

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI
2019-YL-024

**ŞEKER OTUNDAN (*Stevia rebaudiana*) STEVİOL
GLİKOZİTLERİN VE FENOLİK MADDELERİN
EKSTRAKSİYONUNDA MİKRODALGA VE
ULTRASES UYGULAMALARININ
OPTİMİZASYONU**

Özge UYGUN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Cavit BİRCAN
Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Özge UYGUN tarafından hazırlanan “Şeker Otundan (*Stevia rebaudiana*) Steviol Glikozitlerin ve Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonunda Mikrodalga ve Ultrases Uygulamalarının Optimizasyonu” başlıklı tez, 29.03.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Cavit BİRCAN	ADÜ	
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ	ADÜ	
Üye :Doç. Dr. Aslı YORULMAZ	ADÜ	
Üye :Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN	HRÜ	
Üye :Doç. Dr. Murat UYGUN	ADÜ	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN

Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

29/03/2019

Özge UYGUN

ÖZET

ŞEKER OTUNDAN (*Stevia rebaudiana*) STEVİOL GLİKOZİTLERİN VE FENOLİK MADDELERİN EKSTRAKSİYONUNDA MİKRODALGA VE ULTRASES UYGULAMALARININ OPTİMİZASYONU

Özge UYGUN

Yüksek Lisans Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanları: Prof. Dr. Cavit BİRCAN; Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ
2019, 97 sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, doğal ve düşük kalorili bir tatlılandırıcı olan *Stevia rebaudiana* Bertoni (Şeker otu)'de bulunan steviol glikozitlerin ve fenolik maddelerin ekstraksiyonunda farklı yöntemlerin etkilerini incelemektir. Bu kapsamda; çözücü, mikrodalga destekli ve ultrases destekli olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile çalışılmış; yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılarak her bir ekstraksiyon yöntemi için işlem koşullarının etkileri incelenerek optimum işlem koşulları belirlenmiştir. Optimum işlem koşulları çözücü ekstraksiyon yöntemi için %50 EtOH konsantrasyonu, 118 mL/g çözücü oranı, 54 °C sıcaklık ve 112 dk. süre; mikrodalga destekli ekstraksiyon için 51 °C sıcaklık, 16 dk. süre; ultrases destekli ekstraksiyon işlemi için 50 °C sıcaklık, 43 dk. süre olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda çözücü, mikrodalga destekli ve ultrases destekli ekstraksiyon işlemlerinde sırasıyla; rebaudiozit A miktarı 41,10; 42,84; 42,94 mg/g; steviozit miktarı 64,94; 68,02; 70,35 mg/g; toplam fenolik madde miktarı 66,58; 67,75; 68,61 mg GAE/g; toplam flavonoid miktarı 42,13; 43,40; 47,69 mg KE/g; troloks eşdeğer antioksidan kapasite (ABTS) değeri 786,45; 838,57; 853,74 µmol TE/g olarak tespit edilmiştir. LC/Q-TOF/MS analizi ile şeker otu ekstraktlarında toplam 65 bileşen tanımlanmıştır. Ultrases destekli ekstraksiyonun en verimli yöntem olduğu; ayrıca ekstraksiyon süresi açısından mikrodalga (16 dk.) ve ultrases destekli ekstraksiyon (43 dk.) yöntemlerinin çözücü ekstraksiyon (112 dk.) yöntemine kıyasla işlem süresini önemli ölçüde kısalttığı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Doğal Tatlılandırıcı, Ekstraksiyon, Mikrodalga, Rebaudiozit A, Steviol Glikozit, Steviozit, Şeker Otu, Ultrases

ABSTRACT

OPTIMISATION OF MICROWAVE AND ULTRASOUND APPLICATIONS ON THE EXTRACTION OF STEVIOL GLYCOSIDES AND PHENOLIC COMPOUNDS FROM SUGAR LEAF (*Stevia rebaudiana*)

Özge UYGUN

Master of Science Thesis, Food Engineering Department

Supervisors: Prof. Dr. Cavit BİRCAN; Asst. Prof. Dr. Fatih Mehmet YILMAZ

2019, 97 pages

The objective of this study was to determine the effects of different methods on the extraction of steviol glycosides and phenolic compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni (sugar leaf) which is a natural and low calorie sweetener. Three different techniques, i.e, solvent, microwave assisted and ultrasound assisted extraction methods were used and optimum process conditions for each methods were estimated by investigating the effects of process variables using response surface methodology (RSM). Optimum extraction conditions for solvent extraction were 50% EtOH concentration, 118 mL/g solvent ratio, 54 °C temperature and 112 min time; for microwave assisted extraction 51 °C temperature, 16 min time; and for ultrasound assisted extraction 50 °C temperature, 43 min time. At optimum conditions, amounts of rebaudioside A were 41.10, 42.84, 42.94 mg/g; stevioside were 64.94, 68.02, 70.35 mg/g; total phenolic compounds were 66.58, 67.75, 68.61 mg GAE/g; total flavonoid were 42.13, 43.40, 47.69 mg CE/g; trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS) values were 786.45, 838.57, 853.74 µmol TE/g for solvent, microwave assisted and ultrasound assisted extraction methods respectively. A total of 65 compounds were identified in sugar leaf extracts by LC/Q-TOF/MS analysis. Ultrasound-assisted extraction was found the most efficient method, and in terms of extraction time, microwave (16 min) and ultrasound (43 min) assisted extraction methods significantly reduced processing time as compared to solvent extraction method (112 min).

Keywords: Extraction, Microwave, Natural Sweetener, Rebaudioside A, Steviol Glycosides, Stevioside, Sugar Leaf, Ultrasound

ÖNSÖZ

Tez çalışması süresince her konuda bilgilerini ve desteklerini esirgemeyen değerli Danışman Hocalarım Prof. Dr. Cavit BİRCAN ve Dr. Öğr. Üyesi Fatih Mehmet YILMAZ’a teşekkür ederim.

Değerli zamanlarını ayırıp tezimi değerlendiren, tez savunma jüri üyesi Hocalarım Doç. Dr. Aslı YORULMAZ, Doç. Dr. Mehmet KARAASLAN ve Doç. Dr. Murat UYGUN’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Ahmet GÖRGÜÇ, Pınar ÖZER, Esra GENÇDAĞ ve Fulya OKUROĞLU’na teşekkür ederim.

LC/Q-TOF/MS analizinin gerçekleşmesini sağlayan Ege MATAL’a ve bu konuda değerli vaktini ayıran Dr. Zinar Pınar GÜMÜŞ’e teşekkür ederim.

Şeker otunu temin etmemizi sağlayan ve değerli bilgilerini, tecrübelerini bizlerle paylaşan Balıkesir Burhaniye’deki Stevia Bahçesi sahibi Selahattin GÜVENÇ’e teşekkür ederim.

Tez çalışmasına maddi destek sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimine (Proje No: MF18019) teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip, desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen canım annem Feriştah UYGUN ve canım babam İrfan UYGUN’a, canım abim Orhan UYGUN’a ve yengem Ceren UYGUN’a ayrıca bu süreçte sabır ve hoşgörüsüyle tüm desteğini yanımda hissettiğim Zeki AKTUĞ’a teşekkür ederim.

Özge UYGUN

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
EKLER DİZİNİ.....	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni (Şeker otu).....	3
2.1.1. Şeker Otu Bitkisinin Botanik Özellikleri	3
2.1.2. Şeker Otunun Yetiştirme Koşulları ve Hasat.....	3
2.1.3. Şeker Otu Bitkisinin Kimyasal Kompozisyonu	5
2.1.4. Şeker Otunda Bulunan Steviol Glikozitlerin Kimyasal Yapıları ve Özellikleri	6
2.1.5. Steviol Glikozitlerin Metabolik Özellikleri.....	8
2.2. Tatlılandırıcılar.....	9
2.3. Şeker Otunun Kullanım Alanları.....	11
2.4. Şeker Otunun İnsan Sağlığına Etkileri	13
2.4.1. Şeker Otu Günlük Alım Miktarı.....	15
2.5. Ekstraksiyon Yöntemleri.....	16
2.5.1. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi.....	17
2.5.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon İşlemi	18

2.5.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemi	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	23
3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	23
3.4. Yöntem	23
3.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri.....	24
3.4.1.1. Çözücü ekstraksiyon yöntemi.....	24
3.4.1.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon.....	25
3.4.1.3. Ultrases destekli ekstraksiyon	27
3.4.2. Şeker Otu Ekstraktlarına Uygulanan Analizler	28
3.4.2.1. Toplam kuru madde miktarı	28
3.4.2.2. Toplam mineral (kül) miktarı	29
3.4.2.3. Steviol glikozitlerin (Rebaudiozit A ve Steviozit) miktarlarının HPLC ile belirlenmesi	29
3.4.2.4. Toplam fenolik madde miktarı	30
3.4.2.5. Toplam flavonoid miktarı.....	31
3.4.2.6. Antioksidan kapasite	31
3.4.2.7. LC/Q-TOF/MS analizi (Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi)	32
3.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analizler	33
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	34
4.1. <i>Stevia rebaudiana</i> (Şeker otu) Bitkisine Ekstraksiyon İşlemleri Öncesi Yapılan Analizler	34
4.2. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Şeker Otundan Steviol Glikozitler ve Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu İşlemleri	35

4.2.1. Çözücü Ekstraksiyon ve Çözücü Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi	35
4.2.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi	50
4.2.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon ve Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi	58
4.3. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi, Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon, Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemlerine ait Optimum İşlem Koşulları	65
4.3.1. LC/Q-TOF/MS ile Şeker Otunda Bulunan Bileşenlerin Tanımlanması.....	70
5. SONUÇ	77
KAYNAKLAR	79
EKLER.....	93
ÖZGEÇMİŞ	97

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
ANOVA	: Varyans analizi
Ç	: Çözücü
EtOH	: Etanol
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: İlaç ve Gıda İdaresi
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
GRAS	: Genellikle güvenli kabul edilir
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
Hz	: Hertz
JECFA	: Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
KE	: Kateşin eşdeğeri
KM	: Kuru madde
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MD	: Mikrodalga
P	: İstatistiki anlamlılık seviyesi
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
QE	: Kuersetin eşdeğeri
R ²	: Uyum katsayısı
rpm	: Dakikadaki tur sayısı
RSM	: Yanıt yüzey metodu
RU	: Rutin eşdeğeri
TE	: Troloks eşdeğer
TEAK	: Troloks eşdeğer antioksidan kapasite

TF	: Toplam flavonoid
TFM	: Toplam fenolik madde
TOF	: Uçuş zamanlı
US	: Ultrases
UV-VIS	: Mor ötesi-görünür ışık
w	: Ağırlık
W	: Watt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
X_i	: Bağımsız değişken (i 'ye bağlı)
X_j	: Bağımsız değişken (j 'ye bağlı)
Y	: Bağımlı değişken
β	: Regresyon katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan şeker otunun büyüme, çiçeklenme ve tohum evreleri.....	4
Şekil 2.2. Steviozit, rebaudiozit A ve steviolun kimyasal yapıları.....	8
Şekil 3.1. Şeker otu bahçesi ve gövdesinden ayrılan yapraklar	21
Şekil 3.2. Şeker otunda kurutma ve ayıklama sonrası öğütme ve paketleme işlemleri.....	22
Şekil 3.3. Çözücü ekstraksiyon yöntemi ve santrifüj işlemi sonrasında elde edilen ekstraktlar	25
Şekil 3.4. Mikrodalga ekstraktör, ekstraktların mikrodalga işlem öncesi ve sonrası görünümü	26
Şekil 3.5. Ultrases destekli ekstraksiyon, ekstraktların ultrases işleminden önceki ve sonraki görünümü	27
Şekil 3.6. Toplam kuru madde analizi sonrası sabit tartıma ulaşmış şeker otu.....	28
Şekil 3.7. Toplam mineral (kül) miktarı analizi sonrası sabit tartıma ulaşmış şeker otu.....	29
Şekil 3.8. Rebaudiozit A standardı için kromatogram örneği	30
Şekil 3.9. Steviozit standardı için kromatogram örneği	30
Şekil 4.1. Çözücü ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozite (2) ait örnek bir kromatogram	44
Şekil 4.2. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin Rebaudiozit A miktarına etkisi.....	45
Şekil 4.3. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin Steviozit miktarına etkisi.....	46
Şekil 4.4. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarına etkisi	47
Şekil 4.5. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TF miktarına etkisi	48

Şekil 4.6. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) miktarına etkisi	49
Şekil 4.7. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozite (2) ait örnek bir kromatogram	51
Şekil 4.8. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A, steviozit, TFM, TF, TEAK (ABTS) miktarlarına etkisi ...	57
Şekil 4.9. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozit (2) ait örnek bir kromatogram	58
Şekil 4.10. Ultrases destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A, steviozit, TFM, TF, TEAK (ABTS) miktarlarına etkisi ...	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Şeker otu kimyasal kompozisyonu (100 g).....	6
Çizelge 2.2. Steviol glikozitlerin moleküler formülleri, tatlılık derecesi ve yapraktaki kompozisyonu.....	7
Çizelge 2.3. Tatlılandırıcıların sınıflandırılması ve başlıca kullanılan tatlılandırıcılar	10
Çizelge 2.4. Bazı tatlılandırıcıların sükroza kıyasla tatlılık dereceleri (sükroz = 1)	11
Çizelge 2.5. Şeker otu ve türevi tatlılandırıcıların güvenliği ile ilgili bazı düzenlemeler	12
Çizelge 2.6. Çeşitli gıda ürünlerinde kullanılan Rebaudiozit A miktarları	13
Çizelge 2.7. Steviol glikozitlerin günlük tüketilme limitleri (mg/kg)	15
Çizelge 3.1. LC/Q-TOF/MS analizi mobil faz akış diyagramı	33
Çizelge 4.1. Ekstraksiyon işlemi öncesi şeker otu yapraklarının özellikleri*	34
Çizelge 4.2. Çözücü ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar.....	38
Çizelge 4.3. Çözücü ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	40
Çizelge 4.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar	53
Çizelge 4.5. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	55
Çizelge 4.6. Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar	59
Çizelge 4.7. Ultrases destekli ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları.....	62
Çizelge 4.8. Ekstraksiyon yöntemlerine ait optimum işlem koşulları, bağımlı değişkenlere ait sonuçlar	69

Çizelge 4.9. Optimum koşul ekstraktlarındaki pozitif ve negatif polarite gösteren bileşikler ve bunların tanımlanmasını destekleyen ana parametreler	74
--	----



EKLER DİZİNİ

Ek 1. Rebaudiozit A standardı için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	93
Ek 2. Steviozit standardı için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	93
Ek 3. Toplam fenolik madde miktarı analizi için gallik asit standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi.....	94
Ek 4. Toplam flavonoid miktarı analizi için kateşin standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi	94
Ek 5. Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (ABTS) değeri için troloks standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğri	95

1. GİRİŞ

Stevia rebaudiana Bertoni (Şeker otu), birçok yapay tatlılandırıcıya alternatif, düşük kalorili doğal bir bitkisel kaynaktır. Şeker otu bitkisinin az miktarlardaki kullanımı tatlılık açısından oldukça etkili olmaktadır. Şeker otunun tatlılık oranının sükroza kıyasla fazla olduğu bilinmektedir ve içeriğindeki steviol glikozitlerin sükrozdan yaklaşık 300 kat daha tatlı olduğu bildirilmiştir. Şeker otu bitki ekstraktının %95 – 97'ye kadar saflaştırılarak tatlılandırıcı olarak elde edilebileceği belirtilmektedir (Lemus-Mondaca vd., 2012). Şeker otunun kimyasal kompozisyonu incelendiğinde yaprakta en çok tatlılık veren bileşenlerin rebaudiozit A ve steviozit olduğu belirtilmektedir. Gıda Katkı Maddeleri FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (JECFA; Joint FAO Expert Committee on Food Additives), piyasada ticari olarak sunulan şeker otu ekstraktlarının minimum %95 saflıkta olduğunu ve bu miktarı steviol glikozitlerin (rebaudiozit A ve steviozit) oluşturduğunu rapor etmiştir. Kuru ağırlık bazında %3,8 rebaudiozit A, %9,1 steviozit içerdiği bildirilmiştir (Brandle vd., 1998). Elde edilen veriler geri kalan %5'lik kısmın steviol glikozitler dışındaki sakkaritlerin oluşturduğunu göstermiştir (WHO, 2006). Kurutulmuş şeker otu yapraklarının 2,7 kkal/g enerji sağladığı tespit edilmiştir. Şeker otunun düşük kalorili bir tatlılandırıcı olması, kalori alımını sınırlamaya veya kilo kontrolünü sağlamaya yardımcı olduğunu göstermektedir (Savita vd., 2004). JECFA, steviol glikozitlerin günlük alım limitini 0 - 4 mg/kg vücut ağırlığı olarak belirlemiştir (Wallin, 2016).

Kimyasal kullanımının azaltılması, işlem süresinin kısaltılması gibi hedefler doğrultusunda verim de göz önünde bulundurularak farklı bitkisel materyaller için çeşitli ekstraksiyon teknikleri ve optimizasyon çalışmaları yapılmaktadır. Bu kapsamda ultrases, mikrodalga, ohmik ısıtma, süperkritik akışkan, vurgulu elektrik alan gibi farklı tekniklerden yararlanılmaktadır (Azmir vd., 2013). Şeker otundan steviol glikozitlerin ekstraksiyonuna dair bazı çalışmalar mevcuttur. Alupului vd. (2009), şeker otunda çözücü ekstraksiyon işleminde sabit sıcaklık ve farklı sürelerde, ultrases destekli ekstraksiyonda farklı güçler ve farklı sürelerde, mikrodalga destekli ekstraksiyonda farklı sıcaklıklar ve farklı sürelerde ekstraksiyon işlemlerini gerçekleştirerek yalnızca steviol glikozitlerin elde edilmesini amaçlamışlardır. Şeker otuyla ilgili başka bir çalışmada yüksek gerilim elektrik deşarjı, vurgulu elektrik alan ve ultrases uygulamaları ile şeker otundan sadece su kullanarak yapılan ekstraksiyonlardan antioksidan bileşenlerin elde

edilmesi amaçlanmıştır (Barba vd., 2015). Şeker otunda yapılmış bir başka ekstraksiyon çalışmasında çözücü olarak %100 etanol kullanılmış ve yüksek antioksidan kapasite ile fenolik bileşenlerin elde edilmesi amaçlanmıştır (Shukla vd., 2009). Ciulu vd. (2017), şeker otunda mikrodalga destekli ekstraksiyon (farklı etanol konsantrasyonları, süre ve sıcaklıklarda), basınçlı sıvı ekstraksiyonu, ve katı/sıvı ekstraksiyonu (farklı etanol konsantrasyonlarında) uygulayarak sadece fenolik bileşenlerin elde edilmesini amaçlamışlardır. Aynı çalışmada yalnızca basınçlı sıvı ekstraksiyon ile elde edilen numunelere HPLC-ESI-QTOF-MS analizi uygulayarak fenolik bileşenlerin tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir. Ultrases destekli ekstraksiyonun uygulandığı bir başka çalışmada steviol glikozitlerden yalnızca rebaudiozit A göz önünde bulundurulmuştur (Gasmalla vd., 2017).

Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde, bu tez çalışması kapsamında şeker otundan steviol glikozitlerin (rebaudiozit A ve steviozit) ve fenolik maddelerin eldesinde çözücü ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri ile işlem koşullarının etkilerini incelenmesi ve her bir yöntem için optimum işlem koşullarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, optimum işlem koşullarında elde edilen ekstraktlara LC/Q-TOF/MS analizi uygulanarak şeker otunda bulunan steviol glikozitlerin, fenolik bileşenlerin, flavonoidlerin, amino asitlerin ve esansiyel yağların kalitatif olarak tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni (Şeker otu)

Stevia rebaudiana Bertoni (Şeker otu) kayıtlara geçmeden önce Paraguay ve Brezilya halkları tarafından kullanılmaktayken 1887 yılında İskoçyalı botanikçi Dr. Moises Santiago Bertoni tarafından keşfedilmiştir. Ardından Güney Amerika dışında da oldukça tanınır hale gelerek yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Carakostas vd., 2008). Paraguaylı kimyacı Dr. Rebaudi'nin 1905 yılındaki çalışmalarından sonra ise bilimsel adı *Stevia rebaudiana* olmuştur. Paraguay orijinli şeker otu bitkisi "Paraguay'ın tatlı otu" olarak bilinirken bitkiye ayrıca bal yaprağı, tatlı yaprak, şeker yaprağı gibi isimlendirmeler de yapılmıştır (Yadav ve Guleria, 2012).

2.1.1. Şeker Otu Bitkisinin Botanik Özellikleri

Şeker otu, Paraguay'ın kuzey doğusunda bulunan Amambay bölgesinde, *Asteraceae* familyasına ait yaklaşık 150 türü bulunan çalı formunda dallanmış bir bitkidir. Brezilya ve Arjantin topraklarında oldukça sık bir şekilde bulunmaktadır (Lemus-Mondaca vd., 2012; Preethi vd., 2011). Şeker otu bitkisi bir metre ve daha yüksek boylarda büyüyüp gelişebilmektedir. Çiçekleri küçük (15 – 17 mm) ve beyaz renklidir. Geniş kök sistemi ile birlikte oval ve kırılğan yapraklara sahiptir. Çok yıllık bir bitki olan şeker otu yapraklarının üst yüzeyi tüylüdür, gövdesi ise odunsudur. Tohumların koyu renkli olması durumunda verimli; solgun ve berrak olması durumunda kısır olduğu anlaşılmaktadır. Tohumlar çok küçük endosperm içermektedir ve tüylü bir yapıya sahiptir (Yadav vd., 2011; Lemus-Mondaca vd., 2012). Bitki, Güney Amerika'ya özgü olmakla birlikte Çin, Tayvan, Tayland, Güney Kore, Malezya'da yetiştirilmektedir. Üretimi hızla yayılan şeker otunun İsrail, Ukrayna, İngiltere, Filipinler ve Kanada'da tarımı yapılmaya başlanmıştır (Sivaram ve Mukundan, 2003).

2.1.2. Şeker Otunun Yetiştirme Koşulları ve Hasat

Şeker otu bitkisi subtropikal bölgelerde uzun ömürlü olarak yetiştirilmektedir. Orta ve yüksek enlemlilerde yetiştirildiğinde bitkinin yaprak verimi ve içerdiği steviozit miktarı bakımından oldukça zengin olduğu görülmüştür (Goettemoeller ve Ching, 1999). Şeker otunun gelişme evreleri; çimlenme,

büyüme, çiçeklenme ve tohum olgunluğu olmak üzere dört aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan şeker otunun büyüme, çiçeklenme ve tohum evreleri

İlk aşama olan çimlenmenin ardından ikinci aşamada bitkinin büyümesi gerçekleşir. Üçüncü evrede tozlaşma ve çiçeklerin tomurcuklanması, son evrede ise tohum büyümesi gerçekleşmektedir. Tohumun gelişebilmesi için ekim süresi ve sıcaklık önemli kriterlerdir. Tohumun çimlenmesi için optimum sıcaklık 24 °C olarak kabul edilmektedir. Olgunlaşan tohumlar yaklaşık olarak 3 mm uzunluğunda bulunmaktadır. Şeker otu, güney yarımkürede ocak ve mart ayları arasında, kuzey yarımkürede eylül ve ekim aylarında çiçek açan bir bitkidir. Tohumlar ilkbaharda sera içinde çimlendirilir ve yaklaşık 6-7 hafta sonunda

bitkilerin toprağa dikimi gerçekleştirilir. Fidelerin 4-5 aylık büyüme evresinden sonra ise zamanı gelen olgunlaşmış yapraklar hasat edilir (Ramesh vd., 2006; Gupta, 2013).

2.1.3. Şeker Otu Bitkisinin Kimyasal Kompozisyonu

Şeker otu bitkisinin kullanılabilir faydalı ve tatlı kısmı yapraklarıdır. Şeker otunun 150 türünden sadece 18'inin tatlılık için kullanılabilir nitelikte olduğu belirtilmektedir. Şeker otunda en çok bulunan steviol glikozitler; dulkozit A, rebaudiozit A, B, C, D, E, steviolbiozit ve steviozit türleridir. Bu steviol glikozitlerin şeker otunun kuru yaprak ağırlığının %20'sini oluşturduğu ve ortalama olarak sükrozdan 300 kat daha tatlı olduğu tespit edilmiştir (Ramesh vd., 2006; Goyal vd., 2010; Yıldız Öztürk vd., 2015). Taze şeker otu yaprakları yaklaşık olarak %80-85 arasında su içermektedir. En çok tatlılık veren ana bileşenleri ise steviozit, rebaudiozit A ve rebaudiozit B steviol glikozitleridir (Sharma vd., 2006). Şeker otu kuru yapraklarından elde edilen ekstraktlarda flavonoid, alkaloid, suda çözünen klorofil, ksantofil, hidrosinamik asit (kafeik, klorojenik vs.), nötral suda çözünen oligosakkarit, aminoasit, lipid, esansiyel yağlar ve iz elementler (alüminyum, demir, çinko vs.) bulunmaktadır (İnanç ve Çınar, 2009). Savita vd. (2004), şeker otu yapraklarında kuru ağırlık esasına göre enerji değerini 2,7 kkal/g olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, kurutulmuş şeker otunda %7 nem içeriği, %10 protein, %3 yağ, %11 kül, %52 karbonhidrat, %18 lif; mineral içeriğinin ise 100 g şeker otunda 464,4 mg kalsiyum, 11,4 mg fosfor, 190 mg sodyum, 1800 mg potasyum, 55,3 g demir, 349 mg magnezyum, 1,5 mg çinko olduğu saptanmıştır. Şeker otu bileşimi Çizelge 2.1'de verilmiştir (Savita vd., 2004). Bunlara ek olarak şeker otunun su tutma ve yağ tutma kapasitelerini artırıcı protein içeriğine sahip olduğu belirtilmektedir (Yadav ve Guleria, 2012).

Çizelge 2.1. Şeker otu kimyasal kompozisyonu (100 g) (Savita vd., 2004)

Bileşen	Miktar
Nem	7 g
Protein	10 g
Yağ	3 g
Kül	11 g
Karbonhidrat	52 g
Lif	18 g
Mineraller	
Kalsiyum	464,4 mg
Fosfor	11,4 mg
Sodyum	190 mg
Potasyum	1800 mg
Demir	55,3 mg
Magnezyum	349 mg
Çinko	1,5 mg

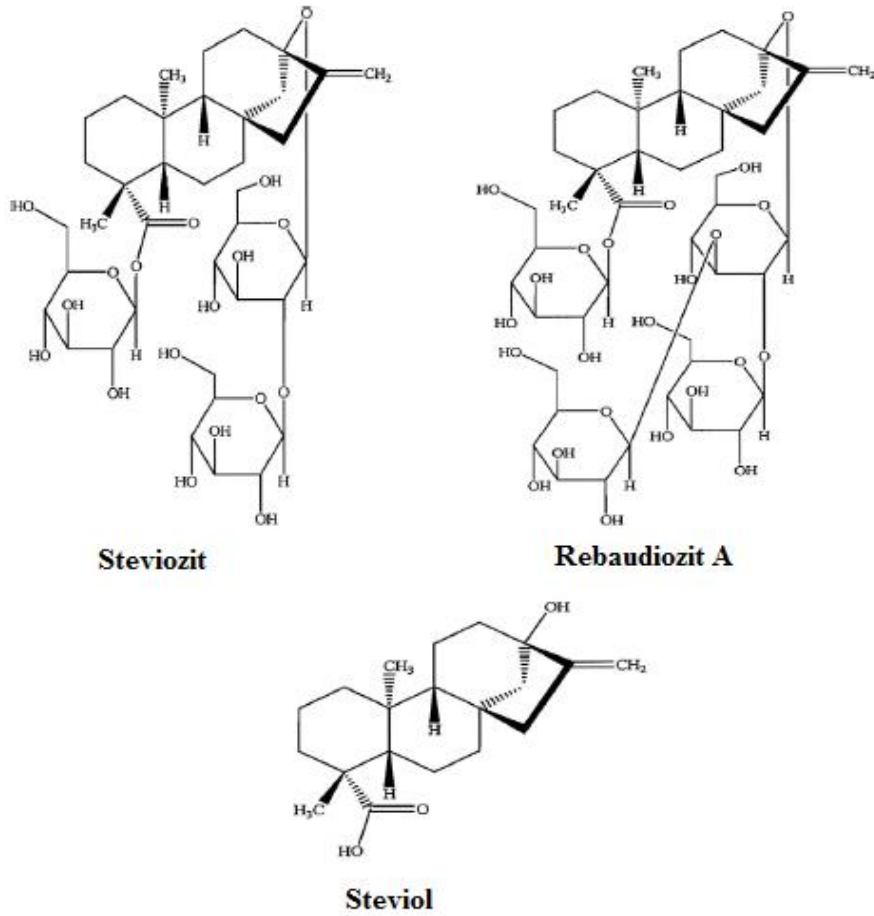
2.1.4. Şeker Otunda Bulunan Steviol Glikozitlerin Kimyasal Yapıları ve Özellikleri

Glikozitler, şeker moleküllerinin (glikon) şeker olmayan (aglikon) gruplarla bağlanarak oluşturduğu bir grup organik bileşik olarak tanımlanmaktadır. Şeker otu yapraklarında bulunan diterpen glikozitler ise entkauren türevleridir ve yüksek derecede tatlılandırma özelliğine sahiptir. Glikozitlerin tatlılandırıcı etkileri bitkinin bölümlerine göre değişmektedir. Yapraklar tatlılık açısından en zengin dokular olup bunu çiçek, sap ve tohumlar takip eder (Marcinek ve Krejpcio, 2015). Japon bilim insanlarının 1970'lerde başlattığı ve günümüze kadar devam ettirilen farklı çalışmalar sonucunda bitkinin ticari değeri önemli ölçüde artmıştır. Yapraklarda bulunan tatlılandırıcı bileşikler diterpen glikozitlerdir ve yapılan çalışmalar bu glikozitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasına yöneliktir (González vd., 2014). Şeker otunun yaprak dokusunda tatlılık verici özelliklere sahip steviozit, rebaudiozit A - E, dulkozit A ve steviolbiozit olmak üzere sekiz tane diterpen glikozit tespit edilmiştir. Bazı steviol glikozitlerin kimyasal yapıları Şekil 2.2'de verilmiştir. Bu glikozitler önemli bir bitkisel hormon olan giberellik asit ile aynı biyokimyasal yol ile sentezlenir. İki temel steviol glikozitten biri olan steviozit, yaprakların kuru ağırlığının %5 - 10 arasında bulunurken; rebaudiozit A'nın %2 - 4 arasında olduğu tespit edilmiştir. Bileşenlerin konsantrasyonları bitkinin genotip ve kültivasyon koşullarına bağlı olarak geniş çapta değişmektedir. Şeker otu, içindeki steviol glikozitlerin varlığı sebebiyle oldukça tatlı bir bitkidir.

ve sükröz ile kıyaslandığında; steviozit 150 - 300, rebaudiozit A 250 - 450, rebaudiozit B 300 - 350, rebaudiozit C 120 - 500, rebaudiozit D 250 - 450, rebaudiozit E 150 - 300, dulkozit A 50 - 120, steviolbiozit ise 100 - 125 kat daha tatlıdır (Çizelge 2.2). Steviol glikozitlere ek olarak farklı tipte diterpenoitler de bulunmaktadır. Manoil oksit ve labdane sklareol, kaurenit olmayan diterpenoitlerdir. Ayrıca şeker otu bitkisinde flavonoidler, glikozitler, kumarinler, sinamik asitler, fenil propanoidler ve bazı uçucu yağlar bulunmaktadır (Wölwer-Rieck, 2012; Yadav ve Guleria, 2012; Gupta, 2013). Ekstraksiyon işlemleri sonucunda steviozit miktarındaki baskınlık dolayısıyla ekstraktlarda karakteristik acı bir tat oluştuğu belirtilmiştir. Bununla birlikte yüksek oranlarda rebaudiozit A içeren ekstraktlar daha iyi bir aroma profiline, fiziko-kimyasal ve organoleptik özelliklere sahiptir. Rebaudiozit A aynı zamanda suda oldukça iyi çözünür ve böylece ticari amaçlı üretilen gıdaların hazırlanmasını kolaylaştırır. Steviozit ve rebaudiozit A düşük kalorilidir, fermente edilemez, dış çürümelerine neden olmazlar. İçeriğindeki steviozit ve rebaudiozit A'nın düşük kalorili olmasının yanı sıra doğada hazır halde bulunmaları ve endüstriyel düzeyde güvenilir olmaları sebebiyle şeker otu doğal tatlandırıcıları iyi bir şekilde temsil etmektedir (González vd., 2014).

Çizelge 2.2. Steviol glikozitlerin moleküler formülleri, tatlılık derecesi ve yapraktaki kompozisyonu (González vd., 2014)

Glikozit	Moleküler Formülü	Tatlılık Derecesi (Sükroz Referans)	Yapraktaki Kompozisyonu (%w/w)
Steviozit	C ₃₈ H ₅₀ O ₁₈	150-300	4 -14
Rebaudiozit A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	250-450	2-4
Rebaudiozit B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	300-350	<0,4
Rebaudiozit C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	120-500	1-2
Rebaudiozit D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	250-450	<0,4
Rebaudiozit E	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	150-300	<0,4
Steviolbiozit	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	100-125	<0,4
Dulkozit A	C ₃₈ H ₅₀ O ₁₇	50-120	0,4 - 0,7



Şekil 2.2. Steviozitol, rebaudiozitol A ve steviolün kimyasal yapıları (Carakostas vd., 2008)

2.1.5. Steviol Glikozitlerin Metabolik Özellikleri

Şeker otunun ağız yoluyla alımını takiben kan dolaşımına giren steviozitolun başlıca metabolitinin steviol olduğu belirtilmektedir. Bunun araştırılması sırasında ise karaciğerdeki metabolizmasına özellikle dikkat edilmiştir. Steviol, fare ve insandan hapatik mikrozomlar ile inkübe edildikten sonra oksidasyon sonucunda monohidroksi ve dihidroksi metabolitler oluşmaktadır (Chatsudhipong ve Muanprasat, 2009).

Geuns vd. (2003), araştırmalarında domuzlara ağız yoluyla verilen steviozitolun, bağırsak kolonunda bulunan bakteriler tarafından tamamen steviole

dönüştürüldüğü sonucuna ulaşmışlardır. Domuz dışkısında tespit edilen tek bileşiğin steviol olduğu tespit edilmiştir. Bu sonucun daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olduğu belirtilmektedir. Steviol, çeşitli hayvan türlerinden ve insanlardan anaerobik koşullar altında bağırsak mikroflorasının ürettiği tek metabolit olarak bulunmuştur. Steviozitin, fareler, domuzlar ve insanlar dâhil olmak üzere test edilen tüm canlılarda bağırsak mikroflorasında hidrolize oldukları takdirde steviole metabolize olduğu belirtilmektedir (Roberts ve Renwick, 2008; Renwick ve Tarka, 2008). Yapılan bir başka çalışmada steviozit ve rebaudiozit A'nın farelerin bağırsak mikroflorasında diterpenoid aglikon grubun steviole indirgenmiş olduğu görülmüştür. Aglikon steviolün fare bağırsağı tarafından tamamen emildiği de belirtilmektedir. Steviozit, inkübasyonda iki günde steviole dönüşürken rebaudiozit A altı günde benzer yollarla steviole dönüşmektedir. Buradan anlaşıldığı üzere steviozitin hidrolizi rebaudiozit A'nın hidrolizinden daha hızlı gerçekleşmektedir (Wingard, 1980).

2.2. Tatlılandırıcılar

Herhangi bir gıda ürünün kalitesi ve insanlar tarafından tüketilebilir olması lezzet ve estetik yönü gibi bazı kriterlere bağlı olarak değişmektedir. Bu kriterleri sağlamak amacıyla gıda endüstrisi çok sayıda katkı maddesi geliştirmiştir (Briciu vd., 2010). Buna bağlı olarak çağımızın en büyük sorunlarından olan diyabet ve obezite gibi hastalıkları olan insanlar için düşük kalorili ürünler üretilmiştir. Ayrıca ucuz maliyetlerinden dolayı ve şükrozla kıyaslandığında daha az enerjiye sahip olmaları üreticiyi çeşitli tatlılandırıcılar üretmeye yönelik çalışmalara itmiştir. Diyabet ve obezite hastaları, kalori alımını azaltması ve kilo vermeye yardımcı olması açısından tatlılandırıcı kullanmaya başlamışlardır (Özdemir vd., 2014, İnanç ve Çınar, 2009).

İnsanoğlunun tatlı gıdalara olan düşkünlüğü insanlık tarihinin başlangıcına dayanmaktadır. Eski Mısır mezarları incelendiğinde bal üretimi resmedilmiş, Araplar MÖ 375 yılında şeker kamışının rafine edilmesinden söz etmişlerdir. En eski yapay tatlılandırıcı olan sakarin, 1879 yılında John Hopkins Üniversitesi'nde Conntantine Fahlberg tarafından keşfedilerek marketlerde diyabet hastaları için özel bir ürün olarak yerini almıştır. II. Dünya Savaşı esnasında şeker kıtlığı yaşanması üzerine yapay şeker ikamelerine yani tatlılandırıcılara olan teşvik artmıştır. Bu süre boyunca diyet soda şişeleri üzerinde “şeker alımını azaltmak

isteyenler için” gibi ifadeler kullanılmıştır (Kızılaslan, 2017; Yang, 2010). Aspartam ise 1965 yılında keşfedilmiştir. Sükrozla karşılaştırıldığında yaklaşık 200 kat daha tatlı olduğu ifade edilmektedir. Aspartamın metabolizması sonunda ise formaldehit, formik asit ve diketopiperazinin oluşumu meydana gelmektedir. Bu durumların varlığı yapay tatlandırıcıların insan sağlığı açısından tehdit oluşturabilir nitelikte olması sebebiyle sorgulanmaktadır (Mooradian vd., 2017).

Birçok insan şeker alımına bağlı olarak obezite hastalığının zararlarının farkındadır ve vücut ağırlığını kontrol altına almak için çaba göstermektedir. Gıda endüstrisi bu eğilime yönelik tatlandırıcıların üretimi için gelişmeler kaydetmiştir (Sardesai vd., 1991). Tatlandırıcılar; yapay tatlandırıcılar ve doğal tatlandırıcılar olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Başlıca kullanılan tatlandırıcılar Çizelge 2.3’te sunulmuştur (Özdemir vd., 2014).

Çizelge 2.3. Tatlandırıcıların sınıflandırılması ve başlıca kullanılan tatlandırıcılar (Özdemir vd., 2014).

Yapay tatlandırıcılar	Sakarin, aspartam, sukraloz, asesulfam K, neotam, siklamat, alitam
Doğal tatlandırıcılar Şeker alkoller (polioller)	Şeker otu, agave şurubu, akçaağaç şurubu, bal, melas, sorbitol, mannitol, ksilitol, eritritol, isomalt, laktitol, hidrojene nişasta hidrolizatları, yüksek fruktozlu mısır şurubu, maltitol, trehaloz, tagatoz

Doğal tatlandırıcı, yapay tatlandırıcı ve şeker alkollerin (polioller) sükroza kıyasla tatlılık derecesi Çizelge 2.4’te verilmiştir (Sardesai vd., 1991; Özdemir vd., 2014; Mooradian vd., 2017).

Çizelge 2.4. Bazı tatlılandırıcıların sükroza kıyasla tatlılık dereceleri (sükroz = 1)

Tatlılandırıcı	Tatlılık Derecesi (sükroz referans)
Advantam	20000 kat
Alitam	2000 kat
Asesülfam K	200 kat
Aspartam	160-220 kat
Dulsin	250 kat
Fruktoz	1.7 kat
Gliserol	0.6 kat
Kukurbitan	250 kat
Ksilitol	1.7 kat
Laktitol	0.4 kat
Maltitol	0.9 kat
Mannitol	0.5 kat
Monellin	2500-3000 kat
Neotam	7000-13000 kat
Osladin	3000 kat
P-4000	4000 kat
Palatinoz	0.4 kat
Pentadin	500 kat
Rebaudiozit A	400 kat
Rubusosit	114 kat
Sakarin	300 kat
Siklamat	30 kat
Sorbitol	0.5 kat
Steviozit	300 kat
Sukraloz	500 kat

2.3. Şeker Otunun Kullanım Alanları

Şeker otu bitkisinin tatlılık derecesinin aynı miktardaki sükrozla kıyaslandığında çok fazla olması, pH stabilitesinin daha iyi olması, pişirme ve fırıncılıkta ısı stabilitesine sahip olması, alkol içerisinde iyi bir şekilde çözünüyor olması ve ağızda metalik tat bırakmaması gibi birçok özelliği mevcuttur. Bu özelliklerinin yanı sıra doğal bir tatlılandırıcı olması şeker otunun değerlendirilmesi açısından oldukça önemlidir (Soliman, 1997). Şeker otunun diğer düşük kalorili tatlılandırıcılara kıyasla doğal olması, sağlık bilincine sahip tüketiciler açısından daha çok tercih edilebilir olduğunu göstermektedir. Farklı gıda ürünlerinde kullanılması, 200 °C'ye kadar dayanıklı olması ve fermente olmaması sebebiyle tüketime oldukça elverişlidir. Ayrıca organoleptik özelliklerinin iyi olduğu belirtilmektedir. Bu özellikleri neticesinde şeker otunun sükroza ikame olarak kullanılabileceği vurgulanmaktadır (Gasmalla vd., 2014a).

Şeker otunun içeriğindeki steviol glikozitler gıda endüstrisinde birçok üründe kullanılmaktadır. Alkolsüz içecekler, meyve suları, tatlılar, şekerlemeler, soslar, ekmek, bisküvi, hazır tüketimli tahıllar, turşu, yoğurt, soya sosu ve deniz ürünlerinde kullanımı oldukça yaygındır (Lemus-Mondaca vd., 2012). Özellikle Japonya, Çin, Rusya, Güney Kore, Paraguay, Arjantin, Endonezya, Malezya, Avustralya, Yeni Zelanda, Güney Amerika gibi ülkeler oldukça fazla kullanılmaktadırlar. Ayrıca şu anda Japonya ve Çin şeker otunun en geniş şekilde kullanıldığı ürün pazarına sahiptir. Daha sonra Güney Kore ve Brezilya da doğal bitkisel bir kaynak olan şeker otunu düşük kalorili tatlılandırıcı olarak pazarlamaya başlamışlardır. Avustralya ve Yeni Zelanda steviol glikozitlerin gıda endüstrisinde yer almasını onaylamışlar; ancak bunu belirli ürünlerde sunmuşlardır. ABD'deki FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) şeker otu kullanımına izin veren kurumlar arasındadır. Fransa 2009 yılında rebaudiozit A'nın tatlılandırıcı olarak kullanılmasına izin vermiştir (Yadav ve Guleria, 2012). Şeker otu ve türevi tatlılandırıcılar için yapılan düzenlemeler ise Çizelge 2.5'te verilmektedir (Kola vd., 2018).

Çizelge 2.5. Şeker otu ve türevi tatlılandırıcıların güvenliği ile ilgili bazı düzenlemeler (Kola vd., 2018)

Düzenleme Numarası	Yapılan Uygulamalar
07- 2004	Codex Alimentarius Komisyonu şeker otunun insan vücudunda güvende olduğunu kabul etmiş ve JECFA ile anlaşmaya varmıştır.
12 – 2008	FDA, rebaudiozit A'yı %95 oranında GRAS olarak kabul etmiştir. Daha sonra Avustralya, Yeni Zelanda, İsviçre, Tayvan, Fransa da rebaudiozit A'yı aynı oranda GRAS olarak kabul etmiştir.
03 - 2010	FDA, rebaudiozit A'nın %60 - %80'ni, bütün steviol glikozitlerin %90'ını GRAS olarak kabul etmiştir.
04 - 2010	EFSA, insan vücudunda steviol glikozitlerin güvenliği konusunda birtakım kısıtlamalar getirmiş ve günlük alım miktarını (ADI) 4 mg/kg olarak belirlemiştir.
07 - 2011	Avrupa Birliği, G/SPS/N/EEC/409 raporu yayınlamıştır. Komisyon yapmış olduğu düzenlemede steviol glikozitlerin kullanım yetkisini belirlemiştir. Rapora göre uzun süreli kullanımı diyabet, kardiyovasküler, hipertansiyon hastaları için iyileştirici etki göstermektedir.
06 - 2013	Türk Gıda Kodeksi, Katkı Maddeleri Yönetmeliğine göre şeker otunun Türkiye'de tatlılandırıcı olarak steviol glikozitler (E 960) adıyla kullanılmasına izin vermiştir.

Kroyer (2010), yapmış olduğu çalışmada uygulanan farklı işlem ve depolama koşulları sırasında şeker otunun stabilitesini değerlendirmiştir. Çay ve kahve gibi içeceklerde bir saat boyunca 120 °C'ye kadar iyi stabilite gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca steviozitin sulu çözelti içinde 2 - 10 pH aralığında da oldukça stabil olduğu vurgulanmıştır. Bu durum şeker otunun sıcak içeceklerdeki kullanılabilirliğini etkin kılmaktadır. Pastane ürünlerinde doğal tatlandırıcı olan şeker otu kullanımı oldukça yaygındır. Puding ve kekler çok az miktardaki toz şeker otu ile tatlandırılabilir. Pişirme işlemi sırasında steviozitte esmerleşme reaksiyonu gözlenmemiştir. Bu sebeple şeker otunun pişirme alanındaki uygulamaları genişlemektedir. Uzun raf ömrü ile ürünün kullanım süresi ve dolayısıyla elde edilen ürünlerin kalitesi de artmaktadır (De vd., 2013). Farklı yiyecek ve içeceklerde kullanılması önerilen rebaudiozit A miktarları Çizelge 2.6'da verilmiştir (Prakash vd., 2008).

Çizelge 2.6. Çeşitli gıda ürünlerinde kullanılan Rebaudiozit A miktarları (Prakash vd., 2008)

Ürün	Konsantrasyon (mg/kg veya mg/L)
Gazlı içecekler	50-600
Alkollü içecekler	50-600
Toz içecekler	200-2000
Fırın ürünleri	200-1000
Süt ürünleri	150-1000
Sakız	300-6000
Şekerlemeler	100-1000
Tahıllar	200-1000
Yenilebilir jeller	200-1000
Tedavi edici özellikteki gıda ürünleri	200-1000
İlaçlar	50-1000

2.4. Şeker Otunun İnsan Sağlığına Etkileri

Şeker otu bitkisinin geçmişi, Hindistan'a ait bir sağlık sistemi olan Ayurveda tıp sistemine kadar dayanmaktadır (Megeji vd., 2005). Şeker otu içerisindeki steviol glikozitler ve ayrıca şeker otunun diğer metabolitleri olan β -karoten, riboflavin, tiamin, çeşitli terpenler ve flavonoidler tıbbi olarak insan sağlığına katkıda bulunmaktadır. Şeker otunun diyabet, diş çürükleri, obezite, mide ve bağırsak enfeksiyonları gibi çeşitli rahatsızlıklara karşı alternatif bir tedavi yöntemi olduğu belirtilmiştir. Ayrıca kandaki şekeri ve kolesterolü düşürmeye, kanın

pıhtılaşmasına, kan damarlarının güçlenmesine katkı sağladığı ifade edilmiştir (Atteh vd., 2008; Konoshima ve Takasaki, 2002; Yadav ve Guleria, 2012).

Diabetes mellitus, hiperglisemi ve bunlara bağlı olarak insülin hormonunun yeterli düzeyde salgılanmaması dünyada yaygın şekilde görülen hastalıklar arasındadır (Gupta vd., 2013). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) diyabetli kişilerin sayısının 1980 yılında 108 milyon iken 2014 yılında 422 milyona yükseldiğini, orta ve düşük gelirli ülkelerde diyabetin daha hızlı arttığını rapor etmiştir. Ayrıca 2012 yılında 2,2 milyon kişinin ölüm sebebinin yüksek kan şekeri kaynaklı olduğu da belirtilmiştir. Yüksek kan şekere bağlı ölümlerin neredeyse yarısı 70 yaşından önce gerçekleşmektedir. Düzenli fiziksel aktivite, vücut ağırlığını korumak, sağlıklı beslenme Tip 2 diyabetin başlangıcını önlemenin ve geciktirmenin yollarıdır (WHO, 2018). Şu anda diyabet hastalığı için bitkisel tedavi yöntemleri oldukça popülerdir. Şeker otu ile yapılan alternatif tedavi yöntemi de bunlardan biridir. Ekstraktın ana bileşeni olan steviozid düşük seviyede kalori içermesi ve yüksek tatlılığa sahip olması nedeniyle az miktarlarda dahi tüketilmesi tatlılık açısından yeterli olmaktadır. Bir çalışmada şeker otu yapraklarının sulu ekstraktının glukoz toleransı üzerine etkisi araştırılmış ve üç gün boyunca altı saat ara ile kullanımından sonra şeker otunun kandaki glukoz seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Bu gözlemler şeker otunun diyabetik hastalar için tedavi edici özellikte olduğu düşüncesini güçlendirmektedir (Curi vd., 1986; Chatsudthipong ve Muanprasat, 2009).

Son yıllarda aşırı kilolu insanlar ve bunun sonucunda ortaya çıkan obezite hastalığında belirgin bir artış görülmektedir. Bu rahatsızlığın sebepleri arasında fiziksel hareketlerde yetersizlik, fazla gıda tüketimi ve aynı zamanda sağlıksız gıda alımı gibi birçok etmen sayılabilmektedir. Şeker otu yaprakları fonksiyonel bir gıda maddesi olarak kullanılabilir ve diyet uygulamalarında faydalıdır. Şeker otu kullanıldığında sindirim sistemi tarafından tamamen emilmiyor olması ve ayrıca çok az kalori içermesi şeker yerine tüketilebilir olduğunu göstermektedir. Ayrıca şeker otunun düşük kalorili bir tatlandırıcı olması, bakteriyostatik ve bakteriyosidal özelliklere sahip olması diş çürümesi ve diş eti iltihabını önleyerek ağız ve diş sağlığında yararlı etkileri olduğu belirtilmektedir (Gupta vd., 2013). Şeker otu ekstraktının tüketimi sonucunda kolesterol, trigliserit, LDL seviyelerinin önemli ölçüde azaldığı, HDL seviyesinin ise yükseldiği gözlenmiştir. Sonuç olarak

şeker otu ekstraktının kardiyovasküler hastalıklara hipolipidemik etki gösterdiği belirtilmektedir (Goyal vd., 2010).

2.4.1. Şeker Otu Günlük Alım Miktarı

Kabul edilebilir günlük alım miktarı, insanların yaşamları süresince sağlık açısından dikkate alınacak kadar risk taşımayan, yiyecek ve içeceklerin günlük olarak tüketebilecekleri madde miktarıdır. Birçok kuruluş, yüksek saflıktaki steviol glikozitlerin güvenliğini inceleyen 200’den fazla hakemli araştırmayı titizlikle değerlendirmiştir (Ashwell, 2015). Dünyada bilim insanlarının yaptıkları araştırmalar sonucunda şeker otunun tatlılandırıcı olarak tüketilmesinin her yaştan insan için güvenli olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Şeker otu yaprağındaki steviozid, rebaudiozid A ve diğer steviol glikozitler ABD’de Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından güvenli bir gıda takviyesi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca JECFA mevcut tüm araştırmaların bilimsel incelemesini yürütmüştür. Sonuç olarak ABD ve Avrupa’da saf steviol glikozitlerin gıda ve içeceklerde kullanılmasının hiçbir sakıncası olmadığını bildirmişlerdir. Ancak şeker otunun fazla tüketilmesi durumunda düşük tansiyon ve hipoglisemik etki yaratabileceği belirtilerek steviol glikozitlerin günlük alım dozunun kg insan ağırlığı başına 4 mg olarak kabul edildiği rapor edilmiştir (Maki vd., 2008; Boileau vd., 2012; Gupta vd., 2013; Pawar vd., 2013; Yücesan vd., 2016). 82. JECFA Kimyasal ve Teknik Değerlendirme, birçok ürün için günlük kullanılabilir limitleri belirlemiştir. Bu ürünlerden bazıları Çizelge 2.7’de sunulmuştur (Wallin, 2016).

Çizelge 2.7. Steviol glikozitlerin günlük tüketilme limitleri (mg/kg) (Wallin, 2016)

Gıda Ürünü	Kullanılabilir Limit (mg/kg)
Meyve suları	600
Alkolsüz içecekler	600
Tatlılar	500
Yoğurt	500
Şekerleme	500
Soslar	1000
Turşu	1000
Tatlı mısır	200
Ekmek	160
Bisküvi	300

2.5. Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitki hücreleri fizyolojik ve biyokimyasal özellik gösteren çok sayıda doğal bileşiği sentezlemektedir (Starmans ve Nijhuis, 1996). Binlerce yıldır insanlar, hastalıkları hafifletmek veya tedavi etmek için bitkisel kaynakları kullanmaktadır. Bitkiler tıp alanında ve diğer uygulamalarda potansiyel kaynak olarak görülerek çeşitli kullanım alanları için doğal bileşik kaynağı oluşturabilmektedir. Bitkiler; yapraklar, çiçekler, kabuk, tohumlar, meyveler kök vb. gibi kısımlarda biriken alkaloidler, steroidler, glikozitler, uçucu yağlar, reçineler, fenoller, flavonoidler gibi birçok aktif bileşik içerebilmektedir. Bu bileşenlerin ekstraksiyonu diyet takviyeleri, nutrasötikler, farmasötik ürünler ve kozmetik ürünlerinin hazırlanmasında ilk adım olarak görülmektedir (Gupta vd, 2012).

Ekstraksiyon işlemi fenolik bileşiklerin izolasyonunda, tanımlanmasında ve kullanılmasında çok önemli bir basamaktır ve birçok ekstraksiyon yöntemi mevcuttur. Literatür incelendiğinde çok sayıda çalışmada meyve, sebze, şarap, çay, kahve, tahıl gibi birçok bitki türevli materyallerden ekstraksiyon işlemleri ve analizleri gerçekleştirilmiştir (Ignat ve Popa, 2011). Ekstraksiyon ile belirlenen prosedürler uygulanarak çözücüler yardımıyla bitkinin aktif bileşenleri ayrılmaktadır. Ekstraksiyonun tüm amacı, çözünmeyen hücresel kalıntıyı ardında bırakarak çözünebilir bitki metabolitlerini elde etmektir (Azwanida, 2015). Yapılan bir ekstraksiyon işleminin kalitesi, başlangıç materyali olarak kullanılan bitkinin bölümleri, kullanılan çözücü, ekstraksiyon koşulları gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ekstraksiyonda yüksek verimlilik elde etmek amacıyla araştırmacılar verimli ekstraksiyon yöntemleri bulmak için büyük çaba sarf etmişler ve tipik bir ekstraksiyon işleminin aşağıdaki adımları içerebileceğini belirtmişlerdir (Gupta vd., 2012):

1. Bitki materyalinin toplanması
2. Boyut küçültme işlemi
3. Ekstraksiyon
4. Filtrasyon
5. Saf ve konsantre ürün elde edilmesi
6. Kurutma ve sulandırma işlemi

Kullanılan bitki materyaline uygun olacak şekilde ekstraksiyon yöntemi seçilir ve tüm bu basamaklar uygulanır. Son yıllarda sentetik ve organik kimyasalların kullanımının azalması, işlem süresinin kısılması daha iyi verimle birlikte kalitenin yüksek olması için çevre dostu teknikler kullanılmaktadır. Bitki materyalinden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon verimini artırmak için ultrases, vurgulu elektrik alan, enzimatik ekstraksiyon, mikrodalga, ohmik ısıtma, süperkritik akışkan gibi birçok yöntem geliştirilmiştir (Azmir vd., 2013).

2.5.1. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi

Bitki materyalinden değerli bileşiklerin elde edilmesi ile ilgili yapılan bilimsel araştırmaların geçmişi 18. yüzyıla kadar ve kokuların çiçeklerden izolasyonuna dayanmaktadır. Anfloraj adı verilen bir teknikte yağlar çiçeklerle doğrudan temas halinde tutularak kokuları matrisinden çektiği görülmüştür. Günümüzde ise ekstraksiyon işlemleri en basit olarak evlerde kahve ve çay yapımında uygulanan çözücü yoluyla ekstraksiyon işlemidir. Burada yapılan ekstraksiyon işleminde tat bileşenlerinin ve renklendirici ajanların bitki materyalinden çekip çıkarılması için sıcak su kullanılmaktadır. Geriye kalan katı kalıntı ise filtrelendir ve elde edilen ekstrakt tüketime hazırdır (Starmans ve Nijhuis, 1996). Yapılan tüm ekstraksiyon tekniklerinin amacı, çözünmeyen hücresel kalıntıyı geride bırakarak çözünür bitki metabolitlerini katı matrisinden ayırmaktır. Ekstraksiyon işlemi ile ekstraktlardan alkaloidler, glikozitler, fenolikler, terpenoidler ve flavonoidler gibi birçok bileşen elde edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan ekstraksiyon tekniklerinden biri çözücü ekstraksiyon yöntemidir (Azwanida, 2015).

Çözücü ekstraksiyon işlemi, kullanım kolaylıkları, verim ve geniş uygulanabilirlik nedeniyle bitki materyallerinden ekstraktlar hazırlamak için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Ekstraksiyon verimi genellikle farklı polaritelere sahip çözücü tiplerine, ekstraksiyon süresine, sıcaklığa, numunenin çözücü oranına, kullanılan bitki materyalinin kimyasal kompozisyonuna ayrıca fiziksel özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (Stalikas, 2007; Dai ve Mumper, 2010). Çözücü ekstraksiyon yönteminde en yaygın olarak kullanılan çözücüler asitlendirilmiş etanol ve metanoldür. Etanol, metanol ve diğer birçok çözücünün kullanıldığı ekstraksiyonlar ile ilgili çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır. Metanol, etanol, aseton, etil asetat ve bunların kombinasyonları gibi çözücüler ile farklı sulu konsantrasyonları fenoliklerin bitki materyalinden ekstraksiyonu için

kullanılmıştır. Özellikle metanolün düşük moleköl ağırlıklı polifenollerin ekstraksiyonunda daha verimli olduğu, yüksek moleköl ağırlıklı flavonellerin ise sulu aseton çözeltisi ile daha iyi ayrıldığı belirtilmektedir. Etanol ile yapılan ekstraksiyonda polifenollerin daha verimli bir şekilde elde edildiği görülmektedir. Ayrıca antosiyanin açısından zengin fenolik ekstraktlar hazırlarken asitli organik çözücülerin (daha çok metanol ve etanol) kullanımı oldukça fazladır. Bu çözücü sistemleri hücre zarlarını yıkar aynı zamanda biyoaktif bileşenleri çözerek stabilize eder (Ignat ve Popa, 2011; Dai ve Mumper, 2010).

2.5.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon İşlemi

Mikrodalgalar, radar teknolojisinin geliştirilmesinden sonra II. Dünya Savaşı'ndan bu yana kullanılmış ve daha sonra mikrodalga fırınlar ile ilk ticari uygulamalar başlamıştır. Mikrodalga teknolojisinin laboratuvarlarda bir ısıtma kaynağı olarak kullanılması 1970'li yılların sonuna doğru başlamış ve asitlerin ekstraksiyonunda uygulanmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun gelişimi ilk önce Ganzler ve çalışma arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Kaufmann ve Christen, 2002). Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi biyolojik olarak aktif bileşenlerin farklı bitki materyallerinden çıkarılması için basit, çevre dostu, ekonomik bir tekniktir (Gupta vd., 2012). Mikrodalgalar 300 MHz ile 300 GHz frekans aralığında çalışan elektromanyetik alanlara sahip bir teknolojidir. Mikrodalgalar elektrik alan ve manyetik alan olmak üzere birbirine dik olan iki salınım alanından oluşmaktadır. Elektromanyetik enerji, iyonik iletim ve dipol rotasyon mekanizmalarının ardından ısıya dönüşmektedir. İyonik iletim mekanizması sırasında ortamın akış iyonuna direnci sebebiyle ısı üretilir. Moleküller arasında çarpışma oluşmakta ve bunun sonucunda ısı açığa çıkmaktadır (Azmir vd., 2013).

Mikrodalga destekli ekstraksiyonun ekstraksiyon mekanizması üzerine üç adımı içermesi beklenmektedir. İlk olarak çözünen maddelerin yüksek sıcaklık ve basınç altında örnek matrisin aktif bölgelerinden ayrılması, ikinci adımda çözücünün örnek matrisi boyunca difüzyonunun gerçekleşmesi, üçüncü adımda ise çözünen maddelerin örnek matrisinden ayrılarak çözücüye bırakılması olarak açıklanmaktadır (Alupului vd., 2012). Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde verimi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Ekstraksiyon için belirlenen frekans, işlem süresini etkilemektedir. Mikrodalga gücünün artmasıyla birlikte aynı miktarda bulunan bileşenin ekstraksiyon hızında genel olarak bir artış

gözenmektedir. Mikrodalga gücüne bağlı sıcaklık etkeni ekstraksiyon işlemi sırasında bitkisel materyalin içinde bulunduğu çözücü maddenin sıcaklığı ile doğru orantılı olarak ilişkilendirilebilir. Gıdanın kütlesi de mikrodalga destekli ekstraksiyon verimini etkileyen bir diğer faktördür. Bir başka etken ise bitki materyali içinde bulunan su veya nemdir. Bitki içinde bulunan suyun bağlı veya serbest halde halde olması mikrodalga destekli ekstraksiyon verimini etkilemektedir (Özer vd., 2018).

2.5.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemi

Ultrases teknolojisinin geçmişi 1880’li yıllara dayanmaktadır. Çeşitli uygulamalara ve birçok gelişmeye rağmen ultrases, hala yeni bir teknoloji olarak kabul edilmektedir. Altmış yıl önce gıdaları karakterize etmek için düşük yoğunluklu ultrases yöntemleri kullanılmaktaydı; ancak son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda ultrasesin birçok alanda kullanıldığı görülmektedir (Dolatowski vd., 2007). Ultrases, dalga boyu 20 kHz ile 1 GHz aralığındaki ses dalgalarına sahip frekanslardır (Feng vd., 2011). Düşük enerjili, yüksek dalga boylarındaki ultrases uygulamaları fiziksel, mekanik, kimyasal etkiler üretebilmekte ve daha çok medikal alanda kullanılmaktadır. Yüksek enerjili (10-1000 W), düşük dalga boylarındaki (20 kHz ve 100 KHz arasındaki frekanslar) uygulamalar ise daha çok gıda endüstrisinde emülsiyon üretmek, mikroorganizmalarda hücre duvarı tahribatı sağlamak, homojenizasyon sağlamak, enzim ve mikrobiyal inaktivasyon gibi etkiler meydana getirmektedir (de São José vd., 2014).

Ultrases teknolojisinin etkisi kavitasyonla ilişkilendirilmektedir. Ultrases dalgaları sıvı bir ortamdan geçerken mekanik titreşimler ve akış meydana gelmektedir. Titreşim ve akış sayesinde çok küçük baloncuklar ve boşluklar meydana gelmekte yani kavitasyon oluşmaktadır. Bu baloncuklar sönmüledikleri anda o noktada lokal olarak yüksek sıcaklık ve basınç oluşmaktadır. Oluşan bu ani değişimler farklı etkiler yaratabilmektedir (Tiwari vd., 2012; de São José vd., 2014). Ultrases teknolojisi gıda endüstrisinde fiziksel ve mekanik işlemleri geliştirme amacıyla birçok alanda kullanılmaktadır. Örneğin filtrasyon, marine etme, kesme, homojenizasyon, pişirme, et yumuşatma, degaz, kurutma gibi alanlarda kullanılırken bu tez çalışmasında ekstraksiyon amacıyla kullanılmaktadır. Ultrases destekli ekstraksiyon ile bitkilerde bulunan hücre duvarlarının çözücü

penetrasyonu ile birlikte istenen maddelerin geçişi hızlı ve verimli bir şekilde sağlanmaktadır (Tiwari vd., 2012).

Yapılan birçok çalışmada ultrases destekli ekstraksiyon ile bitki materyalinden flavonlar, polifenoller, antosiyaninler, aromatik bileşikler, polisakkaritler, bitkisel yağlar, protein ve biyoaktif bileşenlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ekstraksiyon işlemleri sırasında verim artışı, ekstraksiyon suresinde azalma, daha yüksek işlem hacmi elde etmek gibi birçok avantaj yer almaktadır (Vilkhu vd., 2008).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında, kullanılan *Stevia rebaudiana* (Şeker otu) bitki materyali olarak Balıkesir’de bulunan Burhaniye Stevia Bahçesi’nden temin edilmiştir. Saksılarda yetiştirilen ve budama yöntemiyle toplanan şeker otu bitkisinin yaprakları çiçek kısmından kök tarafına doğru saplarından sıyrılarak ayıklanmıştır. Delikli kasalara alınan taze yapraklar 30 dakika boyunca güneş altında bekletilerek mevcut neminin düşürülmesi sağlanmıştır. Ardından bir saat boyunca gölgede tutularak kasalara aktarılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Şeker otu bahçesi ve gövdesinden ayrılan yapraklar

Tedarik edilen şeker otu Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Gıda Mühendisliği laboratuvarlarına taşınmış ve ayıklanan yapraklar fanlı tepsili kurutucuda 65 °C sıcaklıkta, 1,5 m/s hava akış hızında, <%10 bağıl nemde ve iki saat süre ile kurutularak nem içeriği düşürülmüştür. Kurutulan yapraklar tek tek saplarından ayıklanmıştır. Son olarak kahve-baharat değirmeninde (Sinbo) öğütülerek partikül boyutu küçültülmüştür. Öğütülen şeker otu, tez çalışması boyunca kilitli poşetlerde +4 °C’de buzdolabında depolanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Şeker otunda kurutma ve ayıklama sonrası öğütme ve paketlenme işlemleri

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Ekstraksiyon işlemleri ve sonraki analizler için kullanılan tüm kimyasallar; sodyum hidroksit (Tekkim Kimya-100418163001), hidroklorik asit (Merck – 1.00317.2501), etanol (Tekkim Kimya – 020118185001), Folin - Ciocalteu ayracı (Merck – 1.09001.0500), sodyum karbonat (Merck – 1.06392.1000), 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) (Roche Diagnostics – 10102946001), potasyum persülfat (Merck – 1.05091.1000), monobazik sodyum fosfat (Sigma-Aldrich – S0751-100G), dibazik sodyum fosfat (Sigma-Aldrich – 04272-1KG), sodyum klorür (Merck – 1.06404.1000), sodyum nitrit (Merck – 1.06549.0100), alüminyum klorür heksahidrat (Merck – 1.01084.1000), rebaudiozit A (Extrasynthese - 3720 S), steviozit (Extrasynthese- 3725 S), asetonitril (Merck – 1.00030.2500), HPLC su (Sigma- Aldrich – 102024527), formik asit (Carlo Erba – 405792).

3.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Su banyosu (Lab. Companion BW- 20G, Güney Kore), etüv (Lab. Companion ON-11E, Güney Kore), kül fırını (MagmaTherm MT1110-E4, Türkiye), santrifüj (Centurion Scientific K241, Birleşik Krallık), UV-VIS spektrofotometre (Shimadzu V-1800, Japonya), ultrases cihazı (Ermaksan ULT 50-S, Türkiye), mikrodalga ekstraktör (Sineo Mas II Plus, Şangay), HPLC (Shimadzu, Japonya) HPLC kolon (Hichrom INODS3-250D, Birleşik Krallık).

3.4. Yöntem

Bu tez çalışması kapsamında farklı ekstraksiyon yöntemleri ile çalışılmış ve kullanılan yöntemlerin ekstraksiyon verimine olan etkileri incelenmiştir. Yapılan analizler ile her bir yöntem için en uygun ekstraksiyon koşulları belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında çözücü ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrases destekli ekstraksiyon olmak üzere üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile çalışılarak bu işlemlerin ekstraksiyon verimine etkileri incelenmiştir. Bu yöntemlerin her birinde yanıt yüzey metodu (RSM) kullanılmıştır. Farklı ekstraksiyon tekniklerinin optimum koşulları ile çalışılarak şeker otu bitkisindeki steviol glikozitlerin (rebaudiozit A ve steviozit) miktarları, toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antioksidan kapasite (ABTS yöntemi) değeri belirlenmiştir.

3.4.1. Ekstraksiyon İşlemleri

Kurutulduktan sonra öğütülmüş şeker otu yapraklarından steviol glikozitlerin ve biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon işlemi çözücü ekstraksiyon yöntemi, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon olarak üç farklı yöntemle gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.1. Çözücü ekstraksiyon yöntemi

Çözücü ekstraksiyon yöntemi işleminde yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak merkezi tümleşik tasarım ile elde edilen deneme planında bağımsız değişkenler EtOH konsantrasyonu (%0 – 100), süre (10 – 120 dk.), sıcaklık (25 – 55 °C) ve çözücü oranı (10 – 120 mL/g) olmuştur. İlk olarak belirlenen orandaki EtOH konsantrasyonuna sahip ve %0,1'lik HCl ile çözeltiler hazırlanmıştır. Ardından kapaklı cam şişelere alınan çözücüler (100 mL) su banyosunda yedi dk. boyunca belirlenen sıcaklığa ısıtılmıştır. Daha sonra deneme planında belirtilen çözücü oranına bağlı olarak istenen miktarda tartılan öğütülmüş şeker otu ısıtılan çözelti içine eklenmiştir. Tekrar su banyosuna alınan şişeler 3 dk.'da bir çalkalama yapılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş ve belirlenen süre sonunda su banyosundan alınmıştır. Ekstaktlar falkon tüplere alınarak 6000 rpm ve 5 dk. süre ile santrifüjlenmiştir (Centurion Scientific K241, Birleşik Krallık). Santrifüjlenen örneklerin üst fazı alınarak falkon tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.3). Hazırlanan ekstraktlar analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

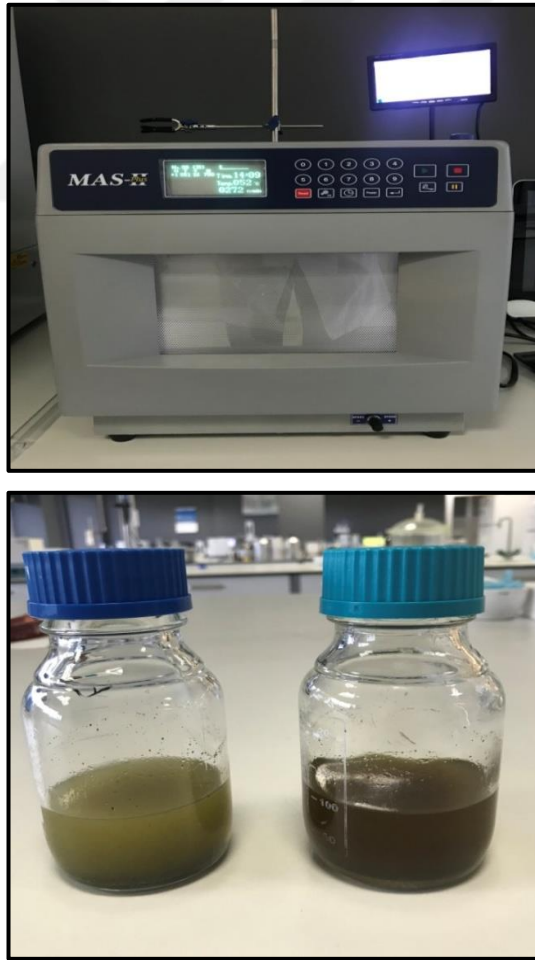


Şekil 3.3. Çözücü ekstraksiyon yöntemi ve santrifüj işlemi sonrasında elde edilen ekstraktlar

3.4.1.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemlerinde işlem parametrelerinin etkileri RSM ile belirlenmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde kullanılacak parametreler çözücü ekstraksiyon yöntemi sonrasında belirlenen sabit EtOH konsantrasyonu ve çözücü oranında gerçekleştirilmiştir. Çözücü oranına göre

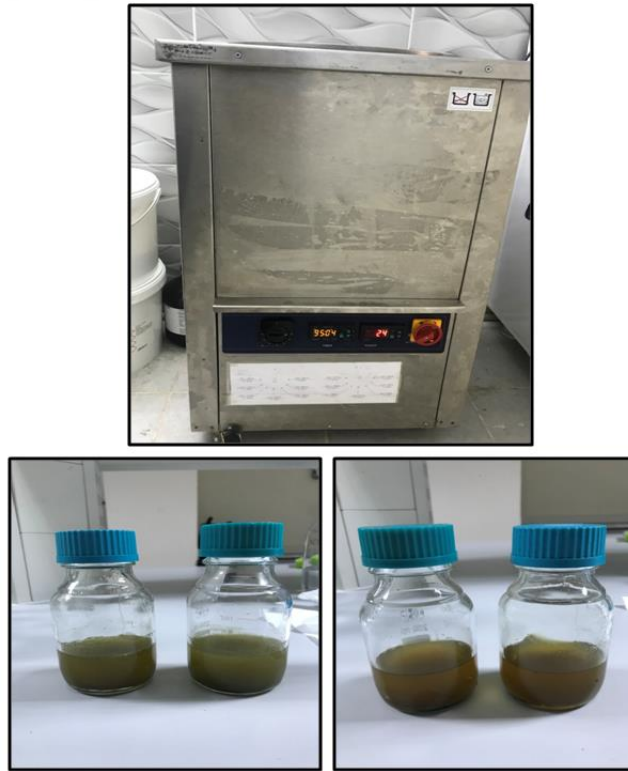
belirlenen miktarda tartılan öğütülmüş şeker otu kapaklı cam şişeye aktarılmış ve üzerine 100 mL EtOH çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra içine manyetik balık konularak kapağı kapatılmıştır (Şekil 3.4). Kapaklı cam şişe mikrodalga ekstraktöre (Sineo Mas II Plus, Şangay) yerleştirildikten sonra deneme planına bağlı olarak farklı zaman (1 – 25 dk.), farklı sıcaklıklar (20 – 55 °C), sabit güçte (700 W) ve 250 rpm’de ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İşlem sonrasında hızlı bir şekilde falkon tüplere aktarılan ekstrakt 6000 rpm, 5 dk. süre ile santrifüjlenmiştir. Son olarak elde edilen süpernatant kısım pipetle alınarak falkon tüplere aktarılmıştır. Elde edilen ekstraktlar analizler gerçekleştirilene kadar -18 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.4. Mikrodalga ekstraktör, ekstraktların mikrodalga işlem öncesi ve sonrası görünümü

3.4.1.3. Ultrases destekli ekstraksiyon

Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde bağımsız değişkenlerin etkisi RSM kullanılarak belirlenmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde EtOH konsantrasyonu ve çözücü oranı bir önceki çalışma baz alınarak sabit tutulmuştur. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde ilk aşamada çözücü oranına bağlı olarak öğütülmüş şeker otu tartılmıştır. Kapaklı cam şişelere aktarılan şeker otu üzerine çözelti eklenmiştir. Ultrases cihazına 5 L saf su eklenerek deneme planına göre istenilen parametreler ayarlanmıştır. Hemen ardından şişeler ultrases cihazına (Şekil 3.5) yerleştirilmiştir. Deneme planında oluşturulan farklı sıcaklıklar (20 – 55 °C), farklı süreler (10 – 50 dk.) ve 540 W sabit güçte ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İşlemler sonunda çözelti hızlı bir şekilde falkon tüplere aktarılmıştır. Santrifüjde 6000 rpm, 5 dk. süre ile santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak üst faz bir diğer falkon tüpe aktarılmış ve elde edilen örnekler analizler gerçekleşene kadar -18 °C’de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5. Ultrases destekli ekstraksiyon, ekstraktların ultrases işleminden önceki ve sonraki görünümü

3.4.2. Şeker Otu Ekstraktlarına Uygulanan Analizler

Çözücü ekstraksiyon yöntemi, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen şeker otu ekstraktlarına HPLC ile steviol glikozit (rebaudiozit A ve steviozit) miktarı, toplam fenolik madde, toplam flavonoid, antioksidan kapasite (ABTS yöntemi) ve LC/Q-TOF/MS analizleri yapılmıştır.

3.4.2.1. Toplam kuru madde miktarı

Toplam kuru madde miktarı analizi için ilk aşama kullanılacak olan tartım kaplarını sabit tartıma getirmektir. Bunun için tartım kapları etüvde (Lab. Companion ON-11E, Güney Kore) 105 °C’de iki saat süre boyunca tutulmuş ardından desikatöre alınarak soğutulmuştur. Soğutulan tartım kaplarının darası alınarak her birine $5 \pm 0,01$ g tartılan öğütülmüş şeker otu eklenmiştir. Etüve alınan örnekler 105 °C’de sabit tartıma ulaşana kadar bekletilmiş (Şekil 3.6) daha sonra desikatörde soğutularak ve son tartımlar alınarak kuru madde miktarı %KM cinsinden aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (AOAC 1998).

$$\%KM = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] \times 100$$

m_0 : Tartım kabı darası (g)

m_1 : Kurutma öncesi tartım kabı darası + örnek ağırlığı (g)

m_2 : Kurutma sonrası tartım kabı darası + örnek ağırlığı (g)



Şekil 3.6. Toplam kuru madde analizi sonrası sabit tartıma ulaşmış şeker otu

3.4.2.2. Toplam mineral (köl) miktarı

Toplam mineral (köl) miktarı tayini AOAC (1988) yöntemi baz alınarak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak krezeler 105 °C’de sabit tartıma ulaşmaları için iki saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Desikatöre alınan krezeler soğutulularak darası alınmıştır. Ardından her bir krezeye $0,5 \pm 0,01$ g örnek tartılarak kül fırınında (MagmaTherm MT1110-E4, Türkiye) kademeli olarak sıcaklığı artırılarak 550 °C’de 6 saat yakılmasının ardından desikatörde soğutulmuştur (Şekil 3.7). Arda kalan ağırlık üzerinden toplam mineral (köl) miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır.

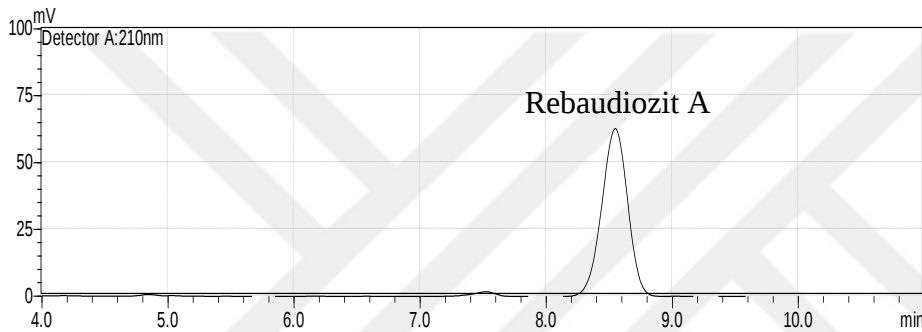


Şekil 3.7. Toplam mineral (köl) miktarı analizi sonrası sabit tartıma ulaşmış şeker otu

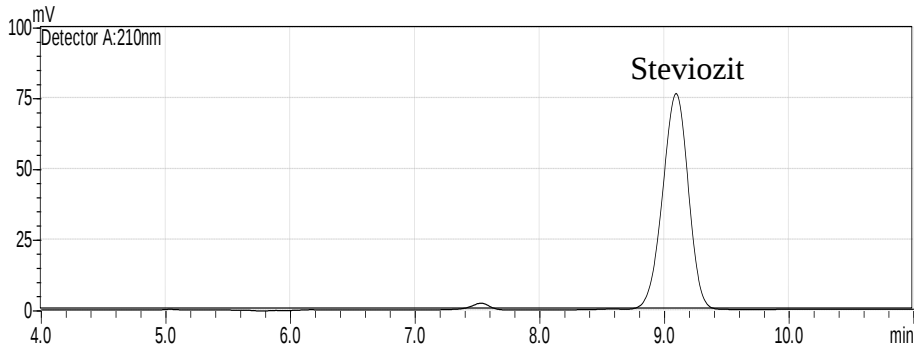
3.4.2.3. Steviol glikozitlerin (Rebaudiozit A ve Steviozit) miktarlarının HPLC ile belirlenmesi

Steviol glikozitlerin miktarlarının belirlenmesi HPLC ile Jentzer vd. (2015)’nin önerdiği metoda göre yapılmıştır. Çözücü ekstraksiyon yöntemi, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon sonucunda elde edilen tüm ekstraktlar 0,45 µm’lik filtreden geçirilerek viallere aktarılmıştır. HPLC kolonu ve çalışma koşulları ise şu şekildedir: Hichrom ODS-3 kolon (4,6 mm x 250 mm x 5 µm), 210 nm dalga boyunda UV dedektör, degazer, pompa, 40 °C kolon sıcaklığı, 1 mL/dk akış hızı, 20 µL enjeksiyon miktarı ve 12 dk. analiz süresi ayrıca mobil faz ise asetonitril:su (31:69 v/v) olacak şekilde %0,1’lik formik asit ile birlikte hazırlanmıştır (pH: 2,3). Rebaudiozit A ve steviozit standartları farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (200, 150, 100, 50, 25, 10 ppm) kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Rebaudiozit A ve steviozit için 200 ppm

konsantrasyondaki örnek kromatogramları sırasıyla Şekil 3.8 ve Şekil 3.9’da sunulmuştur. Örnek verilen standart kromatogramlar incelendiğinde rebaudiozit A ve steviozit için alıkonma sürelerinin sırasıyla 8.5 dk. ve 9.1 dk. olduğu belirlenmiştir. Rebaudiozit A ve steviozit için oluşturulan kalibrasyon eğrileri sırasıyla Ek 1 ve Ek 2’de verilmiştir.



Şekil 3.8. Rebaudiozit A standardı için kromatogram örneği



Şekil 3.9. Steviozit standardı için kromatogram örneği

3.4.2.4. Toplam fenolik madde miktarı

Toplam fenolik madde miktarı analizi, Sarkis vd. (2014)’nin yöntemi göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 2,37 mL saf su eklenen tüplere 30 µL elde edilen ekstraktlardan aktarılmış olup 150 µL Folin - Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 8 dk. boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra 450 µL doygun sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi eklenmiş ve vortekslenerek karıştırılması sağlanmıştır. Etüve alınan örnekler 40 °C sıcaklıkta 30 dk. süre boyunca bekletilmiştir. Son olarak örneklerin UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu V-

1800, Japonya) 750 nm dalga boyunda absorbens değeri okunmuştur. Elde edilen absorbens değerleri ve gallik asit standart eğrisi kullanılarak sonuçlar “mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g örnek” olarak hesaplanmıştır. Toplam fenolik madde miktarı analizi için oluşturulan kalibrasyon eğrisi Ek 3’te verilmiştir.

3.4.2.5. Toplam flavonoid miktarı

Toplam flavonoid miktarı analizi, Kim vd. (2003)’nin belirlediği yönteme göre yapılmıştır. İlk olarak 1:10 v/v oranında seyreltilmiş ekstraktlardan 1 mL eklenmiştir. Üzerine 0,3 mL %5’lik NaNO₂ (sodyum nitrit) eklenerek 5 dk. boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonraki aşamada 0,3 mL %10’luk AlCl₃.6H₂O (alüminyum klorür heksahidrat) eklendikten sonra ise 1 dk. boyunca bekletilmiştir. Ardından 2 mL 1 M NaOH (sodyum hidroksit) çözeltisi eklenmiş ve son olarak 2,4 mL saf su koyularak 510 nm dalga boyunda UV-VIS spektrofotometrede absorbens ölçümü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen absorbens değerleri kateşinin standart olarak kullanıldığı kalibrasyon eğrisi ile hesaplanarak mg KE/g olarak ifade edilmiştir. Toplam flavonoid değeri için kullanılan kalibrasyon eğrisi Ek 4’te verilmiştir.

3.4.2.6. Antioksidan kapasite

ABTS yöntemi ile antioksidan kapasite analizi, Cemeroğlu (2010)’na göre yapılmıştır. ABTS radikalinin hazırlanması için ilk olarak 0,0384 g ABTS tartılıp bir miktar saf suda çözündürülerek 10 mL’lik bir balon jojeye aktarılmıştır. Ayrıca hazırlanan 12,25 mM potasyum persülfat çözeltisinden 2 mL alınarak ilave edilmiştir. Ardından balon joje, saf su ile hacmine tamamlanmıştır. Elde edilen karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 12 – 16 saat bekletilmiş ve böylelikle, 2,45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM ABTS radikal çözeltisi elde edilmiştir. PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi; pH 7,4) çözeltisinin hazırlanması için öncelikle ise 19 mL 0,2 M monobazik sodyum fosfat çözeltisi ile 81 mL 0,2 M dibazik sodyum fosfat çözeltisi karıştırılmıştır. Ardından bu karışıma 8,77 g sodyum klorür eklenip, 1 L’lik balon joje içerisinde saf su ile hacmine tamamlanmıştır.

Analiz için öncelikle ABTS radikal çözeltisi, PBS çözeltisi ile UV-VIS spektrofotometrede (Shimadzu V-1800, Japonya) 734 nm dalga boyunda absorbens değeri 0,700 (±0,02) olana kadar seyreltilmiştir. Seyreltilen ABTS radikal çözeltisinden spektrofotometre küvetine 2,98 mL aktarılıp, başlangıç (0.

dk.) absorbans değeri not edilmiştir. Ardından radikalın bulunduğu küvete 1:10 (v/v) oranında seyreltilmiş 20 µL ekstrakt ilave edilip süre başlatılmıştır. Altı dakika sonunda 734 nm dalga boyundaki absorbans değeri (6. dk.) kaydedilip yüzde inhibisyon değeri, aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar troloks standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi ile µmol TE/g olarak ifade edilmiştir (Ek 5).

$$\% \text{ inhibisyon} = [((0. \text{ dk. absorbans}) - (6. \text{ dk. absorbans})) / (0. \text{ dk. absorbans})] \times 100$$

3.4.2.7. LC/Q-TOF/MS analizi (Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi)

LC/Q-TOF/MS cihazı ile gerçekleştirilen analiz, ekstraktların iyonlaştırılarak kuadropol ve uçuş zamanlı dedektörler yardımıyla kalitatif olarak gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırım; ikili pompa, gaz giderici, otomatik örnek dağıtıcı ile donatılmış bir HPLC Agilent 1260 Infinity serisi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak Sengel vd. (2018)'ne göre gerçekleştirilmiştir. Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 50 mm x 2.7 µm) (Agilent) kolonu bileşikleri ayırmak için tercih edilmiştir. Mobil fazlar tabloda verilen basamaklara dayanan gradient yıkama kullanılarak su ve %0,1 formik asit karışımı mobil faz A ve asetronitril mobil faz B olarak kullanılmıştır. Mobil faz akış diyagramı Çizelge 3.1'de sunulmuştur. Kolon sıcaklığı 35 °C, enjekte edilen örnek hacmi 3 µL, akış hızı 0,4 mL/dk. olarak belirlenmiştir. MS analizi kurutucu gaz akışı 14,0 L/dk., nebilözör gaz basıncı 35 psi; kurutucu gaz sıcaklığı 290 °C; sheath gaz sıcaklığı 400 °C, sheath gaz akışı 12 L/dk. azotta pozitif iyon donatılmış bir Agilent 6550 Q-TOF/MS kullanılarak yürütülmüştür. Kütle spektrumları 50 – 1700 m/z'lik bir kütle aralığında pozitif ve negatif iyonizasyon modunda kaydedilmiştir. Entegrasyon ve veri detaylandırma “MassHunter Workstation” yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agilent METLIN Metabolomiks veri tabanı, kütüphaneye tam kütle kişisel bileşik veri tabanı ve kütüphanesi (METLIN_AM_PCDL) analitleri tanımlamada kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. LC/Q-TOF/MS analizi mobil faz akış diyagramı

Süre (dk.)	Mobil Faz
0	%5 B
8	%15 B
10	%20 B
13	%25 B
18	%30 B
20	%45 B
24	%60 B
27	%80 B
30	%90 B
32	%5 B
3	Şartlanma döngüsü

3.5. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiki Analizler

Verilerin istatistiki değerlendirilmesi SPSS paket programı (SPSS 7.0, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen verilerde, sonuçlar üzerine parametrelerin etkisi varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılık ($P<0,05$) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Optimizasyon, Design-Expert (Design-Expert 7.0, USA) adlı istatistik programı kullanılarak yanıt yüzey metodu (Response Surface Methodology, RSM) uygulanarak yapılmıştır. Deneysel veriler ikinci derece polinom modeline örtüştürülmüş ve regresyon katsayıları çoklu doğrusal regresyon ile elde edilmiştir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Burada Y tahmin edilen bağımlı değişken; X_i ve X_j değerini etkileyen bağımsız değişkenler ($i \neq j$); β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} sırasıyla kesişim, doğrusal, ikinci dereceden ve etkileşim terimlerinin regresyon katsayılarıdır; k ise değişken sayısını ifade etmektedir.

Modelin doğruluğu, programın ANOVA çıktıları olan uyum eksikliği (lack of fit), uyum katsayısı (R^2) ve Fisher test değerine (F-değeri) göre değerlendirilmiştir

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. *Stevia rebaudiana* (Şeker otu) Bitkisine Ekstraksiyon İşlemleri Öncesi Yapılan Analizler

Çalışmada kullanılan ayıklanmış, kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otu bitkisine, ekstraksiyon işlemleri öncesinde toplam kuru madde (TKM) analizi ve toplam mineral (kül) analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otunun TKM içeriğinin %93,6 olduğu saptanmıştır. Kurutulmuş şeker otu yapraklarında TKM miktarının belirlendiği çalışmalar incelendiğinde; %94,6 (Abou-Arab vd., 2010), %93 (Kovačević vd., 2018), %89,3 – 95,5 (Gasmalla vd., 2014a), %87 – 90 (Téllez vd., 2018), %93,15 - 98,77 (Lemus-Mondaca vd., 2016) aralıklarında TKM miktarı tespit edildiği ve bu çalışmada elde edilen TKM miktarıyla karşılaştırılabilir olduğu anlaşılmaktadır. Bir başka araştırmada şeker otunun güneş (açık hava), etüv ve mikrodalga ile kurutulması sonucunda TKM miktarlarının sırasıyla; %89,27, %92,54, %95,55 olarak elde edildiği bildirilmiştir (Gasmalla vd., 2014b).

Çizelge 4.1 incelendiğinde kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otundaki toplam mineral (kül) içeriği %10,9 olarak belirlenmiştir. Khiraoui vd. (2017), tarafından yapılan çalışmada Fas’da altı farklı bölgeden hasat edilen şeker otu yaprakları kurutulmuş ve toplam mineral (kül) miktarlarının %8,13; 9,83; 7,37; 11,28; 10,34; 8,82 olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer araştırmada şeker otu yapraklarındaki toplam mineral (kül) miktarının %8,16 olduğu belirtilmektedir (Martins vd., 2016). Diğer çalışmalarda ise kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otu yapraklarındaki toplam mineral (kül) miktarı %10,72 (Gupta vd., 2012), %11 (Savita vd., 2004) olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Ekstraksiyon işlemi öncesi şeker otu yapraklarının özellikleri*

Analiz	Birim	Değer*
Toplam kuru madde	%	93,6 ± 0,08
Toplam mineral (kül) miktarı	%	10,9 ± 0,15

*Değerler “ortalama ± standart sapma” olarak verilmiştir.

4.2. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Şeker Otundan Steviol Glikozitler ve Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonu İşlemleri

Tez çalışmasının amacı, kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otundan steviol glikozitlerin ve antioksidan özellikli maddelerin ekstraksiyonunda çözücü ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon olmak üzere üç farklı metodun etkilerinin belirlenmesidir. Ekstraksiyon tekniklerinde parametrelerin etkileri yanıt yüzey yöntemi (RSM) kullanılarak merkezi tümleşik dizayn ile belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinin etkinliklerinin test edilmesinde şeker otunda bulunan iki temel steviol glikozit (rebaudiozit A ve steviozit) ve ayrıca toplam fenolik madde, toplam flavonoid ve antioksidan kapasite değerleri göz önünde bulundurulmuştur. Şeker otunun düşük kalorili doğal bir tatlandırıcı olması, bu bitkiden çeşitli yöntemlerle steviol glikozitlerin ekstraksiyonu konusunda çalışmalar yapılmasını sağlamıştır. Her bir ekstraksiyon tekniğinde parametrelerin etkileri değerlendirildikten sonra optimizasyon çalışması ile en uygun işlem parametreleri de ayrıca belirlenmiştir. Optimum işlem koşulları, tüm bağımlı değişkenlerin en yüksek değerlerde olmasını sağlayan bağımsız değişkenlerin program çıktısı olarak belirlenmiştir.

4.2.1. Çözücü Ekstraksiyon ve Çözücü Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi

Çözücü ekstraksiyon yönteminde bağımsız değişkenler; EtOH konsantrasyonu (%0 – 100), çözücü oranı (10 – 120 mL/g), sıcaklık (25 – 55 °C) ve süre (10 – 120 dk.) olarak belirlenmiştir. Dördü merkez noktası olmak üzere dört faktörlü deneme dizaynı 28 deneyden oluşmuştur. Oluşturulan 28 deney için bağımsız değişkenler ile analizlerle belirlenen bağımlı değişkenler Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Analiz sonuçları incelendiğinde rebaudiozit A miktarının 32,99 ile 40,77 mg/g; steviozit miktarının 52,72 ile 63,87 mg /g; TFM miktarının 41,26 ile 66,00 mg GAE/g; TF miktarının 27,21 ile 40,68 mg KE/g; TEAK (ABTS) değerinin ise 469,80 ile 737,40 $\mu\text{mol TE/g}$ aralığında değiştiği görülmektedir. Rebaudiozit A ve steviozitin çözücü ekstraksiyon yönteminde HPLC ile analizine ait örnek bir kromatogramı Şekil 4.1’de verilmektedir.

Çözücü ekstraksiyon işlemine ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.3’te sunulmuştur. Uyum katsayıları (R^2)

rebaudiozit A için 0,9858; steviozit için 0,9782; TFM miktarı için 0,9895; TF miktarı için 0,9884 ve TEAK (ABTS) için ise 0,9858 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3'te rebaudiozit A miktarına sürenin, sıcaklığın ve çözücü oranının etkili olduğu ($P<0,001$); EtOH konsantrasyonunun etkisinin istatistiki açıdan anlamlı olmadığı görülmektedir ($P>0,05$). Bağımsız değişkenlerin etkileşimli etkileri rebaudiozit A miktarı için incelendiğinde, süre x çözücü oranının etkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$). İkinci derece etkilerden EtOH konsantrasyonu ($P<0,001$), süre ve sıcaklığın ($P<0,01$) anlamlı etkileri tespit edilirken; çözücü oranının ikinci derece etkisi istatistiki olarak anlamsız görülmüştür ($P>0,05$).

Her bir bağımsız değişkenin doğrusal etkisi steviozit miktarı için incelendiğinde EtOH konsantrasyonu ve süre ($P<0,01$), sıcaklık ve çözücü oranı ($P<0,001$), EtOH konsantrasyonu x süre, EtOH konsantrasyonu x sıcaklık, süre x çözücü oranı, sıcaklık x çözücü oranı ($P<0,001$), EtOH konsantrasyonu x çözücü oranının etkisi anlamlı olarak görülürken ($P<0,01$), süre x sıcaklık istatistiki olarak anlamlı değildir sonucuna ulaşılmıştır ($P>0,05$). İkinci derece etkilerden EtOH konsantrasyonu ve çözücü oranı ($P<0,001$) ile sıcaklığın steviozit miktarı üzerinde etkisi istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

Süre, sıcaklık, çözücü oranı değişkenleri TFM miktarını ($P<0,001$) anlamlı olarak etkilerken EtOH konsantrasyonunun etkisinin istatistiki açıdan önemsiz olduğu görülmüştür ($P>0,05$). Bağımsız değişkenlerin etkileşimli etkileri TFM miktarı için incelendiğinde yalnızca sıcaklık x çözücü oranının etkileşimli etkileri önemli olduğu ($P<0,001$); ikinci derece etkilerinden ise yalnızca EtOH konsantrasyonunun etkili olduğu görülmüştür ($P<0,001$).

İşlem parametrelerinin doğrusal etkilerinin TF miktarı üzerine etkileri ele alındığında, EtOH konsantrasyonu, süre, sıcaklık, çözücü oranının etkilerinin olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($P<0,001$). Etkileşimli etkiler incelendiğinde EtOH konsantrasyonu x çözücü oranı ($P<0,01$) ve süre x sıcaklık etkileşimlerinin ($P<0,001$) etkili olduğu ayrıca ikinci derece etkilerinden EtOH konsantrasyonunun ($P<0,001$), süre ve sıcaklığın TF miktarı üzerine etkileri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,01$).

Uygulanan modelde her bir bağımsız değişkenin TEAK (ABTS) üzerine etkisinin olduğu görülmüştür ($P<0,001$). Etkileşimli etkiler incelendiğinde ise sıcaklık x çözücü oranı ($P<0,05$) ayrıca her bir parametrenin ikinci derece etkilerinin istatistiki olarak anlamlı olduğu sonucu elde edilmiştir ($P<0,01$).

Yanıt yüzey metodunda kullanılan bağımlı değişkenler rebaudiozit A miktarı, steviozit miktarı, TFM miktarı, TF miktarı, TEAK (ABTS) değerine ait model denklemleri EtOH konsantrasyonu (A), süre (B), sıcaklık (C) ve çözücü oranı (D) bağımsız değişkenlerine bağlı sadece istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak verilmiştir.

$$\textbf{Model denklemleri: } Y = \beta_0 + \beta_1 A + \beta_2 B + \beta_3 C + \beta_4 D + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{13}(Ax C) + \beta_{14}(Ax D) + \beta_{23}(Bx C) + \beta_{24}(Bx D) + \beta_{34}(Cx D) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 + \beta_{44}D^2$$

$$Y (\textbf{Rebaudiozit A}) = 11,12 + 0,13x(B) + 0,64x(C) + 0,09x(D) - 3,14x10^{-4}x(Bx D) - 1,44x10^{-3}x(A^2) - 3,96x10^{-4}x(B^2) - 6,31x10^{-3}x(C^2)$$

$$Y (\textbf{Steviozit}) = 51,95 + 0,12x(A) - 0,09x(B) + 0,29x(C) + 0,02x(D) + 1,31x10^{-3}x(Ax B) + 4,50x10^{-4}x(Ax C) - 8,20x10^{-4}x(Ax D) + 1,03x10^{-3}x(Bx D) + 4,13x10^{-3}x(Cx D) - 3,55x10^{-3}x(A^2) - 8,80x10^{-3}x(C^2) - 1,13x10^{-3}x(D^2)$$

$$Y (\textbf{TFM}) = -6,75 + 0,11(B) + 0,88x(C) + 0,40x(D) - 4,87x10^{-3}x(Cx D) - 5,38x10^{-3}x(A^2)$$

$$Y (\textbf{TF}) = 10,16 + 0,29x(A) + 0,11x(B) + 0,07x(C) + 0,14x(D) + 8,42x10^{-4}x(Ax D) - 3,21x10^{-3}x(Bx C) - 2,66x10^{-3}x(A^2) + 4,05x10^{-4}x(B^2) + 4,87x10^{-3}x(C^2)$$

$$Y (\textbf{TEAK (ABTS)}) = 506,31 + 3,00x(A) - 1,30x(B) - 10,93x(C) + 1,70x(D) + 0,04x(Cx D) - 0,01x(A^2) + 0,02x(B^2) + 0,22x(C^2) + 0,02x(D^2)$$

Çizelge 4.2. Çözücü ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler				
	EtOH Kons. (%)	Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Çözücü oranı (mL/g)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)	TFM (mg GAE/g)	TF (mg KE/g)	TEAK (ABTS) (μmol TE/g)
1	75	38	48	93	37,46	59,15	57,12	37,93	638,94
2	25	93	48	38	38,42	54,34	54,10	35,52	645,25
3	50	65	40	10	35,76	55,74	43,76	27,95	530,80
4	50	65	40	65	38,53	62,47	55,70	35,81	579,46
5	75	38	33	93	36,37	55,76	53,69	35,87	603,99
6	50	65	40	120	40,77	63,38	66,00	40,68	708,95
7	75	93	33	38	37,33	57,59	46,82	32,84	605,64
8	25	38	33	93	35,97	60,08	54,50	33,49	586,10
9	50	120	40	65	40,25	62,94	52,86	37,78	705,60
10	25	93	33	38	37,29	57,51	45,00	30,95	540,40
11	50	65	40	65	38,93	62,55	55,02	33,84	574,89
12	75	93	48	38	38,78	59,20	50,53	32,24	688,60
13	25	38	48	93	37,53	61,59	58,54	35,91	650,57
14	50	65	40	65	38,71	63,05	54,90	35,12	586,37
15	75	93	33	93	39,53	59,45	59,03	39,34	691,06
16	50	65	40	65	39,03	63,13	55,90	34,72	581,71
17	100	65	40	65	34,92	52,72	42,00	30,16	563,12
18	25	93	33	93	38,59	61,51	57,33	35,43	660,79
19	25	38	33	38	34,08	59,79	42,14	27,21	469,80
20	25	38	48	38	35,03	57,15	48,92	31,71	545,10
21	75	38	33	38	32,99	55,27	41,30	28,18	511,80

Çizelge 4.2. Çözücü ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar (Devamı)

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler				
	EtOH Kons. (%)	Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Çözücü oranı (mL/g)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)	TFM (mg GAE/g)	TF (mg KE/g)	TEAK (ABTS) (μmol TE/g)
22	0	65	40	65	35,37	55,49	41,26	25,98	510,00
23	75	38	48	38	35,23	57,16	47,30	31,35	562,80
24	50	10	40	65	34,83	61,42	52,60	34,10	529,96
25	50	65	55	65	38,99	63,08	58,56	37,12	684,33
26	50	65	25	65	35,65	58,94	51,21	34,50	553,14
27	25	93	48	93	39,71	63,57	58,47	36,10	712,70
28	75	93	48	93	40,18	63,82	59,93	39,27	737,40

*Harmanlanmış sıra

Çizelge 4.3. Çözücü ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Rebaudiozit A	Steviozit	TFM	TF	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	+11,12 ^{***}	+51,95 ^{***}	-6,75 ^{***}	+10,16 ^{***}	+506,31 ^{***}
Doğrusal						
EtOH kons. (%), A	β_1	+0,11	+0,12 ^{**}	+0,56	+0,29 ^{***}	+3,00 ^{***}
Süre (dk), B	β_2	+0,13 ^{***}	-0,09 ^{**}	+0,11 ^{***}	+0,11 ^{***}	-1,30 ^{***}
Sıcaklık (°C), C	β_3	+0,64 ^{***}	+0,29 ^{***}	+0,88 ^{***}	+0,07 ^{***}	-10,93 ^{***}
Çözücü oranı (mL/g), D	β_4	+0,09 ^{***}	+0,02 ^{***}	+0,40 ^{***}	+0,14 ^{***}	+1,70 ^{***}
Etkileşimli						
EtOH kons.x Süre, A x B	β_{12}	+2,15x10 ⁻⁴	+1,31x10 ^{-3***}	+5,55x10 ⁻⁴	+3,35x10 ⁻⁴	+8,87x10 ⁻³
EtOH kons x Sıcaklık, A x C	β_{13}	+2,28x10 ⁻⁴	+4,50x10 ^{-3***}	-2,34x10 ⁻³	-1,53x10 ⁻³	-0,03
EtOH kons x Çözücü oranı, Ax D	β_{14}	+2,03x10 ⁻⁴	-8,20x10 ^{-4**}	+4,67x10 ⁻⁴	+8,42x10 ^{-4**}	-9,73x10 ⁻³
Süre x Sıcaklık, B x C	β_{23}	-4,49	+2,20x10 ⁻⁴	-1,64x10 ⁻³	-3,21x ^{-3***}	+0,02
Süre x Çözücü oranı, B x D	β_{24}	-3,14x10 ^{-4*}	+1,03x10 ^{-3***}	-4,86x10 ⁻⁴	-2,61x10 ⁻⁴	-5,62x10 ⁻³
Sıcaklık x Çözücü oranı, C x D	β_{34}	-4,10x10 ⁻⁴	+4,13x10 ^{-3***}	-4,87x10 ^{-3***}	-1,08x10 ⁻³	-0,04 [*]
İkinci derece						
EtOH kons. x EtOH kons., A ²	β_{11}	-1,44x10 ^{-3***}	-3,55x10 ^{-3***}	-5,38x10 ^{-3***}	-2,66x10 ^{-3***}	-0,01 ^{**}
Süre x Süre, B ²	β_{22}	-3,96x10 ^{-4**}	-2,68x10 ⁻⁴	+1,19x10 ⁻⁴	+4,05x10 ^{-4*}	+0,02 ^{**}
Sıcaklık x Sıcaklık, C ²	β_{33}	-6,31x10 ^{-3**}	-8,80x10 ^{-3*}	-8,26x10 ⁻⁴	+4,87x10 ^{-3*}	+0,022 ^{**}
Çözücü oranı x Çözücü oranı, D ²	β_{44}	-1,58x10 ⁻⁴	-1,13x10 ^{-3***}	-6,31x10 ⁻⁵	-1,32x10 ⁻⁴	+0,02 ^{**}
R²		0,9858	0,9782	0,9895	0,9884	0,9858
Ayarlanmış R²		0,9705	0,9548	0,9782	0,9760	0,9704
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		64,50	41,70	87,74	79,37	64,33
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,20	0,10	0,11	0,91	0,05

Önem düzeyleri: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Yanıt yüzey yönteminde uygulanan bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A miktarı üzerine etkileri Şekil 4.2’de; steviozit miktarı üzerine etkileri Şekil 4.3’te; TFM miktarı üzerine etkileri Şekil 4.4’te; TF miktarı üzerine etkileri Şekil 4.5’te; TEAK (ABTS) değerine etkileri ise Şekil 4.6’da verilmiştir.

Şekil 4.2’de süre ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkileri incelendiğinde, süre artışı rebaudiozit A miktarını artırırken; EtOH konsantrasyonunun %50 - 60 olduğu aralığa kadar rebaudiozit A miktarının arttığı, yüksek konsantrasyonlarında düşüşe geçtiği görülmektedir. Sıcaklık ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkileri grafik üzerinde incelendiğinde 40 – 45 °C’ye kadar rebaudiozit A’da artış gözlemlenirken daha yüksek sıcaklıklarda ise miktarın sabite ulaştığı; EtOH konsantrasyonunun %50’ye kadar rebaudiozit A miktarını artırdığı; daha yüksek konsantrasyonlarda ise rebaudiozit A miktarının azalmaya başladığı gözlenmektedir. Çözücü oranının artışı rebaudiozit A miktarını doğrusal olarak artırırken EtOH konsantrasyonunun %50 konsantrasyonu ile çözücü oranının en yüksek olduğu değerde rebaudiozit A’nın en fazla miktarda elde edildiği sonucuna varılmaktadır. Sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkilerinde ise sürenin 80 - 120 dk. olduğu aralığın ve 40 °C’den sonraki sıcaklık değerlerinin rebaudiozit A miktarının artışı için oldukça etkili olduğu görülmektedir. Çözücü oranı ve sürenin etkileşimli etkilerin incelenmesi ile her iki bağımsız değişkenin artması rebaudiozit A miktarında doğrusal bir artışa neden olmaktadır. Çözücü oranı ve sıcaklık parametrelerinin etkileşimli etkileri ele alındığında ise çözücü oranının artışı rebaudiozit A miktarını doğrusal olarak artırırken sıcaklığın 40 – 45 °C olduğu noktalara kadar miktarın arttığı daha sonra sabit konuma geçtiği gözlenmektedir. Das vd. (2015), şeker otunda çözücü ekstraksiyon işleminde 60 °C ve üzeri sıcaklıklarda rebaudiozit A’da bozunma gerçekleştiğini vurgulamışlardır.

Şekil 4.3’te süre ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkilerin steviozit miktarına olan etkisi incelendiğinde EtOH konsantrasyonunun %50 – 60 olduğu noktalara kadar steviozit miktarının arttığı sonrasında azalışa geçtiği, sürenin artmasıyla birlikte doğrusal bir şekilde azalmaya başladığı görülmektedir. Ameer vd. (2017a), kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otunda ekstraksiyon süresinin artışının EtOH çözeltisinin bitki materyali ile olan temas süresini uzatacağından dolayı şeker otu yapraklarından steviozitin geçişinin daha iyi olacağını belirtmişlerdir. Polar çözücü olan EtOH, hücre matrisinin yapısal konformasyonunda değişiklik

yarattığını dolayısıyla hedef bileşenlerin (rebaudiozit A ve steviozit) çözücüye geçişinin kolaylaştığını bildirmişlerdir. Sıcaklık ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkilerinin benzer etki yarattığı gözlenmektedir. Çözücü oranının artması ile birlikte steviozit miktarının arttığı bununla birlikte EtOH konsantrasyonunun %50 – 60 arasında olduğu noktalarda steviozitin en yüksek miktarlara ulaştığı görülmektedir. Sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkileri değerlendirildiğinde, 40 °C ve üzeri sıcaklıklarda, süreninise 47 dk. ve üzeri olduğu noktalarda steviozit miktarının sabit bir şekilde devam ederek yüksek miktarlarda elde edildiği sonucuna ulaşılmaktadır. Süre ve sıcaklığın çözücü oranı ile birlikte olan etkileşimli etkileri ele alındığında benzer sonuçlar görülmektedir. Steviozit miktarının artan süre, sıcaklık ile ilk önce arttığı sonra azalışa geçtiği görülürken çözücü oranının 65 mL/g olduğu noktaya kadar steviozit miktarının arttığı daha sonra azalmaya başladığı sonucuna ulaşılmaktadır. Ameer vd. (2017a), şeker otunda yapmış oldukları ekstraksiyon işleminde süreyle birlikte artan EtOH konsantrasyonunun rebaudiozit A ve steviozit miktarlarını artırdığını daha sonra ise azalttığını bildirmişlerdir.

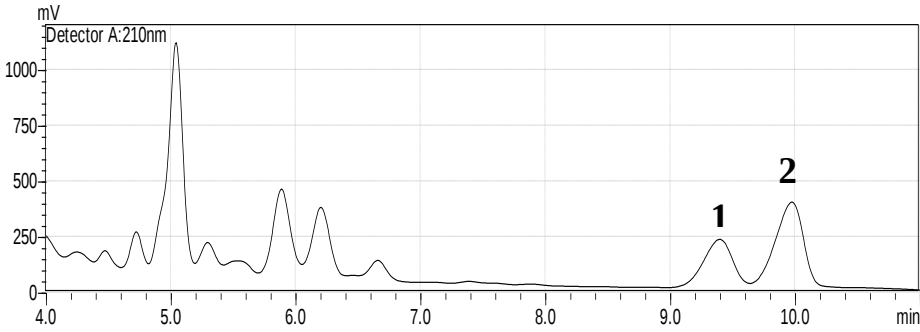
Şekil 4.4 incelendiğinde süre ve sıcaklık parametrelerinin EtOH konsantrasyonu ile etkileşimli etkileri sonucunda benzer etkiler ortaya çıktığı görülmektedir. Artan süre ve sıcaklık ile TFM miktarının arttığı, EtOH konsantrasyonunun %50 – 60 arasında olduğu noktalarda ise TFM miktarının arttığı sonrasında ise düşüşe geçtiği gözlenmektedir. Çözücü oranı ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkileri incelendiğinde çözücü oranının artması TFM miktarının doğrusal olarak artmasına, EtOH konsantrasyonunun ise %50 – 60'a kadar olduğu noktalarda TFM miktarını artırdığı sonrasında miktarın azalışa geçtiği sonucuna ulaşılmaktadır. Sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkilerinde ise her iki parametrenin artması TFM miktarını önemli ölçüde etkilemediği sonucuna ulaşılmaktadır. Süre ve sıcaklığın çözücü oranı ile olan etkileşimli etkilerinde her bir değişkenin artışı TFM miktarında doğrusal bir artışa sebep olmuştur. Belwal vd. (2016), düşük konsantrasyonlardaki çözücünün yüksek konsantrasyonlarına göre fenolik bileşenleri ve antioksidan maddeleri daha verimli şekilde ekstrakte ettiğini belirtmişlerdir. Kuş kirazında yapılan ekstraksiyon çalışmasında ise başlangıçta artan EtOH konsantrasyonunun bitki matrisindeki hücre zarının bozunmasıyla fenolik maddelerin geçişinin hızlandığı ifade edilmiştir; fakat artan EtOH konsantrasyonu ile çözücü polaritesinin değiştiği ayrıca proteinlerin koagülasyonu

ile birlikte difüzyonun zorlaştığı böylece fenolik maddelerin geçişinin zorlaştığı belirtilmiştir (Simic vd., 2016).

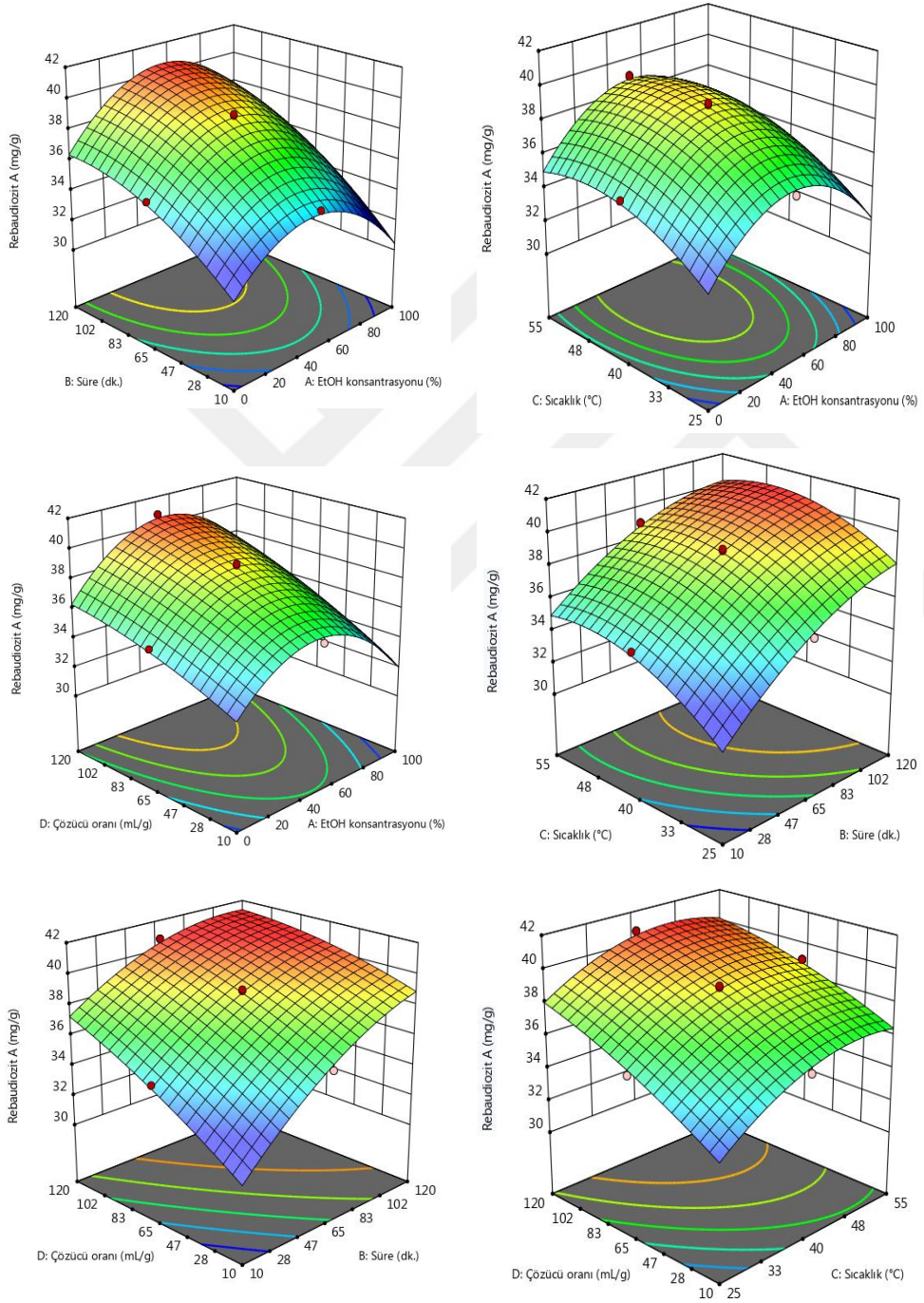
Şekil 4.5'te görüldüğü üzere süre ve sıcaklık parametrelerinin EtOH konsantrasyonu ile olan etkileşiminde benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Süre ve sıcaklık artışı TF miktarı üzerinde sabit bir şekilde etki ederken EtOH konsantrasyonunun %50 – 60 olduğu noktaya kadar TF miktarının arttığı daha sonra azaldığı gözlenmektedir. Çözücü oranı ve EtOH konsantrasyonunun etkileşimli etkilerinde çözücü oranının artması TF miktarını doğrusal olarak artırırken; EtOH konsantrasyonunun %0'dan %50 – 60'lara kadar TF miktarını artırdığı gözlenirken daha yüksek konsantrasyonlar TF miktarının azalmasına neden olmuştur. Süre ve sıcaklık değişkenlerinin etkileşimli etkileri incelendiğinde ise sıcaklığın 25 – 35 °C aralığında sürenin ise 102 – 120 dk. olduğu noktalar ile sıcaklığın 50 – 55 °C, sürenin 10 – 30dk. olduğu noktalarda TF'nin yüksek miktarda elde edildiği sonucuna ulaşılmaktadır. Sıcaklık ve süre değişkenlerinin çözücü oranı ile olan etkileşimli etkilerinde her bir parametrenin artışı TF miktarının doğrusal bir şekilde artmasına sebep olduğu görülmektedir.

Şekil 4.6 incelendiğinde süre ve EtOH konsantrasyonu etkileşimli etkisinde her iki parametrenin maksimum olduğu noktalarda (120 dk. - %100) TEAK (ABTS) değerinin en yüksek olduğu sonucuna varılmaktadır. Sıcaklık ve çözücü oranının EtOH konsantrasyonu ile olan etkileşimli etkileri ele alındığında benzer sonuçlara ulaşılarak her bir parametrenin artışının TEAK (ABTS) değerinde artışa yol açtığı görülmektedir. Sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkileri incelendiğinde her iki bağımsız değişkenin en yüksek noktalarında TEAK (ABTS) değerinin en yüksek değerlere ulaştığı sonucuna varılmaktadır. Çözücü oranının sıcaklık ve süre ile TEAK (ABTS) değerinin artıyor olduğu görülmektedir. Periche vd. (2015), kurutulmuş ve öğütülmüş şeker otu yapraklarında ekstraksiyon işleminin 90 °C üzerinde olması durumunda ekstraksiyon veriminin düştüğünü ve ayrıca fenolik bileşikler ile antioksidanların bozunmalarının meydana geldiğini belirtmişlerdir. Bu durumlar göz önünde bulundurularak bu tez çalışması kapsamında yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmemiş ve çalışılan sıcaklıklarda (25 – 55 °C) steviol glikozitler ile fenolik bileşenlerin miktarlarının arttığı sonucuna ulaşılmıştır.

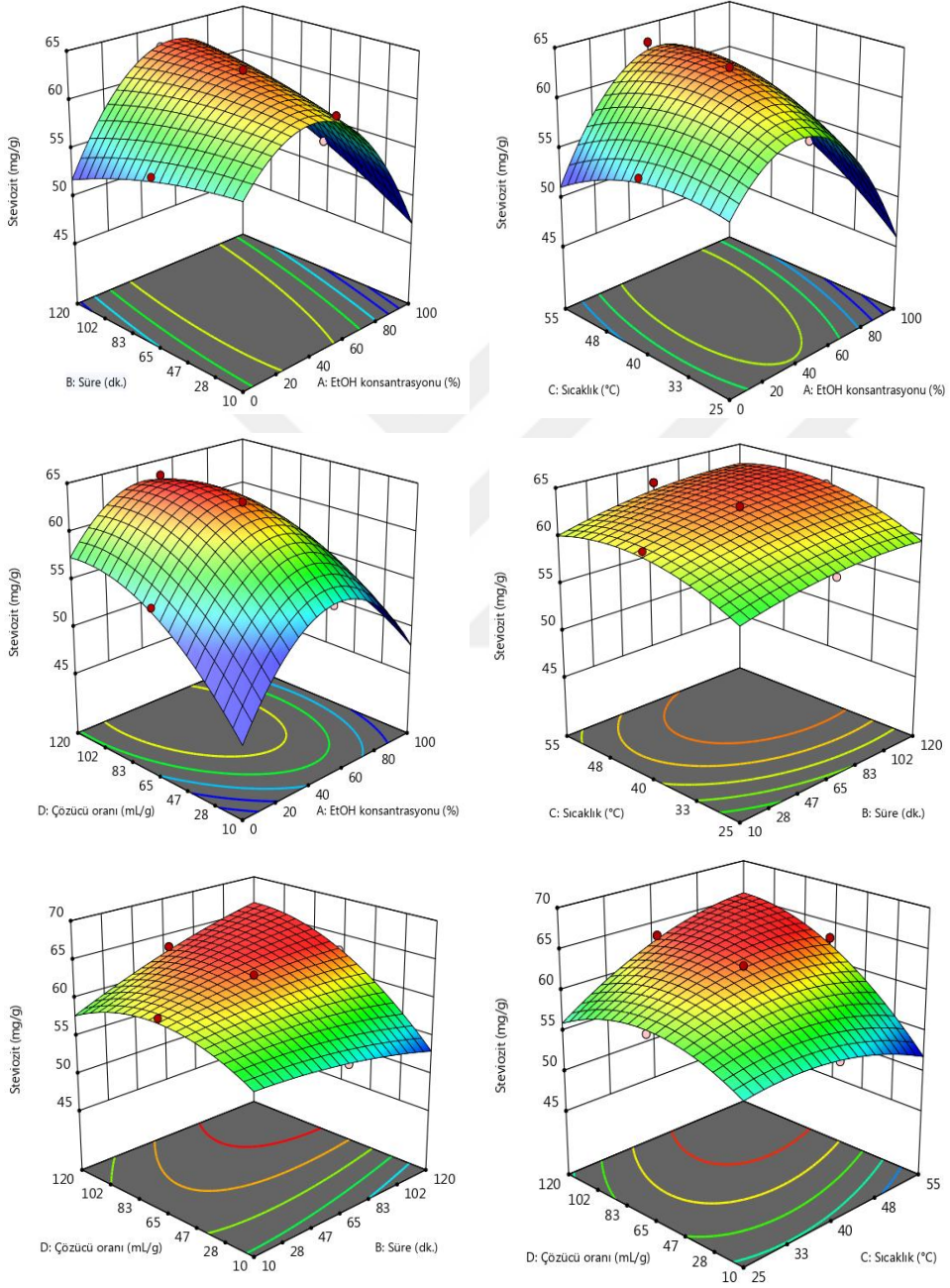
Gaweł-Bęben vd. (2015), su, etanol ve su + glikol ile şeker otunda yapmış oldukları ekstraksiyon işlemi sonrasında en yüksek TFM (15,50 mg/g) ve TF (3,85 mg/g) miktarlarını su + glikol ile yaptıkları ekstraksiyon ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Periche vd. (2015), 90 °C’de gerçekleştirilen çözücü ekstraksiyon yöntemi ile şeker otunda TFM miktarının 93,41 mg GAE/g, antioksidan kapasitenin 131 mg TE/g olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada, sıcaklığın 90 °C’nin üzerinde olduğunda ise ekstraksiyon veriminin düştüğünü ayrıca fenolik bileşiklerin ve antioksidanların bozunmalarının gerçekleştiği vurgulanmıştır. Shukla vd. (2009), şeker otunda %100 EtOH ile yapmış oldukları ekstraksiyon sonrasında 61,50 mg GAE/g TFM miktarı elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada şeker otu yapraklarında ve kallusta su ile yapılan çözücü ekstraksiyon yöntemi sonucunda TFM miktarı yaprakta 130,76 mg KE/ g, kallusta 43,99 mg KE/g; TF miktarı yaprakta 15,64 mg QE/g, kallusta 1,57 mg QE/g olarak tespit edilmiştir (Kim vd., 2011). Yücesan vd. (2016), farklı yetiştirme yöntemleriyle üretilen kurutulmuş şeker otlarından %70 metanol çözeltisiyle steviol glikozitleri ekstraksiyon gerçekleştirilmiş; Rebaudiozit A miktarının %4,7 ile 5,00 (w/w), steviozit miktarının ise %6,4 ile 6,9 (w/w) aralığında değiştiğini belirtmişlerdir.



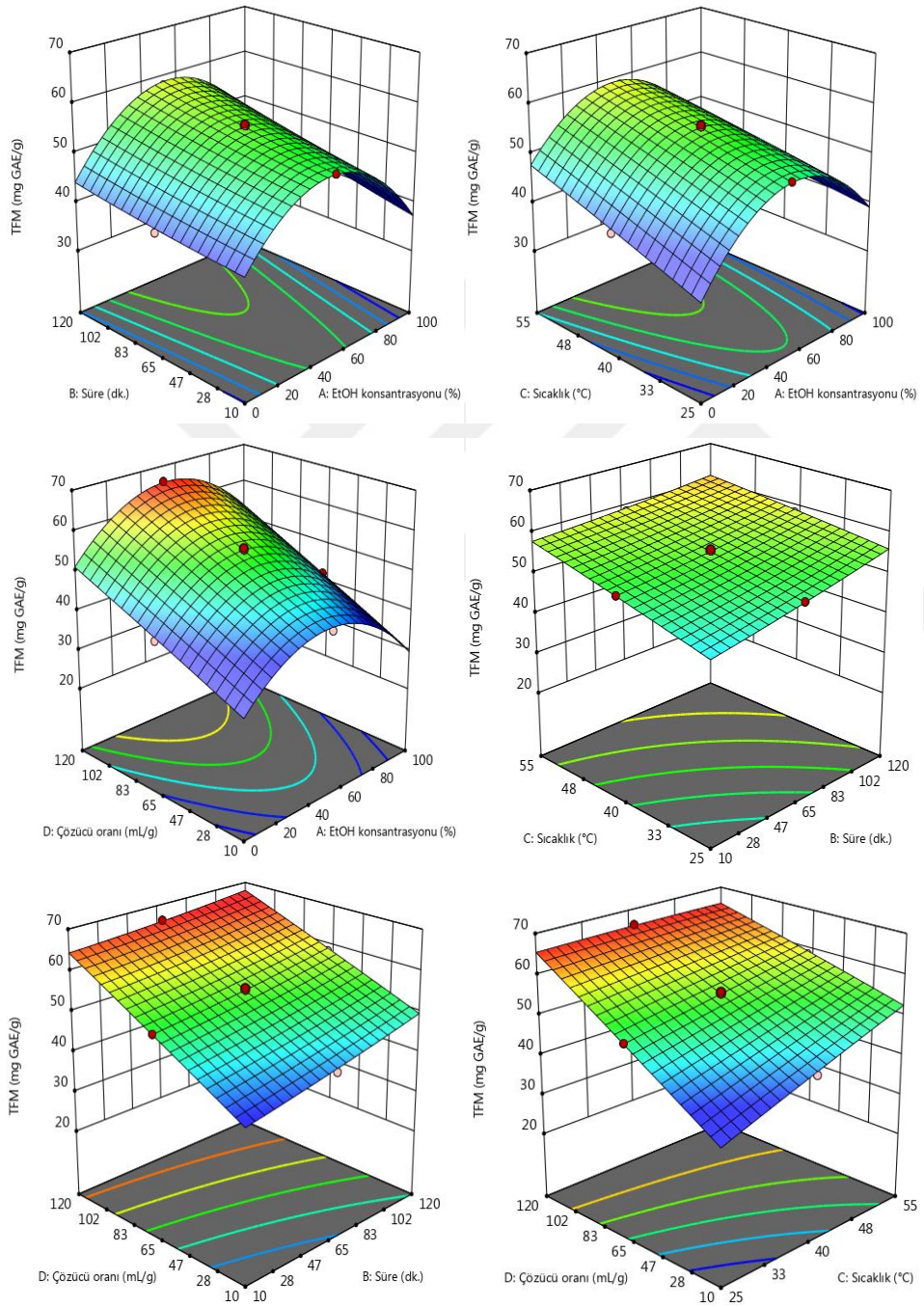
Şekil 4.1. Çözücü ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozite (2) ait örnek bir kromatogram



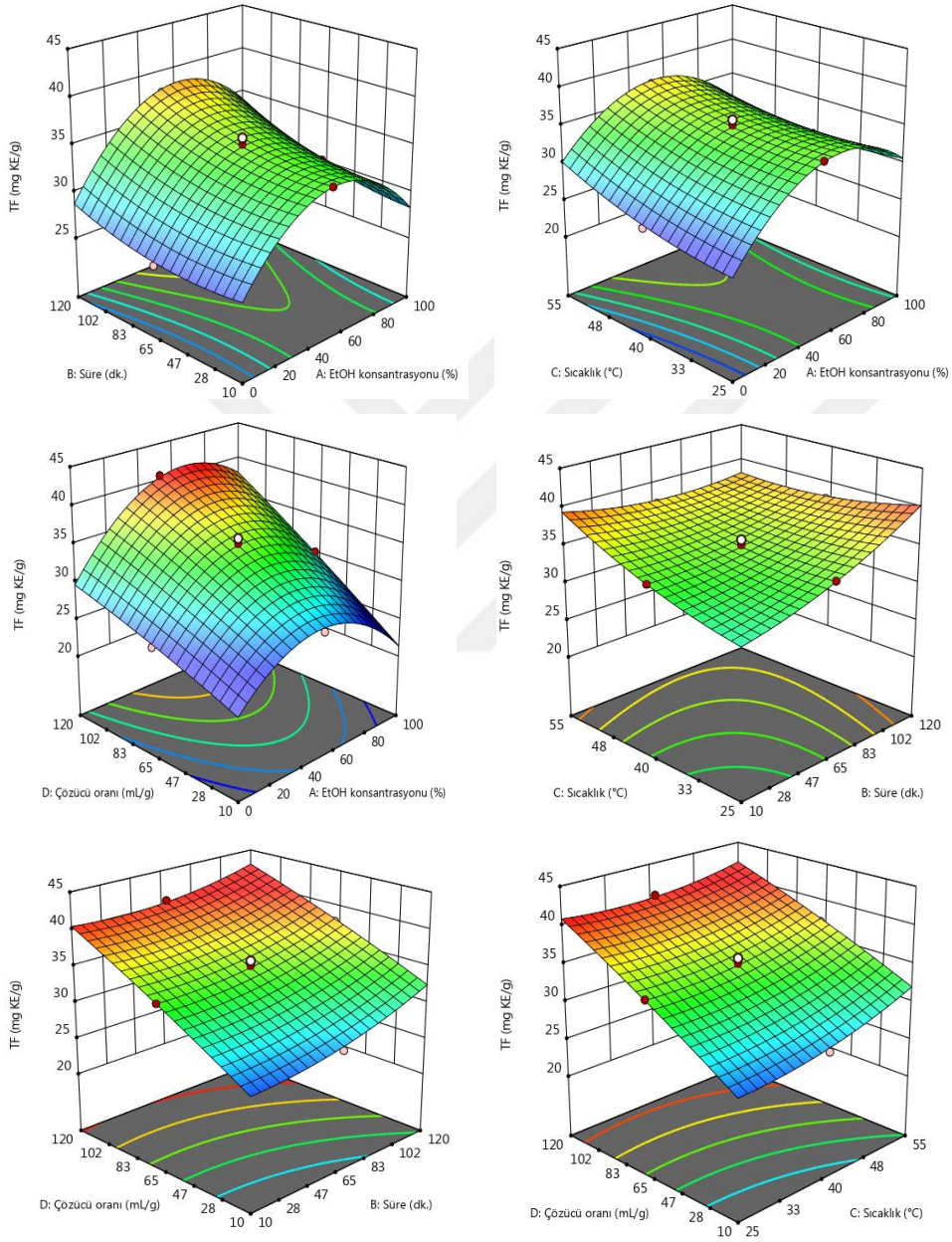
Şekil 4.2. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin Rebaudiozıt A miktarına etkisi



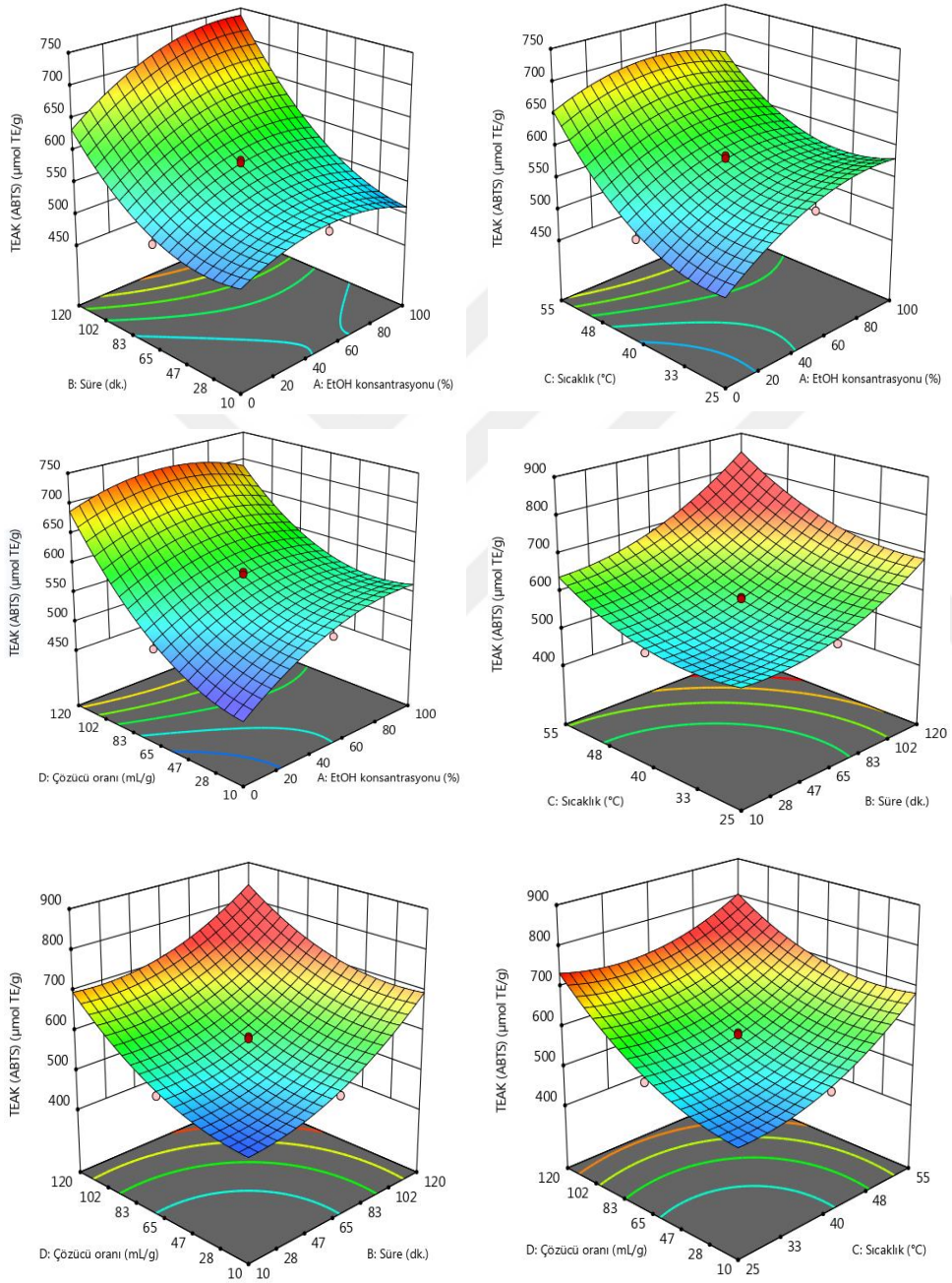
Şekil 4.3. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin Steviosit miktarına etkisi



Şekil 4.4. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TFM miktarına etkisi



Şekil 4.5. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TF miktarına etkisi

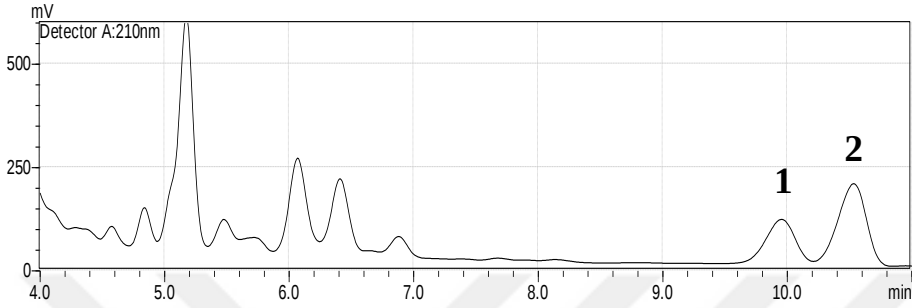


Şekil 4.6. Çözücü ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) miktarına etkisi

4.2.2. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ve Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi

Tez çalışması kapsamında şeker otu ile yapılan mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenler süre (1 – 25 dk.) ve sıcaklık (20 – 55 °C) olarak belirlenmiştir. EtOH konsantrasyonu (%50), çözücü oranı (118 mL/g) ve güç (700 W) sabit tutulmuştur. Çalışmada kullanılan mikrodalga ekstraktörün 100 – 1000 W aralığında farklı güçlerde çalışma işlevi bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında mikrodalga ekstraktörün farklı güçlerinin etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır; ancak ön deneme kapsamında gerçekleştirilen deneme aralığı belirleme çalışmasında farklı güçlerin ekstraksiyon verimine etkisi gözlenmemiştir. Mikrodalga ekstraktör, çalışma prensibi olarak hedef sıcaklığa ulaşılan dek mikrodalga gücü uygulamakta; sonrasında güç kesintiye uğramaktadır. Dolayısıyla, farklı mikrodalga güçleri yalnızca hedef sıcaklığa ulaşma süresini belirli oranda etkilemiş; merkezi tümleşik tasarımda süre parametresi ile birlikte değerlendirilmesine olanak tanımamıştır. Sonuç olarak, literatür çalışmaları ve ön denemeler göz önünde bulundurularak mikrodalga gücü 700 W olarak sabit tutulmuştur. Literatürde farklı mikrodalga güçlerinin ele alındığı çalışmalar incelendiğinde, mikrodalga ekstraktör yerine sıcaklık kontrol özelliği bulunmayan ev tipi cihazların kullanıldığı görülmektedir (Javad vd., 2014; Periche vd., 2015; Koubaa vd., 2015). Mikrodalga ekstraktör kullanılan optimizasyon çalışmalarında ise sabit güçte farklı sıcaklıkların etkilerinin değerlendirildiği anlaşılmaktadır (Teo vd., 2009; Alupului vd., 2012; Ciulu vd., 2017).

Üç tanesi merkez nokta olmak üzere iki faktörlü deneme dizaynı 11 deneyden oluşmuştur. Oluşturulan 11 deney için bağımsız değişkenler ve analiz sonuçlarına bağlı bağımlı değişkenler Çizelge 4.4’te sunulmuştur. Sonuçlar incelendiğinde, rebaudiozit A miktarının 32,94 ile 43,24 mg/g arasında, steviozit miktarının 54,77 ile 68,25 mg/g, TFM miktarının 48,92 ile 68,10 mg GAE/g, TF miktarının 32,21 ile 43,40 mg KE/g, TEAK (ABTS) değerinin ise 635,67 ile 858,766 µmol TE/g arasında değiştiği gözlenmektedir. Rebaudiozit A ve steviozitin mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemine ait örnek kromatogramı Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.7. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozite (2) ait örnek bir kromatogram

Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemine ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.5'te verilmiştir. Uyum katsayıları (R^2) rebaudiozit A için 0,9913; steviozit miktarı için 0,9970; TFM miktarı için 0,9934; TF miktarı için 0,9830 ve TEAK (ABTS) değeri için 0,9599 olarak elde edilmiştir. Tüm bağımlı değişkenlere ait uyum eksikliği testinin istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Bu sonuç, uygulanan modelin deneysel veri açısından anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde, tüm bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A miktarını etkilediği görülmüştür ($P<0,001$). Süre ve sıcaklığın etkileşimli etkileri ($P<0,01$), ikinci derece etkilerden sadece süre parametresi rebaudiozit A miktarı için istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,01$).

Bağımsız değişkenlerin steviozit miktarı üzerine etkileri incelendiğinde her bir değişkenin ($P<0,001$), süre ve sıcaklığın etkileşimli etkilerin ($P<0,001$), ikinci derece etkilerden hem sıcaklık hem de sürenin etkileri steviozit miktarı için istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$).

TFM miktarı için deneysel tasarımda yer alan bağımsız değişkenlerin etkisi olduğu görülmüştür ($P<0,001$). Sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkileri istatistiki açıdan anlamlı bulunmazken ikinci derece etkilerden sıcaklığın ($P<0,001$), sürenin ($P<0,01$) etkisi olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

TF miktarı için incelenen sıcaklık ve süre parametrelerinin etkisi olduğu gözlenmiştir ($P<0,001$). Etkileşimli etkilerin istatistiki olarak anlamlı

bulunmadığı, ikinci derece etkilerden her iki değişkenin etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($P<0,05$).

Bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) değeri için sıcaklık parametresinin ($P<0,001$), süre parametresinin istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Etkileşimli etkilerin istatistiki açıdan anlamlı olmadığı, ikinci derece etkilerden sıcaklığın anlamlı olduğu sonucu elde edilmiştir ($P<0,01$).

Yanıt yüzey metodunda bağımlı değişkenler olarak verilen rebaudiozit A miktarı, steviozit miktarı, TFM miktarı, TF miktarı, TEAK (ABTS) değerine ait model denklemleri sıcaklık (A), süre (B) bağımsız değişkenlerine bağlı olarak sadece istatistiki anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak verilmektedir.

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_{12}(Ax B) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2$

Y (Rebaudiozit A) = $23,87 + 0,15x(A) + 1,17x(B) - 0,01x(Ax B) - 0,02x(B^2)$

Y (Steviozit) = $11,44 + 1,61x(A) + 3,04x(B) - 0,02x(Ax B) - 0,01x(A^2) - 0,07x(B^2)$

Y (TFM) = $6,30 + 2,03x(A) + 1,38x(B) - 0,02x(A^2) - 0,03x(B^2)$

Y (TF) = $15,77 + 0,67x(A) + 0,59x(B) - 5,34 \times 10^{-3}x(A^2) - 0,01x(B^2)$

Y (TEAK (ABTS)) = $256,25 + 23,28x(A) - 1,38x(B) - 0,25x(A^2)$

Çizelge 4.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar

Deney No*	Bağımsız değişkenler			Bağımlı değişkenler			
	Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)	TFM (mg GAE/g)	TF (mg KE/g)	TEAK (ABTS) (μmol TE/g)
1	13	38	39,77	68,00	64,70	38,94	828,06
2	21	50	42,53	64,04	68,10	43,40	852,76
3	25	38	41,25	59,90	65,34	41,89	858,66
4	1	38	32,94	57,7	55,53	33,41	793,17
5	13	38	39,06	67,85	64,43	39,52	782,00
6	13	20	37,21	58,99	51,28	32,89	635,67
7	5	25	32,98	52,76	48,92	32,21	679,09
8	13	55	43,24	68,25	65,74	43,05	830,71
9	5	50	39,74	64,78	62,55	39,09	790,00
10	13	38	40,10	68,25	64,16	40,10	790,91
11	21	25	40,39	62,30	56,95	35,84	727,05

*Harmanlanmış sıra

Çizelge 4.5. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Rebaudiozit A	Steviozit	TFM	TF	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	+23,87 ^{***}	+11,44 ^{***}	+6,30 ^{***}	+15,77 ^{***}	+256,25 ^{**}
Doğrusal						
Sıcaklık(°C), A	B ₁	+0,15 ^{***}	+1,61 ^{***}	+2,03 ^{***}	+0,67 ^{***}	+23,28 ^{***}
Süre (dk.), B	B ₂	+1,17 ^{***}	+3,04 ^{***}	+1,38 ^{***}	+0,59 ^{***}	-1,38 [*]
Etkileşimli						
Sıcaklık x Süre, A x B	β_{12}	-0,01 ^{**}	-0,02 ^{***}	-5,90x10 ⁻³	+1,62x10 ⁻³	+0,04
İkinci derece						
Sıcaklık x Sıcaklık, A ²	B ₁₁	+2,31x10 ⁻³	-0,01 ^{***}	-0,02 ^{***}	-5,34x10 ^{-3*}	-0,25 ^{**}
Süre x Süre, B ²	B ₂₂	-0,02 ^{**}	-0,07 ^{***}	-0,03 ^{**}	-0,01 [*]	+0,12
R²		0,9913	0,9970	0,9934	0,9830	0,9599
Ayarlanmış R²		0,9826	0,9940	0,9868	0,9660	0,9198
p-değeri		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,0017
F-değeri		113,93	332,54	150,83	57,79	23,94
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,71	0,13	0,08	0,34	0,74

Önem düzeyleri: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A, steviozit, TFM, TF miktarlarına ve TEAK (ABTS) değerine olan etkileri Şekil 4.8’de sunulmuştur.

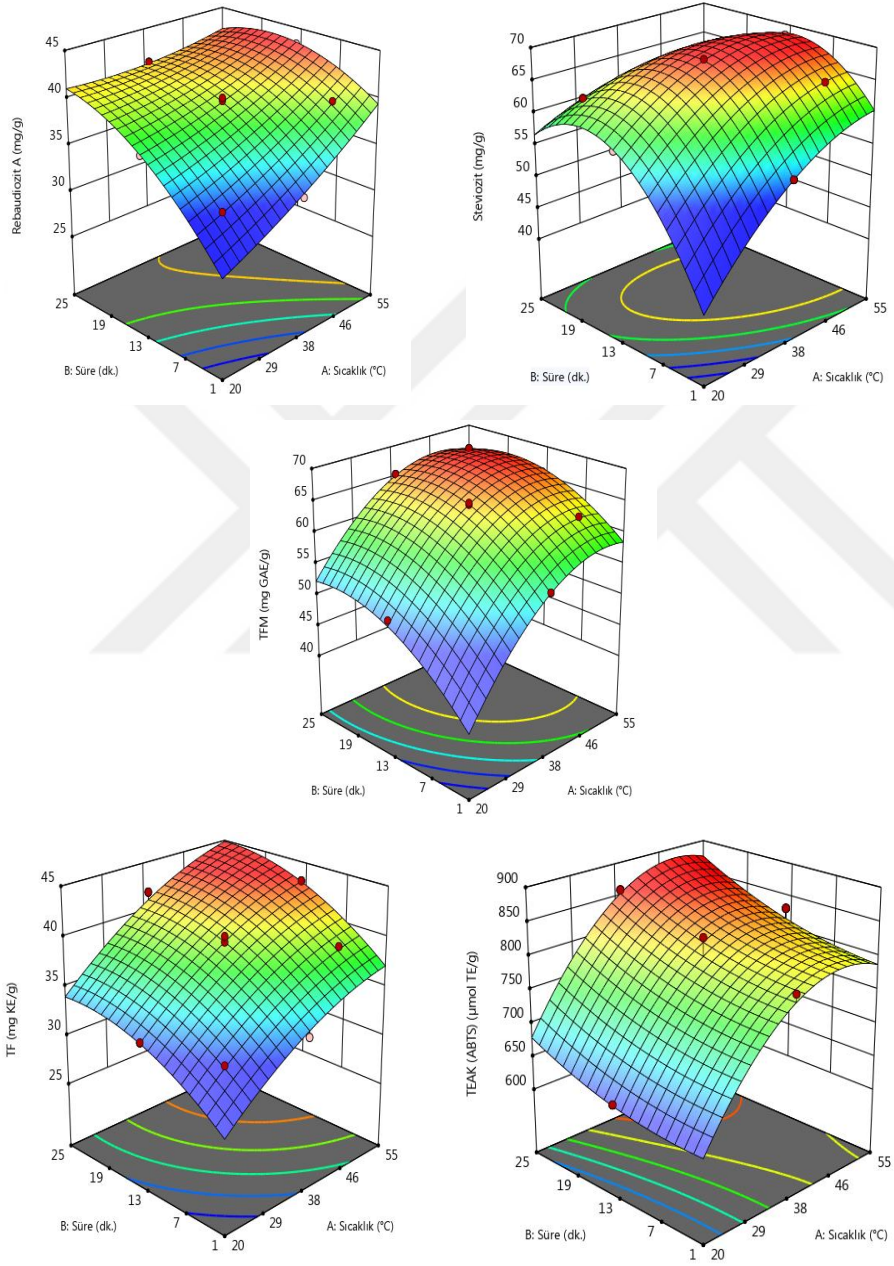
Süre ve sıcaklık bağımsız değişkenlerinin rebaudiozit A miktarına etkisi incelendiğinde, her iki işlem parametresinin artmasıyla birlikte rebaudiozit A miktarının artışının gerçekleştiği görülmektedir. Sıcaklığın 45 – 55 °C olduğu, sürenin ise 10 – 25 dk. arasındaki değerlerinde rebaudiozit A miktarının en yüksek miktarlara ulaştığı saptanmıştır.

Bağımsız değişkenlerin steviozit miktarına olan etkisi ele alındığında sıcaklık artışının steviozit miktarını artırdığı sürenin ise 10 – 20 dk. arasında olduğu noktalarda en yüksek miktara ulaşıldığı, daha sonraki sürelerde steviozit miktarının azalmaya geçtiği görülmektedir. Sıcaklık ve süre artışıyla birlikte TFM miktarında artış gerçekleştiği gözlenmektedir. Bağımsız değişkenlerin TF miktarı üzerindeki etkisi incelendiğinde, sıcaklık ve süre artışının TF miktarını doğrusal olarak artırdığı sonucuna ulaşılmaktadır. Süre ve sıcaklık değişkenlerinin etkileşimli etkilerinin TEAK (ABTS) değeri üzerine etkisi ele alındığında süre artışının antioksidan kapasite değerini artırdığı, sıcaklığın ise 50 °C’ye kadar TEAK (ABTS) değerini artırdığı daha sonra bu değer sabit şekilde devam ettiği görülmektedir.

Farklı koşullarda yetiştirilen şeker otunda mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi incelendiğinde, farklı sıcaklık (60 – 120 °C) ve sürelerde (5 – 45 dk.) ve 700 W güç sabit tutularak elde edilen steviozit ve rebaudiozit A miktarları sırasıyla; doğal ortamda yetiştirilmiş şeker otunda 21,38 mg/g; 20,80 mg/g, doku kültürü ortamında 9,17 mg/g; 8,86 mg/g, hindistan cevizi ile doku kültürü ortamında yetiştirilmiş şeker otunda 11,99 mg/g; 11,65 mg/g, serada yetiştirilmiş şeker otunda ise 17,92 mg/g; 18,86 mg/g olarak rapor edilmiştir (Teo vd., 2009).

Alupului vd. (2012), şeker otunda mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde 40 – 250 °C sıcaklık ve 0 – 400 W güç aralığında çalışılmış ve steviozit miktarının 5 dk.’dan daha kısa bir sürede en yüksek verime ulaşıldığını bildirmişlerdir. Mikrodalga ile gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminin kütle transferini etkili şekilde artmasını sağlayan bir yöntem olduğunu vurgulamışlardır. Jaitak vd., (2009), şeker otunda mikrodalga destekli ekstraksiyon 80 W güç, 50 °C sıcaklık ve 1 dk. süre sonunda, steviozit miktarının %8,64; rebaudiozit A miktarının ise %2,34 olduğunu saptamışlardır. Bir başka çalışmada 50 °C sıcaklık ve 1 dk. süre

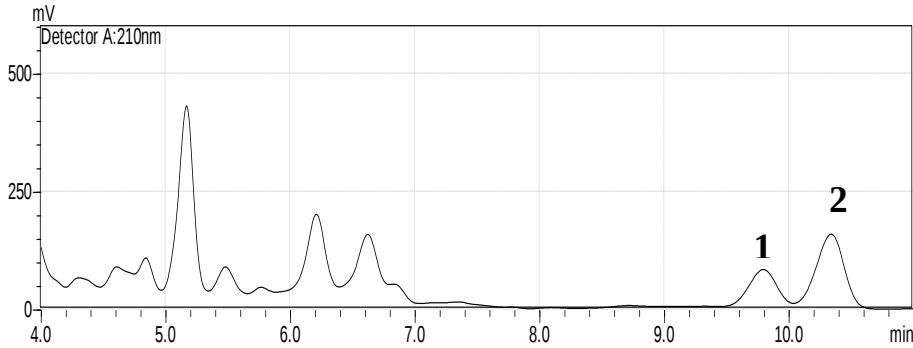
sonunda 17,03 mg/g rebaudiozit A, 46,48 mg/g steviozit elde edildiği görülmektedir. Ayrıca aynı çalışmada mikrodalga destekli ekstraksiyon ultrases ve çözücü ekstraksiyon ile kıyaslanması ile mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde daha yüksek verim elde edildiği belirtilmektedir. TFM miktarının 81 mg GAE/g, TF miktarı 45 mg KE/g, toplam antioksidan kapasitenin 96 mg TE/g olduğunu bildirmişlerdir (Periche vd., 2015). Ciulu vd. (2017), %75 EtOH konsantrasyonu, 100 °C sıcaklık ve 20 dk. süre sonunda maksimum TFM miktarının 45 mg GAE/g olarak elde edildiğini ifade etmişlerdir. Farklı ekstraksiyon çalışmalarının uygulandığı bir başka araştırmada kısa sürede en yüksek verim mikrodalga destekli ekstraksiyonda elde edilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 12 dk.'lık sürede gerçekleştirilmiş ve TFM miktarı şeker otu yaprağında 100,385 mg GAE/g, sap kısmında 18,702 mg GAE/g, çiçekte ise 64,461 mg GAE/g elde edilmiştir (Hajar, 2014).



Şekil 4.8. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A, steviozit, TFM, TF, TEAK (ABTS) miktarlarına etkisi

4.2.3. Ultrases Destekli Ekstraksiyon ve Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemine Etki Eden Faktörlerin Değerlendirilmesi

Şeker otu ile yapılan bu tez çalışması kapsamında ultrases destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenler süre (5 – 50 dk.) ve sıcaklık (20 – 55 °C) olarak belirlenmiştir. EtOH konsantrasyonu (%50), çözücü oranı (118 mL/g) ve güç (540 W) sabit tutulmuştur. Üç tanesi merkez nokta olmak üzere iki faktörlü deneme dizaynı 11 deneyden oluşmuştur. Oluşturulan 11 deney için bağımsız değişkenler ve analiz sonuçlarına bağlı olarak bağımlı değişkenler Çizelge 4.6’da verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, rebaudiozit A miktarının 32,17 ile 43,92 mg/g arasında, steviozit miktarının 53,14 ile 70,55 mg/g arasında, TFM miktarının 47,66 ile 68,76 mg GAE/g arasında, TF miktarının 33,41 ile 48,00 mg KE/g arasında değiştiği; TEAK (ABTS) değerinin ise 634,38 ile 874,45 $\mu\text{mol TE/g}$ aralığında değiştiği görülmektedir. Rebaudiozit A ve steviozitin ultrases destekli ekstraksiyon yöntemine ait örnek kromatogram Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Ultrases destekli ekstraksiyon yöntemi ile rebaudiozit A (1) ve steviozit (2) ait örnek bir kromatogram

Çizelge 4.6. Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde kullanılan parametreler ve analizler sonucunda elde edilen bağımlı değişkenlere ait sonuçlar

Deney No*	Bağımsız değişkenler				Bağımlı değişkenler		
	Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Rebaudiozit A (mg/g)	Steviozit (mg/g)	TFM (mg GAE/g)	TF (mg KE/g)	TEAK (ABTS) (μmol TE/g)
1	28	20	36,26	57,17	51,25	36,86	716,60
2	50	38	41,15	63,30	65,61	45,52	804,73
3	43	50	42,29	70,55	68,76	48,00	851,81
4	28	38	36,96	59,46	61,06	40,28	743,07
5	5	38	32,17	53,14	49,65	33,89	644,82
6	28	38	38,20	59,07	60,60	41,03	746,76
7	12	25	32,61	54,72	47,66	33,41	634,38
8	28	55	43,92	70,45	64,05	45,25	874,45
9	12	50	38,22	62,24	56,25	39,83	776,66
10	43	25	39,33	59,60	57,59	41,93	776,85
11	28	38	38,43	59,86	60,08	40,35	742,81

*Harmanlanmış sıra

Ultrases destekli ekstraksiyon işlemine ait model regresyon katsayıları ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.7’de verilmiştir. Uyum katsayıları (R^2) değeri rebaudiozit A için 0,9812; steviozit için 0,9947; TFM miktarı için 0,9981; TF miktarı için 0,9965; TEAK (ABTS) için ise 0,9996 olduğu görülmektedir. Uyum eksikliği testi ele alındığında belirlenen tüm bağımlı değişkenlere ait uyum eksikliği istatistiki açıdan önemsiz ($P>0,05$) olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Bu sonuç, uygulanan modelin deneysel veri açısından anlamlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7 incelendiğinde rebaudiozit A için sıcaklık ve süre bağımsız değişkenlerinin etkili olduğu görülmüştür ($P<0,001$). Etkileşimli etkiler istatistiki olarak anlamlı bulunmazken ($P>0,05$), ikinci derece etkiler incelendiğinde sıcaklık istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($P<0,05$).

Steviozit miktarı için bağımsız değişkenlerin etkisi incelendiğinde sıcaklık ve sürenin ($P<0,001$) etkili olduğu, etkileşimli etkilerin istatistiki olarak anlamlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır ($P<0,05$). İkinci derece etkilerden sıcaklık değişkeninin istatistiki olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0,001$).

Bağımsız değişkenlerin TFM miktarı üzerine etkisi incelendiğinde sıcaklık ve sürenin ($P<0,001$), etkileşimli etkiler incelendiğinde ($P<0,05$) ayrıca ikinci derece etkileri ele alındığında her iki değişkenin istatistiki açıdan anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0,001$).

İşlem parametrelerinin TF miktarına etkisi incelendiğinde sıcaklık ve süre parametrelerinin her ikisinin de ($P<0,001$) istatistiki olarak anlamlı olduğu, etkileşimli etkiler ve ikinci derece etkileri ele alındığında ise istatistiki açıdan önemsiz olduğu görülmüştür.

Bağımsız değişkenlerin TEAK (ABTS) üzerine etkisi incelendiğinde sıcaklık ve süre değişkenlerinin ($P<0,001$) etkili olduğu, etkileşimli etkiler ve ikinci derece etkileri istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur ($P<0,001$).

Yanıt yüzey metodunda bağımlı değişkenler olarak verilen rebaudiozit A miktarı, steviozit miktarı, TFM miktarı, TF miktarı, TEAK (ABTS) değerine ait model denklemleri sıcaklık (A), süre (B) bağımsız değişkenlerine bağlı sadece istatistiki olarak anlamlı ($P<0,05$) model parametreleri kullanılarak verilmiştir.

Model denklemi: $Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_{12}(AxB) + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2$

$$Y \text{ (Rebaudiozite A)} = 29,62 - 0,23x(A) + 0,45x(B) + 6,86 \times 10^{-3}x(A^2)$$

$$Y \text{ (Steviozite)} = 64,30 - 0,90x(A) + 0,15x(B) + 4,35 \times 10^{-3}x(AxB) - 0,02x(A^2)$$

$$Y \text{ (TFM)} = 21,79 + 1,02x(A) + 0,56x(B) + 3,27 \times 10^{-3}x(AxB) - 9,69 \times 10^{-3}(A^2) - 5,90 \times 10^{-3}(B^2)$$

$$Y \text{ (TF)} = 25,99 + 0,09x(A) + 0,35x(B)$$

$$Y \text{ (TEAK (ABTS))} = 599,18 - 5,74x(A) + 8,82x(B) - 0,09x(AxB) + 0,17x(A^2) - 0,04x(B^2)$$

Çizelge 4.7. Ultrases destekli ekstraksiyon işleminin yanıt yüzey metoduna (RSM) ait istatistiki analiz sonuçları ve model katsayıları

Model parametreleri	Katsayı	Rebaudiozit A	Steviozit	TFM	TF	TEAK (ABTS)
Kesişim	β_0	+29,62 ^{***}	+64,30 ^{***}	+21,79 ^{***}	+25,99 ^{***}	+599,18 ^{***}
Doğrusal						
Sıcaklık(°C), A	B ₁	-0,23 ^{***}	-0,90 ^{***}	+1,02 ^{***}	+0,09 ^{***}	-5,74 ^{***}
Süre (dk.), B	B ₂	+0,45 ^{***}	+0,15 ^{***}	+0,56 ^{***}	+0,35 ^{***}	+8,82 ^{***}
Etkileşimli						
Sıcaklık x Süre, A x B	β_{12}	-3,36x10 ⁻³	+4,35x10 ^{-3*}	+3,27x10 ^{-3*}	-4,38x10 ⁻⁴	-0,09 ^{***}
İkinci derece						
Sıcaklık x Sıcaklık, A ²	B ₁₁	+6,86x10 ^{-3*}	-0,02 ^{***}	-9,69x10 ^{-3***}	+2,30x10 ⁻³	+0,17 ^{***}
Süre x Süre, B ²	B ₂₂	-2,64x10 ⁻³	-1,70x10 ⁻³	-5,90x10 ^{-3***}	-1,27x10 ⁻³	-0,04 ^{***}
R²		0,9812	0,9947	0,9981	0,9965	0,9996
Ayarlanmış R²		0,9624	0,9894	0,9963	0,9931	0,9992
p-değeri		0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
F-değeri		52,23	187,44	534,91	287,93	2372,30
Uyum eksikliği (Lack of fit)		0,65	0,27	0,73	0,60	0,55

Önem düzeyleri: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Bağımsız değişkenlerin rebaudiozit A, steviozit, TFM, TF miktarlarına ve TEAK (ABTS) değerine olan etkileri Şekil 4.10'da verilmiştir.

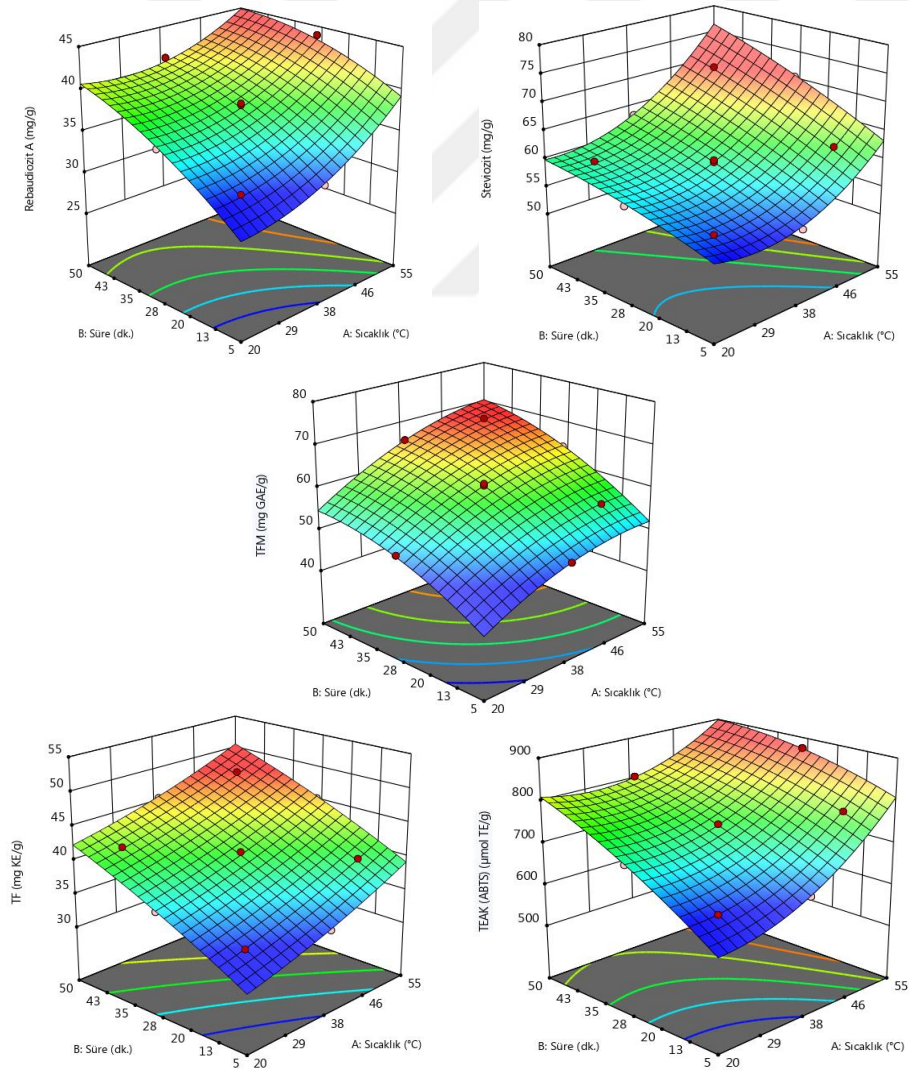
Şekil 4.10'da süre ve sıcaklık bağımsız değişkenlerinin rebaudiozit A üzerine etkileri incelendiğinde her iki parametrenin artmasıyla birlikte rebaudiozit A miktarında artış olduğu görülmektedir. Bağımsız değişkenlerin artmasıyla birlikte steviozit miktarının da arttığı sonucuna varılmaktadır. TFM miktarında ise her iki bağımsız değişkenin artması TFM miktarının doğrusal bir şekilde artışına sebep olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Süre ve sıcaklık artışı ile birlikte TF miktarında doğrusal bir artış olduğu görülmektedir. TEAK (ABTS) değeri ele alındığında süre ve sıcaklık artışının TEAK (ABTS) değerini artırdığı sonucuna ulaşılmaktadır. Her iki parametrenin maksimum olduğu noktalarda TEAK (ABTS) değerinin yüksek miktarda elde edildiği görülmektedir. Zlabur vd., (2015) ultrases destekli ekstraksiyon uygulamasının şeker otunda biyoaktif bileşenler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığını, steviol glikozitlerin kararlılığının sıcaklık ve süreye bağlı olduğunu vurgulamışlardır. Mevcut tez çalışması kapsamında çalışılan sıcaklık (20 – 55 °C) ve süre (5 – 50 dk.) aralıklarında ultrases destekli ekstraksiyon, çözücü penetrasyonu ile birlikte steviol glikozitlerin ve fenolik bileşenlerin geçişinin artırdığı yorumu yapılabilir.

Şeker otundan ultrases destekli ekstraksiyonun ele alındığı başka bir çalışmada, 12 dk. süre ve 360 W düşük ultrases gücünde su, EtOH ve izopropil alkol kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonunda rebaudiozit A miktarı sırasıyla 32,79; 33,85 ve 37,10 g/100 g olmuştur (Gasmalla vd., 2017). Zlabur vd. (2015), şeker otunda ultrases destekli ekstraksiyon işleminde sadece su ile yapmış oldukları ekstraksiyon sonrasında steviozit miktarının 51,12 ile 96,48 mg/g, rebaudiozit A'nın 3,92 ile 36,92 mg/g, TFM miktarının 24,60 ile 77,89 mg/g, TF miktarının 18,45 ile 62,48 mg/g ve TEAK (ABTS) değerinin 1,57 ile 2,58 mM TE/g arasında değiştiğini göstermişlerdir. Barba vd. (2015), 400 W güçte gerçekleştirdikleri ultrases destekli ekstraksiyon sonunda şeker otundaki TFM miktarının 9 ile 15,98 mg GAE/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Periche vd. (2015), 50 °C sıcaklık ve 1 dk. gibi kısa sürede ultrases destekli ekstraksiyon ile 14,12 mg/g rebaudiozit A, 39,06 mg/g steviozit elde etmişler; ultrases ekstraksiyonun düşük sıcaklık ve

sürede olmasına rağmen çözücü ekstraksiyon yöntemine kıyasla 1,5 kat verimli olduğunu vurgulamışlardır.

Yıldız-Öztürk vd. (2015), şeker otunda gerçekleştirdikleri mikrodalga ve ultrases destekli ekstraksiyon çalışmasında TFM ile TF miktarlarının ultrases destekli ekstraksiyonda daha verimli elde edildiğini belirtmişlerdir. Ekstraksiyon sonunda TFM miktarının 86,47 mg GAE/g, TF miktarının ise 126,70 mg KE/g olarak elde edildiği sonucuna ulaşmışlardır.



Şekil 4.10. Ultrases destekli ekstraksiyon işlemine ait bağımsız değişkenlerin rebudiozit A, steviozit, TFM, TF, TEAK (ABTS) miktarlarına etkisi

4.3. Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi, Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon, Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlemlerine ait Optimum İşlem Koşulları

Çözücü ekstraksiyon yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarına göre yanıt yüzey metodu ile belirlenen optimum işlem koşulları; 54 °C sıcaklık, 112 dk. süre, 118 mL/g çözücü oranı, %50 EtOH konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda rebaudiozit A miktarı 41,10 mg/g, steviozit miktarı 64,94 mg/g, TFM miktarı 66,58 mg GAE/g, TF miktarı 42,13 mg KE/g, TEAK (ABTS) değeri ise 786,45 µmol TE/g olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, şeker otundan çözücü ekstraksiyon yöntemi ile yapılmış çalışmada optimum işlem koşulları; %100 EtOH konsantrasyonu, 55 °C sıcaklık, ve 60 dk. süre olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullar sonucunda 16,35 mg/g steviozit, 16,39 mg/g rebaudiozit A tespit edilmiştir. EtOH konsantrasyonu ve sürenin etkileşimli etkilerinin mevcut tez çalışması ile benzer etkiler oluşturduğu görülmektedir. Rebaudiozit A ve steviozit miktarının belli bir noktaya kadar artış gösterdiği sonrasında artan EtOH konsantrasyonu ile birlikte azalmaya başladığı rapor edilmiştir (Ameer vd., 2017a). Rai vd. (2012), şeker otundan steviozitin su ile ekstraksiyonunda optimum işlem koşullarını 78 °C sıcaklık, 56 dk. süre, 1:14 (g:mL) katı/sıvı oranı olarak belirlemişlerdir. Bu koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon işleminde steviozit miktarı 104,5 mg/g olarak bulgulanmıştır. Aynı çalışmada, etkileşimli etkilerden sıcaklık x süre, çözücü oranı x sıcaklık ve çözücü oranı x sürenin steviozit miktarı için istatistiki olarak anlamlı etkileri olduğu bildirilmiştir. Bir diğer optimizasyon çalışmasında (Jentzer vd., 2015) açık havada kurutulmuş şeker otundan steviol glikozitlerin su ile ekstraksiyonunda optimum koşullar; 100 °C sıcaklık ve 4 dk. süre olarak belirlenmiştir. İşlem sonrasında steviozit + rebaudiozit A ekstraksiyon veriminin %91,8 olduğu sonucuna ulaşıldığı bildirilmiştir. Şeker otu yapraklarında partikül boyutunun küçültülmesiyle optimum koşullarda ekstraksiyon işlemi tekrar edilmiş ve steviol glikozitlerin miktarının %100,8'e yükseldiği görülmüştür. Sonuç olarak ekstraksiyon veriminin artmasına yönelik şeker otu matrisi ile çözücü arasındaki geçişin artması için partikül boyutunun önemli bir kriter olduğu görülmektedir (Jentzer vd., 2015).

Das vd. (2015)'nin şeker otunun su ile ekstraksiyonunda rebaudiozit A elde edilmiştir. Optimum koşullar; %2,36 çözücü oranı, 71 °C sıcaklık, 51 dk. süre olarak belirlenmiştir. Optimum şartlarda yapılan ekstraksiyon işleminde rebaudiozit A miktarının %73,12 olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda RSM ile belirlenen optimum işlem koşulları; 51 °C sıcaklık, 16 dk. süre olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları incelendiğinde rebaudiozit A miktarı 42,84 mg/g, steviozit miktarı 68,02 mg/g, TFM miktarı 67,75 mg GAE/g, TF miktarı 43,40 mg KE/g TEAK (ABTS) değerinin ise 838,57 µmol TE/g olarak tespit edilmiştir.

Literatür incelendiğinde bu tez çalışmasına benzer şekilde mikrodalga destekli ekstraksiyon ile optimizasyon çalışmalarına rastlanmaktadır. Yapılan bir çalışmada şeker otu ile mikrodalga destekli ekstraksiyonda optimum işlem koşulları; 4 dk. süre, %75 EtOH konsantrasyonu, 160 W güç olarak belirlenmiş ve bu işlem parametrelerine göre steviozit miktarı 19,58 mg/g, rebaudiozit A miktarı 15,3 mg/g olarak bulgulanmıştır (Ameer vd., 2017b). Küstüm otunda yapılan mikrodalga destekli biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonuna yönelik bir çalışmada optimum koşullar; %87,5 metanol konsantrasyonu, %25 mikrodalga gücü, 60 °C sıcaklık ve 15 dk. süre olarak belirlenmiştir. Optimum koşul ekstraksiyon işleminde TFM miktarı 635 mg GAE/g, TF miktarı 61,53 mg RU/g, TEAK (ABTS) değeri %76,1 elde edilmiştir (Ganesan vd., 2018). Kuş kirazında mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde optimum koşullar; %53,6 EtOH konsantrasyonu, 300 W güç ve 5 dk. süre olarak belirlenmiştir. Optimum koşul ekstraktında gerçekleştirilen analizde TFM miktarı 420,1 mg GAE/100 g olarak belirlenmiştir. Etkileşimli etkilere göre süre x EtOH konsantrasyonunun mevcut tez çalışmasındaki çözücü ekstraksiyon yöntemindeki TFM miktarına olan etkileri ile benzerlik göstermektedir. EtOH konsantrasyonunun %50 – 55 arasında olduğu aralığa kadar TFM miktarının arttığı daha yüksek konsantrasyonlarda ise azaldığı görülmektedir (Simic vd., 2016). *Gordonia axillaris* meyvesinde yapılan mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi sonunda %36,89 EtOH konsantrasyonu, 29,56 mL/g çözücü oranı, 71,04 dk. süre, 40 °C sıcaklık ve 400 W güç olarak optimum koşullar belirlenmiştir. TFM miktarı 17,69 mg GAE/g, TF miktarı 3,11 mg QE/g, TEAK değeri 198,16 µmol TE/g olarak saptanmıştır (Li vd., 2017).

Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde yapılan analiz sonuçlarına göre RSM ile belirlenen optimum işlem koşulları; 50 °C sıcaklık, 43 dk. süre, olarak belirlenmiştir. Analizler sonucunda rebaudiozit A miktarının 42,94 mg/g, steviozit miktarının 70,35 mg/g, TFM miktarının 68,61 mg GAE/g, TF miktarının 47,69 mg KE/g, TEAK (ABTS) değerinin ise 853,74 µmol TE/g olduğu görülmektedir.

Literatür incelendiğinde ultrases destekli ekstraksiyon ile ilgili optimizasyon çalışmalarına rastlanmaktadır. Şeker otunda ultrases destekli ekstraksiyon yapılan optimizasyon çalışmasında optimum işlem koşulları 10 dk. süre, 81,2 °C sıcaklık ve 22 mm ultrases prob çapı olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon işleminde steviozit miktarı 96,48 mg/g, rebaudiozit A 36,92 mg/g, TFM miktarı 77,89 mg/g, TF miktarı 62,48 mg/g, TEAK (ABTS) değeri ise 2,58 mM TE/g olarak elde edilmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon, uygulama süresinin kısa olması ve düşük enerji tüketimi nedeniyle çevre dostu bir yöntem olarak görülmüştür. Ayrıca ultrasesin biyoaktif bileşenler üzerinde olumsuz bir etkisinin olmadığı, steviol glikozitlerin kararlılığının sıcaklık ve zamana bağlı olduğu vurgulanmıştır (Zlabur vd., 2015). Liu vd. (2010), şeker otunda ultrases destekli optimizasyon çalışması gerçekleştirmişler ve optimum koşulları 68 °C sıcaklık, 60 W ultrases gücü, 32 dk. süre olarak belirlemişlerdir. İşlem sonrasında şeker otundan steviozit verimi %43,62, rebaudiozit A verimi ise %28,86 olarak elde edilmiştir.

Farklı bir yöntem olarak enzimatik ekstraksiyon ile şeker otunda steviozit miktarına yönelik optimizasyon çalışmasındaki optimum koşulların bu tez çalışması kapsamındaki ultrases destekli ekstraksiyondaki optimum koşullar ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Selüloz, pektinaz ve hemiselüloz ile yapılan ekstraksiyonda 51 – 54 °C sıcaklık, 36 - 45 dk. süre aralığı ve her bir enzim için %2 enzim oranı en iyi sonuçları elde etmeyi sağlamıştır. En yüksek steviozit miktarı hemiselüloz ile 369,23 µg olarak tespit edilmiştir (Puri vd., 2012). Ceviz unundan fenolik madde ekstraksiyonuna yönelik yapılan optimizasyon çalışmasında eş zamanlı ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmıştır. Optimum işlem koşulları 294,34 W mikrodalga gücü, 93,5 W ultrases gücü, 43,38 °C sıcaklık ve 4,33 dk. süre olarak belirlenmiştir. İşlemler sonucunda TFM miktarı 34,91 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir. Ceviz ununda görülen sıcaklık ve sürenin etkileşimli etkileri mevcut tez çalışması ile benzer etkiler göstermektedir. TFM miktarı, sıcaklık parametresi arttıkça artmaktadır fakat ekstraksiyon süresinin artması ile birlikte azalmaktadır. Ayrıca

mikrodalgaanın hücre matrisine nüfuzu ile polar moleküllerin etkileşimi sonucunda basınç oluşacağı belirtilmiştir. Oluşan basınçla birlikte hücre duvarının bozunması ile fenolik bileşenlerin geçişinin kolaylaşacağı vurgulanmıştır (Luo vd., 2017). Rodrigues vd. (2008) tarafından yapılan hindistan cevizi kabuğu tozunda ultrases destekli optimizasyonda koşullar 4870 W/m² ultrases yoğunluğu, 15 dk. süre, %50 EtOH konsantrasyonu, 30 °C sıcaklık, 6,5 pH değeri olarak elde edilmiştir. TFM miktarı 22,44 mg/g olarak elde edilmiştir. Ayrıca sıcaklık ve sürenin çözücü konsantrasyonu ile olan etkileşimli etkilerinin mevcut tez çalışmasındaki TFM miktarı ile benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. EtOH konsantrasyonunun %50 olduğu noktada maksimum miktara ulaşıldığı artan konsantrasyonla birlikte TFM miktarının azaldığı sonucuna ulaşılmaktadır.

Zeytin yaprağında ultrases destekli ekstraksiyon ile optimizasyon çalışması incelendiğinde %50 EtOH konsantrasyonu, 60 dk. süre, 500:10 mg/mL katı/sıvı oranı olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemi sonunda, TFM miktarının 25,06 mg GAE/g olduğu sonucuna ulaşılmaktadır (Şahin ve Şamlı, 2013). Buğday kepeğinde yapılan ultrases destekli ekstraksiyon çalışmasında optimum koşulların %64 EtOH konsantrasyonu, 60 °C sıcaklık ve 25 dk. süre olduğu belirtilmektedir. Bu koşullarda TFM miktarı 3,12 mg GAE/g olarak tespit edilmiştir (Wang vd., 2008).

Bir başka çalışmada ise üzüm çekirdeğinde ekstraksiyon sonunda optimum koşullar belirlenmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde 40 kHz frekans ve 250 W ultrases gücü sabit tutulmuştur. TFM için %53,15 EtOH konsantrasyonu 56,03 °C sıcaklık, 29,03 dk. süre ve öngörülen miktar 5,44 mg GAE/100 mL olmuştur. Antioksidan kapasite değeri için belirlenen optimum koşullar %53,06 EtOH konsantrasyonu, 60,65 °C sıcaklık, 30,58 dk. süre olarak belirlenmiş, öngörülen değer ise 12,31 mg/mL olarak belirtilmiştir. Gerçekleştirilen analizler sonucunda üzüm çekirdeğinde TFM miktarı 5,41 mg GAE/100 mL, antioksidan kapasite değeri 12,28 mg/mL elde edilerek öngörülen değerler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminin fenolik maddeleri, antioksidanları ve antosiyaninleri bitki materyalinden çıkarma işleminde etkili olduğu belirtilmektedir. Ayrıca diğer yüksek sıcaklık ve uzun süreli ekstraksiyon tekniklerine alternatif olabileceği gibi ultrasesin hidrasyon ve parçalama işlemini artırdığı rapor edilmiştir (Ghafoor vd., 2009).

Çizelge 4.8. Ekstraksiyon yöntemlerine ait optimum işlem koşulları, bağımlı değişkenlere ait sonuçlar

Çözücü Ekstraksiyon Yöntemi ile Ekstraksiyon İşlem Parametreleri						
EtOH Kons. (%)	Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Çözücü oranı (mL/g)	Güvenilirlik	Parametre	Sonuçlar
50	112	54	118	1,000	Rebaudiozit A Steviozit TFM TF TEAK(ABTS)	41,10 mg/g 64,94 mg/g 66,58 mg GAE/g 42,13 mg KE/g 786,45µmol TE/g
Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon İşlem Parametreleri						
Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Güvenilirlik			Parametre	Sonuçlar
16	51	0,967			Rebaudiozit A Steviozit TFM TF TEAK(ABTS)	42,84 mg/g 68,02 mg/g 67,75 mg GAE/g 43,40 mg KE/g 838,57µmol TE/g
Ultrases Destekli Ekstraksiyon İşlem Parametreleri						
Süre (dk.)	Sıcaklık (°C)	Güvenilirlik			Parametre	Sonuçlar
43	50	0,957			Rebaudiozit A Steviozit TFM TF TEAK(ABTS)	42,94 mg/g 70,35 mg/g 68,61 mg GAE/g 47,69 mg KE/g 853,74µmol TE/g

4.3.1. LC/Q-TOF/MS ile Şeker Otunda Bulunan Bileşenlerin Tanımlanması

Son 20 yılda uçuş süreli kütle spektrometreleri (TOF/MS) gıda bileşenlerinin maddeleri kalitatif olarak tanımlanmasında kullanılmaktadır. TOF cihazları kısa sürede (milisaniye) spektrumları toplama kabiliyetine sahiptir. Tüm iyonlar aynı anda uçuş tüpünden atılır. Küçük kütleli iyonlar büyük olanlara göre daha hızlı hareket eder. Bu nedenle iyonlar dedektöre farklı zamanlarda ulaşmaktadır. İyon hızı kütle ile doğru orantılı olduğundan kütle/yük oranı (m/z) iyon dedektöre ulaştığı zaman hesaplanabilir duruma gelmektedir (Williamson ve Bartlett, 2007). LC/Q-TOF/MS cihazı orta derecede hassasiyet, yüksek seçicilik ve doğruluk seviyesi ile doğru parça kütleleri (fragment) elde etme özelliklerine sahiptir (Ferrer ve Thurman, 2003).

Mevcut tez çalışmasında çözücü ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyona ait optimum işlem koşullarında gerçekleştirilen ekstraktlara LC/Q-TOF/MS analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda şeker otuna tatlılık veren diterpen glikozitler dışında fenolik bileşikler, flavonoidler, amino asitler, yağ asitleri olmak üzere 65 bileşen tanımlanmıştır. Elde edilen bileşenler pozitif ve negatif polarite modülünde Çizelge 4.9’da verilmiştir. Ayrıca kütle hata limiti genel olarak 5 ppm ve altındaki değerler alınarak belirlenmiştir (Karaköse vd., 2015). Diterpen glikozitler, fenolik bileşikler ve flavonoidler daha çok negatif polaritede tanımlanmıştır.

Çizelge 4.9 incelendiğinde optimum koşullarda gerçekleştirilen LC/Q-TOF/MS analizinde pozitif ve negatif polaritede 10 diterpen glikozit elde edilmiştir. Elde edilen diterpen glikozitler 15,18 – 22,69 dk.’lar arasında alıkonmuş ve m/z oranları sırasıyla; rebaudiozit D (1127,484), rebaudiozit B (803,3774), izorebaudiozit A (989,4188), rebaudiozit A (965,4322), izosteviozit (803,3774), rebaudiozit C (949,4379), rebaudiozit F (935,4207), steviozit (827,3671), steviolbiozit (665,3143), izostevioldür (317,2138). İzorebaudiozit A, steviozit, steviolbiozit pozitif polarite gösterirken geri kalan diterpen glikozitlerin negatif polarite gösterdiği görülmektedir. Steviol glikozitlerden izorebaudiozit A, steviozit, steviolbiozit çözücü ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyonda elde edilirken diğer glikozitler yalnızca çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyonda açığa çıkmıştır. Literatür incelendiğinde şeker otunda LC/Q-TOF/MS ile yapılan çalışmaların mevcut

olduğu görülmüştür. Diterpen glikozitlerden rebaudiozit A, C, D, E, F, steviozit ve steviolbiozitin Espinoza vd. (2014); Ciulu vd. (2017); Molina Calle vd. (2017); Formigoni vd. (2018) tarafından önceki çalışmalarda elde edildiği görülmektedir. Disakkaritlerden sükroz yalnızca çözücü ekstraksiyon yönteminde tanımlanmış ve m/z oranı 341,1097 olarak elde edilmiştir. Molina Calle vd. (2017), şeker otunun karakterizasyonunu belirleme amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmada disakkarit elde ederek m/z oranını 360,1504 olarak saptamışlardır.

Elde edilen fenolik bileşiklerden kafeik asidin m/z oranı 179,0357 olarak elde edilmiş olup çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Kafeik asit türevlerinden 1,3-Dikafeolkuinik asit m/z oranı 517,1345 olarak belirlenerek tüm optimum koşul ekstraktlarında tanımlandığı görülmüştür. Fenolik bileşiklerden klorojenik asit (353,0889) tüm ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Muanda vd., (2011), şeker otunda su ve metanol + su ile yaptıkları ekstraksiyon işlemi sonrasında hidrosinnamik asit türevi olan kafeik asit ve klorojenik asit varlığını göstermişlerdir. Şeker otunda yapılan bir başka çalışmada klorojenik asit ve kafeik asit elde edilmiştir. Kafeik asidin taze şeker otu yapraklarında tespit edilmediği görülmüştür (Lemus-Mondaca vd., 2016). Klorojenik asit ve kafeik asidin kan dolaşımı için etkili olması ile birlikte LDL miktarını düşürerek kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma ve kanser hücrelerinin oluşumunu engelleyici etkilerinin olduğu vurgulanmıştır (Olthof vd., 2001).

Boots vd. (2008), flavonoid ailesinin önemli bir üyesi olan kuersetinin osteoporoz, kanser, kardiyovasküler hastalıklara karşı etkili olduğunu belirtmişlerdir. Mevcut tez çalışmasında kuersetin, (303,0503) ile türevleri kuersetin 3-galaktozit (463,0898) ve herbasetin (303,0503) bileşenleri tüm ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Bogle ve Mendes (2015), şeker otunun kuersetin ve kafeik asit bileşenlerini içerdiğini belirtmişlerdir.

Kumarin türevi olan eskulin (339,0734) tüm ekstraksiyon yöntemlerinde, eskuletin (177,0201) ve 3-Hidroksikumarin (161,0249) bileşikleri ise yalnızca çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Kumarin ve türevlerinin antioksidan etkisinin yanı sıra LDL değerini düşürdüğü ve hücrel hasara karşı etkili olarak kanserojen etkiyi azalttığı vurgulanmıştır

(Shinde vd., 2014). Daha önce şeker otu ile ilgili yapılmış çalışmalarda eskulin, eskuletin ve 3-Hidroksikumarin bileşiklerine rastlanmamıştır.

Bir flavonol türü olan kaempferol türevi kaempferol-7-o-glikozit bileşiğinin m/z oranı 447,0953 olarak tanımlanmıştır. Bu bileşen çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde belirlenmiştir. İzoflavon türü olan genistein (433,1126) ise tüm ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır.

Flavonoidlerden diosmetinin m/z oranı 299,0574 olarak elde edilmiş ve yalnızca çözücü ekstraksiyon yönteminde tanımlanmıştır. Kastisin (373,0943) bir flavonoid türü olmakla birlikte şeker otunda çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Dioonflavon (623,1937) yalnızca mikrodalga destekli ekstraksiyonda belirlenmiştir. Flavonol türü olan kaempferol türevi kaempferol-7-o-glukozit (447,0953) çözücü ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde belirlenmiştir. Şeker otu ile ilgili yapılmış çalışmalarda diosmetin, kastisin, dioonflavon, kaempferol-7-o-glukozit hakkında bir bulguya rastlanmamıştır.

L-Tirozin, D-Triptofan birer amino asittir ve m/z oranlarının sırasıyla 181,0818; 203,083 olarak elde edildiği görülmektedir. L-Tirozin yalnızca çözücü ekstraksiyon yönteminde, D-Triptofan ise çözücü ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Triptofan türevi olan kynurenik asit (190,0503), çözücü ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde bulgulanmıştır. Histidin türevi olan ürokanik asit (139,0499) tüm optimum ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır.

Prostaglandin bir lipittir ve bu tez çalışmasında türevlerinin belirlendiği görülmektedir. Bunlar; 16-fenoksi tetranor Prostaglandin E2 (411,1783), 19(R)-hidroksi-PGF1 α (395,2403), 11 β -Prostaglandin F1 β (379,2453), 11-deoksi-PGF1 β (363,2501), 16,16-dimetil-6-keto Prostaglandin E1 (419,24), 11-deoksi-PGE1 (361,2348), 1a,1b-dihomo-PGE1 (405,2607), 16,16-dimetil-PGD2 (403,2457), 11-Deoksi-16,16-dimetil-PGE2 (387,2506) tüm optimum koşullarda yapılmış ekstraksiyon yöntemlerinde; 8-izo Prostaglandin F1 β (379,2453), 15(R),19(R)-hidroksi Prostaglandin E1 (396,2235), 20-etil-PGE2 (403,2457), PGF2 β (353,2348) yalnızca çözücü ekstraksiyon yönteminde, 5-trans Prostaglandin D2 (375,2136), 8-izo-PGF2 β (377,2294) yalnızca mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde, 8-izo Prostaglandin F1 α (379,2452) yalnızca ultrases destekli

ekstraksiyon yönteminde; 15(R)-PGE1 (377,2294) çözücü ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Melis, (1995), şeker otunun prostaglandin aktivitesi gösterdiğini vurgulamıştır.

Alfa linoleik asit türevi olan stearidonik asit (277,2161) tüm ekstraksiyon yöntemlerinde; stearik asit (283,2657) çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde ve türevi olan stearamid (284,2948) bileşiği tüm ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Tadhani ve Subhash, (2006); Marcinek ve Krejpcio (2015); Siddique vd., (2016); Formigoni vd. (2018), yapmış oldukları çalışmalarda şeker otunda stearik asit tespit etmişlerdir. Bir diğer yağ asidi türü olan melisik asit (451,4542) yalnızca çözücü ekstraksiyon yönteminde elde edilmiştir. Literatürde melisik asite dair şeker otuyla ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Serbest asit olarak tanımlanan butaprost (431,2768) optimum koşullarda gerçekleştirilen tüm ekstraksiyon yöntemlerinde belirlenmiştir. Glikoproteinlerden gliserofosfokolin bileşiğinin m/z oranı 258,1099 olarak elde edilmiştir. Bu bileşik tüm ekstraksiyon yöntemlerinde tanımlanmıştır. Bitkisel bir hormon olan trigonellin (138,0553) çözücü ekstraksiyon ve mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemlerinde bulgulanmıştır.

Çizelge 4.9. Optimum koşul ekstraktlarındaki pozitif ve negatif polarite gösteren bileşikler ve bunların tanımlanmasını destekleyen ana parametreler

Bileşen	Moleküler formül	Polarite	RT	m/z-(ppm)	Skor	Ekstraksiyon
Sükroz	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	-	1,22	341,1097 (-2,35)	95,71	Ç
Gliserofosfokolin	C ₈ H ₂₁ NO ₆ P	+	1,28	258,1099 (0,8)	91,91	Ç, MD, US
Trigonellin	CH ₈ NO ₂	+	1,39	138,0553 (-2,59)	85,48	Ç, MD
L-Tirozin	C ₉ H ₁₁ NO ₃	+	1,73	182,0818 (-3,33)	90,46	Ç
Ürokanik asit	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	+	1,85	139,0499 (1,89)	88,95	Ç, MD, US
Guanozin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	-	2,19	282,0848 (-1,36)	97,55	Ç, MD, US
Adenozin	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	+	2,22	268,1044 (-1,39)	100	Ç, US
Salidrozyd	C ₁₄ H ₂₀ O ₇	+	3,19	323,1107 (-1,98)	72,28	Ç, MD, US
D-Triptofan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	-	3,31	203,083 (-2,14)	97,42	Ç, MD
Klorojenik asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	3,60	353,0889 (-3,08)	99,27	Ç, MD, US
Eskuletin	C ₉ H ₆ O ₄	-	6,02	177,0201 (-4,23)	95,52	Ç, MD
Eskulin	C ₁₅ H ₁₆ O ₉	-	6,29	339,0734 (-3,6)	97,52	Ç, MD, US
Knürenik asit	C ₁₀ H ₇ NO ₃	+	6,31	190,0503 (-2,48)	95,75	Ç, MD
Dioonflavon	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₀	+	6,64	623,1937 (-4)	38,74	MD
Kafeik asit	C ₉ H ₈ O ₄	-	7,05	179,0357 (-4,19)	99,91	Ç, MD
3-Hidroksikumarin	C ₉ H ₆ O ₃	-	7,38	161,0249 (-3,27)	85,08	Ç, MD
Prim-o-glukozilsimifugin	C ₂₂ H ₂₈ O ₁₁	+	9,11	469,1684 (4,3)	83,34	Ç
Herbacetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	+	12,22	303,0503 (-1)	92,92	Ç, MD, US
Kuersetin 3-galaktozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	-	12,57	463,0898 (-3,35)	98,82	Ç, MD, US
Kuersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	+	12,63	303,0503 (-1)	92,74	Ç, MD, US
İzokuersitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	+	12,67	465,1029 (-0,33)	93,02	US
16-fenoksi tetranor Prostaglandin E2	C ₂₂ H ₂₈ O ₆	+	13,35	411,1783 (-1,22)	68,89	Ç, MD, US
Kaempferol-7-o-glukozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	-	13,43	447,0953 (-4,5)	83,38	Ç, MD
19(R)-hidroksi-PGF1 α	C ₂₀ H ₃₆ O ₆	+	14,38	395,2403 (0,14)	83,71	Ç, MD, US

Çizelge 4.9. Optimum koşul ekstraktlarındaki pozitif ve negatif polarite gösteren bileşikler ve bunların tanımlanmasını destekleyen ana parametreler (Devamı)

Bileşen	Moleküler formül	Polarite	RT	m/z-(ppm)	Skor	Ekstraksiyon
Genistein	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	+	14,50	433,1126 (-0,4)	100	Ç, MD, US
1,3-Dikafekuinik asit	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	+	14,66	517,1345 (0,27)	98,54	Ç, MD, US
Rebaudiozit D	C ₅₀ H ₈₀ O ₂₈	-	15,18	1127,484 (-6,78)	100	Ç, MD
11β-Prostaglandin F1β	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	+	16,37	379,2453 (0,63)	89,2	Ç, MD, US
Bromheksin	C ₁₄ H ₂₀ Br ₂ N ₂	+	16,54	375,0056 (2,2)	91,53	Ç, MD, US
Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	-	16,71	299,0574 (-4,2)	94,98	Ç
Hierasin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	-	16,88	301,0364 (3,31)	99,72	Ç, MD
Rebaudiozit B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	-	17,22	803,3774 (-8,3)	28,34	Ç, MD
Izorebaudiozit A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	+	17,37	989,4188 (1,28)	100	Ç, MD, US
Rebaudiozit A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	-	17,42	965,4322 (-9)	82,76	Ç, MD
15(R)-PGE1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	+	17,54	377,2294 (0,87)	100	Ç, US
8-izo-PGF2β	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	+	17,58	377,2294 (1,28)	100	MD
İzosteviozit	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	-	17,78	803,3774 (-8,3)	86,09	Ç, MD
11-deoksi-PGF1β	C ₂₀ H ₃₆ O ₄	+	18,05	363,2501 (1,39)	84,6	Ç, MD, US
Rebaudiozit C	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	-	18,55	949,4379 (-9,82)	88,58	Ç, MD
Rebaudiozit F	C ₄₃ H ₆₈ O ₂₂	-	18,62	935,4207 (-8,32)	81,85	Ç, MD
8-izo Prostaglandin F1β	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	+	18,91	379,2453 (0,66)	100	Ç
15(R),19(R)-hidroksi Prostaglandin E1	C ₂₀ H ₃₄ O ₆	+	18,94	393,2235 (3,5)	100	Ç
Steviozit	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	+	19,51	827,3671 (-0,02)	100	Ç, MD, US
8-iso Prostaglandin F1α	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	+	20,09	379,2452 (0,78)	100	US
16,16-dimetil-6-keto Prostaglandin E1	C ₂₂ H ₃₆ O ₆	+	21,09	419,24 (1,03)	100	Ç, MD, US
11-deoksi-PGE1	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	+	21,20	361,2348 (-0,28)	100	Ç, MD, US

Çizelge 4.9. Optimum koşul ekstraktlarındaki pozitif ve negatif polarite gösteren bileşikler ve bunların tanımlanmasını destekleyen ana parametreler (Devamı)

Bileşen	Moleküler formül	Polarite	RT	m/z-(ppm)	Skor	Ekstraksiyon
Steviolbiozit	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	+	21,26	665,3143(0,11)	65,81	Ç, MD, US
PGF2β	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	-	22,17	353,2348 (-4,19)	87,62	Ç
1a,1b-dihomo-PGE1	C ₂₂ H ₃₈ O ₅	+	22,34	405,2607 (1,05)	100	Ç, MD, US
Limaprost	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	+	22,44	403,2457 (-0,41)	100	Ç, MD, US
5-trans Prostaglandin D2	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	+	22,68	375,2136 (1,8)	89,62	MD
Izosteviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	-	22,69	317,2138 (-5,08)	50,88	Ç, MD
16,16-dimetil-PGD2	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	+	22,73	403,2457 (-0,41)	89,89	Ç, MD, US
Fitosfingozin	C ₁₈ H ₃₉ NO ₃	+	22,92	318,3001 (0,6)	84,43	Ç
Kastisin	C ₁₉ H ₁₈ O ₈	-	22,97	373,0943 (-3,68)	94,35	Ç, MD
20-etill-PGE2	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	+	23,57	403,2457 (-0,59)	100	Ç
15-F2t-IsoP	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	+	23,63	377,2294 (0,87)	89,06	Ç, MD, US
Butaprost	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	+	24,56	431,2768 (-0,07)	41,07	Ç, MD, US
Stearidonik Asit	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	+	24,76	277,2161 (-0,7)	80,3	Ç, MD, US
11-Deoksi-16,16-dimetil-PGE2	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	+	24,93	387,2506 (0,07)	100	Ç, MD, US
1-Palmitoillizofosfatidilkolin	C ₂₄ H ₅₁ NO ₇ P	+	25,22	496,3394 (0,52)	99,78	Ç, MD, US
3b,12a-Dihidroksi-5b-kolanik asit	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	+	26,93	415,2814 (0,99)	59,28	Ç, MD, US
Stearik asit	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	-	28,95	283,2657 (-4,93)	68,58	Ç, MD
Stearamid	C ₁₈ H ₃₇ NO	+	29,01	284,2948 (-0,03)	93,05	Ç, MD, US
Melissik asit	C ₃₀ H ₆₀ O ₂	-	31,28	451,4542 (-4,79)	64,57	Ç

5. SONUÇ

Şeker otunda steviol glikozitlerin ve fenolik maddelerin farklı ekstraksiyon teknikleriyle değerlendirildiği bu tez çalışmasında çözücü ekstraksiyon yöntemi, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve ultrases destekli ekstraksiyon işlemleri uygulanmış ve sonrasında her bir ekstraksiyon için optimum işlem koşulları belirlenmiştir. Steviol glikozitlerin ekstraksiyonunda ilk adımda yapılan çözücü ekstraksiyon yöntemi sonunda elde edilen sonuçlara göre diğer ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çözücü ekstraksiyon işleminde bağımsız değişkenler olarak EtOH konsantrasyonu, çözücü oranı, sıcaklık ve süre olarak belirlenmiştir. Bu işlem sonrasında elde edilen optimum koşullardan EtOH konsantrasyonu ve çözücü oranı mikrodalga destekli ekstraksiyonda ve ultrases destekli ekstraksiyon işleminde sabit tutulmuştur. Mikrodalga destekli ekstraksiyon işleminde sabit tutulan EtOH konsantrasyonu, çözücü oranı ve mikrodalga gücü haricinde yanıt yüzey metodu (RSM) ile sıcaklık ve süre parametreleri bağımsız değişkenler olarak belirlenmiştir. Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde ise sabit tutulan EtOH konsantrasyonu, çözücü oranı ve ultrases gücü haricinde sıcaklık ve süre bağımsız değişkenler olarak belirlenmiş ve RSM ile deneme planı oluşturulmuştur. Tüm ekstraksiyon işlemleri içinen yüksek miktarlarda steviol glikozitler, fenolik madde, flavanoid ve antioksidan kapasite değerlerinin elde edilmesi amaçlanarak optimum işlem koşulları belirlenmiştir.

Çözücü ekstraksiyon yönteminde optimum koşullar %50 EtOH konsantrasyonu, 118 mL/g çözücü oranı, 54 °C sıcaklık ve 112 dk. süre olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonunda; rebaudiozit A miktarı 41,10 mg/g, steviozit miktarı 64,94 mg/g; TFM miktarı 66,58 mg GAE/g, TF miktarı 42,13 mg KE/g, TEAK (ABTS) değeri ise 786,45 µmol TE/g olarak belirlenmiştir.

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde, %50 EtOH konsantrasyonu, 118 mL/g çözücü oranı ve 700 W güç sabit tutulmuş optimum işlem parametreleri 51 °C sıcaklık ve 16 dk. süre olarak belirlenmiştir. Bu şartlarda rebaudiozit A miktarı 42,84 mg/g; steviozit miktarı 68,02 mg/g; TFM miktarı, 67,75 mg GAE/g, TF miktarı 43,40 mg KE/g, TEAK (ABTS) değeri 838,57 µmol TE/g olarak tespit edilmiştir.

Ultrases destekli ekstraksiyon işleminde %50 EtOH konsantrasyonu, 118 mL/g çözücü oranı ve 540 W ultrases gücü sabit tutulmuş; 50 °C sıcaklık ve 43 dk. süre optimum noktalar olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda rebaudiozit A miktarı 42,94 mg/g; steviozit miktarı 70,35 mg/g; TFM miktarı 68,61 mg GAE/g, TF miktarı 47,69 mg KE/g, TEAK (ABTS) değeri ise 853,74 μ mol TE/g olarak bulunmuştur.

Optimum koşullarda elde edilen ekstraktlarda LC/Q-TOF/MS analizi gerçekleştirilmiş ve toplam 65 bileşen tanımlanmıştır. Çözücü ekstraksiyonda 60 bileşen, mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminde 50, ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde ise 35 bileşen tanımlanmıştır.

Ultrases destekli ekstraksiyon yönteminde en yüksek verimde rebaudiozit A (42,94 mg/g), steviozit (70,35 mg/g), toplam fenolik madde (68,61 mg GAE/g), toplam flavonoid (47,69 mg KE/g) ve antioksidan kapasite değeri (853,74 μ mol TE/g) bulgulanmıştır. Ultrases, oluşturduğu ses dalgaları ve kavitasyon sonucunda steviol glikozitlerin ve fenolik maddelerin hücre matrisinden daha etkin bir şekilde salımını gerçekleştirdiği sonucuna ulaşılabilir. Ultrases destekli ekstraksiyon sayesinde bitkilerdeki hücre duvarlarının çözücü penetrasyonu ile birlikte istenen bileşenlerin geçişi hızlı ve verimli bir şekilde sağlanmaktadır (Tiwari vd., 2012). Mikrodalga destekli ekstraksiyon (16 dk.) ve ultrases destekli ekstraksiyon (43 dk.) yöntemlerinde kısa sürede verimli şekilde ekstraksiyon işlemleri gerçekleştiği görülmüştür. Süreden tasarruf edilmesi aynı zamanda daha az enerji harcanması anlamına gelmektedir. Bu avantajlarından dolayı ultrases ve mikrodalga çevre dostu teknolojiler olarak görülebilir. Optimum koşullardaki ekstraktlara uygulanan LC/Q-TOF/MS analizi incelendiğinde ise en çok bileşen çözücü ekstraksiyon yönteminde tanımlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, M. F. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* Bertoni plant. **African Journal of Food Science**, 4(5), 269-281.
- Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V. 2009. Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants. **In AIDIC Conference Series** (Vol. 9, pp. 1-8).
- Alupului, A., Calinescu, I., Lavric, V. 2012. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **UPB Science Bulletin, Series B**, 74(2), 1454-2331.
- Ameer, K., Bae, S. W., Jo, Y., Chung, N., Gao, Y., Kwon, J. H. 2017a. Optimization and modeling for heat reflux extraction of total yield, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves. **Separation Science and Technology**, 52(7), 1193-1205.
- Ameer, K., Bae, S. W., Jo, Y., Lee, H. G., Ameer, A., Kwon, J. H. 2017b. Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling. **Food Chemistry**, 229, 198-207.
- AOAC (1988) Official Method of Analysis. 7th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- AOAC (1998) Official Method of Analysis. 15th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Ashwell, M. 2015. *Stevia*, Nature's Zero-Calorie Sustainable Sweetener: A new player in the fight against obesity. **Nutrition today**, 50(3), 129.
- Atteh, J., Onagbesan, O., Tona, K., Decuypere, E., Geuns, J., Buyse, J. 2008. Evaluation of supplementary *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: Effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 92, 640–649.

- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: a review. **Journal of Food Engineering**, 117(4), 426-436.
- Azwanida, N. N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Medicinal and Aromatic Plants**, 4(3), 3-8.
- Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E. 2015. Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Journal of Food Engineering**, 149, 222-228.
- Belwal, T., Dhyani, P., Bhatt, I. D., Rawal, R. S., Pande, V. 2016. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, 207, 115-124.
- Bogle, I. D. L., Mendes, M. F. 2015. Evaluation of the effects and mechanisms of bioactive components present in hypoglycemic plants. **International Journal of Chemical and Biomolecular Science**, 1(3), 167-178.
- Boileau, A., Fry, J. C., Murray, R. 2012. A new calorie-free sugar substitute from the leaf of the stevia plant arrives in the UK. **Nutrition Bulletin**, 37(1), 47-50.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, 585(2-3), 325-337.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N., Gijzen, M. 1998. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. **Canadian Journal of Plant Science**, 78(4), 527-536.
- Briciu, R. D., Kot-Wasik, A., Wasik, A., Namieśnik, J., Sârbu, C. 2010. The lipophilicity of artificial and natural sweeteners estimated by reversed-phase thin-layer chromatography and computed by various methods. **Journal of Chromatography A**, 1217(23), 3702-3706.

- Carakostas, M. C., Curry, L. L., Boileau, A. C., Brusick, D. J. 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(7), S1-S10.
- Cemeroğlu, B. 2010. Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, 2. Baskı, Ankara.
- Chatsudthipong, V., Muanprasat, C. 2009. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology & Therapeutics**, 121(1), 41-54.
- Ciulu, M., Quirantes-Piné, R., Spano, N., Sanna, G., Borrás-Linares, I., Segura-Carretero, A. 2017. Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Industrial Crops and Products**, 108, 106-112.
- Curi, R., Alvarez, M., Bazotte, R., Botion, L., Godoy, J., Bracht, A. (1986). Effect of *Stevia rebaudiana* on Glucose Tolerance. In Normal Adult Humans. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.
- Dai, J., Mumper, R. J. 2010. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, 15(10), 7313-7352.
- Das, A., Golder, A. K., Das, C. 2015. Enhanced extraction of rebaudioside-A: experimental, response surface optimization and prediction using artificial neural network. **Industrial Crops and Products**, 65, 415-421.
- de São José, J. F. B., de Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C., Chaves, J. B. P. 2014. Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. **Food Control**, 45, 36-50.
- De, S., Mondal, S., Banerjee, S. 2013. Stevioside: technology, applications and health. John Wiley & Sons, 1. Baskı, İngiltere
- Dolatowski, Z. J., Stadnik, J., Stasiak, D. 2007. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 6(3), 88-99.

- Espinoza, M. I., Vincken, J. P., Sanders, M., Castro, C., Stieger, M., Agosin, E. 2014. Identification, quantification, and sensory characterization of steviol glycosides from differently processed *Stevia rebaudiana* commercial extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(49), 11797-11804.
- Feng, Hao, Gustavo V. Barbosa-Cánovas, Jochen Weiss. 2011. Ultrasound technologies for food and bioprocessing. Vol. 1. New York: Springer.
- Ferrer, I., Thurman, E. M. 2003. Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 22(10), 750-756.
- Formigoni, M., Milani, P. G., da Silva Avíncola, A., dos Santos, V. J., Benossi, L., Dacome, A. S., Pilau, E. J., da Costa, S. C. 2018. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. **Food Chemistry**, 241, 452-459.
- Ganesan, V., Gurumani, V., Kunjiappan, S., Panneerselvam, T., Somasundaram, B., Kannan, S., Chowdhury A., Saravanam, G., Bhattacharjee, C. 2018. Optimization and analysis of microwave-assisted extraction of bioactive compounds from *Mimosa pudica* L. using RSM & ANFIS modeling. **Journal of Food Measurement and Characterization**, 12(1), 228-242.
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., Amadou, I., Hua, X. 2014b. Nutritional composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf: effect of drying method. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 13(1), 61-65.
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., Hua, X. 2014a. *Stevia rebaudiana* Bertoni: an alternative sugar replacer and its application in food industry. **Food Engineering Reviews**, 6(4), 150-162.
- Gasmalla, M. A. A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., Ye, F. 2017. Influence of sonication process parameters to the state of liquid concentration of extracted rebaudioside A from *Stevia* (*Stevia rebaudiana bertoni*) leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, 10(5), 726-731.
- Gawel-Bęben, K., Bujak, T., Nizioł-Lukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska, K. 2015. *Stevia rebaudiana* Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. **Molecules**, 20(4), 5468-5486.

- Geuns, J. M., Augustijns, P., Mols, R., Buyse, J. G., Driessen, B. 2003. Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol. **Food and Chemical Toxicology**, 41(11), 1599-1607.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., Jo, I. H. 2009. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of agricultural and food chemistry**, 57(11), 4988-4994.
- Goettemoeller, J., Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. **Perspectives on New Crops and New Uses**, 510-511.
- González, C., Tapia, M., Pérez, E., Pallet, D., Dornier, M. 2014. Main properties of steviol glycosides and their potential in the food industry: a review. **Fruits**, 69(2), 127-141.
- Goyal, S. K., Samsher, G. R., Goyal, R. K. 2010. *Stevia* (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutritions**, 61(1), 1-10.
- Gupta, A., Naraniwal, M., Kothari, V. 2012. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. **International Journal of Applied and Natural Sciences**, 1(1), 8-26.
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S., Rai, G. K. 2013. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, 7(46), 3343-3353.
- Gupta, P. 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, 5(2), 26-33.
- Hajar, E. W. 2014. Identification and Characterization of *Stevia Rebaudiana* Extraction for Total Phenolic Compound Using Soxhlet Extraction and Microwave-assisted Extraction Techniques (Doktora tezi, UMP).
- Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126(4), 1821-1835.
- İnanç, A. L., Çınar, İ. 2009. Alternatif doğal tatlandırıcı: Stevya. **Gıda/The Journal of Food**, 34(6).

- Jaitak, V., Bandna, B. S., Kaul, V. K. 2009. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). **Phytochemical Analysis**, 20(3), 240-245.
- Javad, S., Naz, S., Ilyas, S., Tariq, A., Aslam, F. 2014. Optimization of the microwave assisted extraction and its comparison with different conventional extraction methods for isolation of stevioside from *Stevia rebaudiana*. **Asian Journal of Chemistry**, 26(23), 8043.
- Jentzer, J. B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., Vilarem, G. 2015. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, 166, 561-567.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, & World Health Organization. 2006. Safety evaluation of certain food additives (No. 56). World Health Organization.
- Karaköse, H., Müller, A., Kuhnert, N. 2015. Profiling and quantification of phenolics in *Stevia rebaudiana* leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63(41), 9188-9198.
- Kaufmann, B., Christen, P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, 13(2), 105-113.
- Khiraoui, A., Bakha, M., Amchra, F., Ourouadi, S., Boulli, A., Al-Faiz, C., Hasib, A. 2017. Nutritional and biochemical properties of natural sweeteners of six cultivars of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves grown in Morocco. **Journal of Materials and Environmental Science**, 8(3), 1015-1022.
- Kızılaslan, N. 2017. The Relationship Between Sweeteners and Metabolic Diseases. **Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology**, 5(2), 191-198.
- Kim, D.O., Jeong, S.W. and Lee, C.Y. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phyto chemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, 81(3):321-326p.

- Kim, I. S., Yang, M., Lee, O. H., Kang, S. N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. **LWT-Food Science and Technology**, 44(5), 1328-1332.
- Kola, O., Parıldı, E., Akkaya, M. R., Çetin, A. E., Cengiz, N. 2018. Comparison of the chemical composition and steviol glycoside profiles of *stevia rebaudiana* (bertoni) varieties cultivated in South of Turkey. **In Science Conference** (p. 508).
- Konoshima, T., Takasaki, M. 2002. Cancer-chemopreventive effects of natural sweeteners and related compounds. **Pure and Applied Chemistry**, 74(7), 1309-1316.
- Koubaa, M., Rosello-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brncic, M., Grimi, N., Boussetta, N., Barba, F. J. 2015. Current and new insights in the sustainable and green recovery of nutritionally valuable compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63(31), 6835-6846.
- Kovačević, D. B., Barba, F. J., Granato, D., Galanakis, C. M., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V., Putnik, P. 2018. Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **Food Chemistry**, 254, 150-157.
- Kroyer, G. 2010. Stevioside and *Stevia*-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, 5(2), 225-229.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. **Food Chemistry**, 132(3), 1121-1132.
- Lemus-Mondaca, R., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., Honores, C., Moraga, N. O. 2016. *Stevia rebaudiana* leaves: effect of drying process temperature on bioactive components, antioxidant capacity and natural sweeteners. **Plant Foods for Human Nutrition**, 71(1), 49-56.
- Li, Y., Li, S., Lin, S. J., Zhang, J. J., Zhao, C. N., Li, H. B. 2017. Microwave-assisted extraction of natural antioxidants from the exotic *Gordonia*

- axillaris fruit: Optimization and identification of phenolic compounds. **Molecules**, 22(9), 1481.
- Liu, J., Li, J. W., Tang, J. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. **Food and Bioproducts Processing**, 88(2-3), 215-221.
- Luo, Y., Wu, W., Chen, D., Lin, Y., Ma, Y., Chen, C., Zhao, S. 2017. Optimization of simultaneous microwave/ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds from walnut flour using response surface methodology. **Pharmaceutical Biology**, 55(1), 1999-2004.
- Maki, K. C., Curry, L. L., Reeves, M. S., Toth, P. D., McKenney, J. M., Farmer, M. V., Schwartz S.L., Lubin B.C., Boileau A.C., Dicklin M.R., Tarka S.M., Carakostas, M. C. 2008. Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus. **Food and Chemical Toxicology**, 46(7), S47-S53.
- Marcinek, K., Krejpcio, Z. 2015. *Stevia rebaudiana* Bertoni? chemical composition and functional properties. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, 14(2), 145-152.
- Martins, P. M., Thorat, B. N., Lanchote, A. D., Freitas, L. A. 2016. Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. **Resource-Efficient Technologies**, 2(4), 247-253.
- Megeji, N. W., Kumar, J. K., Singh, V., Kaul, V. K., Ahuja, P. S. 2005. Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. **Current Science**, 801-804.
- Melis, M. S. 1995. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. **Journal of Ethnopharmacology**, 47(3), 129-134.
- Molina-Calle, M., Priego-Capote, F., de Castro, M. L. 2017. Characterization of *Stevia* leaves by LC-QTOF MS/MS analysis of polar and non-polar extracts. **Food Chemistry**, 219, 329-338.
- Mooradian, A. D., Smith, M., Tokuda, M. 2017. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. **Clinical Nutrition ESPEN**, 18, 1-8.

- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. 2011. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **LWT-Food Science and Technology**, 44(9), 1865-1872.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Katan, M. B. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, 131(1), 66-71.
- Özdemir, D., Başer, H., Çakır, B. 2014. Tatlandırıcılar. **Türkiye Klinikleri Journal of Endocrinology**, 9(2), 60-70.
- Özer P., Yılmaz, F. M., Görgüç, A. 2018. Mikrodalga Teknolojisinin Bitkisel Dokulardan Makro ve Mikro Bileşenlerin Özütlemeinde Kullanımı. **Gıda/The Journal of Food**, 43(5), 765-775.
- Pawar, R. S., Krynitsky, A. J., Rader, J. I. 2013. Sweeteners from plants—with emphasis on *Stevia rebaudiana* (Bertoni) and *Siraitia grosvenorii* (Swingle). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 405(13), 4397-4407.
- Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A., Escriche, I. 2015. Influence of extraction methods on the yield of steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* extracts. **Plant Foods for Human Nutrition**, 70(2), 119-127.
- Prakash, I., DuBois, G. E., Clos, J. F., Wilkens, K. L., Fosdick, L. E. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. **Food and Chemical Toxicology**, 46(7), S75-S82.
- Preethi, D., Sridhar, T. M., Naidu, C. V. 2011. Carbohydrate concentration influences on in vitro plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. **Journal of Phytology**.
- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., Tiwary, A. K. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. **Food Chemistry**, 132(3), 1113-1120.
- Rai, C., Majumdar, G. C., De, S. 2012. Optimization of process parameters for water extraction of stevioside using response surface methodology. **Separation Science and Technology**, 47(7), 1014-1022.

- Ramesh, K., Singh, V., Megeji, N. W. 2006. Cultivation of stevia [Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni]: A comprehensive review. **Advances in Agronomy**, 89, 137-177.
- Renwick, A. G., Tarka, S. M. 2008. Microbial hydrolysis of steviol glycosides. **Food and Chemical Toxicology**, 46(7), S70-S74.
- Roberts, A., Renwick, A. G. 2008. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 46(7), S31-S39.
- Rodrigues, S., Pinto, G. A., Fernandes, F. A. 2008. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (Cocos nucifera) shell powder by response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15(1), 95-100.
- Sardesai, V. M., Waldshan, T. H. 1991. Natural and synthetic intense sweeteners. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2(5), 236-244.
- Sarkis, J. R., Michel, I., Tessaro, I. C., Marczak, L. D. F. 2014. Optimization of phenolics extraction from sesame seed cake. **Separation and Purification Technology**, 122, 506-514.
- Savita, S. M., Sheela, K., Sunanda, S., Shankar, A. G., Ramakrishna, P. 2004. Stevia rebaudiana—A functional component for food industry. **Journal of Human Ecology**, 15(4), 261-264.
- Sengel, T. Y., Celik, E. G., Aydogan, C., Gumus, Z. P., Ilktac, R., Aydindogan, E., Ciftci, M., Aldemir, E., Coskunol, H., Timur, S., Yagci, Y. 2018. A Functional Platform for the Detection of JWH-073 as a Model for Synthetic Cannabinoids. **ChemElectroChem**, 5(9), 1253-1258.
- Sharma, N., Kaushal, N., Chawla, A., Mohan, M., Sethi, A., Sharma, Y. 2006. Stevia rebaudiana-A review. **Agrobios Newslett**, 5(7), 46-48.
- Shinde, R. G., Khan, A. A., Barik, A. 2014. Coumarin derivatives with antioxidant and anticancer potential: a review. **International Journal of Medical and Applied Sciences**, 3(4), 165-187.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K., Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of Stevia rebaudiana Bert. **Food and Chemical Toxicology**, 47(9), 2338-2343.

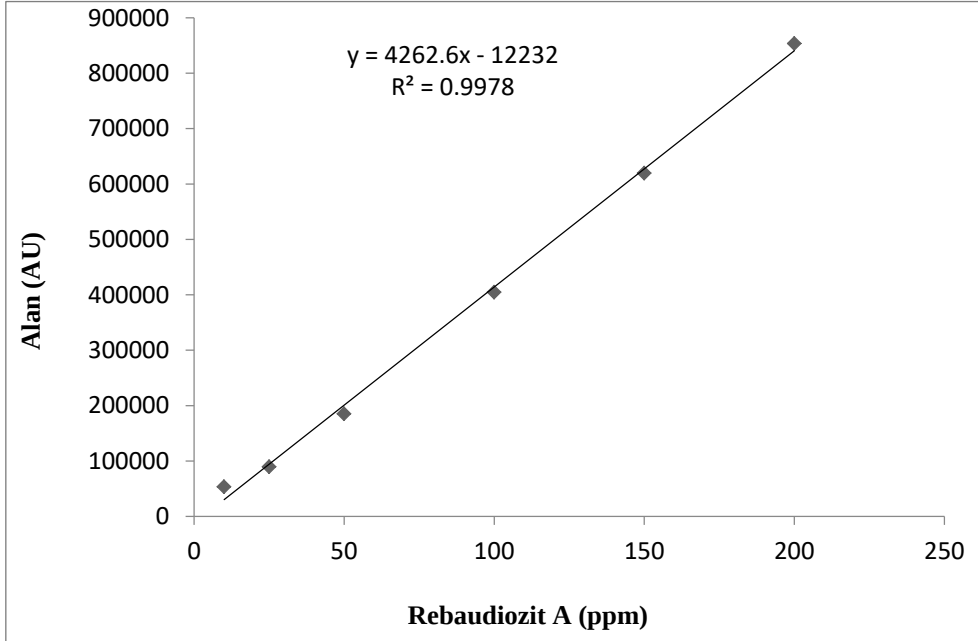
- Siddique, A. B., Rahman, S. M., Hossain, M. A. 2016. Chemical composition of essential oil by different extraction methods and fatty acid analysis of the leaves of *Stevia Rebaudiana* Bertoni. **Arabian Journal of Chemistry**, 9, S1185-S1189.
- Simić, V. M., Rajković, K. M., Stojičević, S. S., Veličković, D. T., Nikolić, N. Č., Lazić, M. L., Karabegović, I. T. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction of total polyphenolic compounds from chokeberries by response surface methodology and artificial neural network. **Separation and Purification Technology**, 160, 89-97.
- Sivaram, L., Mukundan, U. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. In **Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 39(5), 520-523.
- Soliman, M. D. E. 1997. *Stevia* plant, Natural concentrated sweeteners. In Egyptian Society of Sugar Technologists, **28th Annual Conference** (pp. 2-4).
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, 30(18), 3268-3295.
- Starmans, D. A., Nijhuis, H. H. 1996. Extraction of secondary metabolites from plant material: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 7(6), 191-197.
- Şahin, S., Şamlı, R. 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, 20(1), 595-602.
- Tadhani, M., Subhash, R. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: proximal composition, mineral analysis and phytochemical screening. **Journal of Medical Sciences**, 6(3), 321-326.
- Téllez, M. C., Figueroa, I. P., Téllez, B. C., Vidaña, E. C. L., Ortiz, A. L. 2018. Solar drying of *Stevia* (*Rebaudiana* Bertoni) leaves using direct and indirect technologies. **Solar Energy**, 159, 898-907.
- Teo, C. C., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Hew, C. S., Ong, E. S. 2009. Validation of green-solvent extraction combined with chromatographic chemical fingerprint to evaluate quality of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Separation Science**, 32(4), 613-622.

- Tiwari, B. K., Mason, T. J., Cullen, P. J., Brijesh, K. T., Valdramidis, V. 2012. Ultrasound processing of fluid foods. **Novel Thermal and Non-thermal Technologies for Fluid Foods**, 135-165.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. 2008. Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9(2), 161-169.
- Wallin, H. 2016. Steviol Glycosides: Chemical and technical assessment. FAO, 82nd JECFA. Geneva, 9.
- Wang, J., Sun, B., Cao, Y., Tian, Y., Li, X. 2008. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from wheat bran. **Food Chemistry**, 106(2), 804-810.
- WHO. 2018. Global report on diabetes. Kaynak:<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (Erişim tarihi: 23.11.2018).
- Williamson, L. N., Bartlett, M. G. 2007. Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, 21(6), 567-576.
- Wingard, R. E., Brown, J. P., Enderlin, F. E., Dale, J. A., Hale, R. L., Seitz, C. T. 1980. Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A. **Experientia**, 36(5), 519-520.
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60(4), 886-895.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. **Canadian Journal of Plant Science**, 91(1), 1-27.
- Yadav, S. K., 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(11), 988-998.
- Yang, Q. 2010. Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings: Neuroscience. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, 83(2), 101.

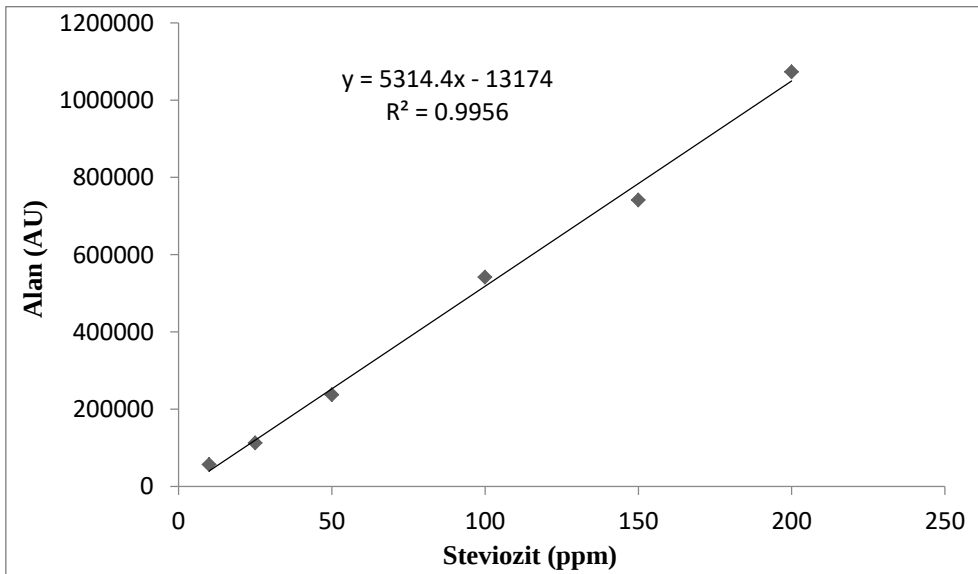
- Yildiz-Ozturk, E., Nalbantsoy, A., Tag, O., Yesil-Celiktas, O. 2015. A comparative study on extraction processes of *Stevia rebaudiana* leaves with emphasis on antioxidant, cytotoxic and nitric oxide inhibition activities. **Industrial Crops and Products**, 77, 961-971.
- Yücesan, B., Büyükgöçmen, R., Mohammed, A., Sameeullah, M., Altuğ, C., Gürel, S., Gürel, E. 2016. An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 52(3), 330-337.
- Žlabur, J. Š., Voća, S., Dobričević, N., Brnčić, M., Dujmić, F., Brnčić, S. R. 2015. Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. **International Agrophysics**, 29(2), 231-237.

EKLER

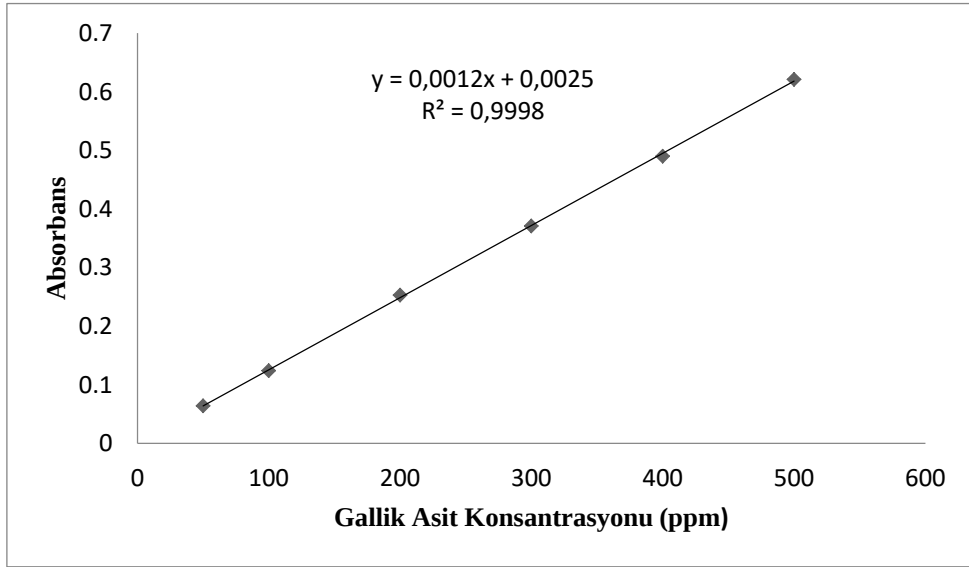
Ek 1. Rebaudiozit A standardı için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



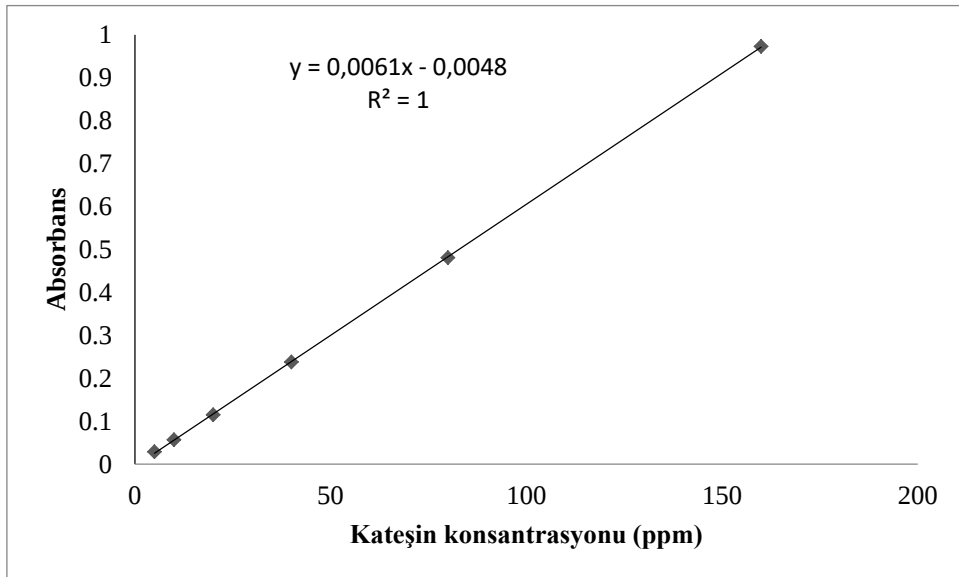
Ek 2. Steviozit standardı için oluşturulan kalibrasyon eğrisi



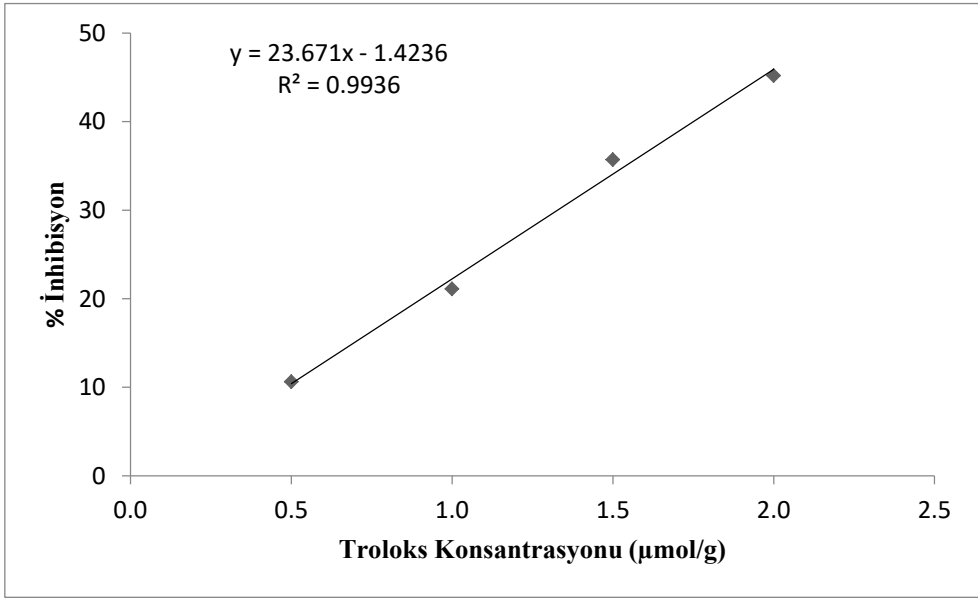
Ek 3. Toplam fenolik madde miktarı analizi için gallik asit standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi



Ek 4. Toplam flavonoid miktarı analizi için kateşin standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisi



Ek 5. Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (ABTS) değeri için troloks standardı ile oluşturulmuş kalibrasyon eğri



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Özge UYGUN

Doğum Yeri ve Tarihi : AYDIN - 03.01.1993

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Pamukkale Üniversitesi, Gıda Mühendisliği

Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Yılmaz, F., M., Görgüç, A., Karaaslan, M., Vardin, H., Bilek, S., Uygun, Ö., Bircan, C., 2018. Sour cherry by-products: compositions, functional properties and recovery potentials – a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, DOI: 10.1080/10408398.2018.1496901.

İLETİŞİM

E-Posta Adresi : ozgeuygun15@gmail.com

Tarih : 29/03/2019