600, 1200, 1800 rpm) parametrelerinde ayırma performansı araştırılmıştır. Bu amaçla transmittans değeri % 1,62 olan besleme ekstraktı kullanılmış ve elde edilen permeatların transmittans değerlerinin % 84,5-95 arasında değişim gösterdiği bildirilmiştir (Chhaya vd 2012b).

Roy ve De (2014) yaptıkları çalışmada UF öncesi ekstraktta %3,2 olan transmittans değerinin 7, 20, 44, 90, 104 kDa olmak üzere 5 farklı CAP-PAN filtre kullanılarak yapılan UF denemeleri sonucu % 27-71,7 aralığında değiştiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu çalışma sonucunda steviol glikozidleri (steviosid ve rebaudiosid A) en yüksek saflıkta (% 34) elde ettikleri 90 kDa CAP-PAN filtreyi (transmittans % 30,06) karıştırmalı ultrafiltrasyon düzeneğinde farklı karıştırma hızlarında kullanarak farklı transmembran basınçlarında yürüttükleri başka bir çalışmada elde edilen permeatlarda transmittans değerinin % 23-35,1 arasında değiştiğini, en yüksek berraklık düzeylerine düşük basınçta (138 kPa) elde edilen permeatlarda ulaşıldığını bildirilmiştir (Roy ve De 2015).

UF öncesi % 1,17 transmittans değerine sahip besleme ekstraktının çapraz akış (cross-flow) ultrafiltrasyon sisteminde 30 kDa filtre kullanılarak sağlanan iki farklı Re sayısı (833, 1667) ve üç farklı transmembran basıncı (138, 276 ve 414 kPa) koşullarında yürütülen ultrafiltrasyon denemeleri sonucu ise permeatların berraklık düzeyinin % 65,6-74,5 aralığında değişim gösterdiği rapor edilmiştir (Das vd 2015b).

4.3.6. Renk (*L*, *a*, *b*)

Lakkaz ve/veya PVPP uygulaması ve ultrafiltrasyonda kullanılan membran filtrelerin ayırma sınırına bağlı olarak stevia ekstraktlarının *L*, *a*, *b* değerlerinin değişimleri Çizelge 4.55'te verilmiş, Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da gösterilmiştir.

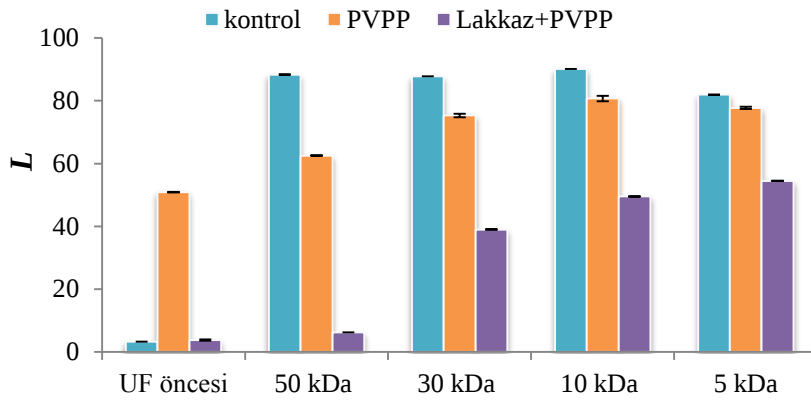
Çizelge 4.55. Lakkaz ve PVPP uygulananan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası renk (*L*, *a*, *b*) değerleri

Uygulama	Filtre ayırma sınırı	<i>L</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
Kontrol	UF öncesi	3,27 ^m ±0,03	6,75 ^{hg} ±0,07	5,50 ^l ±0,04
	50 kDa	88,34 ^b ±0,01	-0,25 ^j ±0,01	48,99 ⁱ ±0,01
	30 kDa	87,79 ^b ±0,01	1,60 ⁱ ±0,01	48,28 ⁱ ±0,01
	10 kDa	90,16 ^a ±0,01	0,49 ^j ±0,01	36,72 ^j ±0,01
	5 kDa	81,93 ^c ±0,01	5,82 ^h ±0,01	57,18 ^g ±0,02
PVPP	UF öncesi	50,86 ⁱ ±0,09	17,78 ^e ±0,05	68,10 ^b ±0,06
	50 kDa	62,53 ^g ±0,04	18,04 ^e ±0,02	70,92 ^a ±0,03
	30 kDa	75,30 ^f ±0,57	8,69 ^f ±0,47	63,48 ^c ±0,79
	10 kDa	80,71 ^d ±0,86	7,10 ^g ±0,79	52,68 ^h ±1,89
	5 kDa	77,74 ^e ±0,40	8,81 ^f ±0,33	58,25 ^f ±0,73
Lakkaz+PVPP	UF öncesi	3,76 ^m ±0,23	17,69 ^e ±0,92	6,48 ^l ±0,39
	50 kDa	6,23 ^l ±0,02	23,72 ^d ±0,06	10,66 ^k ±0,05
	30 kDa	38,98 ^k ±0,05	35,01 ^a ±0,02	61,38 ^{de} ±0,05
	10 kDa	49,52 ^j ±0,05	31,83 ^b ±0,03	62,57 ^{dc} ±0,06
	5 kDa	54,49 ^h ±0,03	29,39 ^c ±0,04	59,83 ^{fe} ±0,06

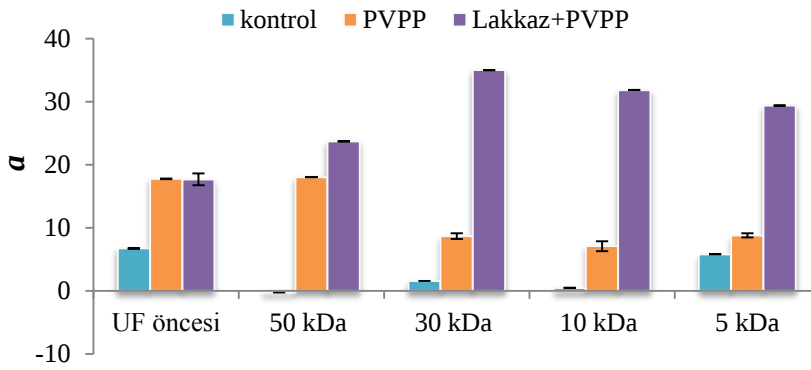
Aynı sütundaki farklı harfler ortalamaların $P < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Ekstraktların rengine açıklık-koyuluk düzeyini ifade eden *L* değeri, hem kontrol örneğinde hem de lakkaz ve/veya PVPP uygulanan ekstraktlarda ultrafiltrasyon sonrası artış göstermiştir. Kontrol örneğinin ultrafiltrasyonu sonrası permeatların *L* değerinde daha belirgin bir artış meydana gelirken, en düşük *L* değerleri lakkaz ve PVPP'nin birlikte uygulandığı örneğin ultrafiltrasyonu sonrası elde edilen permeatlarda belirlenmiştir.

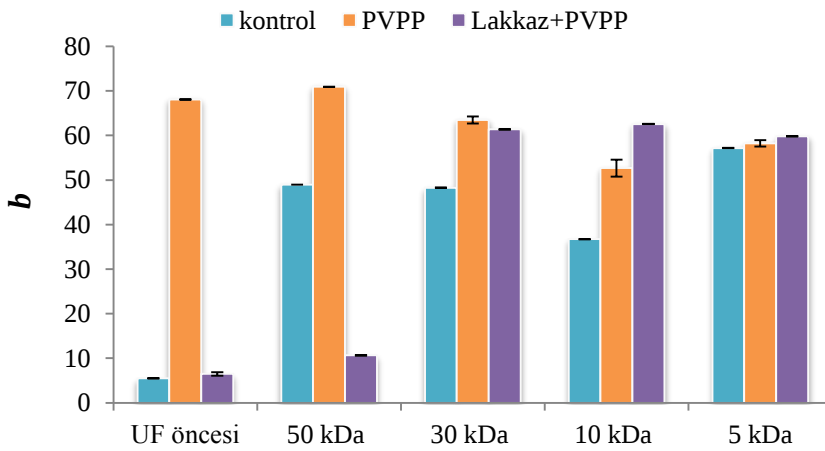
Kontrol örneğine UF uygulamalarıyla *a* değerinde membran ayırma sınırına bağlı olmayan bir azalma, *b* değerinde ise artma belirlenmiştir. Bu durum kontrol örneğine enzim veya adsorber madde uygulanmadığı için örnekte yeşil renk tonunun daha hakim olmasından ve UF uygulamalarıyla açılmasından kaynaklanmaktadır. PVPP uygulanmış ekstraktın ultrafiltrasyonu sonrası 50 kDa ayırma sınırına sahip filtreden elde edilen permeatın hem *a* hem de *b* değeri artmıştır. 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırındaki filtrelerden elde edilen permeatlarda ise bu değerler UF öncesine göre azalmıştır. Lakkaz enzimi ve PVPP'nin beraber uygulandığı ekstraktta ise oksidasyon sonucu koyu kahverengiye dönen rengin, UF işlemi sonrası kırmızılık (*a*) ve sarılık (*b*) düzeyinde artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.24. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası L değerlerinde meydana gelen değişim



Şekil 4.25. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası a değerlerinde meydana gelen değişim



Şekil 4.26. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarının farklı ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltrasyonu sonrası b değerlerinde meydana gelen değişim

UF öncesi ön işlemler uygulanan ve 50, 30, 10 ve 5 kDa olmak üzere 4 farklı ayırma sınırında filtreden elde edilen ekstraktların L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları Çizelge 4.56’da, bu değerlerin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.57’de verilmiştir. Çizelge 4.56’dan anlaşılabacağı üzere L , a , b değerleri üzerine uygulanan yöntem, filtre ayırma sınırı faktörlerinin ve bu faktörlerin ikili interaksiyonunun etkisi önemli bulunmuştur ($P<0,01$).

Çizelge 4.56. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak L , a , b değerlerine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	SD	L		a		b	
		KO	F	KO	F	KO	F
Yöntem (Y)	2	10282,85	29974,7**	3102,13	6418,10**	3507,47	2678,03**
Filtre (F)	4	6084,21	17735,6**	6,88	14,24**	2046,71	1562,71**
Y x F	8	1252,95	3652,38**	169,11	349,89**	1578,99	1205,60**

(**), $P<0,01$ seviyesinde farklılık ifade eder.

Çizelge 4.57. Lakkaz ve PVPP uygulanan stevia ekstraktlarında filtre ayırma sınırına bağlı olarak L , a , b değerlerinin ortalamalarına ait Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

	Uygulama	Kontrol	PVPP	Lakkaz+PVPP	
		70,30 ^a ±7,71	69,43 ^b ±2,57	30,60 ^c ±4,94	
L	Filtre	UF öncesi	50	30	10
		19,30 ^e ±6,73	52,37 ^d ±10,34	67,36 ^c ±6,24	73,46 ^a ±5,24
a	Filtre	UF öncesi	50	30	10
		14,08 ^b ±1,59	13,84 ^b ±3,08	15,10 ^a ±4,34	13,14 ^c ±4,07
b	Filtre	UF öncesi	50	30	10
		26,69 ^d ±8,83	43,52 ^c ±7,51	57,71 ^a ±2,04	50,66 ^b ±3,26

Aynı satırdaki farklı harfler ortalamaların $P<0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre en düşük L değeri ortalaması (19,30) UF prosesi öncesi öncesi örnek grubunda belirlenmiştir. Farklı filtre ayırma sınırında elde edilen örnek gruplarının L değeri istatistiksel olarak önemli düzeyde fazladır ($P<0,05$). Örnek grupları arasında a değeri ortalaması en düşük olan kontrol grubudur (2,88). PVPP uygulanan örnek grubunun (12,08) yanı sıra özellikle lakkaz ve PVPP’nin birlikte uygulandığı örnek grubunda (27,53) kırmızılığı ifade eden a değeri önemli düzeyde artmıştır ($P<0,05$). UF uygulanmamış örnek grubu en düşük b değeri

ortalamasına sahipken farklı ayırma sınırında filtrelerden elde edilen örnek gruplarında sarılık düzeyini ifade eden b değeri önemli bir artış göstermiştir ($P<0,05$).



5. SONUÇ

Tez çalışması kapsamında stevia bitkisinden dekantör ekstraksiyonu yoluyla tatlı bileşiklerinin ekstrakte edilmesi ve ekstraktın zenginleştirilmesinde farklı ayırma sınırına sahip membranlardan yararlanılması amaçlanmıştır. Yöntemde ekstraksiyon çözgeni olarak patentli yöntemlerdeki organik çözücüler yerine su kullanılması çevreci bir yaklaşımın yanında prosesin ekonomik olmasını sağlamıştır. Elde edilen sulu ekstrakttan steviosidlerin zenginleştirme çalışmalarında bilinen fiziksel metotlar dışında farklı ayırma sınırındaki membranlardan yararlanılmıştır. Değerlendirmede ekstraktlarda steviosid ve rebaudiosid A konsantrasyonları, steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranları, ekstraktların fenolik madde düzeyi ve antioksidan aktiviteleri, renk ve transmittans değerleri parametre olarak kullanılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ve konu üzerinde bundan sonraki çalışmalara yön verebilecek bazı öneriler aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

1. Stevia yapraklarından çözücü olarak suyun kullanıldığı steviosid ve rebaudiosid A ekstraksiyonunda ekstraksiyon koşullarının Box-Behnken cevap yüzey metodu ile optimize edilmesi üzerine sıcaklık, süre ve bitki/su oranının etkisi incelenmiştir. Sıcaklığın ekstrakttaki steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranı üzerine etkisi önemli bulunmuştur. 25, 50 ve 75 °C sıcaklıklarda elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık oranı sırasıyla kuru maddede % 21,69-22,62, % 19,06-21,93, % 19,32-21,08, rebaudiosid A'nınki ise % 14,79-15,61, % 13,58-14,69, % 13,26-14,33 aralığında değişim göstermiştir. 15, 60 ve 105 dak süreyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlarda elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık oranı sırasıyla kuru maddede % 19,06-22,39, % 19,32-21,75, % 20,10-22,62, ekstraktlardaki rebaudiosid A oranları ise sırasıyla kuru maddede % 13,97-15,00, % 13,58-15,56, % 13,26-15,61 aralığında değişim göstermiştir. 1/10, 1/25 ve 1/40 bitki/su oranlarında yürütülen ekstraksiyonlar sonucu elde edilen ekstraktlarda steviosidin saflık düzeyi sırasıyla kuru maddede % 21,00-21,93, % 20,10-22,62 ve % 19,06-21,75, rebaudiosid A'nın saflık düzeyi ise sırasıyla kuru maddede % 14,13-14,79, % 13,26-15,61 ve % 13,98-15,56 aralığında değişim göstermiştir.
2. CYM ile yapılan optimizasyon sonucu en iyi kombinasyon koşulları 25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi, 1/27,6 bitki/su oranı olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen ekstrakt kuru ağırlık bazında % 23 oranında steviosid, % 15,67 oranında ise rebaudiosid A içermektedir.
3. Dekantörde yapılan devir sayısı denemeleri sonucu steviosid ve rebaudiosid A açısından verimin en yüksek olduğu devir sayısı 5280 devir/dak olarak belirlenmiştir. Dekantör ekstraksiyonu ile yaprakta bulunan hedef steviol glikozidler % 73,1 verimle ekstrakta geçmiştir (12,04 g steviol glikozid/100 g kuru yaprak).
4. Optimum koşullarda elde edilen dekantör ekstraktına makro safsızlıkları uzaklaştırmak için durultma işlemi uygulanmış, durultma sonrası elde edilen ekstrakt lakkaz enzimi ve/veya PVPP ile muamele edilmiştir.

5. PVPP dozajının artışı hem lakkaz uygulanmış hem de lakkaz uygulanmamış örneklerde hedef steviol glikozidlerin saflık düzeyini artırmıştır. Saflık düzeyinin artışı PVPP uygulaması sonucu toplam fenolik madde miktarındaki azalmayla ilişkilendirilmiştir. Lakkaz enzimi uygulanan örneklerde fenolik maddelerin oksidasyonu sonucu bu azalma daha belirgin şekilde gerçekleşmiştir. Lakkaz ve PVPP birlikte uygulandığı örneklerde fenolik madde miktarındaki azalmaya bağlı olarak antioksidan kapasitelerinde de azalma gözlenmiştir.
6. Lakkaz uygulanan örneklerde berraklık düzeyini ifade eden transmittans değeri uygulanmayan örneklere göre daha düşük olmuştur. PVPP dozajının artması tüm örneklerde transmittans değerini artırmıştır. En yüksek transmittans değeri (% 76.73) % 2 oranında PVPP uygulanan örnekte belirlenmiştir.
7. Lakkaz uygulanan örneklerin *L*, *a*, *b* değerleri oksidasyon sonucu gerçekleşen kararmaya bağlı olarak uygulanmayanlara kıyasla daha düşük bulunmuştur.
8. Çalışmanın bundan sonraki basamağında kontrol örneği, % 2 oranında PVPP ve hem lakkaz enzimi hem de % 2 oranında PVPP ile muamele edilen örnekler 50, 30, 10 ve 5 kDa ayırma sınırına sahip filtrelerden ultrafiltre edilmiştir. Ultrafiltrasyon uygulamasının steviosid ve rebaudiosid A miktarı üzerine etkisi önemli düzeydedir. Hem yalnız PVPP uygulanan hem de lakkaz ve PVPP'nin birlikte uygulandığı örneklerde ultrafiltrasyon işlemi ekstraktlarda steviosid ve rebaudiosid A'nın saflık oranını artırmıştır. En yüksek steviosid (% 26,39) ve rebaudiosid A (% 19,80) oranları lakkaz enzimi ardından % 2 oranında PVPP uygulanan ve 30 kDa filtreden elde edilen ekstraktta tespit edilmiştir.
9. Durultma sonrası enzim ve/veya adsorber uygulaması yapılmamış ekstraktın (1059 mg/L) ultrafiltre edilmesiyle elde edilen örneklerin TFM içeriği 384,62-477,20 mg/L arasında değişirken, PVPP uygulanan ekstraktın (440,66 mg/L) ve lakkaz enzimiyle birlikte PVPP uygulanan ekstraktın (196,77 mg/L) ultrafiltre edilmesiyle elde edilen örneklerin TFM içeriği sırasıyla 319,85-394,36 mg/L ve 155,60-196,77 mg/L aralığında değişmiştir. Lakkaz ve/veya PVPP uygulanmayan ekstraktın UF öncesi yüksek miktarda TFM içermesi sonucu ultrafiltrasyon sırasında filtre ayırma sınırına bağlı olarak bu bileşiklerin yanı sıra hedef steviol glikozidlerin de azalmasına yol açtığı düşünülmüştür. Steviosid ve rebaudiosid A'nın ultrafiltrasyon prosesinde filtreyi aşabilme eğilimi ile ortamdaki fenolik madde miktarı arasında doğrudan bir ilişki olduğu gözlemlenmiştir.
10. Lakkaz ve PVPP uygulanan örneklerin ultrafiltrasyon sonrası transmittans değerleri sadece PVPP uygulanan örneklerinkine göre daha düşük bulunmuştur.

11. Ekstraktların renginde açıklık-koyuluk düzeyini ifade eden L değeri ultrafiltrasyon sonrası artış göstermiştir. Lakkaz uygulanan örneklerde kırmızılığı ifade eden a değeri daha yüksek olurken, PVPP uygulanan örneklerde sarılığı gösteren b değeri daha yüksek olmuştur.
12. Araştırma sonuçları genel olarak incelendiğinde stevia ekstraksiyonun 25 °C’de dekantörde yüksek verimle başarılı bir şekilde gerçekleştirilebildiği, ekstrakttaki safsızlıkları gidermek için lakkaz enzimi ve/veya PVPP ile muamalenin uygulanabilirliği ve ultrafiltrasyon işlemi öncesi bu yöntemlerle özellikle fenolik maddelerin ortamdan uzaklaştırılması sonucu ultrafiltrasyon sonrası elde edilen ekstraktta steviosid ve rebaudiosid A oranlarının artırılabilceği görülmüştür.

Stevia bitkisinin yetiştiriciliği Türkiye için yeni bir tarımsal faaliyettir. Bununla birlikte gelişmiş ülkelerde obezite ve diyabet ile mücadele kapsamında gıda formülasyonlarında kullanımı yaygınlaşan bir üründür. Dolayısıyla ülkemizde de bitkinin değerlendirilmesi ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların bitkinin daha ekonomik ve çevreci yaklaşımlarla işlenmesi konusunda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- ABOU-ARAB, A.E., ABOU-ARAB, A.A. and ABU-SALEM, M.F. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. *African Journal of Food Science*, 4(5):269-281.
- AFANDI, A., SARIJAN, S. and SHAHA, R.K. 2013. Optimization of rebaudioside A extraction from *Stevia rebaudiana* (bertoni) and quantification by high performance liquid chromatography analysis. *Journal of Tropical Resources and Sustainable Sciences*, 1(1):62-70.
- ALPER, N. and ACAR, J. 2004. Removal of phenolic compounds in pomegranate juices using ultrafiltration and laccase-ultrafiltration combinations. *Food/Nahrung*, 48(3):184-187.
- ANONIM 2016.
http://www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu428/berrak_meyve_suyu_uretimi.pdf. Erişim tarihi:16.05.2016.
- ARTIK, N., KARHAN, M. and AYDAR, G. 2004. Effects of polyphenoloxidase (laccase) application on clarity stability of sour cherry juice. *Journal of Food Technology*, 2(4):237-243.
- ATTEH, J., ONAGBESAN, O., TONA, K., DECUYPERE, E., GEUNS, J. and BUYSE, J. 2008. Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(6):640-649.
- BARRIOCANAL, L.A., PALACIOS, M., BENITEZ, G., BENITEZ, S., JIMENEZ, J.T., JIMENEZ, N. and ROJAS, V. 2008. Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(1):37-41.
- BAYINDIRLI, L., SAHIN, S. and ARTIK, N. 1994. The effects of clarification methods on pomegranate juice quality. *Flüssiges Obst*, 61(9):267-270.
- BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A. and DEL RIO, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry*, 68(4):457-462.
- BENDER, C., GRAZIANO, S. and ZIMMERMANN, B.F. 2015. Study of *Stevia rebaudiana* Bertoni antioxidant activities and cellular properties. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66(5):553-558.

- BENDL, R.F., KANDEL, J.M., AMODEO, K.D., RYDER, A.M. and WOOLRIDGE, E.M. 2008. Characterization of the oxidative inactivation of xylanase by laccase and a redox mediator. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(2):149-156.
- BEVERIDGE, T. and RAO, M. 1997. Juice extraction from apples and other fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 37(5):449-469.
- BOONKAEWWAN, C. and BURODOM, A. 2013. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15):3820-3825.
- BRANDLE, J. and ROSA, N. 1992. Heritability for yield, leaf: stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, 72(4):1263-1266.
- BRANDLE, J.E. and TELMER, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry*, 68(14):1855-1863.
- BRUSICK, D. 2008. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7):83-91.
- CABAROĞLU, T. ve CANBAŞ, A. 1994. Şarapçılıkta durultma tekniği. *Gıda Dergisi*, 19(4):249-253.
- CASSANO, A., MARCHIO, M. and DRIOLI, E. 2007. Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination*, 212(1):15-27.
- CEMEROĞLU, B. ve KARADENİZ, F. 2004. Meyve suyu üretim teknolojisi. İçinde: CEMEROĞLU, B. (Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1, Başkent Kışe Matbaacılık, pp. 297-643, Ankara.
- CHATSUDTHIPONG, V. and MUANPRASAT, C. 2009. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & Therapeutics*, 121(1):41-54.
- CHERYAN, M. 1998. Ultrafiltration and microfiltration handbook. CRC press, 527p, Florida.
- CHHAYA, MONDAL, S., MAJUMDAR, G.C. and DE, S. 2012a. Clarifications of stevia extract using cross flow ultrafiltration and concentration by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 89:125-134.
- CHHAYA, SHARMA, C., MONDAL, S., MAJUMDAR, G.C. and DE, S. 2012b. Clarification of Stevia extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food and Bioproducts Processing*, 90(3):525-532.

- CRAMMER, B. and IKAN, R. 1986. Sweet glycosides from the Stevia plant. *Chemistry in Britain*, 22(10):915-917.
- CURRY, L.L. and ROBERTS, A. 2008. Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7):11-20.
- ÇOLAK, N. ve TÜLEK, Y. 2003. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu. *Gıda*, 28(3):313-320.
- DAS, A., GOLDER, A.K. and DAS, C. 2015a. Enhanced extraction of rebaudioside-A: Experimental, response surface optimization and prediction using artificial neural network. *Industrial Crops and Products*, 65:415-421.
- DAS, A., PAUL, D., GOLDER, A.K. and DAS, C. 2015b. Separation of Rebaudioside-A from stevia extract: Membrane selection, assessment of permeate quality and fouling behavior in laminar flow regime. *Separation and Purification Technology*, 144:8-15.
- DE OLIVEIRA, A.J.B., GONÇALVES, R.A.C., CHIERRITO, T.P.C., DOS SANTOS, M.M., DE SOUZA, L.M., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L. and IACOMINI, M. 2011. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry*, 129(2):305-311.
- DE OLIVEIRA, B.H., PACKER, J.F., CHIMELLI, M. and DE JESUS, D.A. 2007. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*. *Journal of Biotechnology*, 131(1):92-96.
- DIBLAN, S. ve ÖZKAN, M. 2013. Çeşitli durultma yardımcı maddelerinin kırmızı şarap antosiyaninleri üzerine etkisi. *GIDA/The Journal of FOOD*, 38(1):47-54.
- DUH, P.-D., TU, Y.-Y. and YEN, G.-C. 1999. Antioxidant activity of water extract of harng jyur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *LWT - Food Science and Technology*, 32(5):269-277.
- DÜZGÜNEŞ, O., KESICI, T., KAVUNCU, O. ve GÜRBÜZ, F. 1987. Araştırma ve Deneme metotları. *AÜ Ziraat Fakültesi Yayınları*, 1021:381.
- EKŞİ, A. 1988. Meyve suyu durultma tekniği. *Gıda Teknolojisi Dernegi Yayinlari*, 9:127.
- ERKMEN, O. 2010. Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53:220-235.
- ERKUCUK, A., AKGUN, I. and YESIL-CELIK TAS, O. 2009. Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 51(1):29-35.

- FERNÁNDEZ-LEÓN, M., FERNÁNDEZ-LEÓN, A., LOZANO, M., AYUSO, M., AMODIO, M., COLELLI, G. and GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. 2013. Retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2):302-313.
- FREDERICO, A.P., RUAS, P.M., MARIN-MORALES, M.A., RUAS, C.F. and NAKAJIMA, J.N. 1996. Chromosome studies in some *Stevia*. Cav.(Compositae) species from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*, 19(4):605-609.
- FUH, W.-S. and CHIANG, B.-H. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes. *Journal of Food Science*, 55(5):1454-1457.
- GARDANA, C., SCAGLIANTI, M. and SIMONETTI, P. 2010. Evaluation of steviol and its glycosides in *Stevia rebaudiana* leaves and commercial sweetener by ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(9):1463-1470.
- GEUNS, J. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5):913-921.
- GEUNS, J.M., BUYSE, J., VANKEIRSBILCK, A. and TEMME, E.H. 2007. Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental Biology and Medicine*, 232(1):164-173.
- GHANTA, S., BANERJEE, A., PODDAR, A. and CHATTOPADHYAY, S. 2007. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (bertoni) bertoni, a natural sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26):10962-10967.
- GIOVANETTO, R.H. 1990. Method for the recovery of steviosides from plant raw material. Google Patents.
- GIRARD, B. and FUKUMOTO, L. 2000. Membrane processing of fruit juices and beverages: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(2):109-175.
- GOYAL, S. and GOYAL, R. 2010. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food sciences and Nutrition*, 61:1-10.
- GÖKMEN, V., BORNEMAN, Z. and NIJHUIS, H.H. 1998. Improved ultrafiltration for color reduction and stabilization of apple juice. *Journal of Food Science*, 63(3):504-507.
- IBRAHIM, I., NASR, M., MOHAMMEDM, B. and EL-ZEFZAFI, M. 2008. Nutrient factors affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10(3):248-253.
- İRAT, A.M. 2010. Yapay tatlandırıcılar: Estetik için mi, sağlık için mi? *Türk Eczacıları Birliği Yayını*, Diyet ve Obezite(23-24):111-114.

- JAITAK, V., BANDNA, B.S. and KAUL, V. 2009. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Berton). *Phytochemical Analysis*, 20(3):240-245.
- JEPPESEN, P., GREGERSEN, S., ROLFSEN, S., JEPSEN, M., COLOMBO, M., AGGER, A., XIAO, J., KRUIHOFFER, M., ORNTOT, T. and HERMANSEN, K. 2003. Antihyperglycemic and blood pressure-reducing effects of stevioside in the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 52(3):372-378.
- KAUSHIK, R., NARAYANAN, P., VASUDEVAN, V., MUTHUKUMARAN, G. and USHA, A. 2010. Nutrient composition of cultivated stevia leaves and the influence of polyphenols and plant pigments on sensory and antioxidant properties of leaf extracts. *Journal of Food science and Technology*, 47(1):27-33.
- KIM, I.-S., YANG, M., LEE, O.-H. and KANG, S.-N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(5):1328-1332.
- KIM, S.-H. and DUBOIS, G. 1991. Natural high potency sweeteners. In, *Handbook of Sweeteners*, Springer, pp. 116-185.
- KINGHORN, A. and SOEJARTO, D. 1985. Current status of stevioside as a sweetening agent for human use. In: WAGNER, H., HIKINO, H., FARNSWORTH, N. *Economics and Medicinal Plant Research*, Academic Press, pp. 1-52, London, UK.
- KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. and TANAKA, O. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 15(6):981-983.
- KOVYLYAEVA, G., BAKALEINIK, G., STROBYKINA, I.Y., GUBSKAYA, V., SHARIPOVA, R., AL'FONSOV, V., KATAEV, V. and TOLSTIKOV, A. 2007. Glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 43(1):81-85.
- KOYAMA, E., SAKAI, N., OHORI, Y., KITAZAWA, K., IZAWA, O., KAKEGAWA, K., FUJINO, A. and UI, M. 2003. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food and Chemical Toxicology*, 41(6):875-883.
- KROP, J.J.P. and PILNIK, W. 1974. Effect of pectic acid and bivalent cations on cloud loss of citrus juice. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 7:62-73.
- KUBERKAR, V.T. and DAVIS, R.H. 2001. Microfiltration of protein-cell mixtures with crossflushing or backflushing. *Journal of Membrane Science*, 183(1):1-14.

- KUMAR, S. 1986. Method for recovery of stevioside. Google Patents.
- LEMUS-MONDACA, R., VEGA-GÁLVEZ, A., ZURA-BRAVO, L. and AH-HEN, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3):1121-1132.
- LI, W., ZHENG, H., BUKURU, J. and DE KIMPE, N. 2004. Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1):1-22.
- LIU, J., LI, J.-W. and TANG, J. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioproducts Processing*, 88(2–3):215-221.
- MAHIDOL, C., PRAWAT, H. and RUCHIRAWAT, S. 1997. Natural products for the improvement of the quality of life. *Pure and Applied Chemistry*, 69(4):655-658.
- MAKI, K., CURRY, L., REEVES, M., TOTH, P., MCKENNEY, J., FARMER, M., SCHWARTZ, S., LUBIN, B., BOILEAU, A. and DICKLIN, M. 2008. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7):47-53.
- MANTOVANELI, I., FERRETTI, E., SIMÕES, M. and SILVA, C. 2004. The effect of temperature and flow rate on the clarification of the aqueous stevia-extract in a fixed-bed column with zeolites. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 21(3):449-458.
- MISHRA, P., SINGH, R., KUMAR, U., PRAKASH, V. 2010. *Stevia rebaudiana* – A magical sweetener. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5:62-74.
- MONDAL, S., CHHAYA and DE, S. 2012. Prediction of ultrafiltration performance during clarification of stevia extract. *Journal of Membrane Science*, 396:138-148.
- MONDAL, S., RAI, C. and DE, S. 2013. Identification of fouling mechanism during ultrafiltration of stevia extract. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4):931-940.
- NEIFAR, M., ELLOUZE-GHORBEL, R., KAMOUN, A., BAKLOUTI, S., MOKNI, A., JAOUANI, A. and ELLOUZE-CHAABOUNI, S. 2011. Effective clarification of pomegranate juice using laccase treatment optimized by response surface methodology followed by ultrafiltration. *Journal of Food Process Engineering*, 34(4):1199-1219.
- ONSEKIZOĞLU, P. 2015. Membran Ayırma. İçinde: BAYSAL, T. and İÇIER, F. Gıda Mühendisliğine Giriş, Nobel Akademik Yayıncılık, pp. 645-674, Ankara.

- PANPATIL, V.V. and POLASA, K. 2008. Assessment of stevia (*Stevia rebaudiana*)-- Natural sweetener: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 45(6):467.
- PAYZANT, J.D., LAIDLER, J.K. and IPPOLITO, R.M. 1999. Method of extracting selected sweet glycosides from the *Stevia rebaudiana* plant. Google Patents.
- PÓL, J., OSTRÁ, E.V., KARÁSEK, P., ROTH, M., BENEŠOVÁ, K., KOTLAŘÍKOVÁ, P. and ČÁSLAVSKÝ, J. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(8):1847-1857.
- PURI, M., SHARMA, D. and BARROW, C.J. 2012. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30(1):37-44.
- RAI, C., MAJUMDAR, G. and DE, S. 2012. Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using response surface methodology. *Separation Science and Technology*, 47(7):1014-1022.
- RAI, P., MAJUMDAR, G.C., SHARMA, G., DAS GUPTA, S. and DE, S. 2006. Effect of various cutoff membranes on permeate flux and quality during filtration of mosambi (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice. *Food and Bioproducts Processing*, 84(3):213-219.
- RAO, G.N., RAO, P.P., BALASWAMY, K. and SATYANARAYANA, A. 2013. Antioxidant activity of stevia (*Stevia rebaudiana* L.) leaf powder and a commercial stevioside powder. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 2(2):32-38.
- REIS, M.H.M., DA SILVA, F.V., ANDRADE, C.M.G., REZENDE, S.L., WOLF MACIEL, M.R. and BERGAMASCO, R. 2009. Clarification and purification of aqueous stevia extract using membrane separation process. *Journal of Food Process Engineering*, 32(3):338-354.
- ROY, A. and DE, S. 2014. Extraction of steviol glycosides using novel cellulose acetate phthalate (CAP) – Polyacrylonitrile blend membranes. *Journal of Food Engineering*, 126:7-16.
- ROY, A. and DE, S. 2015. Resistance-in-series model for flux decline and optimal conditions of Stevia extract during ultrafiltration using novel CAP-PAN blend membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 94:489-499.
- SAVITA, S., SHEELA, K., SUNANDA, S., SHANKAR, A. and RAMAKRISHNA, P. 2004. Stevia rebaudiana--A functional component for food industry. *Journal of Human Ecology*, 15(4):261-264.

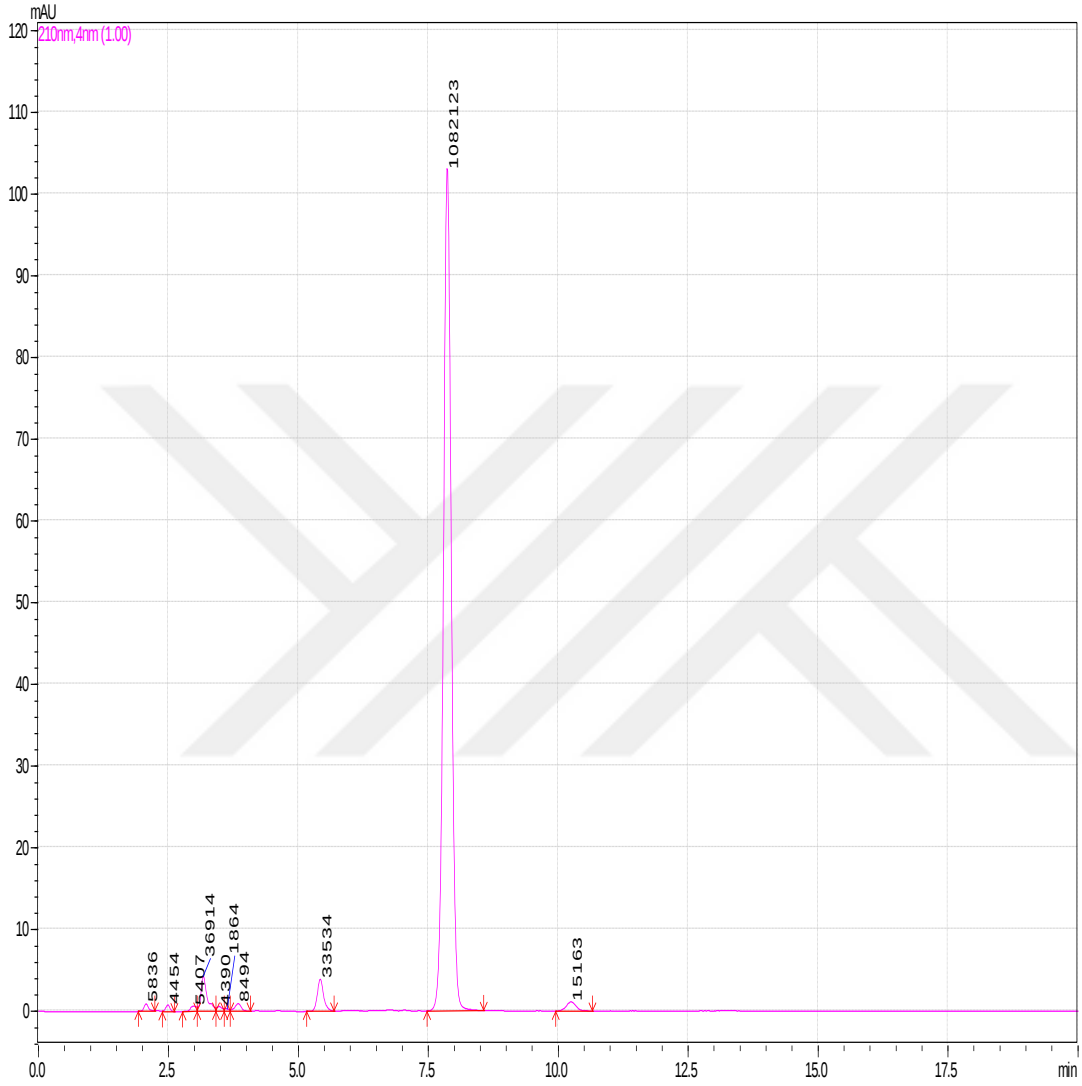
- SERIO, L. 2010. La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre. *Phytothérapie*, 8(1):26-32.
- SHEET, B.S., ARTIK, N., AYED, M.A. and ABDULAZIZ, O.F. 2014. Some alternative sweeteners (xylitol, sorbitol, sucralose and stevia): review. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 4(1):63-70.
- SHIVANNA, N., NAIKA, M., KHANUM, F. and KAUL, V.K. 2013. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Diabetes and its Complications*, 27(2):103-113.
- SHUKLA, S., MEHTA, A., BAJPAI, V.K. and SHUKLA, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9):2338-2343.
- SHUKLA, S., MEHTA, A., MEHTA, P. and BAJPAI, V.K. 2012. Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 64(7-8):807-811.
- SILVA, F.V., BERGAMASCO, R., ANDRADE, C.M.G., PINHEIRO, N., MACHADO, N.R.C.F., REIS, M.H.M., DE ARAÚJO, Á.A. and REZENDE, S.L. 2007. Purification process of stevioside using zeolites and membranes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 5(1):1-7.
- SINGH, S. and RAO, G. 2005. Stevia: the herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech*, 7(1):17-24.
- SIVARAM, L. and MUKUNDAN, U. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(5):520-523.
- SOEJARTO, D., COMPADRE, C., MEDON, P., KAMATH, S. and KINGHORN, A.D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany*, 37(1):71-79.
- SOEJARTO, D.D., KINGHORN, A.D. and FARNSWORTH, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of stevia leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products*, 45(5):590-599.
- SPANOS, G.A. and WROLSTAD, R.E. 1992. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(9):1478-1487.
- TADHANI, M. and SUBHASH, R. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. *Journal of Medical Science*, 6(3):321-326.

- TADHANI, M.B., PATEL, V.H. and SUBHASH, R. 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4):323-329.
- TEO, C.C., TAN, S.N., YONG, J.W.H., HEW, C.S. and ONG, E.S. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Separation Science*, 32(4):613-622.
- TOSUN, J. 2013. Stevia-based sweeteners as a food additive. In, *Risk Regulation in Europe*, Springer, pp. 83-95.
- TOTTÉ, N., CHARON, L., ROHMER, M., COMPERNOLLE, F., BABOEUF, I. and GEUNS, J.M. 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters*, 41(33):6407-6410.
- TOYODA, K., MATSUI, H., SHODA, T., UNEYAMA, C., TAKADA, K. and TAKAHASHI, M. 1997. Assessment of the carcinogenicity of stevioside in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35(6):597-603.
- VANNESTE, J., SOTTO, A., COURTIN, C.M., VAN CRAEYVELD, V., BERNAERTS, K., VAN IMPE, J., VANDEUR, J., TAES, S. and VAN DER BRUGGEN, B. 2011. Application of tailor-made membranes in a multi-stage process for the purification of sweeteners from *Stevia rebaudiana*. *Journal of Food Engineering*, 103(3):285-293.
- WHEELER, A., BOILEAU, A., WINKLER, P., COMPTON, J., PRAKASH, I., JIANG, X. and MANDARINO, D. 2008. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food and Chemical Toxicology*, 46(7):54-60.
- WOELWER-RIECK, U., LANKES, C., WAWRZUN, A. and WÜST, M. 2010. Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231(4):581-588.
- WOJDYŁO, A., OSZMIAŃSKI, J. and CZEMERYŚ, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3):940-949.
- WOELWER-RIECK, U., TOMBERG, W. and WAWRZUN, A. 2010. Investigations on the stability of stevioside and rebaudioside A in soft drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23):12216-12220.
- YILDIZ-OZTURK, E., NALBANTSOY, A., TAG, O. and YESIL-CELIK TAS, O. 2015. A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities. *Industrial Crops and Products*, 77:961-971.

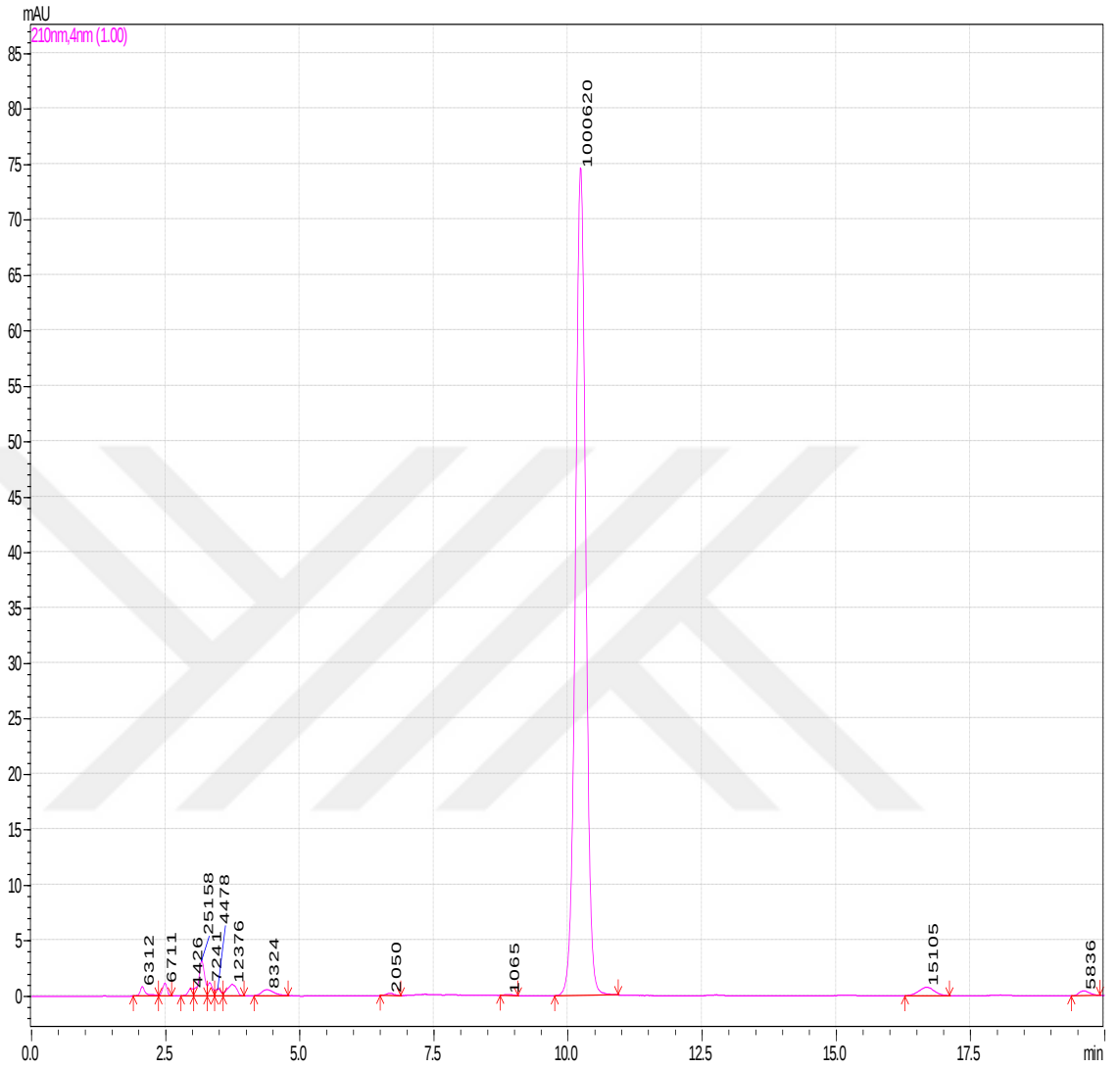
- YILDIZ-OZTURK, E., TAG, O. and YESIL-CELIK TAS, O. 2014. Subcritical water extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves and characterization of the raffinate phase. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95:422-430.
- YOSHIKAWA, S., ISHIMA, T. and KATAYAMA, O. 1979. Taste of components of stevioside. *Abstracts of Papers of The American Chemical Society*, 74-74.
- YÜCESAN, B. 2015. Stevia (*Stevia rebaudiana*) ve ikinci şeker devrimi. [http://www.ulusaltarim.com/2824/Stevia-\(Stevia-rebaudiana\)-ve-ikinci-seker-devrimi](http://www.ulusaltarim.com/2824/Stevia-(Stevia-rebaudiana)-ve-ikinci-seker-devrimi). Erişim tarihi: 22.05.16.
- ZHANG, S.Q., KUMAR, A. and KUTOWY, O. 2000. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Research International*, 33(7):617-620.

7. EKLER

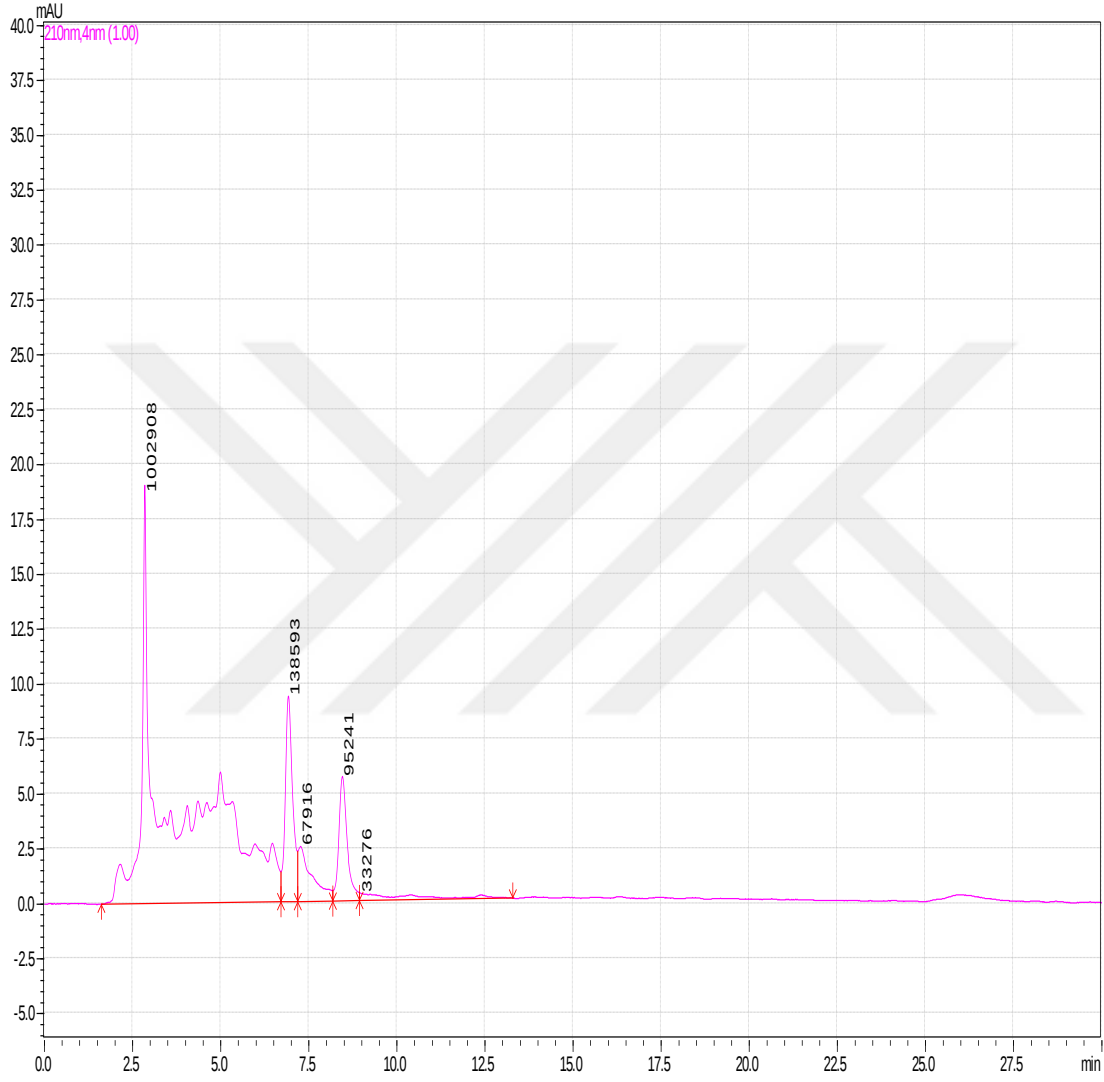
EK-1 Steviosid standardına (200 ppm) ait kromatogram



EK-2 Rebaudiosid A standardına (200 ppm) ait kromatogram



EK-3 Stevianın dekantör ekstraksiyonu için belirlenen optimum koşullarda (25 °C sıcaklık, 101 dakika ekstraksiyon süresi, 1/27,6 bitki/su oranı, 5280 devir/dak dekantör devir hızı) gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakta ait kromatogram



ÖZGEÇMİŞ



Aslı ARSLAN KULCAN 1985 yılında Edirne’de doğdu. İlk öğrenimini Edirne’de, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 2004 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden 2008 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. Eylül 2008-Haziran 2010 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı ve aynı yıl Eylül ayında doktora öğrenimine başladı. Aslı ARSLAN KULCAN, 2011 yılından beri Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

