

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İSPANAKTAN LUTEİN VE β -KAROTENİN BULUTLANMA NOKTASI
TEKNİĞİ İLE EKSTRAKSİYONU**



YÜKSEK LİSANS TEZİ
Bahar ER

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

TEMMUZ 2021

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

**İSPANAKTAN LUTEİN VE β -KAROTENİN BULUTLANMA NOKTASI
TEKNİĞİ İLE EKSTRAKSİYONU**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bahar ER
(36183220003)**

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

TEMMUZ 2021

TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının her aşamasında, bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemedен beni her konuda yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Gökhan DURMAZ'a sabrı, ilgisi ve bana ayırdığı kıymetli zamanları için;

Lisans eğitimi boyunca alanlarında her türlü bilgi ve deneyimi aktararak mesleğe hazırlayan, bugünlere gelmemde katkısı olan saygıdeğer İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Hocalarıma;

Benimle birlikte yüksek lisans öğrenimini tamamlayan güzel anılar biriktirdiğim çalışma arkadaşlarıma;

Tezin uygulama aşamasında FCD-2021-2281 nolu proje ile vermiş oldukları maddi destekten dolayı, İnönü Üniversitesi BAP birimine;

Üzerimde en büyük emeği olan, tüm hayatım boyunca olduğu gibi bu süreçte de benden her türlü desteğini esirgemeyen sevgili annem Suna ER'e, kalbinden eksik etmediğin sevgin ve emeklerin için,

Teşekkür ederim.

ONUR SÖZÜ

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum “İspanaktan Lutein ve β -karotenin Bulutlanma Noktası Tekniđi ile Ekstraksiyonu” başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dūřecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığına ve yararlandığım bütun kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Bahar ER



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ONUR SÖZÜ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR	3
2.1 Ispanak.....	3
2.2 Karotenoidler.....	5
2.3 Bulut Noktası Ekstraksiyonu (BNE)	13
2.3.1 Bulut noktası ekstraksiyon metodu'na etki eden faktörler	14
2.3.1.1 Yüzey aktif madde cinsi ve miktarı	14
2.3.1.2 İnkübasyon sıcaklığı	16
2.3.1.3 İnkübasyon süresi	17
2.3.1.4 Tuz konsantrasyonu	17
2.3.1.5 pH	17
3. LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	18
4. MATERYAL VE METOT.....	21
4.1 Kullanılan Kimyasallar.....	21
4.2 Kullanılan Alet, Ekipman ve Cihazlar.....	21
4.3 Materyal.....	21
4.3.1 Örnek hazırlama	21
4.4 Yöntem	22
4.4.1 Çözücü ekstraksiyonu.....	22
4.4.2 Misel ekstraksiyonu	22
4.4.3 Bulutlanma noktası ekstraksiyonu.....	22
4.4.4 Bulut noktası ekstraksiyon yönteminin çeşitli parametrelerinin optimizasyonu.	25
4.4.4.1 Yüzey aktif madde cinsi ve konsantrasyonunun optimizasyonu.....	25
4.4.4.2 Tuz konsantrasyonunun optimizasyonu	25
4.4.4.3 İnkübasyon sıcaklığının optimizasyonu	26
4.4.4.4 İnkübasyon süresinin optimizasyonu	26
4.5 Karotenoid Analizi	26
4.5.1 İstatistiksel analiz	27
5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	28
5.1 Karotenoid Analizi	28
5.1.1 Yüzey aktif madde cinsi ve konsantrasyonunun etkisi.....	29
5.1.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi	33
5.1.3 İnkübasyon sıcaklığının etkisi	39
5.1.4 İnkübasyon süresinin etkisi	45
5.2 Çözücü Ekstraksiyonu İle Yüzey Aktif Madde Destekli Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması.....	50
6. SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 : 100 g ıspanağın besin ve enerji değerleri.....	4
Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan YAM'ların HLB değerleri.	25
Çizelge 4.2 : Karotenoidlerin ayrılmasında zamana karşı mobil faz kompozisyonunda gradyan akış koşulları.	27



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 : Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı.	6
Şekil 2.2 : β -karotenin yapısı.	7
Şekil 2.3 : Lutein.	7
Şekil 2.4 : Bir YAM'ın şematik yapısı, (b) ara yüzde YAM'lar, (c) küresel misel, (d) YAM konsantrasyonunun fonksiyonu olarak yüzey gerilimi.	15
Şekil 4.1 : Bulutlanma noktası tekniğiyle karotenoid ekstraksiyonunun şematik gösterimi.	23
Şekil 4.2 : BNE akış şeması.	24
Şekil 5.1 : Lutein ve β -karoten standart kalibrasyon eğrisi.	28
Şekil 5.2 : Tween 60 kullanılarak gerçekleştirilen bulut noktası ekstraktına ait HPLC kromatogramı.	28
Şekil 5.3 : Farklı YAM konsantrasyonunda elde edilen faz ayrımlarına ait görüntüler.	29
Şekil 5.4 : Tween 20'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	29
Şekil 5.5 : Tween 40'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	30
Şekil 5.6 : Tween 60'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	31
Şekil 5.7 : Tween 80'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	32
Şekil 5.8 : Farklı tuz konsantrasyonunda elde edilen faz ayrımlarına ait görüntüler.	34
Şekil 5.9 : Tween 20'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	34
Şekil 5.10 : Tween 40'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	35
Şekil 5.11 : Tween 60'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	36
Şekil 5.12 : Tween 80'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi.	37
Şekil 5.13 : Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerine ait görüntüler.	39
Şekil 5.14 : Tween 20'nin farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi.	40
Şekil 5.15 : Tween 40'nin farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi.	41
Şekil 5.16 : Tween 60'nin farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi.	42
Şekil 5.17 : Tween 80'nin farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi.	43
Şekil 5.18 : Farklı sürelerde gerçekleştirilen faz ayrımı denemelerine ait görüntüler.	46
Şekil 5.19 : Tween 20 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi.	46
Şekil 5.20 : Tween 40 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi.	47
Şekil 5.21 : Tween 60 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi.	48
Şekil 5.22 : Tween 80 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi.	49

Şekil 5.23 : Çözücü ekstraksiyonu, misel ekstraksiyon ve bulut noktası ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarlarının karşılaştırılması. **51**
Şekil 5.24 : Bulut noktası ekstraksiyon yönteminin çözücü ekstraksiyonuna göre verimi. **53**



SEMBOLLER VE KISALTMALAR

BNE	: Bulut Noktası Ekstraksiyonu
KMK	: Kritik Misel Konsantrasyonu
YAM	: Yüzey Aktif Madde
HPLC	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
HLB	: Hidrofilik-Lipofilik Denge (Hydrophilic-Lipophilic Balance)
CAE	: Koaservatif Ekstraksiyon (Coaservative Extraction)
NaCl	: Sodyum Klorür
HCl	: Hidroklorik Asit
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration)
Span 20	: Sorbitan Monolaurat
Span 40	: Sorbitan monopalmitate
PEG	: Polietilen glikol
Triton X-100	: Polietilen glikol p- (1,1,3,3-tetrametilbutil) -fenil eter
Triton X-114	: (1,1,3,3-Tetrametilbutil) fenil-polietilen glikol, Polietilen glikol tert-oktilfenil eter
Genapol X-080	: Oligoetilen glikol monoalkil eter
Tween 20	: Polioksietilen Sorbitan Monolaurat
Tween 40	: Polioksietilen Sorbitan Monopalmitat
Tween 60	: Polioksietilen Sorbitan Monostearat
Tween 80	: Polioksietilen Sorbitan Monooleat
UV-VIS	: Ultraviyole-Görünür
ANOVA	: Tek Yönlü Varyans Analizi (ONE-WAY ANOVA)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İSPANAKTAN LUTEİN VE β -KAROTENİN BULUTLANMA NOKTASI TEKNİĞİ İLE EKSTRAKSİYONU

Bahar ER

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

67+ix sayfa

2021

Danışman: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

Bu çalışmada, iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin sulu çözeltileri kullanılarak ıspanak yaprağı atıklarından lutein ve β -karotenin bulutlanma noktası ekstraksiyonu (BNE) tekniği ile geri kazanımı amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda; BNE'yi etkileyen parametreler olarak, yüzey aktif madde cinsi ve konsantrasyonu, faz ayırma sıcaklığı ve süresi, tuz konsantrasyonu gibi parametreler optimize edilmiştir. Çeşitli noniyonik yüzey aktif maddelerin hidrofilitik lipofilitik denge (HLB) değerinin ekstraksiyon performansına etkisini görmek için yapılan denemelerde, en iyi sonuçlar yüksek HLB değerine sahip Tween serisi yüzey aktif maddelerle elde edilmiştir. Ekstraksiyon için en uygun yüzey aktif madde olarak Tween 40 belirlenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları; yüzey aktif madde konsantrasyonu %10, tuz konsantrasyonu %7,5, inkübasyon sıcaklığı 70 °C, inkübasyon süresi 40 dk olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum koşullarda elde edilen ekstraktlarda karotenoid miktarı ve profili HPLC sistemi ile belirlenmiştir. Buna paralel olarak metanol:aseton karışımı ile elde edilen ekstraktın karotenoid profili ile karşılaştırma yapılarak BNE yönteminin, ıspanak atıklarından karotenoid ekstraksiyonu bakımından etkinliği belirlenmiştir. Analiz verilerine göre; BNE tekniğiyle geri kazanım oranları lutein için %66,76 ve β -karoten için %149,89 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, BNE tekniği ile ıspanak dokusundan karotenoidlerin iyonik olmayan yüzey aktif maddelerin sulu çözeltilerini kullanarak ilave bir geri kazanım veya saflaştırma aşaması gerektirmeden yüksek oranda elde edilebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ispanak, Lutein, β -karoten, Ekstraksiyon, Bulut Noktası

ABSTRACT

Master Thesis

CLOUD POINT EXTRACTION OF LUTEIN AND β -CAROTENE FROM SPINACH

Bahar ER

Inonu University
Graduate School of Nature and Applied Sciences
Department of Food Engineering

67+ix sayfa

2021

Supervisor: Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

In this study, it was aimed to recover lutein and β -carotene from spinach waste by cloud point extraction (CPE) technique using aqueous solutions of nonionic surfactants. In accordance with this purpose; parameters such as appropriate surfactant type and concentration, phase separation temperature and time, salt concentration have been optimized. In the trials to see the effect of HLB value of various nonionic surfactants on extraction performance, the best results were obtained with Tween series surfactants having high HLB values. The most suitable surfactant for extraction was determined as Tween 40. Optimum extraction conditions were determined as; 10% surfactant concentration, 7.5% salt concentration, 70 °C incubation temperature, and 40 minutes of incubation time. Lutein and β -carotene content in the cloud point extract obtained in the pre-determined optimum conditions were quantified by a HPLC system. In parallel, the efficiency of the CPE method in terms of carotenoid extraction from spinach waste was determined by comparing to that of obtained with methanol:acetone mixture. Recovery rates with the CPE technique were determined as 66.76% for lutein and 149.89% for β -carotene. The results have shown that with the CPE technique, carotenoids from spinach can be obtained at a high rate by using aqueous solutions of non-ionic surfactants without requiring an additional recovery or purification step.

Keywords: Spinach, Lutein, β -carotene, Green solvents, Cloud point

1. GİRİŞ

Gıda endüstrisinin değişik kollarında oldukça önemli miktarlarda atık meydana gelmektedir. Bu atıklar çoğunlukla önemli miktarlarda besin ögesi içermektedir. Proteinler, karbohidratlar, lipitler gibi majör besin öğelerinin yanında, gıda atıkları biyoaktif gıda bileşenleri bakımından da çoğunlukla zengin bir içeriğe sahiptirler. Gıda atıklarının değerlendirilmesi, kısıtlı Dünya kaynaklarının daha etkin bir şekilde kullanılarak ekonomik açıdan katma değer sağlamanın yanı sıra bu atıklardan elde edilecek biyoaktif gıda bileşenlerinin gıdaların zenginleştirilmesinde kullanılması, sağlık ve beslenme açısından da büyük önem arz etmektedir (Sagar ve diğ., 2018).

Tüketilemeyecek özellikte olan atıklar hayvan yemi veya gübre olarak değerlendirilerek düşük oranda ekonomik kazanımlar sağlanmakta ya da çöp olarak tamamen kaybedilmektedir. Oysaki birçok gıda atığı, önemli makro besin bileşenleri ve biyoaktif mikro besin öğeleri bakımından zengin içeriklere sahiptir. Özellikle meyve ve sebze atıklarında, biyolojik aktiviteleri çok iyi bilinen fenolik bileşikler, karotenoidler, tokoferoller, bitkisel steroller gibi değerli kimyasallar önemli düzeylerde bulunmaktadır (Kowalska ve diğ., 2017). Endüstriyel boyutta gıda üretimi sırasında ortaya çıkan atıkların, ekonomik açıdan değerlendirilebilmesi çok daha mümkündür. Ispanak, özellikle şoklanarak, konserve yapılarak ya da kurutulularak işlenmekte ve bu sırada önemli düzeyde atık ortaya çıkmaktadır. Ispanağın işlenmesi sırasında açığa çıkan bu atıklar önemli düzeyde karotenoid içermektedir ve uygun bir ekstraksiyon tekniği ile bu karotenoidlerin geri kazanılması mümkündür.

Karotenoidler, oldukça hidrofobik bileşikler olduğu için ekstrakte edilmeleri için non-polar çözücülerin kullanılması gerekmektedir (Saini ve Keum, 2018). Karotenoidlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan organik solventler; toksik özellikte, yanıcı-parlayıcı, çevre için zararlı ve pahalı olmaları gibi sebeplerden dolayı oldukça dezavantajlı materyallerdir. Doğal kaynaklardan biyoaktif bileşenleri ekstrakte etmek için kullanılacak en çevre dostu ve biyouyumlu çözücü sudur. Ancak suyun yüksek polariteli bir solvent olması, karotenoid ekstraksiyonu konusunda en önemli engeldir. Dolayısıyla su ile karotenoid ekstraksiyonu yapabilmek için farklı stratejilerin kullanılması gerekmektedir. Bu noktada suyun karotenoidleri bünyesine alabilmesi için karotenoidlerin yüklenebileceği taşıyıcı vesiküllerin olması gerekmektedir. Bu vesiküller yüzey aktif madde (YAM)'ler kullanılarak oluşturulabilmektedir (Melnik ve Namies, 2015). Bulutlanma noktası

ekstraksiyonu (BNE), YAM destekli ekstraksiyon yöntemleri arasında öne çıkan ve endüstriyel boyutta uygulanma potansiyeli olan bir yöntem olarak dikkat çekmektedir. Non-polar bileşikleri ekstrakte etmekteki başarısı ve çevre açısından avantajı yüksek olan BNE tekniği gıda bilimcilerinin de dikkatini çekmiş ve birçok gıda bileşeni bu teknik yardımıyla ekstrakte edilmiştir.

Bu çalışma ile ıspanak atıklarından organik solvent kullanmadan BNE tekniği ile su bazlı bir sistemde karotenoidlerin ekstrakte edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda;

- Ispanaktan karotenoidlerin BNE yöntemi ile ekstraksiyonu amacıyla uygun YAM cinsi ve konsantrasyonu belirlenmiştir.
- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu sırasında uygulanan faz ayrımı sıcaklık ve süresi, tuz derişimi gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Bu parametrelerden sıcaklık, YAM'ların su fazından ayrılarak ayrı bir faz oluşturmaları ve bu sırada karotenoidleri de beraberlerinde taşımaları bakımından önemli bir parametredir. Yine iyonik şiddet, su ve YAM ile birlikte taşınan karotenoidlerin oluşturacakları fazların polaritesini etkileyen unsurlar oldukları için önemlidirler.
- Belirlenen optimum koşullarda elde edilen BNE ekstraktında karotenoid miktarı ve profili HPLC sistemi ile belirlenmiştir. Bununla paralel olarak organik solventlerle elde edilen ekstraktın karotenoid profili ile karşılaştırılarak BNE tekniğinin ıspanak atıklarından karotenoid ekstraksiyonu bakımından etkinliği tespit edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE UYGULAMALAR

2.1 Ispanak

Ispanak (*Spinacia oleracea L.*) *Amaranthaceae* familyasına ait tek yıllık otsu bir serin iklim sebzesidir. Kış ve ilkbahar aylarında üretimi yapılan ıspanağın ana vatanı Orta Asya'dır. Ülkemizin sadece aşırı yağış alan Doğu Karadeniz bölgesinde sınırlı olmak üzere, diğer bütün bölgelerimizde yetişebilen bir sebzedir. Türkiye'de yaklaşık 160 bin dekarı aşan alanda ıspanak üretimi yapılmaktadır (Yet, 2009).

TUİK verilerine göre dünya ıspanak üretimi, 2017 yılında 28 milyon ton olmuştur ve Türkiye Dünya ıspanak üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır. 2018 yılı verilerine göre ülkemizde ıspanak üretimi 225 bin ton civarında olmuş ve 4.700 ton ıspanak ihracatı karşılığında 3,8 milyon \$ ihracat geliri elde edilmiştir. En fazla ihracat yapılan ülkeler arasında Yunanistan %31, Birleşik Krallık %25'lik paya sahiptir. Ispanak ihracatımızın, en fazla dondurulmuş ürün formunda olduğu görülmektedir. Ispanak ithalatımız ise düşük miktarda olup, 2019 yılının ilk sekiz ayında toplam 9 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim¹, 2019).

Ispanak; vitamin, mineral ve fitokimyasallar açısından zengin bir sebzedir. Yaklaşık % 91,4 su, % 2,9 protein, % 3,6 karbohidrat ve % 0,4 lipit içermektedir. Potasyum, manganez, çinko, magnezyum, demir ve kalsiyum olmak üzere fito besin maddelerini folat, niyasin, A vitamini, B6 vitamini, C vitamini, tiamin ve riboflavin gibi vitaminleri içermektedir (Anonim², 2021). Ayrıca β -karoten, lutein, ksanten ve klorofil gibi pigmentler açısından da zengindir. Ispanaktaki tüm bu besleyici maddeler, vücutta çeşitli metabolik reaksiyonlarda kullanılır. Ispanak denilince akla ilk önce demir gelse de içeriğindeki demir vücut tarafından yeterince alınamaz. Oksalat olarak da adlandırılan oksalik asit molekülleri, vücuttaki kalsiyuma ve demire bağlanabilmektedir ve bağırsaklarda bu minerallerin tamamen absorbe edilmelerine engel olmaktadır. Ispanak; kanser, kalp-damar hastalıkları, nörodejeneratif hastalıklar, katarakt ve yaşa bağlı makula bozuklukları gibi göz hastalıkları, diyabet ve obezite gibi birçok hastalık riskini azaltmakla ilişkili olduğu bilinen özel koruyucu karotenoid bileşikleri içermektedir (Anonim³, 2020).

Ispanak, brokoli ve kırmızı soğan gibi diğer flavonoid açısından zengin sebzelerle karşılaştırıldığında önemli miktarda flavonoid içeriğine (> 1000 mg / kg) sahiptir. Ispanak,

glukuronidler ve 6-oksijenli flavonollerin metilatlı ve metilendioksi türevlerinin açillenmiş di- ve triglikositlerini içeren kendine özgü flavonoid bileşikleri içerir. Ayrıca feruloil glikoz, p-kumarik asidin trans ve cis izomerleri ve flavonoidlere ek olarak p-kumarik asidin mezo-tartarat türevleri gibi biyoaktif molekülleri önemli düzeylerde içeren bir sebzedir. Fenolik içeriğinin zenginliği nedeniyle, sebzeler arasında antioksidan kapasitesi açısından üst sıralarda yer almaktadır. Ispanak tüketiminin, oksidatif strese karşı koruma sağlayabileceği düşünülmektedir. Ispanağın fenolik bileşikleri, antioksidatif, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antikarsinojenik ve antimutajenik özellikler dahil birçok biyolojik etkiye sahiptir. Ispanak ekstraktları, memelilerde kemoprevansiyon, merkezi sinir sisteminin korunması ve yaşlanma karşıtı işlevlerden dolayı önemli bir rol oynayabilmektedir (Pandjaitan ve diğ, 2005).

Çizelge 2.1 : 100 g ıspanağın besin ve enerji değerleri (Anonim², 2021).

Bileşen	Birim	Ortalama	Bileşen	Birim	Ortalama
Enerji	kcal	24	Kalsiyum, Ca	mg	143
Enerji	kJ	102	Magnezyum, Mg	mg	116
Su	g	91,38	Potasyum, K	mg	529
Kül	g	2	Sodyum, Na	mg	77
Protein	g	2,49	Çinko, Zn	mg	0,42
Azot	g	0,4	Selenyum, Se	µg	0,8
Yağ, toplam	g	0,49	C vitamini	mg	35,7
Karbonhidrat	g	1,37	L-askorbik asit	mg	27,2
Lif, toplam diyet	g	2,27	Tiamin	mg	0,088
Lif, suda çözünür	g	0,67	Riboflavin	mg	0,198
Lif, suda çözünmeyen	g	1,6	Niasin	mg	0,96
Sakaroz	g	0,08	B-6 vitamini, toplam	mg	0,249
Glukoz	g	0,12	Folat, gıda	µg	264
Fruktoz	g	0,36	A vitamini	RE	666
Laktoz	g	0	Beta-karoten	µg	7987
Maltoz	g	0	Likopen	µg	0
Tuz	mg	193	Lutein	µg	10012
Demir, Fe	mg	9,71	K-1 vitamini	µg	336,4
Fosfor, P	mg	29			

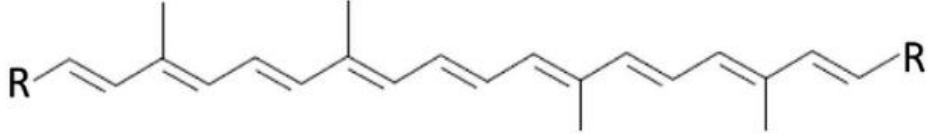
İspanak, endüstriyel boyutta daha çok konserveye işlenerek veya şoklanarak muhafaza edilmiş halde tüketiciye ulaşmaktadır. İşlenmesi sırasında, sap kısımlarının ayıklanmasından ve hassas yapısı nedeniyle hızla bozulan yaprak kısımlarından dolayı önemli miktarda atık ortaya çıkmakta ve bu atıklar çoğunlukla çöpe gitmektedir. İspanağın endüstriyel boyutta işlenmesi sırasında % 50'ye varan miktarlarda atık çıktığı rapor edilmektedir (Sharma ve diğ., 2011). Ekonomik katma değerin artırılması açısından atıkların içerdiği karotenoidlerin geri kazanılması çok önemlidir. Son yıllarda gıda atıklarının besin öğelerinin geri kazanılması amacıyla değerlendirilmesine yönelik çok sayıda araştırma yapılmaktadır (Sagar ve diğ., 2018).

2.2 Karotenoidler

Karotenoidler, genel olarak yağda çözünen, bitkisel ve hayvansal ürünlere sarıdan kırmızıya kadar renk veren izoprenoid sınıftan en yaygın pigmentler olup fotosentetik organizmalar, bazı fotosentez yapmayan bakteriler ve funguslar tarafından sentezlenebilen bileşiklerdir (Saini ve Keum, 2018). Hayvansal dokulara, ancak tüketilen yemler aracılığıyla geçmekte ve dokularda modifiye edilerek depolanmaktadır. Karotenoidler, beslenmenin ötesinde biyolojik aktivite gösteren, doğal olarak oluşan bir fitokimyasal sınıftır. İnsanlar, *in vivo* olarak karotenoidleri sentezleyemediklerinden, diyetle yeterli miktarda alınması gerekmektedir. Bu amaçla tüketilen porsiyon başına düşen karotenoid miktarını artırmaya yönelik çalışmalar sağlık üzerinde önemli bir etki yaratabilir (Rodriguez, 2001).

Karotenoidler gıda endüstrisinde renk verme, antioksidatif özelliği, A vitamini öncülü olması vb. nedenlerden dolayı farklı amaçlar için kullanılabilir. Gıda tercihlerindeki büyük endişeler dikkate alındığında, karotenoidlerin ve klorofillerin doğal pigmentler olarak uygulanması, gıda endüstrisinde artan bir öneme sahiptir.

Karotenoidler, polien hidrokarbon yapısında olup, birbirine kovalent olarak bağlanmış 8 adet izopren ünitesinden oluşmaktadır ve C₄₀-atomu içeren bir iskelet yapısı bulunmaktadır. C₄₀ karotenoid temel yapısından hidrasyon, dehidrasyon veya siklizasyon yoluyla değişik karotenoidler oluşmaktadır. Metil grupları eklenmiş, konjuge çift bağları bulunan doymamışlık derecesi yüksek moleküllerdir (Bilek ve Özkan, 2012).

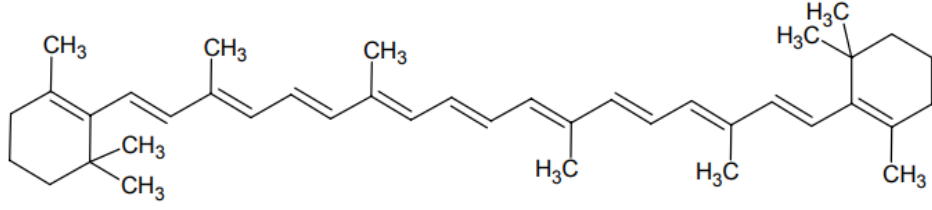


Şekil 2.1 : Karotenoidlerin poliizoprenoid yapısı.

Karotenoidler, doğada geniş dağılımları, yapısal olarak çeşitlilikleri ve sayısız fonksiyonlarıyla doğal pigmentler arasında önemli bir grubu oluşturmaktadır. Karotenoidlerin, doğada yaklaşık 100 milyon kadar farklı renk tonu bulunmaktadır. Bu renk zenginliğinin nedeni yapılarındaki konjuge çift bağlardan kaynaklanmaktadır. Konjuge çift bağların sayısı arttıkça renk de koyulaşmaktadır. Hücre içinde kromoplastlarda bulunmaktadır. Meyve ham iken yapılarındaki karotenoidlerin renkleri klorofiller tarafından maskelenmekte, olgunlaşmayla beraber klorofil kaybolup karotenoidler ortaya çıkmaktadır (Oliver ve Palou, 2000).

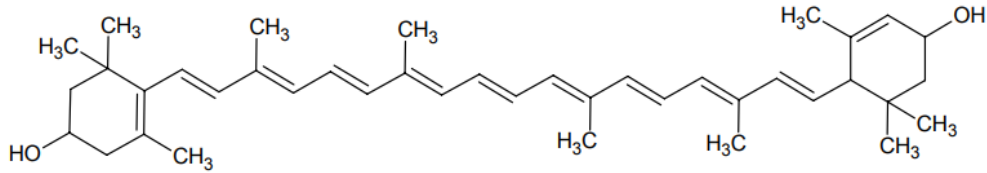
Karotenoidler, β -karoten ve likopen gibi herhangi bir fonksiyonel grup içermeyen sadece bir hidrokarbon zinciri içeren karotenler ve bunların hidroksi, epoksi, okso gibi oksijen içeren türevleri olan ksantofiller (fukoksantin) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Oksijen atomu luteinde olduğu gibi bir alkol, kantaksantinde olduğu gibi bir keton ya da astaksantindeki gibi alkol ve keton kombinasyonu veya fukoksantin gibi alkol esterleri şeklinde bulunabilmektedir. Polar grupların eklenmesi, karotenoidlerin polaritesini değiştirip biyolojik fonksiyonlarını etkilemektedir (Saini ve diğ, 2015). Diğer karotenoid sınıfları da karotenoidlerin oksidatif bölünme ürünleri olan apokarotenoidler ve C_{50} karotenoidlerdir. Karotenoidler ayrıca provitamin A karotenoidler (β -karoten, β -kriptoksantin ve α -karoten) ve provitamin A olmayan karotenoidler (Lutein ve likopen) olarak sınıflandırılabilir (Saini ve Keum, 2018).

Doğada en yaygın bulunan pigmentlerden biri olan β -karoten, yapısında iki adet β -iyonon halkası olduğundan provitamin aktivitesi en yüksek karotenoiddir. Vücut dokularında en fazla bulunan temel karotenoidler arasındadır. Diyetteki başlıca β -karoten kaynakları arasında hindiba, maydanoz, ıspanak ve marul gibi yeşil yapraklı sebzelerin yanı sıra havuç, mango, kayısı, tatlı patates, kırmızı biber gibi sarı, turuncu meyveler ve sebzeler bulunur. Yeşil yapraklı sebzelerden elde edilen β -karotenin biyoyararlanımı düşük olmaktadır. β -karotenin biyoyararlanımında; pişirme, doğrama, öğünde yağ varlığı gibi faktörlerin önemli etkisi olmaktadır (Krinsky ve Johnson, 2005).



Şekil 2.2 : β -karotenin yapısı.

Lutein, serumda bulunan ksantofil grubundan bir bileşiktir ve zeaksentin ile birlikte gözün retina tabakasındaki maküler pigmentler olup sarı renkten sorumlu yegane karotenoidlerdir. Gözdeki sarı noktanın tahribatını önler ve retinanın zararlı ışınlardan korunmasını sağlar (Landrum ve Bone, 2001). Lutein miktarı çevresel faktörler ya da yaşlanmaya bağlı olarak zamanla azalır ve bunun sonucunda da görme bozuklukları, katarakt gibi sorunlar ortaya çıkar. Ancak vücut lutein üretmez dolayısıyla da diyetle lutein alınması göz sağlığı açısından önemlidir. Bazı çalışmalar, ıspanak tüketimi sonucunda serum karotenoid ve maküler pigment yoğunluğunun arttığını göstermiştir (Kopsell vd., 2006). Lutein gözlere faydalı olduğu gibi, deri hücrelerinin yenilenmesini de sağlamaktadır. Vücutta bulunan serbest radikalleri temizleyen antioksidan görevi görmektedir. Lutein özellikle havuç gibi köklü meyve ve sebzelerde bulunur ve bitkileri zararlı UV ışınlarına karşı korur. Ispanak, lahana, brokoli, bezelye, brüksel lahanası, maydonoz, marul, fasulye, yeşilbiber, mısır, kivi, avokado, erik, yaban mersini, ahududu, böğürtlen önemli lutein kaynaklarıdır. Bir başka dikkate alınması gereken lutein kaynağı da düşük değerde olsa da biyolojik olarak yüksek oranda kullanılabilir olduğu için yumurta sarısıdır (Surai ve diğ., 2000).



Şekil 2.3 : Lutein.

Luteini besinlerden, takviye ürünlerden ya da tabletler ile almak mümkündür. Yapılan çalışmalara göre serumdaki lutein seviyesi, diyetle alınan kaynaklara bağlı olarak büyük değişiklik göstermektedir. Örneğin yumurta; ıspanak ve lahana gibi yeşil yapraklı sebzelere göre daha az lutein içermesine rağmen serum lutein seviyesini önemli ölçüde daha

fazla artırmaktadır (Norkus ve diğ., 2010). Lutein ile zenginleştirilmiş yumurtalar tüketildiğinde ise serum lutein seviyesinde daha da büyük artışlar gözlenmiştir (Chung ve diğ., 2004). Lutein takviyelerinin, serum lutein seviyesini yeşil sebzelerden daha fazla, ancak yumurtadan daha az oranda artırdığı bildirilmiştir (Bowen ve diğ., 2002). Bu durumun, alınan luteinin miktarı, izomerik formları ve bulunduğu matris ile mevcut diyet yağı miktarı gibi faktörlere bağlı olacağı düşünülmektedir.

Farklı meyve ve sebzelerin karotenoid seviyeleri; çeşit, genotip, olgunlaşma zamanı, yetiştirme teknikleri, hasat öncesi iklim koşulları gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca bitkinin farklı kısımlarının karotenoid içeriği de değişiklik gösterebilir (Tavarini ve diğ., 2008). Örneğin, domateste en yüksek likopen miktarının endüstriyel atık niteliğindeki kabukta olduğu bildirilmiştir (Ranveer ve diğ., 2013).

Diyetteki karotenoidler belirli kanser türleri, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar, iltihaplanma, oftalmik durumlar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların önlenmesinde rol oynayan antioksidan etkilere sahiptir (Mohammadzadeh Honarvar ve diğ., 2017). Karotenoidlerin bu aktivitelerini gösterebilmeleri için, gıda matrisinden salınması, biyolojik olarak erişilebilir hale gelmesi ve insan bağırsağı tarafından emilebilmesi gerekir.

Biyoyararlılık, organizmanın işleyişinde kullanılmak üzere gıdalardan alınan besinlerin niceliği ile alakalı, beslenme etkinliği için anahtar bir kavramdır. Biyoerişilebilirlik ise, gıda matriksinden besleyici öğelerin sindirim sistemi boyunca salınması ve emilim için uygun hale gelen miktarı olarak tanımlanabilir. Yani biyoyararlılık için gıdanın biyoerişilebilir olması gerekmektedir. Yeşil yapraklı sebzelerden elde edilen karotenoidlerin biyoyararlanımı nispeten düşüktür ve gıdada bulunan karotenoidlerin türleri ve yapıları, gıda matrisindeki konumu ve salınım hızı, tüketilen miktar ve bağırsak yolunda emilim, lipoprotein fraksiyonları içindeki taşınması, biyokimyasal dönüşümler, dokuya özgü birikimler ve beslenme durumu gibi birçok faktöre bağlıdır (Eriksen ve diğ., 2017). Sebzelerin sindirilmesinde karotenoidleri serbest bırakmak için gıda matrisinin parçalanması, yani partikül boyutunun küçültülmesi ve hücresel düzeyde parçalanmayı sağlayacak gerekli koşulların sağlanması gerekmektedir (Bohn ve diğ., 2015). Karotenoidler, bitkisel dokularda serbest veya yağda çözülmüş halde ya da yağ asitleri, şekerler ve proteinlerle esterleşmiş halde bulunabilirler. Karotenoidler, proteinlerle esterleştiklerinde renkleri değişir. Şekerlerle glikozidik bağlarla bağlanmış halde bulunmaktadırlar. Karotenoidlerin yağ asitleriyle açılması, kimyasal özelliklerini etkileyerek hidrofobiklik

kazandırır ve biyoyararlanımını etkiler. Karotenoidler gibi yağda çözünen bileşiklerin erişilebilirliği, diyetle birlikte alınan yağın türüne ve miktarına da bağlıdır. Hidrofobik karotenoidler, lipid membranlarının ve emülsiyon damlacıklarının iç kısmında bulunur. Bu nedenle, karotenler ve karotenoid esterler daha polar karotenoidlerden daha az biyoerişilebilirdir. Karotenoid esterlerinin biyoerişilebilirliğini ve hücre alımını artırmak için saponifikasyon işlemi uygulanabilmektedir (Murador ve diğ, 2021).

Diyetteki karotenoidlerin önemli fizyolojik fonksiyonlarından biri, A vitamini öncüsü olmalarıdır. Doğada yaklaşık 700 karotenoid olmasına rağmen, pro-vitamin A aktivitesine sahip olan karotenoidlerin sayısını 50 civarındadır (Lozano-Alejo ve diğ, 2007). A vitamini metabolize edilebilen karotenoidlerin biyolojik dönüşümü, bireye ve gıda kaynağına bağlı olarak değişim göstermektedir. Örneğin Tang ve diğ. (2005) yaptıkları çalışmada ıspanaktaki β -karotenin retinole dönüşüm oranının ortalama 21'e 1, havuç için ise bu oranın 15'e 1 olduğunu bildirmişlerdir.

A vitamini aktivitesine sahip karotenoidler, sağlıklı epitel hücre farklılaşmasının, normal üreme performansının, diş ve kemik gelişimi ve görsel fonksiyonların korunmasını destekler. Ayrıca Pro-vitamin A karotenoidleri ve pro-vitamin A olmayan karotenoidler de serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görebilir, bağışıklık tepkisini artırabilir ve göz dokularını koruyabilir ve kanser gelişimini baskılayabilir (Kopsell ve diğ, 2006).

Karotenoidler, provitamin A aktivitesinin yanı sıra, singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini söndürme kabiliyetine sahip etkili antioksidanlardır ve bu nedenle oksidatif stres sırasında koruyucu bir rol oynadıkları belirtilmektedir (Santocono ve diğ, 2007). Bunun yanında, karotenoidlerin gen modülasyonu, hücre döngüsü, hücre-hücre iletişim, sitotoksosite ve apoptoz gibi hücresel süreçler üzerine etkileri de araştırılmıştır (Krinsky ve Johnson, 2005).

Karotenoidler, bitki dokusu içerisinde bazı koruyucu bileşiklerin bulunması ve hücre geçirgenliğinin çok sınırlı olması nedeniyle doğal olarak korunmaktadırlar fakat gıdalara uygulanan temel işlemler sonucu hücre yapısının bozulmasıyla karotenoidlerin hassasiyeti artmaktadır (Akdo ve Özdemir, 2006). Termal veya yüksek basınçlı işleme, darbeli elektrik alanı, ultrason/sonikasyon, ozon ve ultraviyole gibi termal olmayan işlemler; yıkama, soyma ve kesme gibi evsel işlemler; konserve, kurutma gibi endüstriyel işleme gıda ürünlerindeki karotenoidlerin stabilitesini etkilemektedir (Tiwari ve Cummins, 2013). Her bir karotenoidin

stabilitesi gıdanın yapısına göre değiştiğinden en uygun işleme ve depolama koşulları her gıda için farklı olabilmektedir.

Karotenoidlerin ekstraksiyonuna ait standart bir yöntem bulunmamaktadır. Etkili bir ekstraksiyon işlemi için karotenoidleri, mümkün olan en az yapısal değişim ile gıda matrisinden çözelti ortamına alabilmek önemlidir (Bıntı Mohd Nasır, 2017). Karotenoidlerin ekstraksiyonunda; nem içeriği, hücre duvarının yapısı ve materyalin karotenoid bileşimi gibi gıda matrisinin özellikleri ile çözücü cinsi, basınç ve sıcaklık gibi ekstraksiyon parametreleri verim üzerinde etkili faktörlerdir. Karotenoidlerin ekstraksiyonu sırasında, gıda matrisindeki fiziksel ve kimyasal engellerden dolayı kütle transferi sınırlandırıldığından geri kazanım düşmektedir. Bu nedenle, karotenoidlerin gıda matrislerinden salınmasını kolaylaştırmak için hücre duvarının ve diğer fiziksel engellerin parçalanmasına yardımcı olan çeşitli kimyasal ve fiziksel ön işlemler uygulanmaktadır. Oksidasyona yatkın karakterlerinden dolayı, karotenoidlerin yüksek sıcaklık, ışık, asitler ve uzun ekstraksiyon sürelerine maruz kalmamaları gerekmektedir. Gıda matrisinde bulunan karotenoidlerin farklı polaritelerde olması hepsinin aynı anda ekstraksiyonunu zorlaştırmaktadır. Karotenoidlerin ekstraksiyonunda hidrofobik yapılarından dolayı genel olarak organik çözücüler kullanılmaktadır. Yüksek geri kazanım için uygun çözücü veya çözücü kombinasyonunun seçimi en önemli unsurlardan biridir. Karotenoidlerin polaritesi, zincir uzunluğu, numune matrisi ve nem içeriği ekstraksiyon için uygun çözücü seçiminde önemli faktörlerdir. Genellikle, polar karotenoidlerin ekstraksiyonu için aseton ve non-polar karotenoidler için hekzan, tüm karotenoidlerin eşzamanlı ekstraksiyonunda ise aseton/etanol/hekzan kombinasyonu kullanılmaktadır (Amorim-Carrilho ve diğer, 2014). Kullanılan organik çözücüler yüksek çözme yeteneğine sahip olsa da, pahalı, nispeten daha toksik, yanıcı olmaları ve çevre için tehlike oluştırmaları kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Örneğin; laboratuvar ölçekli çalışmalar için kullanımı uygun olan süperkritik çözücüler, büyük ölçekli çalışmalarda yüksek basınç ve sıcaklık gibi enerji maliyetlerine sebep olduklarından tercih edilmemektedir. İyonik çözücülerin ise yüksek maliyetlerinin yanı sıra, toksisite çalışmalarının yetersiz olması kullanımlarını kısıtlamaktadır (Kutlu Kantar ve diğer, 2021).

Çoğu çözücü buharlaşma yoluyla çevreye yayılır ve içme suyu, toprak ve yeraltı suyu kontaminasyonu sonucu ciddi sağlık endişesi yaratır. Kullanılan her çözücü yapısına bağlı olarak farklı yollardan vücuda girmektedir. İnhalasyon (solunum ile); hidrofilik uçucu organik bileşikler kana daha fazla geçer. Lipofilik çözücüler deri yolu ile vücuda absorbe edilirler ve çözücünün konsantrasyonu, moleköl ağırlığı, lipofilitesi, temas edilen yüzey alanı, maruz

kalma süresi emilimde önemli faktörlerdir. Çözücülerin yağda çözünürlüğü ve uçuculuğu vücuttaki emilimini ve birikimini etkileyen iki önemli faktördür (Nedir ve Gireler, 2005).

Kullanılan çözücülerin vücut üzerinde farklı etkileri olmaktadır. Merkezi sinir sistemi üzerine baş ağrısı, baş dönmesi, yorgunluk, bilinç kaybı, uzun süreli maruziyette davranışsal değişiklikler; duyu organlarında (görme, işitme), hafıza (koordinasyon bozuklukları, konfüzyon), duygusal (sinirlilik, huzursuzluk, depresyon) etkiler; cilt üzerine alerji, dermatit; solunum sistemi üzerine irritasyon etkileri olmaktadır. Ayrıca karaciğer ve böbrek toksisitesi, kalp, madde bağımlılığı, teratojenik, kanser gibi sağlık üzerine tehlikeli etkileri bulunmaktadır (Yavuz, 2020).

Su, saflaştırılması kolay, ucuz, toksik ve yanıcı olmayan, çevre dostu bir çözücüdür. Ancak, bazı asitler ile reaktif özellik gösterebilmekte ve birçok gaz, endüstriyel polimer gibi katılar, hidrofobik bileşikler için zayıf çözücü özellik göstermektedir (Kutlu Kantar ve diğ., 2021). Yüzey aktif maddeler ise, düşük konsantrasyonlarda kullanıldığında bile yüzey gerilimini azaltıp mikroemülsiyonlar oluşturarak, hidrofobik moleküllerin geri kazanımını artırır ve düşük maliyetli, güvenli bir ekstraksiyon prosedürünü mümkün kılar (Amiri-Rigi ve Abbasi, 2016). Yüzey aktif maddeler, kullanılarak gerçekleştirilen ilk ekstraksiyon yöntemi 1970'lerde yapılmaya başlanan literatürde misel ekstraksiyonu, misel aracılı ekstraksiyon veya sıvı-koaservat ekstraksiyonu olarak da geçen koaservat bazlı ekstraksiyon tekniğidir. Koaservatlar aynı zamanda, koaservatif ekstraksiyon (CAE) ve bulut noktası ekstraksiyon (BNE) olarak bilinen, aynı fiziksel ve kimyasal işlemlere dayanan başka tekniklerdeki ekstraksiyon ortamını oluşturur. Bu iki ekstraksiyon tekniği arasındaki fark, faz ayrılmasını indüklemek için gerekli olan ortam koşullardadır. CAE'de koaservatif faz, tuz, alkol veya pH gibi sıcaklık dışındaki faktörlerin etkisiyle oluşur. Bu sebeple, CAE yönteminde anyonik ve katyonik yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır. Faz ayrımı, yüklü misellerde elektrostatik itme tarafından önlenir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda tuz veya hidrofobik karşı iyonların varlığında faz ayrımı gerçekleşmektedir. Örneğin katyonik yüzey aktif maddeler, yalnızca çok düşük pH veya yüksek iyonik güçte faz ayrımına uğrar (Melnyk ve Namies, 2015).

Ekstraksiyon verimini artırmak amacıyla tek YAM yerine farklı YAM karışımları kullanılarak da ekstraksiyon gerçekleştirilebilir. Sulu yüzey aktif madde iki fazlı olarak adlandırılan katyonik ve anyonik YAM karışımlarının kullanıldığı bir ekstraksiyon sistemi daha etkili bir ayırma tekniğidir. Herhangi bir katkı maddesi olmadan hazırlanabilir ve faz

ayrılması, BNE ve CAE'nin tersine oldukça sınırlı bileşimlerde ve YAM konsantrasyonlarında meydana gelebilmektedir (Weschayanwiwat ve diğ, 2008).

Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden olan Soxhlet ekstraksiyonu, yüksek karotenoid kazanımına rağmen zaman alıcı olması ve önemli miktarlarda çözücü kullanımından dolayı maliyetli bir tekniktir. Süper kritik sıvı ekstraksiyonu, yanıcı ve toksik olmayan, geri dönüştürülebilir çözücü (CO₂ ve etanol) kullanımı ve sıcaklığa duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanışlı olması bakımından yüksek saflıkta karotenoidler elde etmek için uygun çevre dostu bir yöntemdir. Ancak su içeriği yüksek örnekler için uygun olmaması, ksantofil gibi polar karotenoidler için düşük verim göstermesi ve yatırım maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajları vardır. Karotenoidlerin ekstraksiyonunda kullanılan basınçlı sıvı ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon, enzim destekli ekstraksiyon ve darbeli elektrik alanı ekstraksiyonu gibi diğer termal olmayan yöntemler maliyet, çevre güvenliği, analizin verimliliği ve tekrarlanabilirliği bakımından sınırlamalar getirmektedir (Grosso ve diğ, 2015).

Yüzey aktif madde bazlı ekstraksiyon teknikleri;

- Yüzey aktif maddelerin toksik olmayan özellikleri,
- Analiz için gerekli bazı numune hazırlama aşamalarının elimine edilmesi,
- Zenginleştirme faktörleri numune hacmine değil, yüzey aktif madde konsantrasyonuna bağlı olduğundan numune ihtiyacının az olması (García-Prieto ve diğ, 2008),
- Geleneksel ekstraksiyon tekniklerine kıyasla organik çözücüler de dahil olmak üzere daha az miktarda kimyasalların kullanımı (katı faz ekstraksiyonunun aksine),
- Birkaç örneğin aynı anda ekstraksiyonu; geniş aralıklı polarite ve yüke sahip analit ekstrakte etme potansiyeli (García-Prieto ve diğ, 2008),
- Ekstrakte edilen bileşiklerin misel yapı içinde korunması,
- Yüksek ekstraksiyon verimliliği,
- Daha kısa sürede ekstraksiyon dengesine ulaşma,
- İlimli koşullar altında ekstraksiyon gerçekleştirme, düşük enerji tüketimi (Süper kritik sıvı ekstraksiyonu ve kritik altı su ekstraksiyonu aksine) (García-Fonseca ve diğ, 2008),
- Ekstraktların, analitik analizlerde kullanılan araçlarla basit kombinasyonu (örneğin atomik absorpsiyon, kromatografik ve elektrokimyasal analizler) gibi avantajlar sunmaktadır (Melnyk ve diğ, 2014).

Tekniğin büyük avantajlarına rağmen uygulamasını sınırlandıran bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Koaservatif faz, uygun bir pH değerinde oluşmaktadır (López-Jiménez ve diğ., 2008). Bu durum düşük pH koşullarında çalışmayı gerektirdiğinde analitin ayrılmasına sebep olabilmektedir (Cantero ve diğ., 2004). Koaservatif fazın sıvı fazdan ayrılması kolay olmayabilmekte; bekleme süresi, sıcaklık, sonikasyon, santrifüj gibi deney prosedürlerine ayrıca ekstrakte edilecek bileşiğin moleküler yapısına bağlı olmaktadır (Yazdi, 2011). Tekniğin sıcaklık gereksinimi, sıcaklığa duyarlı bileşiklerin yapısında kararsızlığına neden olabilmektedir. Yüzey aktif maddelerin yüksek viskozite ve düşük uçuculuk özelliklerinden dolayı analitin GC yöntemiyle tespiti sınırlı olabilmektedir (Takagai ve Hinze, 2009).

Sürdürülebilirliği iyileştirmek için çevre dostu yeşil çözücüler ve alternatif yöntemlerin kullanılması, çevre kirliliğinin azaltılmasını ve toksik bileşenlerden arındırılmış ürün geliştirilmesini sağlayacak avantajlar sunmaktadır.

2.3 Bulut Noktası Ekstraksiyonu (BNE)

Bulut noktası ekstraksiyonu, Hiroto Watanabe ve arkadaşları tarafından YAM olarak 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) kullanılıp çinkonun su bazlı ekstraksiyonu için 1976 yılında yapılan çalışma ile yeni bir metot olarak ortaya çıkmıştır (Li ve diğ., 2008). Genellikle kromatografik ayırım ve analizden önce bir ön yoğunlaştırma adımı olarak kullanılmıştır. Analitik kimyacılar tarafından organik kirleticilerin ayrılması amacıyla sıkça kullanılmış, sonraki yıllarda organik solventlere alternatif olarak metal iyonlarının, azo boyaların, pestisitlerin ve daha birçok bileşiğin su bazlı materyallerden ekstrakte edilmesi amacıyla bu yöntemin kullanımı giderek yaygınlaşmış ve 2000'li yıllardan sonra bu alandaki çalışmalar hızla artmıştır (Paleologos ve diğ., 2005). Çevre için zararsız veya düşük risk içeren bu yöntemin, non-polar bileşikleri ekstrakte etmekteki başarısı gıda bilimcilerinin de dikkatini çekmiş ve birçok gıda bileşeni bu teknik yardımıyla ekstrakte edilmiştir. Bulutlanma noktası ekstraksiyon tekniği, gıda endüstrisinde biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu, proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması, katkı maddeleri, mineral, pestisit, antibiyotik ve mikotoksin analizlerinde uygulama alanları bulmuştur (Admajith ve diğ., 2019).

Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, sulu çözelti ortamından ayrılması istenen kimyasal ve biyolojik bileşiklerin, YAM'lar kullanılarak misellere hapsedildikten sonra bulutlanma noktası sıcaklığı olarak bilinen kritik sıcaklığa veya bu sıcaklığın üzerine ısıtıldığında misel boyutunda bir artışla beraber çözeltinin bulanıklaşması misel ve sulu çözeltiler arasındaki

yoğunluk farkı sonucunda fazların ayrılmasıyla gerçekleşen bir tekniktir (Motikar ve diğ., 2020). Tekniğin ismindeki “bulutlanma”, ortam sıcaklığının artması durumunda YAM ve içinde taşıdığı bileşiklerin suda dağılılabirliğinin azalmasından dolayı oluşan bulanıklaşmayı ifade etmektedir.

Misel yapıya bağlanması istenen herhangi bir bileşik, geleneksel bir sıvı-sıvı ekstraksiyon aşamalarına benzer şekilde ayrılarak, YAM bakımından zengin faza ekstrakte edilebilir. Bulutlanma noktası ekstraksiyon metodu, deneysel uygunluk, nispeten düşük maliyet-yüksek verim, ihmal edilebilir çevre kirliliği, organik çözücüler yerine nispeten düşük konsantrasyonlarda düşük toksisiteye sahip YAM’lar kullanımı açısından geleneksel sıvı-sıvı (ya da katı-sıvı) ekstraksiyon tekniklerine göre çeşitli avantajlar sunmaktadır (Admajith ve diğ., 2019).

2.3.1 Bulut noktası ekstraksiyon metodu’na etki eden faktörler

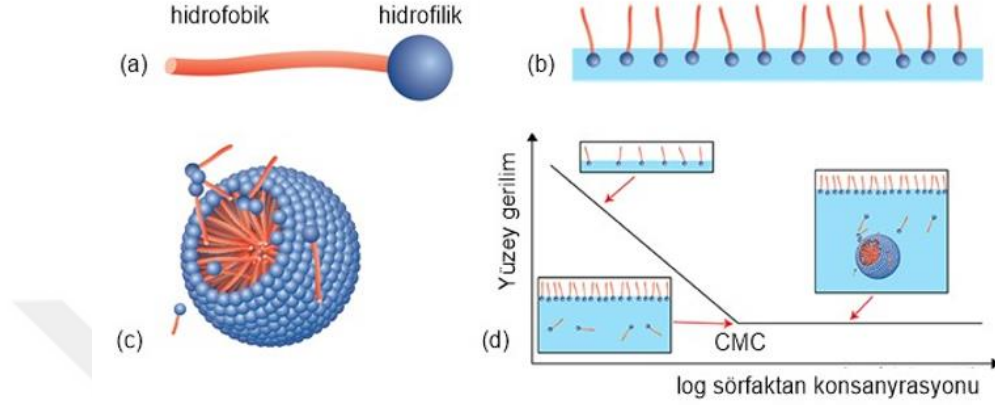
Ekstraksiyon için en uygun; YAM türü ve derişimi, tuz konsantrasyonu, su banyosu sıcaklığı ve bekletme süresi gibi parametreler optimize edilmelidir.

2.3.1.1 Yüzey aktif madde cinsi ve miktarı

Bulutlanma noktası ekstraksiyon tekniğinin, ilk aşamasında ekstrakte edilmek istenen bileşiği içeren materyalin bulunduğu sulu ortama, kritik misel konsantrasyonu (KMK) üzerindeki bir derişimde YAM ilave edilmektedir. Yüzey aktif madde moleküllerinin sulu ortamda kendiliğinden oluşturdukları misel yapıların hidrofobik merkezleri, ekstrakte edilmek istenen hidrofobik bileşikler için uygun bir ortam oluşturmakta ve sulu çözeltilerin ekstraksiyon/çözündürme performansını artırmaktadır. Ekstraksiyon verimini artırmak için örnek matriksine tutunmuş hidrofobik bileşiklerin serbest forma geçmesi amacıyla parçalama vb. fiziksel işlemler uygulanabilmektedir (Bohn ve diğ., 2015).

Yüzey aktif maddeler, genellikle bir polar baş kısmı ve bir uzun hidrofobik kuyruk kısmından oluşur ve taşıdığı yüke göre anyonik, katyonik, zwitteriyonik ve iyonik olmayan YAM’lar olmak üzere dört farklı gruba ayrılabilir (Ullah ve diğ., 2015). Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde, çoğunlukla düşük bulutlanma noktası sıcaklığı sergilediklerinden non-iyonik veya zwitteriyonik YAM’lar ve YAM sınıfında olmayan siklodekstrin türevleri de kullanılabilir. Bulutlanma noktası ekstraksiyonunda, kullanılan non-iyonik YAM’lar uçucu değildir ve nispeten toksik olmayan veya zararsız reaktiflerdir. Özellikle

dallanmış alifatik zincir veya aromatik kısım içermeyenler toksik değildirler ve FDA tarafından yenilebilir olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca kullanılan YAM'ın hidrofilik-lipofilik denge değeri (HLB) de ekstraksiyon verimi üzerinde etkili olmaktadır. Yüzey aktif madde molekülleri, su-hava veya su-organik çözelti ara yüzeyinde, hidrofilik kısım her zaman sulu faza doğru yönlendirilecek şekilde adsorbe edilmektedirler (Melyk ve Namies, 2015).



Şekil 2.4 : Bir YAM'ın şematik yapısı, (b) ara yüzde YAM'lar, (c) küresel misel, (d) YAM konsantrasyonunun fonksiyonu olarak yüzey gerilimi.

Yüzey aktif madde konsantrasyonu, bulutlanma noktası ekstraksiyonunu etkileyen önemli parametrelerden birisidir. Bir çözücü içinde dağılmış halde bulunan YAM'ın konsantrasyonu arttığında, moleküller hidrofobik zincirlerin amfifilik özelliklerinin etkisi altında koloidal kümeler halinde kendiliğinden birleşerek misel denem yapıları oluştururlar. Non-iyonik YAM'lar söz konusu olduğunda, agregatların oluşumu -OH veya $-(CH_2CH_2O)_n$ gruplarının hidrasyonuna bağlıdır. Ortam koşullarındaki değişme hidrasyon seviyelerinde düşüşe, flokülasyona ve fazların yer değiştirmesine neden olur. Misellerin sudaki çözünürlüğünde azalma ve toplanan misel sayısında ani bir artış, faz ayrılmasına yol açmaktadır. Bu olay KMK olarak bilinen değer aşıldığında meydana gelmektedir. Kritik misel konsantrasyonu, çözelti ortamında YAM'ın misel oluşturabilmesi için gerekli olan minimum derişim değerini ifade etmektedir (Melyk ve Namies, 2015). Bu değer YAM'ların karakteristik bir özelliğidir ve çözelti ortamının sıcaklığı, pH, tuz-iyon türü ve miktarı, bekleme süresi gibi BNE metoduna etki eden parametrelere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Bulutlanma noktasına ulaşıldığında çözeltinin iki faza ayrılması için bu değer aşılmalıdır. Kullanılan YAM konsantrasyonu olması gerekenden az olursa, misel oluşumu yeterince gerçekleşmeyip verim düşeceği gibi fazla olursa da yüzey aktif maddece zengin fazın hacmi artacağından ekstrakte edilen bileşiğin saflaştırılması zor olacaktır.

Ekstraksiyon sonucu oluşan YAM bakımından zengin faz, genellikle sıvı halde ve yüksek viskozitededir. Bazı durumlarda enstrümantal bir ölçümden önce numune girişini kolaylaştırmak için, viskoziteyi azaltmak amacıyla, su, metanol, etanol, asetonitril, başka bir YAM'ın sulu çözeltisi, vb. gibi uygun bir çözücü kullanılmaktadır.

Oluşan YAM bakımından zengin fazlar, akış enjeksiyon analizinde kullanılan normal taşıyıcılarla ve HPLC sisteminde kullanılan hidroorganik veya misel mobil fazlarla uyumludur. YAM açısından zengin faz bir HPLC sistemine enjekte edilirken, genellikle, kromatografik işlemler arasında güçlü bir hidroorganik mobil faz ile analitik kolondan non-iyonik YAM'ın yıkanması gerekmektedir (Quina ve Hinze, 1999).

2.3.1.2 İnkübasyon sıcaklığı

Bulutlanma noktası ekstraksiyon tekniğinin ikinci aşamasında, çözelti ısıtılır ve bulutlanma noktası sıcaklığı olarak bilinen bir sıcaklıkta bulanık hale gelir; bu sıcaklığın üzerinde, YAM'ların su içindeki dağılıbilirliklerini kaybederek izotropik bir faz oluşturmaları sağlanır. Ekstrakte edilen bileşiklerle YAM açısından zengin olan bir koaservatif faz ve bu faz ile denge içinde olan sulu yığın olarak adlandırılan YAM açısından fakir bir faz olacak şekilde iki faz oluşmaktadır. Ayrıca, YAM açısından zengin faza supramoleküler çözücü de denmektedir (Melnyk ve diğ, 2014). Faz ayrımı, misellerin sudaki dağılıbilirliğini destekleyen entropi ile misellerin sudan ayrılmasını sağlayan entalpi arasındaki rekabetten kaynaklanır. Sistemin bulanıklığı, çözeltilen geçen görünür ışığı dağıtan çok büyük YAM kümelerinin varlığından kaynaklanır.

Faz ayrımının gerçekleşmesi için bulutlanma noktası sıcaklık değerinin aşılması gerekmektedir. Bulutlanma noktası sıcaklığı, kullanılan YAM'a bağlı olarak değişmekte ve genellikle non-iyonik YAM'lar için daha düşük sıcaklıklarda olmaktadır. Ekstraksiyon tekniğinde yüksek bulutlanma noktalarına sahip YAM'ların kullanımı, termal olarak kararsız analitler/reaktifler için stabilite sorunlarına neden olabilmektedir. Kullanılan YAM çözeltisinin konsantrasyonuna, tuzlar, alkaliler, asitler, polimerler, üre ve diğer YAM'lar gibi katkı maddelerinin varlığına bağlı olarak bulutlanma noktası sıcaklık değerleri değişebilmektedir (Quina ve Hinze, 1999). Bulutlanma noktası sıcaklık değerinin çok üzerindeki sıcaklıklarda ise hidrojen bağlarının bozulması ve dehidrasyon oluşması nedeniyle su miktarının azalmasına bağlı olarak yüzey aktif maddece zengin fazın hacmi azaltacak, ekstraksiyon verimi düşecektir (Farajzadeh ve Fallahi, 2006).

2.3.1.3 İnkübasyon süresi

İnkübasyon süresi; bulutlanma noktası ekstraksiyonu yönteminde önemli bir parametredir. Misel oluşumu ve fazların ayrılması için belirlenen bulut noktası sıcaklığında gerekli inkübasyon süresi optimize edilmelidir. Kompleksleştirici reaktifin kullanıldığı durumlarda, analit ile kompleksleşme reaksiyonunun gerçekleşmesi ve misel yapıya hapsedilmesi için gerekli inkübasyon süresi belirlenmelidir. Yapılan çalışmalara bakıldığında inkübasyon süresi 10 ila 60 dakika arasında değişmektedir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra bekleme süresinin uzatılmasının ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir etkisi görülmemektedir. Amaç mümkün olan en düşük sıcaklıkta, minimum sürede fazların net bir şekilde ayrılarak ekstraksiyonun tamamlanmasıdır (Gökkaya, 2014).

2.3.1.4 Tuz konsantrasyonu

Yapılan çalışmalar birkaç önemli istisna dışında, ortamın iyonik kuvvetindeki artışın sürfaktan bakımından zengin faza ekstrakte edilen analit hacmi üzerine önemli bir etkisi olmadığını ancak bulutlanma noktası sıcaklığını düşürerek ve yığın sulu fazın yoğunluğunu değiştirerek iki fazın ayrılmasını kolaylaştırdığını göstermektedir. Yüksek tuz konsantrasyonu agregasyonu (birleşmeyi) arttırarak misel boyutunun artmasını, moleküllerin misel fazına itilmesinden dolayı faz ayrımını arttırmaktadır. Ayrıca ekstraksiyon ortamına ilave edilen tuz, YAM'ın polioksietilen grupların dehidratasyonundan dolayı bulutlanma noktası sıcaklığını düşürmektedir. Çözeltiye doygunluk sınırına kadar tuz ilave edilmesi ile geri kazanım yüzdesi artmaktadır (Ulusoy ve diğ, 2013).

2.3.1.5 pH

Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde, özellikle metal iyonlarının ön deriştirilmesinde ortam pH'sı ekstraksiyon verimi için optimize edilmesi gereken önemli bir parametredir. Analitin ligand ile kompleksleşme dengesi ve oluşan kompleksin yüzey aktif maddece zengin faza geçişi ortam pH'sına bağlı olabilmektedir. Kullanılan YAM çeşidine bağlı olarak değişim göstermekle birlikte, ortamdaki pozitif yüklü iyonların artışı, YAM'ın hidrofilik baş kısmının çözelti ortamındaki aktivitesini engelleyebilmektedir (Sun ve diğ, 2006). İyonize olabilen organik bileşikler nötr (yüksüz) formdayken iyonize formlarına göre yüzey aktif maddece zengin faza daha güçlü bir şekilde ayrılırlar.

3. LİTERATÜR ÖZETLERİ

Papaioannou ve Karabelas (2012), domates kabuğu kalıntılarında likopen ekstraksiyonunu incelemişlerdir. Ekstraksiyon etkinliği, enzimatik ön işlemler ile geliştirilmiştir. Likopen geri kazanımını arttırmak için YAM destekli ekstraksiyonu araştırmışlar ve kullanılan sekiz YAM arasında en uygun olanın bir molekül likopen başına 6-7 YAM molekülü oranları ile "Span 20" olduğunu göstermişlerdir. Likopen ekstraksiyon verimliliği, enzimatik ön işlemde sonra YAM destekli ekstraksiyon yoluyla iyileştirilmiştir.

Katsoyannos ve diğ. (2012) zeytin kara suyu ve kırmızı etli portakal suyundan, BNE yöntemi kullanılarak fenolik bileşikler ve karotenoidlerin ekstraksiyonu için çeşitli YAM'ların (Span 20, PEG 400, Tween 80 ve 20) uygunluğunu araştırmışlardır. Tween 80 en yüksek geri kazanım ve antiradikal aktivite göstermiştir. Çift aşamalı BNE, zeytin kara suyundan %94,4'e kadar fenoller, kırmızı etli portakal suyundan ise toplam karotenoidlerin %79,8'i geri kazanılmıştır. Başka bir çalışmada yine zeytin kara suyundan fenolik bileşikleri ayırmak için BNE yöntemi kullanılmıştır. %1 ila %10 (w/w) arasında değişen konsantrasyonlarda Triton X-100 kullanılmış ve YAM'ın bulutlanma noktası sıcaklığının üzerindeki üç sıcaklıkta (70, 80 ve 90°C) çalışılmıştır. En yüksek verim, 90°C'de %10 Triton X-100 kullanıldığında elde edilmiştir. Sonuçlar, tek adımlı BNE kullanılarak zeytin kara suyundan fenolik içeriğin %66,5'ini geri kazanılabileceğini göstermiştir (El-Abbassi ve diğ., 2014). Benzer bir çalışmada ise, Genapol X-080, TritonX-100 ve Tween 80, üç farklı iyonik olmayan YAM kullanarak sofralık zeytin işleme atıklarından fenolik bileşikler önceden konsantre etmek için BNE tekniği kullanılmıştır. En uygun koşulların %10 YAM (v/v), pH 2'de, 70°C sıcaklık ve 30 dakikalık denge süresi olduğu belirlenmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında tek aşamalı BNE ile fenolik bileşiklerin geri kazanımı Tween 80, Triton X-100 ve Genapol X-080 için sırasıyla %62, %65 ve %68 olarak belirlenmiştir (Kiai ve diğ., 2018).

Chatzilazarou ve diğ. (2012), PEG 8000 ve Genapol X-080 gibi YAM'lar kullanılarak şarap fermantasyonunun bir yan ürünü olan şarap çamurundan polifenoller geri kazanmak için BNE metodunu kullanmışlardır. İki aşamalı bir BNE uygulanarak, Genapol X-080 ile %75,8 ve PEG 8000 ile %98,5 oranında çamurdan fenoller geri kazanılmıştır.

Başka bir çalışmada ise Tayland yerel şarap örneklerindeki fenolik bileşiklerin HPLC kantifikasyonu için numune hazırlamak amacıyla BNE prosedürü geliştirmiş ve fenol

konsantrasyonu zenginleştirilmiştir. Triton X–114 kullanılarak yapılan BNE, doğrudan analize kıyasla 15 kata kadar daha yüksek zenginleştirme faktörü vermiştir. Çalışılan şaraplarda geri kazanım %90,4–110 aralığında elde edilmiş ve yüksek toplam fenolik içerik, toplam flavonoidler ve antioksidan aktivite de gözlenmiştir (Vichapong ve Santaladchaiyakit, 2014).

Yapılan bir çalışmada; şerbetçiotunda bulunan ksantohumolü, biradan ekstrakte etmek için BNE'nin, HPLC ile ayırma ve ultraviyole tespiti ile kombinasyonuna dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Ekstraksiyon ortamı olarak iyonik olmayan YAM Triton X–114 seçilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi, pH 5'de , %2,5 Triton X–114 (v/v), %15 NaCl (w/v), 70°C sıcaklıkta ve 10 dk denge süresiyle elde edilmiştir. Önerilen yöntem, çeşitli bira örneklerinde ksantohumol tayini için başarıyla uygulanmış ve %90,7 ile 101,9 arasında değişen geri kazanımlar elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin birada ksantohumol ekstraksiyonu ve tayini için organik çözücü gerektirmeyen düşük maliyetli, verimli, hızlı ve çevre dostu olduğu kanıtlanmıştır (Chen ve diğ, 2010).

Mohammadzadeh ve diğ. (2018), misel ortamında BNE yöntemiyle pancar melasından betain geri kazanımını araştırmıştır. Yönteme etki eden parametrelerin pancar melasından betain geri kazanımına olan etkilerini değerlendirmek için yanıt yüzey yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca, her bir değişkenin ve bunların etkileşimlerinin betain geri kazanımının verimliliği üzerindeki etkisini tahmin etmek için bir matematiksel model geliştirilmiştir. Model, en iyi YAM'ın Triton X–114 olduğunu ve optimum koşullar altında, pH 6'da, toplam %1,5 (w/v) YAM içeren üç aşamalı BNE kullanıldığında %80'e kadar geri kazanım sağlandığını göstermiştir. Araştırmacılar, pH'ı 2,5'e ayarladıktan ve 40°C'de yeniden ekstraksiyon yaptıktan sonra YAM bakımından zengin fazdan yaklaşık %100 oranında betainin geri kazanılabileceği önerisinde bulunmuşlardır.

Literatürde BNE tekniğinin, tıbbi tedavilerde yararlanılan şifali bitkilerdeki biyoaktif bileşiklerin ayırımında kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada, Çin baklagil bitkisi olarak bilinen cilt, yemek borusu ve servikal gibi kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan biyoaktif maddeleri içeren *Crotalaria sessiliflora* L.'den alkaloidlerin ve flavonoidlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için özütleyici olarak Triton X–100 – NaCl – HCl sistemi kullanılarak mikrodalga destekli bulut noktası ekstraksiyonu geliştirilmiştir. Sonuçlar, geri akış ısı ekstraksiyonu ve ultrason destekli ekstraksiyon ile

karşılaştırıldığında, mikrodalga destekli BNE'nin daha kısa bir sürede yüksek ekstraksiyon verimi sergilediğini göstermiştir (Tang ve diğ, 2017).

Literatürdeki bir çalışmada, inek sütünden kazein ve peynir altı suyunu ayırmak için BNE yöntemi optimize edilmiştir. Faz ayrılmasını teşvik etmek için, Triton X-114 ve elektrolit olarak NaCl kullanılmıştır. Triton X-114 konsantrasyonu ve numune hacminin BNE sürecini etkileyen ana değişken olduğu görülmüştür. Sonuçlar, optimum koşullarda, YAM bakımından zengin fazların, YAM bakımından fakir fazlara kıyasla daha yüksek protein konsantrasyonuna sahip olduğunu göstermiştir (Lopes ve diğ, 2007). Başka bir çalışmada, BNE tekniği ile termo-ayırma özelliklerine sahip kopolimerlerden (etilen oksit ve propilen oksit) oluşan sulu bifazik sistemler ve bulutlanma noktası sıcaklığını ayarlamak için potasyum fosfat kullanılarak peynir altı suyundan α -laktoalbumin ve β -laktoglobulin etkili bir şekilde ayrılmıştır (Monteiro ve diğ, 2008).

Pourreza ve ark. (2016) yaptığı çalışmada, BNE yöntemiyle sitrat iyonlarının kolorimetrik tanınması için Fe^{3+} varlığında noniyonik YAM (Triton X-100) fazındaki zenginleştirilmiş kurkumin nanopartiküller kullanılmıştır. Analizin ana prensibi, Fe^{3+} iyonlarının varlığında, kurkumin nanopartiküllerinin kolorimetrik olarak analiz edilebilen bir kompleks oluşturmasıdır (Pourreza ve diğ, 2016). Yiyecek ve içeceklerde aroma artırıcı maltolün ön konsantrasyonu ve tayini için basit bir ultrason destekli BNE yöntemi geliştirilmiş ve alevli atomik absorpsiyon spektrometresi ile birleştirilmiştir (Altunay ve diğ, 2017).

Yapılan bir çalışmada, içecek matrislerinden serbest formaldehit miktarının tayini amacıyla ön konsantrasyon için ultrason destekli BNE prosedürü geliştirilmiştir. Formaldehit, pH 7'de karışık misel ortamda YAM bakımından zengin fazda ekstrakte edilen Variamine mavisi ile reaksiyona girer. Variamine mavisi, formaldehitin kendiliğinden Cannizzaro disproporsiyonlaşmasından sonra anyonik YAM, sodyum dodesilsülfat ile iyon eşleşmesi oluşturmak için kullanılmıştır. Ekstraksiyon için Triton X-114 ve sodyum dodesilsülfat karışımı kullanmışlardır (Temel ve Gürkan, 2017).

4. MATERYAL VE METOT

4.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu tez çalışmasında; Tween-20 (polioksietilen sorbitan monolaurat), Tween-40 (polioksietilen sorbitan monopalmitat), Tween-60 (polioksietilen sorbitan monostearat), Tween-80 (polioksietilen sorbitan monooleat), metanol, aseton, β -karoten, lutein, asetonitril, MTBE (metil tert-butil eter) ve NaCl (sodyum klorür) (Sigma-Aldrich, USA) azot gazı, kullanılmıştır.

4.2 Kullanılan Alet, Ekipman ve Cihazlar

Su banyosu (Memmert, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), santrifüj cihazı (Heraeus Sepatech, Almanya), UV-VIS Çift Işın Yollu Spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU, Kyoto, Japonya), çok noktalı manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, İtalya), saf su cihazı (GFL, typ 2004, Almanya), ultra saf su cihazı (Millipore-Q, ABD), sonikatör (Soniprep 150-SANYO, Birleşik Krallık), öğütücü ve hassas terazi (Ohaus PA214C, USA), ev tipi buzdolabı ve otomatik pipet seti tez kapsamında kullanılan ekipman ve düzeneklerdir.

Kromatografik analizler, PDA dedektörü bulunan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC, Shimadzu, LC prominence, Kyoto, Japonya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan HPLC analizlerinde, YMC C30 kolon (250x4.6 mm, 5 μ m) kullanılmıştır.

4.3 Materyal

4.3.1 Örnek hazırlama

Çalışmada kullanılan atık niteliğindeki ıspanak yerel marketlerin manav reyollarından temin edilmiştir. Örnekler yıkanıp benç üzerinde kurutulmuş ve daha sonra öğütülüp toz haline getirilerek, 500 mikronluk elekten elenip cam kavanozlar içinde +4°C saklanmıştır. Bu işlem sırasında karotenoidlerin bir miktar zarar göreceği öngörülmekle beraber, endüstriyel boyutta atık bir malzeme için uygulanabilecek hızlı ve düşük maliyetli bir kurutma metodu olacağı için bu yaklaşım tercih edilmiştir. Ayrıca çalışma boyunca saklanacak örneklerin standart olabilmesi bakımından kurutarak muhafaza yönteminin en uygun yöntem olacağı düşünülmüştür. Nitekim kurutulup öğütülen örnekler harmanlanarak homojen bir örnek oluşturulmuştur.

4.4 Yöntem

4.4.1 Çözücü ekstraksiyonu

Uygulanan BNE tekniğinin, ıspanak atıklarından karotenoid ekstraksiyonundaki etkinliğinin belirlenmesi için karşılaştırma yapmak amacıyla, organik solvent kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 50 mg ıspanak tozu üzerine 10 ml metanol:aseton (1:1) karışımı ilave edilerek kabın dışı alüminyum folyo ile sarılıp 20 dk manyetik karıştırıcıda 300 rpm hızda karıştırılmıştır. Daha sonra süspansiyon Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek kalan kısma aynı solvent karışımından bir miktar daha eklenerek ekstraksiyon tekrarlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar birleştirilerek 25 mL'ye tamamlanmış ve 1 mL ependorflara alınarak azot altında uçurulmuş derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Örnek, HPLC cihazına verilirken %100 metanol kullanılarak çözülmüştür.

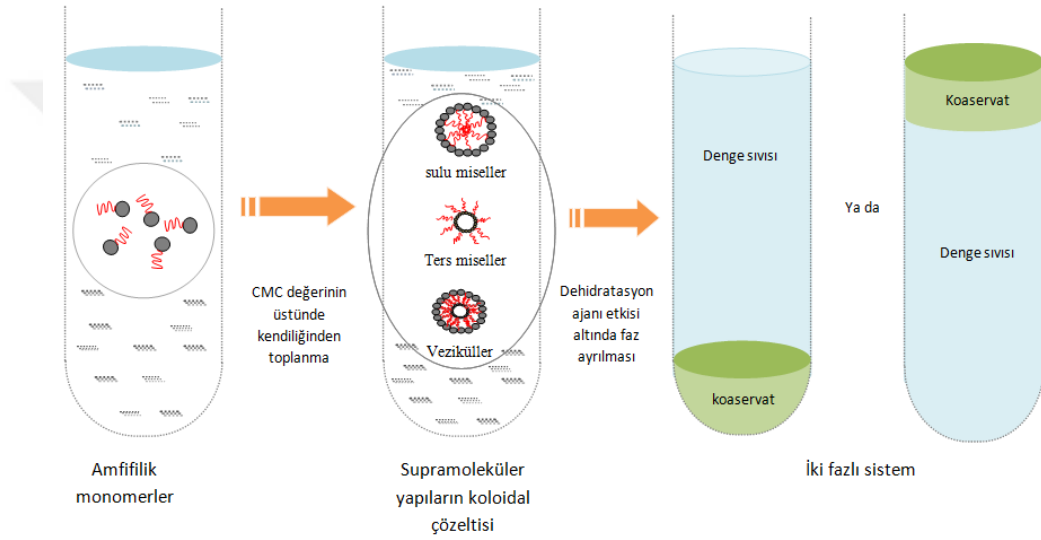
4.4.2 Misel ekstraksiyonu

Falkon tüpüne 50 mg ıspanak tozu tartılıp üzerine 1 mL distile su ilave edilerek dokunun yumuşaması için 1 saat karanlıkta, oda sıcaklığında bekletilmiştir. Toplam hacimde %10 olacak şekilde YAM (Tween 20–40–60–80) ve tuz çözeltileri ilave edilerek 10 mL'ye tamamlanan karışım manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 3 dk sonikasyona tabi tutularak dokunun parçalanması ve karotenoidlerin misel fazına geçişi sağlanmıştır. Katı partiküllerin çökmesini sağlamak için tüpler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz ve alt faz ayrı ayrı ependorflara alınarak derin dondurucuda saklanmıştır. Ayrıca ekstraksiyon kademe sayısının etkisini görmek amacıyla yukarıda anlatılan parametrelerle ekstraksiyon gerçekleştirilip sonrasında kalan alt fazın üzerine tekrar aynı miktar YAM ve tuz çözeltileri ilave edilerek ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. Bu şekilde 3 kademede yapılan ekstraksiyon sonucu balon jodede toplanan üst fazlar distile su ile 50 mL'ye tamamlanmıştır. Karıştırıldıktan sonra ependorflara alınan ekstrakt derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

4.4.3 Bulutlanma noktası ekstraksiyonu

Genel ekstraksiyon prosedürü için; 50 mL'lik falkon tüpüne 50 mg ıspanak tozu tartılarak üzerine 1 mL distile su ilave edilip, dokunun yumuşaması için 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süspansiyonun üzerine farklı oranlarda Tween serisi

YAM ve tuz (NaCl) çözeltileri ilave edilerek toplam hacim 10 mL'ye tamamlanmıştır. Karışım manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldıktan sonra 3 dk sonikasyona tabi tutularak dokunun parçalanması ve karotenoidlerin misel fazına geçişi sağlanmıştır. Katı partiküllerin çökmesini sağlamak için tüpler 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüpler sıcak su banyosuna daldırılarak farklı sıcaklık ve sürelerde bekletilip faz ayrımı sağlanmıştır. Her iki fazda (YAM bakımından zengin ve YAM bakımından fakir fazlar), epondorflara alınarak derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Yapılan analizlerde örnek olarak bu ekstraktlar kullanılmıştır. Ekstraksiyon akış şeması aşağıda Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 : Bulutlanma noktası tekniğiyle karotenoid ekstraksiyonunun şematik gösterimi (Melnik et al., 2014).

4.4.4 Bulut noktası ekstraksiyon yönteminin çeşitli parametrelerinin optimizasyonu

Bulutlanma noktası ekstraksiyon yöntemi için en uygun; YAM cinsi ve miktarı, tuz konsantrasyonu, sonikasyon süresi, su banyosu sıcaklığı ve bekletme süresi gibi parametreler optimize edilmiştir.

4.4.4.1 Yüzey aktif madde cinsi ve konsantrasyonunun optimizasyonu

Yapılan ön denemelerde, düşük HLB değerli Span 20 ve Span 40 gibi YAM'ların suda çözünürlüğünün çok zayıf olduğu ve bu çalışmada kullanımlarının mümkün olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla daha yüksek HLB değeri olan Tween 20, 40, 60, 80 ticari isimli YAM'ların kullanılmasına karar verilmiştir. Bu YAM'lar birçok gıda formülasyonunda da kullanılabilen toksisitesi oldukça düşük maddelerdir. "Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği"nde Polisorbat 20, 40, 60 ve 80 olarak geçmekte ve birçok gıda formülasyonunda 1-10 g/kg düzeyinde kullanımına izin verilmektedir. Çizelge 4.1'de bu çalışmada kullanılan YAM'ların HLB değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan YAM'ların HLB değerleri.

Ticari ad	Kimyasal ad	HLB değeri
Tween 20	Polioksietilen sorbitan monolaurat	16.7
Tween 40	Polioksietilen sorbitan monopalmitat	15.6
Tween 60	Polioksietilen sorbitan monostearat	14.9
Tween 80	Polioksietilen sorbitan monooleat	15

Her bir YAM'ın misel oluşturduğu kritik konsantrasyonu belirlemek amacıyla son hacimde %4-6-8-10-12 YAM olacak şekilde farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanmıştır. Diğer parametreler sabit (%10 NaCl, faz ayrımı için 80°C sıcaklıkta 40 dk bekleme) tutulmuştur.

4.4.4.2 Tuz konsantrasyonunun optimizasyonu

Tuzun bulutlanma noktası ekstraksiyonundaki temel görevi su fazının iyonik şiddetini artırarak YAM fazının ayrımını kolaylaştırmasıdır. Bu amaçla analitik saflıkta NaCl kullanılmıştır. Diğer ekstraksiyon parametreleri sabit tutularak tuz derişimi toplam reaksiyon

karışımının %5–7,5–10–12,5–15'i olacak şekilde ayarlanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Kontrol olarak tuz içermeyen örnek kullanılmıştır.

4.4.4.3 İnkübasyon sıcaklığının optimizasyonu

Kritik bulutlanma sıcaklığının belirlenmesi amacıyla sabit bir konsantrasyonda (%10) YAM çözeltileri hazırlanarak 70-75-80-85-90°C sıcaklıklarda denemeler yapılmıştır. Kontrol olarak oda sıcaklığında (25°C) ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerdeki bulanıklaşma gözlem yoluyla tespit edilmiştir.

4.4.4.4 İnkübasyon süresinin optimizasyonu

Belirgin bir faz ayırımının gerçekleşmesi için gerekli olan süre; 80°C'de sabit tutulan su banyosunda, %10 tuz ve YAM içeren karışımların 20-30-40-50-60 dk bekletilmesiyle belirlenmiştir.

4.5 Karotenoid Analizi

Karotenoidlerin analizi, HPLC sistemi kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla YMC C30 kolon (250×4.6 mm, 5 µm) ve foto diyot array dedektör (PDA) kullanılmıştır. Analizler 25 °C sabit kolon fırını sıcaklığında ve mobil faz olarak metanol (A), asetonitril (B) ve metil tert-butil eter (C) kullanılarak gradient akış şartlarında yapılmıştır. Çizelge 4.2' de 30 dk analiz süresince uygulanan gradyan akış koşulları verilmiştir. Enjeksiyon hacmi 50 µL, akış hızı 1 mL/dk olarak belirlenmiştir (Westphal ve ve diğ, 2018). Yüzey aktif madde açısından zengin ekstraktlar %100 metanol ile seyreltilerek, diğer örnekler seyreltilmeden kolona enjekte edilmiştir. Karotenoidler 475 nm'de takip edilmiş ve her bir örneğin alıkonma süresi ve konsantrasyonu dış standardın farklı konsantrasyonlarının aynı koşullarda analizi ile elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak hesaplanmıştır.

β-karoten ve lutein standartları ayrı ayrı THF içinde çözülerek azot gazı altında uçurulmuştur. Kalıntılar mobil fazda çözülerek 1, 2, 5, 8, 12 ppm çözeltiler hazırlanmıştır.

Çizelge 4.2 : Karotenoidlerin ayrılmasında zamana karşı mobil faz kompozisyonunda gradyan akış koşulları. Mobil faz bileşim değişimleri lineer gradiyent olarak gerçekleştirilmiştir.

Zaman (dk)	Mobil faz A CH₃OH	Mobil faz B CH₃CN	Mobil faz C MTBE
0	75	25	0
20	35	15	50
25	35	15	50
25.5	75	25	0
30	75	25	0

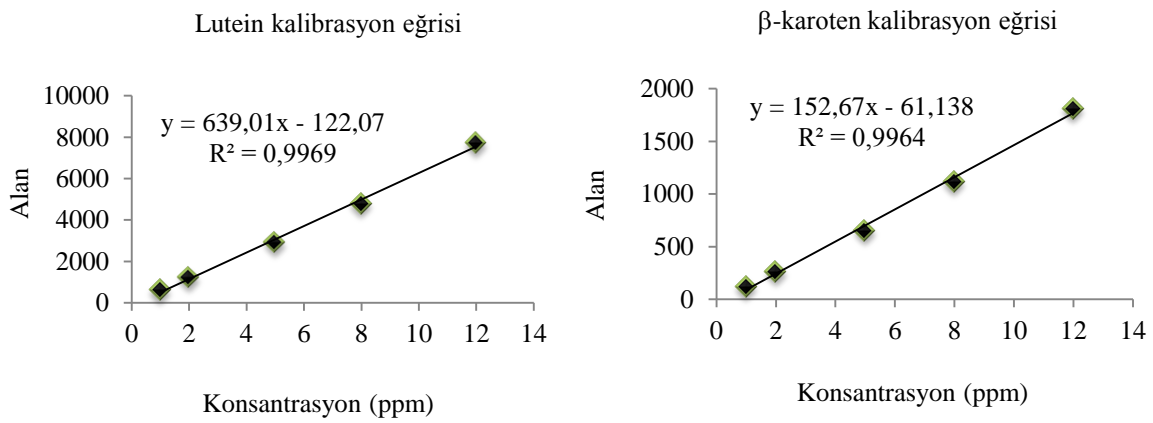
4.5.1 İstatistiksel analiz

Tüm analizler iki tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları, ortalamaları alınmış ve \pm standart sapmaları grafiklerde hata çubukları şeklinde gösterilmiştir. İstatistiksel analizde "SPSS 22 for Windows" programı kullanılmıştır. Analizler sonucu elde edilen veriler "One way ANOVA" analizine tabii tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklar Duncan ($\alpha=0.05$) çoklu karşılaştırmalı testi kullanılarak gruplandırılmıştır. Alt ve üst fazdaki karotenoid miktarlarının kıyaslanması amacıyla "Independent Samples t-Test" metodu kullanılmıştır. Örneklere ilişkin istatistiksel tablolar Ek'de verilmiştir.

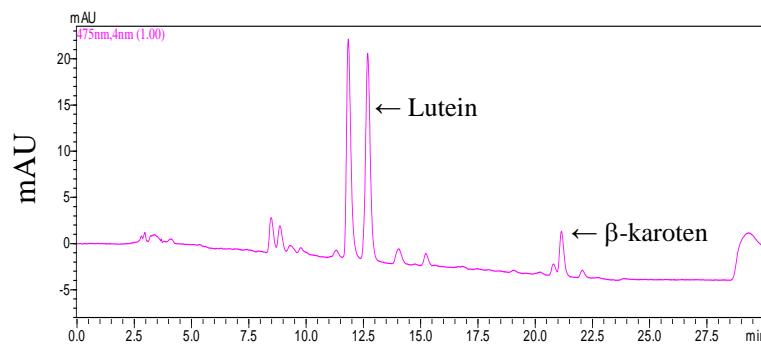
5. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

5.1 Karotenoid Analizi

Bulutlanma noktası ekstraksiyon metodunu etkileyen parametrelerden YAM ve tuz konsantrasyonu, su banyosu sıcaklığı ve bekletme süresi, dört farklı YAM kullanılarak optimize edilmiştir. Standartlarla elde edilen kalibrasyon grafiğine ait denklem kullanılarak, optimize edilen ekstraktların içerdiği lutein ve β -karoten miktarları hesaplanmış ve karşılaştırmalar grafik halinde verilmiştir. Standartlara ait kalibrasyon eğrileri Şekil 5.1’de verilmiştir. Ispanak tozu örneğinden BNE yöntemiyle elde edilen ekstraktlara ait HPLC kromatogramı Şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.1 : Lutein ve β -karoten standart kalibrasyon eğrisi.

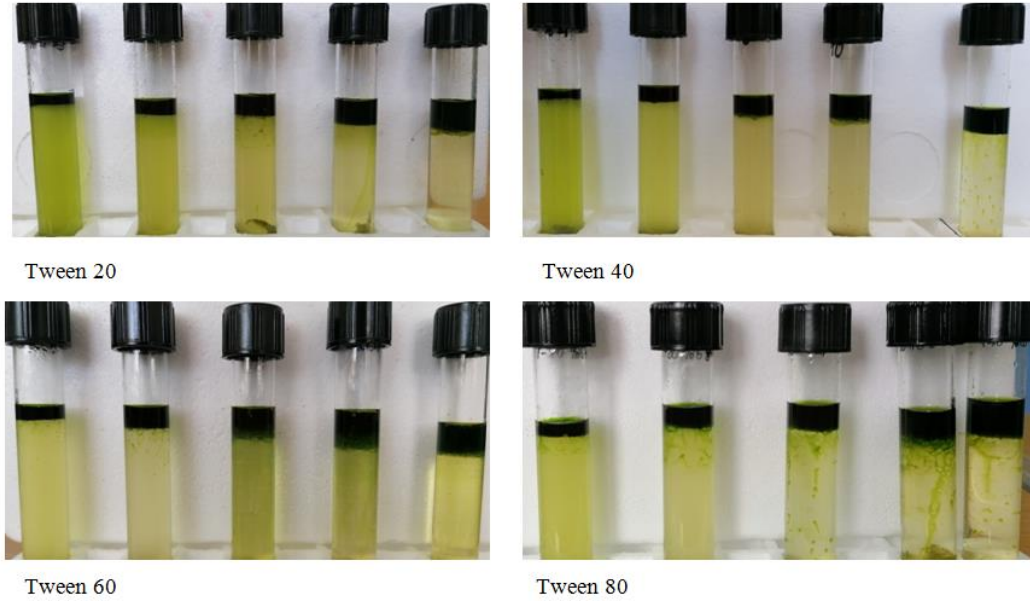


Alıkonma süresi

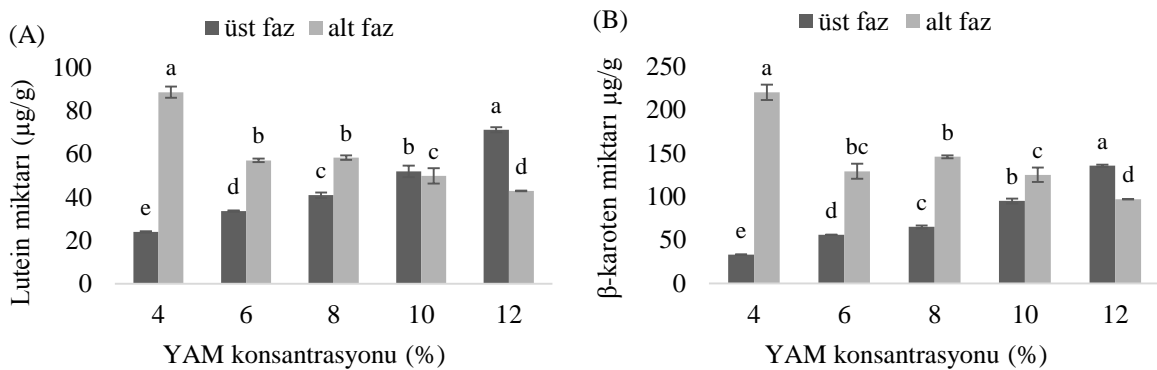
Şekil 5.2 : Tween 60 kullanılarak gerçekleştirilen bulut noktası ekstraktına ait HPLC kromatogramı.

5.1.1 Yüzey aktif madde cinsi ve konsantrasyonunun etkisi

Farklı YAM'lar (Tween 20, 40, 60 ve 80) kullanılarak %4-12 (w/v) konsantrasyon aralığında gerçekleştirilen BNE sonucu oluşan faz ayırımına ait görüntüler Şekil 5.3'de verilmiştir. Görüntüler, YAM konsantrasyonundaki artışla birlikte üst fazın hacminde artış olduğunu, alt fazda ise rengin açıldığını göstermektedir. Bu durum da üst faza ekstrakte edilen karotenoid miktarındaki artışla ilişkilendirilebilir.



Şekil 5.3 : Farklı YAM konsantrasyonunda elde edilen faz ayırımına ait görüntüler (YAM konsantrasyonları soldan sağa doğru %4, 6, 8, 10 ve 12'dir).

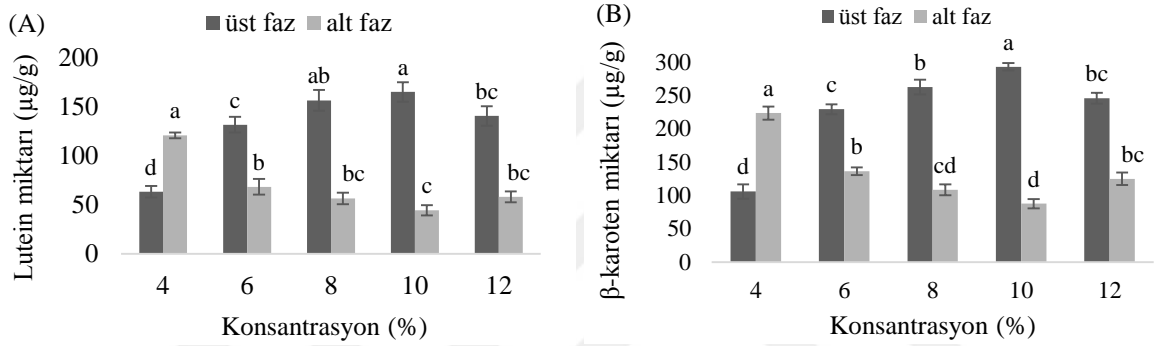


Şekil 5.4 : Tween 20'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Farklı Tween 20 konsantrasyonları ile üst faza ekstrakte edilen lutein miktarları arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Konsantrasyon arttıkça üst fazın lutein içeriğinin de doğrusal olarak arttığı, alt fazda ise

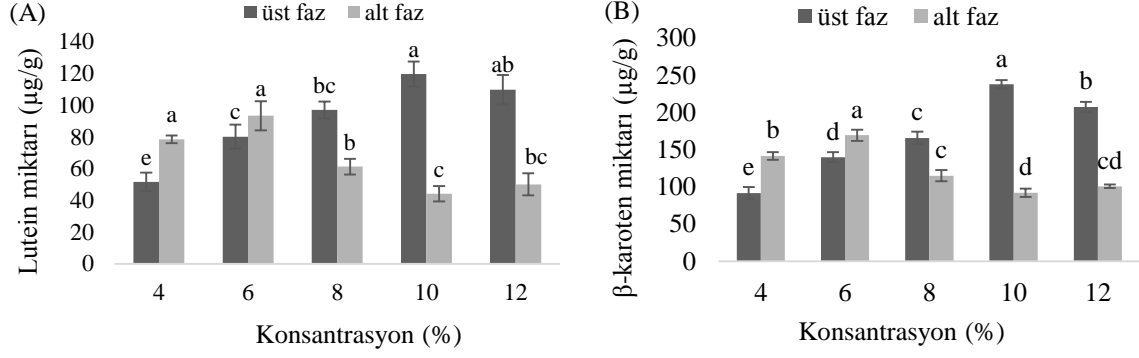
azaldığı görülmüştür. Konsantrasyonunun %10'a artırılmasıyla üst fazdaki lutein miktarı alt fazdaki lutein miktarından daha fazla çıkmıştır. En yüksek kazanım ise 71,23 µg/g lutein miktarı ile %12 YAM konsantrasyonunda gerçekleşmiştir (Şekil 5.4-A). Lutein miktarları, alt ve üst faza göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($P>0,05$).

Ekstrakte edilen β-karoten miktarı ile YAM konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark görülmektedir ($P<0,05$). Konsantrasyon arttıkça üst fazın β-karoten içeriği yaklaşık 4 kat artarken sadece %12 YAM konsantrasyonunda üst fazdaki β-karoten miktarı alt fazdakinden daha fazla olmuştur (Şekil 5.4-B). Alt fazdaki β-karoten ortalamaları, üst fazdakinden önemli düzeyde daha yüksektir ($P<0,05$).



Şekil 5.5 : Tween 40'ın farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 40 konsantrasyonundaki artışla beraber üst fazdaki lutein ve β-karoten miktarı da artış göstermiştir. Bu artış, başlangıçtaki karotenoid miktarına göre yaklaşık 2,5 kat farkla %10 YAM konsantrasyonunda en üst seviyeye ulaşmıştır. Konsantrasyon %12'ye yükseltildiğinde ise üst fazın içerdiği karotenoid miktarında tekrar bir düşüş olup, ekstrakte edilen karotenoid miktarı %8'dekinden daha az olmuştur. En düşük kazanım 63,16 µg/g (lutein) ve 105,87 µg/g (β-karoten) miktarlarıyla, YAM konsantrasyonu %4 olan örnekte olmuştur ($P<0,05$). En yüksek kazanım ise 164,82 µg/g lutein ve 293,06 µg/g β-karoten miktarı ile %10 YAM konsantrasyonunda olmuştur (Şekil 5.5). Lutein ve β-karoten miktarları, alt ve üst faza göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gösterip; üst fazda ortalamalar, alt fazdakinden daha fazladır ($P<0,05$).

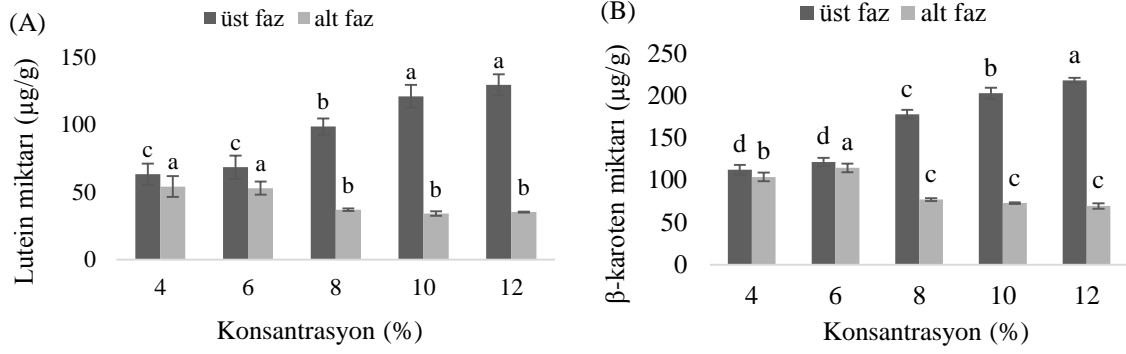


Şekil 5.6 : Tween 60'ın farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 60 konsantrasyonundaki artışla beraber üst fazın içeriğindeki lutein miktarında yaklaşık $52 \mu\text{g/g}$ 'dan $120 \mu\text{g/g}$ 'e doğru istatistiksel olarak önemli düzeyde bir artış görülmüştür ($P<0,05$). Konsantrasyon %12 de ekstrakte edilen lutein miktarında tekrar bir düşüş olmakla beraber istatistiksel olarak %10'daki miktarla aralarında önemli bir fark görülmemiştir (Şekil 5.6-A).

Benzer şekilde, Şekil 5.6-B'de görüldüğü gibi %12 YAM konsantrasyonunda bir düşüş olsa da, konsantrasyon arttıkça üst fazın içerdiği β-karoten miktarında önemli düzeyde bir artış görülmüştür ($P<0,05$). Üst fazdaki en yüksek β-karoten miktarına $238,04 \mu\text{g/g}$ ile %10 YAM konsantrasyonunda ulaşıp bunu $207,58 \mu\text{g/g}$ ile %12 YAM konsantrasyonu takip etmiştir. Üst fazdaki lutein ve β-karoten ortalamaları, alt fazdakinden önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$).

Tween 60 kullanılarak gerçekleştirilen BNE sonucu optimum YAM konsantrasyonu %10 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.7 : Tween 80'nin farklı konsantrasyonlarının ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Şekil 5.7-A'da verildiği gibi istatistiksel olarak, %4 ile %6 Tween 80 içeren örnekler arasında içerdikleri lutein miktarları bakımından önemli bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Ayrıca %10 ve %12 YAM konsantrasyonları arasında da önemli düzeyde bir fark görülmemekle birlikte, YAM konsantrasyonu arttıkça üst fazdaki lutein miktarı, 63,37 µg/g'dan 129,74 µg/g'a çıkmıştır.

Şekil 5.7-B'e göre, üst fazın içeriğindeki β-karoten miktarları açısından %4 ile %6 arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Ancak en fazla kazanım hem lutein (129,74 µg/g) hem de β-karoten (218,28 µg/g) için %12 Tween 80 konsantrasyonunda elde edilmiştir. Fazlar arasında, karotenoid miktarları açısından anlamlı bir farklılık olup; üst fazdaki lutein ve β-karoten ortalamaları, alt fazdan daha yüksektir ($P<0,05$).

Elde edilen sonuçlar YAM konsantrasyonunun ekstrakte edilen karotenoid miktarını etkileyen önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Daha önce de ifade edildiği gibi, sistemin bulutlanma noktasına ulaşip faz ayrımının gerçekleşmesi için ortamdaki YAM konsantrasyonu KMK'nın üzerinde olmalıdır. Faz ayrımının gerçekleşmesinin yanı sıra daha yüksek ekstraksiyon verimi için en ideal YAM konsantrasyonun belirlenmesi gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken diğer bir önemli nokta da; iki fazın hacimleri oranının YAM konsantrasyonundaki azalmayla artmasıdır (Fontana ve diğ., 2009). Dört farklı YAM çeşidi kullanılarak beş farklı konsantrasyonda gerçekleştirilen BNE tekniğinde, kontrol (YAM içermeyen) olarak kullanılan sadece su ve %10 NaCl içeren örneklerde, sıcak su banyosunda bekletme sonrasında faz ayrımı görülmemiştir. Bu durum karotenoidlerin hidrofobik yapılarından dolayı beklenen bir sonuç olmuştur. Diğer örneklerde (YAM

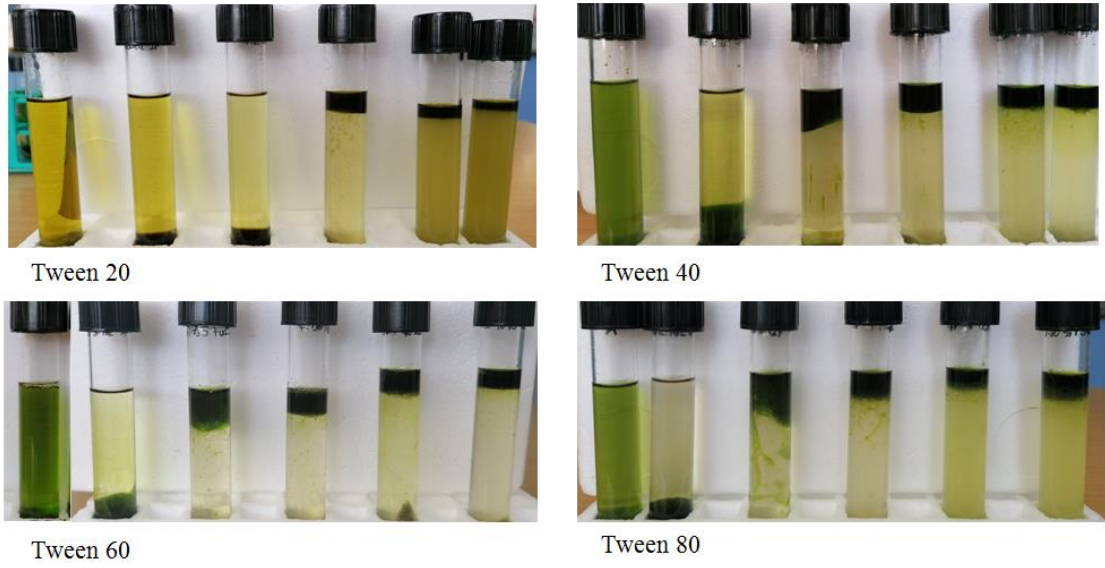
içeren) ise daha önce yapılan çalışmalarda da olduğu gibi, belli bir seviyeye kadar YAM konsantrasyonu arttıkça üst fazın hacmi dolayısıyla içerdiği lutein ve β -karoten miktarı da artış göstermiştir. Ortamdaki YAM konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaştıktan sonra daha fazla YAM ilavesi, viskoziteyi artırarak üst fazın alınmasını zorlaştıran yapışkan bir yapı oluşmasına sebep olmuştur. Nitekim Tween 40 ve 60 da YAM konsantrasyonunun %12'ye çıkarılması, örneğin su banyosundan çıkartıldığı anda üst fazda çalışılması zor bir yapı oluşarak, kayıplar yaşanmasına neden olmuştur. Bu nedenle optimum Tween 40 ve 60 konsantrasyonu %10 olarak belirlenmiştir. Tween 20 ve 80 kullanıldığında ise konsantrasyonun artırılmasıyla üst faza ekstrakte edilen karotenoid miktarı da artarak, %12'de maksimum seviyeye ulaşmıştır. Yapılan farklı bir çalışmada; şarap örneklerinden fenolik bileşiklerin BNE için, Triton X-114 konsantrasyonunun ekstraksiyon verimine etkisi %1.0-2.5 (w/v) aralığında incelenmiştir. Konsantrasyonun %2,0'a kadar artmasıyla ekstrakte edilen fenolik içeriğin kademeli olarak arttığı, daha fazla artırılmasıyla ise azaldığı bildirilmiştir (Vichapong ve Santaladchaiyakit, 2014).

Safdarian ve diğ., (2021), meyve suyu örneklerinden β -karoteni ön deriştirme yapmak için BNE kullanmışlardır. β -karoten ekstraksiyonu ile YAM konsantrasyonu arasında negatif ilişkiyi olduğunu; YAM konsantrasyonunun %2'den %10'a yükselmesiyle geri kazanımın yaklaşık 3 kat düştüğünü gözlemlemişlerdir.

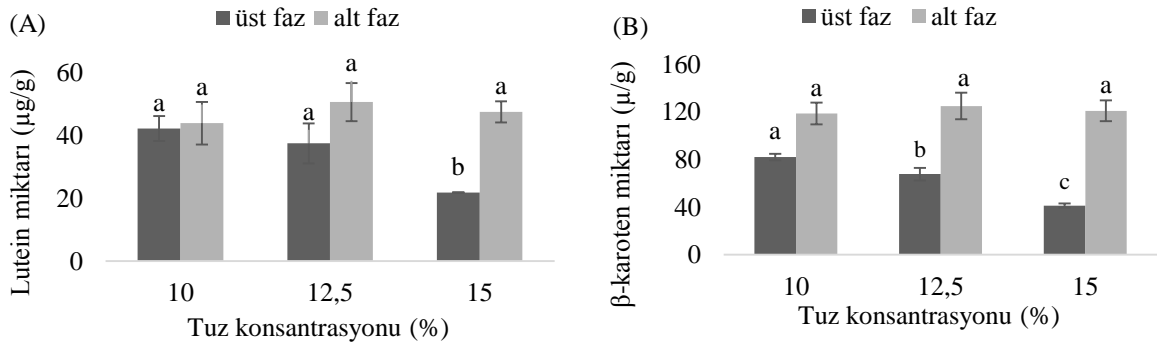
Optimum konsantrasyonlarda Tween 20, 40, 60 ve 80 kullanılarak ekstrakte edilen lutein miktarları sırasıyla 71,23- 164,82- 119,75- 129,74 $\mu\text{g/g}$ ve β -karoten miktarları 135,63- 293,06- 238,04- 218,28 $\mu\text{g/g}$ olup en uygun YAM Tween 40 olarak belirlenmiştir.

5.1.2 Tuz konsantrasyonunun etkisi

Farklı YAM' ler (Tween 20, 40, 60 ve 80) %10 (w/v) konsantrasyonda kullanılarak, sabit sıcaklıkta (80°C), %5-15 (w/v) aralığında tuz konsantrasyonunda gerçekleştirilen BNE sonucu oluşan faz ayırımına ait görüntüler Şekil 5.8'da verilmiştir. Tuz konsantrasyonundaki değişimle birlikte, üst fazın hacminde değişim olduğu ancak bunun konsantrasyon artışıyla doğrusal olmadığı görülmektedir. Tuz içermeyen kontrol örneklerinde faz ayırımı görülmezken, %5 tuz içeren örneklerde tüpün alt kısmında faz oluşumunun başladığı görülmektedir. Bu durum tuz konsantrasyonunun BNE'yi etkileyen önemli bir parametre olduğunu göstermektedir.



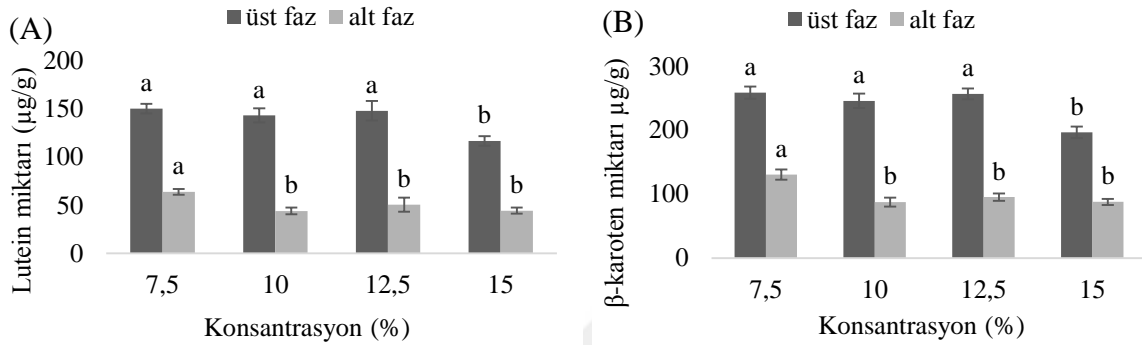
Şekil 5.8 : Farklı tuz konsantrasyonunda elde edilen faz ayrımlarına ait görüntüler (Tuz konsantrasyonları soldan sağa doğru %0, 5, 7.5, 10, 12.5 ve 15'tir).



Şekil 5.9 : Tween 20'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 20 kullanılarak gerçekleştirilen BNE sonucu ortamındaki tuz konsantrasyonunun, üst faza ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarını önemli düzeyde etkileyen bir parametre olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Kontrol örneğinde bulutlanma gerçekleşmediğinden faz ayrımı olmayıp, % 5 ve 7,5 tuz konsantrasyonlarında ise bulutlanma tüpün alt kısmında olduğundan üst fazın hacmi belirlenememiş bu nedenle hesaplamaya alınamamıştır. Tuz konsantrasyonları % 10, %12,5 ve % 15 olan örneklerde de üst fazdaki karotenoid miktarları alt fazdakinden daha düşük olmuştur. Tuz konsantrasyonu arttıkça üst fazdaki karotenoid miktarı azalıp alt fazda artmıştır. Tuz konsantrasyonu %10 iken üst fazın içeriğinde 42,27 µg/g lutein varken, konsantrasyon artışıyla önce 37,58 µg/g'a daha sonra 21,92 µg/g'a düşmüştür (Şekil 5.9-A). Aynı durum, β-karoten için de söz konusu

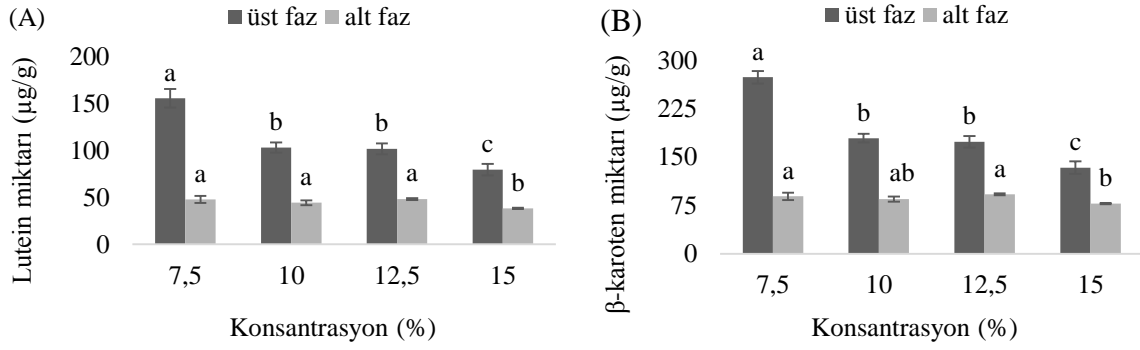
olup, başlangıçta üst fazdaki β -karoten miktarı 82,06 $\mu\text{g/g}$ iken tuz konsantrasyonunun artmasıyla önce 67,74 $\mu\text{g/g}$ 'a sonra 41,36 $\mu\text{g/g}$ ' a düşmüştür (Şekil 5.9-B). Tuz konsantrasyonu %10 (w/v) olan örneklerde üst faza ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarları daha yüksek olup, optimum değer olarak belirlenmiştir. Fazlar arasında lutein ve β -karoten miktarları bakımından anlamlı bir fark yoktur ($P>0,05$).



Şekil 5.0 : Tween 40'ın farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β -karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 40 kontrol örneğinde bulutlanma gerçekleşmediğinden faz ayrımı görülmeyip, %5 tuz konsantrasyonunda ise bulutlanma tüpün alt kısmında olduğundan üst fazın hacmi belirlenemeyip hesaplamaya dahil edilmemiştir. Tuz konsantrasyonu %7,5, %10 ve %12,5 olan örnekler arasında üst faza ekstrakte edilen lutein miktarları açısından önemli bir fark görülmemektedir ($P>0,05$). Başlangıçta üst fazda 150 $\mu\text{g/g}$ olan lutein miktarı, tuz konsantrasyonu %10 (w/v) olduğunda, yaklaşık %4 oranında düşmüştür. Tuz konsantrasyonu %12 olduğunda üst faza ekstrakte edilen lutein miktarı tekrar artarak, % 7,5 tuz içeren örneğe yakın miktarda lutein ekstrakte edilmiştir (Şekil 5.10-A). Konsantrasyon % 15 olduğunda ise önemli düzeyde bir düşüş olmuştur ($P<0,05$).

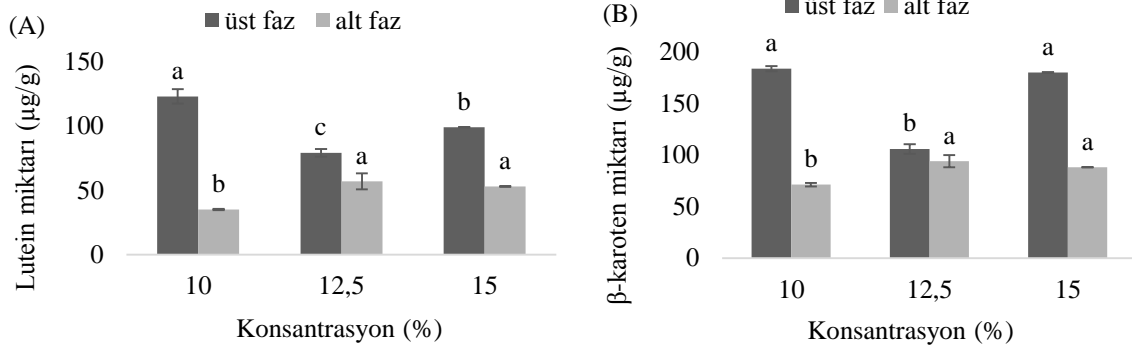
İstatistiksel olarak, üst fazdaki β -karoten miktarları açısından tuz konsantrasyonu %7,5, 10 ve 12,5 olan örnekler arasında önemli bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Ancak tuz konsantrasyonu %15 olan örnek ile diğer örnekler arasında önemli düzeyde bir fark olduğu görülmektedir ($P<0,05$). Üst faza ekstrakte edilen β -karoten miktarı 258,67 $\mu\text{g/g}$ ile en fazla %7,5 (w/v) tuz konsantrasyonunda olmuştur (Şekil 5.10-B). Lutein ve β -karoten miktarları bakımından fazlar arasında anlamlı bir fark olup; karotenoid miktarları, alt faza göre üst fazda daha yüksektir ($P<0,05$).



Şekil 5.11 : Tween 60’ın farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 60 kullanıldığında, tüm örneklerde üst fazın içerdiği karotenoid miktarları alt fazdakinden daha yüksek çıkmıştır. Tuz konsantrasyonu %7,5 olan örneklerle diğer örnekler arasında ekstrakte edilen lutein miktarları açısından önemli bir fark olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Tuz konsantrasyonu %10 ile %12,5 olan örnekler arasında ise önemli düzeyde bir fark görülmemektedir ($P>0,05$). En fazla lutein miktarı 155,49 µg/g ile %7,5 tuz içeren örnekte olup artan tuz konsantrasyonu ile ters orantılı olarak bu miktar düşmüştür (Şekil 5.11-A).

Tuz konsantrasyonu, %10 ile 12,5 olan örnekler arasında ekstrakte edilen β-karoten miktarları açısından, istatistiksel olarak önemli düzeyde bir fark görülmemektedir ($P>0,05$). Üst faza ekstrakte edilen β-karoten miktarı 274 µg/g ile en fazla %7,5 (w/v) tuz konsantrasyonunda olup, %10 (w/v) tuz içeren örnekte %34 oranında ani bir düşüş olmuştur (Şekil 5.11-B). Alt faz ile üst faz arasında karotenoid miktarları açısından anlamlı bir fark görülüp, üst fazın içerdiği lutein ve β-karoten ortalamaları alt fazdakinden önemli seviyede daha fazladır ($P<0,05$).



Şekil 5.12 : Tween 80'nin farklı tuz konsantrasyonlarında ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein (A) ve β-karoten (B) miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P < 0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 80 ile %5 tuz konsantrasyonunda bulutlanma tütün alt kısmında oluştuğundan, %7,5'da ise oluşan üst faz kararsız olduğundan hacimleri belirlenememiş ve bu nedenle hesaplama dahil edilmemişlerdir. İstatistiksel olarak ekstrakte edilen lutein miktarıyla tuz konsantrasyonları arasında önemli bir ilişki olduğu belirlenmiştir ($P < 0,05$). Tuz konsantrasyonu %10-12,5 ve 15 olan örneklerde ise doğrusal bir azalış ya da artış gözlenmemiştir. Nitekim %10'da gözlenen yüksek kazanım %12,5'da ani bir düşüşle devam edip %15 tuz konsantrasyonunda tekrar artışa geçmiştir. Bu durumun nedeninin, Tween 80'nin yapışkan yapısından kaynaklı analiz sırasında meydana gelmiş muhtemel kayıplardan dolayı olduğu düşünülmektedir. Üst fazın içerdiği en fazla lutein miktarı 123,16 µg/g ile %10 (w/v) tuz konsantrasyonunda gözlenmiştir (Şekil 5.12-A).

Ekstrakte edilen β-karoten miktarları açısından ise % 10 ve 15 tuz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark yokken %12,5 tuz içeren örnek diğerlerinden önemli bir farkla ayrılarak 105,64 µg/g ile en düşük kazanımı göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre 183,66 µg/g β-karoten miktarıyla en ideal tuz konsantrasyonu %10 olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.12-B). Lutein ve β-karoten miktarları, alt ve üst faza göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir ($P > 0,05$).

Farklı YAM'lar %10 konsantrasyonda kullanılarak sabit sıcaklık (80°C) ve sürede (40 dk) gerçekleştirilen BNE'ye tuzun etkisi %5-15 (w/v) aralığında NaCl konsantrasyonlarında incelenmiştir. Kontrol örneklerinde (tuz içermeyen) belirlenen inkübasyon süresi boyunca faz ayrımı görülmemiştir. Bu durum ekstraksiyon ortamının iyonik şiddetinin faz ayrımını etkileyen önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Gerçekleştirilen ekstraksiyon yönteminde, YAM çeşidine bağlı olmakla birlikte bulutlanmanın başlayıp faz ayrımının

gerçekleşmesi için ortam sıcaklığının belirli bir değere ulaşması gerekmektedir. Karotenoidler ısıya duyarlı bileşikler olduğundan ekstraksiyon sırasında ortam sıcaklığının çok yüksek olması kayıplar yaşanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle mümkün olan en düşük sıcaklıkta ve en kısa sürede ekstraksiyonun tamamlanması gerekmektedir. Bulut noktası sıcaklığı olarak bilinen YAM'a özgü bu kritik sıcaklık değeri, tuz ilavesiyle düşürülerek ekstraksiyonun daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmesi sağlanabilmektedir. Ayrıca fazlar arasında yoğunluk farkına neden olarak faz ayrılmasının daha kısa sürede meydana gelmesini sağlamaktadır. Ekstraksiyon ortamındaki elektrolitlerin tuzlama etkisi, kationların hidrokarbon zincirini (polioksietilen grupların) dehidrasyona uğratması bulutlanma noktası sıcaklığını düşürmekte, anyonların ise su molekülleriyle kendiliğinden birleşmesiyle misel boyutu ve agregasyon sayısının artması, böylece karotenoidlerin YAM açısından zengin fazda daha fazla çözünmesine neden olur (Ulusoy ve ve diğ, 2013).

Tuz varlığında, bulutlanma noktası sıcaklığının artmasının nedeni olarak; bir iyonun sulu fazdan misel fazına serbest enerji transferi gösterilebilir. Bu enerji, misel fazındaki dehidrasyon enerjisi ve çözünme enerjisinin toplamıdır. Bir hidrofilik anyon, misel fazında hidrofobik bir iyondan daha zor çözünebilse de, baskın olan dehidrasyon enerjisinden dolayı, hidrofilik anyonlar misel fazından uzaklaşacaktır. Ancak, daha az hidratlanmış anyonlar misel fazına daha kolay transfer edilerek, YAM zincirleri arasında itici bir etkileşime neden olarak bulutlanma noktası sıcaklığını arttırır. Bununla birlikte, yüksek tuz konsantrasyonlarında miseller tarafından tutulan önemli miktarlarda suyun varlığı, parçacıkla yayılan suyun fiziksel olarak tutulmasına yol açan misel yüzeyinin pürüzlülüğüne bağlı olabilir. Çünkü etilenoksit zincirinin dehidrasyonu yapısal düzensizliklere neden olur ve artan elektrolit konsantrasyonlarında su kümeleri oluşur (Mukherjee ve diğ, 2011).

NaCl iyonlarının ayrışarak su molekülleri ile birleşip güçlü bağlar oluşturması, tuz konsantrasyonu ile orantılı olarak entalpi ve entropinin artmasına neden olur. Böylece, iç enerji artarak, YAM ile su arasındaki etkileşimlerin giderek küçülmesi, faz ayrımının daha kolay gerçekleşmesini sağlar (De Lemos Araújo ve diğ, 2015).

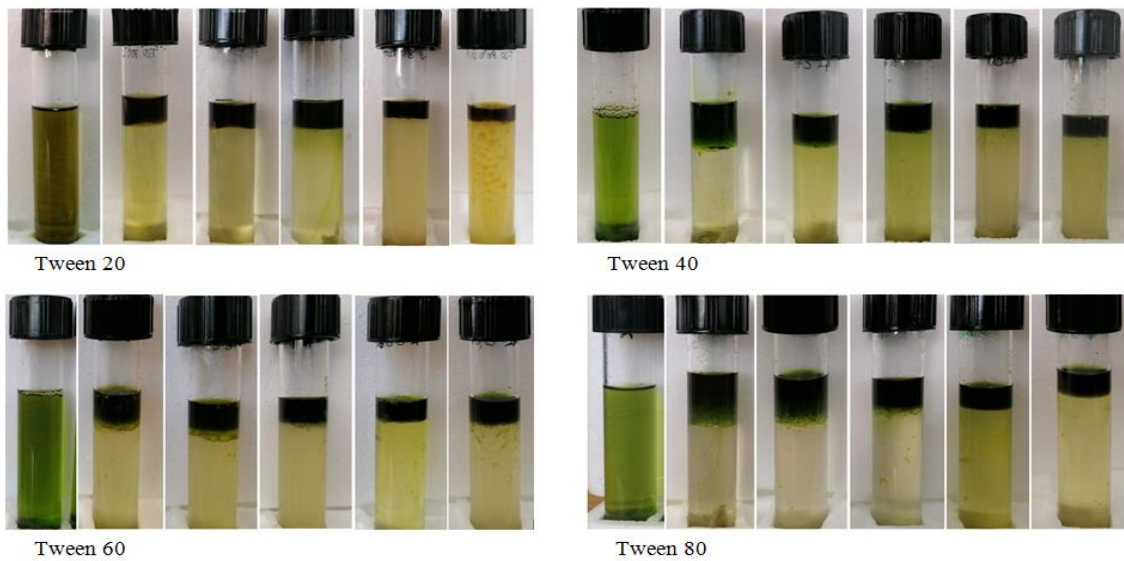
Tween 20 ve 80 kullanılarak gerçekleştirilen BNE' de en yüksek kazanım %10 (w/v) tuz konsantrasyonunda, Tween 40 ve 60 da ise %7.5 (w/v) da olup artan konsantrasyonlarda ekstrakte edilen karotenoid oranında düşüş olmuştur. Tuz konsantrasyonunun daha fazla artırılmasıyla çözelti doygun hale gelmekte, YAM açısından zengin faz yapışkan bir yapı oluşturarak çalışılması zor bir hal almaktadır. Doymuş çözeltide meydana gelen çökme,

normal yük dağılımının bozulması ve elektrolit ilavesiyle miseller arası itmenin engellenmesine bağlanabilir.

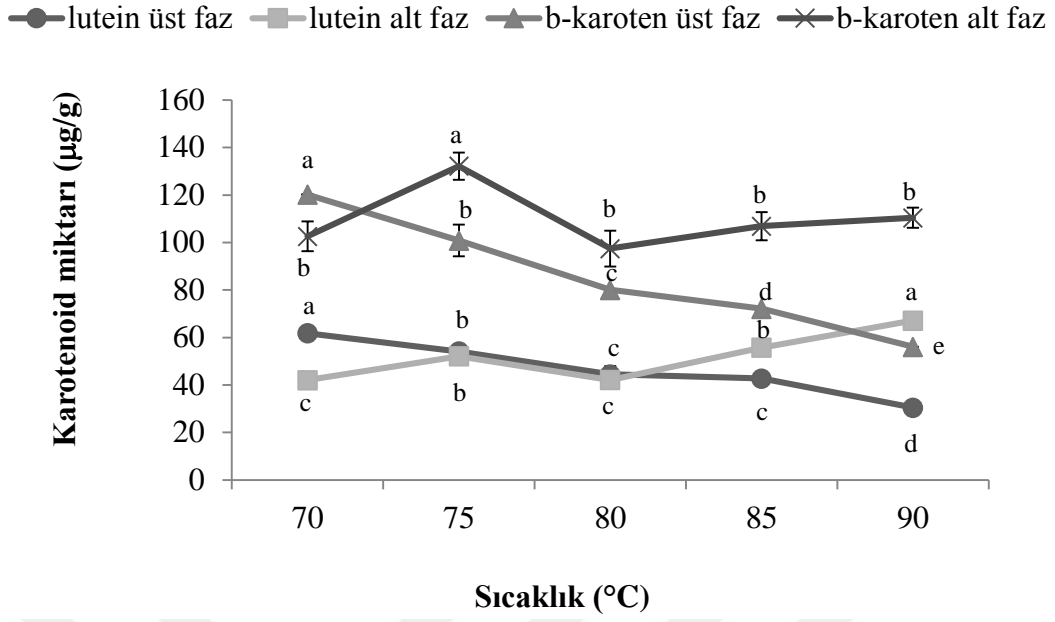
Yapılan farklı çalışmalardaki bulgular elde edilen verilerle benzerlik göstermektedir. Motikar ve diğ. (2020), maksimum toplam polifenol, toplam flavonoid verimi ve antioksidan aktivite için % 6 ila 18 w/v arasında değişen farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi araştırmışlardır. Tuz ilavesindeki %6'dan %14'e artışın, verimde artışa yol açtığını, %18 w/v NaCl konsantrasyonunda BNE veriminin azaldığını gözlemlemişlerdir. Luo ve diğ. (2018), fenolik bileşiklerin BNE ekstraksiyonunda Na_2SO_4 etkisini, 0,4 ile 0,65 mol/L konsantrasyon aralığında incelemişler; en yüksek ekstraksiyon verimliliğine 0.55 mol/L'lik tuz konsantrasyonunda ulaşmışlar ve bu konsantrasyonun üzerinde ekstraksiyon verimliliğinin sabit kaldığını hatta bazen azaldığını belirtmişlerdir.

5.1.3 İnkübasyon sıcaklığının etkisi

Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde, inkübasyon sıcaklığı misel oluşum süresi ve fazların etkin şekilde ayırımında önemli bir parametredir. Sabit ekstraksiyon koşullarında (YAM ve tuz konsantrasyonu % 10, inkübasyon süresi 40 dk) ortam sıcaklığının ekstraksiyon verimine etkisini belirlemek için 70-90 °C arası sıcaklıklarda denemeler yapılmış ve ekstraksiyon sonrasında ait görüntüler Şekil 5.13'de verilmiştir. Kontrol örneklerinde (oda sıcaklığında) faz ayrımı görülmeyp, 70°C den sonra artan sıcaklıkla beraber genellikle üst faz hacminin azaldığı alt fazda ise bulanıklaşma olduğu görülmektedir.

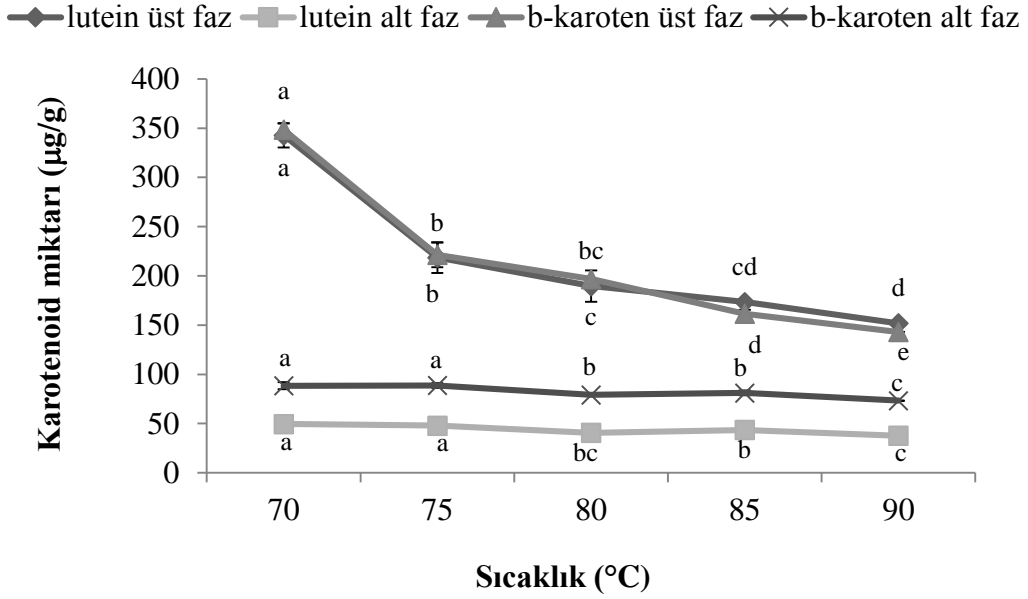


Şekil 5.13 : Farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyon denemelerine ait görüntüler (sıcaklıklar soldan sağa; oda sıcaklığı, 70, 75, 80, 85, 90 °C)



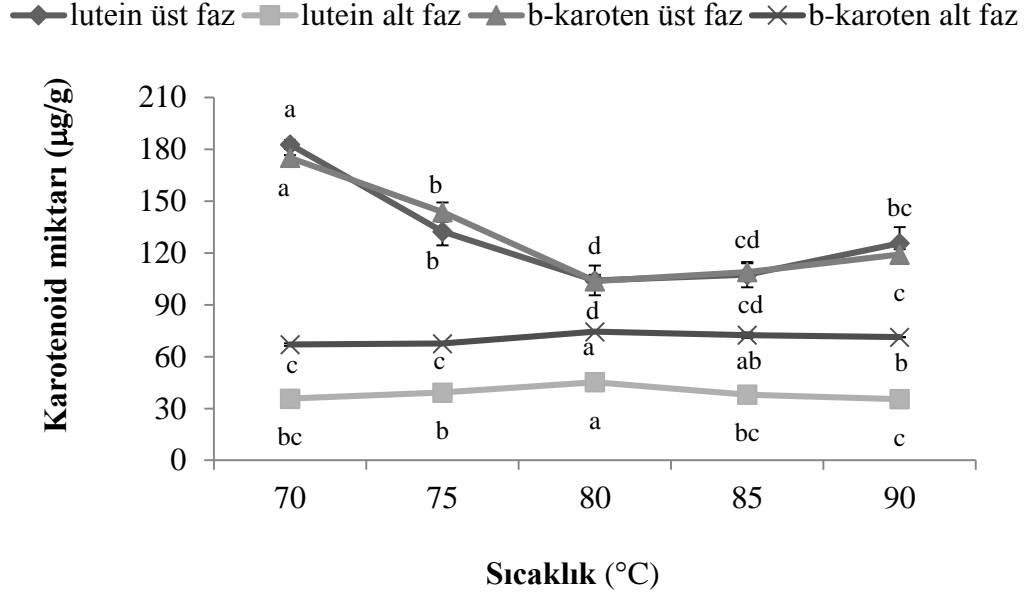
Şekil 5.14 : Tween 20'nin farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 20 ile gerçekleştirilen denemelerde ortam sıcaklığının, ekstrakte edilen karotenoid miktarını önemli düzeyde etkileyen bir parametre olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Sıcaklıktaki artışla beraber üst faza ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarı azalmaktadır. Ortam sıcaklığı 80 ile 85°C'de üst fazdaki lutein miktarları arasında önemli bir fark bulunmamaktadır ($P>0,05$). Sıcaklık 70°C'de iken üst fazdaki lutein miktarı 61,77 µg/g olup sıcaklığın artmasıyla azalarak 90°C'de yarıya düşmüştür. Fazlar arasında lutein miktarı açısından anlamlı bir fark yoktur ($P>0,05$). Ekstrakte edilen β-karoten miktarı ise luteinden daha fazla olup, 70°C'de 120,14 µg/g iken sıcaklık artışıyla ters orantılı olarak azalarak 90°C'de 56,06 µg/g düşmüştür. Bu nedenle optimum sıcaklık 70°C olarak seçilmiştir (Şekil 5.14). β-karoten açısından fazlar arasında anlamlı bir fark bulunup, üst faza oranla alt fazdaki β-karoten ortalaması daha yüksektir ($P<0,05$).



Şekil 5.15 : Tween 40'ın farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

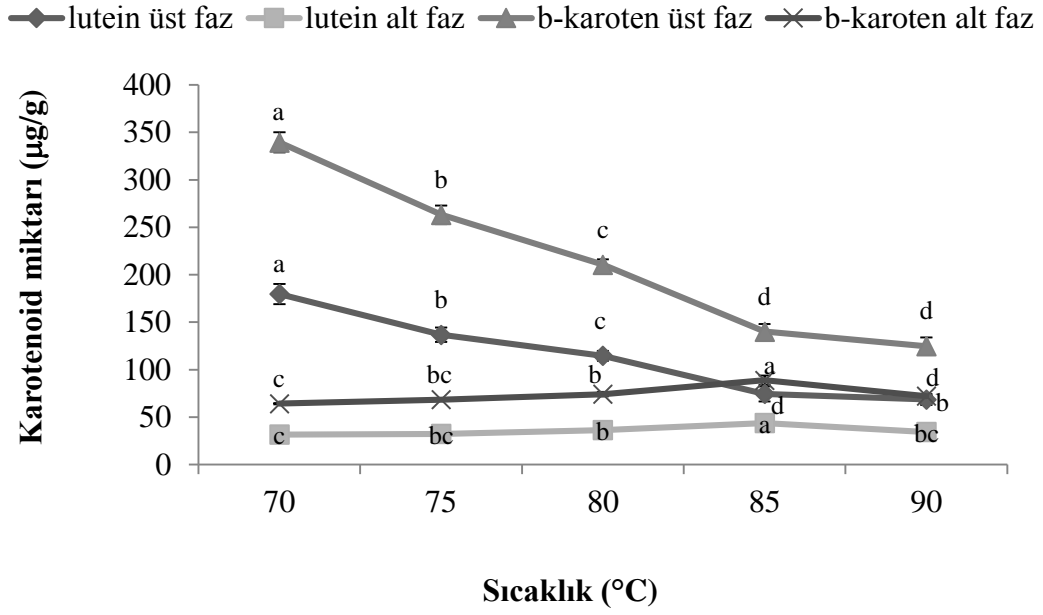
Şekil 5.15'de görüldüğü gibi ekstraksiyon için Tween 40 kullanıldığında, tüm sıcaklıklarda alt fazlardaki hem lutein hem de β -karoten miktarları üst fazlara oranla oldukça düşük çıkmış ve birbirine paralellik göstermiştir. Sıcaklıktaki artışla beraber üst faza ekstrakte edilen karotenoid miktarı düşmektedir ($P<0,05$). Özellikle 70°C sıcaklıkta üst faza ekstrakte edilen lutein miktarı $342,71 \mu\text{g/g}$, β -karoten $348,42 \mu\text{g/g}$ olup en yüksek seviyedeyken, sıcaklığın 75°C 'ye çıkmasıyla karotenoid miktarı %36 oranında ani bir düşüş göstermiştir. Artan sıcaklıklarda da hem lutein hem de β -karoten miktarı azalarak devam etmiştir. Bu nedenle, Tween 40 kullanılarak gerçekleştirilen BNE yönteminde optimum sıcaklık 70°C olarak seçilmiştir. Üst fazda lutein ve β -karoten ortalamaları, alt faza göre önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$).



Şekil 5.16 : Tween 60'ın farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Ekstraksiyon için Tween 60 kullanıldığında, sıcaklığın artmasıyla ekstrakte edilen karotenoid miktarlarında 80°C'ye kadar düşüş gözlenip sonrasında tekrar bir artış görülmüştür ($P<0,05$). İnkübasyon sıcaklığı 70°C iken üst fazdaki lutein (182,80 $\mu\text{g/g}$) ve β -karoten (175,13 $\mu\text{g/g}$) miktarları diğer sıcaklıklara göre belirgin şekilde yüksek çıkmıştır. Sıcaklık, 80°C'e olduğunda üst fazdaki karotenoid miktarında ortalama %42 oranında azalma olup, sonra önemsiz düzeyde tekrar bir artma olmuştur. Alt fazda ise sıcaklık 70°C'den 80°C'e çıktığında lutein ve β -karoten miktarında istatistiksel olarak önemli bir düzeyde artış olup, sıcaklığın daha fazla artmasıyla karotenoid miktarında azalma gözlenmiştir ($P<0,05$). Fazlar arasında, lutein ve β -karoten miktarı bakımından anlamlı düzeyde farklılık görülüp, üst fazda ortalamalar, alt faza göre daha fazladır ($P<0,05$).

Tween 60 ile gerçekleştirilen BNE yönteminde, optimum sıcaklık değeri 70°C olarak belirlenmiştir (Şekil 5.16).



Şekil 5.17 : Tween 80'in farklı sıcaklıklarda ıspanak atığından ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 80 kullanılarak yapılan denemelerde, ekstraksiyon ortamının sıcaklığının artmasıyla, ekstrakte edilen karotenoid miktarında önemli düzeyde bir azalma olduğu görülmüştür ($P<0,05$). En fazla lutein ve β -karoten kazanımı 70°C 'de elde edilip, sırayla 179,66 ve 339,38 $\mu\text{g/g}$ olmuştur. Sıcaklık arttıkça üst faza alınan karotenoid miktarı giderek azalarak başlangıç miktarına göre %63 oranında düşmüştür. Ancak 85 ile 90°C 'de ekstrakte edilen miktarlar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görülmemiştir ($P>0,05$). Ayrıca Tween 80 ile ekstrakte edilen β -karoten miktarının lutein miktarından daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.17). Üst fazda lutein ve β -karoten ortalamaları, alt faza göre önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$).

Ekstraksiyonun tamamlanıp faz ayırımının gerçekleşmesi için YAM çeşidine özgü bulutlanma noktası sıcaklık değerinin aşılması gerekmektedir. Bununla birlikte, faz ayırımının meydana gelmesinin yanı sıra oluşan fazlar arasındaki dengenin kararlı bir hal aldığı, en yüksek ekstraksiyon verimine ulaşılan denge sıcaklığı genellikle bulutlanma noktası sıcaklığının daha üstünde olmaktadır. Ayrıca hidrokarbon uzunluğunun artması ve ortamdaki iyonik şiddet de bulutlanma noktası sıcaklığını önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Sıcaklık, inkübasyon süresini de etkilemektedir. Sıcaklık optimum değer altında olursa faz ayırımı için gerekli inkübasyon süresi uzayabilmektedir. Karotenoidler ısıya duyarlı bileşikler olduğundan ekstraksiyonu sırasında ortam sıcaklığının

çok yüksek olması kayıplar yaşanmasına neden olabilmektedir. Bu nedenle mümkün olan en düşük sıcaklıkta ve en kısa sürede ekstraksiyonun tamamlanması gerekmektedir.

Sabit ekstraksiyon koşullarında (%10 YAM ve NaCl konsantrasyonunda, 40 dk) gerçekleştirilen BNE yönteminde, sıcaklığın faz ayırmasına etkisi, su banyosu sıcaklığı 70°C ile 90°C arasında değiştirilerek incelenmiştir. Tüm YAM cinsi için hem lutein hem de β -karoten açısından en uygun sıcaklığın 70°C olduğu belirlenmiştir. Artan sıcaklıklarda ise genellikle üst faza ekstrakte edilen karotenoid miktarının kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Yapılan bir çalışmada, Brij 58 kullanılarak Ponceau 4R isimli gıda boyasının BNE için, 0-80°C sıcaklık aralıklarında çalışılmış ve en yüksek ekstraksiyon verimliliği 70°C'de gözlenmiştir (Güray ve Alper, 2019). Ma ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada fenolik bileşiklerin BNE için sıcaklığın etkisini belirlemek amacıyla 25-70°C arasında denemeler yapılmış, 30°C optimum değer olarak belirlenip artan sıcaklıklarda ekstrakte edilen fenolik madde miktarında azalma olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, bazı içecek matrislerinden düşük düzeylerde serbest formaldehitin ultrason destekli BNE için, 25-60°C sıcaklık aralığında denemeler yapılmış ve optimum sıcaklık 55°C olarak belirlenmiştir. Daha yüksek sıcaklıkların iyon çifti kompleksinin ayrışmasına ve analitik sinyalin azalmasına yol açtığı, daha düşük sıcaklıklarda ise faz ayrılmasının tamamlanmadığı bildirilmiştir (Temel ve Gürkan, 2017).

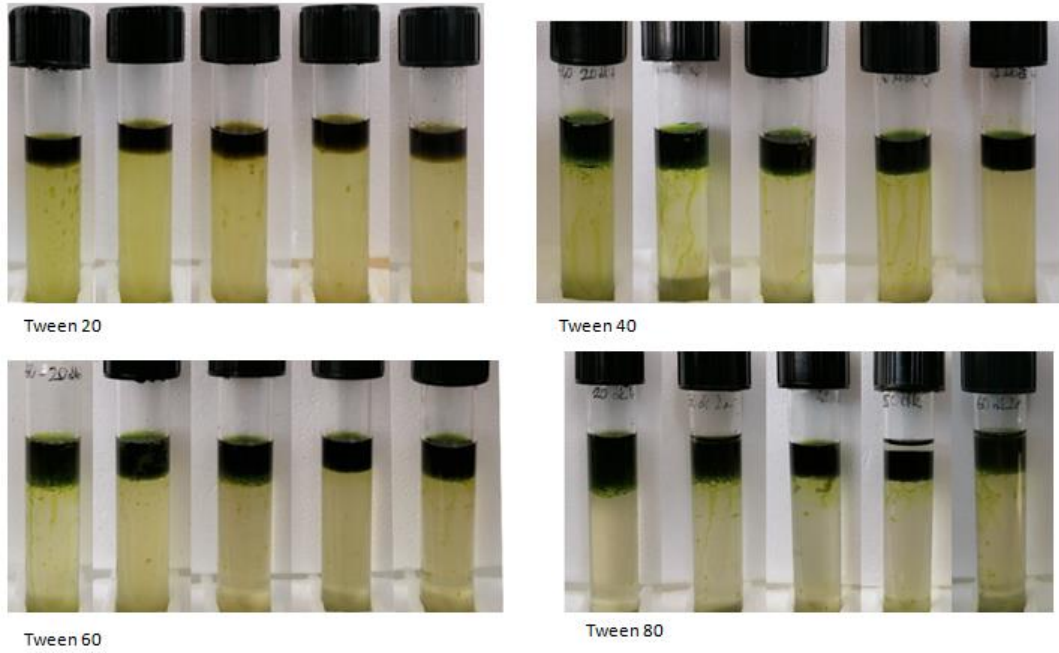
Noniyonik YAM'lar sulu çözeltide misel oluşumunun yanı sıra bulutlanma noktası olayı sergilemektedirler. Bu olayın meydana gelmesi, bulutlanma noktası sıcaklığında YAM'ın polioksietilen zincirinde gerçekleşen ani dehidrasyona bağlanmaktadır. Noniyonik YAM'ların çözünürlükleri sıcaklıkla azalmaktadır. Bunun nedeni ortam sıcaklığındaki artışla beraber suyun dielektirik sabiti azaldığından, molekülün hidrofilik kısmını oluşturan polioksietilen zincirinin hidrasyonunun da azalmasıdır. Polioksietilen zincirin hidrasyonu bulutlanma naktası sıcaklığında engellendiği için çözeltide faz ayrımı gerçekleşir. Bu sıcaklıkta, YAM artık suda çözünmeyip, çözelti puslu ve bulanık bir hal alır. Çözeltideki bulutlanma görünümü, miseller arasında van der Waals kuvvetlerine ek olarak elektrostatik itme sonucu artan hidrofobik etkileşim, hidrofilik grubun dehidrasyonu ve büyük agregaların oluşumu ile açıklanır (Akbaş ve Batigöç, 2009).

Sıcaklık, hem YAM'ın hem de her iki fazda çözünen karotenoidlerin hidrasyonunu azaltır. Non-iyonik YAM'lar, yapısındaki eter oksijenlerinin dehidrasyonuna neden olan bir kararlılık değişiminden dolayı daha yüksek sıcaklıkta daha hidrofobik hale gelirler ve misel konsantrasyonunda bir artış meydana gelir. Yüksek sıcaklıkta KMK'da azalmaktadır. Sıcaklığın yüksek olması, miseller arasında etkileşimi artırarak dış katmanda dehidrasyona neden olduğundan, YAM açısından zengin fazın hacminde azalma olmaktadır (Purkait ve diğ, 2006). Araştırmacıların sonuçları Şekil 5.13'deki bulgularımızı destekler niteliktedir.

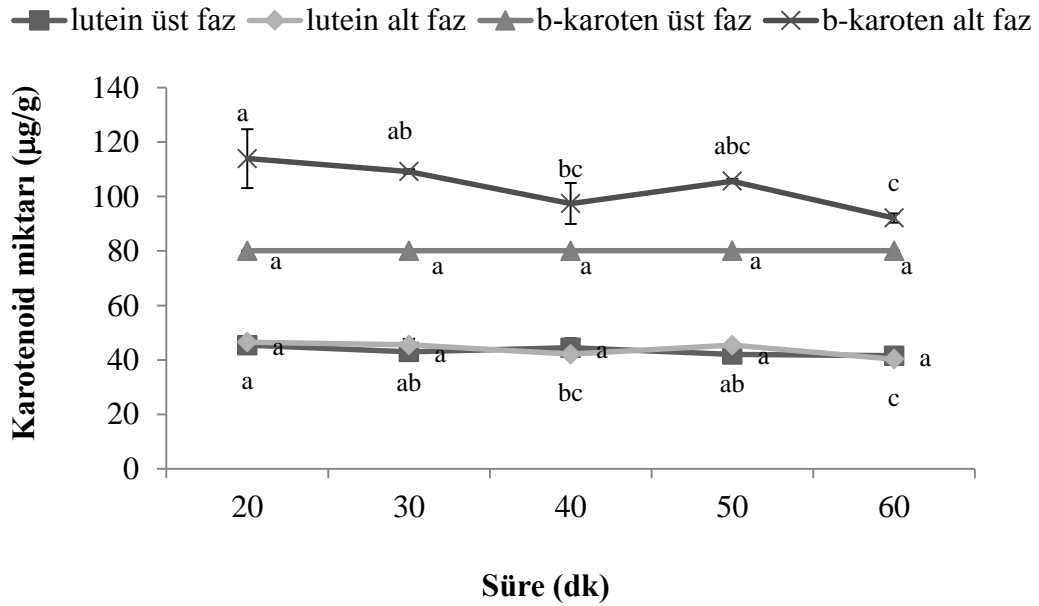
Sıcaklık, karotenoid derişimini ve karotenoidlerin biyoyararlılığını artırmaktadır. Karotenoidler bitkisel dokularda proteinler ve şekerler gibi diğer bazı bileşiklerle kompleks halde bulduklarından oksidasyona karşı korunmuş durumdadırlar. Ekstraksiyon öncesi uygulanan sonikasyon ve ekstraksiyon sırasında uygulanan ısı işlem ile proteinler denatüre olmakta ve hücre duvarlarının yapısı bozulmaktadır. Böylece karotenoidlerin ekstaraksiyonu kolaylaşmakta ve daha yararlı hale gelmektedir. Ancak uygulanan ısının şiddeti ve süresine bağlı olarak karotenoidler trans- formdan cis- forma dönüşebilmektedir. Isıl işleme karşı β -karoten gibi hidrokarbon karotenoidlerin ve luteinin daha dayanıklı olduğu bilinmektedir (Van Den Berg ve diğ, 2000).

5.1.4 İnkübasyon süresinin etkisi

Sabit sıcaklıkta (80°C) tutulan su banyosunda fazların ayrılması için gerekli olan bekleme süresi 20 ile 60 dakika arasında tutularak belirlenmiştir. Farklı YAM çeşitleriyle gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrası, süre optimizasyonuna ait görüntüler Şekil 5.18'da verilmiştir. Tween 20'ye ait görüntülerde, farklı süreler arasında üst fazın hacimlerinde belirgin bir fark görülmemektedir. Tween 40'a ait görüntülerde, 20, 30 ve 50 dk da üst fazdan alt faza doğru bir dağılıma olduğu, 40 ve 60 dk'da ise daha kararlı bir yapı görülmektedir. Ayrıca 40 dk'da alt faz 60 dk' ya göre daha berrak görülmektedir. Tween 60' a ait görüntülerde, üst fazın hacminin inkübasyon süresi 50 ve 60 dk olan örneklerde daha az olduğu görülüp, alt fazların berraklıkları arasında belirgin bir fark görülmemektedir. Tween 80'e ait görüntülerde ise, 20 dk da üst faz hacmi belirgin şekilde fazla olup, iki faz arasında net bir ayırım olduğu ve alt fazın oldukça berrak olduğu görünmektedir. Özellikle inkübasyon süresi 50 dk olan örnekte daha belirgin olmakla birlikte 20 ve 60 dk olan örneklerde de üst kısımda üçüncü bir faz ayrılması görülmektedir.



Şekil 5.18 : Farklı sürelerde gerçekleştirilen faz ayrımı denemelerine ait görüntüler (süreler soldan sağa 20-30-40-50-60 dk).

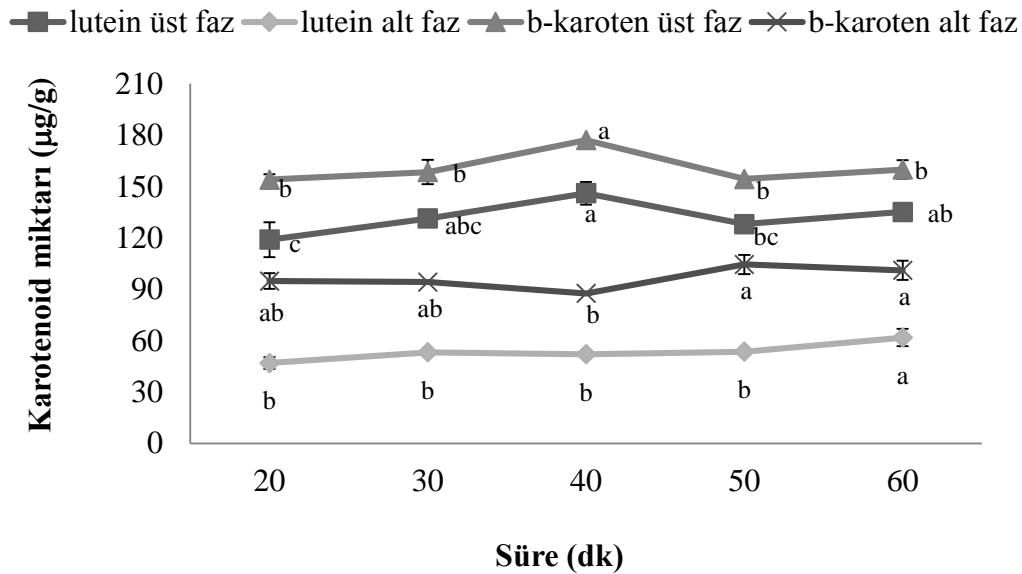


Şekil 5.19 : Tween 20 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 20 ile gerçekleştirilen BNE yönteminde, inkübasyon süresinin üst faza ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarları üzerinde istatistiksel olarak önemli düzeyde bir etkisi olmadığı ve karotenoid kazanımının oldukça düşük olduğu görülmüştür ($P>0,05$). Farklı sürelerde üst faza ekstrakte edilen lutein miktarları arasında önemli bir fark

görülmeyip ortalama 43,25 µg/g olarak belirlenmiş ve alt fazdaki lutein miktarları ile paralellik göstermiştir. Aynı şekilde, üst fazdaki β-karoten miktarları arasında da fark olmayıp ekstrakte edilen miktar 80,09 µg/g olarak belirlenmiştir. Alt fazda ise en düşük β-karoten miktarı inkübasyon süresi 60 dk olan örnekte belirlenip, 92,13 µg/g ekstrakte edilmiştir (Şekil 5.19). Fazlar arasında lutein miktarları açısından anlamlı bir fark görülmemektedir ($P>0,05$).

Farklı inkübasyon sürelerinde, üst faza ekstrakte edilen karotenoid miktarları birbirine yakın olup ortalama 123,34 µg/g olarak belirlenmiştir. Alt fazlardaki karotenoid miktarları daha fazla olup, en düşük 134,43 µg/g olarak inkübasyon süresi 60 dk olan örnekte belirlenmiştir. β-karoten miktarları bakımından fazlar arasında, anlamlı bir fark olup alt fazda ortalamalar üst faza göre daha fazladır ($P<0,05$).

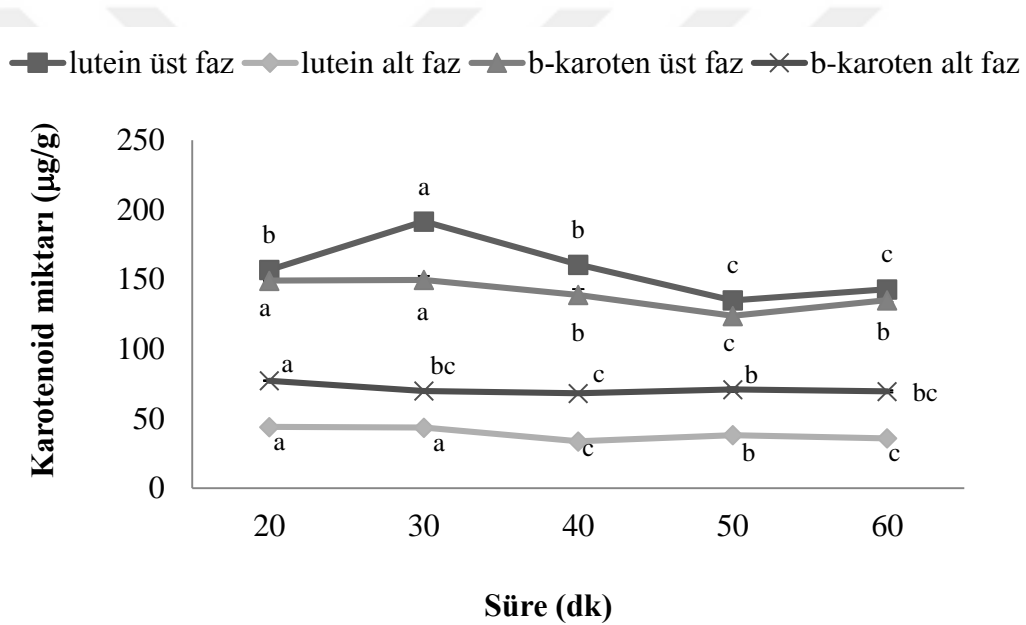


Şekil 5.20 : Tween 40 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 40 ile yapılan inkübasyon süresi denemelerinde, su banyosunda bekletme süresi 20 dakikadan 40 dakikaya doğru uzatıldığında üst faza ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarında artış olup, alt fazda önemli bir değişim olmamıştır. Sürenin daha fazla uzatılmasıyla doğrusal olmamakla birlikte bir düşme meydana gelmiştir. Inkübasyon süresi, 20 dk olan örnekte 118,96 µg/g olan lutein miktarı, sürenin uzatılmasıyla artarak 40 dk olan örnekte 146,04 µg/g olup en fazla kazanım sağlanmıştır. Sürenin daha fazla uzatılması, ekstrakte edilen lutein miktarında azalışa neden olmuştur.

Benzer şekilde, sürenin 20 dk'dan 30 dk'ya uzatılmasıyla üst faza ekstrakte edilen β -karoten miktarında artış olmakla beraber, bu artış istatistiksel olarak önemli düzeyde değildir ($P>0,05$). Ancak, inkübasyon süresi 40 dk olduğunda üst fazdaki β -karoten miktarı 177,12 $\mu\text{g/g}$ olup çalışılan diğer sürelerden önemli düzeyde yüksek çıkmıştır ($P<0,05$). Alt fazda ise 40 dk'da ekstrakte edilen β -karoten miktarının en düşük seviyeye indiği görülmüştür. Artan inkübasyon sürelerinde ise üst faza ekstrakte edilen β -karoten miktarında tekrar bir düşüş görülmüştür. Üst fazdaki lutein ve β -karoten ortalamaları alt faza göre önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$).

Optimum inkübasyon süresi 323,16 $\mu\text{g/g}$ karotenoid miktarı ile 40 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 5.20).

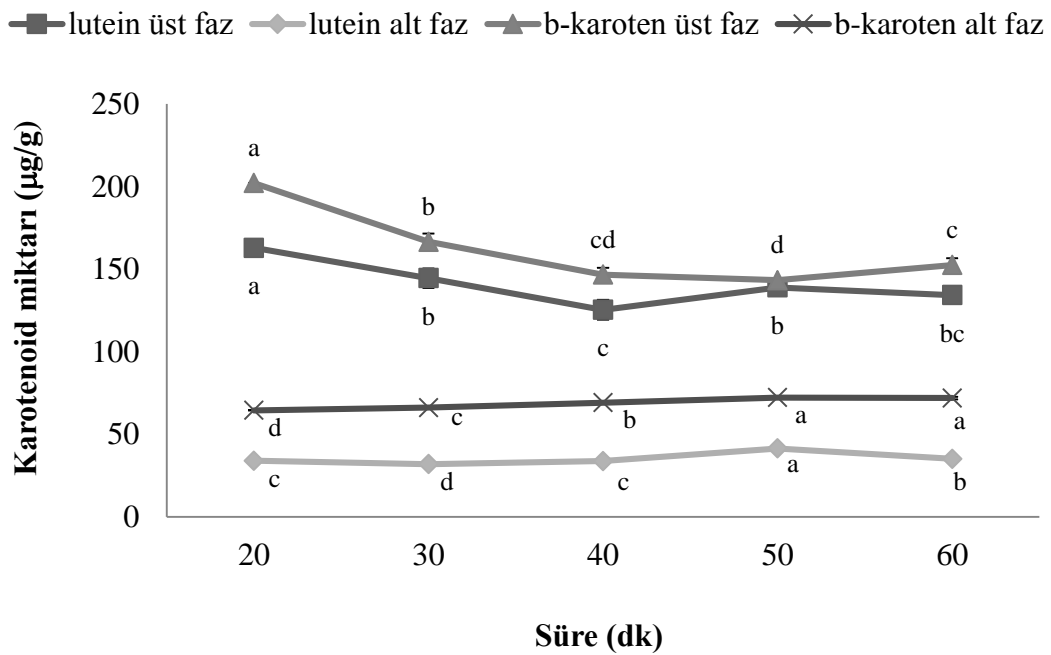


Şekil 5.21 : Tween 60 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 60 kullanılarak gerçekleştirilen inkübasyon süresi denemelerinde, süre 20 dk'dan 30 dk'ya uzatıldığında üst faza ekstrakte edilen lutein miktarı yaklaşık %23 oranında artış göstererek 191,58 $\mu\text{g/g}$ olup en fazla kazanıma ulaşılmıştır. Alt fazda ise önemli bir değişim olmamıştır. Sürenin 30 dk'dan 50 dk'ya doğru uzatılmasıyla da lutein miktarında yaklaşık % 30 oranında, önemli düzeyde bir düşüş olmuştur ($P<0,05$). Inkübasyon süresi, 60 dk'ya çıkarıldığında ise düşük oranda bir artış olsa da, bu artış istatistiksel olarak önemsiz seviyededir ($P>0,05$).

Ekstrakte edilen β -karoten miktarı açısından 20 ile 30 dk arasında önemli bir fark bulunmamakla birlikte, 30 dk da daha yüksek kazanım sağlanarak üst faza ekstrakte edilen β -karoten miktarı 149,61 $\mu\text{g/g}$ olmuştur ($P>0,05$). Sürenin uzatılmasıyla, 60 dk da düşük oranda tekrar bir artış olsa da, genel olarak düşüş gözlenmektedir. Alt fazdaki karotenoid miktarları ise üst fazdakilerden düşük çıkmıştır. Üst fazdaki lutein ve β -karoten ortalamaları alt faza göre önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$).

Optimum inkübasyon süresi, 341,19 $\mu\text{g/g}$ karotenoid miktarıyla 30 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 5.21).



Şekil 5.22 : Tween 80 kullanılarak ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarına farklı ekstraksiyon sürelerinin etkisi. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P<0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

Tween 80 ile yapılan inkübasyon süresi denemelerinde, istatistiksel olarak önemli bir farkla en fazla karotenoid kazanımı 20. dakikada olmuştur ($P<0,05$). Bekletme süresinin uzatılmasıyla 40 dk'ya kadar doğrusal bir azalış gözlenip lutein miktarında %23 oranında, β -karoten miktarında ise %27 oranında düşme olmuştur. Artan sürelerde ise birbirine yakın miktarda karotenoid üst faza ekstrakte edilmiştir. Alt fazdaki karotenoid miktarları ise tüm sürelerde üst fazdakilerden düşük çıkmıştır. Alt ve üst faz arasında lutein ve β -karoten miktarları bakımından anlamlı bir fark görülmektedir. Üst fazdaki lutein ve β -karoten ortalamaları alt faza göre önemli düzeyde daha fazladır ($P<0,05$). Optimum inkübasyon

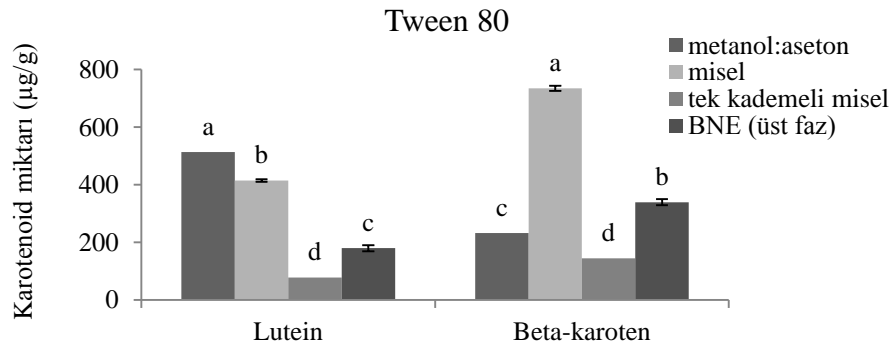
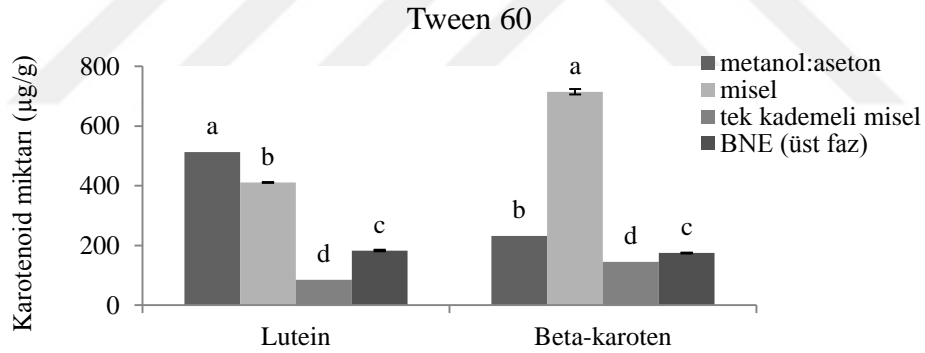
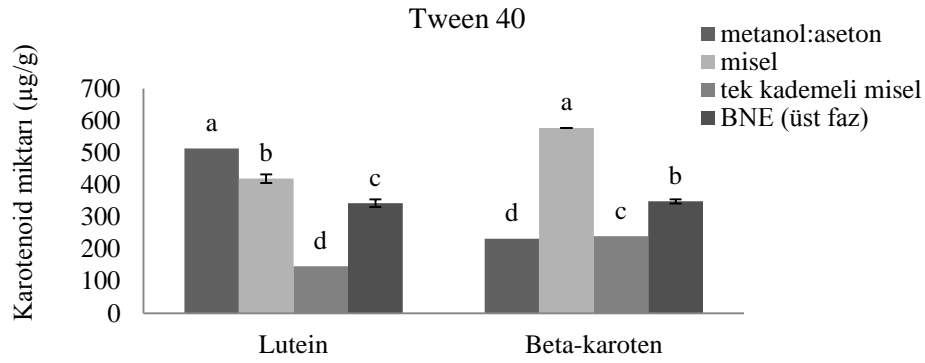
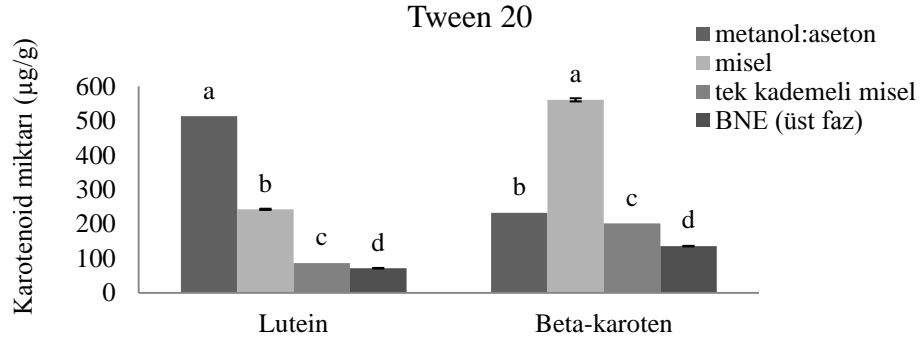
süresi 162,89 µg/g lutein, 202,14 µg/g β-karoten kazanımıyla 20 dk olarak belirlenmiştir (Şekil 5.22).

İnkübasyon süresi denemelerinde, sıcak su banyosunda bekletme süresinin faz ayırımına ve ekstrakte edilen karotenoid miktarı üzerine etkisi 20-60 dk arasında incelenmiştir. Elde edilen verilere göre Tween 20 kullanılarak gerçekleştirilen denemelerde, bekletme süresinin uzatılmasının ekstrakte edilen karotenoid miktarı üzerine önemli bir etkisi olmadığı görülmüştür. Tween 40 ile en fazla karotenoid kazanımı 40 dk da olmuş, diğer süreler arasında önemli bir fark görülmemiştir. Tween 60 ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda, bekletme süresinin 20 dk'dan 30 dk'ya artırılması özellikle lutein miktarında önemli bir artışa neden olup sürenin daha fazla uzatılmasıyla ekstrakte edilen karotenoid miktarında azalma görülmüştür. Tween 80 kullanıldığında ise optimum süre 20 dk olarak belirlenip, sürenin uzatılması ile ekstrakte edilen karotenoid miktarı azalmıştır. Farklı bir çalışmada, nar kabuğundan polifenollerin BNE için, uygun inkübasyon süresi 20 ila 60 dk aralığında incelenmiş, maksimum verim elde etmek için 30 dk yeterli olduğu ve inkübasyon süresi 30 dakikayı aştıkça ekstraksiyon veriminin azaldığı bildirilmiştir (Motikar ve diğ., 2020).

İnkübasyon süresi, ortamın tuz konsantrasyonu ve inkübasyon sıcaklığına da bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca su banyosu öncesi uygulanan santrifüj işlemide inkübasyon süresini kısaltabilir. Sürenin uzaması, karotenoidlerin yapısında bozulmalara neden olarak ekstraksiyon verimini olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle mümkün olan en kısa sürede ekstraksiyonun tamamlanması için optimum sıcaklıkta ve tuz konsantrasyonunda çalışılmalıdır.

5.2 Çözücü Ekstraksiyonu İle Yüzey Aktif Madde Destekli Ekstraksiyon Yönteminin Karşılaştırılması

Bulutlanma noktası ekstraksiyon tekniğinin; etkinliğini belirlemek amacıyla, metodun temelinde yatan misel ekstraksiyonu ile çözücü ekstraksiyonu sonucu ekstrakte edilen lutein ve β-karoten miktarları karşılaştırılmıştır. Bu amaçla (1:1) oranında metanol:aseton karışımı kullanılarak çözücü ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca misel ekstraksiyonla ıspanak atığından karotenoidlerin ne oranda alınabildiği görebilmek için tek kademeli misel ekstraksiyon da gerçekleştirilerek karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.23 : Çözücü ekstraksiyonu, misel ekstraksiyon ve bulut noktası ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen lutein ve β -karoten miktarlarının karşılaştırılması. Farklı harflerle gösterilen gruplar arasında $P < 0,05$ düzeyinde önemli farklılık vardır.

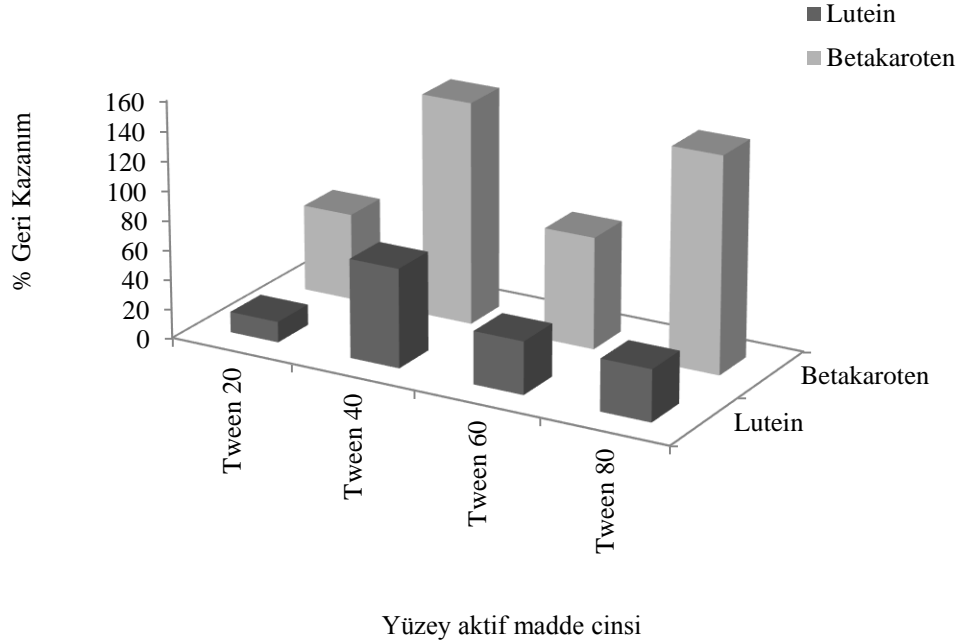
Sonuçlar misel ekstraksiyonuyla ekstrakte edilen β -karoten miktarlarının organik solventle ekstrakte edilenden çok daha fazla olduğunu göstermektedir ($P<0,05$). Bu durumun nedeni; solvent olarak kullanılan aseton ve metanolün polar yapısından dolayı hidrofobik yapıdaki β -karoten için uygun bir solvent olmamasıdır. Tween 20 hariç diğer YAM'lar ile ekstrakte edilen lutein miktarları ise organik solvent ile ekstrakte edilenin ortalama %80'i kadardır. Tween 20 kullanıldığında bu oran %47'ye düşmüştür.

Karotenoidlerin ekstraksiyonu için birçok çalışmada sıklıkla hekzan, aseton, metanol ve THF kullanılmıştır. Daha az sıklıkta ise petrol eter, dietileter, diklorometan, etil asetat ve etanol kullanılmıştır. Dietileter ve THF gibi bileşenler karotenoidlerle reaksiyona giren peroksitler içerebilmektedir. Ayrıca, farklı araştırmacılar tarafından çok çeşitli çözücü kombinasyonları da kullanılmıştır (Amorim-Carrilho ve diğ, 2014). Hekzan/aseton veya hekzan/etanol ile elde edilen karotenoid ekstratlarının stabilitesinin, kloroform, metanol veya diklorometan gibi diğer organik çözücülerle elde edilen ekstratlardan daha yüksek olduğunu gözlemlenmiştir (Taungbodhitham ve diğ, 1998).

Yapılan bir çalışmada; domatesten karotenoidlerin ekstraksiyonu için en iyi çözücünün β -karoten için etil asetat, diğer karotenoidleri ekstrakte etmek için ise diklorometan olduğu bildirilmiştir. Diklorometandan daha az toksik olmaları nedeniyle etil asetat ve siklohekzan/etil asetatın ekstraksiyon çözücüleri olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Amorim-Carrilho ve diğ, 2014). Benzer şekilde, Strati ve diğ. (2011), domates atığından karotenoid ekstraksiyonunda en yüksek verimi etil asetat/hekzan kombinasyonu ile elde etmişler. Hekzanın etanol veya etil asetat ile kombinasyonu, bu çözücüler tarafından ayrı ayrı ekstrakte edilen karotenoid miktarından daha fazla olmuştur. Likopen ve β -karoten için en yüksek verimin sırasıyla apolar çözücü hekzan ve hekzan/etanol ile elde edilirken, bir polar karotenoid olan lutein için etanolle elde edildiğini bildirmişlerdir. Yazarlar ayrıca, hekzan-aseton çözücülerinin sinerjik ve kümülatif bir etkisinin olmadığını vurgulamışlardır.

Şekil 5.23'deki verilere göre misel ekstraksiyonuyla alınan karotenoid miktarı ile tek kademe de alınabilen miktar arasında ciddi bir fark olduğu görülmüştür ($P<0,05$). Tween 20, 40, 60, 80 kullanılarak tek kademeli misel ekstraksiyonla ekstrakte edilen karotenoid miktarları, misel ekstraksiyonla ekstrakte edilen miktarların sırasıyla yaklaşık %36, %39, %20,5 ve %19'u kadardır. Bu durum ekstraksiyonda kademe sayısının büyük etkisi olduğunu göstermektedir.

Tek kademeli ekstraksiyon ile misel ortama alınan karotenoidlerin Tween 20 kullanılarak %71,82'si BNE yöntemiyle üst faza ekstrakte edilmiştir. Diğer YAM'lar ile gerçekleştirilen BNE yönteminde ekstrakte edilen karotenoid miktarı ise tek kademeli misel ekstraksiyonla elde edilenden çok daha fazla çıkmıştır. Bu duruma uygulanan ısıl işlemin etkisiyle dokudan daha fazla karotenoidin serbest forma geçmesinin neden olduğu düşünülmektedir.



Şekil 5.24 : Bulut noktası ekstraksiyon yönteminin çözücü ekstraksiyonuna göre verimi.

Şekil 5.24'de farklı YAM ile gerçekleştirilen BNE yönteminin, çözücü ekstraksiyonuna göre etkinliği verilmiştir. Tween 20 kullanılarak gerçekleştiren BNE'de organik solventle ekstrakte edilen lutein miktarının %13,88'i β -karotenin %58,35'i geri kazanılmıştır. Tween 40 kullanıldığında sırasıyla % 66,76 ile 149,89'u, Tween 60 kullanıldığında % 35,61 ile 75,34'ü ve Tween 80 kullanıldığında ise % 35 ile 146,01'i geri kazanılmıştır. Özellikle Tween 40 ve 80 kullanılarak BNE yöntemiyle elde edilen β -karoten miktarı, organik solvent kullanılarak ekstrakte edilen miktardan yaklaşık 1,5 kat daha fazla olmuştur. Ekstrakte edilen lutein miktarı ise en fazla Tween 40 kullanılarak elde edilmiştir.

6. SONUÇ

Bulut noktası ekstraksiyonu, çevre dostu YAM'lar kullanılarak çok çeşitli organik ve inorganik bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılabilir ve endüstriyel ölçekte uygulama potansiyeli olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır. Non-polar biyoaktif bileşikler ekstrakte etmedeki başarısı, basit, hızlı, ucuz ve çevre açısından avantajlı olan bir ekstraksiyon tekniği olmasıyla gıda bilimcilerinin de dikkatini çekmektedir.

Tez kapsamında yapılan bu çalışmada da ıspanak atıklarından organik solvent kullanmadan BNE tekniği ile su bazlı bir sistemde karotenoidlerin ekstrakte edilmesi hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda; ıspanaktan karotenoidlerin BNE yöntemi ile ekstraksiyonu amacıyla uygun YAM cinsi ve konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca, BNE sırasında uygulanan faz ayırma sıcaklık ve süresi, tuz derişimi gibi parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Belirlenen koşullarda elde edilen BNE ekstraktlarında karotenoid miktarları HPLC sistemi ile belirlenmiştir.

Ekstraksiyon için YAM olarak; Tween 20, 40, 60 ve 80 kullanılmıştır. Yüzey aktif madde derişiminin etkisi %0-12 aralığında incelenmiştir. Kontrol örneklerinde ayırma olmadığı ve en iyi verimin Tween 20 ve Tween 80 için %12 (w/v), Tween 40 ve Tween 60 için %10 (w/v) olduğu görülmüştür.

Ekstraksiyon ortamındaki iyonik şiddet, suyun ve YAM'lar ile birlikte taşınan karotenoidlerin oluşturacakları fazların polaritesini etkileyen unsur olduğu için önemlidir. Bu yüzden, sulu ortama eklenen tuzun ekstrakte edilen karotenoid miktarına etkisi incelenmiştir. Kullanılan NaCl miktarı %0-15 (w/v) olacak şekilde deneyler gerçekleştirilmiştir. Elde edilen verilere göre tuz konsantrasyonuyla ekstrakte edilen karotenoid miktarı arasında önemli bir ilişki olduğu görülmüştür. En fazla kazanım, Tween 20 ve 80 için %10 (w/v), Tween 40 ve 60 için %7,5 (w/v) tuz konsantrasyonunda gerçekleşmiştir.

Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde sıcaklık, YAM'ların su fazından ayrılarak ayrı bir faz oluşturmaları ve bu sırada karotenoidleri de beraberlerinde taşınmaları bakımından önemli bir parametredir. Bu amaçla uygun inkübasyon sıcaklığı, oda sıcaklığı (25°C) ile 70-90°C aralığında, her bir YAM için optimize edilmiştir. Oda sıcaklığında faz

ayrımı gözlenmeyip, tüm YAM'lar için en uygun bulutlanma noktası sıcaklığının 70°C olduğuna karar verilmiştir.

Misel oluşumu ve faz ayrımı için gerekli inkübasyon süresinin karotenoid geri kazanımına etkisi 20-60 dk arasında incelenmiştir. Optimum inkübasyon süresi Tween 80 için 20 dk, Tween 60 için 30 dk, Tween 40 için 40 dk ve Tween 20 için 60 dk olarak belirlenmiştir.

Bulutlanma noktası ekstraksiyon tekniğinin, ıspanak atıklarından karotenoid ekstraksiyonu bakımından etkinliği tespit etmek amacıyla, bu yönteme paralel olarak organik solventlerle (metanol:aseton) elde edilen ekstraktın karotenoid profili ile karşılaştırma yapılmıştır. Şekil 5.23'deki verilere göre YAM çeşitleri arasında en fazla verimine, %66,76 lutein ve %149,89 β -karoten geri kazanımıyla Tween 40 ile ulaşıldığı tespit edilmiştir.

Çalışmada uygulanan BNE, tek kademeli misel ekstraksiyonu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Ispanak atığından karotenoidlerin YAM kullanılarak misel ortama ne oranda alınabildiğini belirleyebilmek için misel ekstraksiyon (üç kademeli) yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda metanol:aseton (1:1) kullanılarak gerçekleştirilen çözücü ekstraksiyonunda, ıspanak dokusundaki lutein ve β -karotenin %100'ünün alındığı varsayılarak karşılaştırma yapılmıştır. Tween 40 ile gerçekleştirilen misel ekstraksiyonla yapıdaki luteinin %81,72 misel ortama alınabilmiştir. β -karoten ise organik solvent kullanılarak elde edilenden çok daha fazla miktarda (%248) ekstrakte edilmiştir. Bu durum Tween 40'ın ıspanak atığından β -karoten ekstraksiyonunda organik solventten daha uygun bir çözücü olduğunu göstermektedir. Luteinin, BNE ile %66,76 olan geri kazanımının sıcaklık uygulamasından önce misel ekstraksiyonun kademe sayısı artırılarak daha yüksek olması sağlanabilir. Nitekim misel ekstraksiyonla organik solvente göre %81,72 olan geri kazanım tek kademeli misel ekstraksiyonda %28,48'e düşmüştür. Dolayısıyla tek kademedeki dokudan sulu misel ortamına oradan da sıcaklık uygulamasıyla faz ayrımı sonucu üst faza alınan karotenoid oranı da düşmektedir. Ekstraksiyon kademe sayısının artırılarak üst faza alınan karotenoid miktarının artırılması, ıspanak atığından lutein ve β -karotenin BNE için bir öneridir.

KAYNAKLAR

- Admajith, S. S. A., Moksha, M. K., & Sachin, C. (2019).** Novel , energy efficient and green cloud point extraction : technology and applications in food processing. *Journal of Food Science and Technology*, 56(2), 524–534. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3546-7>
- Akbaş, H., & Batigöç, Ç. (2009).** Spectrometric studies on the cloud points of Triton X-405. *Fluid Phase Equilibria*, 279(2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2009.02.014>
- Akdo, A., & Özdemir, F. (2006).** *Gıdaların İş lenmesi Sırasında Karotenoid Bile ş iklerde Meydana Gelen De ğ i ş iklikler. 1*, 351–354.
- Altunay, N., Gürkan, R., & Orhan, U. (2017).** Indirect determination of the flavor enhancer maltol in foods and beverages through flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-cloud point extraction. *Food Chemistry*, 235, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.066>
- Amiri-Rigi, A., & Abbasi, S. (2016).** Microemulsion-based lycopene extraction: Effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments. *Food Chemistry*, 197, 1002–1007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.077>
- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014).** Review of methods for analysis of carotenoids. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 56, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>
- Anonim¹.** Alıntı Tarihi: 15 Ekim 2020, <https://www.tuik.gov.tr/>.
- Anonim².** Alıntı Tarihi: 12 Ocak 2021, <http://www.turkomp.gov.tr/food-iskanak-268>.
- Anonim³.** Alıntı Tarihi: 02 Eylül 2020, <https://www.acibademhayat.com/ispanagin-faydalari>.
- Cantero, M., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2004).** Determination of non-ionic polyethoxylated surfactants in sewage sludge by coacervative extraction and ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1046(1–2), 147–153. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.06.073>
- Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Gortzi, O., Paraskevopoulos, Y., Dourtoglou, E., Tsaknis, J., Gortzi, O., & Lalas, S. (2012).** *Removal of Polyphenols from Wine Sludge Using Cloud Point Extraction*. 2247. <https://doi.org/10.3155/1047-3289.60.4.454>
- Chen, L., Zhao, Q., Jin, H., Zhang, X., Xu, Y., Yu, A., Zhang, H., & Ding, L. (2010).** Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 81(1–2), 692–697. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.01.004>
- Chung, H. Y., Rasmussen, H. M., & Johnson, E. J. (2004).** Lutein bioavailability is higher from lutein-enriched eggs than from supplements and spinach in men. *Journal of Nutrition*, 134(8), 1887–1893. <https://doi.org/10.1093/jn/134.8.1887>

- De Lemos Araújo, A. A., De Barros Neto, E. L., Chiavone-Filho, O., & Foletto, E. L. (2015).** Influence of sodium chloride on the cloud point of polyethoxylate surfactants and estimation of Flory-Huggins model parameters. *Revista Facultad de Ingeniería*, 1(75), 155–162. <https://doi.org/10.17533/udea.redin.n75a15>
- El-Abbassi, A., Kiai, H., Raiti, J., & Hafidi, A. (2014).** Cloud point extraction of phenolic compounds from pretreated olive mill wastewater. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(3), 1480–1486. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2014.06.024>
- Eriksen, J. N., Luu, A. Y., Dragsted, L. O., & Arrigoni, E. (2017).** Adaption of an in vitro digestion method to screen carotenoid liberation and in vitro accessibility from differently processed spinach preparations. *Food Chemistry*, 224, 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.146>
- Farajzadeh, M. A., & Fallahi, M. R. (2006).** Simultaneous cloud-point extraction of nine cations from water samples and their determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, 22(4), 635–639. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.635>
- Fontana, A. R., Silva, M. F., Martínez, L. D., Wuilloud, R. G., & Altamirano, J. C. (2009).** Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction-ultrasound-assisted back-extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(20), 4339–4346. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.03.029>
- Gökkaya, N. (2014).** *Bazı Eser Metallerin Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu İle Tayini* (Yüksek Lisans Tezi). Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli.
- García-Fonseca, S., Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2008).** Coacervative extraction of Ochratoxin A in wines prior to liquid chromatography/fluorescence determination. *Analytica Chimica Acta*, 617(1–2), 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.11.002>
- García-Prieto, A., Lunar, L., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2008).** Decanoic acid reverse micelle-based coacervates for the microextraction of bisphenol A from canned vegetables and fruits. *Analytica Chimica Acta*, 617(1–2), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.061>
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., & Andrade, P. B. (2015).** Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*, 13(5), 3182–3230. <https://doi.org/10.3390/md13053182>
- Güray, T., & Alper, Ş. (2019).** *Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Zenginleştirildikten Sonra Ponceau 4R ' nin Şurup ve Meyve Şekerinde Spektrofotometrik Tayini*. 8(4), 1243–1249.
- Katsoyannos, E., Gortzi, O., Chatzilazarou, A., Athanasiadis, V., Tsaknis, J., & Lalas, S. (2012).** Evaluation of the suitability of low hazard surfactants for the separation of phenols and carotenoids from red-flesh orange juice and olive mill wastewater using cloud point extraction. *Journal of Separation Science*, 35(19), 2665–2670. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200356>
- Kiai, H., Raiti, J., El-Abbassi, A., & Hafidi, A. (2018).** Recovery of phenolic compounds

from table olive processing wastewaters using cloud point extraction method. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(1), 1569–1575. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.007>

Kopsell, D. A., Lefsrud, M. G., Kopsell, D. E., Wenzel, A. J., Gerweck, C., & Curran-Celentano, J. (2006). Spinach cultivar variation for tissue carotenoid concentrations influences human serum carotenoid levels and macular pigment optical density following a 12-week dietary intervention. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 7998–8005. <https://doi.org/10.1021/jf0614802>

Kowalska, H., Czajkowska, K., Cichowska, J., & Lenart, A. (2017). Trends in Food Science & Technology What 's new in biopotential of fruit and vegetable by-products applied in the food processing industry. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.016>

Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>

Kutlu Kantar, N., Yılmaz, M. S., İşçi Yakan, A., & Şakıyan Demirkol, Ö. (2021). Gıdalardan Biyoaktif Bileşiklerin Ekstraksiyonunda Derin Ötektik Çözücülerin Kullanımı. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*. <https://doi.org/10.28948/ngumuh.740817>

Landrum, J. T., & Bone, R. A. (2001). Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385(1), 28–40. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2171>

Li, C. F., Wong, J. W. C., Huie, C. W., & Choi, M. M. F. (2008). On-line flow injection-cloud point preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1214(1–2), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.062>

Lopes, A. S., Garcia, J. S., Catharino, R. R., Santos, L. S., Eberlin, M. N., & Arruda, M. A. Z. (2007). Cloud point extraction applied to casein proteins of cow milk and their identification by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 590(2), 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.03.043>

López-Jiménez, F. J., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2008). Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography. Theoretical and practical considerations. *Journal of Chromatography A*, 1195(1–2), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.002>

Lozano-Alejo, N., Carrillo, G. V., Pixley, K., & Palacios-Rojas, N. (2007). Physical properties and carotenoid content of maize kernels and its nixtamalized snacks. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8(3), 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.03.015>

Luo, X., Zheng, H., Zhang, Z., Wang, M., Yang, B., Huang, L., & Wang, M. (2018). Cloud point extraction for simultaneous determination of 12 phenolic compounds by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Microchemical Journal*, 137, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.026>

- Ma, H., Mu, F., Fan, S., Zhou, X., & Jia, Q. (2012).** Development of a cloud point extraction method for the determination of phenolic compounds in environmental water samples coupled with high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 35(18), 2484–2490. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200170>
- MEGEP.** Alıntı Tarihi: 03 Haziran 2020, Ispanak Yetiştiriciliği, http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/ispanak_yetistiriciligi.pdf.
- Melnyk, A., & Namies, J. (2015).** *Trends in Analytical Chemistry Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques.* 71, 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.013>
- Melnyk, A., Wolska, L., & Namieśnik, J. (2014).** Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds. *Journal of Chromatography A*, 1339, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.082>
- Nasır, N. (2017).** *Mikroalglerde Bulunan Karotenoidlerin Tayini* (Yüksek Lisans Tezi). Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Mohammadzadeh Honarvar, N., Saedisomeolia, A., Abdolahi, M., Shayeganrad, A., Taheri Sangsari, G., Hassanzadeh Rad, B., & Muench, G. (2017).** Molecular Anti-inflammatory Mechanisms of Retinoids and Carotenoids in Alzheimer’s Disease: a Review of Current Evidence. *Journal of Molecular Neuroscience*, 61(3), 289–304. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0857-x>
- Mohammadzadeh, M., Honarvar, M., Zarei, A. R., Mashhadi Akbar Boojar, M., & Bakhoda, H. (2018).** A new approach for separation and recovery of betaine from beet molasses based on cloud point extraction technique. *Journal of Food Science and Technology*, 55(4), 1215–1223. <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2999-4>
- Monteiro, P. S., Coimbra, J. S. dos R., Minim, L. A., Oliveira, J. A. de, & da Silva, L. H. M. (2008).** Partition of α -lactoalbumin and β -lactoglobulin by cloud point extraction. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 867(2), 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.03.028>
- Motikar, P. D., More, P. R., & Arya, S. S. (2020).** A novel, green environment-friendly cloud point extraction of polyphenols from pomegranate peels: a comparative assessment with ultrasound and microwave-assisted extraction. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 00(00), 1–12. <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1746969>
- Mukherjee, P., Padhan, S. K., Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. K. (2011).** Clouding behaviour in surfactant systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1–2), 59–79. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.005>
- Murador, D. C., De Souza Mesquita, L. M., Neves, B. V., Braga, A. R. C., Martins, P. L. G., Zepka, L. Q., & De Rosso, V. V. (2021).** Bioaccessibility and cellular uptake by Caco-2 cells of carotenoids and chlorophylls from orange peels: A comparison between conventional and ionic liquid mediated extractions. *Food Chemistry*, 339(August 2020), 127818. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127818>
- Nedir, S., & Girerler, Y. (2005).** *SOLVENT NEDENLİ SAĞLIK.*

- Norkus, E. P., Norkus, K. L., Dharmarajan, T. S., Schierle, J., & Schalch, W. (2010).** Serum lutein response is greater from free lutein than from esterified lutein during 4 weeks of supplementation in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 29(6), 575–585. <https://doi.org/10.1080/07315724.2010.10719896>
- Oliver, J., & Palou, A. (2000).** Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, 881(1–2), 543–555. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00329-0)
- Paleologos, E. K., Giokas, D. L., & Karayannis, M. I. (2005).** Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2005.01.013>
- Pandjaitan, N., Howard, L. R., Morelock, T., & Gil, M. I. (2005).** Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8618–8623. <https://doi.org/10.1021/jf052077i>
- Papaoannou, E. H., & Karabelas, A. J. (2012).** Lycopene recovery from tomato peel under mild conditions assisted by enzymatic pre-treatment and non-ionic surfactants. *Acta Biochimica Polonica*, 59(1), 71–74. https://doi.org/10.18388/abp.2012_2174
- Pourreza, N., Sharifi, H., & Golmohammadi, H. (2016).** Curcumin nanoparticles combined with cloud point extraction for citrate determination in food and drug samples. *Microchemical Journal*, 129, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.06.023>
- Purkait, M. K., DasGupta, S., & De, S. (2006).** Performance of TX-100 and TX-114 for the separation of chrysoidine dye using cloud point extraction. *Journal of Hazardous Materials*, 137(2), 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.03.003>
- Quina, F. H., & Hinze, W. L. (1999).** Surfactant-mediated cloud point extractions: An environmentally benign alternative separation approach. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38(11), 4150–4168. <https://doi.org/10.1021/ie980389n>
- Ranveer, R. C., Patil, S. N., & Sahoo, A. K. (2013).** Effect of different parameters on enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste. *Food and Bioproducts Processing*, 91(4), 370–375. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.01.006>
- Rodriguez, D. (2001).** A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. In *Life Sciences*.
- Sagar, N. A., Pareek, S., Sharma, S., Yahia, E. M., & Lobo, M. G. (2018).** *Fruit and Vegetable Waste : Bioactive Compounds , Their Extraction , and Possible Utilization*. 17, 512–531. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12330>
- Safdarian, M., Hashemi, P., & Ghiasvand, A. (2021).** A fast and simple method for determination of β -carotene in commercial fruit juice by cloud point extraction-cold column trapping combined with UV–Vis spectrophotometry. *Food Chemistry*, 343(November 2020), 128481. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128481>
- Saini, R. K., & Keum, Y. (2018).** Carotenoid extraction methods : A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240(June 2017), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015).** Carotenoids from fruits and vegetables:

Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.047>

Santocono, M., Zurria, M., Berrettini, M., Fedeli, D., & Falcioni, G. (2007). Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 88(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2007.04.007>

Sharma, D., Katnoria, J. K., & Vig, A. P. (2011). Chemical changes of spinach waste during composting and vermicomposting. *10(16)*, 3124–3127.

Strati, I. F., & Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry*, 129(3), 747–752. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.015>

Sun, Z., Liang, P., Ding, Q., & Cao, J. (2006). Cloud point extraction preconcentration of manganese(II) from natural water samples using 1-phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5-pyrazolone and triton X-100 and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Sciences*, 22(6), 911–913. <https://doi.org/10.2116/analsci.22.911>

Surai, P. F., MacPherson, A., Speake, B. K., & Sparks, N. H. C. (2000). Designer egg evaluation in a controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(4), 298–305. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1600939>

Takagai, Y., & Hinze, W. L. (2009). Cloud point extraction with surfactant derivatization as an enrichment step prior to gas chromatographic or gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Analytical Chemistry*, 81(16), 7113–7122. <https://doi.org/10.1021/ac9009963>

Tang, G., Ferreira, A. L. A., Grusak, M. A., Qin, J., Dolnikowski, G. G., Russell, R. M., & Krinsky, N. I. (2005). Bioavailability of synthetic and biosynthetic deuterated lycopene in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(4), 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2004.11.007>

Tang, X., Zhu, D., Huai, W., Zhang, W., Fu, C., Xie, X., Quan, S., & Fan, H. (2017). Simultaneous extraction and separation of flavonoids and alkaloids from *Crotalaria sessiliflora* L. by microwave-assisted cloud-point extraction. *Separation and Purification Technology*, 175, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.11.038>

Taungbodhitham, A. K., Jones, G. P., Wahlqvist, L., & Briggs, D. R. (1998). Carotene Extracción Y Determinación.Pdf. *Food Chemistry*, 63(4), 577–584.

Tavarini, S., Degl'Innocenti, E., Remorini, D., Massai, R., & Guidi, L. (2008). Antioxidant capacity, ascorbic acid, total phenols and carotenoids changes during harvest and after storage of Hayward kiwifruit. *Food Chemistry*, 107(1), 282–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.015>

Temel, N. K., & Gürkan, R. (2017). Extraction , Preconcentration , and Quantification of Low Levels of Free Formaldehyde from Some Beverage Matrices by Combination of Ultrasound-Assisted-Cloud Point Extraction with Spectrophotometry. 4024–4037. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0973-4>

- Tiwari, U., & Cummins, E. (2013).** Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. *Food Research International*, 50(2), 497–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.007>
- Ullah, I., Shah, A., Badshah, A., Shah, A., Shah, N. A., & Tabor, R. (2015).** Surface, aggregation properties and antimicrobial activity of four novel thiourea-based non-ionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 464, 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.10.002>
- Ulusoy, H. I., Yilmaz, Ö., & Gürkan, R. (2013).** A micellar improved method for trace levels selenium quantification in food samples, alcoholic and nonalcoholic beverages through CPE/FAAS. *Food Chemistry*, 139(1–4), 1008–1014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.087>
- Van Den Berg, H., Faulks, R., Granado, H. F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S., & Stahl, W. (2000).** The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 880–912. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<880::AID-JSFA646>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<880::AID-JSFA646>3.0.CO;2-1)
- Vichapong, J., & Santaladchaiyakit, Y. (2014).** Cloud-point extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography for analysis of phenolic compounds and their antioxidant activity in Thai local wines. 51(April), 664–672. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0556-0>
- Weschayanwiwat, P., Kunanupap, O., & Scamehorn, J. F. (2008).** Benzene removal from waste water using aqueous surfactant two-phase extraction with cationic and anionic surfactant mixtures. *Chemosphere*, 72(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.065>
- Yavuz, Ş. (2020).** Organik Kimya Laboratuvarında Kullanılan Kimyasalların İş Sağlığı Ve Güvenliği Açısından Zararlarının İncelenmesi. *Journal of Occupational Health and Safety Academy Open Access*, 221–229.
- Yazdi, A. S. (2011).** Surfactant-based extraction methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), 918–929. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.010>

EKLER

Ek 1. Tween 40'a ait YAM optimizasyonu verilerinin örnek SPSS tabloları.

ANOVA

lutein40üst

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12947,472	4	3236,868	39,565	,001
Within Groups	409,056	5	81,811		
Total	13356,528	9			

Multiple Comparisons

Dependent

Variable: lutein40üst

(I) yamkonsantrasyonu			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	%4	%6	-68,32000*	9,04495	,003	-104,60	-32,0361
		%8	-93,11500*	9,04495	,001	-129,40	-56,8311
		%10	-101,66500*	9,04495	,001	-137,95	-65,3811
		%12	-77,25000*	9,04495	,002	-113,53	-40,9661
	%6	%4	68,32000*	9,04495	,003	32,0361	104,6039
		%8	-24,80	9,04495	,177	-61,0789	11,4889
		%10	-33,35	9,04495	,068	-69,6289	2,9389
		%12	-8,93000	9,04495	,851	-45,2139	27,3539
	%8	%4	93,11500*	9,04495	,001	56,8311	129,3989
		%6	24,79500	9,04495	,177	-11,4889	61,0789
		%10	-8,55000	9,04495	,868	-44,8339	27,7339
		%12	15,86500	9,04495	,482	-20,4189	52,1489
%10	%4	101,66500*	9,04495	,001	65,3811	137,9489	
	%6	33,34500	9,04495	,068	-2,9389	69,6289	
	%8	8,55000	9,04495	,868	-27,7339	44,8339	
	%12	24,41500	9,04495	,185	-11,8689	60,6989	
%12	%4	77,25000*	9,04495	,002	40,9661	113,5339	
	%6	8,93000	9,04495	,851	-27,3539	45,2139	
	%8	-15,87	9,04495	,482	-52,1489	20,4189	
	%10	-24,42	9,04495	,185	-60,6989	11,8689	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

lutein40üst

		Subset for alpha = 0.05				
	yamkonsantrasyonu	N	1	2	3	4
Tukey HSD ^a	%4	2	63,1550			
	%6	2		131,4750		
	%12	2		140,4050		
	%8	2		156,2700		
	%10	2		164,8200		
	Sig.			1,000	,068	
Duncan ^a	%4	2	63,1550			
	%6	2		131,4750		
	%12	2		140,4050	140,4050	
	%8	2			156,2700	156,2700
	%10	2				164,8200
	Sig.			1,000	,369	,140

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

Group Statistics

	FAZLAR	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
lutein20	üst faz	10	44,3390	17,18644	5,43483
	alt faz	10	59,3680	16,57351	5,24101
βkaroten20	üst faz	10	77,0610	37,29051	11,79229
	alt faz	10	143,5450	43,99098	13,91117
lutein40	üst faz	10	131,2250	38,52348	12,18219
	alt faz	10	69,5730	28,43859	8,99307
βkaroten40	üst faz	10	227,4000	68,10265	21,53595
	alt faz	10	136,1730	49,57422	15,67675
lutein60	üst faz	10	91,7400	25,85121	8,17487
	alt faz	10	65,5340	19,74202	6,24298
βkaroten60	üst faz	10	168,6490	54,18532	17,13490
	alt faz	10	123,8700	30,21968	9,55630
lutein80	üst faz	10	96,2830	28,88476	9,13416
	alt faz	10	42,6770	9,93414	3,14145
βkaroten80	üst faz	10	166,6470	45,13432	14,27272
	alt faz	10	88,2370	18,64611	5,89642

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Interval of the	
									Lower	Upper
lutein20	Equal variances assumed	,214	,649	-1,991	18	,062	-15,02900	7,55020	-30,89138	,83338
	Equal variances not assumed			-1,991	17,976	,062	-15,02900	7,55020	-30,89288	,83488
βkaroten20	Equal variances assumed	,009	,927	-3,646	18	,002	-66,48400	18,23674	-104,80	-28,17002
	Equal variances not assumed			-3,646	17,530	,002	-66,48400	18,23674	-104,87	-28,09624
lutein40	Equal variances assumed	,544	,470	4,072	18	,001	61,65200	15,14203	29,83977	93,46423
	Equal variances not assumed			4,072	16,563	,001	61,65200	15,14203	29,64080	93,66320
βkaroten40	Equal variances assumed	,607	,446	3,425	18	,003	91,22700	26,63752	35,26365	147,19035
	Equal variances not assumed			3,425	16,447	,003	91,22700	26,63752	34,88245	147,57155
lutein60	Equal variances assumed	,611	,445	2,548	18	,020	26,20600	10,28607	4,59577	47,81623
	Equal variances not assumed			2,548	16,833	,021	26,20600	10,28607	4,48791	47,92409
βkaroten60	Equal variances assumed	3,491	,078	2,282	18	,035	44,77900	19,61958	3,55980	85,99820
	Equal variances not assumed			2,282	14,105	,038	44,77900	19,61958	2,72852	86,82948
lutein80	Equal variances assumed	14,812	,001	5,550	18	,000	53,60600	9,65928	33,31261	73,89939
	Equal variances not assumed			5,550	11,100	,000	53,60600	9,65928	32,36936	74,84264
βkaroten80	Equal variances assumed	16,776	,001	5,077	18	,000	78,41000	15,44275	45,96599	110,85401
	Equal variances not assumed			5,077	11,985	,000	78,41000	15,44275	44,75852	112,06148

ANOVA

tween40lutein

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	145975,862	3	48658,621	1023,339	,000
Within Groups	190,196	4	47,549		
Total	146166,057	7			

Multiple Comparisons

Dependent

Variable: tween40lutein

(I) YÖNTEMLER	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
Tukey HSD	metanol:aseton misel	93,84170*	6,89557	,001	65,7708	121,9126
	tek kademeli misel	367,16000*	6,89557	,000	339,0891	395,2309
	BNE (üst faz)	170,64000*	6,89557	,000	142,5691	198,7109
	misel metanol:aseton	-93,84170*	6,89557	,001	-121,9126	-65,7708
	tek kademeli misel	273,31830*	6,89557	,000	245,2474	301,3892
	BNE (üst faz)	76,79830*	6,89557	,001	48,7274	104,8692
	tek kademeli misel metanol:aseton	-367,16000*	6,89557	,000	-395,2309	-339,0891
	misel	-273,31830*	6,89557	,000	-301,3892	-245,2474
	BNE (üst faz)	-196,52000*	6,89557	,000	-224,5909	-168,4491
BNE (üst faz)	metanol:aseton	-170,64000*	6,89557	,000	-198,7109	-142,5691
	misel	-76,79830*	6,89557	,001	-104,8692	-48,7274
	tek kademeli misel	196,52000*	6,89557	,000	168,4491	224,5909

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

tween40lutein						
YÖNTEMLER	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	
Tukey HSD ^a	tek kademeli misel	2	146,1900			
	BNE (üst faz)	2		342,7100		
	misel	2			419,5083	
	metanol:aseton	2				513,3500
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Duncan ^a	tek kademeli misel	2	146,1900			
	BNE (üst faz)	2		342,7100		
	misel	2			419,5083	
	metanol:aseton	2				513,3500
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyadı : Bahar ER

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013 – 2017 : **Lisans**, İnönü Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği

2019 – 2021 : **Yüksek Lisans**, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Staj Deneyimi

2016 : MEGSAŞ Malatya Ekmek Gıda San. Tic. A.Ş.

2016 : Kayısı Araştırma İstasyonu Müdürlüğü

Eğitimler

2017 – 2018 : İnönü Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi

2020 : 10. Ulusal Analitik Kimya Kongresi ‘Temel Kemometri Eğitimi’

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN ÇALIŞMALAR

Poster Sunumu: “2nd International Virtual Conference on Raw Material to Processed Foods” 03-04 JUNE 2021, Turkey