EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

STEVIA REBAUDIANA YAPRAKLARINDAN STEVİOL GLİKOZİTLERİN FARKLI YÖNTEMLER İLE EKSTRAKSİYON SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU VE RAFİNAT FAZIN KARAKTERİZASYONU

Ece YILDIZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 612.01.01

Sunuş Tarihi: 18.07.2014

Bornova-İZMİR

2014

Ece YILDIZ tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan **"*Stevia rebaudiana* yapraklarından steviol glikozitlerin farklı yöntemler ile ekstraksiyon sürecinin optimizasyonu ve rafinat fazın karakterizasyonu"** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.07.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri: **İmza**

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ .....

Raportör Üye: Prof. Dr. Erdal BEDİR .....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ruhan AŞKIN UZEL .....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum "***Stevia rebaudiana* yapraklarından steviol glikozitlerin farklı yöntemler ile ekstraksiyon sürecinin optimizasyonu ve rafinat fazın karakterizasyonu**" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

01/08/2014

ECE YILDIZ

ÖZET

STEVIA REBAUDIANA YAPRAKLARINDAN STEVİOL GLİKOZİTLERİN FARKLI YÖNTEMLER İLE EKSTRAKSİYON SÜRECİNİN OPTİMİZASYONU VE RAFİNAT FAZIN KARAKTERİZASYONU

YILDIZ, Ece

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ
Temmuz 2014, 116 sayfa

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında doğal ve kalorisiz tatlandırıcı özelliği olan *Stevia rebaudiana* bitkisinin yapraklarından farklı yöntemler ile (subkritik su ekstraksiyonu (SSE), mikrodalga ekstraksiyon (MDE), ultrasonik ekstraksiyon (USE) ve Soxhlet ekstraksiyonu) içeriğindeki steviol glikozitlerin ekstraksiyonu, optimum ekstraksiyon koşullarının belirlenmesi, elde edilen ekstrelerin biyolojik - sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve ekstraksiyon sonrası elde edilen rafinat fazın karakterizasyonu ile farklı sektörlerde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. *Stevia rebaudiana*'nın farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstrelerinin HPLC analizi ile miktar tayinleri yapılmıştır. Box-Bhenken deneysel tasarım programı kullanılarak optimizasyon yapılmıştır. Subkritik su ekstraksiyonu için optimum çalışma koşulları 125 ^{o}C, 45 dk, 4 ml/dk olarak belirlenmiştir. Mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonları için optimum çalışma koşulları sırasıyla 90 ^{o}C, 45 dk, 1:10 (g/ml), 400 W ve 90 ^{o}C, 45 dk, 1:15 (g/ml), 75 W olarak belirlenmiştir. Gram kuru yaprak başına elde edilen en yüksek glikozit miktarı subkritik su ekstraksiyonunda 74.35 mg/g, mikrodalga etanol ekstraksiyonunda 21.21 mg/g, mikrodalga su ekstraksiyonunda 23.63 mg/g, ultrasonik etanol ekstraksiyonunda 14.09 mg/g, ultrasonik su ekstraksiyonunda 30.72 mg/g, Soxhlet ekstraksiyonunda 26.33 mg/g olarak bulunmuştur. En yüksek ekstraksiyon verimi (0.489 g/g) ve verimliliği (0.011 g/g/dk) subkritik su ekstraksiyonunda elde edilmiştir. En

yüksek fenol içeriği (86.47 mg gallik asit/g) ve flavonoit içeriği (126.7 mg kersetin/g) ultrasonik etanol ekstresinde elde edilmiştir. DPPH serbest süpürme aktiviteleri ise elde edilen tüm su ve etanol ekstrelerinde %91-93 olarak bulunmuştur. Ayrıca farklı dozlardaki Stevia ekstrelerinin (50 μg/ml, 5 μg/ml ve 0.5 μg/ml) farklı kanser hücre hatları (HeLa, A-549, MCF-7, CaCo-2, mPANC96, PC-3, U87MG), sağlıklı hücre hattı (HEK) ve makrofaj hücre hattı (RAW264.7) üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. iNOS aktivite inhisiyon testi için farklı dozlardaki Stevia ekstrelerinin (100 μg/ml, 10 μg/ml ve 1 μg/ml) RAW264.7 makrofaj hücre hattı üzerindeki etkisi taranmıştır. En etkili IC50 değeri (68 μg/ml), mikrodalga etanol ekstresinin uygulandığı makrofaj hücre hattında bulunmuştur. Ekstraksiyon sonrası elde edilen rafinat fazlardaki toplam klorofil, karotenoit içerikleri ve toplam diyet lif oranları sırasıyla etanol fazında 15.15 mg/100 g, 2.93 mg/100 g ve %6.53 iken; sulu fazda 31.91 mg/100 g, 5.71 mg/100 g ve %4.98 olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışması steviol glikozitlerin endüstriyel ölçek üretimi için subkritik su ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunun yapıldığı ilk detaylı çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: *Stevia rebaudiana*, Subkritik Su Ekstraksiyonu, Mikrodalga Ekstraksiyonu, Ultrasonik Ekstraksiyon, steviozit, rebaudiosit A, Box-Behnken, biyolojik aktivite, sitotoksik aktivite, iNOS inhibisyonu, rafinat faz

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF EXTRACTION OF STEVIOL GLYCOSIDES FROM *STEVIA REBAUDIANA* BY USING DIFFERENT EXTRACTION METHODS AND CHARACTERIZATION OF RAFINATE PHASE

YILDIZ, Ece

MSc Thesis in Bioengineering Department
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ozlem YESIL CELIKTAS
July 2014, 116 pages

Aims of this thesis were to obtain steviol glycosides of *S. rebaudiana* leaves, possesing natural and noncaloric sweetener properties, using different extraction methods (subcritical water extraction, microwave assisted extraction, ultrasound assisted extraction and Soxhlet extraction); to determine optimum extraction conditions; to determine biological and cytotoxic activities of Stevia extracts; to characterize the rafinate phase after extractions and to determine utility of the rafinate phase in different sectors. Quantification of Stevia extracts obtaining from different extraction methods were carried out in HPLC analysis. Box-Bhenken design method was used for optimization of the process. Optimum conditions were elicited as 125 ^{o}C, 45 min, 4 ml/min flow rate for subcritical water extraction. Optimum conditions were elicited as 90 ^{o}C, 45 min, 1:10 (g/ml), 400 W for microwave assisted extraction and 90 ^{o}C, 45 min, 1:15 (g/ml), 75 W for ultrasound assisted extraction. Total yields of glycosides were 74.35 mg/g in subcritical water extraction, 21.21 mg/g in microwave assisted ethanol extraction, 23.63 mg/g in microwave assisted water extraction, 14.09 mg/g in ultrasound assisted ethanol extraction, 30.72 mg/g in ultrasound assisted water extraction and 26.33 mg/g in Soxhlet extraction per gram dried leaves. The highest extraction yield (0.489 g/g) and productivity (0.011 g/g/min) were obtained in subcritical water extraction. The highest total phenolic content (86.47 mg gallic acid/g) and flavonoid content (126.7 mg quercetin/g) were obtained in ultrasound assisted ethanol extract. DPPH free radical scavenging activity were found as 91–93% in

all of water and ethanolic extracts. Moreover no cytotoxicity was found in different cancer cell lines (HeLa, A-549, MCF-7, CaCo-2, mPANC96, PC-3, U87MG), healthy cell line (HEK) and macrophage cell line (RAW264.7) that were treated with Stevia extracts in different doses (50 μg/ml, 5 μg/ml ve 0.5 μg/ml). The effect of Stevia extracts in different doses (100 μg/ml, 10μg/ml and 1 μg/ml) on RAW264.7 macrophage cell line was investigated for iNOS activity inhibition test. The most efficient IC50 value (68 μg/ml) were found in macrophage cell line that was treated with microwave ethanolic exctracts. After extraction, total chlorofil content, total carotenoid content and total dietary fiber rate were elicited as 15.15 mg/100 g, 2.93 mg/100 g and %6.53 in ethanol rafinate phase and 31.91 mg/100 g, 5.71 mg/100 g and %4.98 in water rafinate phase respectively. This study is the first detailed work about the optimization of subcritical water extraction conditions in steviol glycosides production for industrial scale up.

Key Words: *Stevia rebaudiana*, Subcritical Water Extraction, Microwave Extraction, Ultrasound Extraction, steviozit, rebaudiozit A, Box-Behnken, biological activity, cytotoxic activity, iNOS inhibition, rafinate phase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tez araştırmamın planlanması, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesi sırasında bana yol gösteren ve destekleyen, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışma sürecinde HPLC analizlerinin gerçekleştirilmesindeki değerli katkılarından dolayı tez jürim Prof. Dr. Erdal BEDİR'e, HPLC analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Özgür TAĞ ve Şeref AKAY'a, sitotoksik ve iNOS inhibisyon aktivite çalışmalarını birlikte gerçekleştirdiğimiz Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a, rafinat faz içeriğinin belirlenmesine yönelik çalışmalarımın Çevre Biyoteknolojisi laboratuarında gerçekleştirilmesi sırasında bana yardımcı olan Elif AKSÖYEK PEKGÜZEL'e ve Öncül Akışkan Teknolojileri ve Uygulamaları Laboratuarı çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesi sırasında TÜBİTAK 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı desteği ile bana sekiz ay burs sağlayan TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu dönemde de maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme ve yüksek öğretim hayatımız boyunca birlikte yol aldığımız, sevinçleri ve hüzünleri beraber yaşadığımız sevgili nişanlım Bülent ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET vii

ABSTRACT ix

TEŞEKKÜR xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvii

1.GİRİŞ 1

2.LİTERATÜR ÖZETİ……3

2.1. Dünya'daki ve Türkiye'deki Obezite ve Tip 2 Diyabet Hastalıklarının Durumu……...3

2.2. Tatlandırıcılar ve Özellikleri…….4

2.3. Stevia rebaudiana Bertoni.……7

2.3.1. Stevia bitkisinin botanik özellikleri…….7

2.3.2. Stevia'nın tarımı……..……..8

2.3.3. Stevia yapraklarının bileşimi ve kimyasal özellikleri 10

2.3.4. Steviol glikozitlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri 13

2.3.5. Steviol glikozitlerin kullanılabilirliği 15

2.3.6. Steviol glikozitlerin metabolizması 15

2.4. *Stevia rebaudiana*'nın Ekstraksiyonu ve Analiz Yöntemleri 16

2.5. Ekstraksiyon Teknikleri 18

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

2.5.1. Soxhlet ekstraksiyonu..... 19

2.5.2. Ultrasonik ekstraksiyon 20

2.5.3. Mikrodalga ekstraksiyonu..... 21

2.5.4. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu..... 23

2.6. Optimizasyon 26

2.7. iNOS İnhibisyon Mekanizması ve Nitrik Oksidin Rolü 27

3. MATERYAL VE METOT..... 28

3.1. Materyal..... 28

3.1.1. Hammadde temini 28

3.1.2. Kullanılan kimyasallar..... . 28

3.1.3. Kullanılan cihazlar…….…….28

3.2. Metot……..…….....29

3.2.1. Uygulanan ekstraksiyon yöntemleri…….……..…….29

3.2.2. Yüksek basınçlı sıvı kromatogafisi (HPLC) analizleri……...…...36

3.2.3. Box-Behnken metodu ile optimizasyon……..……..38

3.2.4. Optimum koşullarda elde edilen ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin

belirlenmesi……..…….……41

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

3.2.5. Optimum koşullarda elde edilen ekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin berlirlenmesi……..……..42

3.2.6. Rafinat fazın karakterizasyonu…….……...46

4. BULGULAR VE TARTIŞMA…….…….52

4.1. Stevia'dan Elde Edilen Steviol Glikozitlerin HPLC Analiz Sonuçları…...…52

4.2. Subkritik Su Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları…….…..53

4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları……...……...…..53

4.4. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Steviol Glikozit Miktarlarının ve Ekstre Verim-Verimlilik Değerlerinin Karşılaştırılması…….…..55

4.5. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon..... 58

4.5.1. Subkritik su ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu 58

4.5.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu……..……69

4.5.3. Ultrasonik tabanlı ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu…….....74

4.6. Optimum Koşullarda Elde Edilen Ekstrelerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi…….…….…….79

4.6.1. Toplam fenol tayini sonuçları……..…….……...79

4.6.2. DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi sonuçları……..…….....81

İÇİNDEKİLER (Devam)

Sayfa

4.6.3. Toplam flavonoit tayini sonuçları……..……..…...84

4.7. Rafinat Fazın Karakterizasyonu..... 87

4.7.1. Toplam klorofillerin ve karotenoitlerin belirlenmesi 87

4.7.2. Toplam diyet liflerinin kantitatif analizi..... 88

4.8. Sitotoksisite Testi Sonuçları 90

4.9. iNOS Aktivitesinin İnhibisyonu Sonuçları..... ….....94

4.10. Makrofaj Hücre Hattı İçin MTT Testinin Sonuçları 95

5. SONUÇ..... 96

6. ÖNERİLER..... ..100

KAYNAKLAR DİZİNİ…….…..…101

ÖZGEÇMİŞ……..…111

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Stevia rebaudiana 8

2.2. Stevia rebaudiana bitkisi ve çiçeği 9

2.3. Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları 12

2.4. Suyun faz diyagramı grafiği 24

3.1. Ekstraksiyonda kullanılmadan önce kurutulmuş haldeki *Stevia rebaudiana* bitkisi ..... .28

3.2. Soxhlet ekstreörü ile gerçekleştirilen *S. rebaudiana* çözgen ekstraksiyonu 29

3.3. S. rebaudiana ekstrelerindeki çözgenlerin uçurulmasında kullanılan vakumlu döner evaporatör 30

3.4. Stevia rebaudiana'nın mikrodalga ekstraksiyonu 30

3.5. Stevia rebaudiana'nın ultrasonik ekstraksiyonu 31

3.6. Soxhlet, mikrodalga ve ultrasonik etanol ekstraksiyonları sonrasında elde edilen rafinat faz 32

3.7. *Stevia rebaudiana*'nın yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu 33

3.8. Subkritik su ekstraksiyonu sonrasında elde edilen rafinat faz 35

3.9. Yüksek basınçlı sıcak su ekstrelerinden suyun uçurulması için kullanılan liyofilizasyon cihazı 35

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

3.10. Liyofilizasyon sonrası elde edilen steviol glikozitler 36

3.11. Ekstrelerin ve rafinat fazların analiz edildiği Thermo Scientific HPLC sistemi..... 37

3.12. Hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a) HeLa, (b) A-549, (c) MCF-7, (d) CaCo-2, (e) mPANC96, (f) PC-3, (g) U87MG, (h) HEK, (ı) RAW264 43

3.13. Su ve etanol rafinat fazlarının 15 saat %85 asetonda bekletilmesi..... 47

3.14. Etanol rafinat fazının 1 saat (a) ve 1 gece (b) sonraki çökelmesi 48

3.15. Su rafinat fazının 1 saat (a) ve 1 gece (b) sonraki çökelmesi ..... .48

3.16. Filtrasyon için kullanılan Sartorious vakumlu filtrasyon cihazı..... .49

3.17. Etanol ve su rafinat fazlarının filtrasyonu sonrası elde edilen filtratlar 49

3.18. Filtre keklerinin yakılması için kullanılan 550 ^{o}C'deki kül fırını..... 50

3.19. Filtre keklerinin kurutulması için kullanılan 105 ^{o}C'lik fırın..... 50

3.20. Filtrasyon sonrası elde edilen filtratlar 51

4.1. Stevia rebaudiana HPLC kromatogramı..... 52

4.2. Steviozit ve Rebaudiosit A standartlarının HPLC kromatogramı..... 52

4.3. Subkritik su ekstresinin HPLC kromatogramı 53

4.4. Soxhlet etanol ekstresinin HPLC kromatogramı 53

4.5. Mikrodalga etanol ekstresinin HPLC kromatogramı 54

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.6. Mikrodalga su ekstresinin HPLC kromatogramı 54

4.7. Ultrasonik etanol ekstresinin HPLC kromatogramı 55

4.8. Ultrasonik su ekstresinin HPLC kromatogramı 55

4.9. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin gram kuru yaprak başına düşen steviol glikozit verimlerine göre karşılaştırılması 56

4.10. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin ekstre verim ve verimliliklerinin karşılaştırılması..... 57

4.11. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (ºC) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Akış hızı optimum değerinde (4 ml/dk) sabit tutulmuştur 62

4.12. Rebaudiozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zaman optimum değeri olan 45 dk'da sabit tutulmuştur..... 64

4.13. Rebaudiozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) zaman (dk) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 125 ^{o}C'de sabit tutulmuştur..... 65

4.14. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Akış hızı optimum değeri olan 4 ml/dk'da sabit tutulmuştur 66

4.15. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zaman optimum değeri olan 45 dk'da sabit tutulmuştur..... 67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.16. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) zaman (dk) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 125 ^{o}C'de sabit tutulmuştur 68

4.17. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 400'de sabit tutulmuştur ..... .72

4.18. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 400'de sabit tutulmuştur..... .73

4.19. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 75'de sabit tutulmuştur ..... .77

4.20. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 75'de sabit tutulmuştur..... .78

4.21. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin toplam fenol konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması..... .80

4.22**.** *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin toplam fenol konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması..... .80

4.23. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından karşılaştırılması ..... .82

4.24. *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından karşılaştırılması 83

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.25. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin toplam flavonoit konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması 85

4.26. *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin toplam flavonoit konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması 85

4.27. Ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 100 g kuru yaprak başına içerdikleri toplam klorofil ve karotenoit miktarlarının karşılaştırılması..... 87

5.1. *Stevia rebaudiana*'nın ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması ve elde edilen maksimum steviol glikozit, verim-verimlilik değerleri 97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

2.1. Doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri 6

2.2. Stevia'nın besin içeriği (kuru madde esasına göre; 100 g'da)..... 11

3.1. BBD programı tarafından 15 deneme için oluşturulan deney deseni 38

3.2. BBD programı tarafından mikrodalga ekstraksiyonu 27 deneme için oluşturulan deney deseni 39

3.3. BBD programı tarafından ultrasonik ekstraksiyon 27 deneme için oluşturulan deney deseni 40

4.1. Subkritik su ekstraksiyonu için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları 58

4.2. Y_1, Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box-Bhenken/Analyses/ANOVA) 59

4.3. Subkritik su ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları ..... .69

4.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları 69

4.5. Y_1, Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box- Bhenken/Analyses/ANOVA) 70

4.6. Mikrodalga ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları 74

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

Cizelge **Sayfa**

4.7. Ultrasonik tabanlı ekstraksiyon için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları 74

4.8. Y_1, Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box-Bhenken/Analyses/ANOVA 75

4.9. Ultrasonik ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları 79

4.10. Ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 1 g kuru rafinat başına içerdikleri çökelti ağırlıkları, protein ve kül miktarları 89

4.11. HeLa kanser hücre hattı için % canlılık oranları 90

4.12. A549 kanser hücre hattı için % canlılık oranları 91

4.13. PC3 kanser hücre hattı için % canlılık oranları 91

4.14. CaCo-2 kanser hücre hattı için % canlılık oranları 91

4.15. MPank kanser hücre hattı için % canlılık oranları 92

4.16. MCF-7 kanser hücre hattı için % canlılık oranları ..... .92

4.17. U87MG kanser hücre hattı için % canlılık oranları ..... .92

4.18. HeK kanser hücre hattı için % canlılık oranları 93

4.19. iNOS Aktivitesinin İnhibisyonu Sonuçları 95

4.20. RAW264.7 makrofaj hücre hattı için % canlılık oranları 95

1. GİRİŞ

Ülkemizde şeker otu olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni, aslen Güney Amerika`da yetişen uzun ömürlü bir bitkidir ve sakkarozdan 300 kat daha tatlı, düşük kalorili tatlandırıcılardan olan diterpen glikozitleri içermektedir. Stevia, kuru yapraklarındaki yüksek orandaki tatlı diterpen (%4–20) içeriği ile bilinmektedir. Stevia yapraklarına tatlılık veren başlıca steviol glikozitler, steviozit, rebaudiozit A (Reb A), rebaudiozit C ve dulkozit A`dır. Steviozit ve rebaudiozit A, ilgilenilen ana tatlandırıcı bileşiklerdir (Lemus-Mondaca et al., 2012). Stevia ekstrelerinin antioksidan, antimikrobiyal ve antifungal aktivite gibi terapötik özellikleri de bulunmaktadır (Tadhani et al., 2007; Shukla et al., 2009; Muanda et al., 2009; Suk Kim et al., 2011; Shivanna et al., 2012). Stevia glikozitlerinden biri olan steviozit obezite, şeker hastalığı, kalp hastalığı ve diş çürüklerinde ve ayrıca diyetlerinde karbonhidrat alımını sınırlamak zorunda olan kişilere yararlı olabilmektedir (Shivanna et al., 2012). Çok sayıdaki çalışma rebaudiozit A, steviol ve izosteviolü içeren bileşikler arasında steviozitin tatlılığının yanı sıra anti-hiperglisemik, anti-hipertansif, anti-inflamatuvar, anti-tümör, anti-diyareik ve diüretik etkiler gibi terapötik yararları da olduğunu göstermiştir (Chatsudthipong and Muanprasat, 2009). Toksikolojik çalışmalar steviozitin mutajenik, teratojenik, alerjenik ve karsinojenik etkilerinin olmadığını göstermiştir (Pól, Hohnová, et al., 2007). İki bin sekiz yılının Aralık ayında Stevia'dan elde edilen saflaştırılmış rebaudiozit A'nın ürünlerde kullanımına Fransa'da izin verilirken, 2011 yılında çıkan bir yönetmelik ile Stevia ekstresinin AB ülkelerinde kullanımının önü açılmıştır.

Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında doğal ve kalorisiz tatlandırıcı özelliği olan *Stevia rebaudiana* yapraklarından farklı yöntemler ile (subkritik su ekstraksiyonu (SSE), mikrodalga ekstraksiyonu (MDE), ultrasonik ekstraksiyon (USE) ve Soxhlet ekstraksiyonu) içeriğindeki steviol glikozitlerin ekstraksiyonu, çalışma koşullarının optimizasyonu ve ekstraksiyon sonrası elde edilen rafinat fazın karakterizasyonu ile farklı sektörlerde kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu çalışma ile 21. yüzyılın en önemli küresel sağlık sorunu olan obezitenin önlenmesine karşı bitkisel bir ürün olan Stevia'nın

ekstraksiyon basamağında yüksek verimde ürün eldesi için optimum çalışma koşulları laboratuar ölçekli aşamalar ile belirlenerek, ileride yapılabilecek endüstriyel çaptaki üretimlerde kullanılmak üzere en etkin yöntemin ve koşulların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanısıra Stevia bitkisinin sadece steviol glikozitlerinin değil, ekstraksiyon sonrası kalan rafinat fazının fiberler, pigmentler bakımından kompozisyonu belirlenerek katma değeri yüksek yan ürünlere dönüştürülebilme potansiyeli ortaya konmuştur. Özetle bu çalışma; Stevia'nın bir bütün olarak değerlendirildiği, farklı yöntemlerin bir arada incelenerek ileride yapılabilecek büyük ölçek üretimler için en uygun yöntemin ve koşulların belirlendiği bir çalışma olmuştur.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Dünya'daki ve Türkiye'deki Obezite ve Tip 2 Diyabet Hastalıklarının Durumu

Obezite ve diyabet, tüm dünyada gittikçe artan önemli bir hastalık ve ölüm nedenidir. Obezite, Tip 2 diyabet için önemli bir risk faktörü olup tip 2 diyabetiklerin %90'ı obezdir. TURDEP (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans)'in çalışmasının sonuçlarına göre ülkemizde tip 2 diyabet oranı %7.2, prediyabet (gizli şeker) olarak tanımlanan bozulmuş glikoz toleransı %6.7 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada glikoz intoleransının obezite ile arttığı gösterilmiştir. Tip 2 diyabet sadece yetişkinlerin bir hastalığı olarak tanımlanırken son yıllarda yapılan çalışmalarda tüm dünyada çocuklarda obezite ile ilişkili Tip 2 diyabet vakalarında artış olduğu bildirilmektedir (Yıldız, 2014).

Obezite küresel boyutta önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hem gelişmiş ülkelerde hem de gelişmekte olan ülkelerde obezite her geçen gün artış göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından Asya, Afrika ve Avrupa'nın 6 ayrı yöresinde yapılan ve 12 yıl süren MONICA çalışmasında 10 yılda obezite görülme sıklığında %10-30 arasında bir artış saptandığı bildirilmiştir. Avrupa'da yetişkinlerde fazla kilolu olma görülme sıklığında erkeklerde %32-79, kadınlarda ise %28-78 arasında değişmektedir (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014).

Ülkemizde de diğer dünya ülkelerinde olduğu gibi obezite görülme sıklığı gün geçtikçe artmaktadır. Bakanlığımızca yapılan "Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010" ön çalışma raporuna göre Türkiye'deki yetişkinlerde obezite sıklığı erkeklerde %20.5, kadınlarda ise %41.0 ve toplamda %30.3 olarak bulunmuştur. Türkiye'deki çocuklarda obezite sıklığı ise 0-5 yaşta %8.5 (erkek %10.1, kız %6.8) ve 6-18 yaşta %8.2 (erkek %9.1, kız %7.3) olarak bulunmuştur (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, 2014).

2.2. Tatlandırıcılar ve Özellikleri

Günümüzde birçok ülkede önemli yeri olan şeker ve tatlıların aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, sağlıklı beslenme bilgisindeki eksiklikler ve ailelerin sağlıklı besinlere ayırdığı düşük bütçe; obezite, şeker hastalığı, hipertansiyon ve kalp-damar hastalıklarında hızlı bir artışa neden olmuştur. Böylece çok şeker içeren besinler, obezite ve şeker hastalarının tedavilerinde sınırlandırılmıştır. Ancak teknolojinin gelişimi ile besin sanayinde kalorisi düşük veya olmayan yapay tatlandırıcılar 19. yüzyılın sonlarında gündeme gelmeye başlamıştır. Aynı miktardaki şekerden daha tatlı olan ve daha az enerji içeren kimyasal maddeler tatlandırıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Tatlandırıcılar, başlangıçta şeker hastalarının tatlandırma gereksiniminin giderilmesi için kullanılmış olmakla birlikte, günümüzde fazla kilolular, günlük diyetine dikkat edenler ve şekerin diş sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmak isteyenler tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Nabors, 2001).

Günümüzde şeker yerine kullanılan birçok tatlandırıcı bulunmaktadır. Fakat yiyecek ve içecek endüstrisi, daha güvenli ürün geliştirmek ve tüketicilerin beklentilerine cevap vermek için üretilen gıda ürünlerinin duyusal kalitesini iyileştirme çalışmalarına sürekli olarak devam etmektedir (İnanç ve Çınar, 2009).

En iyi tatlandırıcının bulunması yönündeki çalışmalar devam etse de henüz en ideal tatlandırıcı bulunamamıştır. Sakkaroz tatlandırıcılar içinde altın standart olarak görülmektedir. Fakat bazı ilaç ve sakız gibi ürünlerde sakkarozun kullanımı uygun değildir (Nabors, 2001).

Alternatif tatlandırıcıların kullanımının başlıca nedenleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir;

a) Kalori ve karbonhidrat alımını kontrol etmek amacı ile tüketilen yiyecek ve içecek çeşitlerinde seçim şansı sağlamaktadır.

b) Mevcut kiloyu korumaya ve zayıflamaya yardımcı olmaktadır.

c) Şeker hastalarının şeker düzeylerini kontrol etmeye yardımcı olmaktadır.

d) Diş çürümelerini kontrol etmeye yardımcı olmaktadır.

e) Kozmetik ürünlerinin ve ilaçların kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

f) Ürün maliyetlerinin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

İdeal bir tatlandırıcı en az şeker kadar tatlı, renksiz ve kokusuz olmalıdır. Kanserojenik olmamalıdır. Tatlı tadını hemen verebilmeli, istenmeyen tat kokuya neden olmamalıdır. Suda çözünebilmeli, asidik ve bazik koşullara ve ısıl uygulamalara karşı dayanıklı olmalıdır. Ürünün raf ömrü boyunca stabilitesini korumalıdır. Ürünün içerdiği bileşenlerle uyumlu olmalı ve bu bileşenlerle reaksiyona girmemelidir. Toksik olmamalı, tüketildikten sonra normal bir şekilde metabolize olmalı ve vücutta birikmeden atılmalıdır. İnsan sağlığı için güvenilir olduğu bilimsel olarak kanıtlanmış olmalıdır. Sakkaroz ve diğer tatlandırıcılara göre ucuz olmalı, kolayca üretilebilmeli ve depolama ve taşıma sırasında problem yaratmamalıdır (Nabors, 2001).

Tatlandırıcılar doğal ve yapay tatlandırıcılar olmak üzere iki gupta incelenir. Şeker, bal, melas gibi doğal tatlandırıcılar, bitkilerden veya doğal materyallerden elde edilir. Aspartam, sakarin, sukraloz gibi yapay tatlandırıcılar ise doğal tatlandırıcı moleküllerinin kimyasal yöntemlerle üretilmesi ile elde edilir. Yapay tatlandırıcılar kalorisiz olarak üretilirken doğal tatlandırıcıların çoğu şeker kadar kalori içermektedir. Fakat şeker alkolleri vücutta daha farklı metabolize olur ve oldukça düşük düzeyde kalori içerir. Bu nedenle kalorisi azaltılmış gıdaların üretiminde kullanılır (The Nibble, 2014).

Sakkaroz bütün tatlandırıcılar için bir standart oluşturmaktadır. Bütün diğer tatlandırıcıların tadı sakkaroza göre verilir. Sakkarozun tatlılığı 1'e eşittir. Çizelge 2.1.'de doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri belirtilmiştir.

Çizelge 2.1. Doğal ve yapay tatlandırıcılar ve tatlılık düzeyleri

Tatlandırıcının Tipi	Tatlandırıcının Adı	Tatlılık Düzeyi
Yapay Tatlandırıcılar	Aspartam	160 – 200
	Asesülfam K	200
	Alitame	2000
	Sakarin	300
	Sukraloz	600
	Siklamat	30
	Dulcin	250
	Neohesperidin dihidrokalkon	1500
	Neotame	8000
	P-4000	4000
	Karrelam	160000
	Bernardam	180000
	Sukrononat	200000
	Lugdunam	220000
Doğal Tatlandırıcılar	Brazzein	2000
	Curculin	550
	Pentadin	500
	Glisirizin	50
	Mabinlin	100
	Monellin	3000
	Tamatin	2000 - 3000
	Tagatoz	0.92
	Stevia	250
	Hidrojene Nişasta Hidrolizatları	0.4 – 0.9
	İzomalt	0.45 – 0.65
	Laktitol	0.4
	Maltitol	0.9
	Mannitol	0.5
	Sorbitol	0.6
	Ksilitol	1
	Eritrol	0.7
	Gliserol	0.6

Stevia rebaudiana bitkisinin içerdiği steviol glikozitler, glisemik indeksleri düşük olduğu için obezite, şeker hastalığı, hipertansiyon ve diş çürükleri gibi rahatsızlıkların önlenmesinde kullanılan; ayrıca antioksidan, anti-mikrobiyal, anti-diyabetik, anti-hiperglisemik, anti-hipertansif, anti-inflamatuvar, anti-kanser, anti-diareik ve immünomodülatör etkiler gibi birçok terapötik özelliğe sahip, normal şekerden 300 kat daha tatlı olan doğal ve kalorisiz tatlandırıcılardır (Tadhani et al., 2007; Carakostas et al., 2008; Shukla et al., 2009; Chatsudthipong and Muanprasat, 2009; Muanda et al., 2009; Suk Kim et al., 2011; Shivanna et al., 2012).

2.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni

2.3.1. Stevia bitkisinin botanik özellikleri

Stevia rebaudiana, Ayurveda zamanlarından tıbbi dünyada geçerli olan bir isimdir. Bu bitki çeşitli alanlarda uygulamaya sahiptir. Ticari olarak iyi bilinmekle birlikte, bugünlerde ilginç araştırma alanlarını oluşturmaktadır. *Stevia rebaudiana* Bertoni, endemik ve çok yıllık bir bitkidir. Stevia'nın 150'den fazla türü bilinmektedir; fakat *Stevia rebaudiana* (Bertoni) tatlılığından dolayı ilgi çekmektedir. Stevia ile ilgili çalışmalar bir süre durağan kalsa da, 1888 yılında Paraguay'da Dr. M.S. Bertoni'nin bu bitkiyi keşfetmesiyle çalışmalar tekrardan başlamıştır. 1905 yılında Paraguay'lı kimyacı Dr. Rebaudi'den sonra bu bitki bilimsel olarak *Stevia rebaudiana* olarak isimlendirilmiştir (Yadav and Guleria, 2012).

Stevia rebaudiana, Paraguay ve Brezilya'da yetişen *Asteraceae* (Compositae) familyasına bağlı, yabani, küçük bir çalı türüdür. Nemli ortamları seven, 60-90 cm boyunda, ortalama 25 °C'de ve bazı türleri 2300-2900 m yüksekliklerde yetişebilen tatlılık özelliğine sahip bir bitki türüdür. *Stevia rebaudiana*'nın anavatanı Güney Amerika'dır. Paraguay, Brezilya, Arjantin, Kolombiya, Meksika, Uruguay, Guatemala, Peru, Japonya ve Güney Kore'de yetiştirilmektedir. Ayrıca Kaliforniya ve İngiltere'de de kültürü yapılmaktadır. Kuzey Amerika'da tespit edilebilen 80'den fazla türü, Güney Amerika'da ise 200'den fazla yerli türü olduğu tahmin edilmektedir (Lemus-Mondaca et al., 2012; Yadav and Guleria, 2012).

Stevia çok sayıda tatlı diterpenoit glikozitlerin kaynağıdır ve Stevia glikozitleri şekerimsi tatdan sorumlu bileşiklerdir. Stevia'nın 230 türü arasında sadece rebaudiana ve phlebophylla türleri steviol glikozitleri üretmektedir. Stevia kuru-yapraklarının %4 – 20 oranlarında tatlı diterpenler içerdiği bilinmektedir (Wölwer-Rieck, 2012; Pawar, 2013).

Bu bitki çoğunlukla Stevia, Tatlı yaprak, Paraguay'ın tatlı bitkisi, Bal yaprak ve Şeker yaprak olarak bilinmektedir. Yapraklar orta uçtan tüm aşağıya doğru kör-uçlu lamina, tırtıklı kenarlar ile birlikte sapsız, 3-4 cm uzunluğunda, uzun-mızraksı veya spatulat şeklindedir. Yaprağın üst yüzeyi belli belirsiz

gandular tüylüdür. Kökleri en aşağıda zayıf-tüylü ve odunsudur. Kök sapları çok az dallanmış köklere sahiptir. Çiçekler yalancı çanak yaprakların burumu tarafından çevrelenerek oluşan bileşimdir. Gevşek, düzensiz ve simpodiyal dallanma görülmektedir. Çiçekleri açık mor ve pentamerdir (Yadav and Guleria, 2012).



Şekil 2.1. *Stevia rebaudiana*

2.3.2. Stevia'nın tarımı

Stevia bitkisinin çiçeklenme dönemi, Ağustos ve Eylül aylarıdır. Bu dönem, iklim ve bölge özelliklerine göre az veya çok değişiklik gösterebilir. Bitki, Ağustos ayı ortasından itibaren tomurcuklar vermeye ve bu tomurcuklar üzerinde kısa zaman sonra minik ve beyaz renkli çiçekler açmaya başlar. Çiçeklenmeyle birlikte, bitkinin her yanı beyaz çiçeklerle dolar ve görsel açıdan hoş bir görüntü ortaya çıkmaya başlar. Çiçekler açtıktan 10-15 gün sonra kurumaya başlar. Kuruyan çiçeklerin dip kısımlarında veya tomurcuğun çıktığı dip kesimlerde kurumuş ve büzülmüş vaziyette tohum keseleri yer alır. Bu keselerin her birisinin içerisinde, ortalama 4-6 adet olmak üzere minicik tohumcuklar bulunur. Çiçekler kuruyup sarardığı zaman, tohum kesesi içerisindeki minik tohumların toplanma zamanı gelmiş demektir. Bitkide tohumlar, tam olgun haldeyken koyu gi veya siyahımsı renklerde iken; tam olgunlaşmamış tohumlar ise genellikle açık yeşilimsi (taze yaprak) renktedir. Üretimde kullanılabilecek olgunluğa erişmiş haldeki olgun tohumların büyüklüğü çoğunlukla iğne ucu şeklindedir (Stevia, 2014).



Şekil 2.2. *Stevia rebaudiana* bitkisi ve çiçeği

Stevia diğer bitkisel ekinler gibi kolaylıkla yetişebilen yarı-nemli subtropikal bir bitkidir. Stevia ekinleri Şubat ve Mart'ta başka bir yere dikilebilmektedir ve yazın sonunda tohumları toplanmaktadır. Bu koşullar altında çiçeklenme, transplantasyonun ardından 54-104. gün aralığında meydana gelmektedir. Üretimin ilk yılı için yoğunluğun 83.000 ve 111.000 bitki/ha'ya artması ile birlikte yaprak verimi de artmaktadır. Stevia yapraklarının içerdiği steviozit konsantrasyonu bitkinin uzun zamanda yetişmesi durumunda artmaktadır.

Yapraklardaki steviol glikozit içeriği maksimum olduğunda, çiçeklenmeden hemen önce bitki hasat edilmektedir. Binlerce Stevia tohumunun ağırlığı genellikle 0.15 ve 1.30 g aralığında değişmekte ve bitki yoğunluğuna da bağlı olmaktadır. Tohum canlılığı ve verimi döllenme sırasındaki büyüme koşullarından etkilenmektedir. Döllenme sırasında meydana gelen aşırı yağış, hem tohumu hem de çimlenmeyi etkileyebilmektedir.

Daha iyi bir yaprak verimi ve yapraklardaki rebaudiozit A konsantrasyonu için çeşitli bitki yetiştirme prosedürleri kullanılmıştır. Japonya, Çin ve Kore'deki kültür bitkisi türlerinden yola çıkılarak, yapraktaki rebaudiozit A içeriği ve rebaudiozit A:steviozit oranında önemli genetik artışlar yapmak için yeterli genetik çeşitliliğin olduğu görülmektedir. Tohum en iyi 0 ^{o}C'de depolanmaktadır, fakat üç yılın üstünde daha düşük sıcaklık koşulları altında çimlenme %50 oranında azalmaktadır.

Glikozitler üzerine yapılan çalışmalar sentezin çiçeklenme döneminde veya hemen öncesinde azaldığını ortaya çıkartmıştır. Çiçeklenmenin uzun zaman gecikmesi, glikozit birikiminin daha uzun bir sürede olmasına olanak sağlamaktadır. Bunu takiben Stevia ot topluluğunun vejetatif periyodun daha uzun olduğu çevrelerde yetişmesi en iyi sonucu vermektedir. Meydana gelen steviol glikozit verimi bu yüzden daha yüksek olacaktır. Yıllık mahsül olarak Stevia'nın yetişmesi için gübre gereksinimi makul miktardadır. Stevia'nın ticarileşmesi, *in vitro* çoğaltım ile ilgili çalışmaları arttırmıştır (Yadav and Guleria, 2012; Lemus-Mondaca et al., 2012).

2.3.3. Stevia yapraklarının bileşimi ve kimyasal özellikleri

Stevia rebaudiana'nın şeker tadı ile karakterize edilen farklı derişimlerde 30'dan fazla steviol glikozit içerdiği bilinmektedir. Toplam steviol glikozitler, Stevia'nın yetişme dönemine bağlı olarak değişmekle birlikte kuru yaprak ağırlığının yaklaşık %20'sini oluşturmaktadır. En iyi bilinen steviol glikozitler bitkide en yüksek miktarda bulunan steviozit (%5 - 10) ve rebaudiosit A (%2 - 4)'dır (Genus, 2003, Abou-Arab et al., 2010; Puri et al., 2011; Wölwer-Rieck, 2012; Lemus-Mondaca et al., 2012). Stevia'nın %63.10'luk karbonhidrat içeriğinin yanı sıra %13.68'ini proteinler, %12.06'sını kül, %10.73'ünü nem, %6.13'ünü yağlar, %5.03'ünü fiberler ve %4.50'sini de indirgen şekerler oluşturmaktadır (Gasmalla et al., 2014).

Stevia'nın enerji değeri kurumadde esasına göre 2.7 kcal/g olarak ölçülmüştür. Bunun yanısıra, asesülfam K'nın enerji değeri 0, aspartamın 4 kcal/g, sakarinin 0 kcal/g ve sukralozun 0 kcal/g'dır. Sakkaroz tüketiminin günlük diyetteki kalori miktarına katkısı oldukça yüksektir ve kilo artışına neden olur. Bu nedenle günlük diyette düşük kalorili bir tatlandırıcı olan Stevia'nın kullanımı, alınan kalori miktarının azalmasını sağlamaktadır (Savita et al., 2004; Lemus-Mondaca et al., 2012; Puri et al., 2011; Abou-Arab et al., 2010).

Çeşitli kantitatif ve kalitatif analiz metotları kullanılarak, Stevia yaprakları kompozisyon ve mineral içerikleri bakımından değerlendirilmiştir (Çizelge 2.2). Stevia'nın (100 g) analiz edilen mineral kompozisyonu ise sırası ile kalsiyum 464.4 mg, fosfor 11.4 mg, demir 55.3 mg, sodyum 190 mg ve potasyum 1800 mg'dır. Bu bulgular Stevia'nın, sağlığın korunması ve birçok metabolik prosesin

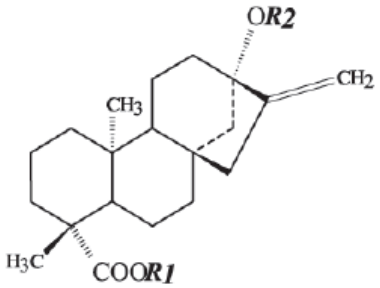
sürdürülmesi için gerekli olan mineralleri içeren bir bileşen olduğunu ortaya koymaktadır. Tüm bunların yanı sıra, Stevia kalsiyum, demir ve yeşil yapraklı bitkilerde bulunan diğer nütrientlerin biyoyararlanımının azalmasına neden olan yüksek okzalik asit içeriğine sahiptir (Genus, 2003; Savita et al., 2004).

Çizelge 2.2. Stevia'nın besin içeriği (kuru madde esasına göre; 100 g'da)

Bileşen Adı	**Miktarı**
Enerji (kcal)	270
Protein (g)	13.68
Yağ (g)	6.13
Karbonhidrat (g)	63.10
Kül (g)	12.06
Nem (g)	10.73
Fiber (g)	5.03
Mineraller	
- Kalsiyum (mg)	464.4
- Fosfor (mg)	11.4
- Demir (mg)	55.3
- Sodyum (mg)	190.0
- Potasyum (mg)	1800.0
Anti-Besinsel Faktörler	
- Okzalik asit (mg)	2295
- Taninler (mg)	0.010

Stevia ekstresi yüksek oranda diterpen steviol glikozitlerini içermektedir. Diterpen steviol glikozit bileşenleri; steviol, steviolbiozit, steviozit, rebaudiozit A, B, C, D, E, F, rubusozit, dulkozit A olarak tanımlanmıştır (Wölwer-Rieck, 2012). Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.3'te verilmiştir. *Stevia rebaudiana* yapraklarından elde edilen ekstrelerdeki başlıca tatlılık özelliğine sahip major bileşenler steviozit ve rebaudiozit A'dır (Gasmalla et al., 2014). Steviozit'in

tatlılık oranı, sakkarozdan 110–270 kez, rebaudiozit A'nın ise, 150–320 kez daha fazladır. Bunun yanında rebaudiozit C, sakkarozdan 40–60 kez, dulkozit A ise 30 kez daha tatlıdır. Diğer steviol glikozitler de düşük oranda tatlılık özelliğine sahiptir. Stevia yapraklarında bulunan (kurumadde esasına göre) steviozit, rebaudiozit A, rebaudiozit C ve dulkozit A miktarları sırasıyla %9.1, %3.8, %0.6 ve %0.3'dür. Steviol glikozit preparatları beyaz-açık sarı renkte, toz yapıdadır ve suda çözünebilir özelliktedir. Kokusuzdur veya kendine has kokusu olabilir (Wallin, 2007; Thomas, 2010; Wölwer-Rieck, 2012).



Bileşik Adı	R1	R2
Steviol	H	H
Steviolbioside	H	β-Glc- β-Glc(2→1)
Stevioside	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2→1)
Rebaudioside A	β-Glc	β-Glc- β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
Rebaudioside B	H	β-Glc- β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
Rebaudioside C (Dulcoside B)	β-Glc	β-Glc- α-Rhas(2→1) | β-Glc(3→1)
Rebaudioside D	β-Glc- β-Glc(2→1)c	β-Glc- β-Glc(2→1) | β-Glc(3→1)
Rebaudioside E	β-Glc- β-Glc(2→1)	β-Glc- β-Glc(2→1)
Rebaudioside F	β-Glc	β-Glc- β-Xyl(2→1) | β-Glc(3→1)
Dulcoside A	β-Glc	β-Glc- α-Rhas(2→1)

Şekil 2.3. Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları

Stevia su tutma kapasitesini ve yağların fiziksel tutuklamasını arttıran yüksek protein içeriğine sahiptir. Mineral analizleri potasyum, kalsiyum, magnezyum, fosfor, sodyum ve sülfürün; bakır, kobalt, manganez, çinko, selenyum ve molibdenden daha fazla miktarlarda bulunduğunu göstermiştir. Tüm bu çeşitli özellikler Stevia'yı çeşitli gıda ürünlerinde önemli bir bileşen yapmaktadır. Fitokimyasal görüntülemeden elde edilen sonuçlar tanenlerin en yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunu ve bunları alkaloitler, glikozitler,

saponinler, steroller, triterpenler, antrakinonlar ve diğer indirgen bileşiklerin takip ettiğini göstermiştir. Tüm bu kimyasal bileşenler Stevia'nın tıbbi ve ticari öneminden sorumludur (Yadav and Guleria, 2012).

2.3.4. Steviol glikozitlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri

Steviol glikozitler (SG), özellikle tetrasilik diterpenoitlerden olan sekonder metabolitlerdir. Stevia, "diterpenoit steviol glikozitlerin üreticisi" olarak bilinmektedir. Steviol glikozitler oldukça tatlı, toksik ve mutajenik olmayan diterpenoitlerdir.

Steviol, steviolbiozit, steviozit, rebaudiozit A, B, C, D, E, F ve dulkozit olarak isimlendirilen sekonder metabolitlerin yapraklarda biriktiği bilinmektedir. Bunların arasında steviozit ve rebaudiozit A daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Steviozit, sükrozdan 110-270 kat daha tatlıdır ve rebaudiozit A ise 150-320 kat daha tatlıdır. Arttırılmış steviozit içeriği ağızda metalimsi bir tat bırakmaktadır. Glikozital içerikte %50'den fazla rebaudiozit A'nın bulunması ağızdaki metalimsi tadı azalttığından, tadı geliştirmektedir. Tüm glikozitler kolayca çözülebilmekte ve sulu solventler ile ekstre edilebilmektedir. Bu da yüksek pH'lardaki (2'den 10'a kadar) stabilitesinin ve özel termostabilitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Yüksek sıcaklıklarda (200 ^{o}C) stabil kalabilmektedir. Bu glikozitler, diğer tatlandırıcıların yanı sıra tatlılığı arttırarak sinerjik etki oluşturmaktadır.

Tıp dünyası için "Stevia" yeni bir isim değildir. Eski zamanlardaki Ayurvedik sistem *Stevia rebaudiana*'nın kullanımına ilişkin uzun bir tarihe sahiptir. Stevia'daki steviol glikozitler çoğunlukla tıbbi öneme katkı sağlamaktadır. Steviol glikozitlerin yanı sıra, Stevia'nın diğer metabolitleri β-karoten, riboflavin, tiamin, austroinülin, çeşitli terpenler ve flavonoitler gibi tıbbi değere sahiptir. Stevia diabet, diş çürükleri, obezite ve mide rahatsızlıkları gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde önerilmektedir.

Stevia yaprak ekstresinin içerdiği çeşitli kimyasal bileşenlerin rolü belirlenmiştir. Ham metanol ekstresi ve flavonoit bakımından zengin etil asetat ekstresi antioksidan ve oksidatif DNA zararını önleyici aktiviteye sahiptir. Yüksek miktarlarda seskiterpenleri içeren sulu ekstre antimikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahiptir. Bu tür ekstreler feromon ve parfüm sentezi için başlangıç

materyali olarak önerilmektedir. Steviol glikozitlere ek olarak, Stevia yaprak ekstresindeki diterpenoitlerin diğer tipleri de belirlenmiştir. Anti-Manoyl oksit ve labdan sklareol non-kaurenoit diterpenoitlerdir. Manoil oksit anti-inflamatuvar ve anti-parazit özelliğe sahiptir. Labdan sklareol ise anti-tümör ve sitotoksik özelliklere sahiptir. Stevia yapraklarının mumsu kısmında bulunan fitosterollerin, kardiyovasküler rahatsızlıklara karşı etkili olduğu bulunmuştur. Çeşitli minerallerin de metabolik mekanizmayı ve konukçunun immün cevaplarının devamlılığını sağladığı bildirilmiştir. Tüm bu çalışmalar, Stevia'nın insan sağlığı üzerinde sekonder metabolitlerin katkısını göstermektedir (Thomas and Glade, 2010; Yadav and Guleria, 2012; Wölwer-Rieck, 2012; Ceunen and Geuns, 2013).

Stevia ve steviol glikozitlerin güvenlik durumlarını belirlemek için çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Nunes et al. (2006), steviozitin sitotoksik ve genotoksik davranışını belirlemek için bir çalışma yapmıştır. *E. coli* suşları steviozitin farklı konsantrasyonları ile inkübe edilmiş ve bunu takiben agaroz elektroforezi ve sağkalım denemeleri için bakteriyel transformasyon yapılmıştır. *E.coli*'lerin hayatta kalma oranlarında düşüş gözlenmiştir. Steviozitin sitotoksik davranışı, DNA'da lezyon oluşumuna yol açmakta ve lezyon geri dönüşüm yol izini parçalamaktadır. Steviozitin steviole metabolize olması, DNA hasarı kapasitesinden sorumludur. Ayrıca antimikrobiyal aktivite için de Stevia yaprak ekstresi araştırılmıştır. Yaprak ekstresinin izolasyonu farklı solventler ile gerçekleştirilmiştir ve her bir ekstre belirli mikrobiyal türlere karşı incelenmiştir. Farklı ekstreler çeşitli mikroorganizmalara karşı farklı inhibitör aktivite göstermiştir. Bu deneme Stevia yaprak ekstresinin antifungal potansiyelinin yanı sıra antibakteriyel olduğunu da doğrulamış ve Stevia'nın yeni antibakteriyel ve antifungal ajanların kaynağı olabileceğini göstermiştir. Stevia'nın antifungal aktivitesinin genellikle bitki patojenlerine karşı kullanılan standart fungisitlerden daha yüksek olduğu tahmin edilmiştir. Stevia'nın bu olağanüstü antimikrobiyal aktivitesi, non-antibiyotik farmasötik ve etkili gıda koruyucu potansiyeli olarak gösterilmiştir. Yalnızca steviozitin inflamasyon mediyatörlerini azalttığı ve konakçının sitotoksik hücrelerini aktive ettiği gözlenmiştir. Bu aktiviteler steviozitin konakçının doğal bağışıklığı ile sinerjitik rol oynayabileceğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, steviozitin antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuvar, anti-tümör etkilere sahip olduğu anlaşılmıştır (Genus, 2003; Thomas and Glade,

2010; Yadav and Guleria, 2012; Lemus-Mondaca et al., 2012).

2.3.5. Steviol glikozitlerin kullanılabilirliği

Stevia, Güney Amerika'da yaşayan Hintli bir yerli topluluğu tarafından yüzyıllar boyunca çayı tatlandırmak için kullanılmıştır. Günümüzde ise Güney Amerika, Asya, Japonya, Çin ve bazı AB ülkelerinde gıda katkısı ve kalorisiz tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. En büyük Stevia pazarını ise Japonya ve Kore oluşturmaktadır. Fakat, Çin dünyadaki en büyük Stevia yetiştiriciğilini yapmakta ve bunun %80'inini ihraç etmektedir (Madan et al., 2010; Pawar, 2013; Gasmalla et al., 2014).

Birçok ülkede Stevia ekstrelerinin gıda katkıları olarak kullanımı onaylanmıştır. Amerika'da 2008 – 2009 yıllarında yüksek saflıktaki steviol glikozitler GAS (Generally Recognized As Safe) statüsünde kabul edilmiştir. EFSA (European Food Safety Authority) 2010 yılının Mart ayında steviol glikozitlerin günlük alım miktarlarını günde 4 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir. 11 Kasım 2011 tarihinde çıkan yönetmelik ile Stevia ekstresinin AB ülkelerinde kullanımının önü açılmış ve Avrupa marketinde >%95 saflıkta steviol glikozitler gıda katkıları olarak kullanılmaya başlanmıştır (Wölwer-Rieck, 2012).

2.3.6. Steviol glikozitlerin metabolizması

Sindirim sistemi florasının büyük bir kısmını oluşturan enterekok, laktobasil, klostridia, bakteroitler ve bifidobakter gibi birçok mikroorganizma, ürettikleri enzim aracılığıyla birçok maddenin hidroliz edilerek metabolize edilmesinden sorumludur (Hawksworth et al., 1971). Steviol glikozitler de sindirim sisteminde bu yolla hidroliz edilmektedir. Bu bağlamda vücuda alınan Stevia'nın metabolize olması için için sağlıklı bir sindirim sistemine ihtiyaç duyulmaktadır (Wingard et al., 1980).

Major steviol glikozidler olan rebaudiozit A ve steviozit benzer yol izleri ile metabolize olurlar. Öncelikle rebaudiozit A, kalın bağırsaktaki mikroorganizmalar tarafından steviozite metabolize edilir ve ardından steviole dönüştürülür ve bir glikoz molekülü salgılanır. Salınan glikoz molekülü kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından kullanılır ancak absorbe edilmez. İnsan sindirimi üzerine yapılan çalışmalar, insan dışkısı gözlemlendiğinde steviolün stevia metabolizmasının son

ürünü olduğunu ve dolayısıyla steviolün yüksek ve düşük konsantrasyonlarda değişmediğini göstermiştir (Fisberg, 2010).

Koyama et al. (2003a), steviol glikozitlerin insan bağırsak metabolizması ile ilgili çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada Stevia karışımı (%28.8 rebaudiozit A, %17 steviozit, %25.2 rebaudiozit C ve %10.2 dulkozit), α-glikoz türevleri, steviozit ve rebaudiozit A (0.2 mg/ml)'nın 24 saat içinde tamamen steviole metabolize olduğunu fakat, steviolün (0.08 ve 0.2 mg/ml) inkübasyon süresi boyunca da metabolize olmadığını belirtmişlerdir. Stevia karışımı, steviozit ve rebaudiozit A'nın insan bağırsak mikroflorası tarafından steviole hidroliz edildiğini belirtmişlerdir.

Ayrıca Koyama et al. (2003b), sıçanlarda hem Stevia karışımının (rebaudiozit A, steviozit, rebaudiozit C, dulkozit) hem de steviolün absorbsiyonunu ve hepatik (karaciğere ait) metabolizmasını araştırmışlardır. Absorbsiyon hem *ex vivo* hem de *in vivo* olarak denenmiştir. *ex vivo* denemeler sonucunda Stevia karışımının absorbe olmadığını fakat, steviolün belirgin bir şekilde absorbe olduğunu belirtmişlerdir. *in vivo* denemede ise sıçanlara ağız yoluyla steviol veya Stevia karışımından verilmiştir. Steviolün ağızdan uygulanmasından 15 dakika sonra, plazmadaki steviol pik konsantrasyonunun 18 μg/ml olduğunu ve hızlı absorbsiyon gösterdiğini görmüşlerdir. Fakat Stevia karışımının ağızdan uygulanmasından sonra ise, plazmadaki steviol konsantrasyonunun 8 saati aşkın bir sürede sabit bir şekilde arttığını görmüşlerdir. Bu çalışma sonucunda Stevia karışımını oluşturan bileşenlerin (rebaudiozit A, steviozit, rebaudiozit C, dulkozit) ilk önce metabolize olduğu ve ardından sıçanların bağırsağında steviol olarak absorbe olduğu belirtilmiştir.

2.4. *Stevia rebaudiana*'nın Ekstraksiyonu ve Analiz Yöntemleri

Stevia yapraklarından steviol glikozitlerin geri kazanımı için uygulanan konvansiyonel yöntemler ile Stevia bazlı tatlandırıcıların üretimi, glikozitlerin ekstraksiyon ve saflaştırma-ayrıştırma basamaklarını içermektedir (Tzia and Liadakis, 2003). Kurutulmuş Stevia yaprakları çoğunlukla su veya su/alkol ile ekstre edilmekte (Muanda et al., 2011) ve elde edilen ekstre ultrafiltrasyon (Zhang et al., 2000) ile konsantre edilebilmektedir. Ayrıca reçineler kullanılarak durultma (Rai et al., 2012) ve kristalizasyon/presipitasyon (Puri et al., 2011) basamakları ile

saflaştırılmaktadır. Kurutma sonrası elde edilen Stevia tatlandırıcısı iki ana glikoziti de yüksek seviyelerde içermelidir. Öncelikli olarak ağızda kalan yoğun ve istenmeyen tat olmadan, yüksek tatlılık gösteren maksimum saflıktaki rebaudiozit A istenmektedir. Daha kaliteli ve rebaudiozit A içeriği daha yüksek steviol glikozitlerin eldesi için yeni metotlar geliştirilebilir. Bu amaçla düşük sıcaklıkların kullanıldığı ultrasonik ekstraksiyon (Liu et al., 2010), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Yoda et al., 2003), süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Erküçük vd., 2009), enzim ekstraksiyonu gibi metodlar kullanılmaktadır. Enzim destekli ekstraksiyon yöntemlerinin kullanımı, endüstriyel uygulamalarda hızlı bir yöntem olması, solvent kullanımını azaltması, daha yüksek verimlilikte ürün eldesi, geleneksel yöntemlere göre daha az zaman ve enerji harcanması açısından yaygınlaşmaktadır. Aynı zamanda ekstraksiyonu yapılan steviol glikozitlerin alternatif saflaştırma metodları iki majör steviol glikozitin seçilmesinde ve izolasyonunda kullanılmaktadır (Mondal et al., 2011). Genelde bu amaç ile kullanılan metodlar Yüksek Basınç Sıvı Kromatogafisi (HPLC), Yakın Kızıl Ötesi Spektroskopisi veya Sıvı Kromatogafi metodudur (Cacciola et al., 2011; Gardana et al., 2010; Hearn and Subedi, 2009; Pol et al., 2007).

Bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda basınçlı sıvı, basınçlı sıcak su (PHWE), süperkritik akışkan ve mikrodalga destekli (MAE) ekstraksiyonlarının, geri akış, Soxhlet ve solvent ekstraksiyonu gibi geleneksel metotlara göre avantajları farklı çalışmalarda ortaya konulmuştur. Sulu metanol ile basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve CO_2 ile süperkritik akışkan ekstraksiyonu *Stevia rebaudiana'dan* steviozitlerin ekstre edilmesi için daha önceden denenmiş metotlardır (Teo et al., 2009). Pol et al. (2007), metanol kullanarak basınçlı akışkan ekstraksiyonu yapmışlar ve metanol ile yüksek verimlere ulaşmışlardır. Ancak metanol son derece toksik bir çözgen olduğundan sağlık açısından uygun değildir. Erküçük vd. (2009), *Stevia rebaudiana* yapraklarındaki glikozitlerin eldesinde süperkritik akışkan ekstraksiyonunu kullanarak optimize etmişlerdir. Jaitak et al. (2009), steviozit ve rebaudiozit A'nın optimum verimlerde ekstraksiyonu için üç farklı metot (geleneksel soğuk ekstraksiyon, ultrasonik, mikrodalga tabanlı ekstraksiyon) ile çalışmışlar ve en verimli metodun MAE (mikrodalga tabanlı ekstraksiyon) olduğunu belirlemişlerdir. Teo et al. (2009), önerilen metotlar olan basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (PHWE) ve mikrodalga

tabanlı ekstraksiyonu (MAE) kullanarak, steviozit ve rebaudiozit A'nın ekstre edilebileceğini bildirmişler ve MAE'nin ekstraksiyon verimliliğinin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Huang et al. (2010), yüksek-hız karşıt-akım kromatogafisini kullanarak Stevia ekstresinden üç steviol glikoziti (steviozit, rebaudiozit A ve rebaudiozit C) başarılı bir şekilde izole edip, saflaştırmışlardır. Liu et al. (2010), ultrason destekli ekstraksiyon sonucundaki ekstraksiyon verimlerinin klasik ekstraksiyon prosedürlerine göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Rai et al. (2012), kuru Stevia yapraklarından steviozitlerin ekstraksiyonu için sıcak su ekstraksiyon sürecini kullanmışlardır. Siddique et al. (2012), Stevia yapraklarından uçucu yağlar distilasyon ile elde etmişler ve kimyasal kompozisyonu gaz kromatogafi – kütle spektroskopisi analizleri (GC–MS) ile yapmışlardır. Puri et al. (2012), *Stevia rebaudiana* yapraklarından steviozitlerin enzimatik ekstraksiyonu için selülaz, pektinaz ve hemiselüloz enzimlerini kullanmışlardır. Çalışmada enzim derişimi, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi çeşitli parametreler optimize edilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında Stevia yapraklarının ekstraksiyonu kontrol deneyi ile karşılaştırıldığında verimde dikkate değer bir artış (35 kat) olmuştur. Ancak literatürde yer alan bu çalışmalarda rebaudiozit A verimi ve verimliliğini temel alan kapsamlı bir optimizasyon çalışması yapılmamış ve ekstre fazı haricinde rafinat fazın değerlendirilmesine yönelik herhangi bir kurgu da yer almamıştır.

2.5. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitkiler belirli oranlarda biyoaktif bileşikler içermektedirler. Bitki ekstreleri gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde geniş çapta kullanılmaktadır. Bununla bağlantılı olarak elde edilen doğal bileşiklerin ticarileştirilmesi amacıyla ekstraksiyon metotları geniş çapta araştırılmaktadır. İdeal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstre edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ilaveten bir saflaştırma gerektirmemeli ve atık çözücü içermemelidir. Genelde çözücü ekstraksiyonu bu koşulları sağlamakta yetersiz kalmaktadır. Çözücü ekstraksiyonu basit, ucuz ve kuramsal olarak yerleşmiş bir yöntemdir fakat birtakım dezavantajları bulunmaktadır. Bunların en başında yüksek ısı ve çözücü tüketimi gelmektedir. Genelde çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücüler kullanılır. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkiler, dolayısıyla ısıl bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için

geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygun bir yöntem değildir. Ayrıca ekstraksiyon işleminden elde edilen alt akım seyreltiktir. Hedef ürünün çözücüden ayrılıp yoğunlaştırılması için ek bir ayırma işlemine gerek duyulur. İşlem süresi uzun ve işletme maliyeti yüksektir. Tüm bunlardan dolayı alternatif ekstraksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur (Wang and Weller, 2006). Soxhlet ekstraksiyonu ile birlikte bu yeni ekstraksiyon teknikleri;

1. Soxhlet Ekstraksiyonu

2. Ultrasonik Ekstraksiyon

3. Mikrodalga Ekstraksiyon

4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

olarak belirtilebilir. Bu teknikler ile yüksek sıcaklık ve basınçta çalışmak mümkün olmakta ve ekstraksiyon zamanı dikkat çekici bir şekilde azaltılmaktadır.

2.5.1. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu özel bir cihazda gercekleştirilir. Katı veya yarı-katı numuneler icin uygundur. Soxhlet ekstraktörü, en eski ekstraksiyon sistemlerinden biridir ve hala geniş ölçüde kullanılmaktadır. Soxhlet ekstraktörü, bir solvent şişesi, orta çemberde bir sıvı akış borusu (sifon), soğutulmuş bir kondansör (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden meydana gelmiştir.

Katı örnek, orta çemberin içindeki ekstraksiyon bölmesinin içine yerleştirilir. Solvent bunun altındaki solvent şişesinin içine konur. Solvent kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılır ve kaynayan solventten gelen buharlar yoğunlaşmanın olduğu kondansatöre hareket eder; yoğunlaşır, örneğe doğru damlar. Solvent örneği ıslatır ve daha sonra solvent seviyesi sifonun tepesine ulaşır ulaşmaz, solvent tüm örnek bölmesini boşaltarak, solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent birkaç kere örnek içerisinde sirküle olur. Ekstre olan analitler solvent şişesinin içinde kalırken, yalnızca temiz solvent buharlaştığından, her dolaşımda taze solvent kullanılır. Çevrim sayısını ve ekstraksiyon zamanını rapor etmek daha iyi bir karşılaştırma için önemlidir. Tipik ekstraksiyon zamanları 6 saatten 24 saate kadardır ve oldukça büyük solvent hacimleri (100-500 mL) gereklidir. Ekstraksiyon solventleri genellikle saf organik solventler veya bunların karışımlarıdır. Soxhlet ekstraksiyonu, esas olarak organik bileşiklerin katı örneklerden ekstraksiyonunda kullanılır. Bileşikler, solventin

kaynama sıcaklığında termal olarak kararlı olmalıdır. Soxhlet cihazı, sürecin hızlanmasına yardımcı olan çalkalama sağlamaz. Büyük miktarlarda solvent kullanıldığından, ekstraksiyon sonrası buharlaştırma/deriştirme basamağı zorunludur. Soxhlet tekniği solvent seçiciliği ile sınırlıdır ve otomasyonu zordur (Büyüktuncel, 2012).

Soxhlet ekstraksiyon tekniğinin avantajları arasında, çözücünün transfer dengesinin katı matriksle tekrarlanan bir şekilde etkileşmesinden dolayı sürekli değişmesi, ekstraksiyondan sonra filtreleme işlemine gerek duyulmaması, metodun basit ve ucuz olması gösterilebilir. Bununla birlikte ekstraksiyon zamanının çok uzun olması, çok miktarda çözücü kullanılması, prosesi hızlandırmak için balonun çalkalanamaması ve termal olarak bozulmaya duyarlı bileşiklerin yüksek sıcaklıkta ekstre edilememesi bu metodun dezavantajları olarak gösterilebilir. Genel olarak bakıldığında, iyi uygulanan bir metotdur ve endüstriyel proseslerde daha etkili ve iyi tekrarlanabilirlik göstermesi, ekstreye daha az manipülasyon olması diğer metotlara kıyasla üstün özellikleridir (Wang and Weller, 2006).

2.5.2. Ultrasonik ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon yönteminde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle analitin iyi geri kazanımıyla sonuçlanan katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. Katı örneklerin ekstraksiyonunu ve bulamaç oluşumunu destekler. Sıvı örneklerde ise, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, homojenizasyonu veya emülsiyon haline getirmeyi desteklemek için kullanılır. Katı örneklerden analitlerin ekstraksiyonu, su banyosuna ultrasonik radyasyon uygulanmasıyla veya prob (ultrasonik aygıtların ucunda bir alıcı bulunan hareketli kısmı) gibi diğer cihazlarla gerçekleştirilir. En çok kullanılan ve en ucuz ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur (Büyüktuncel, 2012).

Ultrasonik indüklemenin mekanik etkisi olarak, kütle transferinin arttırılarak

çözücülerin hücrelere etki etmesi olarak gösterilebilir. Ekstraksiyon esnasında ultrason (ses dalgaları) hücre duvarına etki etmekte ve bileşenlerin bırakılmasına olanak sağlamaktadır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılan çalışmalarda ultrasoniğin mekaniksel etkisi sonucu hücre duvarının yıkıldığı ve bundan kaynaklı olarak bileşenlerin serbest kaldığı kanıtlanmıştır (Wang and Weller, 2006).

Ekstraksiyon verimini artırmak için solvent türü, sıcaklık ve sonikasyon genliği koşulları gibi farklı faktörleri optimize etmek gereklidir. Ekstraksiyon verimini etkileyen diğer parametreler; sonikasyon zamanı, örnek partikül boyutu, örnek miktarı ve kullanılan cihazdır. Son zamanlarda, solvent miktarını azaltmayı sağlamak için analitik örnek hazırlama işlemlerine özel önem verilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

Bitkiye özgü nem oranı, tanecik büyüklüğü ve kullanılan çözücü gibi faktörler yanında, frekans, sıcaklık ve zaman gibi faktörlerde ultrasonik ekstraksiyon verimini etkilemektedir. Pahalı olmaması, basit olması, ekstraksiyon kinetiğinin hızlı olması ve ısıya duyarlı bileşiklerin ekstre edilebilir olması bu metodun avantajları olarak belirtilebilir (Wang and Weller, 2006).

2.5.3. Mikrodalga ekstraksiyonu

Mikrodalgalar 0.3-300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır ve genellikle doğal ürünlerde 2.5-75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga enerjisinin etkinliği büyük oranda çözücünün içeriğine, bitki materyaline ve uygulanan mikrodalga gücüne bağlı olmaktadır. Polar moleküller ve iyonik türlerin bulunduğu durumlarda daha hızlı bir enerji yayılması gerçekleşmektedir (Wang and Weller, 2006).

Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalganın direkt etkisi temeline dayanır. Çoğu uygulamalarda bu iki mekanizma eş zamanlı meydana gelir. İyonik iletim, bir manyetik alan uygulandığında iyonların elektroforetik göçüdür. Çözeltinin bu iyon akışına direnci friksiyon (sürtünme) ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Dipol rotasyonu, uygulanan manyetik alanla dipollerin yeniden düzenlenmesi anlamına gelir. MAE'de mikrodalga ışıması, ekstraksiyon solventini ve böylece de örneği ısıtmak için kullanılır.

Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun solvent seçimi çok önemlidir. Seçilen solventlerde mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin matriksle etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Daha büyük dipol momente sahip olan solvent, mikrodalga ışıması altında daha hızlı ısınacaktır. Örneğin hekzan gibi nonpolar bir solvent (dipol moment<0.1) ısınmayacak, oysa 2.69 dipol momente sahip aseton birkaç saniye içinde ısınacaktır. Eğer ekstraksiyonda hekzan ve toluen gibi nonpolar solventler gerekliyse, solventleri su, metanol ve aseton gibi yüksek bir dipol momente sahip polar solventlerle karıştırmak önerilir. Seçilen solvent çok kuvvetli ısınmaya neden olursa, bileşiklerin degedasyonundan kaçınılamaz. Bu yüzden yaygın uygulama, yalnızca biri mikrodalga ışımayı absorplayan ikili karışımların (örneğin hekzan-aseton, 1:1) kullanımıdır.

Diğer önemli faktörlerden biri de, ekstraksiyon solventi ile ekstrenin analizinde kullanılan analitik metodun uyumluluğudur. Gaz kromatogafik analizler için daha az polar solventler, sıvı kromatogafik analiz ve imunoassay teknikler için daha polar solventler tercih edilir. MAE'nin seçiciliği üzerine çok az literatür rapor edilmiştir. Örneğin içindeki tüm maddeler ekstre edildiğinden seçici bir ekstraksiyon tekniği olduğu söylenemez ve hemen hemen her durumda ekstraksiyon sonrası temizleme basamağı gereklidir (Büyüktuncel, 2012).

Ekstraksiyon genellikle kapalı bir kapta gerçekleştirilir. Bu durumda basınç artar ve solvent kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ısıtılabilir. Çoğu solvent için (aseton, aseton-hekzan, diklorometan aseton gibi) kabın içindeki sıcaklık, solventin kaynama noktasının 2-3 katıdır. Temel olarak iki tip MAE sistemi kullanılabilir: Kapalı kap sistemi (kontrollü sıcaklık ve basınç altında) ve açık kap sistemi (atmosfer sıcaklığında). Kapalı kap sisteminde hücreler eşzamanlı olarak ışınlanırken, açık sistemde kaplar sıralı olarak ışınlanır. Açık kaplarda sıcaklık solventin atmosferik basıncta kaynama noktasıyla sınırlıyken, kapalı kaplarda sıcaklık uygulanan basınçla yükseltilebilir. Kapalı kap sistemi uçucu bileşikler olması durumunda en uygun görünmektedir. Bununla birlikte, kapalı kaplarda, ekstraksiyon sonrasında kap açılmadan önce sıcaklığın düşmesini beklemek gereklidir. Bu ekstraksiyon süresini artırır (yaklaşık 20 dakika) (Büyüktuncel, 2012).

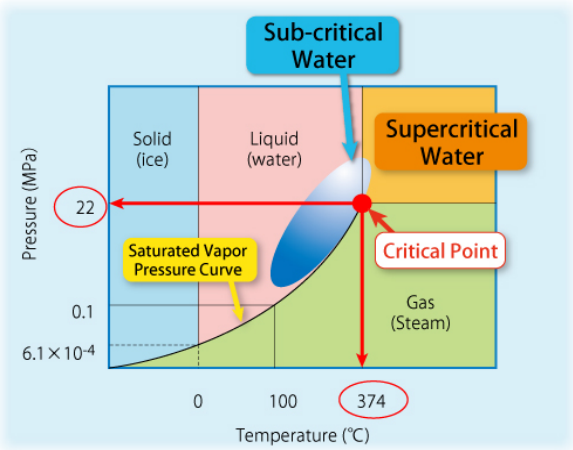
Kullanılan ticari kapalı kap MAE sistemleri, bir manyetron tüp (çok kısa radyo dalgaları veren bir lamba), içinde döner bir tablada ekstraksiyon kaplarının bulunduğu fırın, sıcaklık ve basıncın kontrolu için izleme cihazları ve birkaç elektronik bileşenden oluşmaktadırlar. Ekstraksiyon süreci, ekstraksiyon hücresine örneğin yüklenmesiyle başlar. Mikrodalga ışıma uygulanır ve solventi ayarlanan değerlere ısıtmak için, ön-ekstraksiyon basamağı başlatılır. Bu değerlere ulaşmak için gerekli zaman hem örnek sayısına hem de örnek türüne bağlıdır. Normal olarak ısıtma 2 dakikadan daha az bir zaman alır. Daha sonra örnek ışınlanır ve genellikle 10-30 dakika aralığında ekstre edilir (Büyüktuncel, 2012).

Hekzan ve toluen gibi polar olmayan ve düşük dielektrik sabitine sahip çözücüler mikrodalga ekstraksiyonu için çok uygun olmamaktadırlar. Klasik çözücü ekstraksiyonunda ürün miktarını arttırmak için katı matriksler çözücü içerisine tamamen batırılırken, mikrodalga ekstraksiyonda çözücü miktarının arttırılması ekstraksiyon verimini, mikrodalga ile çözücünün yeterince etkileşememesine bağlı olarak azaltmaktadır. Sıcaklığın arttırılması ile ekstraksiyon veriminin arttığı fakat ısıya duyarlı bileşiklerin yıkımında da etkili olduğu belirtilmiştir. Ekstraksiyon zamanının ve kullanılan çözücü miktarının azaltılması, ekstraksiyon veriminin iyileştirilebilmesi, basit ve ucuz bir proses olması bu metodun avantajları olmaktadır. Bununla birlikte katı atıkların giderilmesi için filtreleme ve santrifüj gerekmesi, apolar ve uçucu bileşiklerin ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olmaması dezavantaj olarak belirtilebilir (Wang and Weller, 2006).

2.5.4. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu

En yaygın olan süperkritik akışkanların (karbondioksit) yanı sıra suyun, kimyasal reaksiyonlarda ve izolasyon – saflaştırma proseslerinde ortam ve ajan olarak kullanımı oldukça ilgi çekicidir. Su toksik olmaması, yanıcı olmaması, ucuz ve kolay bulunur olması nedeniyle avantajlıdır. Oda sıcaklığında su, birçok organik bileşik için çok polar bir solventtir. Fakat arttırılmış sıcaklıklarda su daha az polar olmaktadır ve bu da suyu organik solventlere alternatif olabilecek çevreci ve ilgi çekici hale getirmektedir. Çünkü birçok bileşik suyun kritik sıcaklığının (374 ^{o}C) üzerinde degrede olmaktadır, genelde analitik uygulamalar suyun

kullanışlı fizikokimyasal özelliklerinin yeterli derecede olduğu düşük sıcaklıklarda yapılmaktadır. Farklı matrislerden çeşitli bileşiklerin basınçlı sıcak su ekstraksiyonu (PHWE), suyun kritik sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda verimli olabilmektedir (Kronholm et al., 2007).



Şekil 2.4. Suyun faz diyagramı grafiği

Su, tıbbi bitkilerin endüstriyel ekstraksiyonu için ucuz ve çevre dostu olması sebebiyle ideal bir solventtir. Fakat, oda sıcaklığında poliklorobifeniller (PCBs), polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAHs) ve pestisitler gibi birçok organik bileşiklerin düşük ekstraksiyon verimliliklerinden dolayı kullanımı sınırlandırılmıştır. Fakat, suyun sıcaklık ile değişen özgün çözünme özelliklerinden dolayı ilgi çekiciliği artmıştır. Sızdırmaz sistemler içerisindeki suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri, eş zamanlı olarak sıcaklık ve basınç kontrol edilerek manipule edilebilmektedir. Sıcaklık suyun atmosferik kaynama noktasının (100 ^{o}C) önemli ölçüde üstüne çıkmasına rağmen, su sıvı fazda kalmaktadır. Subkritik suyun polarite, viskozite, yüzey gerilimi, kopma sabiti; çevre sıcaklığı ve basınç koşullarındaki su ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşürülmüştür. Dolayısıyla, organik solventlere yakın kimyasal özelliklere değiştirilebilmektedir. Sonuç olarak, subkritik koşullar altında basınçlı düşük polariteli su, polardan (düşük sıcaklıklarda) nonpolara (yüksek sıcaklıklarda) organik bileşikleri kolayca çözebilmektedir. Bu durumda bu "sub-kritik" ve "sıcak/sıvı" su olarak bilinmektedir. Subkritik su, 374 ^{o}C sıcaklık ve 221 bar basınca ulaşıncaya kadar sıvı formda kalabilmektedir. Sonrasında süperkritik su olmaktadır. Subkritik su ekstraksiyonu (SBWE), sıcak su ekstraksiyonu, basınçlı (sıcak) su ekstraksiyonu, basınçlı düşük polariteli su ekstraksiyonu, yüksek-sıcaklık su ekstraksiyonu, süper ısıtılmış su ekstraksiyonu veya sıcak sıvı su

ektraksiyonu olarak bilinmektedir. Bu ekstraksiyon yöntemi, subkritik fazdaki suyun kullanımına dayalı umut verici yeşil bir tekniktir. Subkritik su ekstrasiyonunun ileri avantajı, yüksek sıcaklık ve basınçta ham maddenin verimli ekstraksiyonu teşvik eden yüksek difüzyon hızlarını sağlamasıdır. Ayrıca organik bileşiklerin farklı kimyasal yapılarına göre oranlar değişmektedir. Bu sebeple subkritik suyun ekstraksiyonu hem seçici hem de hızlı olabilmektedir (Liang and Fan, 2013).

2.5.4.1. Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonunun avantajları

Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonunun (subkritik su ekstraksiyonunun) kullanımı çevresel ve sağlık bakımından oldukça ilgi çekicidir. Bu metot daha düşük ekstraksiyon süresi ve düşük solvent kullanımı gerektirmektedir. Buna bağlı olarak ısıya duyarlı bileşiklerin kaybı azalmakta ve toksik organik solvent kullanımı azalmakta, organik solvent kalıntısı ve aynı ekstraksiyon verimliliğinde oluşan atıklar olmamaktadır. Bu teknik sıcaklık, basınç ve ko-solvent gibi ekstraksiyon parametrelerini değiştirerek polar, orta polar ve polar olmayan organiklerin seçici olarak ekstraksiyonunu gerçekleştirebilmektedir. Bu arada subkritik su ekstraksiyonu (SBW), süperkritik ekstraksiyon (SFE) (özellikle CO_2) ile karşılaştırıldığında tıbbi bitkilerdeki orta polariteden yüksek molekül ağırlığına kadar tüm bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılabilmektedir. Süperkritik CO_2 ekstraksiyonu, sadece polar olmayan ve düşük molekül ağırlığına sahip bileşikleri ekstre edebilmekte ve flavonoitler, lignanlar ve diğer ilişkili polifenolikler gibi bileşikleri içeren sulu etanol veya metanolde çözünebilen bileşikleri ekstre edememektedir. Bu sebeple subkritik su ekstraksiyonu, süperkritik CO_2 ekstraksiyonundaki eksikliği telafi etmektedir.

Sonuç olarak, subkritik suyun kullanımının tıbbi bitkilerden fitokimyasalların ekstraksiyonu için uygun alternatif bir solvent olduğu görülmüştür. Özellikle organik solventlerin kullanımını içermeyen bu proses kirlilik problemleri, bununla ilişkili olarak proses sırasındaki organik solvent kayıpları kaçınılmazdır. Bu nedenle, geliştirilmiş yaşam standartları ve sosyal ilerleme olarak subkritik suyun kullanımı, doğru yeşil bir yöntemdir. Bugünlerde, subkritik su ekstraksiyon teknolojisi esansiyel yağlar, tanenler, flavonoitler, laktonlar, antrakinonlar, glikozitler, lignanlar, protein, pektin, polisakkaritler ve organik asitlere uygulanmaktadır (Liang and Fan, 2013).

2.6. Optimizasyon

Cevap yüzey yöntemi (Response surface methodology, RSM) temel olarak, farklı değişkenlerin sistem üzerine etkilerini belirlemek için matematiksel ve istatistiksel tekniklerin bir arada kullanıldığı bir metoda dayanmaktadır. Son yıllarda özellikle biyoteknolojik proseslerin optimizasyonunda sıkça kullanılan bir metottur. Deneysel tasarımın diğer yöntemlere göre üstünlüğü bütün parametrelerin aynı anda değişimlerinin incelenebilmesidir. Diğer yöntemlerle yapılan deneysel araştırmalarda incelenen parametre dışındaki parametreler sabit tutularak bir parametrenin değişimi incelenebilmektedir. Bu da çok sayıda deney yapılmasını gerektirmektedir. Deneysel tasarımda ise faktörlerin aynı anda değişimi incelenebildiğinden deney sayısı azalmaktadır. RSM yöntemi en çok bilgiye ulaşılacak noktalarda deney yapılmasını sağlamaktadır (Yücel, 2008).

Deneysel tasarım yöntemlerinde belirlenmesi gereken aşamalar problemin durumu ve tanımlanması, faktörler, seviye ve aralığın seçilmesi, cevap değişkeni seçilmesi, deneysel tasarım matrisi oluşturulması, deneylerin gerçekleştirilmesi, verilerin istatistiksel analizinin yapılması ve sonuçların değerlendirilmesi olarak sıralanmaktadır.

Proseslerin matematiksel tanımını oluşturabilmek için en önemli nokta, deneysel tasarım ve minimum deney ile maksimum bilgiye ulaşmaktır. Daha önceden belirlenmiş olan bir seri deney yapılarak değişkenler arasındaki iç etkileşimler ve istatistiksel tasarım gerçekleştirilir. Regesyon ve korelasyon analizi, proses değişkenleri ve optimum şartları doğru bir şekilde vermektedir (Yücel, 2008).

RSM, klasik yöntemde çok uzun çalışma sürelerini ve etkileşimlerini, matematiksel ve istatistiksel yaklaşımlarla çözen bir metottur. Ampirik modeller ve istatistiksel analizler, çok kompleks sistemlerdeki temel veya daha basit mekanizmaları ortaya çıkarmakta büyük önem taşır; böylelikle prosesin kontrolünde ve daha iyi anlaşılmasında kolaylıklar sağlamış olur. RSM' nin temel amacı, incelenen sisteme ait optimum işletme şartlarını veya işletim spesifikasyonlarını karşılayacak bir çalışma aralığının belirlenmesidir. Bu durumda klasik yöntemlerle elde edilen bazı sonuçlar, RSM için bir başlangıç noktası olabilir (Yücel, 2008).

2.7. iNOS İnhibisyon Mekanizması ve Nitrik Oksidin Rolü

Nitrik oksit (NO), homeostazın sürdürülmesinde önemli bir moleküldür. Hipertansiyondan septik şoka dağılım gösteren birçok patolojik durumda etkilidir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-argininden sentez edilir. Nitrik oksit sentaz enzimleri, yapısal nitrik oksit sentaz (cNOS) ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) olmak üzere iki ana guba ayrılır. Normal fizyolojik süreçler için cNOS ile üretilen miktarlara gereksinim vardır. Doku hasarı ve zedelenmesi gibi durumlarda ise iNOS ile aşırı miktarlarda NO üretilir. Akut inflamatuvar olaylarda iNOS ile üretilen miktarlar hem koruyucu hem de zarar verici olabilir. Organizmada birçok aktivitesi olması nedeniyle NO, fizyopatolojisinde çelişkiler bulunan hemen hemen her durumda üzerinde durulan bir moleküldür (Kuyumcu vd., 2004).

İnflamasyon herhangi bir yaralanma durumunda meydana gelen reaksiyonda yer alan spesifik-olmayan immün cevabın bir parçasıdır. İmmün sistem enfeksiyona ilk cevabı oluşturmakta ve akut inflamasyonda kritik rol oynamaktadır. Makrofajlar inflamatuvar rahatsızlıklarda temel rol oynamakta ve interlökin-6 (IL-6), tümör nekrozis faktör–α (TNF-α) ve interlökin-1β (IL-1β) gibi birçok pro-inflamatuvar sitokinleri üretmektedir. Ayrıca makrofajlar nitrik oksit (NO) ve prostanglandin E_2 (PGE_2)'yi de içeren inflamatuvar mediyatörleri de üretmektedirler. Gram-negatif bakterilerin hücre duvarlarının dış membranındaki majör bileşen olan lipopolisakkarit (LPS), proinflamatuvar sitokinleri, NO ve PGE_2 gibi inflamatuvar mediyatörleri üretmesi için makrofajları stimüle edebilmektedir (Cho et al., 2013).

İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) tarafından üretilen nitrik oksit (NO), damar tıkanıklığı, inflamasyon, kanser, hipertansiyon, obezite ve diyabet gibi birçok rahatsızlığa aracılık etmektedir. Bu sebeple, bu pro-inflamatuvar mediyatörlerin inhibisyonu inflamatuvar hastalıkların tedavisi için etkili bir strateji olmaktadır (Cho et al., 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Hammadde temini

Stevia rebaudiana bitkisinin yaprakları Manisa'da bulunan Öcal Organik Tarım Ürünleri Ltd. Şti.'den temin edilmiştir. Oda sıcaklığında kurutulup gönderilen yapraklar, +4 ºC'de ekstraksiyon işlemine kadar bekletilmiştir. Warring laboratuar ölçekli öğütücüyle toz hale getirilmiştir (Şekil 3.1). Çalışma süresince, plastik kilitli torbalarda +4 ºC'de tutulmuştur. Öğütme sonucu partikül boyutu 500 µm olmuştur.



Şekil 3.1. Ekstraksiyonda kullanılmadan önce kurutulmuş haldeki *Stevia rebaudiana* bitkisi

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Mikrodalga, ultrasonik, Soxhlet ekstraksiyonları için solvent olarak Merck (Almanya) markalı etanol kullanılmıştır. HPLC standartları rebaudiozit A ve steviozit %98 saflıkta olup, Extrasynthese (Fransa) firmasından temin edilmiştir. HPLC analizleri için etanol, asetonitril ve metanol Merck (Almanya) markalı kullanılmıştır. Analizlerde ve yardımcı çözgen içerisinde distile su kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Yüksek Basınçlı Sıcak Su Ekstraksiyon Ünitesi: Amar Equipments

HPLC Pompası: Thermo Scientific (Amerika)

Çözgen ekstraksiyonu mantolu ısıtıcı: Labor Alliance

Mikrodalga Cihazı: Sineo Microwave Chemistry Technology Co, Ltd. (Çin)

Ultrasonik Cihazı: Everest Ultrasonic

Vakum Pompası: Welch 2511

Liyofilizatör: Christ-ALPHA 1- 4 LD

3.2. Metot

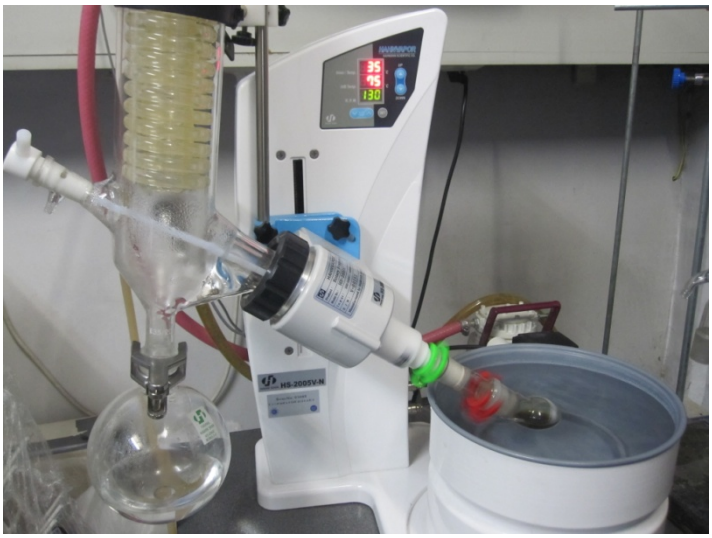
3.2.1. Uygulanan ekstraksiyon yöntemleri

3.2.1.1. Solvent ekstraksiyonu

Solvent ekstraksiyonu, Şekil 3.2'de görülen 500 ml hacimli Soxhlet ekstraktöründe gerçekleştirilmiştir. 100 g öğütülmüş *S. rebaudiana* yaprakları filtre kağıtlarından hazırlanmış kartuşlara konularak, Soxhlet aparatının içine yerleştirilmiştir. Mevcut sistem 1000 ml solvent ilavesi ile çalıştırılıp, 4 sifon (yaklaşık 6 saat) yaptıktan sonra durdurulmuştur. Mantolu ısıtıcı 100 ºC'ye ayarlanmış ve geri soğutucu altında çalıştırılmıştır. Polar yapıdaki steviol glikozitlerin ekstre edilmesi amaçlandığından, GRAS (Generally Regarded as Safe) statüde yer alan etanol solvent olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.2. Soxhlet ekstraktörü ile gerçekleştirilen *S. rebaudiana* çözgen ekstraksiyonu



Şekil 3.3. *S. rebaudiana* ekstrelerindeki çözgenlerin uçurulmasında kullanılan vakumlu döner evaporatör

Şekil 3.3'de vakumlu döner evaporatörde (70 ºC) çözgen uçurularak glikozit içeriği zengin ekstreler elde edilmiştir. 140 ºC'ye kadar olan sıcaklıklarda glikozit yapısı değişmemektedir (Kroyer, 1999).

3.2.1.2. Mikrodalga ekstraksiyonu

Mikrodalga ekstraksiyonu, Şekil 3.4.'de görülen içinde 8 adet kartuş (50 ml'lik) içeren Sineo mikrodalga cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraksiyon basamağında daha yüksek verim elde etmek için sıcaklık, ekstraksiyon süresi, katı:sıvı oranı ve güç parametreleri optimize edilmek istenmiştir. 2 g kurutulmuş Stevia yaprağı her bir çalışma aralığında yer alan katı:sıvı oranına göre etanol ile karıştırılarak kartuşlara yerleştirilmiştir.



Şekil 3.4. *Stevia rebaudiana*'nın mikrodalga ekstraksiyonu

Bu çalışmada uygulanacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için dört bağımsız değişkene (sıcaklık (40-90 ^{o}C), ekstraksiyon süresi (5-45 dk), kat:sıvı oranı (1:5-1:15 g/ml), güç (300-500 W) dayalı RSM yöntemi ile deney setleri oluşturulmuştur.

Mikrodalga ekstraksiyonunun literatürdeki örneklerine bakıldığında Jaitak et al. (2009), 10 – 90 ^{o}C sıcaklık, 20 – 160 W güç, 1:100 katı sıvı oranı (g/ml) ve 5 dk ekstraksiyon süresi koşullarında; Teo et al. (2009), 60 – 120 ^{o}C sıcaklık, 1:100 katı sıvı oranı (g/ml) ve 5 – 45 dk ekstraksiyon süresi koşullarında çalışmışlardır. Bu çalışmalardan yola çıkılarak bu tez çalışmasındaki mikrodalga ekstraksiyonu için çalışma koşulları 40 - 90 ^{o}C sıcaklık, 5 - 45 dk ekstraksiyon süresi, 1:5 - 1:15 (g/ml) katı:sıvı oranı ve 300 – 500 W güç olarak seçilmiştir.

3.2.1.3. Ultrasonik ekstraksiyon

Ultrasonik ekstraksiyon, Şekil 3.5.'de görülen içinde Everest ultrasonik cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu ekstraksiyon basamağında daha yüksek verim elde etmek için sıcaklık, ekstraksiyon süresi, katı:sıvı oranı ve güç parametreleri optimize edilmek istenmiştir. 2 g kurutulmuş Stevia yaprağı her bir çalışma aralığında yer alan katı:sıvı oranına göre etanol ile karıştırılarak kartuşlara yerleştirilmiştir.



Şekil 3.5. *Stevia rebaudiana*'nın ultrasonik ekstraksiyonu

Bu çalışmada uygulanacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için dört bağımsız değişkene (sıcaklık (40-90 ^{o}C), ekstraksiyon süresi (30-60 dk), katı:sıvı oranı (1:5-1:15 g/ml), güç (50-100 W)) dayalı RSM yöntemi ile deney setleri oluşturulmuştur.

Ultrasonik ekstraksiyonunun literatürdeki örneklerine bakıldığında Jaitak et al. (2009), 35±5 ^{o}C sıcaklık, 1:100 katı sıvı oranı (g/ml) ve 30 dk ekstraksiyon süresi koşullarında; Liu et al. (2010), 40 – 80 ^{o}C sıcaklık, 20 – 100 W güç, 1:10 katı sıvı oranı (g/ml) ve 10 - 60 dk ekstraksiyon süresi koşullarında çalışmışlardır. Bu çalışmalardan yola çıkılarak, bu tez çalışmasında ultrasonik ekstraksiyon için çalışma koşulları 40 - 90 ^{o}C sıcaklık, 30 - 60 dk ekstraksiyon süresi, 1:5 - 1:15 (g/ml) katı:sıvı oranı ve 50 – 100 W güç olarak seçilmiştir.



Şekil 3.6. Soxhlet, mikrodalga ve ultrasonik etanol ekstraksiyonları sonrasında elde edilen rafinat faz

3.2.1.4. <u>Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu</u>

Yüksek basınçlı sıcak su sistemi aşağıdaki parçalardan oluşmaktadır ;

1- Solvent sistemi
2- HPLC pompası
3- Örnek çıkış vanası
4- Giriş vanası
5- Basınç göstergesi

6- Motor

7- Mekanik şaft

8- Ekstraksiyon haznesi

9- Rezistans

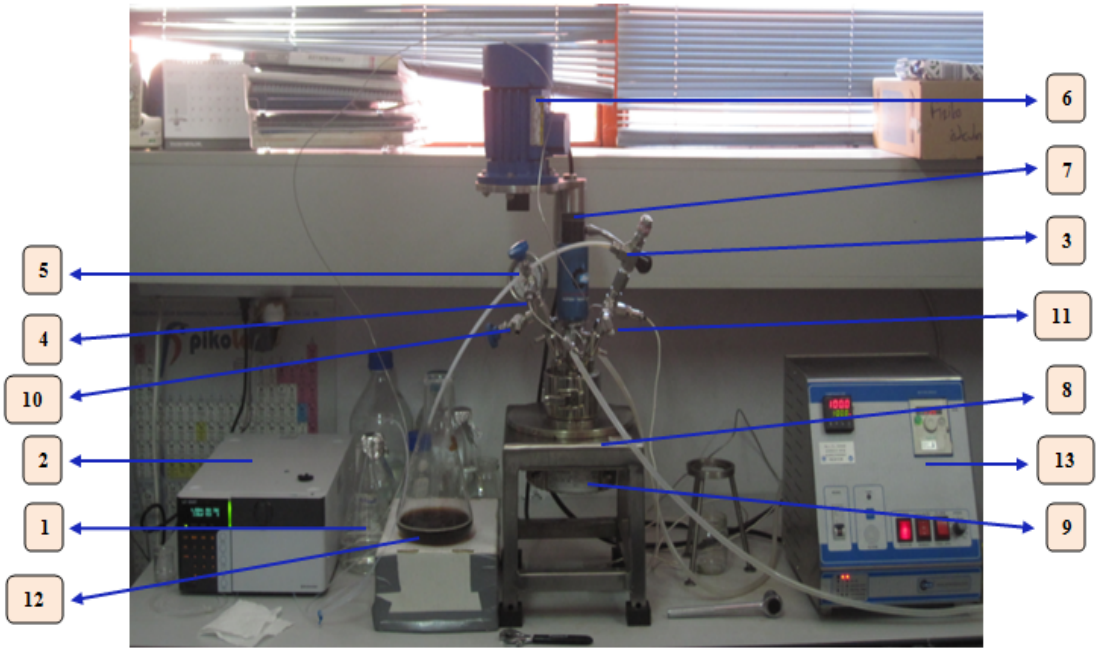
10- Çıkış vanası

11- Patlama diski

12- Toplama flaskı

13- Elektrik kontrol paneli

Tüm bu parçalardan oluşan, yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon denemelerinin gerçekleştirildiği sistem Şekil 3.7'de verilmektedir.



Şekil 3.7. *Stevia rebaudiana*'nın yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu

Ekstraktörün 100 ml'lik haznesi kartuş içinde 5 g öğütülmüş *S. rebaudiana* yaprakları ve 50 ml distile su ile doldurulmuştur. Ekstraktör ve vanaların da bulunduğu mekanik şaft birbirlerinin üstüne geçirilerek kapalı konuma getirilmiştir. Ardından kelepçeler ile de kapatılarak vidaları sıkıştırılmıştır. Ekstraksiyona başlamadan önce, ısıtıcı açılarak sıcaklığının ekstraksiyon denemesinde istenen sıcaklığa çıkması beklenmiştir. Ekstraksiyon sürekli akışta gerçekleştirileceği için HPLC pompasında istenen akış hızı ayarlanmış ve istenen sıcaklığa ulaşıldığında distile su sisteme pompalanarak ekstraktördeki basıncın

arttırılması sağlanmıştır. Sistemin yüksek basınca (230 bar) ulaşmasıyla, örnek çıkış akımında ilk akışın meydana gelmesiyle ekstraksiyon süreci başlatılmıştır.

Yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu için yaklaşık 230 bar yüksek basınç ve 1:10 (g/ml) oranında kurutulmuş Stevia yaprağı/distile su uygulanmıştır. Bu çalışmada uygulanacak olan ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için üç bağımsız değişkene (sıcaklık (100 - 150 ^{o}C), ekstraksiyon süresi (30 - 60 dk) ve akış hızı (2 – 6 ml/dk)) dayalı RSM yöntemi ile deney setleri oluşturulmuştur.

Suyun kritik sıcaklığı (T_c) 374.1 ^{o}C ve kritik basıncı (P_c) 221 bar olduğundan basınçlı sıcak su (subkritik su) genellikle suyun kaynama noktası olan 100 ^{o}C'nin üstü fakat 374 ^{o}C'nin altındaki ekstraksiyonlarda kullanılmaktadır. Bu koşullar suyun fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek için yeterli olmaktadır. Süperkritik suyun eritme gücü yüksektir ve suyun çözünürlüğü sıcaklık ve basıncın değiştirilmesiyle ayarlanabilmektedir. Ayrıca subkritik su ekstraksiyonu küçük ölçekte bu avantajı sağlamaktadır. Kritik noktanın yakınlarında yoğunluk basıncın güçlü bir fonksiyonudur. Oda sıcaklığında suyun bağıl geçirgenliği yüksektir, fakat sıcaklık arttıkça organik non-polar bileşiklerin suda daha çözünür olmasıyla bağıl geçirgenlik azalmaktadır. Yüksek basınçlı sıcak suyun (subkritik su) kütle-transfer özellikleri artmaktadır, çünkü subkritik suda çözünen maddelerin difüzyon katsayıları süperkritik suda çözünen maddelere göre daha yüksektir. Subkritik suyun viskozitesinin ve yüzey geriliminin azalması daha uygun kütle-transfer özellikleri sağlamaktadır.

Basınçlı sıcak su ekstraksiyonunun literatürdeki örneklerine bakıldığında Pol et al. (2007), 110 ^{o}C sıcaklık, 50 bar basınç ve 10 dk ekstraksiyon süresi koşullarında; Teo et al. (2009), 60-110 ^{o}C sıcaklık, 11-13 bar basınç, 1.5 ml/dk akış hızı ve 50 dk ekstraksiyon süresi koşullarında; Rao et al. (2012), 100-110 ^{o}C sıcaklık, 1 bar basınç, 120 rpm karıştırma ve 10 dk ekstraksiyon süresi koşullarında çalışmışlardır. Bu çalışmalardan yola çıkılarak bu tez çalışmasındaki yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyonu için çalışma koşulları 230 bar basınç, 1:10 (g/ml) katı:sıvı oranı, 100 - 150 ^{o}C sıcaklık, 2-6 ml/dk akış hızı ve 30-60 dk ekstraksiyon süresi olarak seçilmiştir.

Ekstraksiyon süresi dolduğunda HPLC pompasından gelen akış kesilmiş ve ısıtıcı kapatılmıştır. Ardından çıkış vanası açılarak kalan akışında çıkması sağlanarak sistemin basıncı düşürülmüştür. Cihazın soğuması beklendikten sonra, kelepçeler açılarak kalan ekstre ve rafinat faz boşaltılmıştır. Ekstraksiyon sonrası çıkan tüm ekstre filtre kağıdından geçirilerek +4 ºC'ye kaldırılmış, rafinat kısmı da oda sıcaklığında kurutulmuştur. Her denemeden sonra sistem temizlenerek, bir sonraki set değerleriyle yeni denemeye geçilmektedir.



Şekil 3.8. Subkritik su ekstraksiyonu sonrasında elde edilen rafinat faz



Şekil 3.9. Yüksek basınçlı sıcak su ekstrelerinden suyun uçurulması için kullanılan liyofilizasyon cihazı



Şekil 3.10. Liyofilizasyon sonrası elde edilen steviol glikozitler

3.2.2. Yüksek basınç sıvı kromatogafisi (HPLC) analizleri

3.2.2.1. Örneklerin hazırlanması

Vakumlu evaporatörde kurutulan Soxhlet, mikrodalga, ultrasonik ekstreleri ve liyofilizatörde kurutulan subkritik su ekstrelerinin 5 mg'ı 5 ml metanolde çözülerek, 0.45 μm naylon membrandan (SRP 15, Machery, Almanya) süzülmüştür. Böylece çözünmeyen partiküller filtrelenerek uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.2. HPLC-UV işlemi

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstreler ve posaları HPLC-UV'de aşağıdaki koşullarda 3 tekrar olarak analizlenmiştir. Kullanılan sistem Şekil 3.11.'de görülmektedir.

Cihaz : Thermo Scientific (Amerika), SCL- 10 A VP Kontrol ünitesi, SPD-10 Avp UV dedektör, DGU- 14A Degasser.

Pompa : LC-10 AT VP pompa

Kolon : SUPELCO 5NH2-MS 4.6 mmI..*150mm*5μm (Sigma-Aldrich)

Mobil faz : Çözgen A; ultra saf su ve Çözgen B; asetonitril

Sıcaklık : Ortam sıcaklığı (25- 27 ºC)

Akış hızı : 1 ml/dk

Enjeksiyon miktarı : 10 µl; Rhynodyne manuel enjektör

Tayin dalgaboyu : 210 nm

Şartlanma süresi : 10 dk



Şekil 3.11. Ekstrelerin ve rafinat fazların analiz edildiği Thermo Scientific HPLC sistemi

3.2.2.3. Kalibrasyon

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında rebaudiozit A ve steviozit standartlarının stok çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. Ardından bu stok çözeltilerin metanolle seyreltilmesiyle 7 farklı derişim hazırlanmıştır: rebaudiozit A için 1075 µg/ml, 537.5 µg/ml, 268.75 µg/ml, 134.375 µg/ml, 67.1875 µg/ml, 33.5938 µg/ml, 16,7968 µg/ml; steviozit için 1175 µg/ml, 587.5 µg/ml, 293.75 µg/ml, 146.875 µg/ml, 73.43 µg/ml, 36.7 µg/ml, 18.35 µg/ml. Üçer kez analiz yapılmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak lineer bir kalibrasyon grafiği çizilmiş ve miktarlar bu gafik kullanılarak Thermo Scientific Surveyer Chromquest 4.2 yazılımı ile bulunmuştur.

3.2.3. Box-Behnken metodu ile optimizasyon

Design Expert yazılımının Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) deneysel tasarım yönteminin uygulamalarından biri olan Box-Bhenken deneysel tasarımı (BBD) kullanılarak ekstraksiyon verimleri üzerine bağımsız değişkenlerin birbirleriyle etkileşiminin gözlenmesi mümkün olmaktadır. Bu çalışmada üç ve dört bağımsız değişkenli, BBD kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler subkritik su ekstraksiyonunda sıcaklık, zaman ve akış hızı olarak; mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonunda sıcaklık, zaman, güç ve katı:sıvı oranı olarak belirlenmiştir. Subkritik su ekstraksiyonundaki diğer değişkenler (basınç ve katı:sıvı oranı) seçilen değerlerde sabit tutulmuştur. Üç bağımsız değişkenli çalışılarak, 3 merkez nokta seçildiğinde, BBD matrix programı ile 15 denemeden oluşan deney deseni (Çizelge 3.1) ve 4 merkez nokta seçildiğinde, BBD matrix programı ile 27 denemeden oluşan deney desenleri (Çizelge 3.2 ve Çizelge 3.3) elde edilmiştir. Hammadde kısıtlı ya da pahalı olduğunda merkez nokta sayısı en az 1 seçilmekte, genelde 5 seçilerek daha fazla deneme yapılmaktadır. Bu seçimi yaparken elimizdeki *S. rebaudiana* miktarı gözönüne alınmıştır ve 3 denemede karar kılınmıştır. Merkez noktalarının eklenmesi işlemin tutarlılığını arttırmıştır. Steviozit ve rebaudiozit A verimleri bağımlı (response 1, 2) değişkenlerimiz olmuştur. HPLC sonuçları hesaplanıp, bu sütunlara yazılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. BBD programı tarafından 15 deneme için oluşturulan deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Time min	Factor 3 C:Flow rate ml/min	Response 1 Rebaudioside A mg/g	Response 2 Stevioside mg/g
1	Block 1	125.00	60.00	6.00		
2	Block 1	125.00	45.00	4.00		
3	Block 1	125.00	30.00	6.00		
4	Block 1	125.00	45.00	4.00		
5	Block 1	125.00	45.00	4.00		
6	Block 1	100.00	45.00	2.00		
7	Block 1	150.00	45.00	2.00		
8	Block 1	150.00	45.00	6.00		
9	Block 1	150.00	30.00	4.00		
10	Block 1	100.00	45.00	6.00		
11	Block 1	125.00	30.00	2.00		
12	Block 1	125.00	60.00	2.00		
13	Block 1	100.00	60.00	4.00		
14	Block 1	150.00	60.00	4.00		
15	Block 1	100.00	30.00	4.00		

Çizelge 3.2. BBD programı tarafından mikrodalga ekstraksiyonu 27 deneme için oluşturulan deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Time min	Factor 3 C:Solid/liquid rate g/ml	Factor 4 D:Power W	Response 1 Rebaudioside A mg/g	Response 2 Stevioside mg/g
1	Block 1	40.00	25.00	10.00	300.00		
2	Block 1	40.00	25.00	10.00	500.00		
3	Block 1	65.00	25.00	5.00	500.00		
4	Block 1	65.00	45.00	5.00	400.00		
5	Block 1	90.00	25.00	10.00	500.00		
6	Block 1	65.00	45.00	10.00	500.00		
7	Block 1	65.00	5.00	10.00	300.00		
8	Block 1	65.00	45.00	15.00	400.00		
9	Block 1	90.00	45.00	10.00	400.00		
10	Block 1	65.00	25.00	5.00	300.00		
11	Block 1	40.00	45.00	10.00	400.00		
12	Block 1	40.00	25.00	15.00	400.00		
13	Block 1	65.00	25.00	15.00	500.00		
14	Block 1	90.00	25.00	15.00	400.00		
15	Block 1	65.00	25.00	10.00	400.00		
16	Block 1	65.00	25.00	10.00	400.00		
17	Block 1	65.00	5.00	15.00	400.00		
18	Block 1	65.00	5.00	5.00	400.00		
19	Block 1	40.00	25.00	5.00	400.00		
20	Block 1	90.00	5.00	10.00	400.00		
21	Block 1	90.00	25.00	10.00	300.00		
22	Block 1	65.00	25.00	10.00	400.00		
23	Block 1	65.00	5.00	10.00	500.00		
24	Block 1	90.00	25.00	5.00	400.00		
25	Block 1	40.00	5.00	10.00	400.00		
26	Block 1	65.00	25.00	15.00	300.00		
27	Block 1	65.00	45.00	10.00	300.00		

Çizelge 3.3. BBD programı tarafından ultrasonik ekstraksiyon 27 deneme için oluşturulan deney deseni

Run	Block	Factor 1 A:Temperature C	Factor 2 B:Time min	Factor 3 C:Solid/liquid rate g/ml	Factor 4 D:Power W	Response 1 Rebaudioside A mg/g	Response 2 Stevioside mg/g
1	Block 1	90.00	45.00	5.00	75.00		
2	Block 1	65.00	45.00	10.00	75.00		
3	Block 1	40.00	30.00	10.00	75.00		
4	Block 1	90.00	30.00	10.00	75.00		
5	Block 1	40.00	45.00	15.00	75.00		
6	Block 1	65.00	30.00	10.00	50.00		
7	Block 1	65.00	45.00	5.00	50.00		
8	Block 1	65.00	30.00	10.00	100.00		
9	Block 1	40.00	45.00	10.00	50.00		
10	Block 1	65.00	60.00	5.00	75.00		
11	Block 1	90.00	60.00	10.00	75.00		
12	Block 1	65.00	45.00	15.00	100.00		
13	Block 1	65.00	45.00	10.00	75.00		
14	Block 1	65.00	45.00	10.00	75.00		
15	Block 1	65.00	45.00	15.00	50.00		
16	Block 1	65.00	30.00	15.00	75.00		
17	Block 1	90.00	45.00	15.00	75.00		
18	Block 1	65.00	60.00	10.00	50.00		
19	Block 1	65.00	30.00	5.00	75.00		
20	Block 1	40.00	45.00	5.00	75.00		
21	Block 1	40.00	60.00	10.00	75.00		
22	Block 1	65.00	45.00	5.00	100.00		
23	Block 1	90.00	45.00	10.00	100.00		
24	Block 1	90.00	45.00	10.00	50.00		
25	Block 1	65.00	60.00	10.00	100.00		
26	Block 1	65.00	60.00	15.00	75.00		
27	Block 1	40.00	45.00	10.00	100.00		

3.2.4. Optimum koşullarda elde edilen ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.4.1. Toplam fenol tayini

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarları standart olarak gallik asit kullanılarak Folin Ciocalteu reaksiyonu ile belirlenmiştir. Toplam fenol içeriği gram kuru ekstre başına mg gallik asit eşdeğerliği (GAE) olarak ifade edilmiştir [standart eğri denklemi : 760 nm = $0.0946.c_{gallic\ acid}$ $(mg.ml^{-1})$]. Stevia ekstrelerinin herbiri (0.1 ml, 5 mg/ml) distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak seyreltilmiş ve Folin Ciocalteu reaktifi (500 µl) ile karıştırılmıştır. Ardından elde edilen solüsyon vortex ile karıştırılarak 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak doymuş Na_2CO_3 (1.5 ml, %20) çözeltisi eklenmiş ve vorteks ile karıştırılarak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımının absorbansı Shimadzu UV-2401 spektrofotometre kullanılarak 760 nm'de ölçülmüştür. Standart olarak gallik asit kullanılmış ve analizler çift tekrarlı yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar gallik asit (GAE) / g ekstre olarak ifade edilmiştir (Akay vd., 2011).

3.2.4.2. DPPH serbest radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesi (Antioksidan aktivite tayini)

Bu tayin yöntemi, antioksidan aktivite gösteren maddelerin, kararlı yapıda ve mor renkli DPPH radikalini süpürme etkilerinin ölçümlenmesine dayanmaktadır. Referans standart bileşiği olarak askorbik asit kullanılmıştır. Ekstreler 4 ml MeOH içinde çözünmüştür (final konsantrasyon 250 µg/ml). Ardından 1 mM DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate radical-Sigma) metanolik solüsyonu (0.5 ml) hazırlanarak ekstrelere ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 15 sn karıştırılarak, 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası reaksiyon karışımının absorbansı Shimadzu UV-2401 işişspektrofotometre kullanılarak 517 nm'de metanole karşı okunmuştur. Reaksiyon karışımının düşük absorbans değeri yüksek serbest radikal süpürme aktivitesini belirtmektedir. DPPH radikal süpürme inhibisyonunun yüzdesi %50 DPPH serbest radikalini inhibe etmek için gereken örnek konsantrasyonunu (IC_{50} değeri, µg/ml) vermektedir (Yesil-Celiktas, 2009).

Okunan absorbans değerleri verilen denklemde yerlerine yazılarak radikal süpürme aktivitesi yüzdesel olarak hesaplanmaktadır.

% İnhibisyon = $((A_{DPPH} - A_{Ext})/A_{DPPH}) \times 100)$

A_{DPPH}: ekstre içermeyen kontrol solüsyonunun (metanolik DPPH solüsyonu) absorbansı

A_{Ext}: ekstre içeren solüsyonun absorbansı

3.2.4.3. Toplam flavonoit tayini

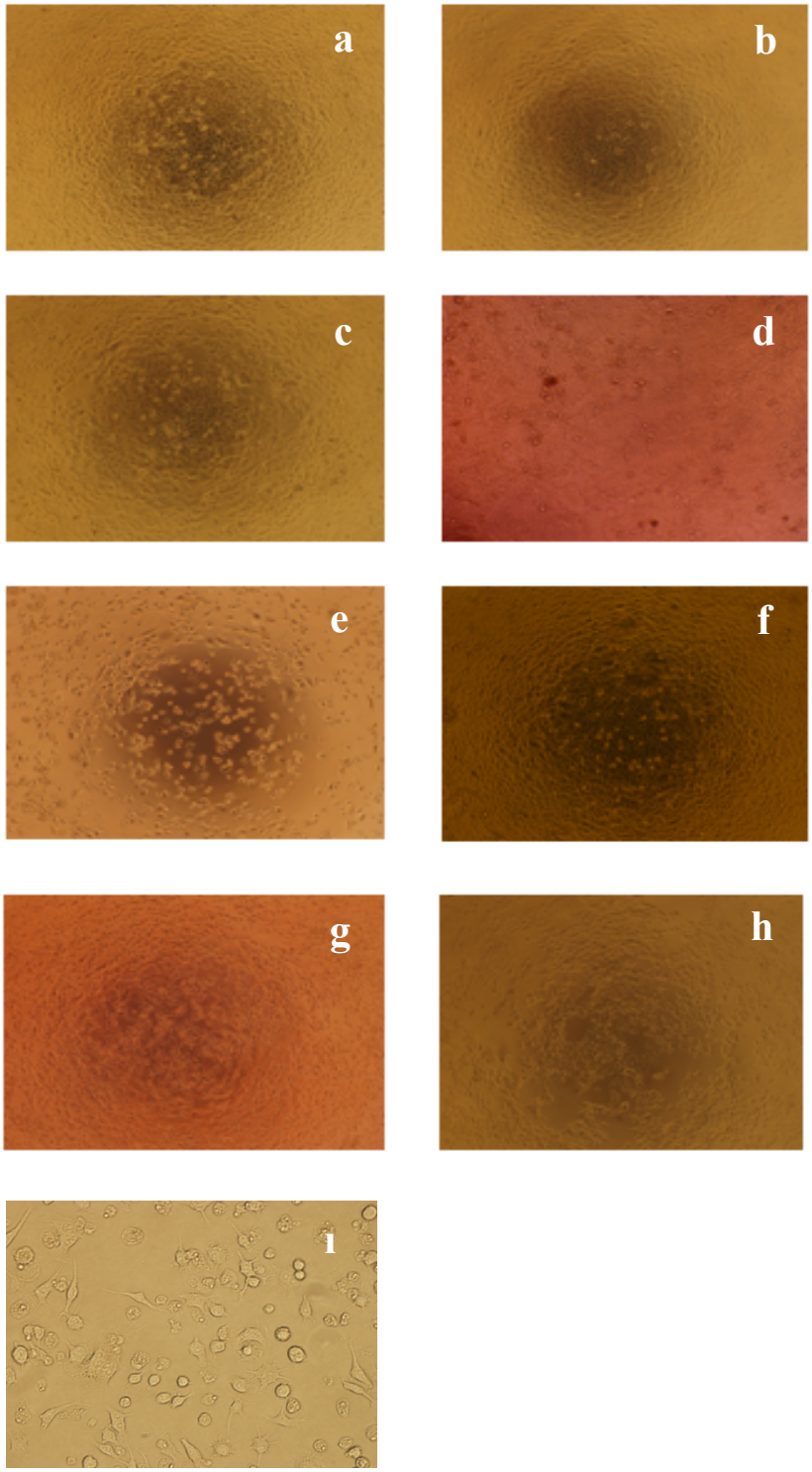
Kullanılacak metodun prensibi ekstrelerdeki flavonoitlerin alüminyum iyonu (Al^{3+}) ile reaksiyona girerek stabil flavonoit-Al^{3+} kompleksini oluşturmasına dayanmaktadır. Bu kompleks sarı renk oluşturmakta ve rengin yoğunluğu flavonoit konsantrasyonu ile orantılı olmaktadır. Flavonoitlerin tayini için kalibrasyon eğrisi olarak y = 0.0037.x + 0.0027 kullanılmıştır. Flavonoit içeriği, gram ekstre başına mg kersetin eş değerliği (mg QE/g) olacak şekilde ifade edilmiştir. 0.5 ml ekstre (final konsantrasyonu 1 mg/ml, MeOH içinde) MeOH (1.5 ml), alüminyum klorit solüsyonu ($AlCl_3$, 0.1 ml, %10), potasyum asetat (CH_3COOK, 0.1 ml, 1 M) ve distile su (2.8 ml) karıştırılarak 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyon karışımının absorbansı Shimadzu UV-2401 spektrofotometre kullanılarak 415 nm'de ölçülmüştür (Mandal and Madan, 2013).

3.2.5. Optimum koşullarda elde edilen ekstrelerin sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi

3.2.5.1. Hücre hatları ve kültürlerin devamlılığı

Normal hücre hattı olarak HEK (insan embriyonik böbrek); kanser hücre hatları olarak HeLa (insan serviks adenokarsinoma), A-549 (insan akciğer karsinoma), MCF-7 (insan göğüs adenokarsinoma), CaCo-2 (insan kolon koloraktal adenokarsinoma), mPANC96 (insan pankreas adenokarsinoma), PC-3 (insan prostat adenokarsinoma) ve U87MG (glioblastom hücre hattı) sitotoksiste testlerinde kullanmıştır. Ayrıca RAW264.7 (makrofaj hücre hattı) iNOS inhibiyon aktivite testinde kullanılmıştır. Hücre hatları Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Eğitim Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

Hücreler, DMEM:F12 (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 gentamisin, ve 1 mM HEPES) besi ortamı içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücreler haftada iki defa pasajlanmış ve logaritmik fazda aktif olarak çoğalan hücreler testlerde kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Hücre hatlarının mikroskop görüntüleri (a) HeLa, (b) A-549, (c) MCF-7, (d) CaCo-2, (e) mPANC96, (f) PC-3, (g) U87MG, (h) HEK, (ı) RAW264.7

3.2.5.2. Hücre kültürü

Bu aşamadan sonra hücre hattının başlangıç derişimi 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde medium ile birlikte hücreler hazırlanmıştır. Her bir hücre hattı için ayrı bir 96 gözlü kültür pleytlerine hücre süspansiyonları koyularak CO_2 inkübatöründe 37 °C'de %5 CO_2 içeren ortamda 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücre süspansiyonlarının bulunduğu 96 gözlü plakların her bir kuyucuğuna 1. kuyucuğa hücre ve medium (1/10 oranında), 2. kuyucuğa DMSO (pozitif kontrol) olmak üzere ekstreler 3 farklı konsantrasyonda (50 µg/mL, 5 µg/mL, 0.5 µg/mL) ilave edilmiş ve tekrar CO_2 inkübatöründe 48 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5.3. Sitotoksisite testi

Ekstrelerin çeşitli kanser hücre hatları (HeLa, A-549, MCF-7, CaCo-2, mPANC96, PC-3, U87MG) ve normal hücre hattı (HEK) üzerine olan etkisi MTT testi ile taranmıştır. Test, MTT tetrazolium tuzunun sadece mitokondrial aktivitesi olan canlı hücreler tarafından renkli formazanlara indirgenmesi prensibine dayanmaktadır. Çoğalan hücreler prolifere olmayan hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirlenmektedir. Sitotoksisite testi için başlangıç hücre sayısı 1×10^5 hücre/ml olacak şekilde 96 gözlü mikropleytlere 100 µl ekilmiştir. Her bir hücre hattı için ayrı bir 96 gözlü kültür pleyti hazırlanarak 37 °C'de %5 CO_2 ve %95 nem içeren inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben DMSO içerisinde hazırlanan her ekstre 3 farklı konsantrasyonda (50 µg/mL, 5 µg/mL, 0.5 µg/mL) hücreler üzerine eklenerek tekrardan CO_2'li inkübatörde 48 saat inkübe edilmiştir. DMSO maksimum %0.05 oranında kullanılmış olup test dozlarında hücrelerle muamele edilmiştir.

48 saatlik inkübasyon ve morfolojik incelemeler sonunda 96 gözlü pleytlerin hücre ve madde bulunan her bir kuyucuğuna 25 µL MTT solüsyonu (2 mg/ml) eklenmiş ve 4 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki solüsyon boşaltılarak MTT ile oluşan formazan kristallerini çözmek için kuyucuklara 200'er µL DMSO eklenmiştir. Ardından pleytler mikroplate okuyucu (Thermo Multiskan Spectrum) ile her bir kuyucuk 570 nm'de (referans filtre, 620 nm) okutulmuş ve okunan absorbans değerine göre canlılık

oranı belirlenmiştir (Nalbantsoy vd., 2008, 2011).

Yüzde canlılık oranları aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır :

$$\%\ \text{Canlılık oranı} = \frac{\text{Test kuyucuğunun adsorbansı}}{\text{Kontrol kuyucuğunun adsorbansı}}\ \text{x}\ 100$$

3.2.5.4. Morfolojik inceleme

48 saatlik inkübasyon sonrasında farklı derişimlerde ekstrelere maruz bırakılmış hücrelerin morfolojik incelemeleri ters faz mikroskop (Olympus, Japonya) altında yapılmıştır.

3.2.5.5. iNOS aktivitesinin inhibisyonu

iNOS aktivitesinin inhibisyonu Nalbantsoy vd. (2012)'nin yaptığı metoda göre belirlenmiştir. Bu amaçla makrofaj hücreleri (RAW 264.7) RPMI 1640 (%10 FBS, %1 L-glutamin, %1 gentamisin, ve 1 mM HEPES) besi ortamı içerisinde 37 °C'ye ayarlanmış CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Test için hücreler 96 gözlü hücre kültürü pleytlerine 100'er µL ekilerek ($1x10^5$ hücre/göz) 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra LPS (1 µg) ve farklı dozlarda (100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL) ekstrelerle muamele edilerek 24 saat 37 °C'ye ayarlanmış CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Partenolayt pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Ortamdaki nitrit miktarını belirlemek için 96 gözlü pleytlerde 35 µl hücre kültürü süpernatantına 35 µl Giess ajanı eklenerek 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası absorbans değerleri mikropleyt okuyucu (Thermo Multiskan Spectrum) ile 540 nm'de (referans filtre, 630 nm) okunmuştur. Nitrit üretiminin yüzde inhibisyonu kontrol ile karşılaştırılarak belirlenmiş ve doz eğrisinden IC_{50} değeri hesaplanmıştır (Nalbantsoy vd., 2012; Quang et al., 2006).

NO üretiminin yüzde inhibisyonu aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\%\ \text{NO inhibisyonu} = \frac{(NO2)c - (NO2)s}{(NO2)c}\ \text{x}\ 100$$

$(NO_2)c$: ekstre eklenmemiş hücreler tarafından salınan nitrit konsantrasyonu
$(NO_2)s$: ekstre eklenmiş hücreler tarafından salınan nitrit konsantrasyonu

3.2.5.6. Ekstrelerin makrofaj hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Ekstrelerin makrofaj hücreleri (RAW 264.7) üzerine etkisi MTT testi ile taranmıştır. Ekstreler ile 24 saatlik inkübasyon sonunda hücre canlılığı MTT yöntemiyle 3.2.5.3.'de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir.

3.2.6. Rafinat fazın karakterizasyonu

Ekstraksiyon sonrası kalan rafinat fazın da tamamı katma değeri yüksek ürün ve ara ürünlerin eldesi için kullanılabilmektedir. Buradaki temel hedef toplam klorofillerin, karotenoitlerin ve toplam diyet fiberlerin kantitatif analizlerinin yapılmasıdır.

3.2.6.1. Toplam klorofillerin ve karotenoitlerin belirlenmesi

Stevia yapraklarındaki her iki klorofil (A ve B) ve karotenoitler Abou-Arab et al. (2010) metoduna göre dehidrasyon öncesi ve sonrası farklı metotlar ile belirlenmiştir: Her bir örnekten 5 g alınarak 30 ml %85 aseton bulunan koyu renk şişe içerisinde karıştırılmış ve 15 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 100 ml'lik flask içerisine filtre edilmiş ve %85 aseton çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyonun absorbansı spektrofotometre kullanılarak 440, 644 ve 662 nm'de ölçülmüştür. Kör olarak %85'lik aseton kullanılmıştor. Toplam karotenoitler ve klorofillerin içeriği aşağıdaki denklikler kullanılarak hesaplanmıştır:

Klorofil A (mg/L) = (9.784 × A662) – (0.99 × A664).

Klorofil B (mg/L) = (21.426 × A664) – (4.65 × A662).

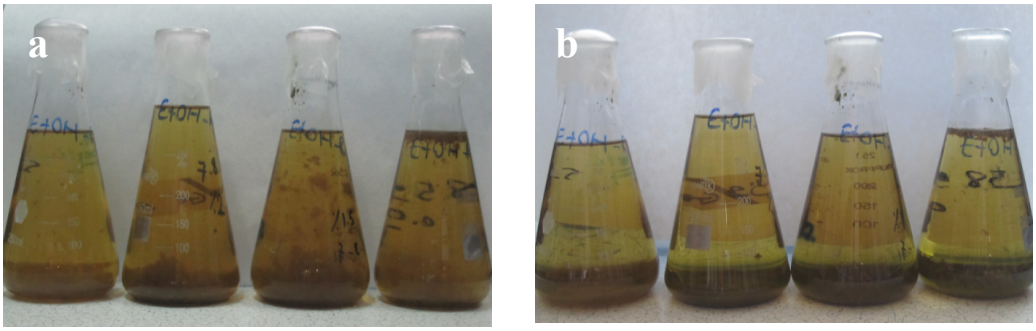
Toplam karotenoitler (mg/L) = (4.695 × A440) – 0.369 (klorofil A + klorofil B)



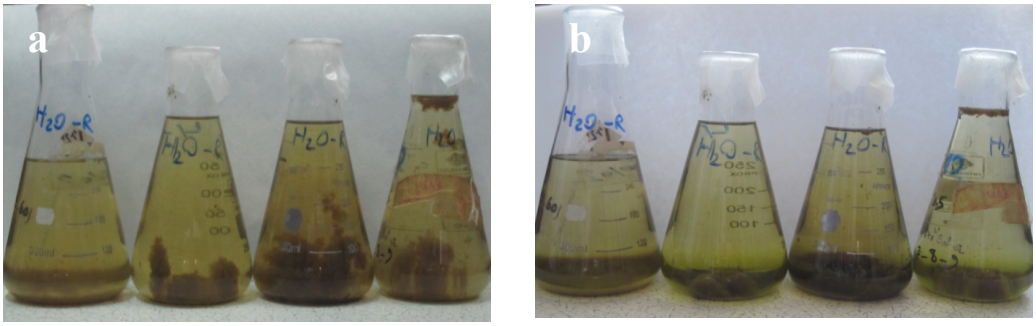
Şekil 3.13. Su ve etanol rafinat fazlarının 15 saat %85 asetonda bekletilmesi

3.2.6.2. Toplam diyet liflerinin kantitatif analizi

Toplam diyet liflerin miktarı gavimetrik enzimatik metot ile belirlenmiştir (Segura-Campos et al., 2014; Sigma-Aldrich, 2014). Toplam diyet liflerin belirlenmesinde protein ve kül miktarlarının hesaplanması için örneklerin analizi çift tekrarlı yapılmıştır. Sulu ve etanolik Stevia rafinat fazlarından 4'er gram tartılarak 4 flask içine paylaştırılmış (2 flask protein analizi için ve 2 flask kül analizi için) ve her birine 50 mL fosfat tamponu (50 mM, pH 6) ilave edilmiş ve flasklar alüminyum folyo ile sarılmıştır. Ardından flaskların her birine jelleşmeleri için 0,1 ml α-amilaz enzimi (Orba Biyokimya) eklenerek 100 ^{o}C'deki su banyosuna yerleştirilmiş ve 15 dk boyunca belirli aralıklarla karıştırılmıştır. İnkübasyon sonrası flasklar soğutulduktan sonra pH 7.5'a ayarlanmıştır. Ardından proteinleri uzaklaştırmak için flasklara 0.1 ml proteaz enzimi (Sigma) eklenerek 60 ^{o}C'deki su banyosuna yerleştirilmiş ve 30 dk boyunca belirli aralıklarla karıştırılmıştır. Flasklar soğutulduktan sonra pH 4'e ayarlanmıştır. Ardından nişastayı uzaklaştırmak için flasklara 0.1 ml amiloglukosidaz enzimi (Novozymes) eklenerek tekrardan 60 ^{o}C'deki su banyosuna yerleştirilmiş ve 30 dk boyunca belirli aralıklarla karıştırılmıştır. Son olarak çözünebilen diyet liflerin presipitasyonu için flasklara 1:4 (v/v) oranında %95'lik etanol eklenerek bir gece bekletilmiştir.



Şekil 3.14. Etanol rafinat fazının 1 saat (a) ve 1 gece (b) sonraki çökelmesi

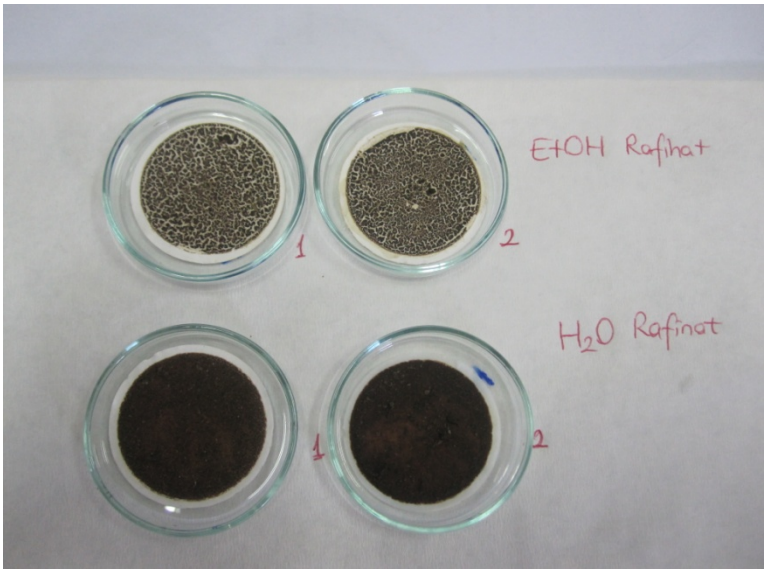


Şekil 3.15. Su rafinat fazının 1 saat (a) ve 1 gece (b) sonraki çökelmesi

Ardından vakum altında flask içeriği filtre edilmiştir. Flask içinde kalan kısım ise 3 kere 20 ml %78'lik (v/v) etanol, 2 kere 10 ml %95'lik (v/v) etanol ve 2 kere 10 ml aseton ile yıkanmıştır.

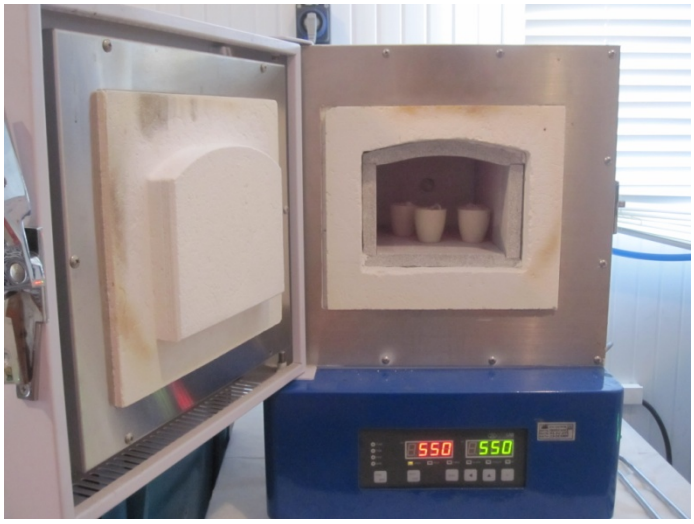


Şekil 3.16. Filtrasyon için kullanılan Sartorious vakumlu filtrasyon cihazı



Şekil 3.17. Etanol ve su rafinat fazlarının filtrasyonu sonrası elde edilen filtre kekleri

Elde edilen filtre keklerinden 2 tanesi 550 ^{o}C'deki kül fırınında 4 saat boyunca yakılmış ve sonrasında soğuması için desikatörde bekletilmiştir. Filtre keklerinden kalan 2 tanesi de 105 ^{o}C'de kurutulmuş ve sonrasında soğuması için desikatörde bekletilmiştir.



Şekil 3.18. Filtre keklerinin yakılması için kullanılan 550 ^{o}C'deki kül fırını



Şekil. 3.19. Filtre keklerinin kurutulması için kullanılan 105 ^{o}C'lik fırın

Filtrasyon sonrası elde edilen filtrattan 1 ml örnek alınmış ve azot (N) analiz kiti kullanılarak içeriğindeki yaklaşık azot miktarı belirlenmiş ve 6.25 faktörü ile çarpılarak protein miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.20. Filtrasyon sonrası elde edilen filtratlar

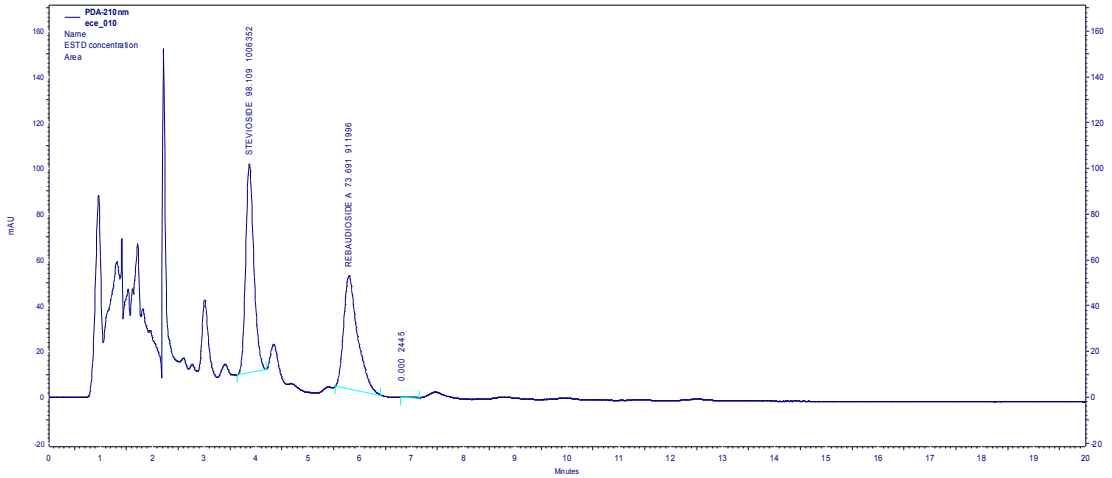
Desikatörde bekletilen filtre kekleri tartılarak her bir rafinat için çökelti ağırlığı ve kül ağırlığı hesaplanmıştır. Rafinat fazdaki toplam diyet liflerin yüzdesi aşağıdaki formül ile belirlenmiştir:

$$\%\ \mathrm{TDF}\ = \frac{\text{Çökelti ağırlığı (g)} - \text{Protein (g)} - \text{Kül (g)}}{\text{Örneğin ağırlığı (g)}}$$

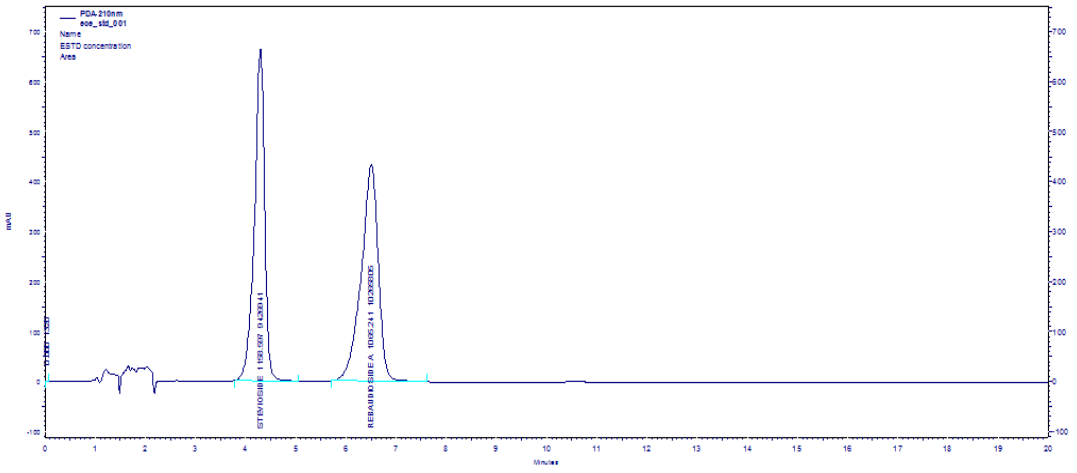
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Stevia'dan Elde Edilen Steviol Glikozitlerin HPLC Analiz Sonuçları

Türkiye'de Manisa'da kültivasyonu yapılan *S. rebaudiana* yapraklarından optimum koşullardaki subkritik su ekstraksiyonu ile steviol glikozitler ekstre edilmiş ve HPLC analizi sonuçlarına göre, toplam ekstrenin yaklaşık %10'unun steviozit ve %7'sinin rebaudiozit A içerdiği belirlenmiştir. Bitkiye ait kromatogram ve steviol glikozitlerin standart kromatogramı Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de görülmektedir.



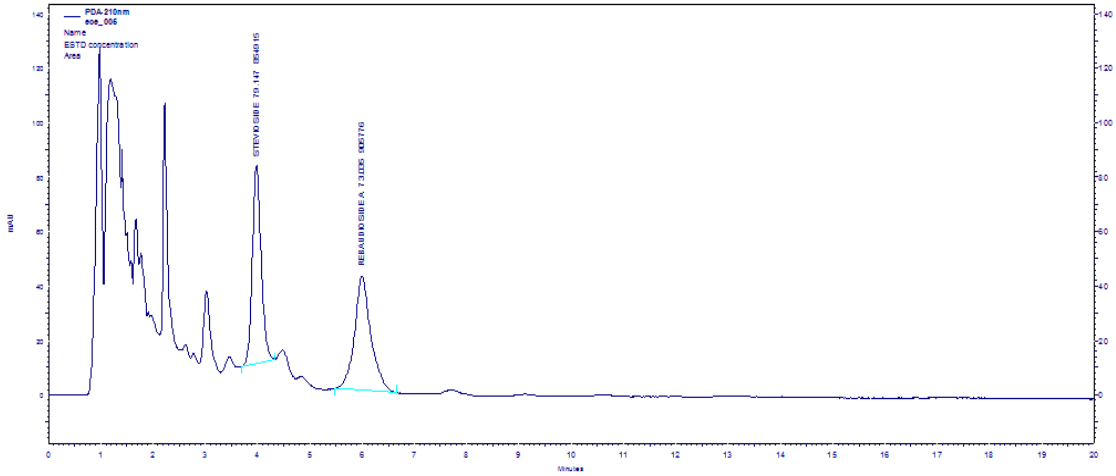
Şekil 4.1. *Stevia rebaudiana* HPLC kromatogramı



Şekil 4.2. Steviozit ve Rebaudiozit A standartlarının HPLC kromatogramı

4.2. Subkritik Su Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları

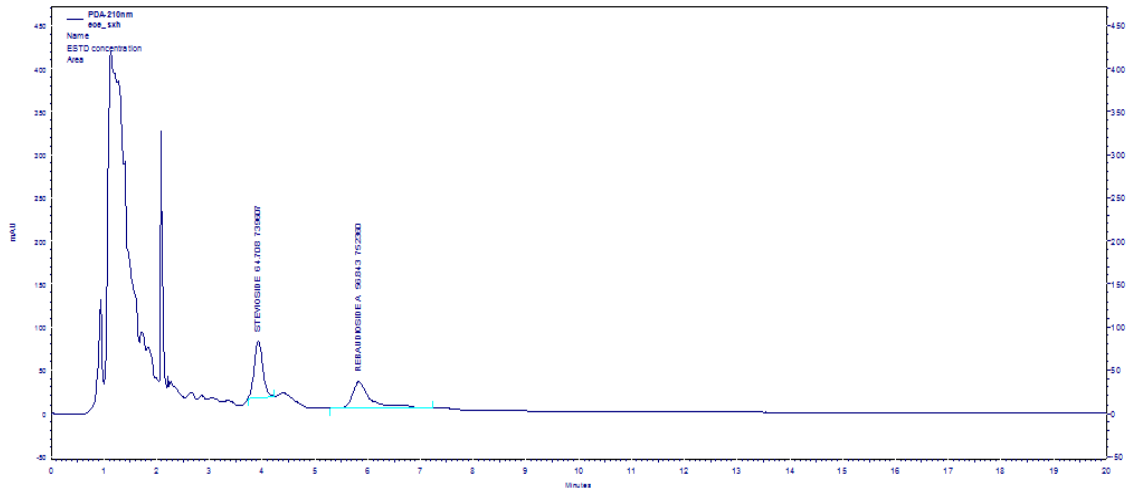
Subkritik su ekstraksiyonu en yüksek verim 125 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ekstraksiyon süresi, 4 ml/dk akış hızı çalışma koşullarında 38.67 mg/g steviozit ve 35.68 mg/g rebaudiozit A olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Subkritik su ekstresinin HPLC kromatogramı

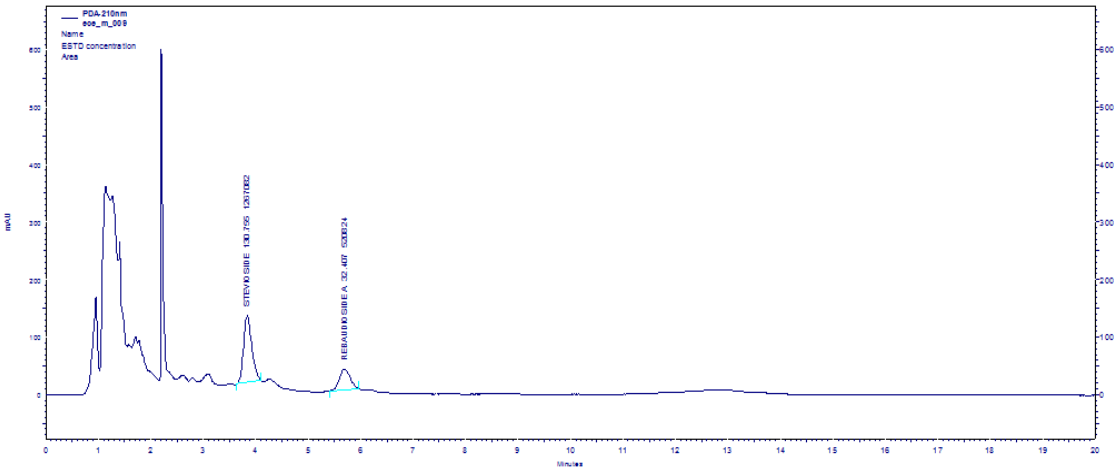
4.3. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları

Soxhlet ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ekstre içeriği 14.02 mg/g steviozit ve 12.31 mg/g rebaudiozit A olarak bulunmuştur (Şekil 4.4).

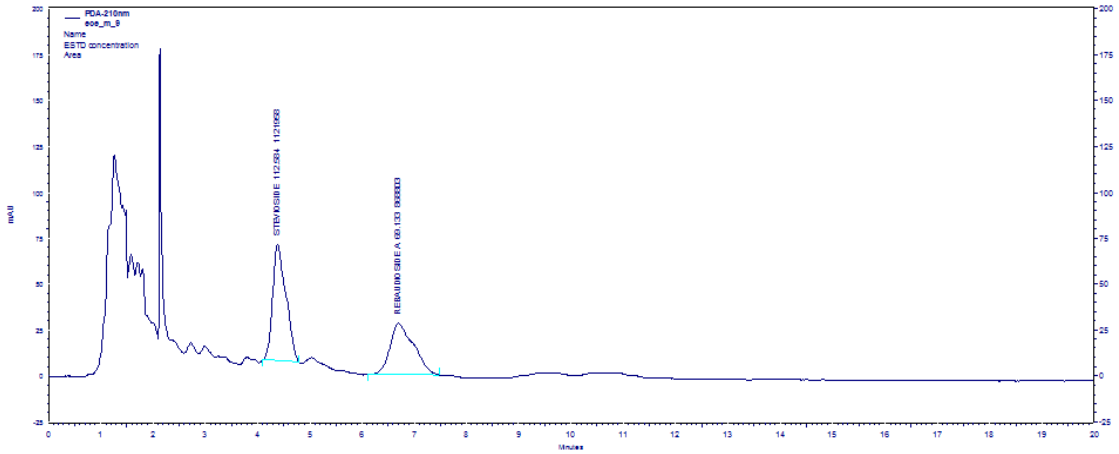


Şekil 4.4. Soxhlet etanol ekstresinin HPLC kromatogramı

Mikrodalga etanol ekstraksiyonunda en yüksek verim 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ekstraksiyon süresi, 1:10 katı:sıvı oranı, 400 W güç çalışma koşullarında 17 mg/g steviozit ve 4.21 mg/g rebaudiozit A olarak (Şekil 4.5); aynı koşullarda mikrodalga su ekstraksiyonunda ise 14.64 mg/g steviozit ve 8.99 mg/g rebaudiozit A (Şekil 4.6) olarak belirlenmiştir.

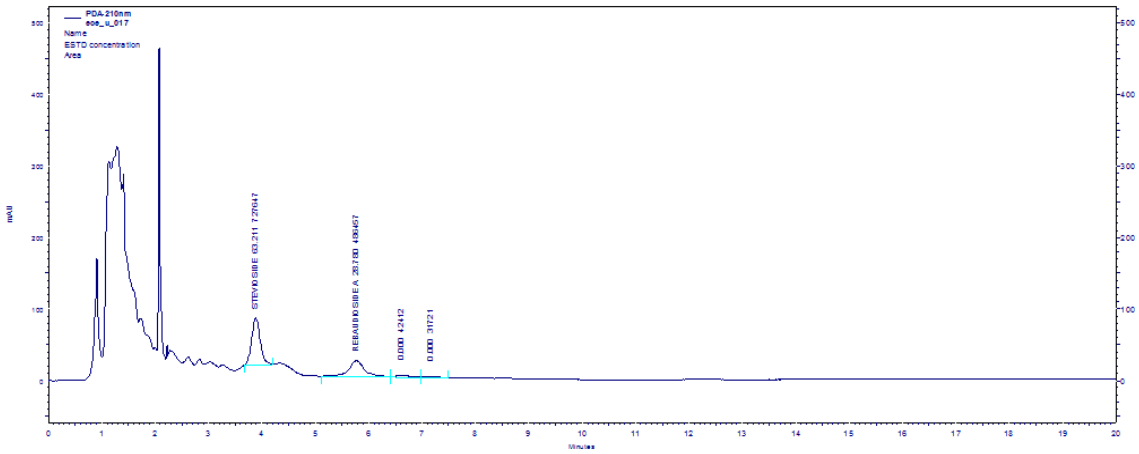


Şekil 4.5. Mikrodalga etanol ekstresinin HPLC kromatogramı

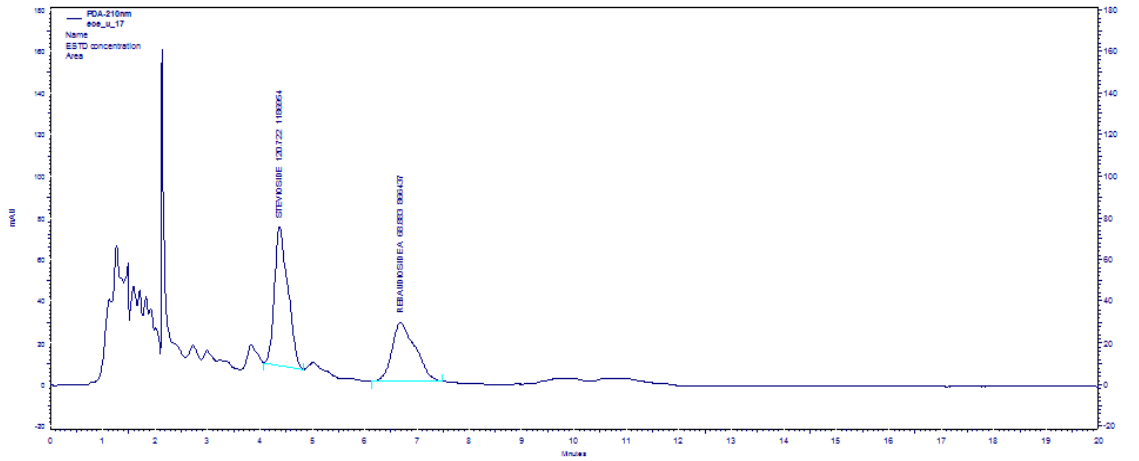


Şekil 4.6. Mikrodalga su ekstresinin HPLC kromatogramı

Ultrasonik etanol ekstraksiyonunda en yüksek verim ise 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ekstraksiyon süresi, 1:15 katı:sıvı oranı, 75 W güç çalışma koşullarında 10.24 mg/g steviozit ve 4.66 mg/g rebaudiozit A (Şekil 4.7); aynı koşullarda ultrasonik su ekstraksiyonunda 19.56 mg/g steviozit ve 11.16 mg/g rebaudiozit A (Şekil 4.8) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Ultrasonik etanol ekstresinin HPLC kromatogramı



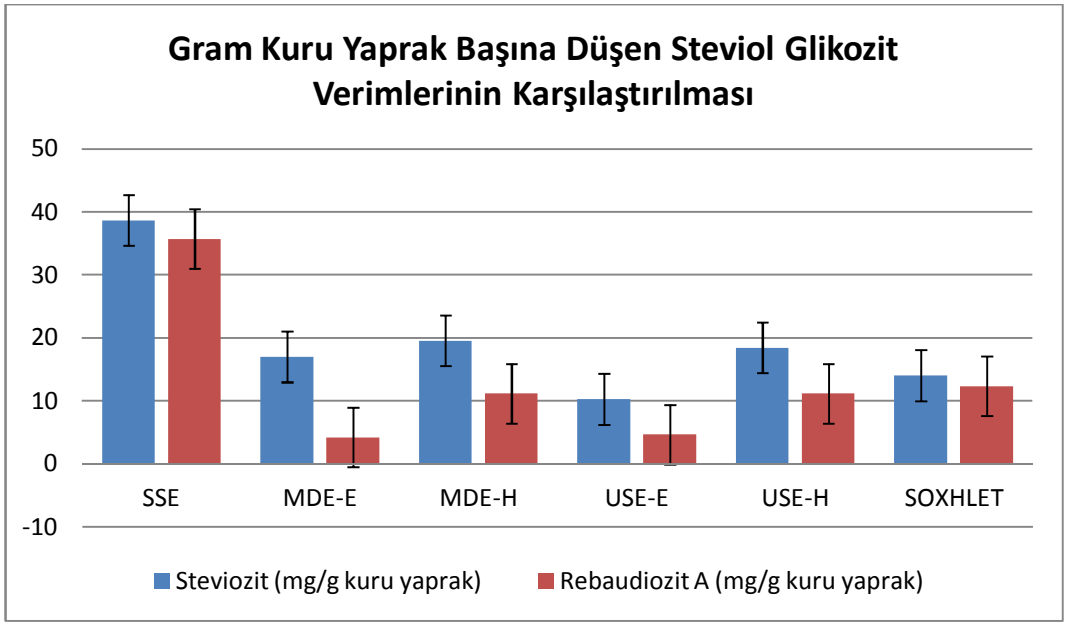
Şekil 4.8. Ultrasonik su ekstresinin HPLC kromatogramı

4.4. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilen Steviol Glikozit Miktarlarının ve Ekstre Verim-Verimlilik Değerlerinin Karşılaştırılması

Stevia rebaudiana'nın subkritik su ekstraksiyonunun yanı sıra diğer alternatif yöntemler olarak mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonları ve karşılaştırma için de konveksiyonel yöntem olarak Soxhlet (etanol) ekstraksiyonu yapılmıştır. Stevia'nın mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonlarının optimum koşullarının belirlenmesi için çok sayıda denemenin yapılacak olması ve elde edilen ekstrelerdeki solventin kolay uçurulabilir ve az toksik bir solvent olarak tercih edilmek istenmesi sebebiyle bu ekstraksiyonlar etanol ile

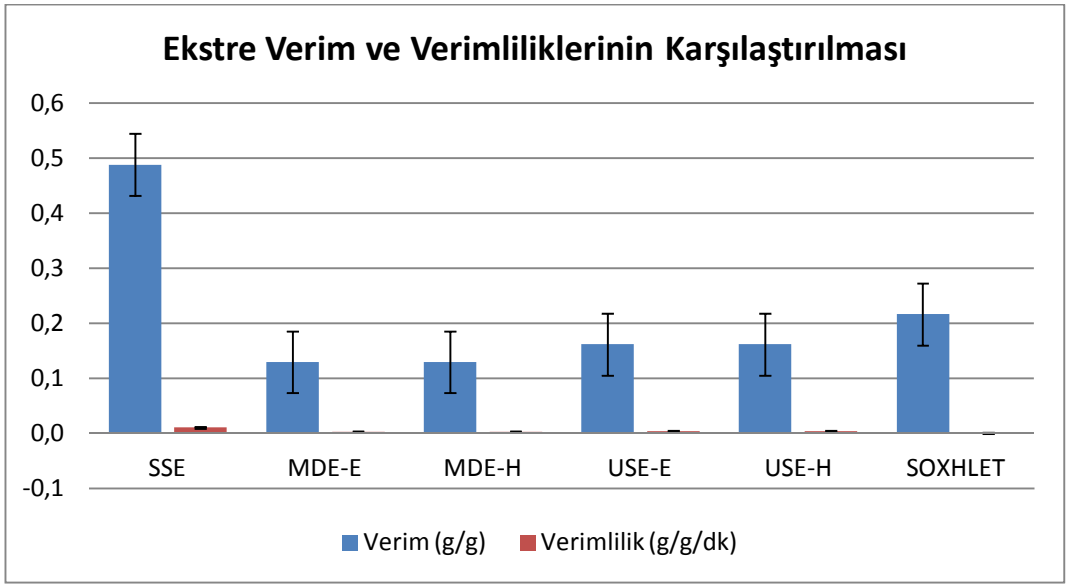
gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon koşullarının optimizasyonunun ardından subkritik su ekstraksiyonu ile karşılaştırılabilmesi açısından belirlenen optimum çalışma koşulları ile mikrodalga su ve ultrasonik su ekstraksiyonları da yapılmıştır.

Stevia'nın farklı ekstraksiyon yöntemleri gram kuru yaprak başına düşen steviol glikozitler bakımından karşılaştırıldığında en yüksek steviozit (38.67 mg/g kuru yaprak) ve rebaudiozit A (35.68 mg/g kuru yaprak) içeriği subkritik su ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Subkritik su ektraksiyonu dışında diğer su ile yapılan ekstraksiyonları karşılaştırdığımızda mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonlar ile elde edilen steviol glikozit miktarları çok yakın bulunmuştur. Etanolik ekstreleri kendi içinde karşılaştırdığımızda ise en yüksek steviol glikozit içeriği Soxhlet ekstraksiyonunda, sonra sırasıyla mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonda bulunmuştur. Elde edilen tüm bu veriler karşılaştırıldığında subkritik su ekstraksiyonu ile kuru yaprak başına en fazla steviol glikozitin elde edilebileceği anlaşılmıştır. Stevia yapraklarında farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen steviol glikozitlerinin miktarsal olarak karşılaştırılması Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin gram kuru yaprak başına düşen steviol glikozit verimlerine göre karşılaştırılması

Stevia'nın farklı ekstraksiyon yöntemleri ekstre verim ve verimliliği bakımından karşılaştırıldığında en yüksek verim (0.489 g/g) ve verimlilik (0.011 g/g/dk) değerlerinin subkritik su ekstraksiyonunda olduğu belirlenmiştir. Subkritik su ektraksiyonunu dışında diğer su ile yapılan ekstraksiyonları karşılaştırıldığında ultrasonik su ekstrasksiyonunun verim (0.162 g/g) ve verimlilik (0.004 g/g/dk) değerleri mikrodalga su ekstraksiyonunun verim (0.130 g/g) ve verimlilik (0.003 g/g/dk) değerlerinden daha yüksek olarak bulunmuştur. Etanol ekstreleri kendi içinde karşılaştırıldığında en yüksek verim (0.217 g/g) ve en düşük verimlilik (0.001 g/g/dk) değerlerinin Soxhlet ekstraksiyonunda olduğu bulunmuş ve aynı şekilde ultrasonik etanol ekstraksiyonunun verim (0.162 g/g) ve verimlilik (0.004 g/g/dk) değerlerinin mikrodalga etanol ekstraksiyonunun verim (0.130 g/g) ve verimlilik (0.003 g/g/dk) değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Buna göre su ve etanol ile yapılan mikrodalga ve ultrasonik ekstraksiyonları arasında verim ve verimlilik açısından bir fark olmadığı anlaşılmıştır. Elde edilen tüm bu veriler karşılaştırıldığında en yüksek verim ve verimlilikteki Stevia ekstrelerinin elde edilebileceği yöntemin subkritik su ekstraksiyonu olduğu anlaşılmıştır. Stevia'nın farklı ekstraksiyon yöntemlerinin ekstre verim ve verimlilik değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4.10'da yapılmıştır.



Şekil 4.10. Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin ekstre verim ve verimlilikleri bakımından karşılaştırılması

4.5. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon

4.5.1. Subkritik su ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Çizelge 4.1'de verilen deney tasarımına uygun olarak gerçekleştirilen deneylerde Rebaudiozit A'nın (*Y1*) ve Steviozit'in (*Y2)* ekstraksiyon verimini (mg/g kuru *S. rebaudiana* yaprakları) açıklamak için program tarafından oluşturulan ikinci dereceden çok terimli denklem değişkenlerinin önündeki katsayılar Design Expert programında yer alan **''Analysis''** sekmesinde ANOVA bölümünde yer almaktadır. Aynı yerde bulunan **''Diagnostics''** bölümünde deney sonuçlarıyla elde edilmiş eğri görülmektedir.

Çizelge 4.1. Subkritik su ekstraksiyonu için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları

Deney no	A (sıcaklık)	B (zaman)	C (akış hızı)	Sıcaklık (^oC)	Zaman (dk)	Akış hızı (ml/dk)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)
1	0	+1	+1	125	60	6	17.35	34
2	0	0	0	125	45	4	15.87	31.09
3	0	-1	+1	125	30	6	21.25	31.28
4	0	0	0	125	45	4	30.68	33.70
5	0	0	0	125	45	4	35.68	38.67
6	-1	0	-1	100	45	2	27.57	31.10
7	+1	0	-1	150	45	2	6.20	3.27
8	+1	0	+1	150	45	6	5.76	5.83
9	+1	-1	0	150	30	4	12.15	17.80
10	-1	0	+1	100	45	6	21.03	28
11	0	-1	-1	125	30	2	20.64	27.06
12	0	+1	-1	125	60	2	18.55	23.52
13	-1	+1	0	100	60	4	24.65	29.94
14	+1	+1	0	150	60	4	7.84	7.01
15	-1	-1	0	100	30	4	25.12	31.01

Her iki glikozitin de denklemleri aşağıda olup, A, B, C kodlanmış değişkenleri sırasıyla sıcaklık, zaman ve akış hızını göstermektedir:

$$Y1\left(\frac{mg}{g}\right) = +30.74 - 8.30 * A - 1.35 * B - 0.95 * C - 0.96 * A * B + 1.52 * A * C - 0.45 * B * C - 8.81 * A^2 - 4.50 * B^2 - 6.80 * C^2$$

$$Y2\left(\frac{mg}{g}\right) = +34.49 - 10.77 * A - 1.58 * B + 1.77 * C - 2.43 * A * B + 1.41 * A * C + 1.56 * B * C - 12.48 * A^2 - 0.57 * B^2 - 4.96 * C^2$$

Çizelge 4.2. *Y_1, Y_2* ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box- Bhenken/Analyses/ANOVA)

Kaynak	**Kareler Toplamı**	**d.f.***	**Ortalama Kareleri**	**F- değeri**	**Olasılık (P)>F**
a) Rebaudiozit A için Model	1055.53	9	117.28	9.88	0.0106
A-Sıcaklık	551.74	1	551.74	46.50	0.0010
B-Süre	14.49	1	14.49	1.22	0.3194
C-Akış hızı	7.15	1	7.15	0.60	0.4726
Artık değer	59.33	5	11.87		
Uyumsuzluk	11.15	3	3.72	0.15	0.9185
Saf hata	48.18	2	24.09		
Genel toplam	1114.86	14			
R^2	0.9468				
R^2 adj	0.8510				

Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F-değeri	Olasılık (P)>F
b) Steviozit için Model	1649.93	9	183.33	9.36	0.0120
A-Sıcaklık	927.18	1	927.18	47.33	0.0010
B-Süre	20.10	1	20.10	1.03	0.3576
C-Akış hızı	25.08	1	25.08	1.28	0.3091
Artık değer	97.94	5	19.59		
Uyumsuzluk	68.30	3	22.77	1.54	0.4177
Saf hata	29.64	2	14.82		
Genel toplam	1747.87	14			
R^2	0.9440				
R^2 adj	0.8431				

*d.f: degees of freedom

Varyans analizi (ANOVA), eldeki verilerin modele oldukça uygun olduğunu göstermektedir. Öncelikle F değerine değinecek olursak, bu değer belirli bir veri kümesine ilişkin olan bir modelin, bu veri kümesindeki varyasyonun ne kadarını açıklayabildiği ile ilişkilidir. Bu ilişki ise, açıklanan varyasyonun açıklanmayan varyasyona oranı şeklindedir. Oran olarak ifade edilen bu ilişki *uyumsuzluk F değeriyle* ilgilidir. Regesyon eşitliğiyle (model ile) açıklanan varyasyon miktarının daha büyük olması; bu eşitliğin, sonuçları anlamlı bir şekilde açıklama olasılığının da daha büyük olduğunu ifade eder. Varyans analizinde elde edilen F değeri, bu ilişkinin bir ölçüsüdür. Daha büyük F değeri, regesyon eşitliğinin, verileri anlamlı olarak açıklamada daha yetenekli olduğunu gösterir. Yukarıda 9.88 ve 9.36 olduğu görülen *model F değeri*, modelin anlamlı olduğunu; 0.15 ve 1.54 olan *uyumsuzluk F değeri* ise görülen bu uyumsuzluğun anlamsız olduğunu veya kayda değer olmadığını göstermektedir.

Varyans analizi (ANOVA) (Çizelge 4.2) modeldeki *F* ve olasılık (probabilite) değerlerinin anlamlı olduğunu göstermiştir. 0.05'ten küçük olan "Olasılık(P)>F" değerleri veya P-değerleri model terimlerinin anlamlı olduğunu; 0.1'den büyük olan değerler ise model terimlerinin anlamlı olmadığını ifade eder.

Y_1 modelinin p= 0.0106<0.05 ve Y_2 modelinin p= 0.0120<0.05 değerleri modellerin anlamlı olduğunu göstermiştir. Bu da bize, değişkenlerin herhangi bir kombinasyonuna göre deneme yapılsa tahmini verimi bulmak için yeterli bir model denklemi oluşturulduğunu göstermiştir. Yukarıdaki analiz tablosunda A terimi anlamlı iken, B ve C terimlerinin anlamsız olduğu görülmektedir. P-değerlerinden açıkça anlaşılmaktadır ki, Stevia'nın subkritik su ekstraksiyonu ile elde edilen steviol glikozitler (rebaudiozit A ve steviozit) sıcaklıktan daha fazla etkilenmektedir. Daha yüksek P-değerine sahip olan süre ve akış hızı değişkenlerinin ekstraksiyon üzerindeki etkisi, sıcaklığa göre daha azdır.

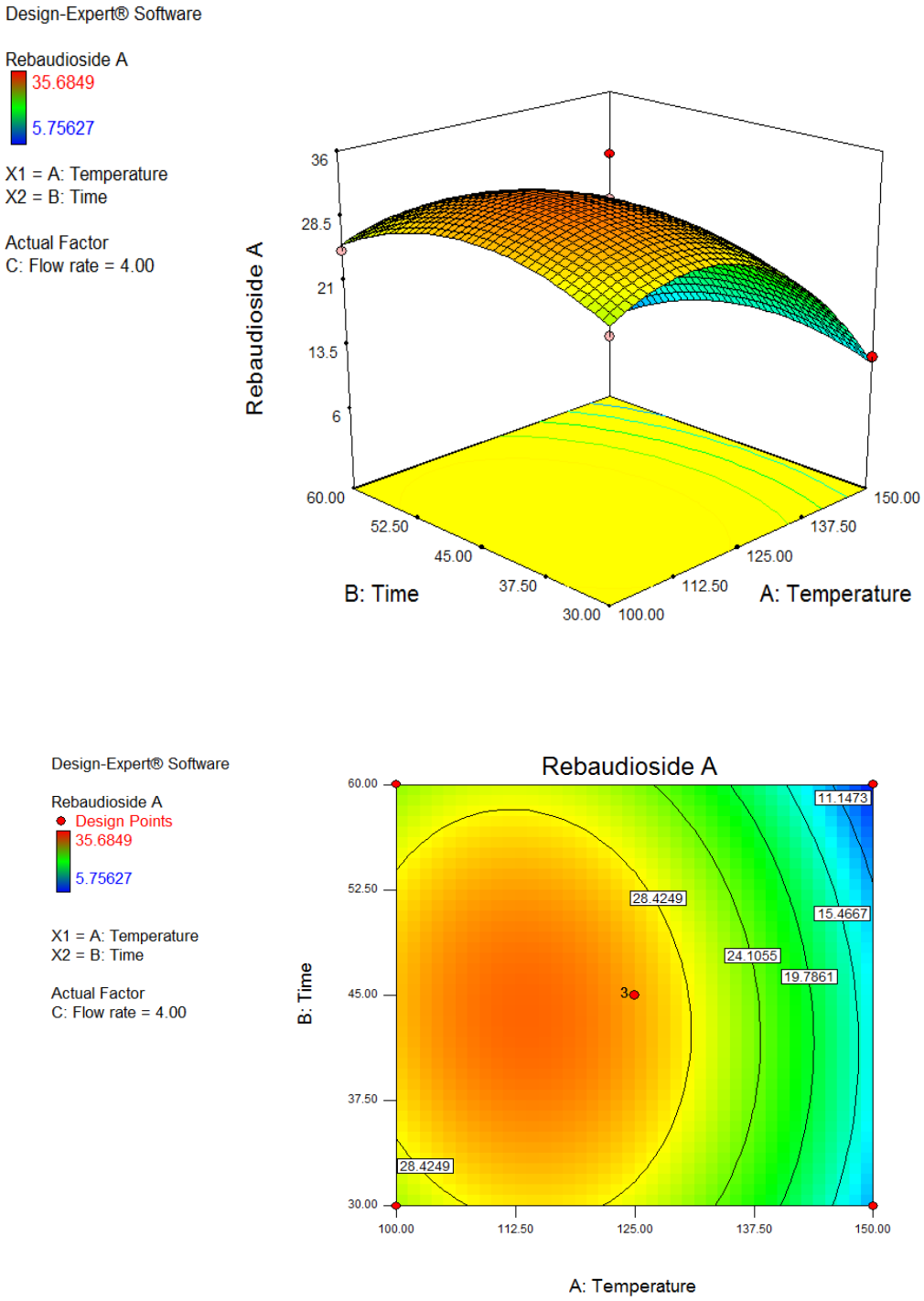
0.15 ve 1.54 olan uyumsuzluk değerleri ("*Lack of Fit F-value*"), modelin uyumsuzluğunun, tekrarlanan deneylerde görülen hata payı olan saf hataya ("*pure error*") göre oldukça küçük olduğunu diğer bir deyişle bu uyumsuzluğun anlamsız olduğunu göstermektedir.

R^2 değerleri (0.9468 ve 0.9440) modelin HPLC sonuçlarına uyduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon verimlerinin model ve deneysel değerleri arasında iyi bir uyum olduğunu göstermiştir. Şöyle ki, veri kümesindeki varyasyonun %94-95'i model ile açıklanabilmiş fakat, %5-6'sı açıklanamamıştır. Yani modelin, ilişkin olduğu prosesi yeterince iyi açıkladığı söylenebilmektedir.

Şekil 4.11 (a) sıcaklık ve zamanın farklı kombinasyonlardaki üç boyutlu (3D) (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zamanın 30-60 dk arasında, 125ºC sıcaklıklara çıkıldığında ekstraksiyon veriminin maksimum noktaya ulaştığı görülmüştür. Şekil 4.11 (b)'de zamanın kavis yaptığı değerin 45 dk civarında yer alması, optimum zamanın bu bölgede olduğu şeklinde yorumlanmaktadır.

Her iki şekilden de verim üzerine sıcaklık artışının daha fazla etkisi, kırmızı bölgelerin genişlemesiyle görülmüştür. Suyun sıcaklığının kaynama noktası olan 100 ^{o}C'nin üstüne çıktığı yani subkritik faza geçtiği sıcaklığa artması suyun yoğunluk, viskozite, yüzey gerilimi ve difüzivite gibi fizikokimyasal özelliklerini değiştirmiştir. Kritik noktanın yakınlarında yoğunluk basıncın güçlü bir fonksiyonudur. Yüksek basınçlı sıcak suyun (subkritik su) kütle-transfer özellikleri artmaktadır, çünkü subkritik suda çözünen maddelerin difüzyon katsayıları süperkritik suda çözünen maddelere göre daha yüksektir. Subkritik suyun viskozitesinin ve yüzey geriliminin azalması daha uygun kütle-transfer

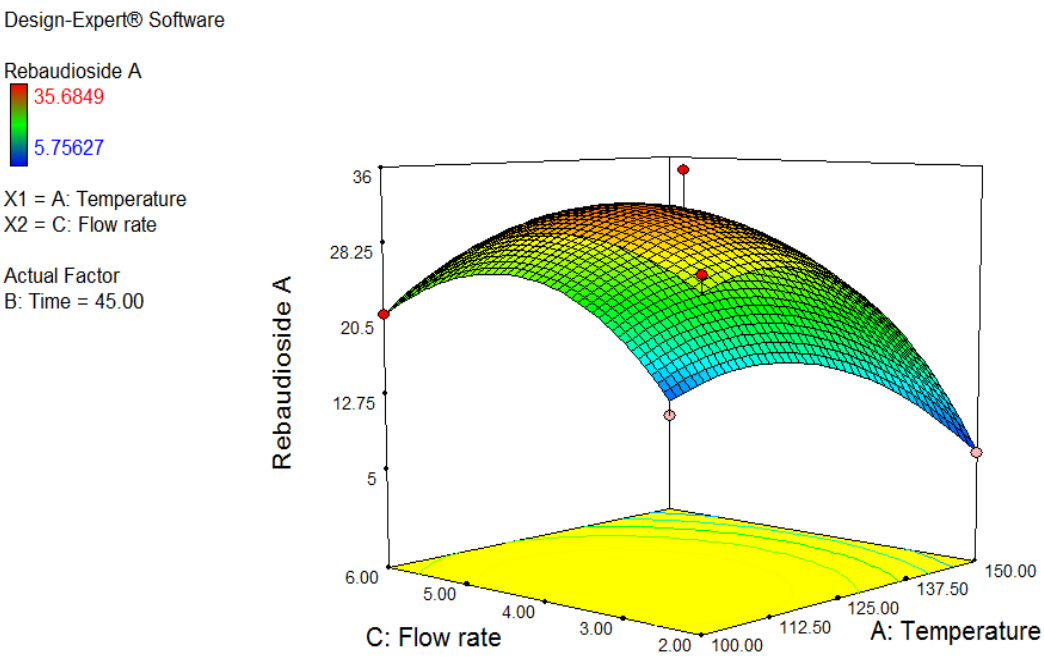
özellikleri sağlamaktadır (Liang X., Fan Q., 2013). Bu bağlamda suyun sıcaklığının artması ekstraksiyon verimini arttırmıştır.

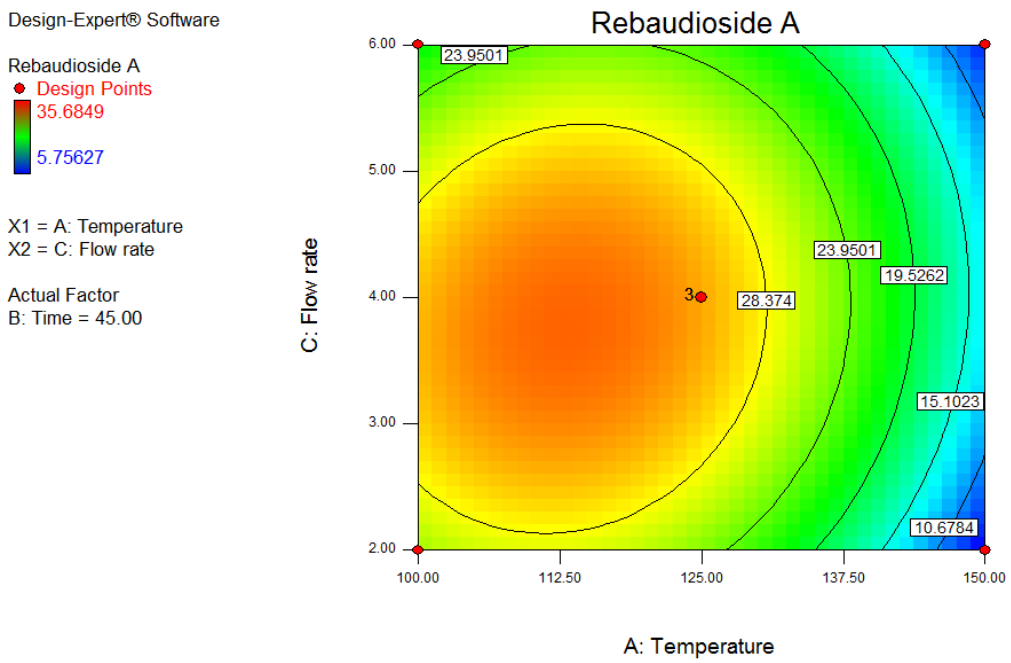


Şekil 4.11. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (ºC) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki **(a)** 3D, **(b)** yatay etkilerini göstermektedir. Akış hızı optimum değerinde (4 ml/dk) sabit tutulmuştur.

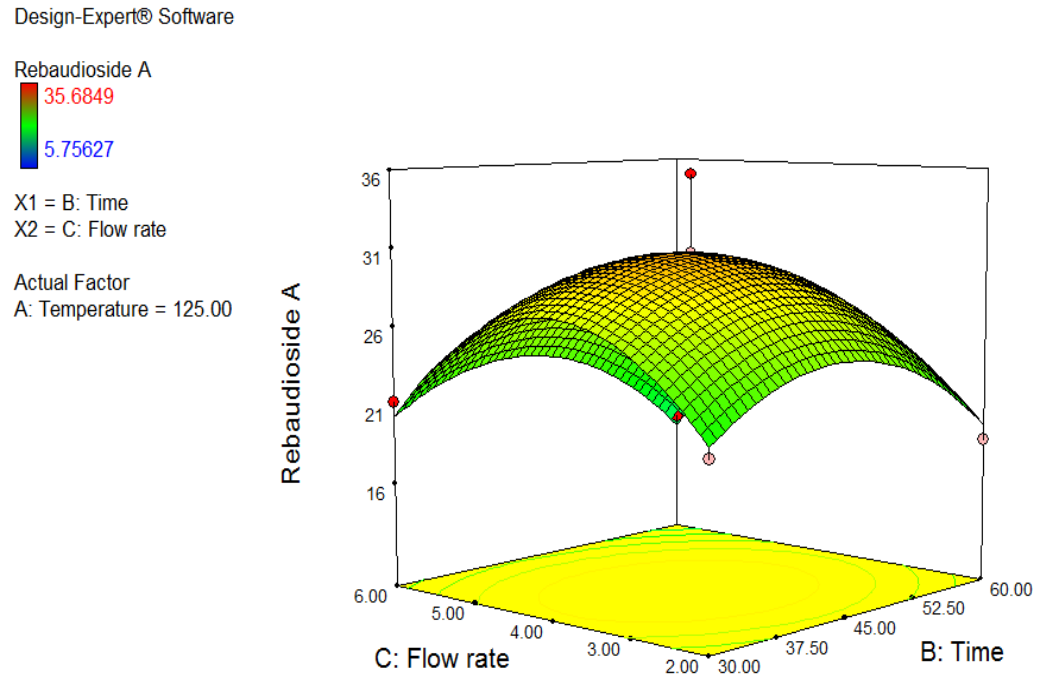
Sıcaklık ve akış hızının etkileşimine (Şekil 4.12) baktığımızda 45 dk ekstraksiyon süresinde yüksek ekstraksiyon verimlerine ulaşıldığı görülmektedir. En yüksek verim 125 ^{o}C sıcaklık ve 4 ml/dk akış hızı koşullarının olduğu kırmızı bölgede elde edilmiştir. Şekil 4.12 (b)'de akış hızının kavis yaptığı değerin 4 ml/dk civarında yer alması, optimum akış hızının bu bölgede olduğu şeklinde yorumlanmaktadır. Sıcaklık ve akış hızı orta noktalarda optimum olduğundan kırmızı bölge şeklin tam ortasında çıkmıştır.

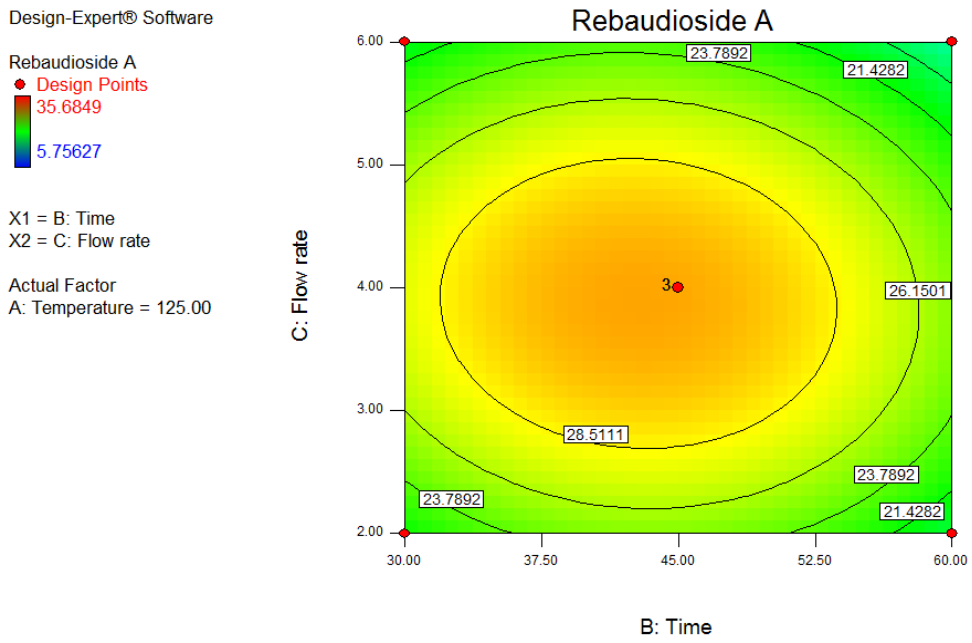
Zaman ve akış hızı ilişkisinin gösterildiği Şekil 4.13 iki boyutlu resimde daha net anlaşılmaktadır. En yüksek rebaudiozit A miktarının elde edildiği noktalar 45 dk zaman ve 4 ml/dk akış hızında bulunmaktadır. Zaman ve akış hızı orta noktalarda optimum olduğundan kırmızı bölge şeklin tam ortasında çıkmıştır.





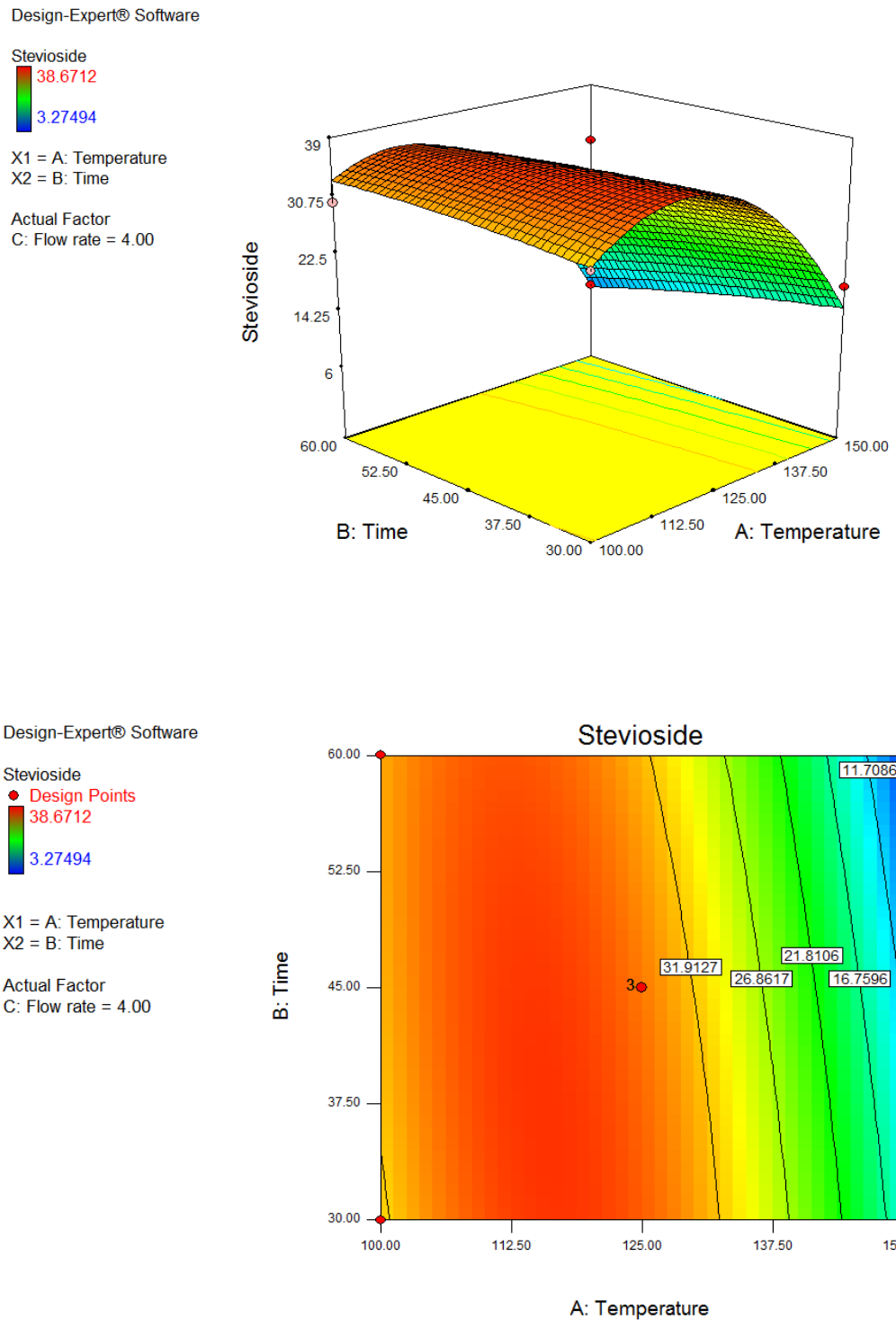
Şekil 4.12. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zaman optimum değeri olan 45 dk'da sabit tutulmuştur.



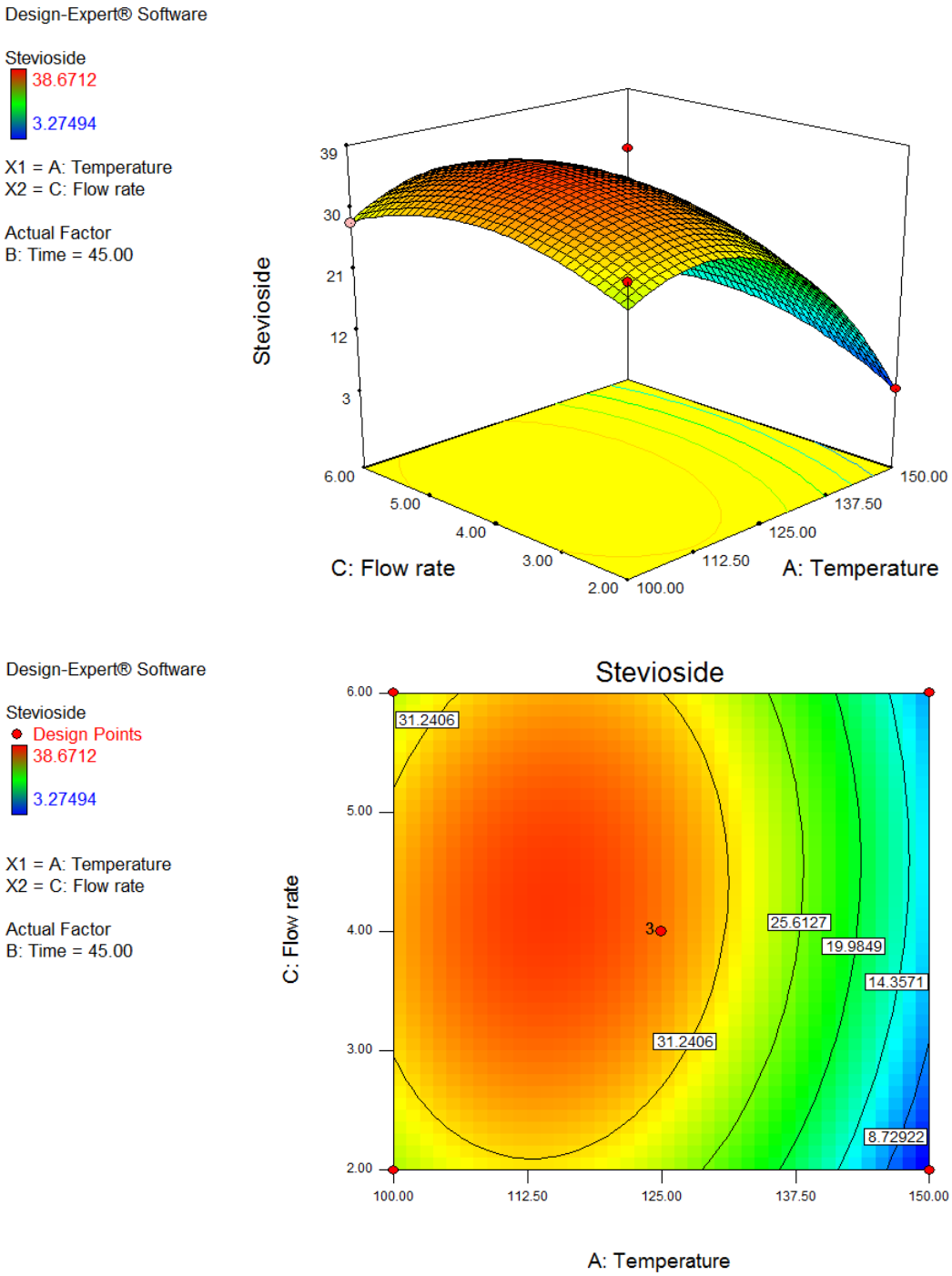


Şekil 4.13. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) zaman (dk) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 125 ^{o}C'de sabit tutulmuştur.

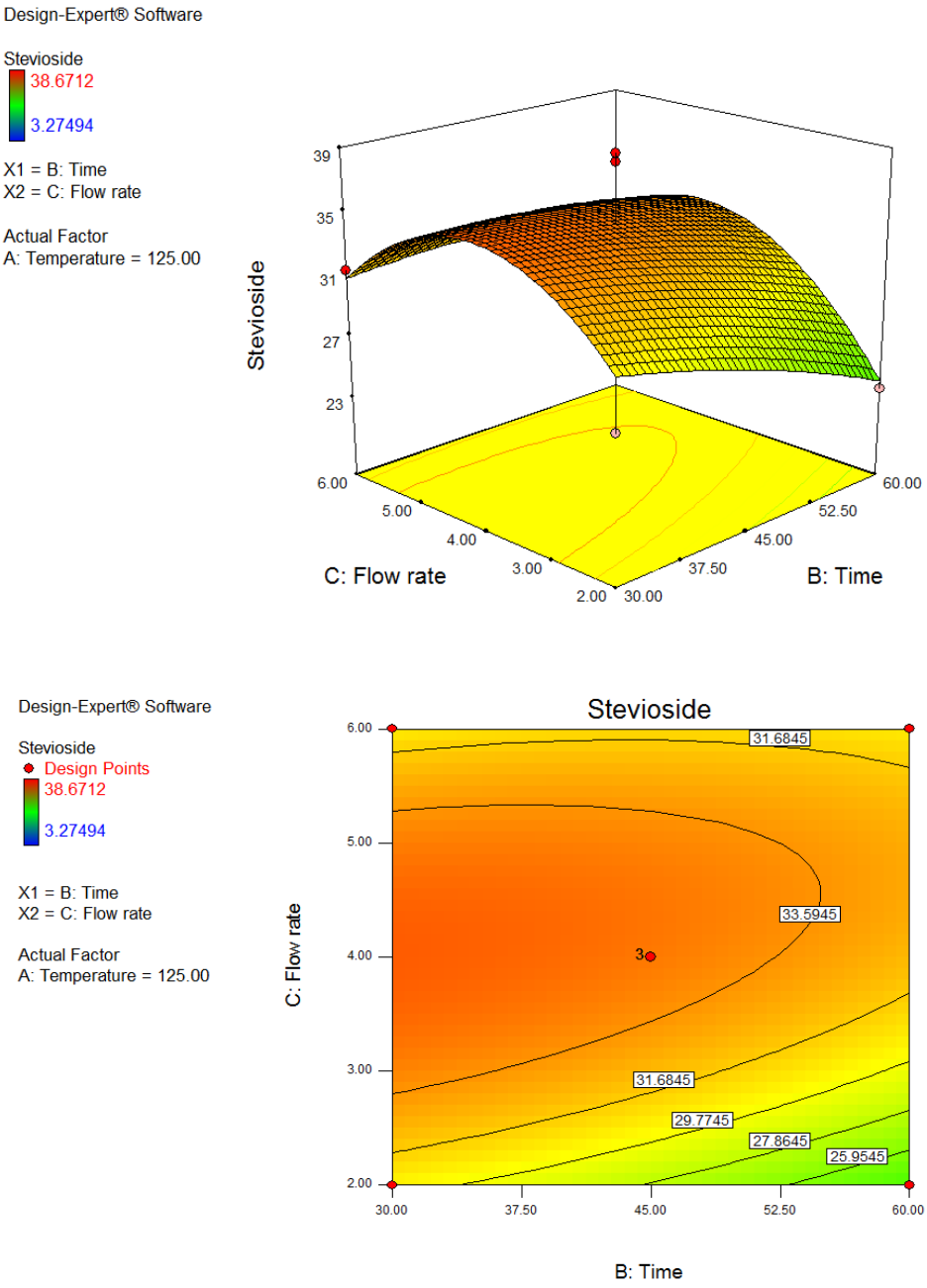
Steviozit verimi sonuçlarına baktığımızda elde edilen şekillerin benzerliği görülmektedir Design expert yazılımına göre sıcaklık olasılık değerinin < 0.1 olması bu değişkenin önemlilik düzeyinin anlamlı olduğunu gösterirken; zaman ve akış hızı olasılık değerlerinin > 0.1 olması da bu değişkenlerin önemlilik düzeyinin anlamlı olmadığını göstermiştir. Bunun sonucunda Steviozit'in ekstraksiyon verimi sıcaklıktaki değişmelerden etkilenmiştir. Şekil 4.14 (a) sıcaklık ve zamanın farklı kombinasyonlardaki üç boyutlu (3D) (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zamanın 30-60 dk arasında, 125 ºC sıcaklığa çıkıldığında ekstraksiyon veriminin maksimum noktaya ulaştığı görülmüştür.



Şekil 4.14. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Akış hızı optimum değeri olan 4 ml/dk'da sabit tutulmuştur.



Şekil 4.15. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Zaman optimum değeri olan 45 dk'da sabit tutulmuştur.



Şekil 4.16. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) zaman (dk) ve akış hızının (ml/dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 125 ^{o}C'de sabit tutulmuştur.

Sayısal optimizasyon:

Optimizasyon için kriterler belirlenmelidir. Bu kriterler, her iki değişkenin de çalışma aralığı ve istenen yanıt davranışının belirlenmesi şeklindedir. Optimum koşullarda elde edilecek Rebaudiozit A ve steviozit miktarları 32.785 mg/g ve 36.824 mg/g'dır. Design Expert programı ile elde edilen optimum koşullar Çizelge 4.3'de verilmiştir:

Çizelge 4.3. Subkritik su ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları

Parametreler	Optimum değerler
Sıcaklık	113.94 ^{o}C
Süre	42.92 dk
Akış hızı	3.92 ml/dk

4.5.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Çizelge 3.2. oluştuktan sonra, kodlanmış bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu elde edilmiştir. Rebaudiozit A'nın (*Y1*) ve Steviozit'in (*Y2)* ekstraksiyon verimini (mg/g kuru *S. rebaudiana* yaprakları) açıklamak için program tarafından ikinci dereceden çok terimli denklemler oluşturulmuştur.

Çizelge 4.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları

Deney no	A (sıcaklık)	B (süre)	C (katı:sıvı)	D (güç)	Sıcaklık (^{o}C)	Süre (dk)	Katı:Sıvı (g/ml)	Güç (%)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)
1	-1	0	0	-1	40	25	10	300	0.76	2.63
2	-1	0	0	+1	40	25	10	500	0.48	1.59
3	0	0	-1	+1	65	25	5	500	1.49	4.45
4	0	+1	-1	0	65	45	5	400	2.24	6.30
5	+1	0	0	+1	90	25	10	500	3.03	11.30
6	0	+1	0	+1	65	45	10	500	0.89	8.64
7	0	-1	0	-1	65	5	10	300	0.27	2.93
8	0	+1	+1	0	65	45	15	400	0.54	8.48
9	+1	+1	0	0	90	45	10	400	4.21	17
10	0	0	-1	-1	65	25	5	300	1.47	5.91
11	-1	+1	0	0	40	45	10	400	0.37	2.27
12	-1	0	+1	0	40	25	15	400	0.24	1.44
13	0	0	+1	+1	65	25	15	500	0.05	2.99
14	+1	0	+1	0	90	25	15	400	2.94	7.60
15	0	0	0	0	65	25	10	400	0.74	2.03
16	0	0	0	0	65	25	10	400	1.14	2.66
17	0	-1	+1	0	65	5	15	400	1.28	2.48
18	0	-1	-1	0	65	5	5	400	0.68	1.39

19	-1	0	-1	0	40	25	5	400	0.48	1.02
20	+1	-1	0	0	90	5	10	400	1.57	5.44
21	+1	0	0	-1	90	25	10	300	4.41	9.89
22	0	0	0	0	65	25	10	400	1.35	4.55
23	0	-1	0	+1	65	5	10	500	0.87	2.97
24	+1	0	-1	0	90	25	5	400	1.33	3.49
25	-1	-1	0	0	40	5	10	400	0.66	1.09
26	0	0	+1	-1	65	25	15	300	0.78	1.61
27	0	+1	0	-1	65	45	10	300	3.41	6.59

Her iki glikozitin de denklemleri aşağıda olup, A, B, C, D kodlanmış değişkenleri sırasıyla sıcaklık, süre, katı:sıvı oranı ve akış hızını göstermektedir:

$$\mathrm{Y1}\left(\frac{\mathrm{mg}}{\mathrm{g}}\right) = +1.40 + 1.21 * \mathrm{A} + 0.53 * \mathrm{B} - 0.15 * \mathrm{C} - 0.36 * \mathrm{D}$$

$$Y2\left(\frac{mg}{g}\right) = +4.77 + 3.72 * \mathrm{A} + 2.75 * \mathrm{B} + 0.17 * \mathrm{C} + 0.20 * \mathrm{D}$$

Çizelge 4.5. Y_1, Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box- Bhenken/Analyses/ANOVA)

Kaynak	**Kareler Toplamı**	**d.f.***	**Ortalama Kareleri**	**F-değeri**	**Olasılık (P)>F**
c) Rebaudiozit A için Model	22.63	4	5.66	8.34	0.0003
Artık değer	14.93	22	0.68		
Uygunsuzluk	14.74	20	0.74	7.87	0.1186
Saf hata	0.19	2	0.094		
Genel toplam	37.56	26			
R^2	0.6025				
R^2 adj	0.5303				

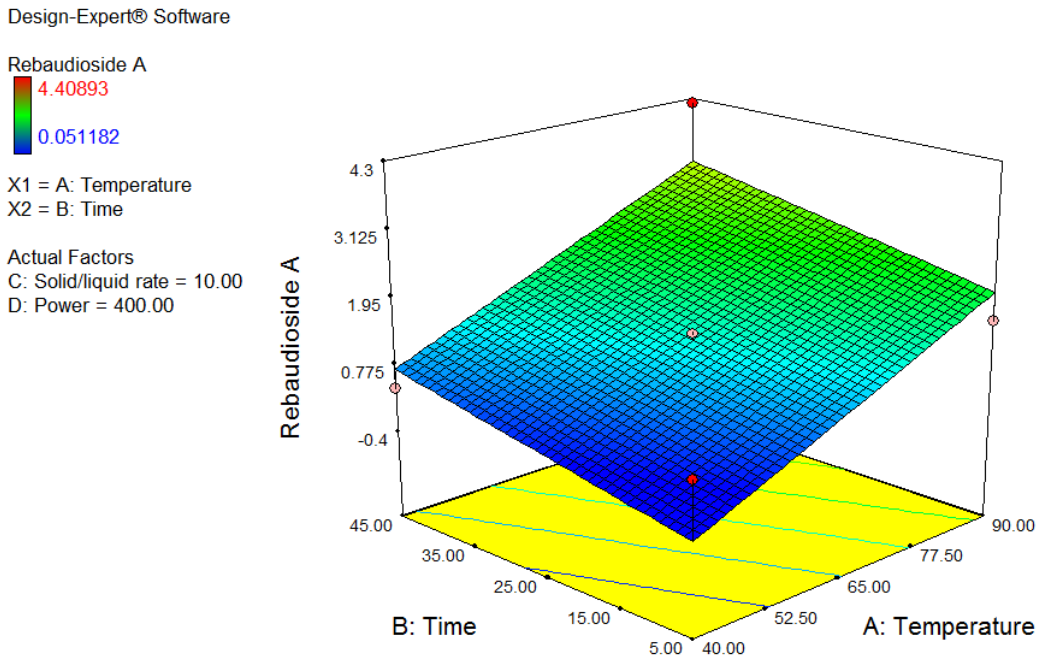
Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F-değeri	Olasılık (P)>F
d) Steviozit için Model	257.87	4	64.47	12.30	0.0001
Artık değer	115.27	22	5.24		
Uygunsuzluk	113.52	20	5.68	6.51	0.1414
Saf hata	1.74	2	0.87		
Genel toplam	373.14	26			
R^2	0.6911				
R^2 adj	0.6349				

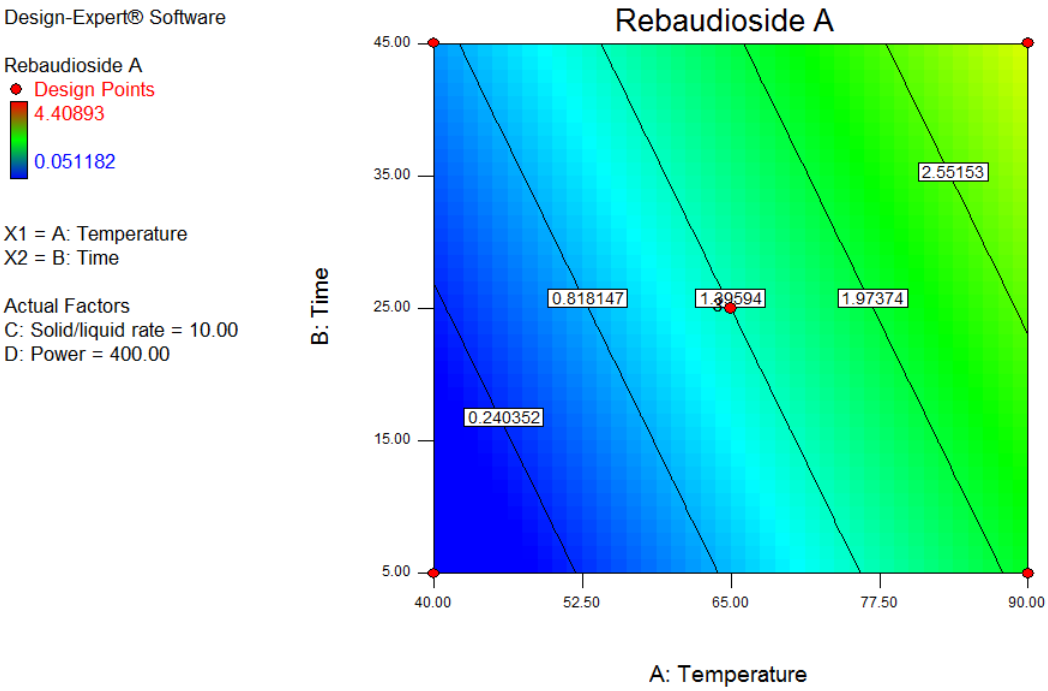
*d.f: degees of freedom

Varyans analizi (ANOVA) (Çizelge 4.4) modeldeki *F* ve olasılık (probabilite) değerlerinin anlamlı (significant) olduğunu göstermiştir. Denklem olarak oluşturulan modelin HPLC sonuçlarına uyduğu, R^2 olarak belirtilen katsayı değerlerine (0.6025 ve 0.6911'e) göre kontrol edilmiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon verimlerinin model ve deneysel değerleri arasında iyi bir uyum olduğunu göstermiştir.

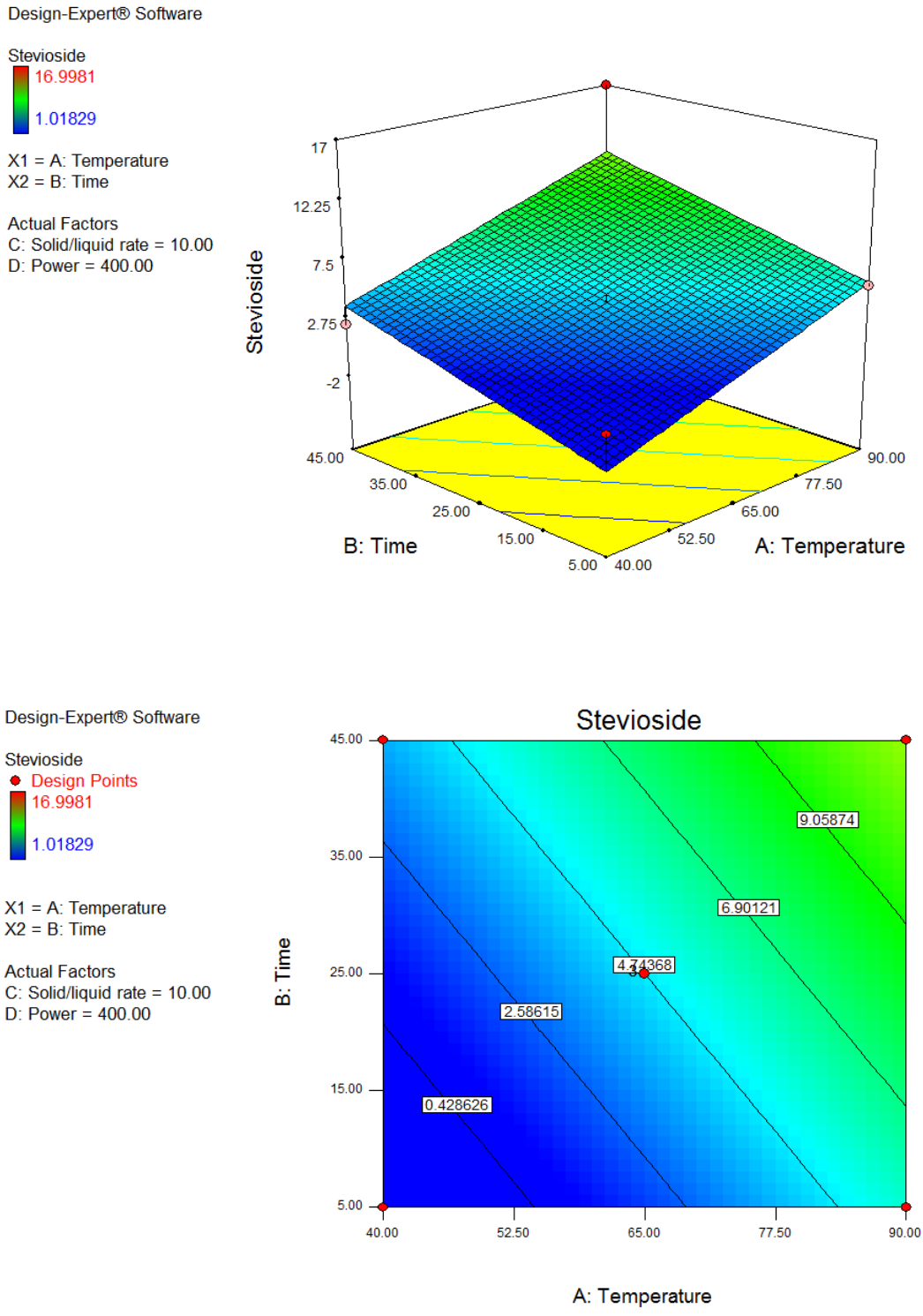
R değeri (0.95), 1'e ne kadar yakınsa deneysel ve tahmin edilmiş değerler arasında korelasyon o kadar iyi olmaktadır. Y_1 modelinin p= 0.0003<0.05 ve Y_2 modelinin p= 0.0001<0.05 değerleri önemlilik düzeyi anlamlı bulunmuştur. Bu da bize, değişkenlerin herhangi bir kombinasyonuna göre deneme yapılsa tahmini verimi bulmak için yeterli bir model denklemi oluşturulduğunu göstermiştir.

Design expert yazılımına göre sıcaklık ve zaman olasılık değerlerinin < 0.1 olması bu değişkenlerin önemlilik düzeyinin anlamlı olduğunu gösterirken; akış hızı ve güç olasılık değerlerinin > 0.1 olması da bu değişkenlerin önemlilik düzeyinin anlamlı olmadığını göstermiştir. Bunun sonucunda rebaudiozit A'nın ekstraksiyon verimi sıcaklıktaki ve zamandaki değişmelerden etkilenmiştir. Şekil 4.17 (a) sıcaklık ve zamanın farklı kombinasyonlardaki üç boyutlu (3D) (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık 90 ^oC'ye ve zaman 45 dk'ya ulaştığında ekstraksiyon veriminin maksimum noktaya ulaştığı görülmüştür.





Şekil 4.17. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 400'de sabit tutulmuştur.



Şekil 4.18. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 400'de sabit tutulmuştur.

Sayısal optimizasyon:

Optimizasyon için kriterler belirlenmelidir. Bu kriterler, her iki değişkenin de çalışma aralığı ve istenen yanıt davranışının belirlenmesi şeklindedir. Optimum koşullarda elde edilecek rebaudiozit A ve steviozit miktarları 3.626 mg/g ve 10.881 mg/g'dır. Design Expert programı ile elde edilen optimum koşullar Çizelge 4.6.'da verilmiştir:

Çizelge 4.6. Mikrodalga ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları

Parametreler	**Optimum değerler**
Sıcaklık	90 ^{o}C
Katı:sıvı oranı	1:5 g/ml
Süre	45 dk
Güç	304.65 W

4.5.3. Ultrasonik tabanlı ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Çizelge 3.3. oluştuktan sonra, kodlanmış bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu elde edilmiştir. Rebaudiozit A'nın (*Y1*) ve Steviozit'in (*Y2)* ekstraksiyon verimini (mg/g kuru *S. rebaudiana* yaprakları) açıklamak için program tarafından oluşturulan ikinci dereceden çok terimli denklemler oluşturulmuştur.

Çizelge 4.7. Ultrasonik tabanlı ekstraksiyon için kullanılan Box-Behnken deney desenindeki parametreler ve kodları

Deney no	**A (sıcaklık)**	**B (süre)**	**C (katı:sıvı)**	**D (güç)**	**Sıcaklık (^{o}C)**	**Süre (dk)**	**Katı:Sıvı (g/ml)**	**Güç (%)**	**Rebaudiozit A (mg/g)**	**Steviozit (mg/g)**
1	+1	0	-1	0	90	45	5	75	1.80	3.39
2	0	0	0	0	65	45	10	75	2.04	4.77
3	-1	-1	0	0	40	30	10	75	1.29	2.20
4	+1	-1	0	0	90	30	10	75	4.80	7.91
5	-1	0	+1	0	40	45	15	75	1.68	1.64
6	0	-1	0	-1	65	30	10	50	2.26	3.96
7	0	0	-1	-1	65	45	5	50	1.31	2.79

8	0	-1	0	+1	65	30	10	100	1.22	3.85
9	-1	0	0	-1	40	45	10	50	0.75	1.82
10	0	+1	-1	0	65	60	5	75	1.25	3.13
11	+1	+1	0	0	90	60	10	75	3.66	9.64
12	0	0	+1	+1	65	45	15	100	1.19	3.59
13	0	0	0	0	65	45	10	75	1.54	4.25
14	0	0	0	0	65	45	10	75	1.62	3.58
15	0	0	+1	-1	65	45	15	50	1.41	3.36
16	0	-1	+1	0	65	30	15	75	1.24	2.09
17	+1	0	+1	0	90	45	15	75	4.66	10.24
18	0	+1	0	-1	65	60	10	50	1.71	3.80
19	0	-1	-1	0	65	30	5	75	0.87	2.08
20	-1	0	-1	0	40	45	5	75	0.52	0.82
21	-1	+1	0	0	40	60	10	75	0.77	1.31
22	0	0	-1	+1	65	45	5	100	1.23	2.55
23	+1	0	0	+1	90	45	10	100	4.45	8.91
24	+1	0	0	-1	90	45	10	50	2.26	4.41
25	0	+1	0	+1	65	60	10	100	3.36	7.65
26	0	+1	+1	0	65	60	15	75	3.80	6.35
27	-1	0	0	+1	40	45	10	100	1.12	1.58

Her iki glikozitin de denklemleri aşağıda olup, A, B, C, D kodlanmış değişkenleri sırasıyla sıcaklık, süre, katı:sıvı oranı ve akış hızını göstermektedir:

$$Y1\left(\frac{mg}{g}\right) = +1.99 + 1.29 * \mathrm{A} + 0.24 * \mathrm{B} + 0.58 * \mathrm{C} + 0.24 * \mathrm{D}$$

$$Y2\left(\frac{mg}{g}\right) = +4.14 + 2.93 * \mathrm{A} + 0.82 * \mathrm{B} + 1.04 * \mathrm{C} + 0.66 * \mathrm{D}$$

Çizelge 4.8. Y_1, Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box- Bhenken/Analyses/ANOVA)

Kaynak	**Kareler Toplamı**	**d.f.***	**Ortalama Kareleri**	**F-değeri**	**Olasılık (P)>F**
a)Rebaudiozit A için Model	25.49	4	6.37	8.96	0.0002
Artık değer	15.65	22	0.71		
Uygunsuzluk	15.51	20	0.78	11.01	0.0864
Saf hata	0.14	2	0.070		

Genel toplam	41.14	26
R^2	0.6196	
R^2 adj	0.5504	

Kaynak	**Kareler Toplamı**	**d.f.***	**Ortalama Kareleri**	**F-değeri**	**Olasılık (P)>F**
b) Steviozit için Model	129.28	4	32.32	14.29	0.0001
Artık değer	49.77	22	2.26		
Uygunsuzluk	49.06	20	2.45	6.89	0.1342
Saf hata	0.71	2	0.36		
Genel toplam	179.06	26			
R^2	0.7220				
R^2 adj	0.6715				

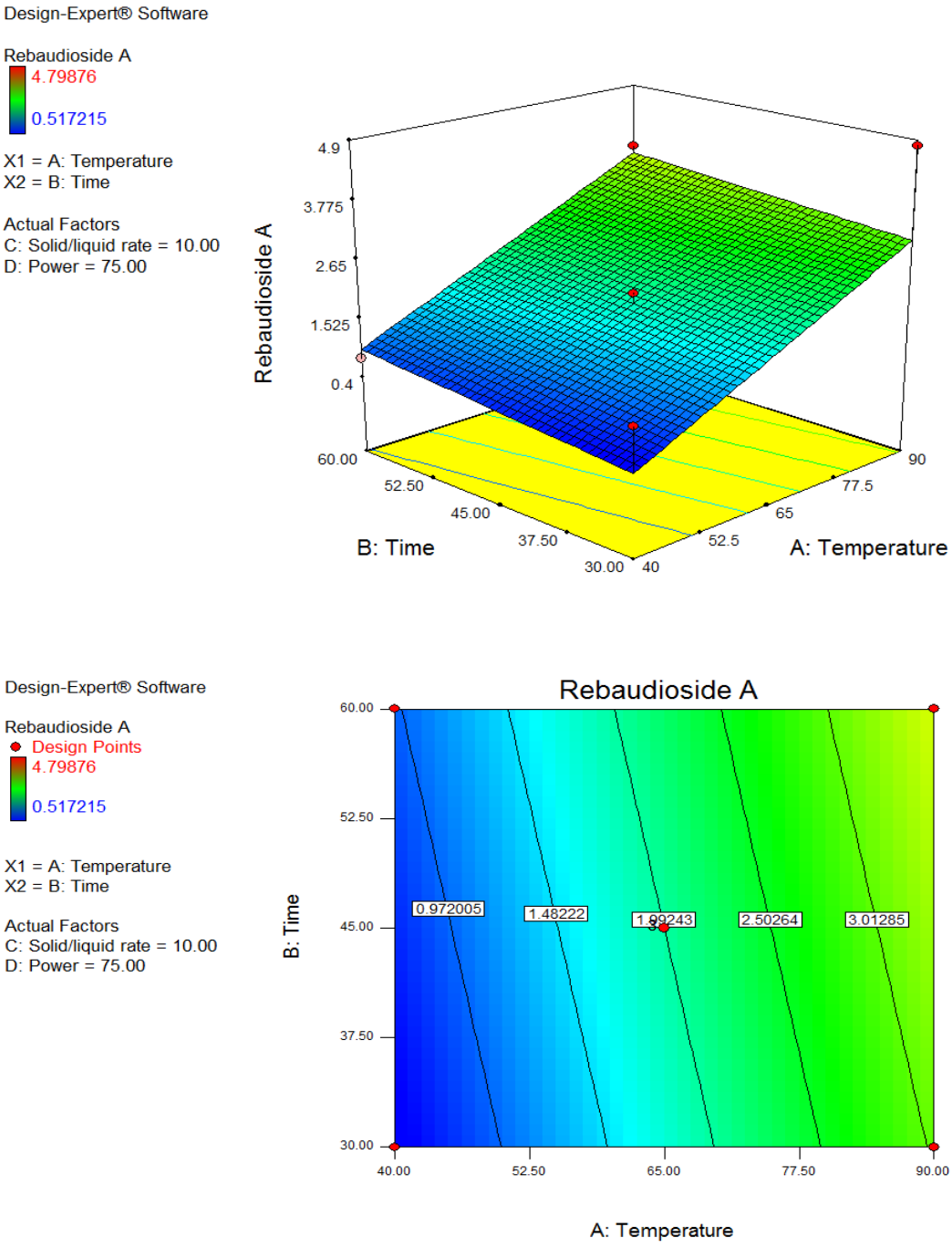
*d.f: degees of freedom

Varyans analizi (ANOVA) (Çizelge 4.4) modeldeki *F* ve olasılık (probabilite) değerlerinin anlamlı (significant) olduğunu göstermiştir. Denklem olarak oluşturulan modelin HPLC sonuçlarına uyduğu, R^2 olarak belirtilen katsayı değerlerine (0.6196 ve 0.7220'ye) göre kontrol edilmiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon verimlerinin model ve deneysel değerleri arasında iyi bir uyum olduğunu göstermiştir.

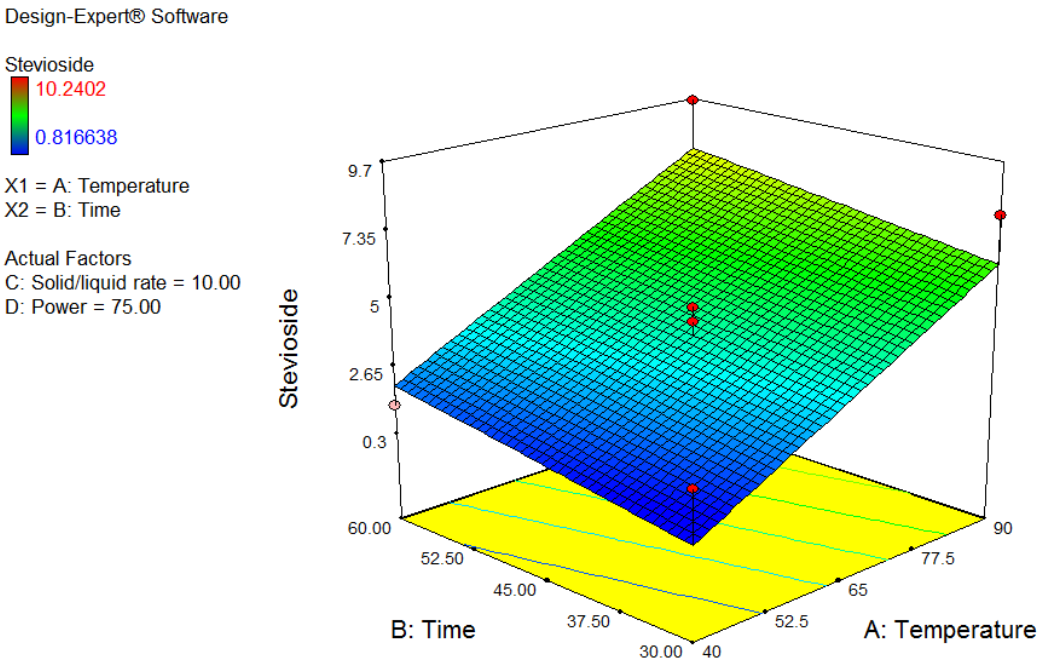
R değeri (0.95), 1'e ne kadar yakınsa deneysel ve tahmin edilmiş değerler arasında korelasyon o kadar iyi olmaktadır. Y_1 modelinin p= 0.0002<0.05 ve Y_2 modelinin p= 0.0001<0.05 değerleri önemlilik düzeyi anlamlı bulunmuştur. Bu da bize, değişkenlerin herhangi bir kombinasyonuna göre deneme yapılsa tahmini verimi bulmak için yeterli bir model denklemi oluşturulduğunu göstermiştir.

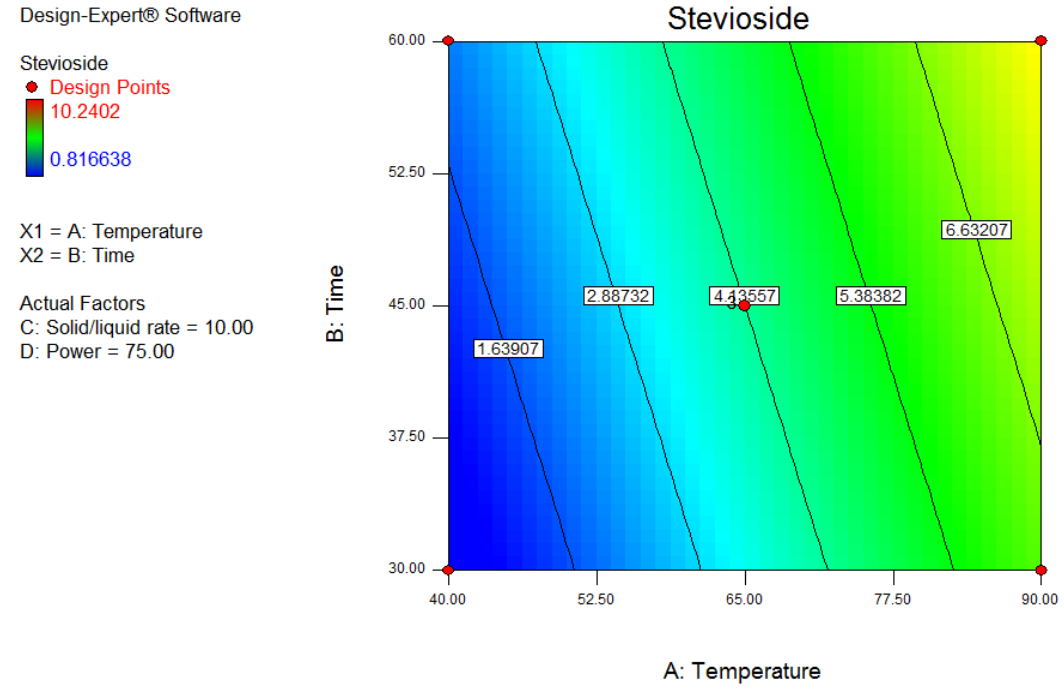
Design expert yazılımına göre sıcaklık ve katı:sıvı oranı olasılık değerlerinin < 0.1 olması bu değişkenlerin önemlilik düzeyinin anlamlı olduğunu gösterirken; zaman ve güç olasılık değerlerinin > 0.1 olması da bu değişkenlerin önemlilik

düzeyinin anlamlı olmadığını göstermiştir. Bunun sonucunda Reb A'nın ekstraksiyon verimi sıcaklıktaki ve katı:sıvı oranındaki değişmelerden etkilenmiştir. Şekil 4.19 (a) sıcaklık ve zamanın farklı kombinasyonlardaki üç boyutlu (3D) (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık 90 ^{o}C'ye ve zaman 45 dk'ya ulaştığında ekstraksiyon veriminin maksimum noktaya ulaştığı görülmüştür.



Şekil 4.19. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 75'de sabit tutulmuştur.





Şekil 4.20. Steviozit verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (^{o}C) ve zamanın (dk) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Katı/sıvı oranı ve güç optimum değerleri olan 1:10 ve 75'de sabit tutulmuştur.

Sayısal optimizasyon:

Optimizasyon için kriterler belirlenmelidir. Bu kriterler, her iki değişkenin de çalışma aralığı ve istenen yanıt davranışının belirlenmesi şeklindedir. Optimum koşullarda elde edilecek rebaudiozit A ve steviozit miktarları 4.329 mg/g ve 9.536 mg/g'dır. Design Expert programı ile elde edilen optimum koşullar Tablo.'da verilmiştir:

Çizelge 4.9. Ultrasonik ekstraksiyonunun optimizasyonu sonucunda elde edilen optimum çalışma koşulları

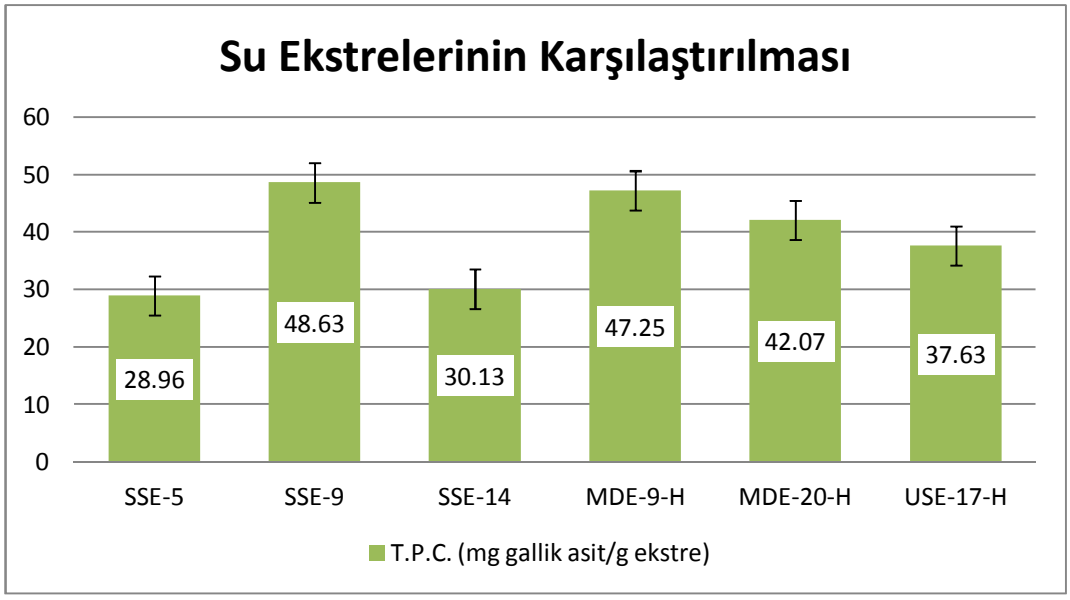
Parametreler	Optimum değerler
Sıcaklık	90 ^{o}C
Katı:sıvı oranı	1:15 g/ml
Süre	59.06 dk
Güç	100 W

4.6. Elde Edilen Ekstrelerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

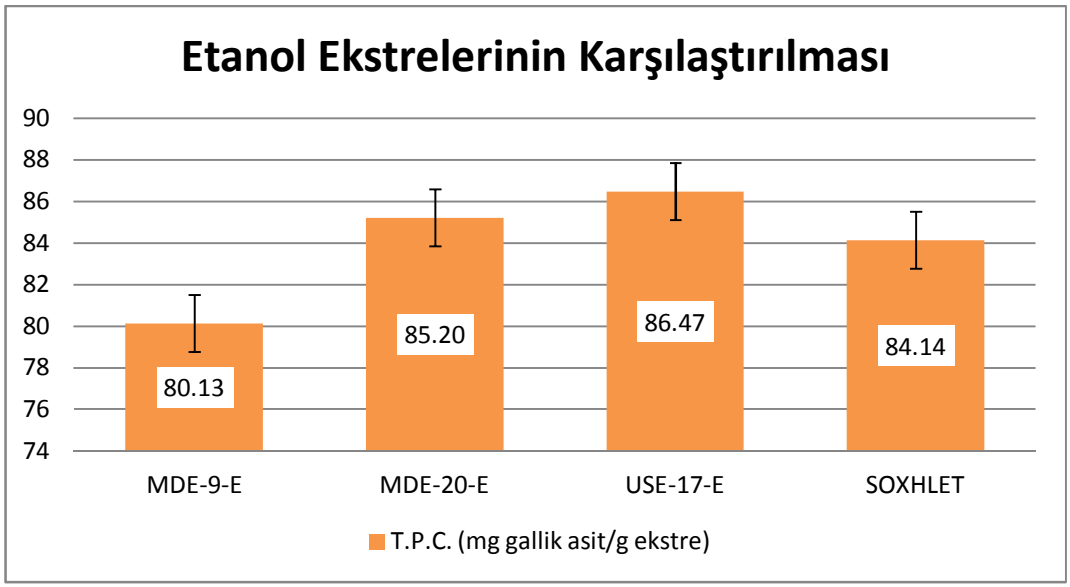
4.6.1. Toplam fenol tayini sonuçları

Bitkilerdeki fenolik bileşikler indirgen ajanlar, hidrojen donörleri, serbest radikaller ve metal şellatlayıcılar gibi işlevi olan redoks özelliklerinden dolayı antioksidan etki gösterirler. Yapılan çalışmalarda bitki ekstrelerındaki yüksek antioksidan aktivitenin içerdikleri fenolik bileşiklerden kaynaklandığı anlaşılmıştır. Polifenolik bileşiklerin meyve ve sebzeler ile günlük diyetle 1 grama kadar alındıklarında mutasyon oluşumu ve kanser gelişimi üzerinde inhibitör etkileri olduğu bilinmektedir. Bu yüzden bitkilerdeki fenolik bileşikler antioksidan etkiye direkt olarak katkıda bulunduklarından doğal antioksidanlar olarak bilinmektedirler (Shukla et al., 2009). *Stevia rebaudiana*'nın sulu ve etanolik ekstreleri içerdikleri toplam fenol içerikleri bakımından karşılaştırıldıklarında ekstre başına en yüksek fenol miktarı (86.47 mg gallik asit/g ekstre) ultrasonik etanol ekstraksiyonunda belirlenmiştir.

Şekil 4.21. ve Şekil 4.22. *Stevia rebaudiana*'nın optimum koşullarda elde edilen su ve etanol ekstrelerinin içerdiği ekstre başına düşen toplam fenol miktarlarının karşılaştırılmasını göstermektedir:



Şekil 4.21. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin toplam fenol konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması



Şekil 4.22. *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin toplam fenol konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması

Mandal and Madan (2013), beş farklı bölgeden aldıkları *Stevia rebaudiana*'nın fenol içeriğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada Stevia'nın metanol ekstrelerindeki toplam fenol miktarlarını 3.64 – 5.87 mg GAE/L olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında ise en yüksek fenol içeriğine (4.32 mg gallik asit/ml) sahip ekstreler 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ektraksiyon süresi, 75 watt güç ve 1:15 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma koşullarında gerçekleştirilen ultrasonik etanol ekstraksiyonu ve 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ektraksiyon süresi, 400 watt güç ve 1:10 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma oranlarında gerçekleştirilen mikrodalga etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.

Jahan et al. (2010), *Stevia rebaudiana*'nın farklı ekstrelerinin fenol içeriklerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada ekstre başına en yüksek fenol içeriğini (65.21 mg gallik asit/g ekstre) %80 etanol ekstresinde bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon 750 g kurutulmuş Stevia yaprağının 1 L %80 etanol içinde oda sıcaklığında 72 saat boyunca karıştırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Shukla et al. (2009), *Stevia rebaudiana*'nın etanol ekstresinin fenol içeriğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada ekstre başına fenol içeriğini 65.50 mg gallik asit/g ekstre olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada 50 g kurutulmuş Stevia yaprağı 500 ml etanol içinde Soxhlet aparatı kullanılarak ekstre edilmiştir. Bu tez çalışmasında ise en yüksek fenol içeriği (86.47 mg gallik asit/g ekstre), 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ektraksiyon süresi, 75 watt güç ve 1:15 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma koşullarında gerçekleştirilen ultrasonik etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda ultrasonik ekstraksiyon yönteminin klasik solvent ekstraksiyonuna göre daha verimli ve etkin bir yöntem olduğu anlaşılmıştır.

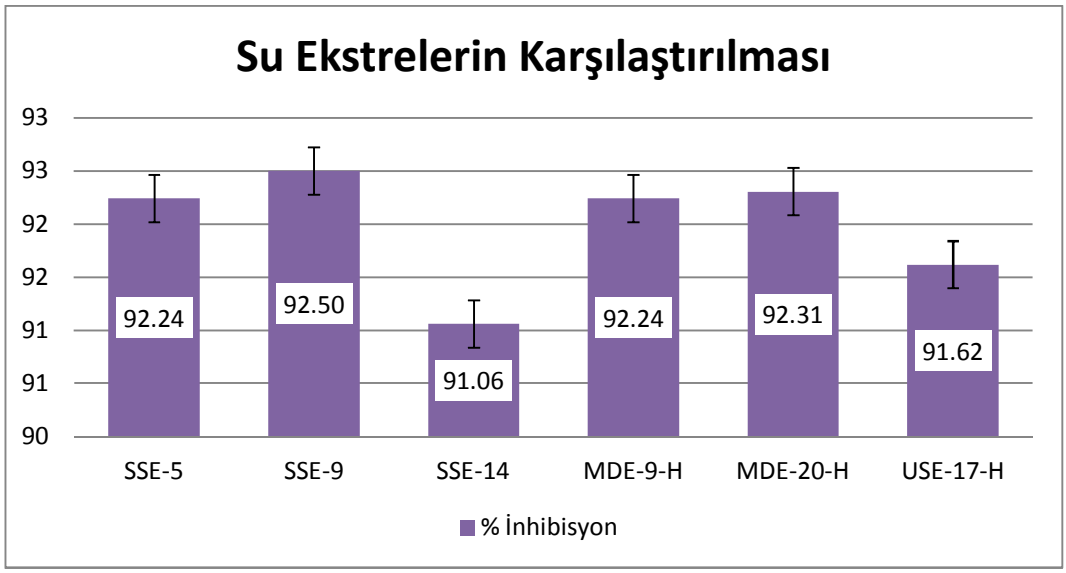
4.6.2. DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi sonuçları

Oksidatif metabolizma, hücrelerin hayatta kalması için gereklidir. Bu bağlılığın bir yan etkisi de oksidatif değişikliklere sebep olan, serbest radikal ve reaktif oksijen türleri oluşumudur. Gereğinden fazla serbest radikal oluşması, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi koruyucu enzimleri yenmekte ve zar lipitlerini, hücresel proteinleri, DNA ve enzimlerini oksitleyerek (böylece hücresel solunum bitmektedir) yıkıcı ve öldürücü etkiler oluşturmaktadır (Antolovich et al., 2002). Aynı zamanda oksidatif stres süreci, temelde normal

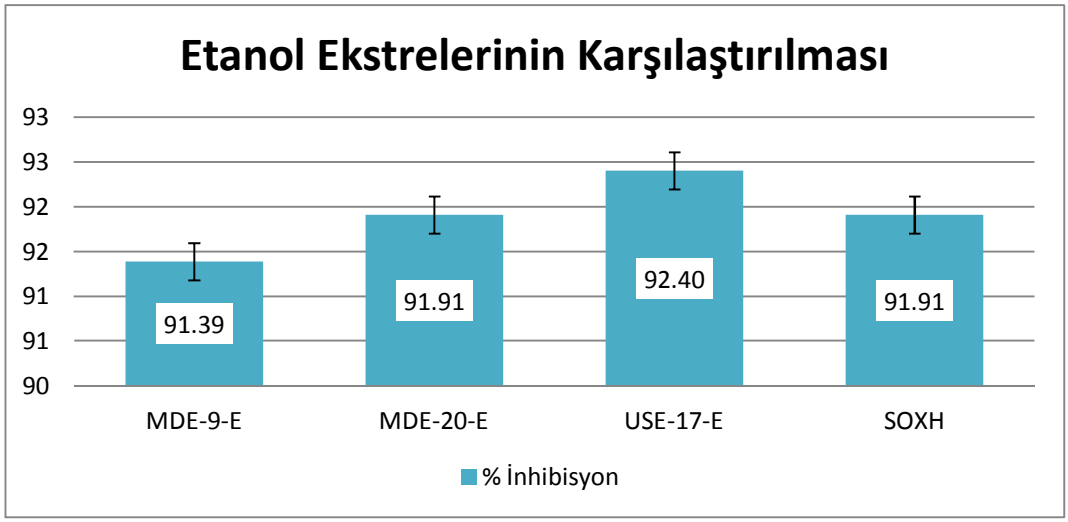
biyolojik reaksiyonlarda dahi sürekli oluşum içinde olan serbest radikallerle, bu moleküllerin etkilerini ortadan kaldırmaya çalışan antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan bir durumdur. Son yıllarda sıklıkla duyduğumuz "serbest radikaller", hem vücudun normal metabolik faaliyetleri sırasında, hem de kimyasal ajanlar, radyasyon, alkol, sigara, ağır metaller gibi pek çok dış kaynaklı etkenlerle oluşabilen moleküllerdir. Kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin değildirler. Serbest radikallerin yüksek oranda reaktif bileşikler olmaları ve en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron içermeleri, kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerini sağlamaktadır. Antioksidanlar, serbest radikaller gibi kolay bir elektron hedefi oluşturur (Akbaba, 2005). Canlı bir organizma, serbest radikallerin sebep olduğu zarara karşı enzimatik (süperoksit dismutaz, glutathion peroksidaz ve katalaz) veya enzimatik olmayan (Vitamin E gibi antioksidanlar ve glutatyon) iki değişik mekanizma ile korunmaktadır. Antioksidan içeren gıda ve gıda ürünleri bir çeşit enzimatik olmayan savunma sisteminin ana elemanlarıdır (Yılmaz vd., 2004).

DPPH analizi ekstrelerin antiradikal aktivitesi üzerine temel bilgi sağlamaktadır. DPPH stabil radikali ve antioksidan arasında yer alan mevcut reaksiyon şudur: DPPH* + $(AH)_n$ → DPPH-H + $(A^*)_n$. Genellikle oluşan radikal (A*), molekülün yapısına bağlı olarak daha az reaktiftir veya stabil molekülü oluşturabilmek için radikal radikal etkileşimini takip edebilmektedir (Kim et al., 2011). DPPH oda sıcaklığında stabil serbest radikaldir ve stabil diyamanyetik molekül haline gelmek için elektron veya hidrojen radikalini almaktadır. DPPH'in indirgenme kapasitesi antioksidanların sebep olduğu 517 nm'deki absorbansındaki azalma ile belirlenmektedir (Shukla et al., 2009). *Stevia rebaudiana*'nın sulu ve etanolik ekstrelerinin DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından karşılaştırıldıklarında inhibisyon oranlarının tüm ekstrelerde yüksek olduğu görülmüştür.

Şekil 4.23. ve Şekil 4.24. *Stevia rebaudiana*'nın optimum koşullarda elde edilen sulu ve etanolik ekstrelerinin % inhibisyon değerlerinin karşılaştırmasını göstermektedir:



Şekil 4.23. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından karşılaştırılması



Şekil 4.24. *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından karşılaştırılması

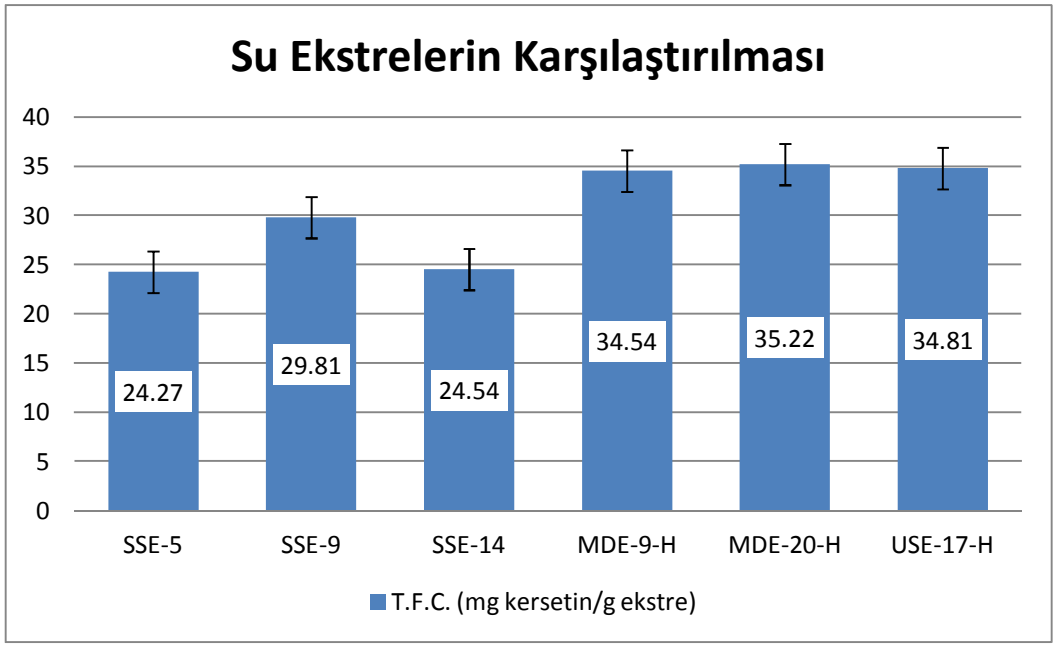
Abou-Arab and Abu-Salem (2010), *Stevia rebaudiana* yapraklarının farklı ekstrelerindeki DPPH serbest radikal süpürme aktivitelerinin belirlenmesine yönelik çalışmalarında sulu ve metanol ekstrelerinde sırasıyla %37.36 ve %31.61 inhibisyon bulmuşlardır. Shukla et al. (2009), *Stevia rebaudiana*'nın etanol ekstresinin DPPH serbest radikal süpürme aktivitesinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada inhibisyon oranını %68.76 olarak bulmuşlardır.

Bitki ekstrelerinin antioksidan aktivitelerinden toplam fenolik ve flavonoit içerikleri sorumludur. DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi antioksidan etkinliğini ölçmek için kullanılmaktadır ve bu sonuçlar toplam fenol ve flavonoit içeriği ile bağlantılı olmalıdır. Fakat, tıbbi bitkilerdeki bazı biyoaktif bileşikler fenoliklerin, karotenoitlerin ve flavonoitlerin eksikliğinden dolayı yüksek antioksidan aktivitesine sahiptir. Kim et al. (2011), Stevia'nın su ekstraksiyonu ile elde ettikleri ekstrelerde toplam fenol, flavonoit ve DPPH içerikleri arasında yüksek korelasyon bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında en yüksek fenol içeriği (86.47 mg gallik asit/g ekstre) ve en yüksek flavonoit içeriği (126.703 mg kersetin/g ekstre) ultrasonik etanol ekstresinde elde edilmiştir. Bu ekstreler radikal zincir reaksiyonunu sonlandırarak serbest radikalleri inhibe etme ve indirgeme kapasitesindedir ve bu yüzden indirgen ajanlar olarak davranırlar. *Stevia rebaudiana*'nın etanolik ekstrakstları DPPH'i inhibe ettiğinden oldukça yüksek antioksidan aktivite göstermektedir. Ancak bu tez çalışmasında subkritik su (%92.50) , mikrodalga su (%92.31) ve ultrasonik su (%91.62) ekstraksiyonları sonucunda elde edilen ekstrelerde de oldukça yüksek DDPH serbest radikal süpürme aktivitesi olduğu belirlenmiştir. *in vitro* denemelerde bulunan antioksidan aktiviteler potansiyel sağlık faydalarının göstergesi olması ile birlikte, DPPH serbest radikal süpürme aktivite testi *Stevia rebaudiana* yapraklarındaki antioksidan aktivitenin incelenmesinde ilk basamağı oluşturmaktadır. Dolayısıyla Stevia'dan elde edilen sulu ve etanolik ekstreler kolaylıkla ulaşılabilen doğal antioksidan kaynaklarıdır.

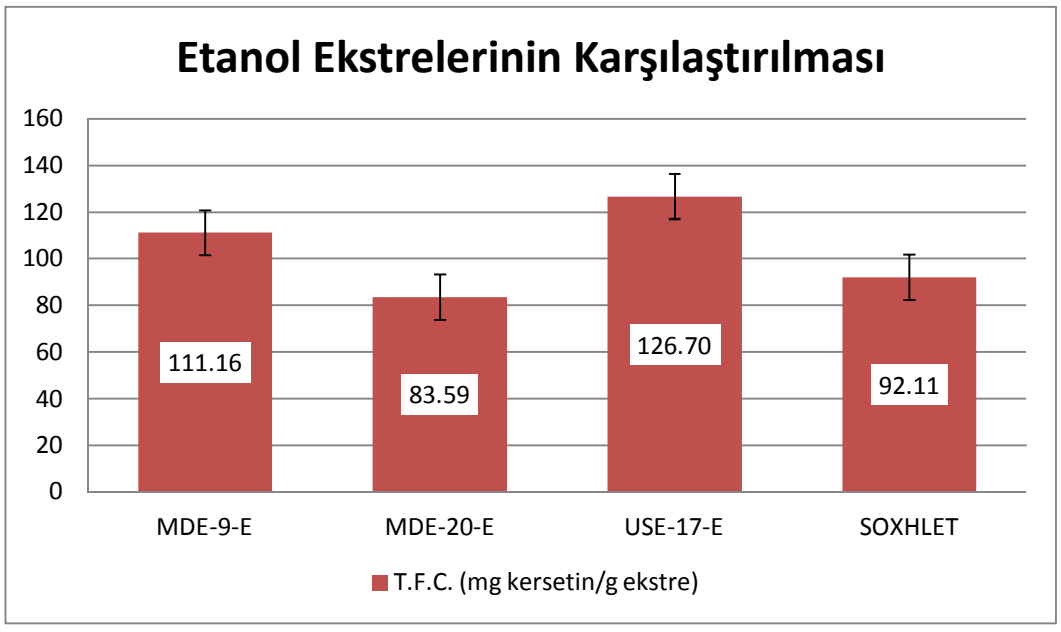
4.6.3. Toplam flavonoit tayini sonuçları

Doğal bileşiklerin en çeşitli ve geniş guplarından biri olan flavonoitler en önemli doğal polifenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler anti-alerjik, anti-inflamatuvar, anti-mikrobiyal ve anti-kanser gibi birçok terapötik etkiyi de içeren kimyasal ve biyolojik aktivitelere sahiptir. Son yıllarda araştırmacılar özellikle flavonoitler ve diğer fenoliklerin kanser ve kalp rahatsızlıklarının önlenmesindeki potansiyeli gibi tıbbi özellikleri ile ilgilenmektedirler (Khativora et al., 2010). *Stevia rebaudiana*'nın su ve etanol ekstreleri içerdikleri toplam flavonoit içerikleri bakımından karşılaştırıldıklarında ekstre başına en yüksek flavonoit miktarı (126.703 mg kersetin/g ekstre) ultrasonik etanol ekstraksiyonunda belirlenmiştir.

Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.'da *Stevia rebaudiana*'nın optimum koşullarda elde edilen su ve etanol ekstrelerinin içerdiği ekstre başına toplam flavonoit miktarlarının karşılaştırılması gösterilmektedir:



Şekil 4.25. *Stevia rebaudiana* su ekstrelerinin toplam flavonoit konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması



Şekil 4.26. *Stevia rebaudiana* etanol ekstrelerinin toplam flavonoit konsantrasyonları bakımından karşılaştırılması

Mandal and Madan (2013), beş farklı bölgeden aldıkları *Stevia rebaudiana*'nın flavonoit içeriğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada Stevia'nın metanol ekstrelerindeki toplam flavonoit miktarlarını 39.86 – 62.22 mg QE/L (mg QE/ml) olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında ise en yüksek flavonoit içeriğine (126.70 μg kersetin/ml) sahip ekstre 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ektraksiyon süresi, 75 watt güç ve 1:15 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma koşullarında gerçekleştirilen ultrasonik etanol ekstraksiyonu ile elde edilmiştir.

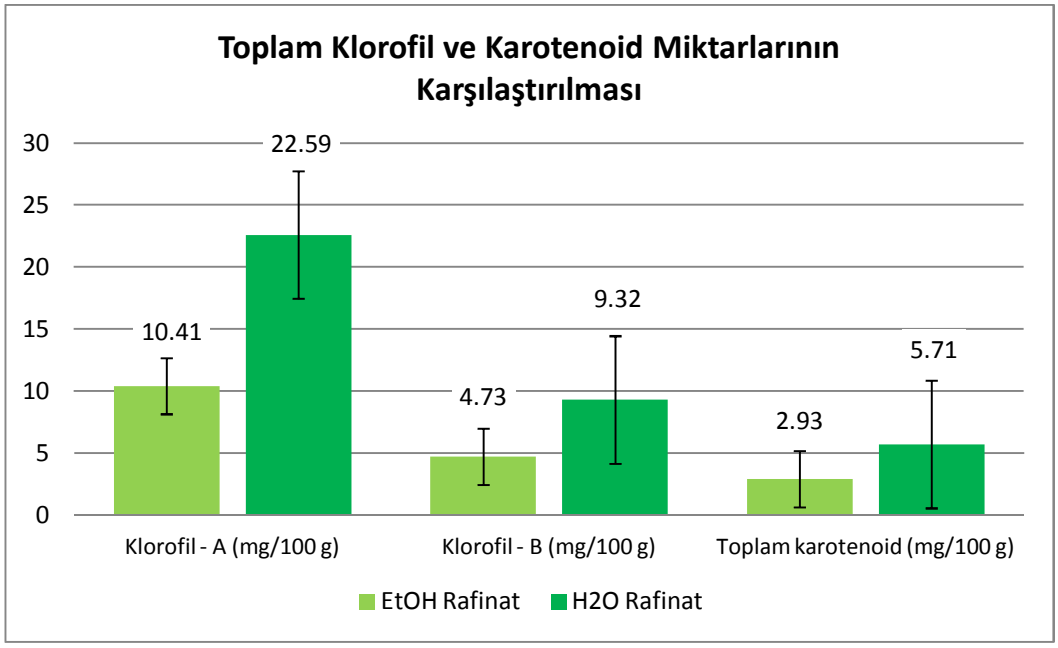
Jahan et al. (2010), *Stevia rebaudiana*'nın farklı ekstrelerinin flavonoit içeriklerinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada ekstre başına en yüksek flavonoit içeriğini (125.64 mg kersetin/g ekstre) %80 etanol ekstresinde bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon 750 g kurutulmuş Stevia yaprağının 1 L %80 etanol içinde oda sıcaklığında 72 saat boyunca karıştırılması şeklindedir. Bu tez çalışmasında ise etanol ekstrelerinden en yüksek toplam flavonoit içeriğine sahip ekstre (126.703 mg kersetin/g ekstre) 90 ^{o}C sıcaklık, 45 dk ekstraksiyon süresi, 75 watt güç ve 1:15 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma koşullarına sahip ultrasonik etanol ekstraksiyonunda elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda ultrasonik ekstraksiyon yönteminin klasik solvent ekstraksiyonuna göre daha verimli ve etkin bir yöntem olduğu anlaşılmıştır.

Kim et al. (2011), *Stevia rebaudiana*'nın su ekstresinin flavonoit içeriğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada ekstre başına toplam flavonoit miktarını 15.64 mg kersetin/g ekstre olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon 5 kg kurutulmuş Stevia yaprağının 1:10 (v/w) oranında 100 ^{o}C'deki distile suda 3 saat bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında ise, sulu ekstrelerden en yüksek toplam flavonoit içeriğine sahip ekstre (35.216 mg kersetin/g ekstre) 90 ^{o}C sıcaklık, 5 dk ekstraksiyon süresi, 400 watt güç ve 1:10 katı sıvı oranı (g/ml) çalışma koşullarına sahip mikrodalga su ekstraksiyonunda elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda mikrodalga su ekstraksiyon yönteminin klasik sıcak su ekstraksiyonuna göre daha verimli ve etkin bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

4.7. Rafinat Fazın Karakterizasyonu

4.7.1. Toplam klorofillerin ve karotenoitlerin belirlenmesi

Klorofil yeşil sebzelerin, meyvelerin ve yaprakların karakteristik özelliğini oluşturmaktadır. Klorofil, bütün yeşil bitkilerde fotosentez sonucu oluşan pigmentlerdir. Klorofil fotosentetik porfirin pigmentinin bütün sınıflarını kapsamaktadır. Yeşil yaprakların ve bazı ham meyvelerin yeşil rengini veren bu pigment, klorofil a (mavi-yeşil) ve klorofil b (sarı-yeşil) olarak iki guba ayrılır ve genel olarak bitkilerde 3:1 oranında bulunurlar. Karotenoitler ise klorofilden sonra doğada en yaygın olarak bulunan renk pigmentleridir. Karotenoitler, genel olarak yağda çözünen, bitkisel ve hayvansal ürünlere sarıdan kırmızıya kadar renk veren bileşiklerdir (Kimyaevi, 2014). *Stevia rebaudiana*'nın ekstraksiyonu sonrası elde edilen etanolik ve sulu rafinat faz, klorofil ve karotenoit içeriği bakımından karşılaştırıldığında 100 g örnek başına en yüksek klorofil A (22.59 mg/100 g), klorofil B (9.32 mg/100 g) ve karotenoit miktarının (5.71 mg/100 g) sulu rafinat fazda olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.27. ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 100 g kuru yaprak başına içerdikleri toplam klorofil ve karotenoit miktarlarının karşılaştırmasını göstermektedir.



Şekil 4.27. Ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 100 g kuru yaprak başına içerdikleri toplam klorofil ve karotenoit miktarlarının karşılaştırılması

Abou-Arab et al. (2010), güneş ışığı altında kuruttuğu yapraklar üzerinde yaptıkları analizde klorofil-A, klorofil-B ve toplam karotenoit miktarlarını sırasıyla 40.71 mg/100 g, 27.22 mg/100 g ve 7.67 mg/100 g bulmuşlardır. Bu çalışmada bulunan klorofil-A, klorofil-B ve toplam karotenoit miktarları ise literatürdeki değerlere göre daha düşüktür. Stevia'nın ekstraksiyonunda bir miktar klorofil ve karotenoitlerin de ekstreye alınması bunun nedeni olabilir.

Rafinat fazın içerdiği en yüksek toplam klorofil A (22.59 mg/100g) ve klorofil B (9.32 mg/100 g) miktarları, doğadaki bazı meyve ve sebzelerin ortalama klorofil içerikleriyle karşılaştırıldığında yeşil fasulye (11.8 mg/100 g klorofil A ve 3.5 mg/100 g klorofil B), salatalık (6.4 mg/100 g klorofil A ve 2.4 mg/100 g klorofil B), yeşil biber (9.9 mg/100 g klorofil A ve 3.3 mg/100 g klorofil B), bezelye (10.6 mg/100 g klorofil A ve 2.2 mg/100 g klorofil B) ve elma (9.8 mg/100 g klorofil A ve 3.8 mg/100 g klorofil B)'ya göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

4.7.2. Toplam diyet liflerinin kantitatif analizi

Diyet lifleri, sindirim enzimlerine dirençli bir gup gıda bileşenidir ve başlıca tahıl, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. Farklı diyet lifi tipleri, özellikleri bakımından farklılık göstermektedir. Çözünür olmayan diyet lifi bağırsak sağlığı ile ilgiliyken, çözünür diyet lifi, temel olarak kandaki kolesterolün düşürülmesi ve glukozun bağırsaktaki absorbsiyonunun azaltılması ile ilişkilidir.

Diyet lifi, enerji değerinin diğer karbohidratlara kıyasla düşük olması ve tokluk hissi oluşturması sebebiyle günümüzde diyet ürünlerinin temel bileşenini oluşturmaktadır. Diyet lifinin kan şekerini düzenlemesi, kolesterol seviyesini düşürmesi, bağırsak kanseri ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olması, sağlık üzerine olumlu etkileri arasında sayılmaktadır. Diyet lifi, birçok faydalı etkisinin yanısıra gıda formülasyonlarında kullanılabilen teknolojik özelliklere de sahiptir. Ayrıca, diyet lifi düşük enerji değerine sahip ürünlerin temel bileşenini oluşturmaktadır. Bu nedenle, diyet lifi ile zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmaktadır (Burdurlu ve Karadeniz, 2014).

Stevia rebaudiana'nın ekstraksiyonu sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazları toplam diyet lif oranları bakımından karşılaştırıldığında etanol ve su rafinat fazlarının toplam diyet lif oranları sırasıyla %6.5 ve %4.98 olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.14. ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 1 g kuru rafinat başına içerdikleri çökelti ağırlıkları, protein ve kül miktarlarını göstermektedir.

Çizelge 4.10. Ekstraksiyon sonrası elde edilen etanol ve su rafinat fazlarının 1 g kuru rafinat başına içerdikleri çökelti ağırlıkları, protein ve kül miktarları

	EtOH Rafinat	**H_2O Rafinat**
Çökelti ağırlığı (g)	0.0989 ± 0.008	0.0741 ± 0.006
Protein miktarı (g)	0.0038 ± 0.005	0.0028 ± 0.005
Kül miktarı (g)	0.0300 ± 0.013	0.0215 ± 0.010

Toplam diyet lif oranı aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\%\ \text{TDF} = \frac{\text{Çökelti ağırlığı (g)} - \text{Protein (g)} - \text{Kül (g)}}{\text{Örneğin ağırlığı (g)}}$$

EtOH Rafinat için

$$\%\ \text{TDF} = \frac{(0.0989\ \text{g}) - (0.00375\ \text{g}) - (0.03\ \text{g})}{1\ \text{g}} \text{x}\ 100 = \%\ 6.50$$

H_2O Rafinat için

$$\%\ \text{TDF} = \frac{(0.0741\ \text{g}) - (0.00281\ \text{g}) - (0.0215\ \text{g})}{1\ \text{g}}\ \text{x}\ 100 = \%\ 4.98$$

Gasmalla et al. (2014), *Stevia rebaudiana*'nın besinsel içeriğinin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada işlenmemiş fiber oranını %5 olarak bulmuşlardır.

4.8. Sitotoksisite Testi Sonuçları

Sitotoksik aktivite denemesinin sonunda tüm hücre hatları mikroskop altında morfolojik olarak incelenmiştir. Fakat hücre şekillerinde sitotoksik aktivitenin varlığına dair bir etki gözlenmemiştir. Mikroskop incelemesinden sonra MTT testi uygulanmıştır. MTT testinin sonunda mikropleyt okuyucuda her bir kuyucuğun absorbans değeri okunmuştur. Stevia ekstresinin eklenmediği kontrol kuyucuklarının ortalama absorbans değerleri 0.500-0.800 aralığında okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda Stevia ekstrelerinin eklendiği hücre hatlarını içeren kuyucuklarının da absorbans değerleri okunarak % hücre canlılık oranları hesaplanmıştır.

HeLa insan serviks adenokarsinoma hücre hattına 50 μg/mL dozdaki ekstrelerin eklenmesi sonucunda hücre canlılık oranları %5-72 aralığında iken, 5 μg/mL ve 0.5 μg/mL dozlardaki ekstrelerin eklenmesi sonucunda hücre canlılık oranları %80-100 aralığında bulunmuştur. Bu durumda 50 μg/mL dozdaki Stevia ekstresinin HeLa kanser hücreleri üzerinde zayıf sitotoksik etkisinin olduğu görülmüştür. Ekstre dozunun arttırılması durumunda sitotoksik etkinin artabileceği düşünülmüştür. Diğer kanser hücre hatlarına (A-549, MCF-7, CaCo-2, Mpank, PC-3, U87MG) ve HEK sağlıklı hücre hattına bakıldığında hücre canlılık oranlarının %80-100 dolaylarında olduğu belirlenmiştir. 3 farklı konsantrasyondaki (50 μg/mL, 5 μg/mL, 0.5 μg/mL) ekstrelerin eklenmesinden sonraki HeLa, A-549, MCF-7, CaCo-2, mPANC96, PC-3, U87MG ve HEK hücre hatlarının % canlılık oranları Çizelge 4.15. – 22'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. HeLa kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	**Ekstre doz miktarları**		
	50 μg/ml	**5 μg/ml**	**0.5 μg/ml**
SSE-13	67.18 ± 5.20	82.89 ± 4.89	87.38 ± 2.20
SOXLET	55.32 ± 8.01	79.83 ± 0.49	89.89 ± 2.02
MDE-4-E	56.60 ± 8.03	79.03 ± 2.02	80.02 ± 0.61
MDE-9-E	62.47 ± 3.79	83.99 ± 4.89	93.52 ± 0.61
MDE-20-E	52.81 ± 0.49	82.27 ± 3.30	84.57 ± 2.02
UDE-24-E	71.88 ± 8.17	96.00 ± 3.34	100.00 ± 0.11

Çizelge 4.12. A549 kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	89.88 ± 8.48	86.35 ± 2.75	96.53 ± 2.92
SOXLET	83.27 ± 2.73	86.61 ± 3.72	97.56 ± 1.31
MDE-4-E	100.00 ± 0.40	100.00 ± 0.52	100.00 ± 0.01
MDE-9-E	79.20 ± 1.16	100.00 ± 0.38	100.00 ± 0.49
MDE-20-E	72.51 ± 2.42	97.40 ± 6.47	100.00 ± 4.84
UDE-24-E	94.38 ± 9.64	100.52 ± 0.22	100.00 ± 0.81

Çizelge 4.13. PC3 kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	98.33 ± 1.67	94.09 ± 0.33	96.08 ± 1.67
SOXLET	100.00 ± 0.46	100.00 ± 0.34	100.00 ± 0.46
MDE-4-E	96.32 ± 2.34	100.00 ± 0.85	100.00 ± 0.85
MDE-9-E	76.41 ± 4.91	96.43 ± 4.91	96.43 ± 4.91
MDE-20-E	96.21 ± 3.25	100.00 ± 0.73	100.00 ± 0.25
UDE-24-E	100.00 ± 0.57	100.00 ± 0.72	100.00 ± 0.57

Çizelge 4.14. CaCo-2 kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	85.00 ± 2.67	100.00 ± 0.56	100.00 ± 0.48
SOXLET	81.31 ± 1.78	93.32 ± 1.34	90.95 ± 0.15
MDE-4-E	81.45 ± 4.30	90.65 ± 4.60	100.00 ± 0.30
MDE-9-E	90.06 ± 1.04	98.08 ± 0.15	98.37 ± 0.15
MDE-20-E	83.98 ± 0.89	90.06 ± 2.25	98.66 ± 4.30
UDE-24-E	86.05 ± 4.75	97.18 ± 4.30	100.00 ± 0.30

Çizelge 4.15. mPANC96 kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	88.60 ± 1.63	90.95 ± 2.33	92.09 ± 1.40
SOXLET	78.37 ± 3.95	90.23 ± 0.47	90.93 ± 1.63
MDE-4-E	88.84 ± 2.33	90.93 ± 2.56	100.00 ± 0.16
MDE-9-E	79.53 ± 0.93	93.95 ± 3.72	100.00 ± 0.07
MDE-20-E	80.70 ± 3.02	86.70 ± 0.47	88.60 ± 0.23
UDE-24-E	94.98 ± 3.28	96.88 ± 3.65	98.53 ± 2.35

Çizelge 4.16. MCF-7 kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	95.15 ± 1.27	93.46 ± 0.84	100.00 ± 0.64
SOXLET	86.18 ± 4.65	90.19 ± 0.74	94.30 ± 1.69
MDE-4-E	96.31 ± 0.53	97.26 ± 1.69	98.21 ± 1.79
MDE-9-E	83.12 ± 2.74	95.57 ± 3.17	100.00 ± 0.02
MDE-20-E	80.80 ± 1.69	89.77 ± 2.85	90.40 ± 4.33
UDE-24-E	93.57 ± 2.64	100.00 ± 0.44	100.00 ± 0.70

Çizelge 4.17. U87MG kanser hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	96.32 ± 0.92	100.00 ± 0.69	100.00 ± 0.51
SOXLET	94.33 ± 3.53	96.32 ± 4.30	97.85 ± 2.76
MDE-4-E	100.00 ± 0.99	100.00 ± 0.82	100.00 ± 0.22
MDE-9-E	87.27 ± 6.05	95.55 ± 1.38	100.00 ± 0.07
MDE-20-E	89.88 ± 3.37	91.10 ± 1.23	94.02 ± 3.22
UDE-24-E	82.52 ± 3.07	100.00 ± 0.76	100.00 ± 3.83

Çizelge 4.18. HEK sağlıklı hücre hattı için % canlılık oranları

Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	50 µg/ml	**5 µg/ml**	**0.5 µg/ml**
SSE-13	79.33 ± 2.86	85.21 ± 0.61	86.07 ± 3.55
SOXLET	83.65 ± 0.95	85.38 ± 5.43	87.72 ± 5.27
MDE-4-E	82.01 ± 6.75	85.90 ± 4.41	92.56 ± 6.82
MDE-9-E	73.10 ± 7.53	75.95 ± 0.17	84.34 ± 2.16
MDE-20-E	72.92 ± 5.80	75.78 ± 2.42	77.42 ± 3.55
UDE-24-E	85.03 ± 2.16	93.51 ± 8.05	98.53 ± 2.97

Ramya (2014), HeLa kanser hücre hatlarının *in vitro* antikanser etkisini araştırdığı çalışmada 4 farklı ekstre konsantrasyonunda (10 µg/ml, 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0.1 µg/ml) çalışmış ve inkübasyon sonrası hücre membranında bir bozulma olmadığı ve bu doğrultuda sitotoksik aktivite gözlenmediğini belirtmiştir. Ayrıca bu bileşiklerin sitotoksisiteyi indüklemediğini fakat, HeLa hücre hatlarındaki hücre ölümünü apoptosis ile indükleyebileceğini belirtmiştir.

Paul et al. (2012), steviozitin sitotoksisite, apoptozisin indüklenme potansiyellerini ve insan meme kanseri hücreleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada steviozitin apoptosisi indüklediği ve bunun hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu üzerinden apoptotik sinyal ilettiği, dolayısıyla mitokondrial transmembran potansiyelinde (MTP) değişimi uyardığı ve mitokontri aracılıklı apoptotik yolağı indüklediğini belirtmişlerdir.

Elde edilen tüm bu verilerden ve literatürdeki çalışmalardan yola çıkılarak Stevia ekstrelerinin kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite göstermemesinin sonucunda, immün sistem üzerinden apoptotik yolaklara girerek etki gösterebileceği düşünülmüştür. Aynı zamanda Stevia'nın kanser üzerinde tedavi edici değil de, kanseri önleyici etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda sitotoksik aktivite çalışmalarının sonrasında, inos aktivitesinin inhibisyonu çalışmaları da yapılmıştır.

4.9. iNOS Aktivitesinin İnhibisyonu Sonuçları

Nitrik oksit (NO), homeostazın sürdürülmesinde önemli bir moleküldür. Hipertansiyondan septik şoka dağılım gösteren birçok patolojik durumda etkilidir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-argininden sentez edilir. Doku hasarı ve zedelenmesi gibi durumlarda iNOS ile aşırı miktarlarda NO üretilir (Kuyumcu vd., 2004). iNOS tarafından NO'in aşırı üretimi inflamasyona ve birçok rahatsızlığa sebep olmaktadır. Birçok çalışma bitkilerdeki doğal ürünlerin iNOS ekspresyonunun inhibisyonu ile RAW264.7 makrofaj hücrelerinde LPS-indüklenmiş NO üretimini azalttığını belirtmektedir (Cho et al., 2013).

Lipopolisakkarit (LPS) inflamatuvar cevaplardaki pro-inflamatuvar sitokinleri ve kemokinleri indükleyebilmektedir. Birçok çalışma TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin iNOS ekspresyonunu artırdığını ve böylece NO üretimini indüklediğini belirtmektedir (Cho et al., 2013).

Cho et al. (2013), Stevia'daki austroinulin ve 6-O-asetil-austroinulin bileşiklerinin nitrik oksit üretimi üzerindeki ve LPS ile stimüle edilmiş RAW264.7 makrofaj hücrelerinin moleküler mekanizmaları üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada bu bileşiklerin nitrik oksit, iNOS, makrofaj hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-α, IL-6, IL-1β ve MCP-1) üretimini inhibe ettiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada ise % inhibisyon değerlerinin düşük ve buna bağlı olarak IC50 değerlerinin yüksek çıkması, makrofaj hücre hattına uygulanan maddelerin ekstre olmasından dolayı ve bu durumda da orta düzeyde bir IC50 etki göstermiş olduğu düşünülmüştür. Uygulanan maddenin saf olması durumunda daha iyi IC50 değerlerinin bulunabileceği düşünülmüştür. Çizelge 4.23. üç farklı dozda (100 μg/ml, 10 μg/ml ve 1 μg/ml) ekstre uygulanan RAW267.4 makrofaj hücrelerinin iNOS aktivite inhibisyon değerlerini göstermektedir.

Çizelge 4.19. iNOS Aktivitesinin İnhibisyonu Sonuçları

Ekstre türü	IC50 μg/ml
MDE-4-E	68
MDE-9-E	>100
MDE-20-E	85
USE-24-E	>100
SOXHLET	>100

4.10. Makrofaj Hücre Hattı için MTT Testinin Sonuçları

RAW264.7 makrofaj hücre hattına üç farklı dozdaki (100 μg/mL, 10 μg/mL ve 1 μg/mL) ekstrelerin eklenmesi sonucunda hücre canlılık oranları %68-87 aralığında bulunmuştur. Bu durumda Stevia ekstrelerinin RAW264.7 makrofaj hücre hattı üzerinde önemli sitotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. Çizelge 4.25. RAW264.7 makrofaj hücre hattı için %canlılık oranlarını göstermektedir.

Çizelge 4.20. RAW264.7 makrofaj hücre hattı için % canlılık oranları

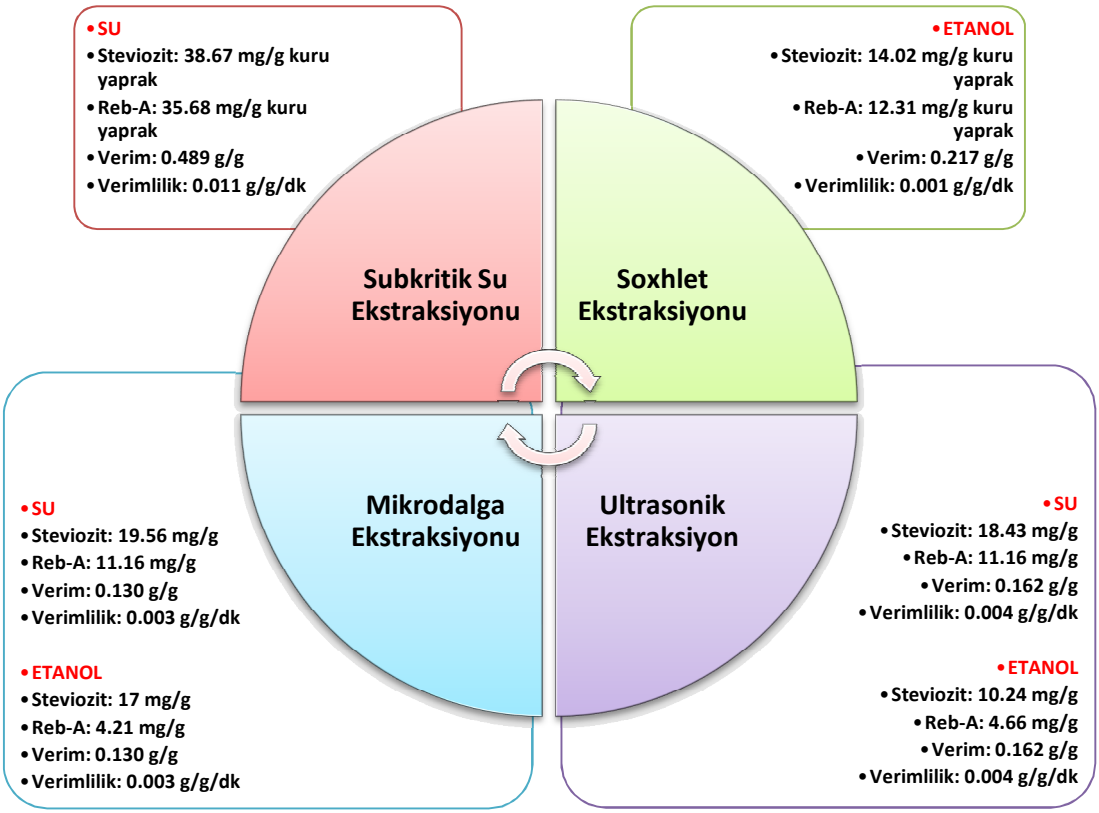
Ekstre türü	Ekstre doz miktarları		
	100 μg/ml	**10 μg/ml**	**1 μg/ml**
MDE-4-E	84.83 ± 3.27	63.86 ± 6.40	74.11 ± 2.50
MDE-9-E	75.65 ± 3.09	68.25 ± 5.57	75.18 ± 1.36
MDE-20-E	80.33 ± 5.41	67.48 ± 6.34	74.53 ± 1.90
USE-24-E	86.37 ± 2.25	59.24 ± 0.95	68.60 ± 1.30
SOXHLET	86.49 ± 0.36	86.67 ± 3.85	83.77 ± 2.96

5. SONUÇ

Bu tez projesi kapsamında Stevia bitkisinden steviol glikozitlerin eldesi için farklı ekstraksiyon yöntemlerinin (subkritik su ekstraksiyonu, mikrodalga ekstraksiyonu, ultrasonik-tabanlı ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu) detaylı bir şekilde irdelendiği, geniş bir verim - verimlilik denemesi ve optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu şekilde ülkemizde sadece tarımı yapılan Stevia bitkisinin işlenmesi ile katma değeri yüksek ürünlere dönüştürülmesinde ilk adım olan laboratuar çalışmaları yapılarak endüstriyel ölçeğe uygulanması yolunda önemli bir çalışma olmuştur. Ayrıca bütünsel mühendislik yaklaşımıyla Stevia'dan en üst düzeyde fayda sağlanması amacıyla rafinat fazın içeriğin de belirlenmiş ve farklı sektörlerde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bununla birlikte elde edilen steviol glikozitlerin, fenol, flavonoit içeriği ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi gibi biyolojik aktivitelerine ve ayrıca hücre kültürü teknikleri kullanılarak sitotoksik ve immünomodülatör aktivitelerine de bakılarak bu bileşenlerin insan refahına yönelik özellikleri ortaya konmuştur.

Stevia rebaudiana'nın yapraklarından steviol glikozitlerin elde edilmesi için kullanılan farklı ekstraksiyon metotlarının optimum çalışma koşulları subkritik su ektraksiyonunda 125 ^{o}C, 45 dk, 4 ml/dk akış hızı; mikrodalga ekstraksiyonunda 90 ^{o}C, 45 dk, 1:10 katı/sıvı oranı (g/ml), 400 W güç ve ultrasonik esktraksiyonunda 90 ^{o}C, 45 dk, 1:15 katı/sıvı oranı (g/ml), 75 W güç olarak belirlenmiştir.

Stevia rebaudiana'nın yapraklarından steviol glikozitlerin elde edilmesi için kullanılan farklı ekstraksiyon metotları ve bu metotlar sonucu elde edilen maksimum steviozit, rebaudiozit A miktarları ve ekstraksiyon verim-verimlilik değerleri Şekil 5.1.'de belirtilmiştir.



Şekil 5.1. *Stevia rebaudiana*'nın ekstraksiyonunda kullanılan ekstraksiyon metotlarının karşılaştırılması ve elde edilen maksimum steviol glikozit, verim-verimlilik değerleri

Steviol glikozitlerin elde edilmesinde en yüksek steviol glikozit içerikleri ve en yüksek ekstraksiyon verim – verimlilik değerleri subkritik su ekstraksiyon metodunda elde edilmiştir. Ardından steviol glikozit içeriği en yüksek ekstreler sırasıyla mikrodalga su, ultrasonik su ve Soxhlet ekstraksiyonlarında elde edilirken; en yüksek ekstraksiyon verimlilikleri sırasıyla Soxhlet, ultrasonik ve mikrodalga ekstraksiyonlarında elde edilmiştir. Mikrodalga ve ultrasonik su ekstraksiyonlarında çözücü olarak su veya etanol kullanılmasının verim ve verimlilik değerleri üzerinde bir etkisi olmamıştır. Suyun güvenli, ucuz, non-toksik, çevre dostu bir solvent olması ve çözünürlük özelliğinin organik solventlere çok yakın olması dolayısıyla subkritik su, mikrodalga su ve ultrasonik su ekstraksiyonları, Soxhlet etanol ekstraksiyonuna göre daha avantajlı olmaktadır. Subkritik su ortamında gerçekleştirilen ekstraksiyonların yüksek glikozit içeriği ve yüksek verimle sonuçlanması, yüksek sıcaklık ve basınçta ham maddenin verimli ekstraksiyonunu teşvik eden yüksek difüzyon hızlarını sağlamasıdır.

Suyun sıcaklık ile değişen özgün çözünme özellikleri suyun ilgi çekiciliğini arttırmaktadır. Sızdırmaz sistemler içerisindeki suyun fiziksel ve kimyasal özellikleri, eş zamanlı olarak sıcaklık ve basınç kontrol edilerek manipüle edilebilmektedir. Sıcaklık suyun atmosferik kaynama noktasının (100 ^{o}C) önemli ölçüde üstüne çıkmasına rağmen, subkritik su sıvı fazda kalmaktadır. Subkritik suyun polarite, viskozite, yüzey gerilimi, kopma sabiti; çevre sıcaklığı ve basınç koşullarındaki su ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşürüldüğünden organik solventlere yakın kimyasal özelliklere değiştirilebilmektedir. Sonuç olarak, subkritik koşullar altında basınçlı düşük polariteli su, polardan (düşük sıcaklıklarda) nonpolara (yüksek sıcaklıklarda) organik bileşikleri kolayca çözebilmektedir. Bu sebeple subkritik suyun ekstraksiyonu hem seçici hem de hızlı olabilmektedir.

Subkritik su ektraksiyonunun kullanımı çevresel ve sağlık bakımından oldukça ilgi çekicidir. Bu, daha düşük ekstraksiyon süresi ve solvent kullanımı göstermektedir. Buna bağlı olarak ısıya duyarlı bileşiklerin kaybı azalmakta ve toksik organik solvent kullanımı azalmakta, organik solvent kalıntısı ve aynı ekstraksiyon verimliliğinde oluşan atıklar oluşmamaktadır. Sonuç olarak, subkritik suyun kullanımının tıbbi bitkilerden fitokimyasalların ekstraksiyonu için uygun alternatif yeşil bir solvent olduğu görülmüştür.

Mikrodalga ekstraksiyonunda iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalganın direkt etkisi temeline dayanan mikrodalga enerjisi kullanılarak örnek ısıtılmakta iken; ultrasonik ekstraksiyonda ultrasonik ses dalgaları sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana getirerek hücre duvarına etki etmekte ve bileşenlerin bırakılmasını sağlamaktadır.

Subkritik su ekstraksiyon sisteminin diğer adıyla yüksek basınçlı sıcak su ekstraksiyon sisteminin mekanizması basınç ve arttırılmış sıcaklık koşulları altında örnek matriksindeki çeşitli aktif bölgelerden çözünen maddelerin desorpsiyonu (yüzeyden salınması), ekstraksiyon akışkanının matriks içerisine difüzyonu, örnek matriksine bağlı olan çözünen maddeler örnek matriksinden ekstraksiyon akışkanına doğru ayrılması ve son olarak kromatogafik olarak ekstraksiyon hücresi dışından toplama şişesine ayrıştırılması şeklinde dört basamaktan oluşmaktadır. Bu mekanizma doğrultusunda bu sistem su stoğu, solventin taşınımı için pompa, solventin ısıtılması için ısıtıcı, ekstraksiyonun

gerçekleştiği basınç kabı (sistemdeki basıncı kontrol eder), paslanmaz çelik serpantin (ön ısıtma için) ve ekstre için toplama kabından oluşmaktadır.

Elde edilen en yüksek ekstraksiyon verimlilikleri ve steviol glikozit verimleri değerlerinin yanı sıra; birim hacim başına düşen güç, reaktör içindeki sıvı sirkülasyonu, kütle transfer katsayısı gibi ölçek büyütme parametreleri göz önünde bulundurulduğunda subkritik su ekstraksiyon sisteminin mikrodalga ve ultrasonik ektraksiyon sistemlerine göre endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği açısından çok daha uygun bir yöntem olduğu görülmektedir.

Stevia ekstrelerinin biyolojik aktivitelerine bakıldığında toplam fenol, flavonoit içeriklerinin ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitelerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Stevia ekstrelerinin sitotoksik ve iNOS inhibisyon aktivitelerine bakıldığında kanser hücre hatlarında sitotoksik etki göstermediği, fakat kanseri immün sistem üzerinden apoptotik yolaklara girerek etkilediği düşünülmüştür. Bu şekilde Stevia'nın kanseri tedavi edici etkisi değil de önleyici etkisinin olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda tüketicinin Stevia bitkisini doğal ve kalorisiz tatlandırıcı olarak kullanmasının yanı sıra antioksidan, anti-inflamatuvar ve anti-kanser gibi birçok terapötik etkisinden de faydalanabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca Stevia'nın immün sistem destekleyici gıda takviyeleri olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Stevia rebaudiana bitkisinin içerdiği steviol glikozitlerin gıda ürünlerinde tatlandırıcı, pigmentlerin gıda ürünlerinde doğal renklendirici ve fiberlerin yığın kütle halinde elde edilerek lif içeriği artırılmak istenen gıdalarda kullanım potansiyeli bulunduğu anlaşılmıştır.

6. ÖNERİLER

Stevia tatlandırıcılarının gıda uygulamalarında kullanılmasından beri ürün geliştirme protokolleri üzerinde çalışılmaktadır. Steviol glikozitler tatlı olmalarının yanı sıra, eğer uygun derişimin üzerinde kullanılırsa acı veya metalik bir tat verebilmektedir. Stevia tatlandırıcılarının ilave edilecekleri ürün içerisine, optimum derişimde katılmasını sağlamak, şekerin tatlılığı ile eşit tatlılığı verecek, fizokimyasal ve duyusal özellikler açısından farklılık göstermeyecek şekilde formüle edilmesi gerekmektedir (Garcia-Noguera et al., 2010). Enkapsülasyon steviol glikozitler için bu problemlerin aşılmasında kullanılabilecek modern bir tekniktir (Chranioti and Tzia, 2013). Gelişmiş duyusal karakteristiğe sahip enkapsüle formdaki steviol glikozitler şeker tadının, kontrollü bir şekilde salınımını sağlayacaktır (Scipioni et al., 2010). Steviol glikozitlerin enkapsülasyonu birçok farklı gıda ürününde kullanılabilmektedir; gıda model ürünü olarak daha önce formülasyon çalışması yapılmamış dondurmalarda bu metot geliştirilebilir.

Bitkinin çevreci bir yaklaşım ile bütünsel olarak değerlendirildiği çalışmada, en son basamak saf olarak elde edilen rebaudiozit A bileşiğinin kontrollü şeker salımını sağlamak için enkapsüle forma getirilmesi için uygun polimerin belirlenmesi ve formülasyona yönelik yöntemin optimizasyonu ile model ürün olarak seçilen daha önce hiç çalışılmamış dondurmalara ilavesine yönelik formülasyon çalışması geliştirilmesi önerilen çalışmalar arasındadır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A. A. and Abu-Salem, M.F., 2010, Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviozits produced from *Stevia rebaudiana* bertoni plant, *African Journal of Food Science*, 4(5):269-281 pp.

Abou-Arab, E.A. and Abu-Salem, F.M., 2010, Evaluation of bioactive compounds of *Stevia rebaudiana* leaves and callus, *African Journal of Food Science*, 4(10):627-634 pp.

Akay, S., Alpak, I. ve Yesil-Celiktas, O., 2011, Effects of process parameters on supercritical CO_2 extraction of total phenols from strawberry (Arbutus unedo L.) fruits: An optimization study, *Journal of Separation Science*, 34:925-1931 s.

Akbaba, G., 2005, Serbest radikallere karşı antioksidan savunma, *Bilim ve Teknik*, 453:28-29 s.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S. and Robards, K., 2002, Methods for testing antioxidant activity, *Analyst*, 127:183-198 pp.

Burdurlu, H.S. ve Karadeniz, F., "Gıdalarda Diyet Lifinin Önemi", Gıda Müh. Dergisi,www.gidamo.org.tr/resimler/ekler/f6ffe13a5d75b2d_ek.pdf?dergi=15 (Erişim tarihi: 10.07.2014)

Büyüktuncel, E., 2012, Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Dergisi*, 32(2):209-242 s.

Caciola, F., Delmonte, P., Jaworska, K., Dugo, P., Mondello, L. and Rader, J.I., 2011, Employing ultra high pressure liquid chromatogaphy as the second dimension in a comprehensive two-dimensional system for analysis of *Stevia rebaudiana* extracts, *Journal of Chromatogaphy A*, 1218:2012-2018 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Carakostas, M., Curry, L., Boileau, A. and Brusick, D., 2008, Overview: The history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages, *Food and Chemical Toxicology*, 46:1-10 pp.

Ceunen, S. and Geuns, J.M.C., 2013, Steviol Glycosides: Chemical Diversity, Metabolism and Function, *Journal of Natural Products*, 76:1201-1228 pp.

Chatsudthipong, V. and Muanprasat, C., 2009, Steviozit and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness, *Pharmacology & Therapeutics*, 121:41–54 pp.

Chranioti C., Tzia C., 2013, Arabic gum-mixtures as encapsulating agents of freeze-dried fennel oleoresin products, *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-013-1074-z.

Cho, B.O., Ryu, H.W., So, Y., Cho, J.K., Woo, H.S., Jin, C.H., Seo, K.I., Park, J.C. and Jeong, I.Y., 2013, Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetyl-austroinulin from *Stevia rebaudiana* in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages, *Food and Chemical Toxicology*, 62:638–644 pp.

Erküçük, A., Akgün, I.H. ve Yesil-Celiktaş, Ö., 2009, Supercritical CO_2 extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* leaves: Identification and optimization, *Journal of Supercritical Fluids*, 51:29-35 s.

Fisberg, M., "Metabolism of the Zero-Calorie Sweetener Stevia", Global Stevia Institute, globalsteviainstitute.net/.../MF-Metabolism-of-t... (Erişim tarihi: 02.06.2014)

Garcia-Noguera, J., Weller, C.I., Oliveira, F.I.P., Rodrigues, S. and Fernandes, F.A.N., 2010, Dual-stage sugar substitution in strawberries with a Stevia-based sweetener, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11:225-230 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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 chromatogaphy-mass spectrometry, *Journal of Chromatogaphy A*, 1217:1463-1470 pp.

Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Musa, A., Hua, X. and Zhang, W., 2014, Physico-chemical assesment and Rebaudioside A. productively of natural sweeteners (*Stevia rebaudiana* Bertoni), *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5):209-214 pp.

Geuns, J.M.C., 2003, Molecules of Interest: Stevioside, Phytochemistry, 64:913-921 pp.

Goyal, S., Samsher and Goyal, R., 2010, Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: A review, *International Journal of Food Sciences and Nutritio*n, 61:1–10 pp.

Hawksworth, G., Drasar, B.S. and Hill M.J., 1971, Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycosidic bonds, *J. Med. Microbiol*., 4:451-459 pp.

Hearn, L.K. and Subedi, P.P., 2009, Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy, *Journal of Food Composition and Analysis*, 22:165-168 pp.

İnanç, A.L. ve ÇINAR, İ., 2009, Alternatif Doğal Tatlandırıcı: Stevya, *Gıda*, Cilt: 34(6):411-415 s.

Jahan, I.A., Mostafa, M., Hossain, H., Nimmi, I., Sattar, A., Alim, A. and Iqbal Moeiz, S.M., 2010, Antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* Bert. leaves from Bangladesh, *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 13(2):67-75 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Jaitak, V., Bandna, Singh, B. and Kaul, V.K., 2009, An Efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni), *Phytochem. Anal.*, 20:240-245 pp.

Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Amadou, I. and Hua, X., 2014, Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf: Effect of drying method, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1):61-65 pp.

Khatiwora, E., Adsul V.B., Kulkarni, M.M., Deshpande, N.R. and Kashalkar, R.V., 2010, Spectroscopic determination of total phenol and flavonoid contents of *Ipomoea carnea*, *International Journal of ChemTech Research*, 2(3):1698-1701 pp.

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*, 44:1328-1332 pp.

Kimyaevi, "Karotenoidler", www.kimyaevi.org/TR/Yonlendir.aspx?... (Erişim tarihi: 04.07.2014)

Koyama, E. Ohori, Y, Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A. and Ui, M., 2003a, *In vitro* metabolism of the glycosidic sweeteners, Stevia mixture and enzymically modified *Stevia* in human intestinal microflora, *Food and Chemical Toxicology*, 41:359-374 pp.

Koyama, E., Sakai, N., Ohori, Y., Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A. and Ui, M., 2003b, Absorption and metabolism of the glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans, *Food and Chemical Toxicology*, 41:875-883 pp.

Kronholm, J., Hartonen, K. and Riekkola, M.L., 2007, Analytical extractions with water at elevated temperatures and pressures, *Trends in Analytical Chemistry*, 26(5):396-410 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kuyumcu A., Polat Düzgün A., Özmen M.M. ve Besler H.T., 2004, Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü, *Uluslararası Travma Dergisi*, 10(3):149-159 s.

Larrauri, J.A., 1999, New approches in ther preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products, *Trends in Food Science & Technology*, 10:3-8 pp.

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*, 132:1121-1132 pp.

Liang, X. and Fan, Q., 2013, Application of sub-critical water extraction in pharmaceutical industry, *Journal of Materials Science and Chemical Engineering*, 1:1-6 pp.

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*, 88:215-221 pp.

Madan, S., Ahmad, S., Singh, G.N., Kohli, K., Kumar, Y., Singh, R. and Garg, M., 2010, *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A Review, *Indian Journal of Natural Products and Resources*, Vol, 1(3):267-286 pp.

Mandal, B. and Madan, S., 2013, Preliminary phytochemical screening and evaluation of free radical scavenging activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni from different geogaphical sources, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2(1):14-19 pp.

Mondal, S. and Rai, C. De S., 2011, Identification of fouling mechanism during ultrafiltration of stevia extract, *Food Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/s11947-011-0754-9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Muanda, F.N., Soulimani, R., Diop, B. and Dicko, A., 2010, Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves, *LWT - Food Science and Technology*, 44:1865-1872 pp.

Nabors, L.B., 2001, Alternative Sweeteners, *Food Trade Press Ltd.*, 3:1-5 pp, USA.

Nalbantsoy, A., Ayyıldız Tamiş, D., Akgün, I.H., Öztürk Yalçın, T., Deliloğlu Gürhan, I. ve Karaboz, I., 2008, Antimicrobial and cytotoxic activities of *Zingiber officinalis* extracts, *Journal of Pharmaceutical Sciences, FABAD,* 33:76–85 s.

Nalbantsoy, A., Nesil, T., Erden, S., Çalıs, I. ve Bedir, E., 2011, Adjuvant effects *of* astragalus saponins macrophyllosaponin b and astragaloside, *Journal of Ethnopharmacology*, 134(3):897-903 s.

Nalbantsoy, A., Nesil, T., Yılmaz-Dilsiz, O., Aksu, G., Khan, S. ve Bedir, E., 2012, Evaluation of the immünomodulatory properties in mice and *in vitro* anti-inflammatory activity of cycloartane type saponins from *Astragalus* species, *Journal of Ethnopharmacology,* 139:574-581 s.

Paul, S., Sengupta, S., Bandyopadhyay, T. K. and Bhattacharyya, A., 2012, Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7, *Nutrition and Cancer*, 64(7):1087-1094 pp.

Pawar R.S. & Krynitsky A.J. and Rader J.I., 2013, Sweeteners from plants—with emphasis on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and *Siraitia gosvenorii* (Swingle), *Anal Bioanal Chem*, 405:4397-4407 pp.

Pól, J., Hohnová, B., and Hyötyläınen, T., 2007, Characterization of *Stevia rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatogaphy time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Chromatogaphy A*, 1150:85-92 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Prakash, I., Dubois, G.E., Clos, J.F., Wilkens, K.L. and Fosdick, L.E., 2008, Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener, *Food and Chemical Toxicology*, 46:75-82 pp.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C.J. and Tiwary, A.K., 2012, Optimization of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves, *Food* Chemistry, 132:1113-1120 pp.

Puri, M., Sharma, D. and Tiwari, A.K., 2011, Downstream processing of stevioside and its potential applications, *Biotechnology Advances*, 29:781-791 pp.

Raoi, A.B., Reddy, G.R., Ernala, P., Sridhar S. and Ravikumar Y.V.L., 2012, An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and its biological activity, *International Journal of Food Science and Technology*, 47:2554–2560 pp.

Rai, C., Mondal, S., Majumdar, G.C. and De, S., 2012, Clarifications of Stevia extract using cross flow ultrafiltration and concentration by nanofiltration, *Separation and Purification Technology*, 89:125-134 pp.

Rai, C., Majumdar, G.C., and De, S., 2012, Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using Response Surface Methodology, *Separation Science and Technology*, 47:1014-1022 pp.

Ramya M., *in vitro* study of anticancer effect of rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* against HeLa cell lines, *International Journal of Advanced Technology and Science*, 10-16 pp.

Raoi, A.B., Reddy, G.R., Ernala P., Aridhar A. and Ravikumar Y.V.L., 2012, An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and its biological activity, *International Journal of Food Science and Technology*, 47:2554–2560 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Savita, S.M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A.G. and Ramakrishna, P., 2004, *Stevia rebaudiana* – A Functional Component for Food Industry, *Journal of Human and Ecology*, 15(4):261-264 pp.

Scipioni, G.P., Ferreyra, D.J., Acuña, M.G. and Schmalko, M.E., 2011, Rebaudioside A release from matrices used in a yerba maté infusion, *Journal of Food Engineering*, 100:627-633 pp.

Segura-Campos, M., Barbosa-Martin, E., Matus-Basto, A., Cabrera-Amaro, D., Murguia-Olmedo, M., Moguel-Ordonez, Y. and Betancur-Ancona, D., 2014, Comparison of chemical and functional properties of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) varieties cultivated in Mexican Southeast, *American Journal of Plant Science*, 5:286-293 pp.

Serio, L., 2010, La *Stevia rebaudiana*, une alternative au sucre, *Phytothérapie*, 8:26–32 pp.

Shivanna, N., Naika, M., Khanum, F. and Kaul, V.K., 2012, Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of *Stevia rebaudiana*, *Journal of Diabetes and Its Complications,* 27(2):103-113 pp.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., and Shukla, S., 2009, *in vitro* antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert., *Food and Chemical Toxicology*, 47:2338-2343 pp.

Siddique, A.B., Mızanur Rahman, S.M. and Amzad Hossaın, M., 2012, Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Arabian Journal of Chemistry*, doi:10.1016/j.arabjc.2012.01.004.

Sigma-Aldrich, "Total Dietary Fiber Assay Kit Product Information", https://www.sigmaaldrich.com/.../tdf100a_tdfc (Erişim tarihi: 18.06.2014)

Stevia, "Stevia Kullanımı", http://www.Stevia.com.tr/kullanimi.php (Erişim tarihi: 10.06.2014)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tadhani, M., Patel, V., and Subhash, R., 2007, *in vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20:323-332 pp.

Teo, C.C., Tan, S.N., Yong, J.W.H., Hew, C.S. and Ong, E.S.., 2009, Validation of geen- solvent extraction combined with chromatogaphic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni, *J Sep Sci*, 32:612-622 pp.

The Nibble Great Food Finds, http://www.thenibble.com/REVIEWS/diet/ sweeteners.asp (Erişim Tarihi: 12.06.2014)

Thomas, J.E.1. and Glade, M.J., 2010, Stevia: It's Not Just About Calories, *The Open Obesity Journal,* 2:101-109 pp.

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, "Obezite, Diyabet ve Metabolik Hastalıklar Daire Başkanlığı", http://beslenme.gov.tr/index.php?lang=tr&page=38 (Erişim tarihi: 01.07.2014)

Tzia, C., Liadakis, G., 2003, Extraction optimization in food processing, Marcel Dekker.

Vanneste, J., Sotto, A., Courtın, 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*, 103:285-293 pp.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D., 2008, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9:161-169 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wallin, H., 2007, Steviol Glycosides Chemical and Technical Assessment. JECFA, 1-7 pp.

Wang, L. and Weller, C.L., 2006, Recent advanced in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17:300-312 pp.

Wingard jr, R.E., Brown, J.P., Enderlin, F.E., Dale, J.A., Seitz, C.T., 1980, Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A, *Experientia*, 36:519–520 pp.

Yadav, S.K. and Guleria, P., 2012, Steviol glycosides from stevia: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52:988-998 pp.

Yesil-Celiktas, O., 2009, A comparative study of antioxidant properties of extracts obtained from renewable forestry and agicultural resources, *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(8):1507-1512 s.

Yıldız, E., Obezite ve Tip 2 Diyabet, Klasmat Matbaacılık, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 729, ISBN : 978-975-590-245-6.

Yılmaz, Y. and Toledo, R.T., 2004, Health aspects of functional gape seed constituents*, Trends in Food Science & Technology*, 15:422-433 s.

Yoda, S.K., Marques, M.O.M., Petenate, A.J. and Meireles, M.A.A., 2003, Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO_2 and CO_2 + water: extraction kinetics and identification of extracted components, *Journal of Food Engineering*, 57:125-134 pp.

Yücel, M., 2008. Fermantasyon Optimizasyonunda İstatiksel Metotlar, Lisans Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

Zhang, S. Q., Kumar, A. and Kutowy, O., 2000, Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from Stevia leaves, *Food Research International*, 33:617-620 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Ece YILDIZ



BİYOMÜHENDİSLİK YÜKSEK LİSANS

Tel: 0 554 732 46 14

E-Posta: eceyildiz.bioeng@gmail.com

Adres: 974 Sok. No:32 Atatürk Mah. Bornova/İZMİR

KİŞİSEL BİLGİLER

ADI SOYADI : Ece YILDIZ

DOĞUM TARİHİ/YERİ : 06.06.1989/İZMİR

MEDENİ DURUMU : Bekâr

SÜRÜCÜ BELGESİ : B Sınıfı (2009)

(Sigara kullanmıyorum)

EĞİTİM BİLGİLERİ

YÜKSEK LİSANS : Ege Üniversitesi / Biyomühendislik Bölümü

(2012 - 2014)

LİSANS : Ege Üniversitesi / Biyomühendislik Bölümü

(2008 – 2012)

NOT ORTALAMASI : **3.36/4.00**

LİSE : Atakent Anadolu Lisesi (2003 – 2007)

NOT ORTALAMASI : **92.96/100**

STAJ BİLGİLERİ

- **Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü** (İZMİR)
  Staj Tarihi: 05.07.2010 – 27.08.2010

  Bölümü: Endüstriyel Mikrobiyoloji Laboratuarı

- **TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi – Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü** (GEBZE)
  Staj Tarihi: 08.08.2011 – 09.09.2011

  Bölümü: Aşı ve Tanı Teknolojileri Laboratuarı

YABANCI DİL BİLGİLERİ

İNGİLİZCE: Okuma, anlama, yazma: Çok iyi

Konuşma: İyi

(TÖMER Dil Kursu Upper Intermediate)

(TOEIC Sınav Score: 700 / 990)

(YDS : 68)

BİLGİSAYAR BİLGİLERİ

Microsoft Word	: Çok iyi
Microsoft Excel	: Çok iyi
Power Point	: Çok iyi
Design Expert	: Çok iyi
Visual Basic	: İyi
Matlab	: İyi

KAZANILAN BAŞARILAR

- TÜBİTAK 2210-C kodlu Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

POSTER VE YAYINLAR

- Yildiz E., Karabulut D., Yesil-Celiktas O., 2014, A bioactivity based comparison of *Echinacea purpurea* extracts obtained by various processes, *Journal of Supercritical Fluids*, 89: 8–15.

- Comparison of Extraction Methods of *Echinacea purpurea* and Determination of Cytotoxic Activity of Obtained Extracts, VI. Uluslarası Biyomühendislik Kongesi, Sözlü Sunum (12-15 Kasım 2013 – Kuşadası)

- Cultivation of *Botryococcus braunii* for Production of Hydrocarbons and Effects of Cryopreservation Method on Cell Viability, VI. Uluslararası Biyomühendislik Kongesi, Poster Sunumu (12-15 Kasım 2013 – Kuşadası)

- Doğal Ve Bitkisel Bir Tatlandırıcı Olan *Stevia Rebaudiana* Bitkisinin Özütünün Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Elde Edilmesi ve Optimizasyonu, II. Uluslararası Gıda Ar-Ge Proje Pazarı, Poster Sunumu (3-4 Haziran 2013 - İzmir)

- DPP IV Enzim Üretiminde Hücre Parçalama, 2012, Lisans Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

- Yıldız, E., 2012, Probiyotik Bakterilerin Sağladığı Yararlar Nelerdir ?, Biyomühendislik Dergisi, Sayı : 4, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Topluluğu, İzmir.

- AREGE Fikir Yarışması: Doğadan Gelen Yeşil Çözüm: Tatlı Patatesten Biyobozunur Biyoplastik Üretimi, 1. Ege Araştırma - Geliştirme ve Teknoloji Günleri, Poster Sunumu (1-3 Aralık, 2010 - İzmir)

- Yıldız, E., 2010, 20'lik Yaş Dişiyle Gelen Kök Hücre Mucizesi, Hücre Dergisi, Sayı: 6, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir.

PROJELER

- Sustainable Polymers from Algae Sugars and Hydrocarbons (SPLASH)

Funded by EU FP7, Contact for Turkish partner, (2012-2016). http://www.eu-splash.eu/

ALINAN SERTİFİKALAR

- Türk – Alman İkili İşbirliğine Yönelik Öncül Akışkan Teknolojileri ve Uygulamaları Workshop (21 – 22 Nisan, 2014 – İzmir) (Görevli ve Katılımcı)

- VI. Uluslararası Biyomühendislik Kongesi (12 - 15 Kasım 2013 - Kuşadası) (Katılımcı ve Sözlü sunum)

- Girişiminizin İlk Seferde Başarılı Olması için Bilmeniz Gereken 5 Şey Nedir? – Gemba Team (8 Kasım 2013)

- Bilimsel Dergi Yayını Nasıl Hazırlanır? - Springer ve Edanz (Dokuz Eylül Üniversitesi) (30 Mayıs 2013)

- Ege Üniversitesi – Onur Belgesi (20 Haziran 2012)

- Türkiye Biyomühendislik Zirvesi – 9. Biyomühendislik Günleri ve Mezunlar Buluşması Teşekkür Belgesi (20 – 21 Nisan, 2012 – İzmir) (Görevli – Sunucu)

- I. Alman - Türk Biyogaz Workshop (19 - 20 Ekim, 2011 - İzmir) (Katılımcı)

- EBİLTET 3. Kök Hücre Sempozyumu (Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu) (30 Nisan, 2011 - İzmir) (Görevli ve Katılımcı)

- EBİLTET Doku Mühendisliği Sempozyumu (11 Nisan, 2011 - İzmir) (Katılımcı)

- VII. Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu (4 - 6 Mart, 2011 - İstanbul) (Katılımcı)

- Araştırma Laboratuarlarında Gönüllü Çalışma Deneyim Sertifikası (Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Merkezi) (2010)

- V. Uluslararası Biyomühendislik Kongesi (16 - 19 Haziran 2010 - İzmir) (Katılımcı)

- IV. Uluslararası Bilim ve Teknoloji Günleri (25 May, 2010 - İzmir) (Katılımcı)

- EBİLTET Aşı Sempozyumu (26 Nisan, 2010 - İzmir) (Görevli ve Katılımcı)

- EBİLTET 2. Kök Hücre Sempozyumu (23 Mart, 2010 - İzmir) (Katılımcı)

- EBİLTET Yapay Doku ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar (27 Ekim, 2009 - İzmir) (Katılımcı)

- EBİLTET Kök Hücre Sempozyumu (16 Mart, 2009 - İzmir) (Katılımcı)

ALINAN EĞİTİM VE SEMİNERLER

- ISO 9001:2008 Temel Kalite Yönetimi Eğitimi (27-28 Temmuz 2013)

- ISO 18001:2007 – OHSAS İş Sağlığı ve Güvenliği Yönetim Sistemi (27-28 Temmuz 2013)

- ISO 14001:2005 Çevre Yönetimi Sistemi Eğitimi (27-28 Temmuz 2013)

- ISO 19011:2011 İç Denetçi Eğitimi (27-28 Temmuz 2013)

- ISO 22000:2005 – HACCP Gıda Güvenliği Yönetimi Sistemi Eğitimi (27-28 Temmuz 2013)

- Ege Üniversitesi Lisansüstü Öğrencileri Oryantasyon Programı (20-22 Şubat 2013)

- ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi (9 Mayıs 2010)

- ISO 14001:2004 Çevre Yönetim Sistemi Eğitimi (9 Mayıs 2010)

- OHSAS 18001:2007 İş Sağlığı Güvenliği Yönetim Sistemi Eğitimi (9 Mayıs 2010)

Teknik Geziler : BİONORM Doğal Ürünler Sanayi Ve Ticaret Limited Company (Torbalı), TARKİM Bioethanol Tesisi (M. Kemalpaşa), Mauri Maya (Bandırma), Eczacıbaşı – Zentiva İlaç Sanayi Tesisi (Lüleburgaz), Abdi İbrahim İlaç Fabrikası (Büyükçekmece), Nobel İlaç Sanayi – Fargem ARGE Tesisi (Düzce), KÖGEM (Kocaeli Üniversitesi).

HOBİLER VE İLGİ ALANLARI

- Latin dansları, masa tenisi, yüzme, satranç
- Kitap okuma, puzzle yapma, ahşap boyama
- Çeşitli organizasyonlarda görev almak

ÜYELİKLER

- Kimya Mühendisliği Odası Üyeliği (2008-)
- Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) (2008-)
- Ege Genç Tema Topluluğu (2009-)

REFERANSLAR

- Prof. Dr. Fazilet VARDAR SUKAN, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü
  Email: fazilet.vardar.sukan@ege.edu.tr Tel: +90 232 388 49 55
- Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü
  Email: ozlem.yesil.celiktas@ege.edu.tr Tel: +90 232 343 44 00
- Prof. Dr. Mustafa DEMİRCİOĞLU, Ege Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
  Email: md.che.tr@gmail.com Tel: +90 232 311 18 31
- Prof. Dr. Nalan KABAY, Ege Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
  Email: nalan.kabay@ege.edu.tr Tel: +90 232 388 76 00