

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

PORTAKAL KABUĞU KAROTENOİDLERİNİN SU İLE EKSTRAKSİYONU

KÜBRA TEKELİOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

AĞUSTOS 2016

Tezin Başlığı : Portakal Kabuğu Karotenoidlerinin Su ile Ekstraksiyonu

Tezi Hazırlayan : Kübra Tekelioğlu

Sınav Tarihi : 01.08.2016

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında " Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jüri Üyeleri

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Gökhan DURMAZ

.....

İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Murat YILMAZTEKİN

.....

İnönü Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Bayram YURT

.....

Bingöl Üniversitesi

Prof. Dr. Alaattin ESEN

Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "**Portakal Kabuğu Karotenoidlerinin Su ile Ekstraksiyonu**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Kübra TEKELİOĞLU



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PORTAKAL KABUĞU KAROTENOİDLERİNİN SU İLE EKSTRAKSİYONU

Kübra TEKELİOĞLU

İnönü Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

70 + xi sayfa

2016

Danışman: Doç. Dr. Gökhan DURMAZ

Bu çalışmada, portakal kabuğu karotenoidlerinin su bazlı bir sistemle ekstrakte edilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yüzey aktif madde destekli mikroemülsiyon ekstraksiyon tekniği uygulanmıştır. Gıda katkı maddesi olarak kullanılabilen, farklı HLB (Hidrofilik-lipofilik denge) değerlerine sahip yüzey aktif maddelerin varlığında, karotenoidler miseller içerisine alınarak su içinde dağılıbilir hale getirilmiştir. Böylece karotenoidlerin posadan su fazına alınabilmesi sağlanmıştır. Su bazlı sistemle ardışık ekstraksiyonlar yapılarak portakal kabuğu örneklerinden yüzey aktif madde destekli ekstraksiyonla alınabilen toplam karotenoid miktarı ve ekstraksiyon etkinliği belirlenmiştir. Sıvılaştırıcı enzim miktarı, yüzey aktif madde çeşidi ve miktarı, ortam pH'ı, tuz konsantrasyonu ve ekstraksiyon öncesi uygulanan ısıl işlemin şiddetinin karotenoid kazanımı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Boyut küçültme işlemi için kullanılan farklı dispersiyon yöntemlerinin (yüksek devirli parçalayıcı, yüksek basınçlı homojenizatör ve sonikasyon) karotenoid kazanımına etkisi karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasiteleri üzerine yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin etkisi de çalışma kapsamında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre karotenoid kazanımının maksimum olduğu enzim miktarı % 0.01, yüzey aktif madde miktarı % 0.4, inkübasyon sıcaklık ve süresi 50 °C'de 10 dk olarak belirlenmiştir. Kullanılan yüzey aktif maddeler içerisinde en yüksek geri kazanımın Tween-40 ile en düşük geri kazanımın ise Tween-20 ile sağlandığı belirlenmiştir. Yüksek basınçlı homojenizatör ile diğer dispersiyon yöntemlerine göre daha yüksek karotenoid kazanımı sağlanmıştır. En yüksek karotenoid kazanımının pH 8.2 civarında ve %5 tuz konsantrasyonunda elde edildiği görülmüştür. Portakal kabuğu ekstraktlarının antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarı üzerine yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Portakal kabuğu, Karotenoid, Su bazlı ekstraksiyon, Yüzey aktif madde

ABSTRACT

Master Thesis

EXTRACTION OF ORANGE PEEL CAROTENOIDS WITH WATER

Kübra TEKELİOĞLU

İnönü University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Food Engineering

70 + xi pages

2016

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gökhan DURMAZ

In this study, it was aimed to extract orange peel carotenoids with a water based system. With this aim, surfactant assisted microemulsion extraction technique was applied. In the presence of food grade surfactants having different HLB (Hydrophilic-lipophilic balance) values, carotenoids encapsulated in the micelles that dispersible in water. In this way, carotenoid extraction from orange pulp was managed. Total extractable carotenoid content and extraction efficiency were determined by successive extractions with water based system. The effect of liquefaction enzyme amount, surfactant type and ratio, pH, salt concentration and the intensity of preheating on carotenoid recovery were investigated. Different dispersion methods (high-speed crushing, high-pressure homogenization and sonication) were comparatively investigated for the carotenoid recovery. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained by different rates of different surfactants were also determined. According to the results, it was determined that optimum enzyme concentration was 0.01%, surfactant ratio was 0.4%, incubation temperature and time were 10 min at 50 °C. Among the surfactants used, the maximum and minimum recoveries were obtained by Tween-40 and Tween-20, respectively. High-pressure homogenization provided the highest carotenoid recovery compared to the other dispersion methods. The highest carotenoid extraction values obtained at pH 8.2 and 5% salt concentration. It was elucidated that surfactant type and ratio had no effect on total phenolic content and antioxidant activity of orange peel extracts.

KEY WORDS: Orange peel, Carotenoids, Water based extraction, Surfactant

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Gökhan DURMAZ' a;

Çalışmalarım esnasında bilgi, deneyim ve güler yüzünü benden esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. İncilay GÖKBULUT, Yrd. Doç. Dr. Didem ŞAHİNGİL, Arş. Grv. Hacer GÜRKAN, Arş. Grv. Hüseyin KARAKAYA, Arş. Grv. Tuğça BİLENLER, Arş. Grv. Nurullah DEMİR ve bölümdeki tüm hocalarıma, arkadaşlarıma Emine Betül AKALIN, Fatma Sezer ÖZTÜRK ve Yasemin GÖKÇE' ye;

Çalışmalarımda kullanılmak üzere portakal kabuğu temininde yardımcı olan Şekerciler Tic. San. Ltd. Şti. yönetici ve çalışanlarına;

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Burs Programı ile çalışmamı destekleyen TÜBİTAK' a;

BAP- 2015/18 nolu proje kapsamında çalışmamı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine;

Ve tüm hayatım boyunca beni hiç yalnız bırakmayan, her türlü nazımı çeken aileme, kardeşim İsmail Furkan TEKELİOĞLU' na çalışmalarım konusunda beni destekleyen eniştem İbrahim AŞLAMACI' ya, değerli dostum Başak BİLCANOĞLU' na;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Karotenoidlerin Yapısı ve Biyosentezi	4
2.2. Karotenoidlerin Fizikokimyasal Özellikleri	7
2.2.1. Çözünürlük	7
2.2.2. Işık absorpsiyonu	7
2.2.3. Adsorpsiyon ve bölünme özellikleri	8
2.2.4. İzomerizasyon ve oksidasyon	8
2.3. Karotenoidlerin Bazı Biyokimyasal Özellikleri	8
2.4. Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri	10
2.5. Portakal ve Portakal Kabuğunda Bulunan Karotenoidler.....	10
2.6. Karotenoid Ekstraksiyon Yöntemleri	11
2.6.1. Solvent ekstraksiyonu	12
2.6.2. Süper kritik akışkan ekstraksiyonu	12
2.6.3. Basınçlı sıvı ekstraksiyon.....	13
2.6.4. Mikroemülsiyon ekstraksiyon yöntemi.....	14
2.6.5. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu	17

2.7. Karotenoid Ekstraksiyon Etkinliğini Artıran Teknikler	18
2.7.1. Ultrases destekli ekstraksiyon	18
2.7.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon	18
2.7.3. Enzim destekli ekstraksiyon.....	19
2.7.4. Elektroliz yöntemiyle ekstraksiyon	20
2.8. Karotenoid Ekstraksiyonunu Etkileyen Faktörler.....	20
2.8.1. Örneğin yapısı	20
2.8.2. Solvent.....	21
2.8.3. Sıcaklık.....	23
2.8.4. Oksijen ve diğer faktörler.....	24
2.9. Kromatografik Analizler.....	25
2.9.1. HPLC.....	25
2.9.2. Süperkritik akışkan kromatografi.....	25
2.9.3. İnce tabaka kromatografi.....	26
2.9.4. Kapiler elektroforez	26
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Materyal	27
3.1.1. Kullanılan kimyasallar	27
3.1.2. Kullanılan alet, ekipman ve cihazlar	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Örnek hazırlama	28
3.2.2. Yüzey aktif madde destekli karotenoid ekstraksiyonu.....	28
3.2.3. Spektrofotometrik toplam karotenoid analizi.....	31
3.2.4. Farklı parametrelerin karotenoid kazanımına etkisinin belirlenmesi.....	32
3.2.5. Toplam fenolik madde analizi.....	35
3.2.6. Antioksidan aktivite analizi.....	36

3.2.7. HPLC analizleri.....	37
3.2.8. İstatistiksel analiz	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	39
4.1. Sıvılaştırıcı Enzim Düzeyinin Etkisi.....	39
4.2. Yüzey Aktif Madde Miktar ve Çeşidinin Etkisi	40
4.3. Ekstraksiyon Öncesi Isıl İşlemin Karotenoid Kazanımına Etkisi.....	44
4.4. Farklı Dispersiyon Yöntemlerinin Karotenoid Kazanımına Etkisi.....	46
4.5. pH 'ın Karotenoid Kazanımına Etkisi	50
4.6. Tuz Konsantrasyonunun Karotenoid Kazanımına Etkisi.....	51
4.7. Ekstraksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi.....	51
4.8. HPLC Sonuçları	52
4.9. Toplam Fenolik Madde Analizi Sonuçları.....	54
4.10. Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları.....	55
5. SONUÇ.....	57
6. KAYNAKLAR	60
7. EKLER.....	68
8. ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Karotenoidlerin kimyasal yapısı	4
Şekil 2.2.	Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları.....	5
Şekil 2.3.	Karotenoidlerin genel dalga boyu spektrumu.....	7
Şekil 2.4.	Yüzey aktif maddelerin yapısı.....	22
Şekil 3.1.	Karotenoid ekstraksiyon basamakları.....	29
Şekil 3.2.	Karotenoidlerin ardışık ekstraksiyonu.....	30
Şekil 3.3.	Su içerisinde mikroemülsiyeye β -karotenin kalibrasyon grafiği.....	31
Şekil 3.4.	β - karotenin THF içerisindeki çözeltisinin spektrofotometrede elde edilmiş kalibrasyon grafiği.....	32
Şekil 3.5.	Farklı dispersiyon yöntemleri kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi.....	33
Şekil 3.6.	Folin & Ciocalteu yöntemi için Gallik asit kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.7.	ABTS yöntemi için Trolox kalibrasyon grafiği.....	37
Şekil 4.1.	Karotenoid ekstraksiyon etkinliği üzerine enzim miktarının etkisi.....	39
Şekil 4.2.	Farklı oranlarda T-80 kullanımının karotenoid kazanımına etkisi.....	41
Şekil 4.3.	Farklı yüzey aktif maddelerin (YAM) farklı oranlarının kullanımının karotenoid kazanımına etkisi (YAM oranları; I: % 0.05, II: % 0.1, III: % 0.2, IV: % 0.3, V: % 0.4).....	42
Şekil 4.4.	Farklı miktar ve çeşitte yüzey aktif madde kullanımının karotenoid kazanımına etkisinin karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.5.	Farklı sıcaklıklarda 5 dk 'lık ısıtma işlem uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi.....	44
Şekil 4.6.	Farklı sıcaklıklarda 10 dk 'lık ısıtma işlem uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi.....	45
Şekil 4.7.	Farklı sıcaklıklarda 15 dk 'lık ısıtma işlem uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi.....	45
Şekil 4.8.	Yüksek basınçlı homojenizasyon ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında geçiş sayısının karotenoid kazanımına etkisi.....	47

Şekil 4.9.	Yüksek devirli parçalayıcı ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında parçalama süresinin karotenoid kazanımına etkisi.....	47
Şekil 4.10.	Sonikatör ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında sonikasyon süresinin karotenoid kazanımına etkisi.....	48
Şekil 4.11.	Dispersiyon yöntemlerinin karotenoid geri kazanımı bakımından karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.12.	Farklı dispersiyon yöntemlerinin farklı oranlarda yüzey aktif madde varlığında karotenoid kazanımı bakımından karşılaştırılması (Kullanılan yüzey aktif madde: T-80, I: Yüksek basınçlı homojenizatör, II: Yüksek devirli parçalayıcı, III: Sonikatör).....	49
Şekil 4.13.	Karotenoid kazanımı üzerine pH 'ın etkisi.....	50
Şekil 4.14.	Karotenoid kazanımı üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi.....	51
Şekil 4.15.	Ardışık ekstraksiyonlarda karotenoid kazanımının göreceli değişimi.	52
Şekil 4.16.	Yüzey aktif madde çeşidine göre alınabilen toplam karotenoid miktarı	52
Şekil 4.17.	Kontrol örneği, T-20, T-40, T-60 ve T-80 'den a) % 0.1 b) % 0.2 c) % 0.3 d) % 0.4 oranında kullanılarak elde edilen ekstraktların HPLC diyagramları.....	53
Şekil 4.18.	Kontrol örneği, % 0.1, % 0.2, % 0.3, % 0.4 oranında kullanılarak elde edilen ekstraktların a) T-20 b) T-40 c) T-60 d) T-80 için HPLC diyagramları.....	54
Şekil 4.19.	Portakal kabuğu ekstraktının toplam fenolik madde içeriği üzerine yüzey aktif madde çeşit ve miktarının etkisi.....	55
Şekil 4.20.	Portakal kabuğu ekstraktının antioksidan aktivitesi üzerine yüzey aktif madde çeşit ve miktarının etkisi.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan karotenoidler.....	6
Çizelge 2.2. Farklı gıdalarda yapılan solvent ekstraksiyonu.....	12
Çizelge 2.3. Farklı gıdalarda yapılan süper kritik akışkan ekstraksiyonu.....	13
Çizelge 3.1. HPLC gradient koşulları.....	37



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
ε	Epsilon
λ	Lamda
γ	Gama
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
nm	Nanometre
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
mM	Milimolar
ppm	Parts per million (milyonda bir birim)
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir sayısı)
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
T-20	Polioksietilen sorbitan monolaurat (Tween- 20)
T-40	Polioksietilen sorbitan monopalmitat (Tween- 40)
T-60	Polioksietilen sorbitan monostearat (Tween- 60)
T-80	Polioksietilen sorbitan monooleat (Tween- 80)
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit
NaCl	Sodyum klorür
Na_2CO_3	Sodyum karbonat
THF	Tetra Hidro Furan
DCM	Diklorometan
MeOH	Metanol
ACN	Asetonitril
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
Trolox	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
TEAC	Trolox eşdeğeri
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

SFE	Supercritical Fluid Extraction (Süper kritik akışkan ekstraksiyonu)
PLE	Pressurized Liquid Extraction (Basınçlı sıvı ekstraksiyonu)
CPE	Cloud Point Extraction (Bulutlanma noktası ekstraksiyonu)
YAM	Yüzey aktif madde
ANOVA	Varyans (değişkenlik) analizi
PK	Portakal kabuğu



1. GİRİŞ

Gıdaların rengi, bir ürünün görüntüsü ve kalitesinin tüketiciler tarafından değerlendirilmesinde rol oynayan faktörlerin başında gelmektedir. Meyve ve sebzelerdeki renk sırasıyla yeşil, kırmızı-sarı ve mavi-mor renklerden sorumlu klorofiller, karotenoidler ve antosiyaninleri de içinde bulunduran pigment gruplarından kaynaklanmaktadır [1].

Bitkisel karotenoidler kloroplast ve kromoplast membranlarında gömülü olarak bulunan yağda çözünebilen sarı, turuncu ve kırmızı renkli pigmentlerdir. Renkleri fotosentetik dokulardaki klorofiller tarafından maskelenir. Bitki gelişiminin son aşamasında bu pigmentler birçok çiçek, meyve ve havuç kökünün parlak renginin oluşmasına katkıda bulunurlar. Karotenoidler fotooksidatif hasarlara karşı fotosentetik organizmaları korumaktadır. Bitkilerde bu bileşiklerin bazıları büyüme ve gelişmeyi sağlayan bir foto hormon olan absisik asit öncülüdür. Provitamin A aktivitesine sahip karotenoidler, insan diyetinin temel bileşenlerinden biridir. Karotenoidler diyetle absorbe edilirler. Istakoz, flamingo ve balık gibi bazı hayvanların renginden sorumludurlar. Doğal pigmentler arasında yer alan karotenoidler 19. yüzyılda organik kimyacıların dikkatini çekmiştir. β -karoten 1817'de izole edilmiştir ve 1837'de sonbahar yapraklarının pigmentleri ksantofil olarak adlandırılmıştır [2]. Doğada 600'den fazla sayıda karotenoid bulunmaktadır, bunlardan 40 tanesi insan diyetinde düzenli olarak tüketilmektedir. Karotenoidlerin bazı kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, göz bozukluklarını önleme ve bağışıklık sistemini güçlendirme gibi [3] sağlık için yararlı katkılarının bulunmasıyla karotenoidlere olan ilgi son yıllarda artmıştır. Dünyada ticari olarak üretilen β -karotenin çoğu β -iyonondan kimyasal sentezle elde edilmektedir. Sebze kaynaklarından ekstraksiyonla ya da üretici olarak ipliksi mantar, bakteri, mikro alg ve maya kullanılan biyoteknolojik alternatifler de vardır [4]. Karotenoidlere olan bu ilgi, özellikle bitkisel materyallerden karotenoid eldesi için araştırmacıları yeni kaynak ve yöntemler araştırmaya teşvik etmiştir.

Turunçgiller güneydoğu Asya'daki tropikal ve subtropikal alanlarda ortaya çıkmış olan *Rutaceae* ailesindeki çiçekli bitkilerin yaygın bir türüdür. Turunçgil kabukları kısmen limonoidleri ve flavonoidleri içerdiğinden dikkat çekici kokuları vardır. Portakal, greylift, limon ve bazı mandalinalar gibi sayısız doğal ve hibrit ürün bulunmaktadır [5].

Turunçgil meyvesi atıkları, tüm meyve ağırlığının dörtte birini oluşturmaktadır. Tüm meyvenin yaş ağırlığının yaklaşık yarısını kabuklar (flavedo ve albedo tabakaları) oluşturmaktadır. Bu gibi atıklar karotenoid pigmentleri, pektinler ve terpenler (esansiyel yağlar) gibi biyoaktif moleküllerin ekstrakte edilmesi için iyi bir kaynaktır. Diğer meyvelerle karşılaştırıldığında, kompleks karotenoidlerin bir çoğu turunçgil meyvelerinde bulunur. Epoksit ve furanoksitlerin yüksek bileşimiyle karakterize edilen bu fraksiyonlar, toplam karotenoidlerin yaklaşık % 70'ini oluşturur. Meyve içi dokusundan daha yüksek karotenogenik kapasiteye sahip olan kabuklarda, karotenoid düzeyi iki kattan sekiz kata kadar daha yüksek olabilmektedir [6].

Portakal, dünyadaki en popüler meyvelerden biridir. Bu bitkilerin endüstriyel atıkları yüksek oranda fenolik bileşen içermektedir. Bu biyoaktif maddelerin birçoğu portakalın iç kısmından çok kabuğunda bulunmaktadır. Fakat bu yararlı bileşikler portakal suyu üretimiyle genellikle imha edilmektedir [5]. Portakallar yaklaşık 20 çeşit karotenoid içermektedir, fakat kırmızı greyfurt en yüksek β -karoten içeriğine sahiptir. Lutein, zeaksantin ve β -kriptoksantin gibi diğer karotenoidler portakal ve mandalinada önemli bir miktarda bulunmaktadır [6].

Bitkiler bileşimsel farklılıklarından dolayı farklı çeşitlilikte ve miktarlarda karotenoidler içerirler. Bundan dolayı karotenoid ekstraksiyonunda genel olarak kabul edilmiş bir metot ya da standart bir metot bulunmamaktadır. Ancak, çoğu ekstraksiyon metodu, dokuları parçalayarak matriksten istenilen bileşenlerin açığa çıkarılması ve ardından istenmeyen bileşenlerin elimine edilmesi aşamalarından oluşan ortak bir yol kullanır [7].

Karotenoid analizinde kullanılan ekstraksiyon yöntemleri içerisinde solvent ekstraksiyonu, süper kritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyon, son yıllarda oldukça dikkat çeken bulutlanma noktası ekstraksiyon yöntemi (cloud point extraction), mikroemülsiyon ekstraksiyon yöntemi ve ekstraksiyon etkinliğini artıran teknikler olan enzim destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrases destekli ekstraksiyon ve elektrol plazmoliz tekniği ile ekstraksiyon bulunmaktadır.

Bu çalışmada dünyada ve ülkemizde en çok üretilen bitkisel atıklardan biri olma özelliği taşıyan portakal kabuklarının yapısında bulunan karotenoidlerin, klasik solvent ekstraksiyonundan farklı olarak, yüzey aktif madde yardımı ile su bazlı bir sistem

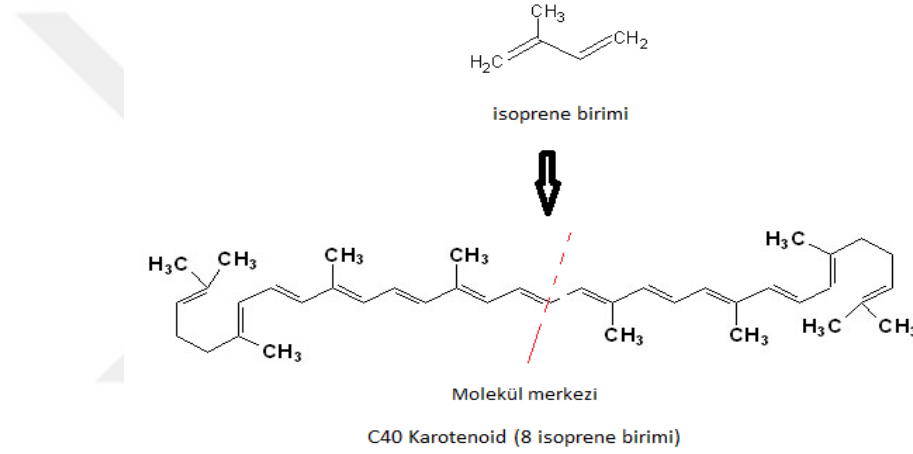
içerisinde miseller halinde dağılması sağlanarak ekstraksiyon işleminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada temel olarak; yüzey aktif madde çeşidi ve oranı, enzim oranı, ekstraksiyon öncesi uygulanan ısı işlemi, pH, tuz konsantrasyonu ve farklı dispersiyon yöntemlerinin karotenoid kazanımı üzerine olan etkisi incelenmiştir.



2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Karotenoidlerin Yapısı ve Biyosentezi

Gıda karotenoidleri genellikle, merkezde ters olarak sıralanmış, sekiz C_5 isopren ünitesinden C_{40} tetraterpen oluşturur. Karotenoidler simetrik bir iskelet yapı gösterir. Bu yapı farklı pozisyonlarda ve farklı sayıda metil grubu içeren halkalar ihtiva eder. Halkalaşma ve diğer modifikasyonlar, hidrojenasyon, dehidrojenasyon, çift bağ göçü, zincir kısalması ya da uzaması, izomerizasyon, oksijenin yapıya girişi ya da bunların kombinasyonundan kaynaklanır [8].

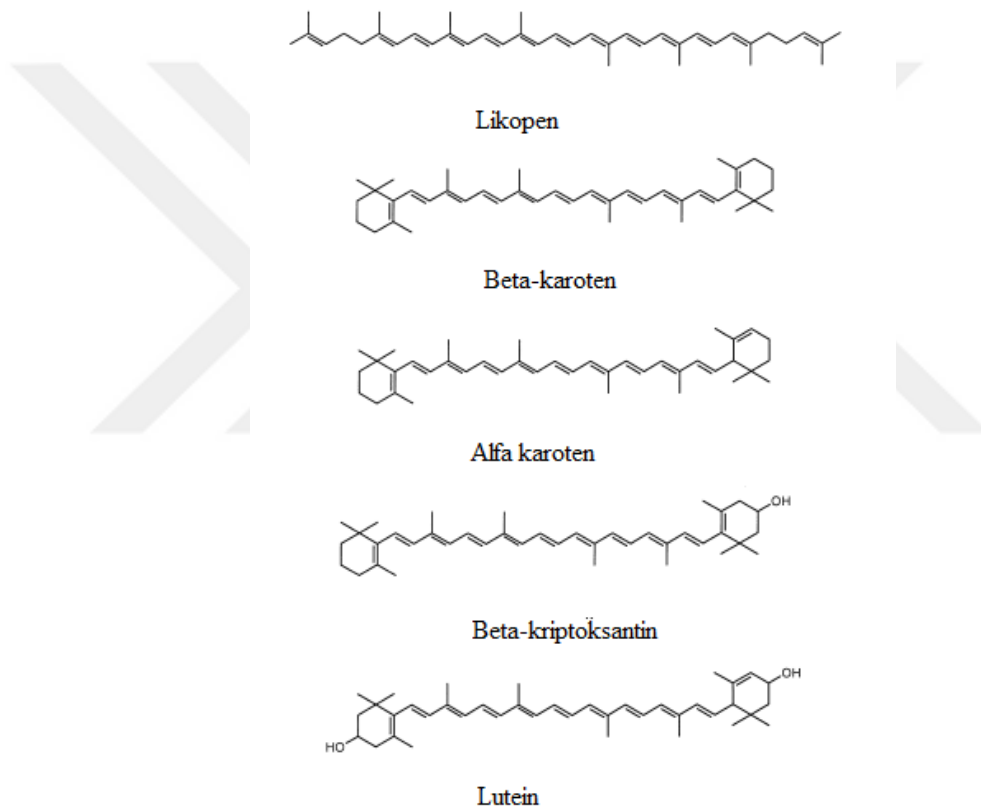


Şekil 2.1. Karotenoidlerin kimyasal yapısı

Karotenoidler plastidlerde üretilirler ve isopentildifosfattan (IIP) gelirler. Biyosentezdeki ilk basamakta, IPP, C_{20} geranilgeranil difosfat (GGPP) için substrat olan, dimetilalil difosfata (DMAPP) izomerize edilir. GGPP sentaz enzimi IPP ve DMAPP'den GGPP formuna katalizler. Karotenoid biyosentezine özel ilk basamakta iki GGPP molekülünün kondensasyonu sonucu fitoen sentaz aracılığıyla, ilk C_{40} karotenoid fitoen oluşur. Yapısal olarak benzer iki enzim, fitoen desatüراز ve ζ -karoten desatüراز, fitoenin likopene dönüşümünü sağlar. Likopen, β -karotenin yapısında olduğu gibi iki adet β -iyonon halkası veya α -karoten ve luteinin yapısında olduğu gibi bir adet β -iyonon halkası ve ε -halkası içeren karotenoid oluşumu için iki farklı halkalaşma reaksiyonuna uğramaktadır. Zeinoksantin ve β -kriptoksantin gibi ksantofiller ise α -karoten ve β -karoten gibi hidrokarbonların oksijen ile reaksiyonu sonucu oluşur [3].

Karotenoidler yalnızca karbon ve hidrojenle oluşan (β -karoten ve likopen) karotenler (hidrokarbon karotenoidler) ve epoksi (violaksantin, neoksantin, fukoksantin), hidroksi (lutein ve zeaksantin), keto (astaksantin ve kantaksantin) ve metoksi (spirilloksantin) fonksiyonel grubunu içeren ksantofiller (oksijenlenmiş karotenoidler) olarak sınıflandırılır [9].

Karotenoidler arasındaki, Şekil 2.2.'de gösterilen β -karoten, α -karoten, likopen, lutein, zeaksantin ve β -kriptoksantin insan diyet, kan ve dokularında en yaygın bulunan karotenoidlerdir [9].



Şekil 2.2. Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidlerin kimyasal yapıları

Çizelge 2.1. Gıdalarda yaygın olarak bulunan bazı karotenoidler

Karotenoid	Özellikleri	Kaynak
α-karoten	Havuç, tatlı patates, bal kabağı gibi turuncu sebzeler ve brokoli, yeşil fasulye, ıspanak gibi koyu yeşil sebzelerde sınırlı miktarda bulunmaktadır. α -karotene zengin gıdalar aynı zamanda β - karoten bakımından da zengin bir gıda kaynağı olma eğilimi gösterir.	7
β-karoten (provitamin A)	Diyetteki en önemli A vitamini öncülüdür. Birçok çeşit sarı-turuncu meyvelerde ve brokoli, ıspanak, yeşil turp, havuç, kabak, tatlı patates ve bal kabağı gibi koyu yeşil ve sarı sebzelerde bulunur. Karaciğer, süt, tereyağı, peynir ve tüm yumurta doğrudan provitamin A kaynağıdır. Vitamin A normal büyüme ve doku tamirinde önemli bir rol oynar.	10
Likopen	Domates, karpuz, pembe greyfurt ve guava gibi birçok meyve sebze de bulunan kırmızı bir pigmenttir ve provitamin A aktivitesine sahip değildir. Ancak, mükemmel bir antioksidan kaynağıdır ve kanser ve koroner kalp hastalığına yakalanma riskini azaltmada rol oynar.	10
Lutein ve zeaksantin	Mısır, nektarin, portakal, papaya ve kabak gibi bazı sarı-turuncu ve yeşil meyve sebzelerde bulunmaktadır. İnsan retinasındaki sarı noktanın oluşmasını sağlayan temel karotenoidlerdir.	10
β-kriptoksantin	Nektarin, turuncu etli papaya, Trabzon hurması, ağaç domatesin meyvesi ve <i>Spondias lutea</i> gibi birçok turuncu etli meyvenin ana pigmentidir, fakat nadiren ikinci pigment olarak oluşur.	8

2.2. Karotenoidlerin Fizikokimyasal Özellikleri

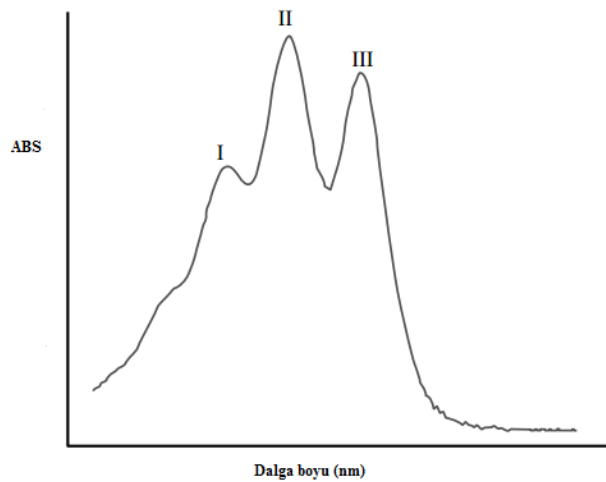
2.2.1. Çözünürlük

Karotenoidler birkaçı hariç lipofiliktir. Suda çözünmezler ve aseton, alkol, etil eter, kloroform ve etil asetat gibi organik solventlerde çözünürler. Karotenler petrol eteri, hekzan ve toluende hızlıca çözünürler; ksantofiller metanol ve etanolde en iyi çözünme özelliği gösterir [8].

2.2.2. Işık absorpsiyonu

Konjuge çift bağ sistemi karotenoidlerin ışık absorpsiyon kromoforunu oluşturur. Birçok karotenoid Şekil 2.3.'te görüldüğü gibi maksimum olarak üç dalga boyunda absorblanır. En büyük sayıdaki konjuge çift bağ zinciri, en yüksek λ_{max} değeridir. Bu yüzden birçok doymamış asiklik likopen karotenoidi, 11 konjuge çift bağa sahiptir, kırmızıdır ve en uzun dalga boyunda absorblanır (444, 470, 502 nm). En az 7 konjuge çift bağ bir karotenoidin fark edilebilir bir renge sahip olabilmesi için gerekmektedir [8].

Karotenoid molekülündeki hidroksi ve metoksi yan gurupların ortaya çıkması kromoforu etkilemez ve böylece absorpsiyon spektrumu üzerine etkisi neredeyse yoktur. Bu yüzden lutein, zeinoksantin ve α -kriptoksantin UV-VIS spektrumu α -karotenin benzerdir; β -kriptoksantin ve zeaksantin ise β -karotenin aynıdır [8].



Şekil 2.3. Karotenoidlerin genel dalga boyu spektrumu

2.2.3. Adsorpsiyon ve bölünme özellikleri

Karotenoidlerin kromatografik davranışları onların yapılarıyla ilgilidir. Normal faz açık kolon kromatografisinde adsorpsiyon afinitesi konjuge çift bağın sayısına, halkalı yapıya ve oksijen gruplarının varlığına bağlıdır. Halkalı yapılar adsorpsiyon afinitesini azaltır. Bu yüzden β -karoten, likopenden önce ayrılan γ -karotenden çok daha zayıf bir şekilde adsorbe edilir. Oksijen gruplarının varlığı ise adsorpsiyonu artırır; tür, sayı ve fonksiyonun lokasyonu artışı uzatır. Hidroksil grupları adsorpsiyon üzerine büyük bir etki uygular. Metilasyon ve asetilasyon bu etkiyi azaltmaktadır. Bir karbonil grubun adsorpsiyon afinitesi serbest hidroksil grubundan azdır [8].

2.2.4. İzomerizasyon ve oksidasyon

Doymamış karotenoidlerin neredeyse tamamı izomerizasyona ve oksidasyona eğilimlidir. Karotenoidler doğada *all-trans* formunda bulunurlar. Sıcaklık, ışık, asitler ve aktif bir yüzey üzerindeki adsorpsiyon, *trans* karotenoidlerin izomerizasyonuna neden olmaktadır. Bu bazen renk ve provitamin A aktivitesi kaybına neden olur. Oksidatif bozulma, karotenoid kaybına neden olmaktadır. Işık, enzim, metaller ve lipit hidroperoksidasyon ile kooksidasyon aracılığıyla oksijen uyarılmaktadır [8].

2.3. Karotenoidlerin Bazı Biyokimyasal Özellikleri

Antioksidanlar gıdaları oksidatif strese karşı koruyan maddelerdir. Antioksidanlar serbest radikal temizleyici, tekli oksijeni bağlayıcı, peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) inaktivatörü, metal iyonlarını bağlayıcı molekül, ikincil oksidasyon ürünlerini sönmleyen ve prooksidatif enzimlerin inhibitörü olarak çalışan maddelerdir [11].

Karotenoidlerin antioksidan aktivitesi tekli oksijeni bağlama ve peroksil radikallerini yakalama yeteneğine dayanmaktadır. Karotenoidlerin antioksidan aktivitesine en iyi kanıt tekli oksijeni bağlama yetenekleridir. Karotenoidlerin tekli oksijeni bağlama aktivitesi moleküldeki konjuge çift bağların sayısından kaynaklanmaktadır. Karotenoidlerin yapısında bulunan son grupların (asiklik ya da siklik) yapısı da bu durumu etkilemektedir [12].

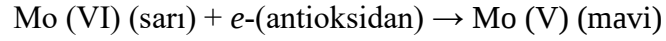
Son yıllarda, spektrofotometrik çalışmaların çoğu gıdaların antioksidan kapasitelerini ölçmek için geliştirilmiştir. En çok kullanılanları ABTS ve DPPH yöntemidir. Ayrıca oksijenin radikal absorban kapasitesi (ORAC) ve plazmanın demir azaltma yeteneği (FRAP) gibi yöntemler de kullanılmaktadır [13-18].

Kullanılan çoğu yöntemin temel prensibi, sentetik renkli bir radikal ya da redoks aktif bileşenlerden oluşur. Bir biyolojik örneğin redoks aktif bileşenleri ya da radikali uzaklaştırma yeteneği spektrofotometre tarafından monitöre verilir, antioksidan kapasite Trolox eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) ya da vitamin C eşdeğer antioksidan kapasite (VCEAC) gibi bir standartla ifade edilir. Burada iki türlü yaklaşım vardır. İlk yaklaşım ABTS, DPPH ve FRAP gibi analizleri içeren renkli bir antioksidanın azalmasını içerir. Diğer bir yaklaşım ise ORAC analizi gibi bir oksijen atomunun transferinden oluşur. ABTS analizi, antioksidanları azaltan, mavi-yeşil ABTS'nin üretimine dayanırken DPPH, mor DPPH'ın 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazine indirgenmesine dayanır. Her iki yöntem en çok kullanılan yöntemlerdendir. Bunun aksine ORAC serbest radikal saldırılarına neden olan bir floresan moleküldeki kimyasal değişmeyi saptar. FRAP diğerlerinden farklı bir yöntemdir, burada serbest radikal oluşumu yoktur fakat Fe^{+3} iyonunun Fe^{+2} iyonuna indirgendiği görülür [19].

ABTS yöntemi ile antioksidan kapasitenin ölçüldüğü çalışmada, ABTS'nin persülfatla oksidasyonu ile $ABTS^{\bullet+}$ radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Moleküllerin kararlı serbest radikali süpürme kabiliyeti, vitamin E'nin suda çözünebilen bir analogu olan Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) ile karşılaştırılması yapılır [20].

Polifenolikler hidroksil gruplarına sahip aromatik benzen halkalarından oluşan bir grup bileşiktir. Bitkiler aleminin yaygın ikincil metabolitleridir. Meyve, sebze ve içeceklerin renk, tat ve lezzet gibi duyu kalite özelliklerini onların yapısında bulunan fenolikler etkilemektedir. Polifenolikler arasındaki flavonoidler genellikle glikozit formda bulunurken, hidroksinamik asitler genellikle ester formda bulunmaktadır [21].

Toplam fenolik madde içeriği ölçme yöntemlerinden biri olan Folin-Ciocalteu yönteminde, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir. Varsayılan aktif merkezi Mo (VI) dır [20].



FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, fenolik bileşiklere spesifik değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer . Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler (sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır). Fenolik bir protonun ayrılması, FCR'yi indirgeme yeteneğine sahip bir fenolat anyonun oluşmasına neden olur. Fenolat ve FCR arasında oluşan mavi bileşikler, fenolik bileşiklerin yapısından bağımsızdır. Bu yüzden metal merkez ve fenolik bileşikler arasında koordinasyon bileşiği oluşma olasılığı göz ardı edilir. Mavi renkli kompleks oluşumu 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle Gallik asit kullanılır ve sonuçlar Gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir [20].

2.4. Karotenoidlerin Sağlık Üzerine Etkileri

Karotenoidler insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemezler fakat onların kan ve dokusunda bulunurlar. Karotenoidler önemli bir retinol (vitamin A) öncülüdür. Ancak, onların fotosentetik olmayan organizmalardaki temel fonksiyonu fotoooksidatif hasarlara karşı korumadır. Karotenoidlerin singlet oksijeni yakalama ve diğer reaktif oksijen türlerini temizleme gibi fiziksel ve kimyasal birçok etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Karotenoidler ve karotenoidlerin bazı metabolitleri kardiyovasküler hastalıklar, kanserin bazı türleri, nörolojik hastalıklar ve göz ile ilgili hastalıklar gibi reaktif oksijenin neden olduğu hastalıklara karşı koruyucu bir rol üstlenmektedir. Son yapılan epidemiyolojik ve klinik araştırmalar da karotenoid bakımından zengin gıdalarla karotenoid alımının faydalı etkilerini vurgulamaktadır [22].

2.5. Portakal ve Portakal Kabuğunda Bulunan Karotenoidler

Portakal yetiştiriciliği büyük bir endüstriye sahiptir. Florida ve Kaliforniya (ABD), Brezilya, Meksika, Pakistan, Çin, Hindistan, İran ve birçok Akdeniz ülkesi ekonomisinin önemli bir kaynağıdır [23]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün istatistik verilerine göre, 2013 yılında Türkiye'deki portakal üretiminin ortalama 1.781.258 ton olduğu tahmin edilmektedir [FAOSTAT, Nisan 2016] .

Turuncgil meyvelerine rengini veren temel pigmentler klorofiller (yeşil), karotenoidler (sarı, turuncu ve koyu turuncu), antosiyaninler (kan kırmızı) ve

likopenlerdir (pembe ya da kırmızı). Büyüme ve olgunlaşma sırasında, özellikle olgunlaşmanın ilk aşamasında, tüm turunçgil meyvelerinin kabuklarında klorofiller baskın olan pigmentlerdir. Toplam karotenoid, klorofil ve likopen içeriği çeşitli turunçgil meyvelerinin kabuk ve posasında büyük oranda değişir. Olgunlaşmayla posa ve kabuktaki toplam karotenoidler artar. Meyvenin dış kabuğu en yüksek karotenoid konsantrasyonuna sahip olan bölgedir ve portakalların toplam karotenoidinin % 50-75'ini oluşturur [24].

Portakal kabukları genel olarak, çözünebilir şeker, nişasta, selüloz, hemiselüloz, lignin ve pektin içeren lifler, kül, yağ ve protein içerir [25]. Portakal yaklaşık 20 çeşit karotenoid içerir, fakat kırmızı greyfurt en yüksek β -karoten içeriğine sahiptir. Lutein, zeaksantin ve β -kriptoksantin gibi diğer karotenoidler portakal ve mandalinada önemli miktarda bulunur [6]. Portakal suyu kriptoksantin, lutein, anteraksantin ve violaksantin ile birlikte eser miktarda bulunan karoten öncüllerini de içermektedir [26].

Polifenolik bileşikler antioksidan özelliğe sahip antikanser, antiviral ve antiinflamatuvar aktivite içeren sağlığa yararlı özelliklere sahiptir. Flavonoid grubu, fenolik bileşikler içerisinde en yaygın olarak dağılmış olanıdır. Portakal kabuğundaki flavonoidler en çok flavanon glikozit (narirutin 4'-O-glikozit, eriositrin, narirutin, hesperidin, isosakuranetin rutinosit), polimetoksilat flavon aglikonlar (sinensetin, hekza-O-metilquarçetin, nobiletin, hekza-O-metilgossypetin, tetra-O-methylscutellarein, tangeritin ve 5-hidroksi-3,7,8,3',4'-pentametoksiflavon) flavon glikozitler (diosmin, isorhoifolin, rutin) ve C-glukosiyalat flavondan oluşur. Naritutin, hesperidin, naringin and neohesperidin çoğu turunçgil meyvesinin yenilebilir kısmında yaygın olarak bulunan flavonoidlerdir [5].

2.6. Karotenoid Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkiler bileşimsel farklılıklarından dolayı farklı çeşitlilikte ve miktarlarda karotenoidler içerirler. Karotenoidlerin bu özelliğinden dolayı karotenoid ekstraksiyonu için standart bir ekstraksiyon metodu yoktur. Ancak çoğu ekstraksiyon metodu, dokuları parçalayarak matriksten istenilen bileşenlerin açığa çıkarılmasını sağlayan, ardından istenmeyen bileşenlerin elimine edildiği ortak bir yol kullanır [7].

2.6.1. Solvent ekstraksiyonu

Organik solventlerle ekstraksiyon, ekstraksiyon sıcaklığına ve solventle bileşen arasındaki etkileşime dayanır [27]. Karotenoidler polaritesi düşük bileşiklerdir ve hekzan gibi polaritesi düşük solventlerde çözünürler [28]. Çizelge 2.2.'de görüldüğü gibi analiz edilecek örneğin polaritesine göre kullanılan solvent de farklılık göstermektedir.

Çizelge 2.2. Farklı gıdalarda yapılan solvent ekstraksiyonu

Örnek	Analit	Ekstraksiyon solventi	Kaynak
Konserve domates suyu	α -karoten β -karoten Likopen	Aseton-hekzan (4:6, v/v) Etanol-hekzan (4:3, v/v) Kloroform-MeOH (2:1, v/v) DCM-MeOH (2:1, v/v) Hekzan-isopropanol (2:1, v/v) Aseton-petrol eteri (50:50, v/v)	29
Domates suyu	Karotenoid	Aseton-hekzan (3:5, v/v) Etanol-hekzan (4:3, v/v) Etanol-aseton-hekzan (2:1:3, v/v) Etil asetat-hekzan (1:1, v/v) Etil asetat (%100)	30
Yeşil yapraklı sebzeler	Lutein, α -karoten, zeaksantin, β -kriptoksantin, β -karoten ve izomerleri	MeOH-DCM	31
Domates	Likopen, lutein, β -karoten	THF/ Kloroform/ MeOH:ACN:DCM	32
Havuç	β -karoten, karotenler, ksantofil	n-hekzan/etanol	33
Taneli tahıl	Lutein, zeaksantin, β -kriptoksantin 13-cis lutein, 9-cis lutein,	Bütanol-su	34

2.6.2. Süper kritik akışkan ekstraksiyonu

Süper kritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction) hızlı, otomasyona uygun, seçici ve büyük oranlarda toksik solvent kullanımı gerektirmeyen bir metottur. CO₂ uygun kritik koşullara sahip olması, çözünen maddeden hızlı bir

şekilde ayrılabilmesi, çevresel problemlere neden olmaması, yanıcı olmaması ve ucuz olmasından dolayı en yaygın kullanılan süper kritik akışkandır [35].

SFE'ye özgü özellikler bitki materyallerinden doğal ürünlerin ekstraksiyonu için oldukça uygundur. SFE özellikle termal olarak stabil olmayan bileşenler için önerilir. Çünkü ekstraksiyon düşük bir sıcaklıkta gerçekleşir ve temiz bitki ekstraktı sağlar. SFE ekstraktları çok konsantredir. Ayrıca, CO₂'nin toksik olmayan karakteri gıda uygulamaları için SFE seçiminde önemli bir nedendir. Çoğu durumda, SFE konvansiyonel ekstraksiyon metodlarından daha etkilidir [35]. Çizelge 2.3'te de görüldüğü gibi ekstraksiyon sıcaklığı ya da basıncı değiştirilerek ekstraksiyon yapılabilmektedir.

Çizelge 2.3. Farklı gıdalarda yapılan süper kritik akışkan ekstraksiyonu

Örnek	Analit	Süper Kritik Akışkan	SFE koşulları	Kaynak
Domates	<i>All trans</i> likopen	CO ₂	40 °C 281 bar 4 ml/dk	36
Domates salçası atıkları	Likopen β -karoten	CO ₂ ve modifiyer olarak % 5 etanol	55 °C likopen için 65°C β -karoten için 300 bar 4 kg/sa	37
Alg (<i>Dunaliella bardawil</i>)	β -karotenin geometrik izomerleri	CO ₂	40 °C 448 bar 0.5-1 ml/dk	38

2.6.3. Basıncılı sıvı ekstraksiyon

Basıncılı sıvı ekstraksiyonu (Pressurized Liquid Extraction) yüksek sıcaklık ve basınçta sıvı çözücü kullanılarak yapılan bir ekstraksiyon tekniğidir. Bu teknik yaklaşık

oda sıcaklığında ve atmosferik basınçta gerçekleşmesine rağmen ekstraksiyon etkinliği yüksektir. Atmosferik kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda solvent kullanıldığından çözünürlük ve kütle transfer özellikleri gelişmiştir. Ekstraksiyon etkinliği örnek matriksinin yapısına bağlıdır. Başlangıçta ekstraksiyon hücresinden analiti uzaklaştırabilmek için, ilk önce bileşen örnek matriksi içindeki yerinden ayrıştırılır. Daha sonra, matriks-sıvı ara yüzeyine ulaşabilmek için matriks organik solventle diffüze edilir. Bu aşamada, analit ekstraksiyon fazı içinde dağılmıştır. Daha sonra ise ekstraksiyon fazı içinde diffüzenir. Ekstraksiyon işleminin son aşamasında ise ekstrakte edilen analit toplanır [39].

PLE karotenoid ekstraksiyonu için kullanılan popüler yöntemlerdendir. Karotenoidlerin ekstraksiyonunda PLE'nin kullanıldığı ilk çalışma yeşil alglerin farklı türleri üzerinedir. Yeşil algler üzerine yapılan bu çalışmada ekstraksiyon işlemi solvent, örnek-solvent oranı, sıcaklık ve süre değiştirilerek optimize edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre; kontrollü sıcaklık ve basınç altında konvansiyonel solventlerin kullanıldığı PLE en kısa sürede ve çok az solvent kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PLE konvansiyonel organik solvent metodu ile eşit ekstraksiyon etkinliği göstermiştir [40].

Basınçlı sıcak etanol kullanılarak karides atıklarından astaksantin ekstraksiyonu için yapılan çalışma sonuçlarına göre PLE işlemi için en önemli parametrelerin ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi olduğu bildirilmiştir. Ekstraksiyon basıncının çalışılan deneysel koşullarda astaksantin üzerinde minör düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir [41].

PLE tekniği kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada ise; bitkisel çaylar ve sebzelerdeki karotenoid içeriği kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiş ve farklı karotenoidlerin biyo-geri kazanımı PLE tekniği kullanılarak araştırılmıştır [42,43].

2.6.4. Mikroemülsiyon ekstraksiyon yöntemi

Emülsiyonlar, sıvılardan birinin küçük damlacıklar halinde bir diğeri içinde dağılmış halde bulunduğu birbirine karışmayan iki sıvıdan oluşur. Sulu faz içinde dağılmış olarak bulunan yağ damlacıklarından oluşan sistemler su içinde yağ emülsiyonlarıdır (O/W) ve mayonez, dondurma ve süt örnek olarak verilebilir. Yağ içinde dağılmış olarak bulunan su damlacıklarından oluşan sistemler ise yağ içinde su

emülsiyonları (W/O) olarak sınıflandırılır ve tereyağı ve margarin örnek olarak verilebilir. Gıda endüstrisinde kullanılan diğer emülsiyon türleri su içinde yağ içinde su (W/O/W) ve yağ içinde su içinde yağ (O/W/O) emülsiyonlarıdır [44].

Emülsiyonlar genel olarak damlacık çapına göre nanoemülsiyonlar (1-100 nm), mikroemülsiyonlar (10-100 nm), miniemülsiyonlar (100-1000 nm) ve makroemülsiyonlar (0.5-100 µm) olarak sınıflandırılır [45,46]. Nanoemülsiyonlar, miniemülsiyonlar ve makroemülsiyonlar termodinamik olarak stabil değildir. Fakat kinetik stabiliteleri emülsifiyer/stabilizer eklenerek ve homojenizasyon işlemi kontrol edilerek artırılabilir [44].

Termodinamik olarak stabil olmayan emülsiyonlar, topaklanma, birleşme, krema oluşturma ve çökme gibi destabilizasyon işlemlerinden dolayı zaman geçtikçe ayrılan fazlardan doğal olan formlarına dönme eğilimindedir. Ancak, termodinamik olarak stabil olmayan emülsiyonların kinetik stabilitesi fazlar arasındaki yoğunluk farkı azaltılarak, ortalama damlacık çapı azaltılarak ya da sürekli fazın viskozitesi artırılarak iyileştirilebilir. Son iki işlem emülsifiyer ve stabilizer olarak bilinen ingredientler kullanılarak ya da emülsifikasyon işlemi parametreleri kontrol edilerek gerçekleştirilir [44].

Emülsifiyerler ve yüzey aktif maddeler, damlacıkların emülsiyon oluşumu sırasında bir araya gelmesini ve geri topaklanmasını önleyen, yağ ve su ara yüzeyi arasındaki ara yüzey gerilimini azaltan bileşiklerdir [47]. Kullanılan emülsifiyerin konsantrasyonu ve türü emülsiyon stabilitesini ve damlacık çapının dağılımının belirlenmesindeki en önemli faktördür [44]. Küçük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddelerin emülsiyon stabilitesi genellikle biyopolimerlerden daha iyidir. Damlacıkların yüzeylerini hızlı bir şekilde kaplayarak adsorbe olurlar ve damlacıkların geri birleşmesini önleyerek milisaniyeler içinde yeni ara yüzey oluştururlar. Küçük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddeler hem düşük hem de yüksek enerjili işlemlerde başarıyla kullanılmaktadır. Biyopolimerler en yavaş emülsifiyerlerdir. Sadece yüksek enerjili emülsifikasyonlarda etkili bir şekilde kullanılabilir [47].

Yüzey aktif maddeler hidrofilik-lipofilik dengelerine (HLB) göre sınıflandırılır. HLB, molekül içindeki hidrofobik grupların ağırlık yüzdesinin hidrofilik grupların ağırlık yüzdesine oranını tanımlar [48]. Genellikle W/O emülsiyonlar düşük HLB (3-8)

değerine sahip yüzey aktif maddeler kullanılarak üretilirken; yüksek HLB (8-18) değerine sahip yüzey aktif maddelerle O/W emülsiyonlar oluşturulmaktadır. Küçük molekül ağırlıklı yüzey aktif maddeler iyonlaşma durumuna göre katyonik, anyonik, noniyonik ya da zwitterion şeklinde sınıflandırılır. Katyonik ve anyonik yüzey aktif maddelere sırasıyla laurik arjinat ve biyosüpfektanlar örnek verilebilir [48,49]. Noniyonik sorbitan yağ asidi esterleri (Span), polioksietilen sorbitan yağ asidi esterleri (Tween), şeker esterleri ve monogliseritler gibi yüzey aktif maddeler gıda ve ilaç endüstrisinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [50]. Zwitterion yüzey aktif maddeler, fosfolipitler gibi, "Genellikle güvenilir kabul edilen" (GRAS) gruba dahil olduklarından gıda uygulamalarında ilgi çekici bulunmaktadır. Ancak, düşük enerjili emülsiyonlarda kullanımı sınırlıdır ve diğer yüzey aktif maddelere eklenir [51].

Mikroemülsiyon tekniği ekstraksiyon amacıyla kullanılabilme potansiyeline sahip yeni bir tekniktir. Mikroemülsiyon sistemleri, optik olarak transparan görüntü, mükemmel stabilite, hem hidrofilik hem de lipofilik bileşenler için geniş çözünbilme kapasitesi, yağ-su ara faz yüzeyini artırma ve yüzey gerilimini düşürme gibi üstün özelliklerinden dolayı gıda ve kimya alanında ilgi çekmektedir [52].

Mikroemülsiyon tekniği kullanılarak endüstriyel domates atıklarından likopen ekstraksiyonunun iyileştirilmesi için yapılan bir çalışmada; birkaç aşamalı olarak planlanan ekstraksiyon işleminde öncelikle ultrases ön işlemi uygulanmış, ardından enzimatik hidroliz uygulanmıştır. Daha sonra domates atıklarının mikroemülsiyon ekstraksiyonu az miktarda yüzey aktif madde kullanımı ile likopenin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmiş koşullar altında verim % 100'ün üzerinde bir artış göstermiştir [52].

Mikroemülsiyona dayalı likopen ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada, yüzey aktif maddelerin, yardımcı yüzey aktif maddelerin ve ön işlemlerin etkileri araştırılmıştır. Domates posasından likopen mikroemülsiyon tekniği ile ekstrakte edilmiştir. Bunun için, sekiz farklı yüzey aktif madde, dört farklı yardımcı yüzey aktif madde, ultrases ve enzim ön işlemlerinin likopen ekstraksiyon verimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, mikroemülsiyon tekniğiyle en yüksek likopen konsantrasyonuna ulaşılmıştır [53].

Enzimatik ön işlem ve yüzey aktif maddeler yardımıyla uygun koşullar altında domates kabuklarından likopen geri kazanımı üzerine yapılan bir çalışmada; likopenin yüzey aktif madde destekli ekstraksiyonu sekiz farklı yüzey aktif madde kullanılarak çalışılmıştır. Bu yüzey aktif maddeler içinde en uygun olanının Span 20 olduğu belirlenmiştir. Enzimatik ön işlem ve yüzey aktif madde kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen likopen geri kazanımının sadece 1 saatlik enzimatik ön işlem uygulanan örneklerden 4 kat fazla olduğu ve hiç işlem uygulanmamış kabuklarla kıyaslandığında ise yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [54].

2.6.5. Bulutlanma noktası ekstraksiyonu

Yüzey aktif maddelerle oluşturulan misel sistemine dayanan bulutlanma noktası ekstraksiyonu (Cloud Point Extraction) basit, hızlı, ucuz, hassas ve seçici bir metottur. Noniyonik yüzey aktif maddeler kullanılarak oluşturulan çözeltiler, bulutlanma noktasının üzerindeki bir sıcaklığa ısıtıldığında sistem iki faza ayrılmaktadır. Bu fazlardan biri viskoz yüzey aktif madde fazı ve diğeri ise bulutlanma noktasında kritik misel konsantrasyonuna yakın yüzey aktif madde konsantrasyonu içeren su fazıdır [55].

Kırmızı etli portakal suyu ve işlenmiş zeytin atığı sularından CPE kullanılarak karotenoidlerin ve fenollerin ayrılması için yüzey aktif maddelerin uygunluğunun değerlendirildiği bir çalışmada; Span 20, PEG 400, T-80 ve T-20 kullanılmıştır ve en yüksek geri kazanıma T-80 ile ulaşılmıştır [55].

Yüzey aktif madde kullanımının, kırmızı etli portakal suyundan likopen ve toplam karoten geri kazanımına etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise; kırmızı etli portakal suları noniyonik yüzey aktif madde olan Genapol X-80 ile muamele edilmiştir. CPE üzerine pH, tuz konsantrasyonu, yüzey aktif madde konsantrasyonu, inkübasyon sıcaklığının etkisi incelenmiştir. Analiz sonucunda; pH 2.3, % 5 Genapol X-80 (v/v), 55 °C inkübasyon sıcaklığı ve örneklerin NaCl ile doyurulmasının maksimum karoten geri kazanımı için optimum deney koşulları olduğu belirlenmiştir [56].

2.7. Karotenoid Ekstraksiyon Etkinliğini Artıran Teknikler

2.7.1. Ultrases destekli ekstraksiyon

Ultrases, ses dalgalarının saniyede 20.000 veya daha fazla titreşimleri sonucunda üretilen bir enerjidir. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Ultrasonik enerjinin neden olduğu kavitasyon olarak bilinen bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufak kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları genellikle katı ve solvent arasında etkin bir temas sağlar [57]. Gıda teknolojisinde 20 kHz ile 10 MHz frekans aralığındaki ultrases ekipmanları kullanılmaktadır [58].

Mısırdaki β -karoten, lutein, zeaksantin analizinin yapıldığı bir çalışmada ultrases destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre 12 dakikada ultrases uygulamasıyla karotenoidlerin ultrases uygulanmadan yapılarına göre 3.6 kat daha yüksek düzeyde alınabildiği belirlenmiştir. Ultrases kullanılarak 30 dakikada elde edilen karotenoid konsantrasyonu 360 dk magnetik karıştırıcı ile elde edilen karotenoid konsantrasyonundan daha yüksek olduğu bildirilmiştir [59].

Portakal kabuğunda bulunan karotenoidlerin ekstraksiyonu için geliştirilen bir yöntemle yapılan bir çalışmada, konvensiyonel ekstraksiyon metodlarına göre ultrases destekli ekstraksiyonun daha kısa sürede gerçekleştiği belirlenmiştir [60].

2.7.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Havuçta β -karoten ve toplam karotenoid analizinin yapıldığı bir çalışmada; mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi uygulanmış ve sürekli mikrodalga uygulaması ile kesikli mikrodalga uygulamasının ekstraksiyon verimine olan etkisi incelenmiştir. Ayrıca farklı mikrodalga güçlerinin ve örnek/solvent oranının etkisi de araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre 180 W/75 mL:2 gr ve 300 W/150 mL:2 gr oranında mikrodalga gücü ve örnek/solvent oranı kullanıldığında ekstrakte edilebilir β -karoten ve toplam karotenoid miktarının aynı ve sürekli mikrodalga gücü kullanılarak yapılan ekstraksiyondan daha fazla olduğu belirlenmiştir [61].

Domates kabuklarından mikrodalga yardımıyla likopen analizinde analizin çok hızlı bir şekilde gerçekleştiği, ısı ve ışığa karşı hassas olan bileşiklerin analizi için büyük avantaj sağlayabileceği bildirilmiştir [62].

2.7.3. Enzim destekli ekstraksiyon

İşlenmiş domates atıklarından likopen analizi yapılan bir çalışmada; domates kabukları pektinolitik ve selüloolitik aktiviteye sahip gıda olarak tüketilebilir bir enzim karışımı ile muamele edilmiştir ve ardından örnekler hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Likopen geri kazanımında hiç işlem görmemiş bitki materyallerine göre 8-18 kat artma gözlenmiştir [63].

Cinar tarafından yapılan bir çalışmada [64]; karotenoid pigmentleri selüloz ve pektinazın farklı kombinasyonları kullanılarak portakal kabuğu, tatlı patates ve havuçtan enzimatik olarak ekstrakte edilmiştir. Karotenoid pigmentlerinin renk etkinliği üzerine ekstraksiyon süresinin ve enzim konsantrasyonunun etkisi araştırılmıştır. Düşük enzim konsantrasyonlarında ekstraksiyon süresi uzatılarak aynı renk etkinliğine ulaşılabildiği belirtilmiştir.

Bütün haldeki domateslerden likopenin ekstraksiyonu için yapılan bir çalışmada, selüloz ve pektinaz gibi hidrolitik enzimler kullanılarak, çalışma koşulları optimize edilmiş ve likopen veriminin enzim konsantrasyonu ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişimi incelenmiştir. Bu çalışmada pektinaz ve selüloz kullanımının likopen geri kazanımını artırdığı belirlenmiştir [65].

Domates meyvesinin endüstriyel atıkları, posası, kabuğu ve tamamının likopen içeriği yönünden araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; likopen ekstraksiyonu ekstraksiyon etkinliği bilinen dört farklı solventle iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada örnekler selüloz ve pektinaz gibi enzimlerle muamele edilmiştir. İkinci aşamada ise, likopen ekstraksiyonu solventlerle gerçekleştirilmiştir. Likopen geri kazanımının enzim ön uygulamasıyla arttığı belirlenmiştir [66].

Organik solvent kullanılmadan domates kabuğu atıklarından likopen ekstraksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada; doku hidrolitik enzim kullanılarak parçalanmıştır. Likopen içeren kromoplastlar düşük pH ile çöktürüldükten sonra santrifüjle izole edilmiştir. Bu aşamada kromoplastlardan izole edilmiş likopen içeriği

hiç işlem görmemiş domates kabuklarına göre 10 kat artış göstermiştir. Likopen ekstraksiyonunda proteaz karışımı kullanılarak yapılan bir enzimatik işlemle de verimin artırılabilirdiği rapor edilmiştir. Son üründe likopen konsantrasyonunun hiç işlem görmemiş kabukların likopen konsantrasyonlarına göre 30 kat fazla olduğu bildirilmiştir [67].

2.7.4. Elektrop plazmoliz yöntemiyle ekstraksiyon

Elektrop plazmoliz hücrenin içerisinden elektrik geçirilerek oluşturulan bir plazmoliz olayıdır. Elektrop plazmoliz yönteminde elektrik alanın gücü, işlem süresi, ürünün elektriksel özelliği, operasyon sıcaklığı ve ürünün partikül özelliği önemli faktörlerdir [68].

Ispanak ve domateste β -karoten ve likopen analizinde elektrop plazmoliz tekniği üç farklı enerji düzeyi (40, 60, 80 V/cm) ve üç farklı uygulama periyodu (4, 8, 12 dk) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon verimi üzerine farklı sıcaklıklarda ısıtılmış su banyosunun etkisi de incelenmiştir. Ön işlemlerden sonra β -karoten, likopen, klorofil-a, ve klorofil-b ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ispanakta, β -karoten için en yüksek ekstraksiyon verimi (% 19.7) ısıtılmış su banyosu ile elde edilmiştir. Klorofil-a, klorofil-b ve toplam klorofil için 60 V/cm için 8 dk elektrop plazmoliz ile ekstraksiyon verimi sırasıyla 14.9, 12.6 ve 13.7 olarak belirlenmiştir. Domateste, ekstraksiyon verimindeki en yüksek artış β -karoten (% 139.1) ve likopen (% 112.4) için 4 dk 80 V/cm elektrop plazmoliz ile elde edilmiştir [68].

2.8. Karotenoid Ekstraksiyonunu Etkileyen Faktörler

2.8.1. Örneğin yapısı

Doğada karotenoidler hücresel yapılar içinde korunmaktadır. Karotenoidlerin bozulmaya karşı hassasiyeti hücre yapısının bozulmasıyla artar. Gıda prosesleri proteinlerin denatürasyonuna ve hücre duvarının parçalanmasına neden olur [69].

Bitkisel karotenoidler kloroplast ve kromoplast membranlarında gömülü olarak bulunur [2]. Enzimik preparatlar pigment ekstraksiyonundaki verimi artırmak için bitki dokularını parçalamaktadır. Genellikle, selüloolitik ve pektinolitik bir enzim karışımı sınılaştırma işlemini artırır [64]. Amilaz, amiloglukoksidaz, selülaz, pektinaz, pentonaz,

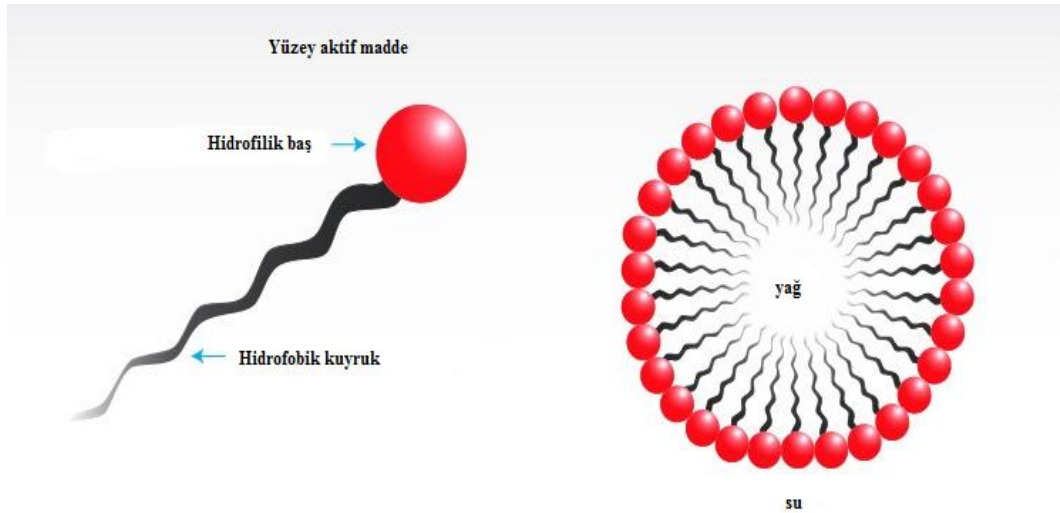
dehidrogenaz, naringinaz vb. meyve işlenmesi ve meyve suyu ekstraksiyonunda kullanılır [70]. Pektinazlarla selüloz, arabinaz ve ksilanazların kombinasyonu meyve suyu ekstraksiyonunda meyvelerin parçalama etkinliğini artırmak için kullanılır [71].

2.8.2. Solvent

Karotenoidler lipofilik bileşikler olduğundan genellikle organik solvent karışımları kullanılarak ekstrakte edilir. Kullanılan solventin türü, örnek matriksine ve karotenoidlerin nispi polaritesine bağlıdır. Sebze ve meyvelerde su içeriğinin yüksek olmasından dolayı aseton, THF gibi su ile karışabilen solventlerin kullanımı daha uygundur. Aseton, hekzan, metanol, etanol, etil eter, THF, dikloroetan ve bunların karışımları da gıdalardan karotenoidleri ekstrakte etmek için kullanılmıştır [72].

Karotenoidlerin su ile ekstraksiyonunda ise öncelikle emülsiyona dayalı sistemler oluşturulması gerekmektedir. Bu sistemlerin oluşturulması için yüzey gerilimini azaltan ve emülsiyon stabilitesini sağlayan yüzey aktif maddeler kullanılmaktadır.

Yüzey aktif madde molekülleri Şekil 2.4.'te görüldüğü gibi lipofilik ve hidrofilik olmak üzere iki kısımdan oluşur. Hidrofilik kısım polar baş grubu olarak, lipofilik kısım ise kuyruk olarak adlandırılır. Yüzey aktif maddelerin katyonik, anyonik, noniyonik ve zwitterion olarak sınıflandırılması hidrofilik grupların iyonik ya da noniyonik olup olmamasına bağlıdır. Yüzey aktif maddeler, yüzey ve ara yüzeydeki adsorblama eğilimine göre karakterize edilirler. Yüzey aktif maddelerin temel özelliklerinden biri solüsyon içinde yığın oluşturma eğiliminde olmalarıdır; bu formları ise misel olarak adlandırılır. Misel formunun oluşmaya başladığı konsantrasyon kritik misel konsantrasyonu (CMC) olarak adlandırılır. Misel formu su ile temastan kaçınan hidrofobik grupların ara yüzeylerindeki adsorbsiyon mekanizmasına bir alternatif olarak görülmektedir. Miseller organik hidrokarbonların ve sulu çözeltilerdeki yağın çözünürlüğünü etkileyen ve aynı zamanda viskoziteyi de etkileyen büyük moleküller gibi davranır. Miselin büyüklüğü, misel ile yüzey aktif madde molekülleri arasındaki ilişki ile ölçülür. Yüzey aktif madde molekülleri yüzey ve ara yüzey geriliminin düşürülmesini sağlar [73].



Şekil 2.4. Yüzey aktif maddelerin yapısı

Polisorbatlar (E 432-E 436) sorbitol, yağ asitleri ve etilen oksidin reaksiyonu ile oluşan yüzey aktif maddelerin bir sınıfını oluşturur. Polisorbatlar hafif karakteristik kokuya sahip renkli yağimsı sıvılar ya da mumsu katılardır. Uzun polioksietilen zincirlerinden dolayı, polisorbatların sudaki çözünürlükleri iyidir. Sulu çözeltilerinin (% 5 w/v) pH'ı 6-8 olarak bildirilmiştir. Polisorbat 80 ve 20 'nin birçok solventteki çözünürlüğünün iyi olması hem hidrojen alıcı hem de hidrojen verici olarak hareket etme özelliklerine dayanır. Her bir polisorbatın kendine özgü karakteristiği yapısında bulunan farklı yağ asidi ester gruplarından kaynaklanmaktadır. Polisorbat 20, 40, 60 ve 80 molekül başına yalnızca bir yağ asidi grubu içerirken, polisorbat 65'te ise üç stearat grubu bulunur [74].

- **Polioksietilen (20) Sorbitan Monolaurat (Polisorbat 20)**

Emülsifiyer ve dispersiyon ajanı olarak kullanılır. Su, etanol, metanol, etil asetat ve dioksanda çözünür; mineral yağlar ve petrol eterinde çözünmez [75].

- **Polioksietilen (20) Sorbitan Monopalmitat (Polisorbat 40)**

Emülsifiyer ve dispersiyon ajanı olarak kullanılır. Su, etanol, metanol, etil asetat ve asetonda çözünür; mineral yağlarda çözünmez [76].

- **Polioksietilen (20) Sorbitan Monostearat (Polisorbat 60)**

Emülsifiyer ve dispersiyon ajanı olarak kullanılır. Su, etil asetat ve toluende çözünür; mineral yağlar ve bitkisel yağlarda çözünmez [77].

- **Polioksietilen (20) Sorbitan Monooleat (Polisorbat 80)**

Emülsifiyer ve dispersiyon ajanı olarak kullanılır. Su, etanol, metanol, etil asetat ve toluende çözünür; mineral yağlar ve petrol eterinde çözünmez [78].

2.8.3. Sıcaklık

Genellikle tüm ekstraksiyon yöntemlerinde sıcaklığın kütle transfer işlemini ve karotenoidlerin ekstraksiyon verimini pozitif yönde artırdığı görülmüştür. Ekstraksiyon sıcaklığının artması genellikle;

- Hedef bileşenin solvent içerisinde çözünme kapasitesini artırır.
- Difüzyon oranını artırır.
- Hedef bileşen ve matriks arasındaki bağları iyi bir şekilde koparır.
- Solventin viskozitesini azaltır.
- Yüzey gerilimini azaltır.

Solventin kaynama noktası ve karotenoidlerin izomerizasyonu ya da oksidasyonu gibi istenmeyen durumlar ekstraksiyon sıcaklığı seçimini sınırlandıran faktörlerdir [79].

Toz halindeki domates kabuklarından likopen, β -karoten, fitoen ve fitofluenin ekstraksiyonu 25, 35, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda yapılmış ve sıcaklık artışının karotenoid konsantrasyonunda artışa neden olduğu bildirilmiştir. Ancak ekstraksiyon 60 °C'de etanolle gerçekleştirildiğinde likopen ve izomerlerinin veriminin, yüksek sıcaklıklarda izomerizasyon ve degradasyondan dolayı, 50 °C'den daha düşük olduğu görülmüştür [80].

Shi ve ark. [81] yaptıkları bir çalışmada; 60 °C'de bile izomerizasyonun gerçekleşebileceğini göstermişlerdir. Fakat 100 ya da 120 °C'de domates püresi matriksini ısıtarak likopen veriminde artış elde etmişlerdir. Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen ekstraksiyonun materyalin yapısında bulunan karotenoidlerin izomerizasyonuna ya da degradasyonuna neden olabileceği bildirilmiştir. Bu yüzden Strati ve Oreopoulou [79], 25 °C'deki ekstraksiyonla karşılaştırıldığında, ekstraksiyon verimi artmasına rağmen sıcaklığın 70 °C'ye çıkmasının domates atıklarından likopen ve diğer karotenoidlerde herhangi bir değişime neden olmadığını bulmuşlardır.

Kaur ve ark. [82] yaptıkları çalışmada ekstraksiyon aşamalarının sayısının ve ekstraksiyon süresinin artmasıyla likopen geri kazanımının arttığını göstermişlerdir. Ekstraksiyon sayısı ile karotenoid geri kazanımının artması arasındaki benzer trend Strati ve Oreopoulou [79] tarafından da gözlenmiştir.

2.8.4. Oksijen ve diğer faktörler

Oksijen, özellikle ışık ve ısı ile birlikte, yüksek derecede yıkıcı bir etkiye sahiptir. Işığa maruz bırakmak, özellikle doğrudan güneş ışığı ve ultraviyole ışık, *trans-cis* fotoizomerizasyona ve karotenoidlerin parçalanmasına neden olmaktadır [8]. Bu faktörlerden uzak tutulduğunda, gıdaların yapısında bulunan karotenoidler yüksek sıcaklıklarda bile stabil kalabilmektedir. Lipit peroksidasyonundan dolayı gıdalarda oluşan serbest radikallerle bozulma hızlanmaktadır. Lipoksigenaz varlığında oluşan kooksidasyon görülebilir düzeyde olabilmektedir [26].

Karotenoidler asit varlığında yapıları bozulabilmekte, dehidrate olabilmekte ve izomerize olabilmektedir. Birçok karotenoid alkali varlığında stabil kalabilmektedir. Kalsiyum karbonat, magnezyum karbonat ya da sodyum bikarbonat gibi nötralize edici ajanlar ekstraksiyon sırasında açığa çıkan gıdaların kendi yapılarında bulunan asitleri nötralize etmek için eklenebilmektedir [8].

Karotenoid ekstraktlarına sabunlaştırma işleminin uygulanması bu pigmentlerin tanımlanmasında önemli bir basamak olarak görülmektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan ksantofiller genellikle ester formunda bulunur. Esterifikasyon derecesi molekülün yapısında bulunan hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. β -kriptoksantin gibi monol karotenoidler serbest ya da monoester olarak bulunurlar. Lutein, zeaksantin gibi diol karotenoidler ise serbest, bir ya da iki yağ asidiyle esterleşmiş olarak bulunurlar. Bundan dolayı, sabunlaştırma işlemi yapılarak bu esterleşmiş yapılar, nötral yağlar, yağ asitleri ve klorofiller ekstraktan uzaklaştırılır. Böylece kromatografik analizlerde daha net bir ayırım sağlanmış olur [83].

2.9. Kromatografik Analizler

2.9.1. HPLC

Gıda ve biyolojik örneklerin karotenoid analizi genellikle HPLC ile gerçekleştirilmektedir. Asetonitril (ACN), MeOH ya da bu solventlerin karışımı karotenoidlerin analizinde kullanılan mobil fazın majör bileşenleridir. Bazı karotenoidlerin analizini iyileştirmek için (örneğin geometrik izomerleri ayırmak), mobil faza genellikle DCM, su, hekzan, kloroform, THF, propanol, etil asetat, metilen klorid ya da çeşitli eterler gibi küçük miktarda organik solventler eklenerek mobil faz modifiye edilir. Askorbik asit ya da BHT gibi antioksidanlar genellikle karotenoidleri stabilize etmek için mobil faza eklenmektedir [84].

Karotenoidleri analiz etmek için gradient ve isokratik ayırma modellerinde normal faz ve ters faz ayırma sistemleri kullanılmaktadır. Ancak yapılan araştırmaların çoğunda C₁₈ ve C₃₀ kolon kullanılan ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Polimerik C₃₀ kolonunun karotenoidlerin izomerlerini ayırmada C₁₈ kolonundan daha iyi olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. C₁₈ kolonu β -karoten, lutein, zeaksantin gibi geometrik izomerleri ayırmak için kabul edilebilir bir seçiciliğe sahiptir. C₃₀ kolonu benzer polariteye sahip karotenoidleri ayırmak için daha uygundur [85].

Karotenoidler gibi karakteristik absorpsiyon spektrumuna sahip örneklerin HPLC ile analizinde DAD dedektör sistemleri kullanılmaktadır. DAD dedektör sistemleri analiz sırasında girilen spektrum aralığını (190-800 nm) kaydedebilme özelliğine sahiptir. Bu da seçilen dalga boyundaki herhangi bir kromatogramın görülebilmesini sağlamaktadır [86].

2.9.2. Süperkritik akışkan kromatografi

Son birkaç yılda süper kritik akışkan kullanımı gıda sektöründeki araştırmalarda oldukça dikkat çekmektedir. Karbon dioksit en yaygın kullanılan süperkritik akışkandır; çünkü toksik değildir, patlayıcı değildir, GRAS olduğu düşünülür ve kritik sıcaklık ve basıncı sırasıyla 31 °C ve 73 bar olduğundan istenilen deneysel koşullara kolayca ulaşılabilmektedir. HPLC'nin aksine, SFC (Supercritical Fluid Chromatography) kolon boyunca en düşük basınç düşüşleriyle en yüksek akış oranının kullanılmasına olanak sağlar, kısa sürede en yüksek verim elde edilir ve organik solventlerin tüketimini azaltır.

Ayrıca, termal olarak dayanıksız maddeleri ve türevlendirme olmadan GC ile analiz edilemeyen polar bileşikler analiz edebilmektedir. 1980'lerde, SFC kapiler kolon ile alev iyon dedektör (FID) birlikte kullanılırken, günümüzde paket kolonlar ve LC tip dedektörler sıklıkla kullanılmaktadır. GC tip dedektörlerden LC tip dedektörlere, UV-VIS dedektörler gibi, evaporatif ışık saçma dedektör (ELSD) ve son olarak kütle spektrometre dedektör (MSD) birleşimi daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamaktadır. Benzer şekilde LC-MS, atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) SFC-MS sistemi için en popüler iyonizasyon metotlarıdır [87].

Matsubara ve ark. [88] tarafından yapılan bir çalışmada turunçgil meyvelerinde bulunan β -kriptoksantin ve esterleri SFC kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sonucuna göre ksantofil grubu karotenoidlerin analizi için SFC'nin uygun bir metot olabileceği bildirilmiştir.

2.9.3. İnce tabaka kromatografi

İnce tabaka kromatografi (Thin Layer Chromatography) karotenoid standartlarını elde etmek için saflaştırma amacıyla kullanılmaktadır. Farklı oranlarda petrol eteri, dietileter, toluen ve etanol, tek olarak ya da kombinasyon halinde silika jel üzerinde TLC ile birçok karotenoid grubunu saf olarak tanımlamakta kullanılmaktadır. TLC üzerinde ayırım gerçekleştikten sonra, bantlar tabaka üzerinden kazınır ve uygun bir solventle silika jelden ayrılır. Pigmentlerin tanımlanması ve kuantifikasyonu için dalga boyu spektrumu kaydedilir [86]. Chen ve Chen [89] tarafından, TLC kullanılarak su sarmaşıklarında karotenoid ve ksantofillerin analizi yapılmıştır.

2.9.4. Kapiler elektroforez

Kapiler elektroforez dar tüplerde gerçekleştirilen güçlü bir ayırma tekniğidir. Hızlı analiz süresi, etkili bir ayırma, yüksek seçicilik, kolaylık ve farklı uygulama koşullarına uygulanabilirliği kapiler elektroforezi diğer sıvı faz ayırma tekniklerinden oldukça avantajlı hale getirmektedir. Kapiler elektroforezin temel prensibi elektrik alan altındaki analitin hareketindeki farklılıklara dayanmaktadır. Elektrik alan tampon çözelti içindeki elektrotlar arasındaki yüksek voltajla sağlanır. Kapiler elektroforez tekniği kullanılarak karotenoidlerin ve klorinlerin ayırımının yapıldığı bir çalışmada yüksek oranda karotenoid geri kazanımı elde edilmiştir [90].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma için gerekli olan portakal kabuğu materyali Şekerciler Tic. San. Ltd. Şti. (Malatya)'den temin edilmiştir. Yıkanmış, iri parçalara ayrılmış ve taze olarak temin edilen materyal homojen bir şekilde karıştırılmış ve küçük porsiyonlar halinde -18 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan polisoksietilen sorbitan monolaurat (Tween-20), polioksietilen sorbitan monopalmitat (Tween-40), polioksietilen sorbitan monostearat (Tween-60), polioksietilen sorbitan oleat (Tween-80) yüzey aktif maddeleri Sigma Aldrich firmasından, sıvılaştırıcı enzim karışımı (pektinaz ve selülaz) ticari enzim üreten bir firmadan, aseton, metanol, HCl, NaOH, NaCl, THF, Na₂CO₃, β -karoten, Folin & Ciocalteus, ABTS, Gallik asit, amonyum asetat, potasyum peroksodisülfat ve Trolox kimyasalları Merck firmasından, distile su ve ultra saf su bölümdeki saf su cihazından temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet, ekipman ve cihazlar

Bu çalışma kapsamında yüksek devirli parçalayıcı (IKA T18 Digital ULTRA TURRAKS), ultrasonik su banyosu (BANDELİN SONOREX), UV-VIS çift ışın yollu spektrofotometre (UV-1800 SHIMADZU), vorteks karıştırıcı (UM-96B JE10 TECH), sonikatör (Soniprep 150 SANYO), yüksek basınçlı homojenizatör (Nanodisperser ISA-NLM 100 SUFLUX), HPLC (Yüksek basınç sıvı kromatografi sistemi, SHIMADZU), C₁₈ HPLC kolonu (Inertsil ODS-3, 5 μ m 4.6 x 250 mm), pH metre (METTLER TOLEDO), santrifüj (MSE MISTRAL 1000), hassas terazi (OHAUS PA214), çok noktalı manyetik karıştırıcı (VELP SCIENTIFICA), otomatik pipet seti ve çalışma için gerekli olan diğer malzemeler kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek hazırlama

Analizde kullanılan materyal, 100 gr portakal kabuğu ve 200 mL distile su ile blenderde parçalanarak homojen bir portakal kabuğu püresi şeklinde haftalık olarak hazırlanmıştır.

3.2.2. Yüzey aktif madde destekli karotenoid ekstraksiyonu

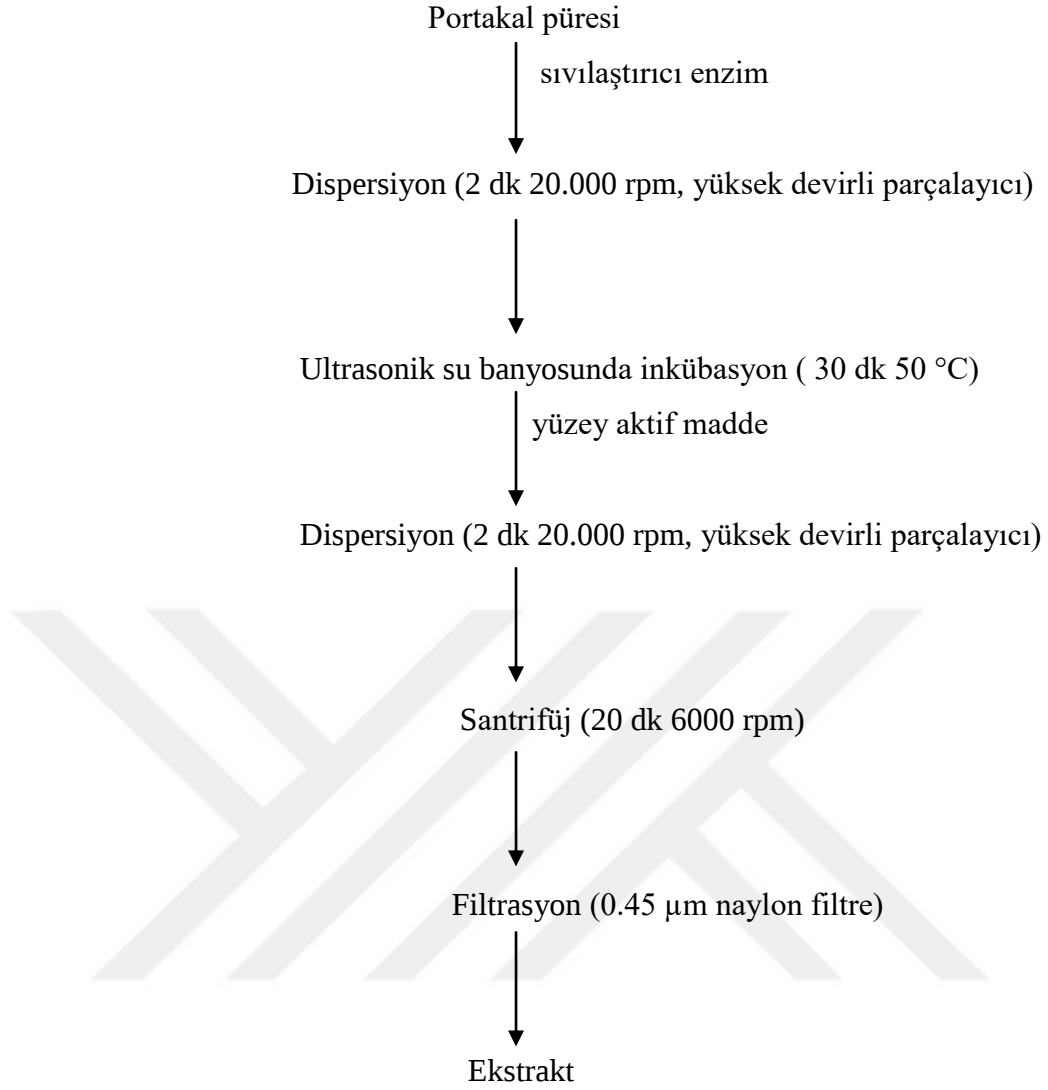
Bu çalışma kapsamında yüzey aktif madde destekli ekstraksiyon için öncelikle, analizde kullanılacak olan yüzey aktif madde ve sıvılaştırıcı enzim çözeltileri şu şekilde hazırlanmıştır:

Analizde kullanılacak olan T-20, T-40, T-60 ve T-80 yüksek viskozitelerinden dolayı direkt kullanmak zor olduğundan, bu maddeler distile su ile 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler, ağızları kapatılarak +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Analizden önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir analizde kullanılacak yüzey aktif madde miktarı analizde kullanılan portakal kabuğu miktarı üzerinden belirlenmiştir ve 10 kat seyreltme faktörü göz önünde bulundurularak hesaplanmıştır.

Analizde kullanılacak olan sıvılaştırıcı enzim çok küçük miktarlarda kullanılacağından, kullanım kolaylığı sağlaması açısından, 10 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Hazırlanan seyreltilmiş sıvılaştırıcı enzim +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Analizden önce buzdolabından çıkarılarak oda sıcaklığına getirilmiştir. Her bir analizde kullanılacak enzim miktarı, analizde kullanılan portakal kabuğu miktarı üzerinden belirlenmiştir.

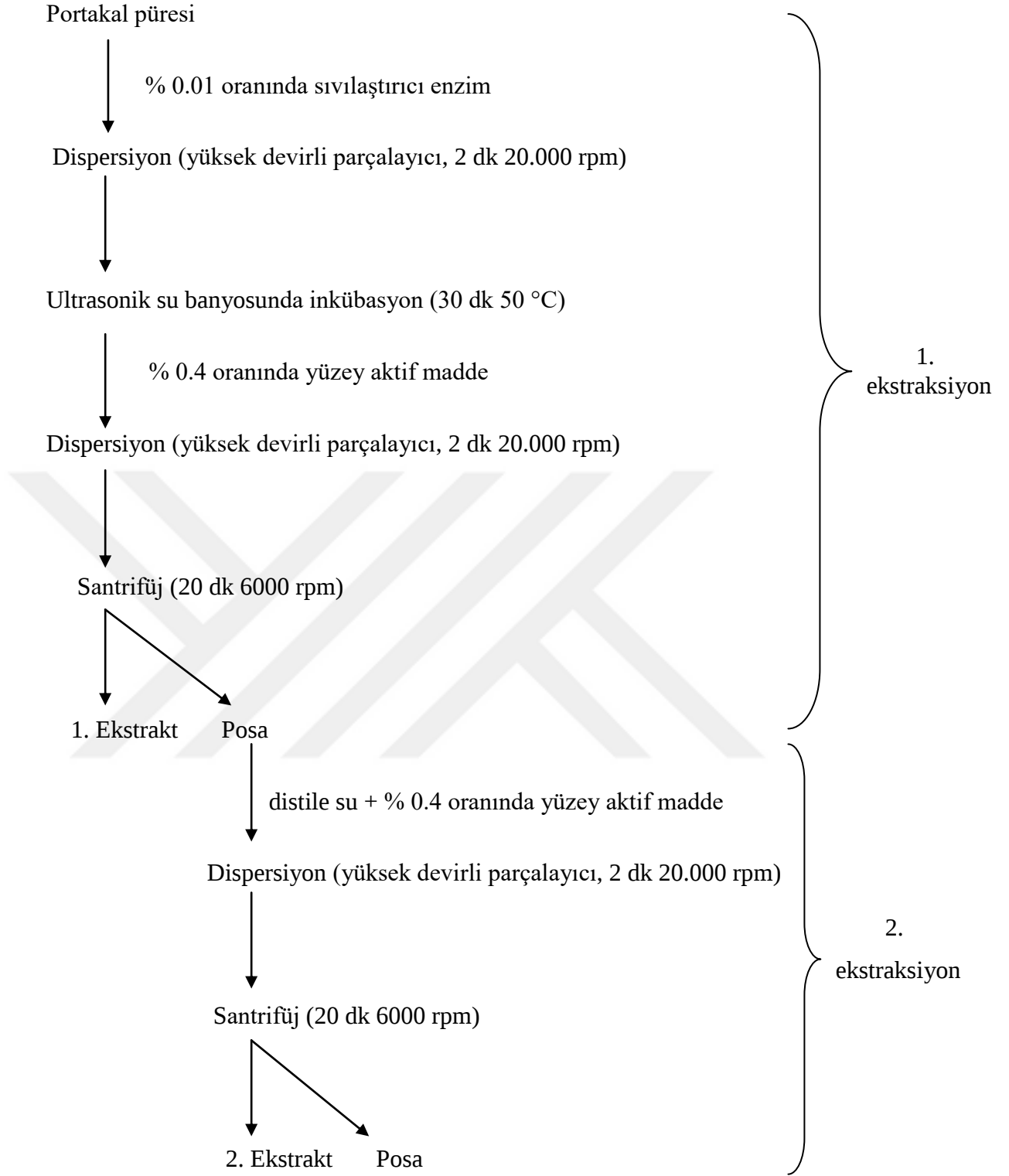
Bu çalışmada, portakal kabuğu karotenoidlerini ekstrakte etmek için uygulanan genel ekstraksiyon basamakları Şekil 3.1.'de gösterildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyonu etkileyen parametreler yapılan analizlerle optimize edilmiştir.

Analiz, kontrol örneği de dahil olmak üzere, her bir yüzey aktif madde için üç paralel şeklinde yapılmıştır.



Şekil 3.1. Karotenoid ekstraksiyon basamakları

Portakal kabuğu örneklerinde bulunan karotenoidlerin, kaç kademeli ekstraksiyon ile alınabildiğini ve geliştirilen bu ekstraksiyon yöntemi ile portakal kabuğunda bulunan karotenoidlerin ne kadarının alınabildiğini belirlemek amacıyla, portakal kabuğu örneklerine ardışık ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Şekil 3.2.'de gösterildiği şekilde ardışık yapılan ekstraksiyonlar sonucunda, posada karotenoid kalmayınca kadar ekstraksiyon işlemine devam edilmiştir. Ardından su bazlı sistem ile alınamayan karotenoidleri almak için THF ile ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu ekstraksiyonda yüzey aktif madde kullanılmadan posaya sadece THF eklenerek ekstraksiyon işlemi su bazlı sistemdeki gibi yapılmıştır. Ekstraksiyon sonunda elde edilen berrak ekstraktlar toplanarak 470 nm'de UV-VIS spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır.

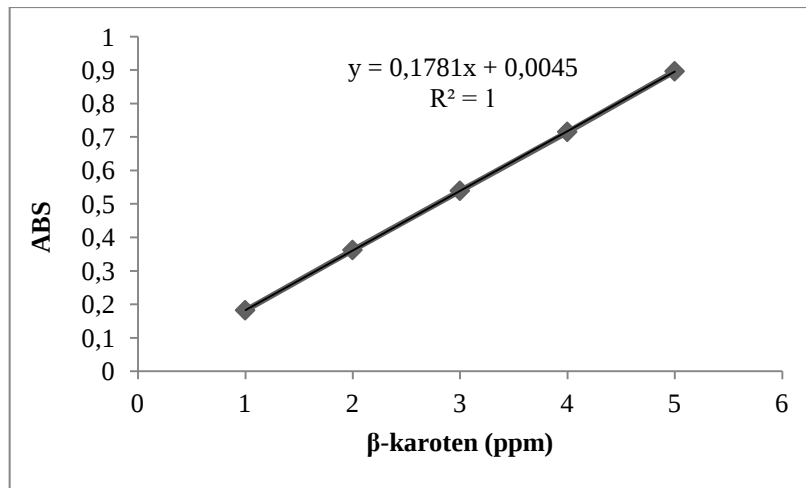


Şekil 3.2. Karotenoidlerin ardışık ekstraksiyonu

3.2.3. Spektrofotometrik toplam karotenoid analizi

Portakal kabuğunda bulunan karotenoidler su bazlı bir sistemle ekstrakte edilerek mikroemülsiyon bir yapı içerisine alınmıştır. Bu mikroemülsiyon yapı içerisinde bulunan karotenoidlerin toplam miktarını hesaplamak için saf β -karotenin su içerisindeki kalibrasyon grafiği kullanılmıştır. Su bazlı sistemle alınabilen toplam karotenoid miktarını klasik solvent ekstraksiyonuyla alınabilen karotenoid miktarı ile karşılaştırmak için, portakal kabukları THF ile ekstrakte edilmiştir. Bu ekstraksiyon sonucunda elde edilen karotenoidlerin toplam miktarı ise saf β -karotenin THF içerisindeki kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır.

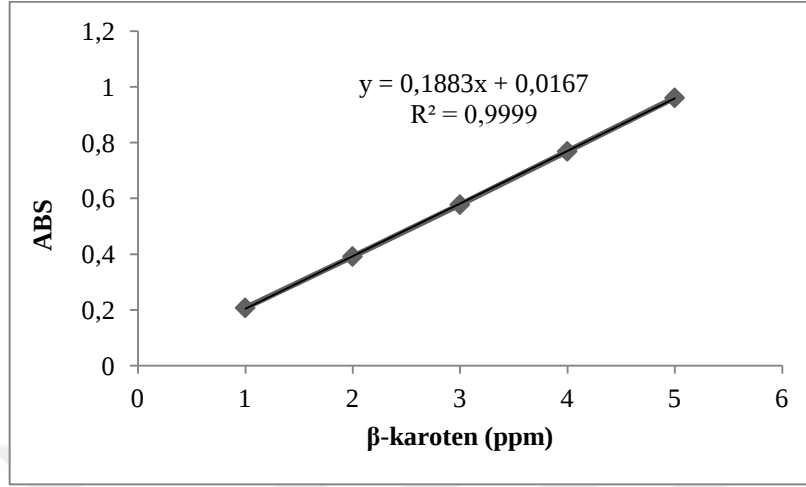
Su içerisinde mikroemülsiyon β -karotenin kalibrasyon grafiğini çizmek için 50 mg β -karoten 50 mL THF içerisinde çözündürülmüştür. Elde edilen çözeltiden 100 μ L alınarak 100 mg T-20 eklenmiştir. Çözelti manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra azot gazı ile THF'in tamamı çözeltiden uzaklaştırılmıştır. Ardından çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine damla damla 10 mL su eklenmiştir. Elde edilen bu çözeltiden β -karotene karşılık gelen 1-10 ppm değerlerinde konsantrasyonlar alınarak suya karşı absorbans değerleri UV- VIS çift ışın yollu spektrofotometrede 470 nm'de ölçülmüştür. Veriler grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.3.'teki kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.3. Su içerisinde mikroemülsiyon β -karotenin kalibrasyon grafiği

THF içerisinde β -karotenin kalibrasyon grafiğini çizmek için 50 mg β -karoten 50 mL THF içerisinde çözündürülmüştür. Hazırlanan çözeltiden 1-5 ppm'lik çözeltiler hazırlanarak THF'e karşı absorbans değerleri UV-VIS çift ışın yollu spektrofotometrede

470 nm'de ölçülmüştür. Elde edilen veriler grafiğe geçirildiğinde Şekil 3.4.'deki kalibrasyon grafiği elde edilmiştir.



Şekil 3.4. β -karotenin THF içerisindeki çözeltisinin spektrofotometrede elde edilmiş kalibrasyon grafiği

3.2.4. Farklı parametrelerin karotenoid kazanımına etkisinin belirlenmesi

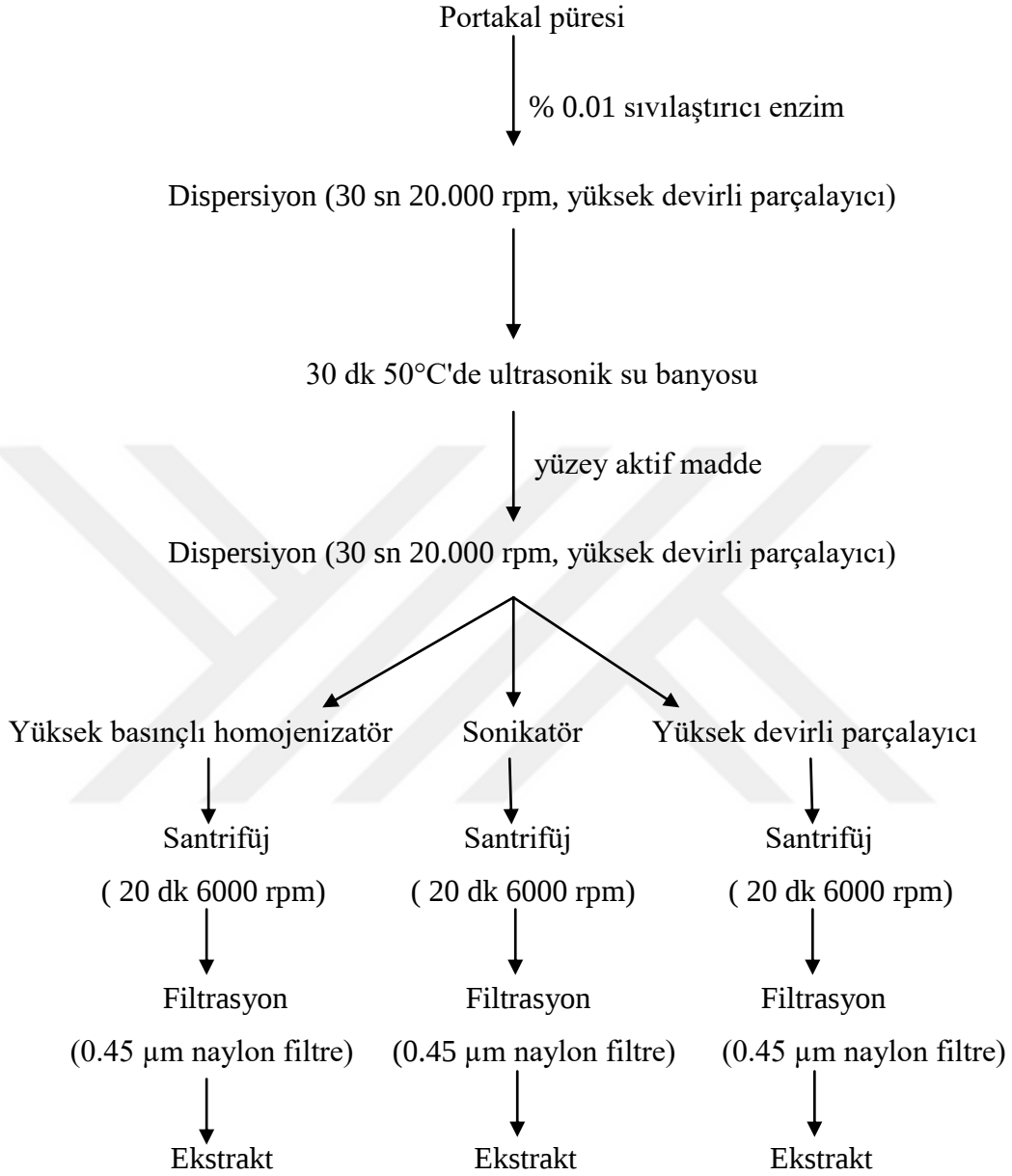
3.2.4.1. Sıvılaştırıcı enzim etkisi

Karotenoid ekstraksiyonu üzerine kullanılan enzim miktarının etkisini belirlemek amacıyla, Şekil 3.1.'de gösterilen ekstraksiyon işlemi farklı oranlarda (% 0-0.5) sıvılaştırıcı enzim ve % 0.5 oranında T-20 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstraktın toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4.2. Farklı dispersiyon yöntemlerinin etkisi

Ekstraksiyon sırasında uygulanan dispersiyon işleminin, karotenoid kazanımı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yüksek devirli parçalayıcı, sonikatör ve yüksek basınçlı homojenizatör olmak üzere üç farklı yöntemle homojenizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında her bir yüzey aktif madde çeşidi (% 0.4 oranında) için Şekil 3.5.'deki işlem basamakları uygulanmıştır. Bu ekstraksiyon işleminde üç bölüme ayrılan püreler yüksek devirli parçalayıcıda 1 dk, 2 dk, 4 dk, 6 dk ve 8 dk homojenize edilmek üzere, 1 dk, 2 dk, 4 dk, 6 dk ve 8 dk sonikasyon işlemi uygulanmak üzere ve yüksek basınçlı homojenizatörde (100 rpm 600 mPa) 9 defa

geçirilerek homojenize edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde edilen berrak ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. Farklı dispersiyon yöntemleri kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemi

Farklı oranda (% 0.05-0.4) T-80 kullanılarak yüksek devirli parçalayıcı, sonikatör ve yüksek basınçlı homojenizatör ile yapılan homojenizasyon işleminin karotenoid kazanımı üzerine etkisini araştırmak amacıyla ekstraksiyon işlemi Şekil 3.5.'deki gibi yapılmıştır. Hazırlanan püreler, yüksek devirli parçalayıcıda 1 dk ve 2 dk homojenize edilerek, 1 dk ve 2 dk sonikasyon işlemi uygulanarak ve yüksek basınçlı homojenizatörden 4 defa geçirilerek homojenize edilmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde

edilen berrak ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4.3. Yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin etkisi

Karotenoid ekstraksiyonu üzerine kullanılan yüzey aktif madde miktarının etkisini belirlemek amacıyla Şekil 3.1.'de gösterilen ekstraksiyon işlemi % 0.01 oranında enzim ve yalnızca T-80'den % 0-10 oranında kullanılarak yapılmış ve optimum yüzey aktif madde oranı belirlenmiştir. Farklı Tween çeşitlerinin farklı oranlarda kullanımı ile karotenoid geri kazanımı arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla Şekil 3.1.'de gösterilen ekstraksiyon işlemi % 0.01 oranında enzim ve % 0.05- 0.4 oranında farklı yüzey aktif maddeler kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen berrak ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4.4. Ekstraksiyon öncesi ısıl işlemin etkisi

Karotenoid kazanımı üzerine, ekstraksiyon öncesi uygulanan ısıl işlemin etkisini belirlemek amacıyla farklı sıcaklık değerlerinde (50-90 °C) ve farklı sürelerde (5, 10 ve 15 dk) ısıl işlem uygulanmıştır. Ekstraksiyon için alınan numuneler yüksek devirli parçalayıcıda 2 dk 20.000 rpm'de homojenize edildikten sonra, numunelere farklı sıcaklık ve sürelerde ısıl işlem uygulanmıştır. Isıl işlem uygulamasının ardından numuneler oda sıcaklığına getirilmiştir. Ardından % 0.01 oranında sıvılaştırıcı enzim ve her bir Tween çeşidi % 0.4 oranında eklenerek ekstraksiyon işlemi Şekil 3.1.'de belirtildiği şekilde devam ettirilmiştir. Ekstraksiyon sonunda elde edilen berrak ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4.5. pH 'ın etkisi

Karotenoid ekstraksiyonu üzerine pH'ın etkisini belirlemek amacıyla analizde kullanılacak olan portakal püresinin ilk önce başlangıç pH'ı ölçülmüştür. Ardından 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak portakal kabuğu püresinin pH'ı 3-9 arasında farklı değerlere ayarlanmış ve ardından ekstraksiyon Şekil 3.1.'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Ekstraksiyon işleminde % 0.01 oranında enzim ve % 0.4 oranında T-80 kullanılmıştır. Ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.4.6. Tuz konsantrasyonunun etkisi

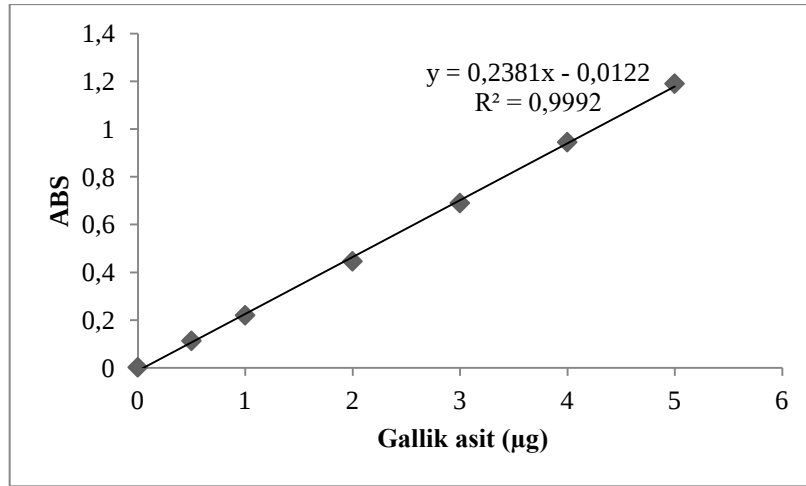
Karotenoid ekstraksiyonu üzerine tuz konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla, analiz yapılacak portakal püresi örneklerine % 0-10 oranında derişik NaCl çözeltisi eklenerek ekstraksiyon Şekil 3.1.'deki gibi yapılmıştır. Ekstraksiyon işleminde % 0.01 oranında enzim ve % 0.4 oranında T-80 kullanılmıştır. Ekstraksiyonun ardından elde edilen ekstraktların toplam karotenoid miktarı Bölüm 3.2.3.'te anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

3.2.5. Toplam fenolik madde analizi

Toplam fenolik madde miktarı Folin & Ciocalteu yöntemi [91] ile yapılmıştır. Ekstraksiyon işlemi Bölüm 3.2.4.3.'te izah edildiği gibi yapılmıştır.

Analize başlamadan önce 10 kat seyreltilmiş Folin & Ciocalteu reaktifi ve % 2'lik sodyum karbonat çözeltisi hazırlanmıştır. Toplam fenolik madde miktarını Gallik asit cinsinden ifade etmek için 1000 ppm'lik Gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan Gallik asit çözeltisi 10 kat seyreltilerek, farklı miktarlarda (50-500 µL) alınmıştır.

Analiz için 100 µL örnek alınarak üzerine 900 µL distile su eklenmiştir. Daha sonra üzerine 10 kat seyreltilmiş 1 mL Folin & Ciocalteu reaktifinden eklenmiş ve vortekste karıştırılmıştır. 2 dk sonra üzerine 1 mL % 2'lik sodyum karbonat çözeltisi eklenmiş ve vortekste karıştırılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir ve bu süre sonunda plastik spektrofotometre küvetlerine alınarak 750 nm'de UV-VIS çift ışın yollu spektrofotometrede absorbans ölçümü yapılmıştır. Gallik asit çözeltilerine ise örneğe uygulanan işlemler eş zamanlı olarak aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre Şekil 3.6.'daki kalibrasyon grafiğı oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiğinde yer alan denkleme göre gerekli hesaplamalar yapılarak örneklerdeki toplam fenolik madde miktarı Gallik asit cinsinden ifade edilmiştir.



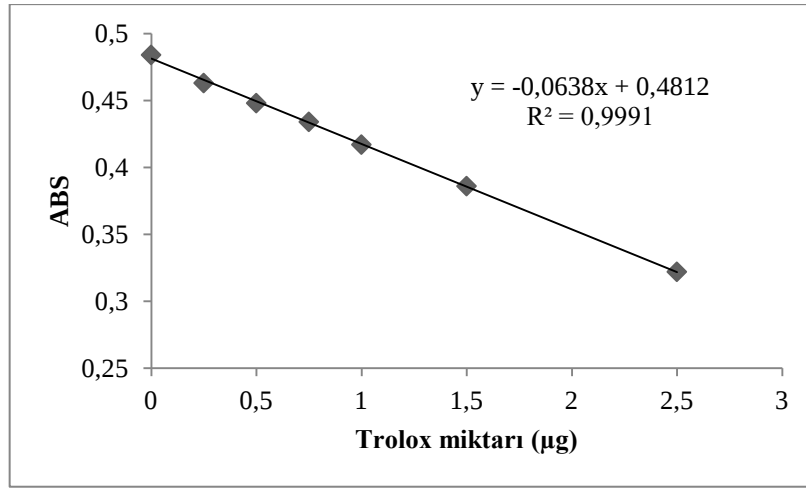
Şekil 3.6. Folin & Ciocalteu yöntemi için Gallik asit kalibrasyon grafiği

3.2.6. Antioksidan aktivite analizi

Portakal kabuğunun antioksidan aktivitesini belirlemek için klasik ABTS yöntemi [16] kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi Bölüm 3.2.4.3.'te izah edildiği gibi yapılmıştır.

Analiz öncesinde 7 mM ABTS solüsyonu 2.45 mM potasyum peroksodisülfat çözeltisi içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 16 saat oda sıcaklığında karanlık bir ortamda bekletilmiştir. Elde edilen çözelti saf su ile seyreltilerek 0.7-0.8 absorbans değerine sahip çözelti elde edilmiştir. Antioksidan aktivite miktarını Trolox eşdeğeri olarak ifade etmek için, 50 mg Trolox 50 mL metanolde çözülerek 1000 ppm'lik çözelti hazırlanmıştır. Ardından 1000 ppm'lik Trolox çözeltisi 10 kat seyreltilerek farklı miktarlarda (50-500 µL) alınmıştır.

Analiz için 50 µL örnek alınarak üzerine 950 µL distile su ve 2 mL ABTS solüsyonu eklenerek vortekslenmiştir. Trolox çözeltilerine ise örneğe uygulanan işlemler eş zamanlı olarak aynı şekilde uygulanmıştır. Elde edilen verilere göre Şekil 3.7.'deki kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kalibrasyon grafiğindeki denkleme göre gerekli hesaplamalar yapılarak antioksidan aktivite Trolox eşdeğeri olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. ABTS yöntemi için Trolox kalibrasyon grafiği

3.2.7. HPLC analizleri

Portakal kabuğu ekstraktların HPLC kromatogramları ters faz HPLC sisteminde elde edilmiştir. Çalışmada C₁₈ kolon ve PDA dedektör kullanılmıştır. Bölüm 3.2.4.3.'de anlatıldığı şekilde elde edilen ekstraktlar cihaza direkt olarak enjekte edilmiştir. Analizlerde enjeksiyon hacmi 50 µL, akış hızı 1 mL/dk, kolon fırını sıcaklığı 30 °C ve dedeksiyon dalga boyu 450 nm olarak ayarlanmıştır. Çalışmada gradient akış kullanılmıştır. Üç solventli bu sistemde 0.005 M amonyum asetat içeren aseton (A), metanol (B) ve ultra saf su (C) kullanılmıştır. Gradient koşulları aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC gradient koşulları

Zaman (dk)	Solvent A	Solvent B	Solvent C
0	50	40	10
20	50	40	10
30	50	50	0
40	50	50	0
45	50	40	10

3.2.8. İstatistiksel analiz

Tüm analizler üç paralel olarak yapılmıştır. Analiz sonuçları ortalama ve ± standart sapma olarak grafiklerde belirtilmiştir. İstatistiksel analizde "SPSS 16.0 for Windows" programı kullanılmıştır. Portakal kabuklarına uygulanan işlemler için elde

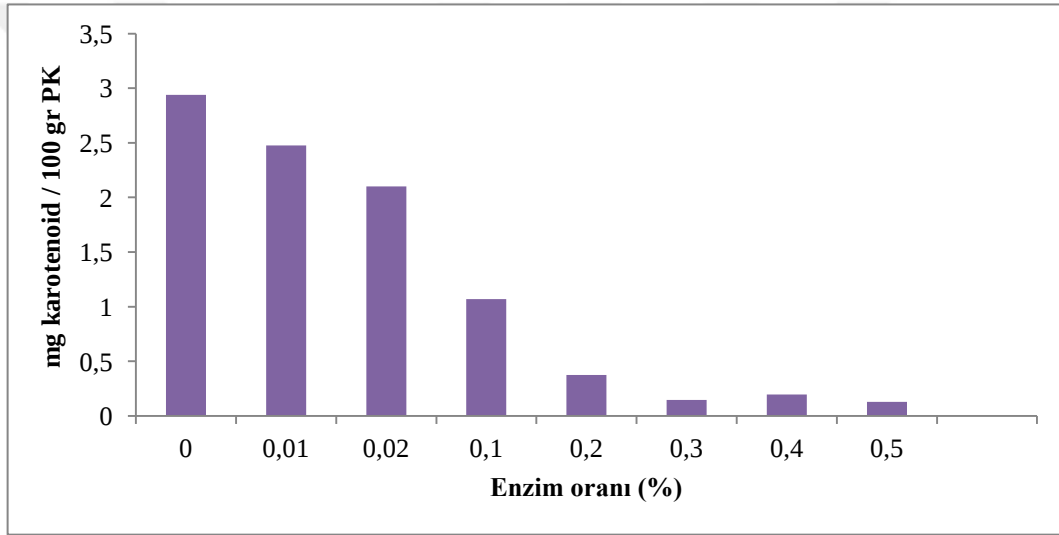
edilen analiz sonuçları arasındaki farkların önem düzeyi One Way ANOVA testi ve Duncan post testiyle belirlenmiştir. Farklı grupların istatistiksel olarak önem düzeyleri a, b, c... şeklinde harflerle gösterilmiştir. Bu harflerin sayısı Duncan testinde oluşan grup sayısına göre, en yüksek değerden en düşük değere doğru, alfabetik olarak belirlenmiştir. Örnek istatistik tabloları EK 1 ve EK 2'de verilmiştir.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Sıvılaştırıcı Enzim Düzeyinin Etkisi

Portakal kabuğu yapı itibariyle pektin açısından zengin bir materyal olduğundan kullanılan sıvılaştırıcı enzim karışımının (pektinaz ve selüloz), pektini parçalamasıyla çok miktarda pektin kalıntıları mikroemülsiyon içerisinde bulunmaktadır. Mikroemülsiyon içerisinde bulunan bu kalıntıların, hücrelerin parçalanmasıyla açığa çıkmış olan karotenoidlerin etrafını sardığı ve ekstrakta geçmesini engellediği düşünülmektedir.



Şekil 4.1. Karotenoid ekstraksiyon etkinliği üzerine enzim miktarının etkisi

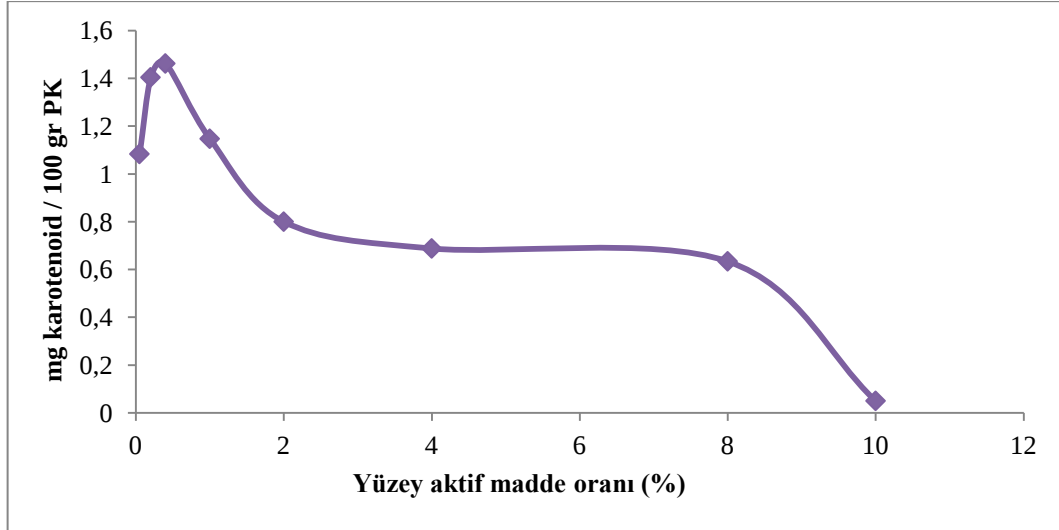
İşlenmiş domates atıklarından likopen analizi yapılan bir çalışmada, enzim kullanımıyla likopen geri kazanımında hiç işlem görmemiş bitki materyallerine göre 8-18 kat artış gözlenmiştir [63]. Bütün haldeki domateslerden likopenin ekstraksiyonu için yapılan bir diğer çalışmada ise, pektinaz ve selüloz kullanımının likopen geri kazanımını artırdığı belirlenmiştir [65]. Domates meyvesinin endüstriyel atıkları, posası, kabuğu ve tamamının likopen içeriği yönünden araştırıldığı bir diğer çalışmada ise likopen geri kazanımının enzim kullanımıyla arttığı belirlenmiştir [66]. Organik solvent kullanılmadan domates kabuğu atıklarından likopen ekstraksiyon olanağının araştırıldığı bir çalışmada enzim kullanımıyla son üründe likopen bileşiminin hiç işlem görmemiş kabukların likopen konsantrasyonlarına göre 30 kat artış gösterdiği bildirilmiştir [67]. Yapılan bu çalışmalarda görüldüğü gibi enzim ön işlemi uygulanarak yapılan

ekstraksiyon işlemlerinde karotenoid geri kazanımında artış olduğu görülmüştür. Fakat portakal kabukları ile yapmış olduğumuz analizde ise enzim ön işleminin karotenoid geri kazanımında ciddi oranlarda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra ekstraktın filtreden geçirilmesi işlemini ise kolaylaştırdığı görülmüştür. Bu nedenle bundan sonra yapılacak olan ekstraksiyon işlemlerinde en düşük oranda (% 0.01) enzim kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2. Yüzey Aktif Madde Miktar ve Çeşidinin Etkisi

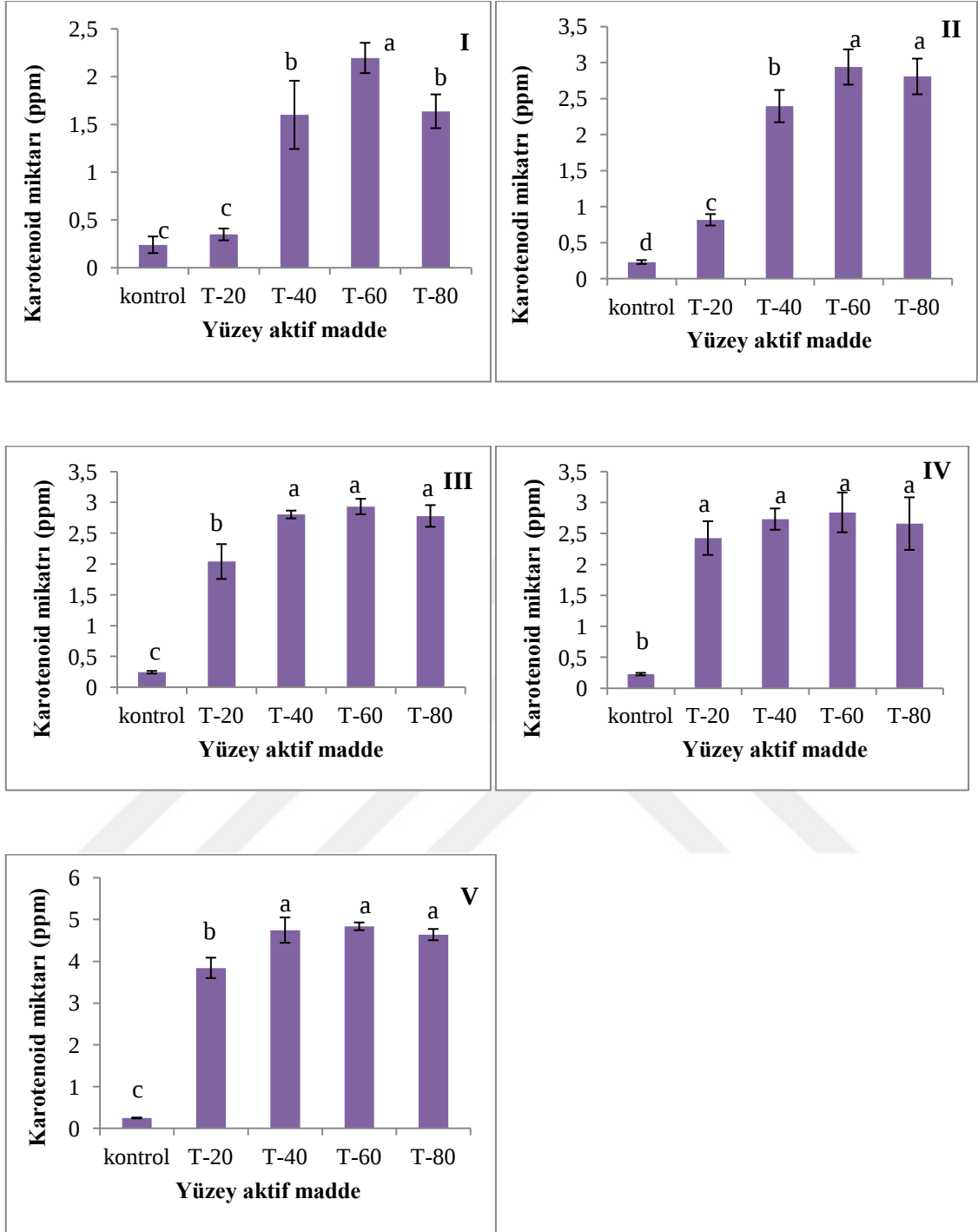
Karotenoidler lipofilik moleküller olduklarından ve suda çözünmediklerinden [8], hücrelerin parçalanması ile açığa çıkan karotenoidler bir süre sonra bir araya toplanma eğiliminde olacaktır. Bunu önlemek ve sulu çözelti içerisinde dağılmalarını sağlamak amacıyla yüzey aktif madde kullanılması gerektiği düşünülmüştür. Yüzey aktif maddeler misel oluşturma özelliğine sahiptir [73]. Uzun polioksietilen zincirlerinden dolayı, polisorbatların sudaki çözünürlüklerinin iyi olması [74], sulu çözeltiler içerisinde misel oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Yüksek devirli parçalayıcı ve enzim yardımıyla portakal kabuklarının parçalanması ile mikroemülsiyon içerisinde dağılmış olan karotenoidlerin, mikroemülsiyon içerisine eklenen yüzey aktif madde ile miseller içerisine alınması sağlanmıştır. Miseller içerisine alınan karotenoidlerin bir araya gelmesi önlenmiş ve bu sayede ayrıştırılmaları kolaylaşmıştır.

Bu çalışmada % 0.05-10 oranında T-80 kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarla elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, % 0.4 oranında T-80 kullanılması durumunda maksimum karotenoid kazanımı elde edildiği ve bunun üzerindeki oranlarda yüzey aktif madde kullanılması durumunda karotenoid geri kazanımında bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre optimum yüzey aktif madde miktarı % 0.4 olarak belirlenmiştir. Analiz esnasında yapılan gözlemlere göre, yüzey aktif madde oranı arttıkça, yüksek devirli parçalayıcı ile homojenizasyon işlemi sırasında köpük oluşumunun arttığı ve bunun homojenizasyon işlemini zorlaştırdığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2. Farklı oranlarda T-80 kullanımının karotenoid kazanımına etkisi

Karotenoid geri kazanımı üzerine kullanılan yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin etkisini belirlemek amacıyla, farklı oranlarda T-20, T-40, T-60 ve T-80 kullanılmıştır. Şekil 4.3.'te görüldüğü gibi kontrol örneği ile kıyaslanınca % 0.4 oranında YAM kullanıldığında en yüksek karotenoid geri kazanımına T-60 ile ulaşılmıştır ($p < 0.05$). Bunu sırası ile T-40, T-80, T-20 ve kontrol örneği takip etmiştir. T-60'tan elde edilen sonuçlar ile T-40 ve T-80 ile elde edilenler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. % 0.3 oranında YAM kullanıldığında da % 0.4'e benzer bir trend görülmüştür. Fakat bu analiz sonuçlarına göre T-20, T-40, T-60 ve T-80 arasında önemli bir farklılık bulunmamaktadır. YAM oranı % 0.2 olduğunda % 0.4'teki gibi bir trend görülmüştür. % 0.1 oranında YAM kullanıldığında ise yine en yüksek geri kazanım T-60 ile, ve T-60'ı sırası ile T-80, T-40 ve T-20 takip etmiştir; T-80 ve T-60 arasında anlamlı bir farklılık görülmezken diğerleri arasında önemli bir farklılık görülmektedir. % 0.05 oranında kullanıldığında ise en belirgin farklılık T-60 ile elde edilen sonuçlarda görülmüştür. Özetle karotenoid kazanımının YAM kullanılan örneklerde YAM kullanılmayan örneklere kıyasla oldukça fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Farklı yüzey aktif maddelerin (YAM) farklı oranlarının kullanımının karotenoid kazanımına etkisi (YAM oranları; **I:** % 0.05, **II:** % 0.1, **III:** % 0.2, **IV:** % 0.3, **V:** % 0.4) (Farklı harfler farklı yüzey aktif madde çeşidine göre elde edilen sonuçların ANOVA testi (SPSS) ile belirlenen istatistiksel gruplarını göstermektedir, $p < 0,05$.)

Mikroemülsiyon tekniği kullanılarak endüstriyel domates atıklarından likopen ekstraksiyonunun artırılması için yapılan bir çalışmada; optimize edilmiş koşullar altında, verim başlangıç deneyinin son ürününe kıyasla % 100'ün üzerinde bir artış göstermiştir [52].

Domatesten mikroemülsiyona dayalı likopen ekstraksiyonunun incelendiği başka bir çalışmada, yüzey aktif maddelerin, yardımcı yüzey aktif maddelerin ve ön işlemlerin etkileri araştırılmıştır. Tweenler arasında en yüksek karotenoid geri kazanımı T-60 ile elde edilmiştir. Bunu T-80 ve T-20'nin izlediği bildirilmiştir [53].

Enzimatik ön işlem ve yüzey aktif maddeler yardımıyla uygun koşullar altında domates kabuklarından likopen geri kazanımı üzerine yapılan bir çalışmada ise; enzimatik ön işlem ve yüzey aktif madde kullanılarak yapılan ekstraksiyondan elde edilen likopen geri kazanımının sadece 1 saatlik enzimatik ön işlem uygulanan örneklerden 4 kat fazla olduğu ve hiç işlem uygulanmamış kabuklarla kıyaslandığında ise yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir [54].

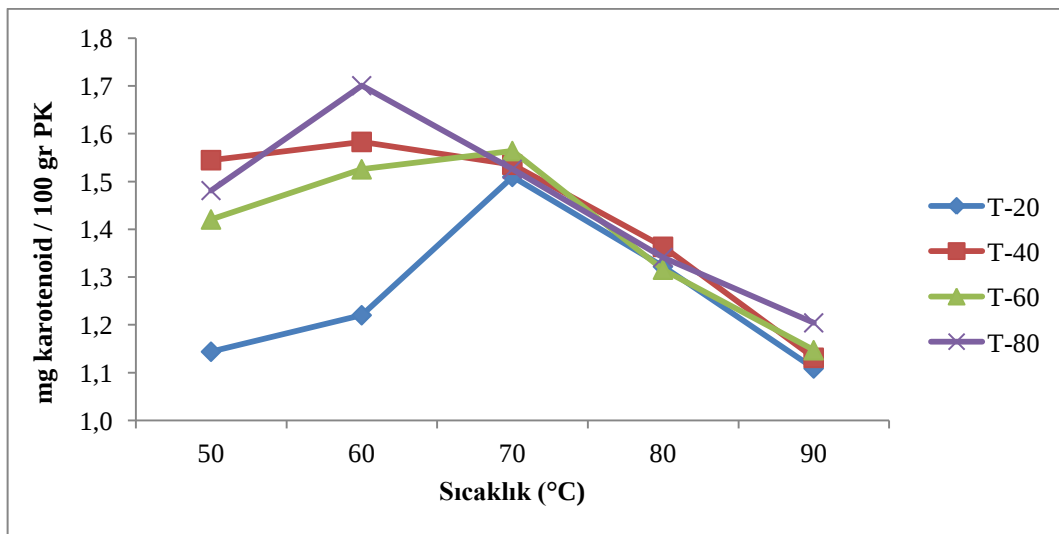
Bu çalışmalarda da belirtildiği gibi yüzey aktif madde kullanılarak yapılan ekstraksiyon ile karotenoid geri kazanımının ve ekstraksiyon veriminin arttığı belirlenmiştir. Portakal kabuğu ile yapmış olduğumuz bu çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarda da yüzey aktif madde oranının artışına bağlı olarak karotenoid geri kazanımının kontrol örneğine kıyasla arttığı görülmüştür. Analiz edilecek örneğin yapısına uygun HLB değerine sahip yüzey aktif madde seçimi ile verim ve geri kazanımın artması muhtemeldir.



Şekil 4.4. Farklı miktar ve çeşitte yüzey aktif madde kullanımının karotenoid kazanımına etkisinin karşılaştırılması

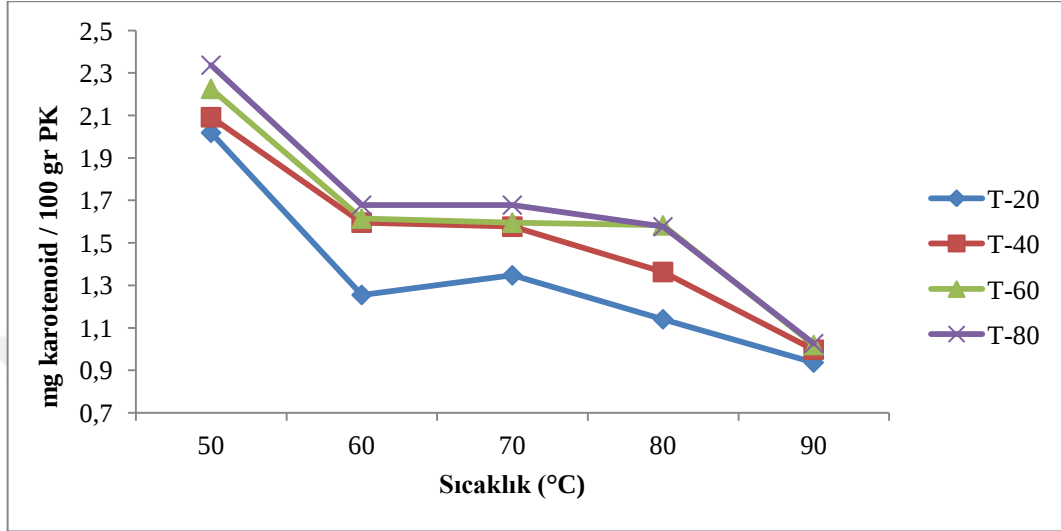
4.3. Ekstraksiyon Öncesi Isıl İşlemin Karotenoid Kazanımına Etkisi

Karotenoid ekstraksiyonu öncesinde farklı sürelerde uygulanan ısıtma işleminin karotenoid kazanımı üzerine etkilerini incelemek amacıyla yaptığımız çalışmada, artan sıcaklık ve artan uygulama sürelerine bağlı olarak karotenoid kazanımında genel olarak bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Buna göre; Şekil 4.5'te gösterilen analiz sonuçlarına göre 5 dk süreyle farklı yüzey aktif madde çeşitleri için farklı sıcaklık değerleri uygulandığında, karotenoid geri kazanımının 70 °C'ye kadar arttığı görülmüştür. Bu sıcaklık değerinden sonra ise karotenoid geri kazanımında önemli bir düşüş olmuştur.



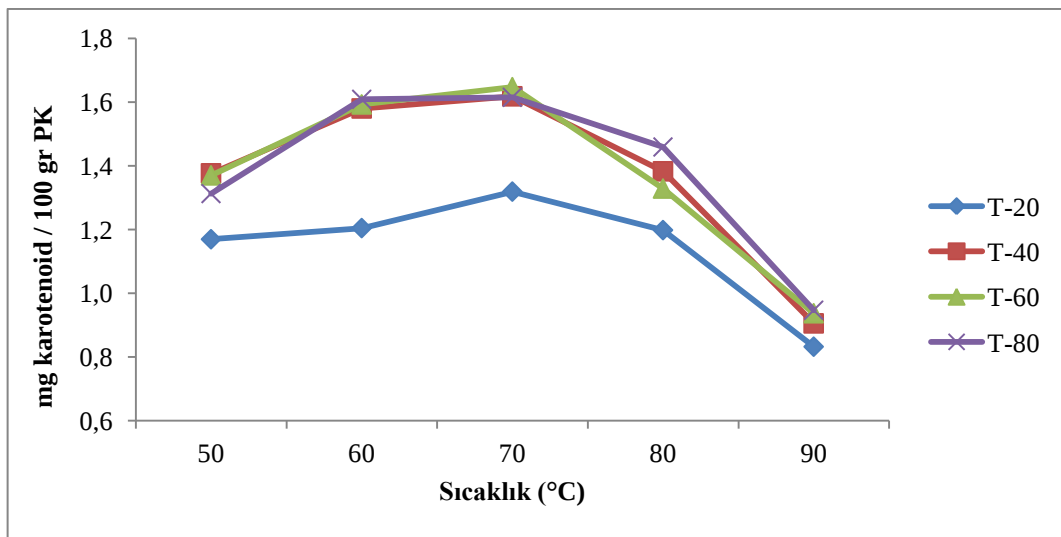
Şekil 4.5. Farklı sıcaklıklarda 5 dk'lık ısıtma uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi

Şekil 4.6.'da verilen analiz sonuçlarına göre; 10 dk süreyle farklı yüzey aktif madde çeşitleri için farklı sıcaklık değerleri uygulandığında, karotenoid geri kazanımının 60 °C'ye kadar azaldığı, 80 °C'ye kadar karotenoid geri kazanımının hemen hemen sabit bir değerde olduğu ve 80 °C'den sonra ise belirgin bir azalma olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. Farklı sıcaklıklarda 10 dk 'lık ısıtma uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi

Şekil 4.7.'de verilen analiz sonuçları ise; 15 dk süreyle farklı yüzey aktif madde çeşitleri için farklı sıcaklık değerleri uygulandığında, karotenoid kazanımının 70 °C'ye kadar arttığı ve 70 °C'den sonra karotenoid kazanımında bir düşüş olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.7. Farklı sıcaklıklarda 15 dk'lık ısıtma uygulamasının karotenoid kazanımına etkisi

Genellikle tüm ekstraksiyon yöntemlerinde sıcaklığın kütle transfer işlemini ve karotenoidlerin ekstraksiyon verimini pozitif yönde artırdığı görülmüştür [79]. Fakat karotenoidler termal olarak stabil olmadıklarından, yüksek sıcaklık uygulamaları yapılarında degradasyona ve izomerizasyona neden olabilmektedir. Portakal kabukları üzerinde yapılmış olan bu analizlerde artan sıcaklık ve süreye bağlı olarak karotenoid geri kazanımında görülen azalmanın, karotenoidlerin yapısının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Genel olarak, elde edilen sonuçlardan optimum sıcaklık değeri ve süresinin 50 °C'de 10 dk olduğu görülmektedir. Ayrıca yüzey aktif madde çeşitleri kendi aralarında değerlendirildiğinde artan sıcaklıkla, 5, 10 ve 15 dk inkübasyon sürelerinde en düşük karotenoid geri kazanımı T-20 ile elde edilmiştir. 5 dk inkübasyon süresi sonucunda karotenoid geri kazanımında şu şekilde bir sıra elde edilmiştir: $T-60 < T-40 < T-80$, inkübasyon süresi 10 dk olduğunda $T-40 < T-60 < T-80$, inkübasyon süresi 15 dk olduğunda ise $T-40 \approx T-60 \approx T-80$.

Strati ve Oreopoulou [79], 25 °C'deki ekstraksiyonla karşılaştırıldığında, ekstraksiyon verimi artmasına rağmen sıcaklığın 70 °C'ye çıkmasının domates atıklarından likopen ve diğer karotenoidlerde herhangi bir değişime neden olmadığını göstermiştir.

Kaur ve ark. [82] yaptıkları çalışmada en yüksek likopen geri kazanımına 50 °C'de yaptıkları çalışma ile ulaşmıştır.

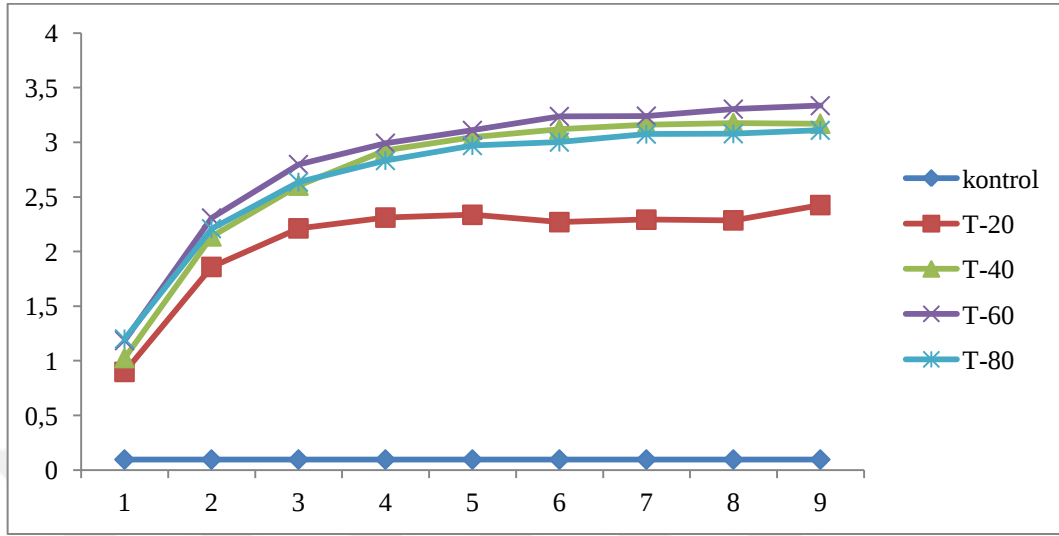
Literatürde yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi karotenoid geri kazanımı için optimum sıcaklık değerinin 50 °C olduğu söylenebilir. Fakat analiz edilecek örneğin yapısına göre bu değerlerde farklılık olması muhtemeldir.

4.4. Farklı Dispersiyon Yöntemlerinin Karotenoid Kazanımına Etkisi

Portakal kabuğunda bulunan karotenoidleri ekstrakte etmek için ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan dispersiyon işlemi yüksek devirli parçalayıcı, sonikatör ve yüksek basınçlı homojenizatör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu üç farklı dispersiyon yöntemi % 0.4 oranında farklı yüzey aktif maddeler kullanılarak ayrı ayrı uygulanmıştır.

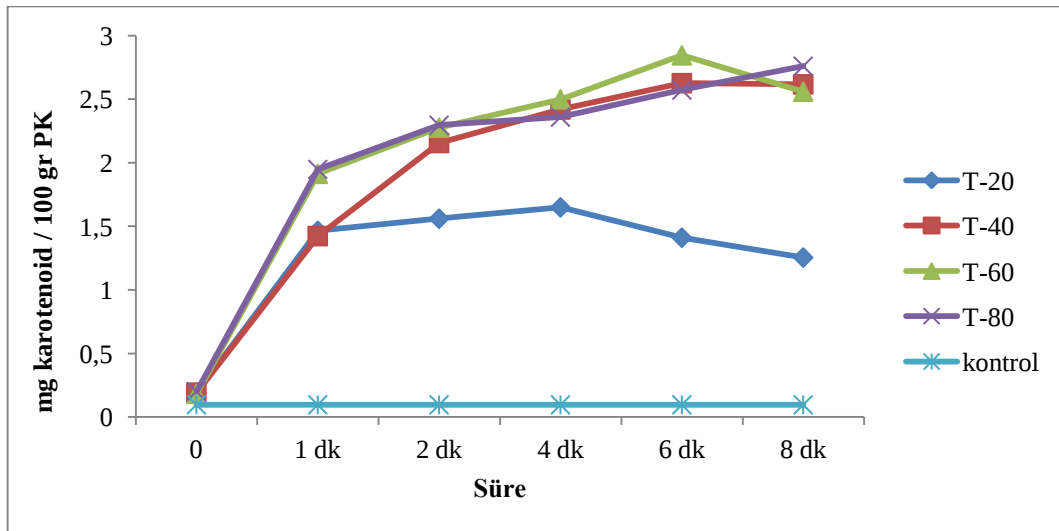
Farklı yüzey aktif madde çeşitlerinin yüksek basınçlı homojenizatör ile dispersiyonu sonucu yapılan ekstraksiyon sonuçları Şekil 4.8.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre kontrol örneklerine uygulanan dispersiyonun şiddetinin artırılmasıyla karotenoid kazanımında bir değişiklik (0.097 mg karotenoid/100 gr portakal kabuğu)

olmadığı görülmektedir. En düşük karotenoid kazanımı T-20 ile, en yüksek karotenoid kazanımı ise T-60 ile elde edilmiştir.



Şekil 4.8. Yüksek basınçlı homojenizasyon ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında geçiş sayısının karotenoid kazanımına etkisi

Yüksek devirli parçalayıcı ile yapılan dispersiyon sonunda elde edilen ekstraktlardaki karotenoid miktarları Şekil 4.9.'da verilmiştir. Analiz sonuçlarına göre parçalama süresi arttıkça kontrol örneklerinden karotenoid geri kazanımında herhangi bir değişiklik (0.097 mg karotenoid/100 gr portakal kabuğu) olmamıştır. En düşük karotenoid kazanımı T-20; en yüksek karotenoid geri kazanımı T-80 ve T-60 ile elde edilmiştir.

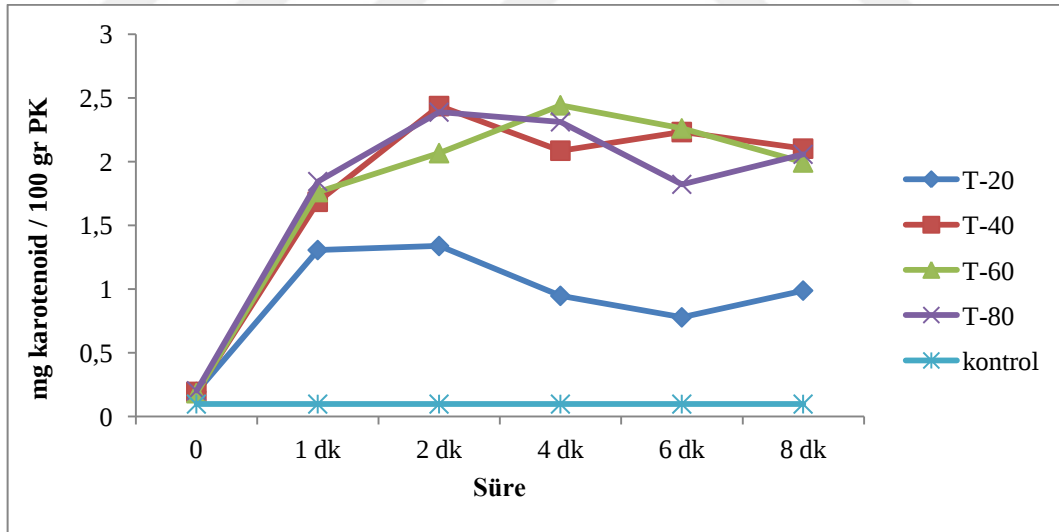


Şekil 4.9. Yüksek devirli parçalayıcı ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında parçalama süresinin karotenoid kazanımına etkisi

Şekil 4.10.'da sabit frekans değerinde farklı sürelerde sonikatör ile yapılan dispersiyon sonucunda ölçülen karotenoid miktarları verilmiştir. Kontrol örneklerinden karotenoid geri kazanımı (0.097 mg karotenoid/100 gr portakal kabuğu) diğer dispersiyon metotlarında olduğu gibi zamanla bir değişim göstermemektedir. En düşük karotenoid geri kazanımına T-20 ile ulaşılmıştır. Dispersiyon süresi arttıkça karotenoid geri kazanımında görülen nispi azalmanın yüksek frekanslı ses dalgaları etkisiyle oluşan ısıdan kaynaklandığı ve bununla karotenoid kaybına neden olduğu düşünülmektedir.

Mısırdaki etanol kullanılarak β -karoten, lutein, zeaksantin analizinin yapıldığı bir çalışmada ultrases destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Bu çalışma sonuçlarına göre 12 dk ultrases yardımıyla karotenoidlerin ekstraksiyon konsantrasyonunun ultrases uygulanmadan yapılanlara göre 3.6 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir [59].

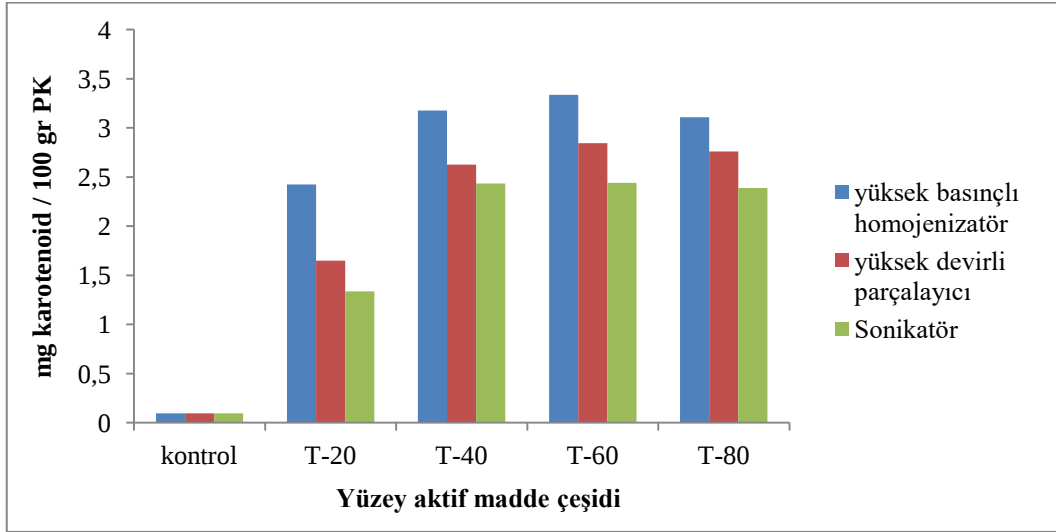
Portakal kabuğunda bulunan karotenoidlerin belirlenmesi ve ekstraksiyonu için geliştirilen bir yöntemle yapılan bir çalışmada ise, konvansiyonel ekstraksiyon metotlarına göre ekstraksiyonun daha kısa sürede gerçekleştiği belirlenmiştir [60]. Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi ultrases uygulaması ekstraksiyon verimini artırmaktadır.



Şekil 4.10. Sonikatör ile yapılan ekstraksiyon işleminde farklı yüzey aktif maddeler varlığında sonikasyon süresinin karotenoid kazanımına etkisi

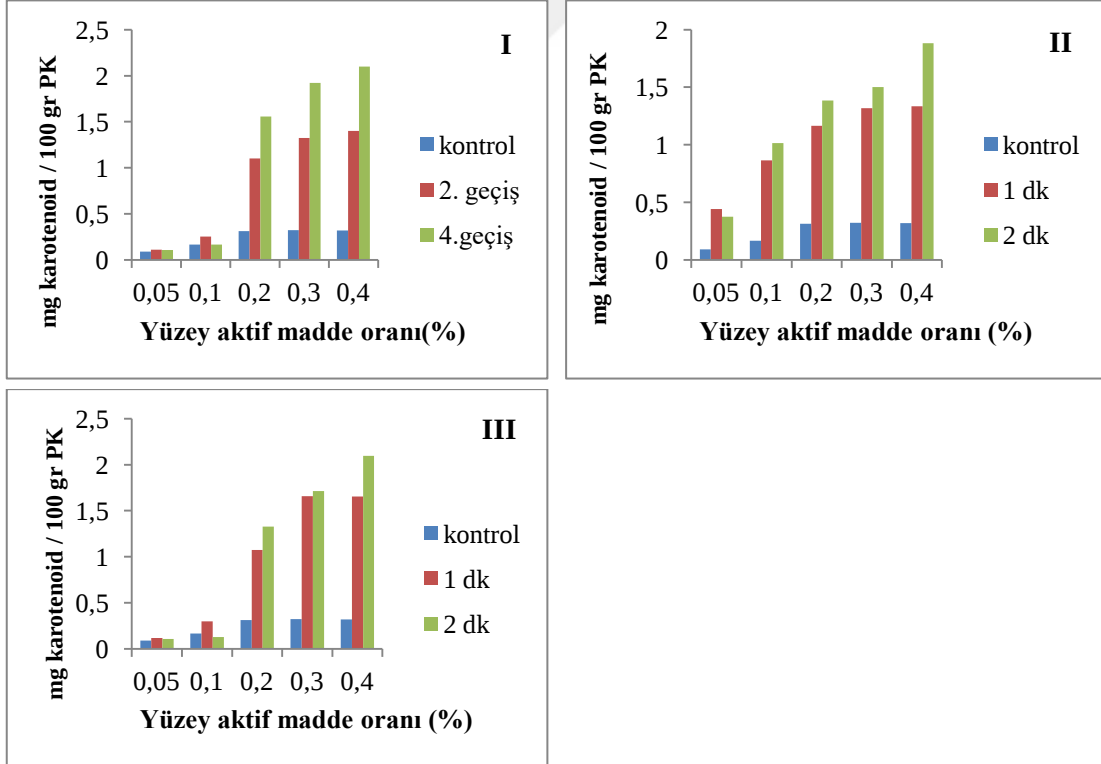
Şekil 4.11.'de bu üç dispersiyon yöntemi sonucunda elde edilen karotenoid geri kazanımları her bir yüzey aktif madde çeşidi (% 0.4 oranında) için karşılaştırılmıştır. En yüksek karotenoid geri kazanımına yüksek basınçlı homojenizatör kullanılarak

ulaşılmıştır. Bunu sırası ile yüksek devirli parçalayıcı ve sonikatör izlemektedir. Literatürde bu üç dispersiyon yönteminin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.



Şekil 4.11. Dispersiyon yöntemlerinin karotenoid geri kazanımı bakımından karşılaştırılması

T-80'den % 0.05-0.4 oranında kullanılarak uygulanan bu üç yöntemin Şekil 4.12.'de verilen sonuçlarına göre, üç yöntemde de yüzey aktif madde oranı ve dispersiyon süresi-sayısı arttıkça karotenoid geri kazanımının da arttığı belirlenmiştir.



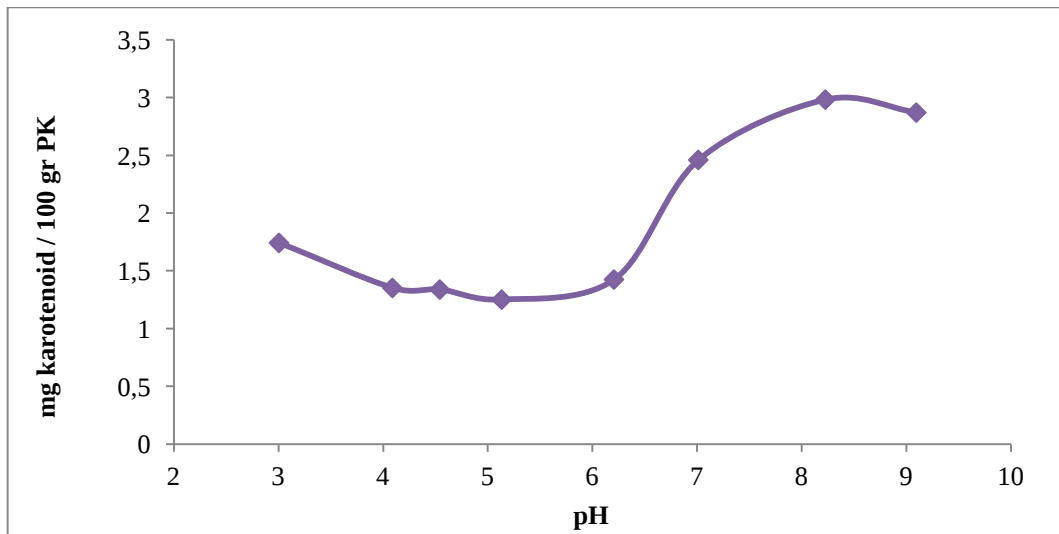
Şekil 4.12. Farklı dispersiyon yöntemlerinin farklı oranlarda yüzey aktif madde varlığında karotenoid kazanımı bakımından karşılaştırılması (Kullanılan yüzey aktif madde: T-80; **I:** Yüksek basınçlı homojenizatör **II:** Yüksek devirli parçalayıcı **III:** Sonikatör)

4.5. pH 'ın Karotenoid Kazanımına Etkisi

Farklı pH değerlerinde karotenoid kazanımında meydana gelen değişimleri belirlemek amacıyla yapılan analizler sonucunda; Şekil 4.13.'te görüldüğü gibi başlangıç örneğine göre (pH 4.5) pH azaldıkça karotenoid kazanımında öncelikle bir azalmanın olduğu fakat pH arttıkça karotenoid kazanımının arttığı ve pH 8'de en yüksek değere ulaştığı ölçülmüştür. Ekstraksiyon işlemi sırasında uygulanan yüksek devirli parçalayıcıda homojenizasyon işlemi sırasında pH arttıkça köpük oluşumunun arttığı, pH 6'da ekstraktın filtreden geçirilmesi işleminin oldukça zor olduğu, elde edilen ekstraktın renginin artan pH değerine bağlı olarak koyulaştığı ve faz ayrımı zorlaştığından santrifüj süresinin belirlenen süreden biraz daha uzun olması gerektiği gözlenmiştir.

pH'da meydana gelen bu değişikliklere bağlı olarak karotenoid geri kazanımında da değişikliklerin görülmesinin, portakal kabuklarının hücre duvarının yapısında bulunan proteinlerin konformasyon değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

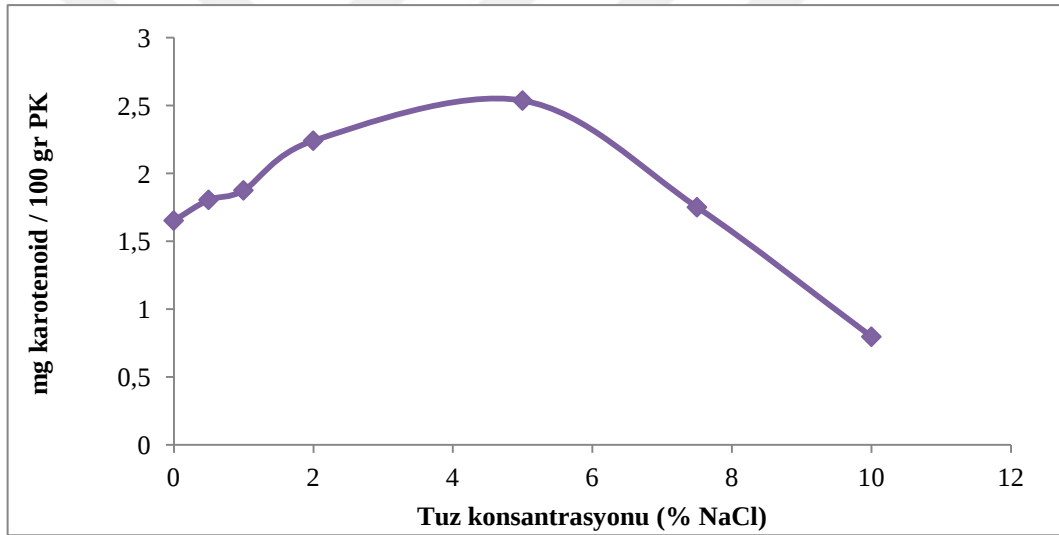
Mikroemülsiyon tekniği kullanılarak endüstriyel domates atıklarından likopen ekstraksiyonunun artırılması için yapılan bir çalışmada; likopen geri kazanımı üzerine pH'ın etkisi incelendiğinde en yüksek geri kazanımın pH 4,5'de olduğu ve bu değerden sonra belirgin bir azalmanın olduğu görülmüştür [52]. Bu çalışma ile portakal kabuğunda yapmış olduğumuz çalışma sonuçlarını incelediğimizde ortaya çıkan bu farklılığın nedeninin örneklerin asitliğinin ve matriks yapısının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.13. Karotenoid kazanımı üzerine pH 'ın etkisi

4.6. Tuz Konsantrasyonunun Karotenoid Kazanımına Etkisi

Karotenoid kazanımı üzerine NaCl'nin etkisini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonucuna göre, Şekil 4.14.'te de görüldüğü gibi örneğe eklenen tuz konsantrasyonu arttıkça karotenoid geri kazanımı da artmıştır. En yüksek karotenoid geri kazanımına % 5 NaCl kullanıldığı durumda ulaşılmıştır. Bu değerden sonra ise artan miktarda NaCl kullanımına bağlı olarak karotenoid geri kazanımının azaldığı belirlenmiştir. Örneğe eklenen NaCl'nin analizde kullanılan T-80'in çözünürlüğünü daha da artırdığı ve misel oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Belli bir noktadan sonra karotenoid geri kazanımında görülen azalmanın ise fazlar arasında artan polaritenin misel oluşumunu olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Literatürde bu yönde yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

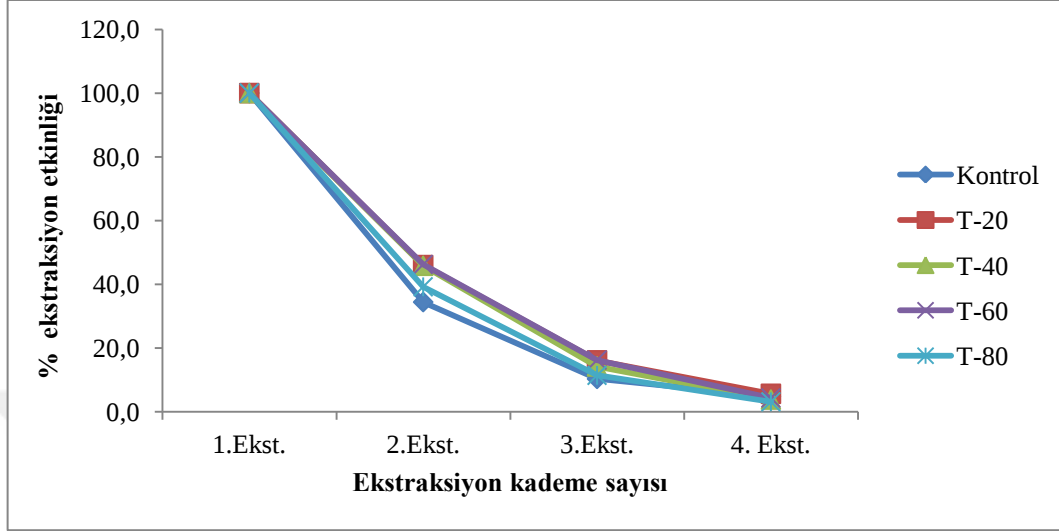


Şekil 4.14. Karotenoid kazanımı üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi

4.7. Ekstraksiyon Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Yüzey aktif madde destekli ekstraksiyonla kaç kademede karotenoidlerin alınabildiği ve seçilen bu metot ile bu karotenoidlerin ne kadarının alınabildiğini belirlemek amacıyla art arda 4 kademeli ekstraksiyon işlemi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre karotenoidlerin Şekil 4.15.'te gösterildiği gibi tamamına yakınının alınabildiği belirlenmiştir. Yüzey aktif madde destekli ekstraksiyondan sonra kalan posadaki karotenoidler THF ile alınmış ve toplam karotenoid miktarından bu değerler

ıkarılarak yüzey aktif madde destekli ekstraksiyon yoluyla alınabilen toplam karotenoid miktarları ekil 4.16.'daki gibi hesaplanmıştır. Bu sonuçlardan T-20'nin karotenoid geri kazanımında en düşük kapasiteye sahip olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15. Ardışık ekstraksiyonlarda karotenoid kazanımının göreceli değişimi



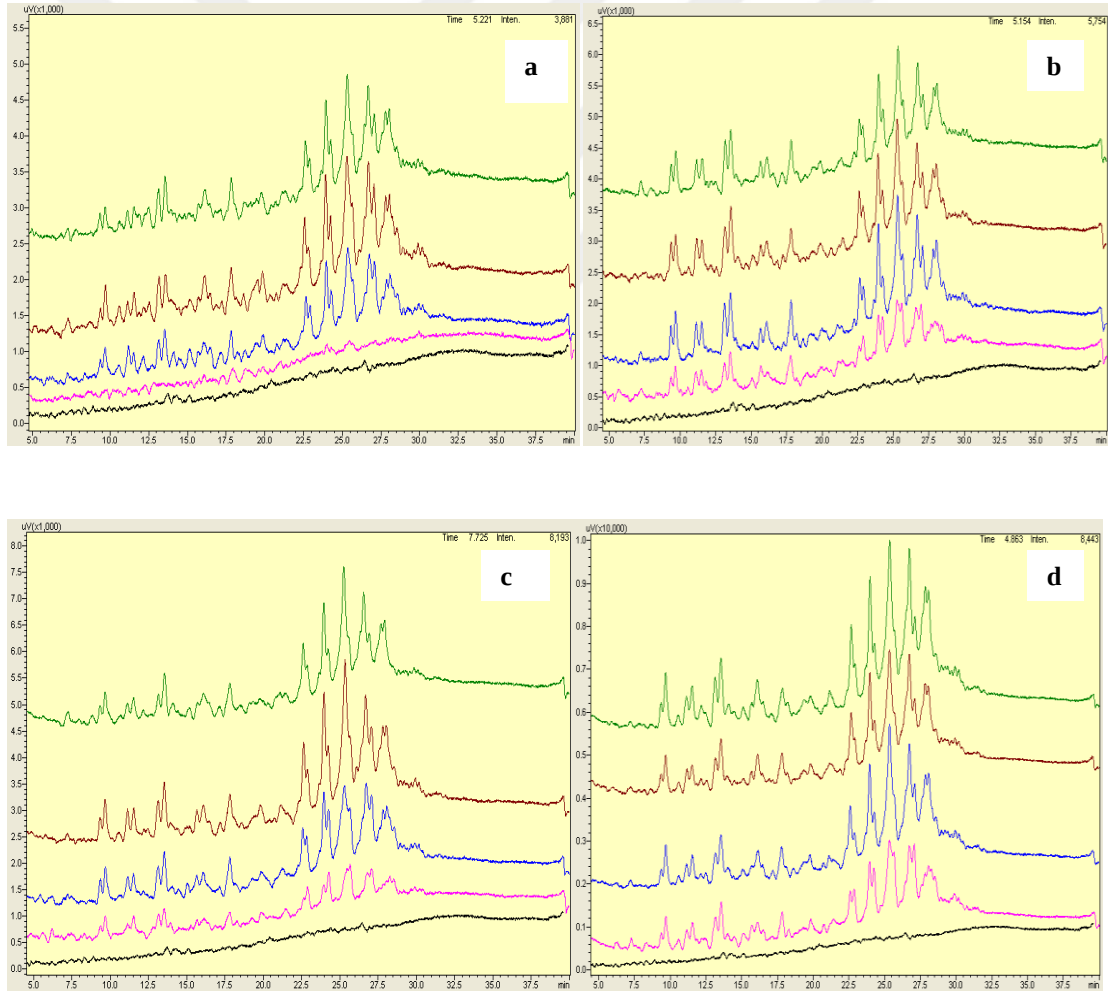
Şekil 4.16. Yüzey aktif madde çeşidine göre alınabilen toplam karotenoid miktarı

4.8. HPLC Sonuçları

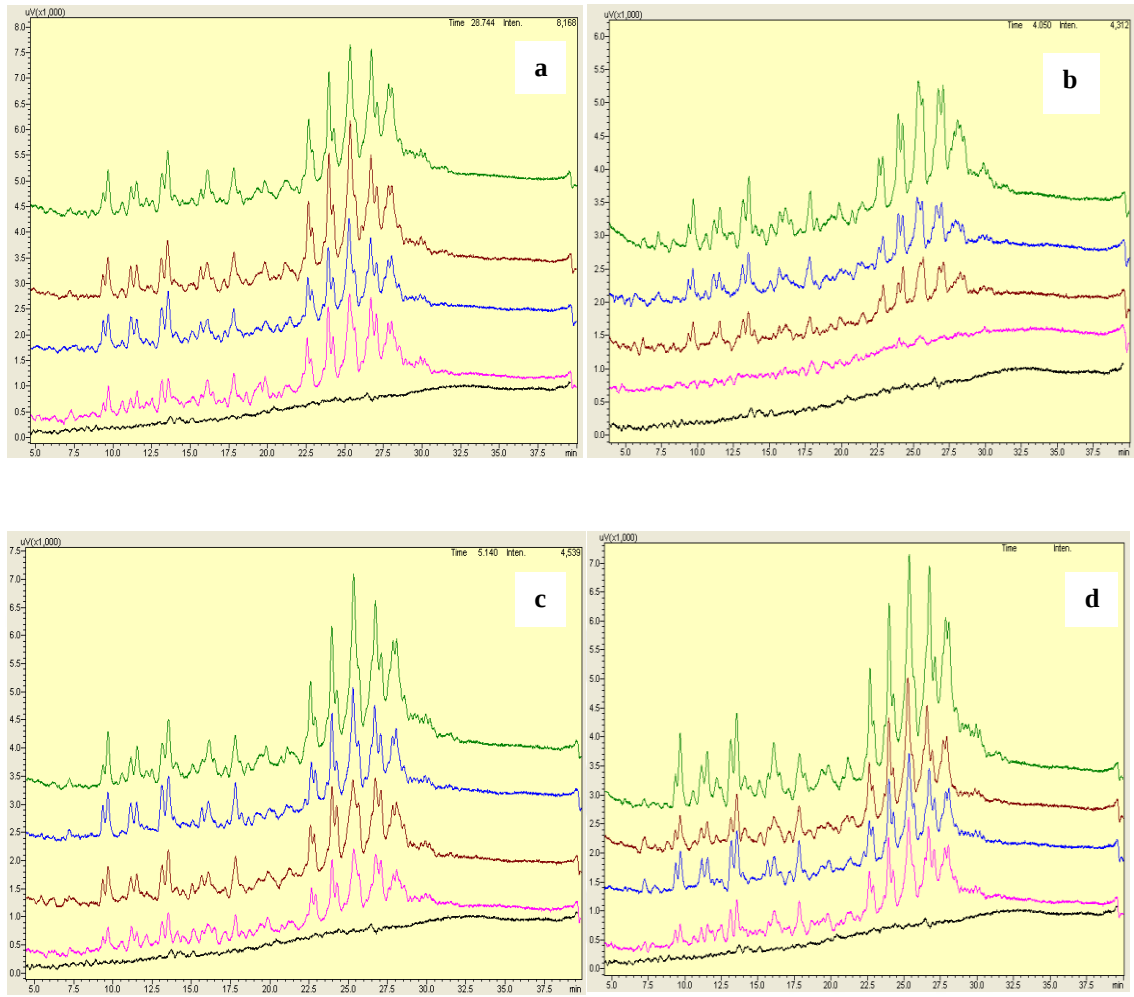
Portakal kabuğu rneklerinin HPLC kromatogramlarından elde edilen verilere göre, ekstraksiyon işleminde kullanılan yüzey aktif madde oranı arttıkça daha net pik şekillerinin olduğu ve en yüksek pik değerinin % 0.4 oranında yüzey aktif madde

kullanıldığı durumda ölçüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca T-60 ve T-80 kullanıldığı durumda en yüksek pik değerine ulaşıldığı, bunu sırası ile T-40 ve T-20'nin takip ettiği belirlenmiştir. HPLC ile elde edilen analiz sonuçları (Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.) spektrofotometre ile yapılan elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

Analiz sonuçları; Şekil 4.17.'de kontrol örneği (siyah diyagram), T-20 (pembe), T-40 (mavi), T-60 (kahverengi) ve T-80'den (yeşil) a) % 0.1 b) % 0.2 c) % 0.3 ve d) % 0.4 oranında kullanılarak elde edilen ekstraktların HPLC diyagramları şeklinde verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.18.'de farklı oranlarda yüzey aktif maddelerden, kontrol örneği (siyah diyagram), % 0.1 (pembe), % 0.2 (mavi), % 0.3 (kahverengi) ve % 0.4 (yeşil) oranında kullanılarak elde edilen ekstraktların HPLC diyagramları a) T-20 b) T-40 c) T-60 ve d) T-80 için verilmiştir.



Şekil 4.17. Kontrol örneği (siyah diyagram), T-20 (pembe), T-40 (mavi), T-60 (kahverengi) ve T-80'den (yeşil) a) % 0.1 b) % 0.2 c) % 0.3 ve d) % 0.4 oranında kullanılarak elde edilen ekstraktların HPLC diyagramları

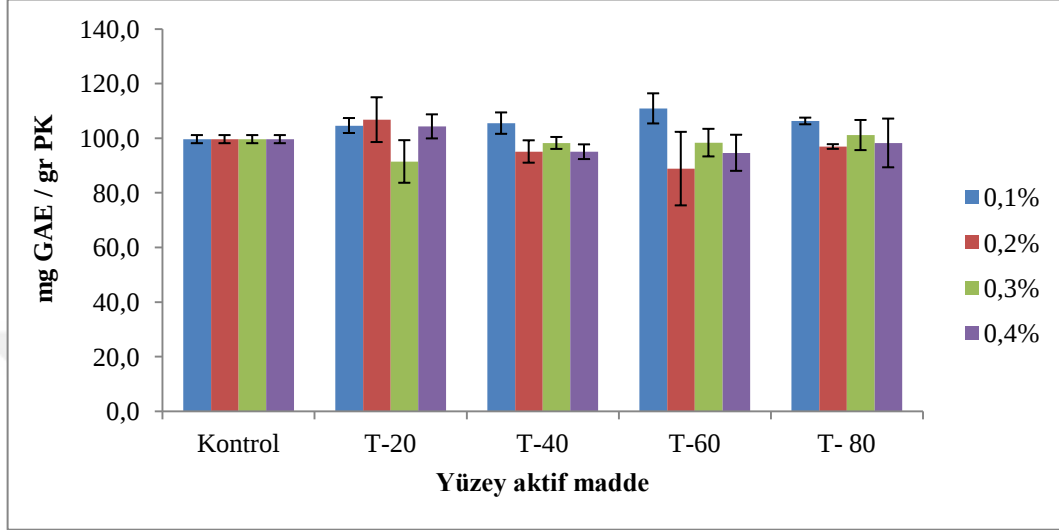


Şekil 4.18. Kontrol örneği (siyah diyagram), % 0.1 (pembe), % 0.2 (mavi), % 0.3 (kahverengi) ve % 0.4 (yeşil) oranında kullanılarak elde edilen ektstraktların **a) T-20 b) T-40 c) T-60 ve d) T-80** için HPLC diyagramları

4.9. Toplam Fenolik Madde Analizi Sonuçları

Portakal kabuğu ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarını belirlemek için Folin & Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonuçları mg Gallik asit eşdeğeri/gr portakal kabuğu olarak ifade edilmiştir. SPSS One Way ANOVA ($p < 0.05$) istatistik sonuçlarına göre; farklı yüzey aktif madde türlerinden % 0.1 oranında kullanıldığında elde edilen toplam fenolik madde miktarları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Analiz sonuçlarına göre fenolik madde miktarı yüzey aktif madde türlerine göre $T-20 < \text{kontrol} < T-40 < T-80 < T-60$ şeklinde sıralanmıştır. Yüzey aktif madde oranı % 0.2 olduğunda en yüksek fenolik madde miktarı T-20 ile elde edilmiştir. Fakat kontrol, T-80 ve T-40 arasında anlamlı bir farklılık görülmezken, T-60 ile ulaşılan analiz sonuçlarında belirgin bir farklılık görülmüştür. Yüzey aktif madde oranı % 0.3 ve

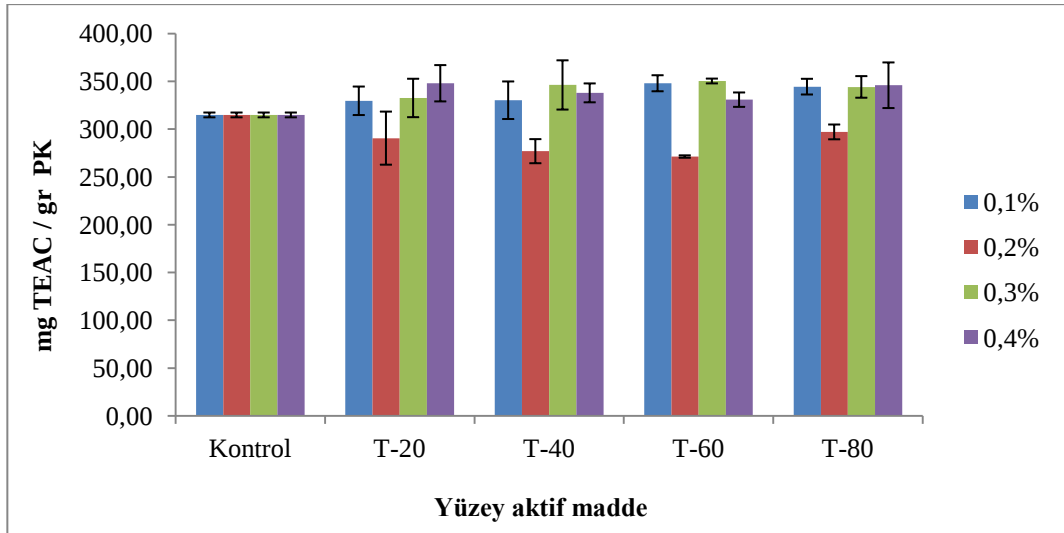
% 0.4 olduğunda da analiz sonuçları arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Analiz sonuçlarına göre fenolik madde miktarı yüzey aktif madde türlerine göre % 0.3 oranı için T-20 < T-40 < T-60 < kontrol < T-80 şeklinde; % 0.4 için kontrol < T-60 < T-40 < T-80 < T-20 şeklinde sıralanmıştır. İstatistik analiz sonuçları EK-1'de verilmiştir.



Şekil 4.19. Portakal kabuğu ekstraktının toplam fenolik madde içeriği üzerine yüzey aktif madde çeşit ve miktarının etkisi

4.10. Antioksidan Aktivite Analizi Sonuçları

Portakal kabuğunun antioksidan içeriğini belirlemek amacıyla ABTS antioksidan aktivite tayin yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar mg Trolox eşdeğeri olarak ifade edilmiştir. SPSS One Way ANOVA ($p < 0.05$) istatistik sonuçlarına göre; yüzey aktif madde oranlarına göre gruplar kendi içerisinde antioksidan aktivite bakımından anlamlı düzeyde bir farklılık göstermemiştir. Fakat gruplar arasında bir değerlendirme yapıldığında en düşük antioksidan aktivite % 0.2 oranında yüzey aktif madde kullanıldığı durumda görülmüştür. İstatistik analiz sonuçları EK-2'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Portakal kabuğu ekstraktının antioksidan aktivitesi üzerine yüzey aktif madde çeşit ve miktarının etkisi

Gerek toplam fenolik madde miktarı gerekse de antioksidan aktivite analizi sonuçları, karotenoid kazanımının artmasının antioksidan parametre üzerinde belirgin bir katkısının olmadığını göstermiştir. Nitekim portakal kabuğu, özellikle naringin, hesperidin gibi fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir ve yüzey aktif madde bulunması, bu fenolik bileşiklerin su ile ekstraksiyonunda herhangi bir avantaj sağlamadığı anlaşılmaktadır.

5. SONUÇ

Portakal dünyada ve ülkemizde oldukça büyük miktarlarda üretilen bir meyvedir. Bu meyvenin endüstriyel olarak işlenmesi sonucu oluşan kabuklar çevre açısından büyük bir önem taşımaktadır. Değerli pigmentler içeren bu atıkların değerlendirilmesi amacıyla birçok teknik geliştirilmektedir. Bu çalışma kapsamında da toksik organik solventler kullanılmadan, portakal kabuğunda bulunan karotenoidlerin farklı dispersiyon yöntemleri kullanılarak katı matriksten parçalanarak serbest kalması sağlanmıştır. Ardından katı matriksten açığa çıkan karotenoidlerin, yüzey aktif maddeler tarafından oluşturulan miseller içine alınması sağlanmıştır. Bu sistem ile hem toksik olmayan ucuz bir çözücü olan suyun kullanılması hem de gıdalarda kullanım açısından herhangi bir tehlike oluşturmeyen yüzey aktif maddelerin (polisorbat) kullanılması büyük avantajlar sağlamaktadır.

Sıvılaştırıcı enzim kullanımının karotenoid kazanımında ciddi bir oranda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Portakal kabuğu yapı itibariyle pektin açısından zengin bir materyal olduğundan kullanılan sıvılaştırıcı enzim karışımının (pektinaz ve selülaz), pektini parçalamasıyla çok miktarda pektin kalıntıları mikroemülsiyon içerisinde bulunmaktadır. Mikroemülsiyon içerisinde bulunan bu kalıntıların, hücrelerin parçalanmasıyla açığa çıkmış olan karotenoidlerin etrafını sararak bir anlamda enkapsüle ettiği ve katı matriksten ayrılmasını zorlaştırdığı tahmin edilmektedir. Sonuç olarak bu durumun karotenoid geri kazanımı üzerinde herhangi bir artışa neden olmadığı tam tersine karotenoid geri kazanımını azalttığı görülmüştür.

Karotenoid kazanımı üzerine kullanılan yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin etkisini belirlemek amacıyla, farklı HLB değerlerine sahip yüzey aktif maddelerden farklı oranlarda kullanılmıştır. T-80'nin farklı oranları ile yapılan analiz sonuçlarına göre % 0.4 oranında yüzey aktif madde kullanılması durumunda karotenoid kazanımında en yüksek değere ulaşıldığı belirlenmiştir. Ayrıca farklı oranlarda yüzey aktif maddeler kullanılarak yapılan ekstraksiyonlar sonucunda, kontrol örneğine kıyasla en yüksek karotenoid kazanımı T-60 (HLB değeri 14.9) ve T-80 (HLB değeri 15.0) kullanıldığı durumlarda ölçülmüştür. T-20'nin (HLB değeri 16.7) her analizde diğer yüzey aktif maddelere oranla daha düşük bir aktivite gösterdiği görülmüştür. Portakal kabuğunda polar yapıda olan ksantofil grubu karotenoidler oldukça fazla sayıdadır.

Su ile ekstraksiyonda parçalama ile açığa çıkan bu karotenoidlerin su içerisinde dağılması sudaki çözünürlüğü yüksek olan yüzey aktif maddelerle sağlanabilir. Polisorbatların yapılarında bulunan uzun polioksietilen zincirlerinden dolayı sudaki çözünürlükleri oldukça iyidir. Bu durum portakal kabuğunda bulunan karotenoidlerin suda miseller içine alınarak dağılımını kolaylaştırdığından karotenoid kazanımını artırdığı düşünülmektedir. T-20'nin sudaki çözünürlüğü daha iyi olmasına rağmen daha düşük bir etkinlik göstermesi yapısında bulunan yağ asidi ester türünden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ekstraksiyon öncesi uygulanan ısıtma işleminin karotenoid kazanımına etkisinin incelendiği çalışmadan elde edilen analiz sonuçlarına göre; karotenoid geri kazanımının ılımlı sıcaklık değerlerinde arttığı, sıcaklık değeri ve uygulama süresi arttıkça karotenoid kazanımında azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca yüzey aktif madde çeşitleri kendi aralarında değerlendirildiğinde artan sıcaklıkla, 5, 10 ve 15 dk inkübasyon sürelerinde en düşük karotenoid geri kazanımı T-20 ile elde edilmiştir. Portakal kabukları üzerinde yapılmış olan bu analizlerde artan sıcaklık ve süreye bağlı olarak karotenoid geri kazanımında görülen azalmanın, karotenoidlerin yapısının bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Genel olarak, elde edilen sonuçlardan optimum sıcaklık değeri ve süresinin 50 °C'de 10 dk olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Portakal kabukları yapı itibarıyla ksantofil grubu karotenoidleri çok fazla miktarda içerdiğinden 70 °C'nin ksantofil grubu karotenoidler için kritik bir sıcaklık olup olmadığı merak edilen sorular arasındadır.

Farklı dispersiyon yöntemleri kullanılarak yapılan ekstraksiyonlarda, en iyi karotenoid kazanımı yüksek basınçlı homojenizatör ile yapılan çalışmalardan alınmıştır. Bunu sırası ile yüksek devirli parçalayıcı ve sonikatör takip etmiştir. Bu üç dispersiyon yöntemiyle yapılan ekstraksiyondan elde edilen en düşük karotenoid geri kazanımı T-20 ile elde edilmiştir. Karotenoid geri kazanımı kontrol örneğine göre kullanılan yüzey aktif madde ve dispersiyon sayısı-süresi arttıkça bu üç yöntemde de artmıştır. Bu üç yöntem kullanılarak elde edilen ekstraktların parçacık büyüklüğü ölçülerek emülsiyon oluşumu üzerine parçacık büyüklüğünün etkisi ve kullanılan yüzey aktif maddenin etkisi araştırma konusu olarak incelenebilir.

pH'nin karotenoid kazanımına etkisini belirlemek amacıyla, portakal kabuğu örnekleri farklı pH değerlerine ayarlanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Başlangıç örneğine göre (pH 4.5) pH azaldıkça karotenoid kazanımında öncelikle bir azalmanın olduğu fakat pH arttıkça karotenoid kazanımının arttığı ve pH 8'in üzerindeki pH'larda en yüksek değere ulaştığı ölçülmüştür. pH 8'den sonra ise karotenoid geri kazanımının azaldığı belirlenmiştir. pH'da meydana gelen bu değişikliklere bağlı olarak karotenoid geri kazanımında da değişikliklerin görülmesinin, portakal kabuklarının hücre duvarının yapısında bulunan proteinlerin konformasyon değiştirmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tuz konsantrasyonunun karotenoid kazanımına etkisinin araştırıldığı çalışmada, en yüksek karotenoid geri kazanımına % 5 NaCl kullanıldığı durumda ulaşılmıştır. Örneğe eklenen NaCl konsantrasyonu % 5'in üzerine çıkarıldığında ise karotenoid geri kazanımının azaldığı belirlenmiştir. Örneğe eklenen NaCl'nin analizde kullanılan T-80'in sudaki çözünürlüğünü daha da artırdığı ve misel oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Belli bir noktadan sonra karotenoid geri kazanımında görülen azalmanın ise fazlar arasında artan polaritenin misel oluşumunu olumsuz yönde etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yüzey aktif madde destekli ekstraksiyonla kaç kademede karotenoidlerin alınabildiği ve seçilen bu metot ile bu karotenoidlerin ne kadarının alınabildiğini belirlemek amacıyla yapılan analizler sonucunda, art arda 4 kademeli ekstraksiyon ile karotenoidlerin tamamına yakınının alınabildiği belirlenmiştir. Kullanılan yüzey aktif maddeler içerisinde en yüksek geri kazanımının Tween-40 ile en düşük geri kazanımın ise Tween-20 ile sağlandığı belirlenmiştir.

Portakal kabuklarının toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan kapasitesinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları, yüzey aktif madde miktar ve çeşidinin toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite üzerine herhangi bir katkısının olmadığını göstermiştir.

Portakal kabuğu örneklerine uygulanan HPLC analizi sonuçlarına göre yüzey aktif madde oranı arttıkça daha net pik şekillerinin oluştuğu ve en yüksek pik değerinin % 0.4 oranında yüzey aktif madde kullanıldığı durumda ölçüldüğü belirlenmiştir. HPLC ile elde edilen analiz sonuçlarının spektrofotometre ile elde edilen sonuçları destekler nitelikte olduğu belirlenmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Fernàndez-García, E. (2012). *Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities*. **Food Research International**. 46, 438-450.
- [2] Bartley, G. E., Scolnik, P. (1995). *Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health*. **The Plant cell**. 7(7), 1027-1038.
- [3] Kopsell, D.A., Kopsell, D.E. (2006). *Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops*. **Trends in Plant Science**. 11(10), 499-507.
- [4] Arvayo-Enríquez, H., Mondaca-Fernández, I., Gortáez-Moroyoqui, P., López-Cervantes, J., Rodríguez-Ramírez, R. (2013). *Carotenoids extraction and quantification: a review*. **Analytical Methods**. 5(12), 2916.
- [5] Sawalha, S.M.S. (2009). *Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS*. **Food Chemistry**. 116(2), 567-574.
- [6] Chedea, V. S., Kefalas, P., Socaciu, C. (2010). *Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel wastes (Valencia and Navel var.)*. **Journal of Food Biochemistry**. 34(1), 101–110.
- [7] 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.
- [8] Rodriguez, D. (2001). *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods*. **Life Sciences**.(64).
- [9] Sowmya, R. (2015). *Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects A review*. **Trends in Food Science & Technology**. 45(1), 105–117.
- [10] Farré, G. (2010). *Travel advice on the road to carotenoids in plants*. **Plant Science**. 179(1-2), 28-48.
- [11] Shahidi, F., Zhong, Y. (2015). *Measurement of antioxidant activity*. **Journal of Functional Foods** ,18, 757-781.
- [12] Paiva, S. a, Russell, R. M. (1999). *Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants*. **Journal of the American College of Nutrition**, 18(5), 426-433.
- [13] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. **LWT - Food Science and Technology**, 28(1), 25-30.

- [14] Kim, D. O., Lee, K. W., Lee, H. J., Lee, C. Y. (2002). *Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(13), 3713-3717.
- [15] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., Deemer, E. K. (2002). *Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(11), 3122-3128.
- [16] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9-10), 1231-1237.
- [17] Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins Byrne, D. (2006). *Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts*. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 669-675.
- [18] Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., Van Den Berg, H., Bast, A. (1999). *Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures*. **Food Chemistry**, 66(4), 511-517.
- [19] Floegel, A., Kim, D., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, K.O. (2011), *Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods*, **Journal of Food Composition and Analysis**, 24, 1043-1048.
- [20] Büyüktuncel, E. (2013). *Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler*. **Marmara Pharmaceutical Journal** , 17, 93-103.
- [21] Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., Lee, C. Y. (2003). *Quantification of Polyphenolics and Their Antioxidant Capacity in Fresh Plums*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51(22), 6509-6515.
- [22] Fiedor, J., Burda, K. (2014). *Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease*. **Nutrients**. 6(2), 466-488.
- [23] Angel Siles López, J., Li, Q., Thompson, I. P. (2010). *Biorefinery of waste orange peel*. **Critical Reviews in Biotechnology**. 30(1), 63-9.
- [24] Ladaniya, M. S. (2008). *Fruit Biochemistry*. In *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*. 150, 193-197.

- [25] Rivas, B. (2008). *Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(7), 2380- 2387.
- [26] Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. (2009). *Food chemistry*, **Springer Berlin Heidelberg**, (1-1070).
- [27] Markom, M., Hasan, M., Daud, W. R. W., Singh, H., Jahim, J. M. (2007). *Extraction of hydrolysable tannins from Phyllanthus niruri Linn.: Effects of solvents and extraction methods*. **Separation and Purification Technology**, 52(3), 487-496.
- [28] Mezzomo, N., Ferreira S. R. S. (2016). *Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review*. **Journal of Chemistry**, 2016(16) .
- [29] Taungbodhitham, A. K., Jones, G. P., Wahlqvist, M. L., Briggs, D. R. (1998). *Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables*. **Food Chemistry**, 63(4), 577-584.
- [30] Lin, C. H., Chen, B. H. (2003). *Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography*. **Journal of Chromatography A**, 1012(1), 103-109.
- [31] Djuikwo, V. N. D. (2011). *Determination of Major Carotenoids in Processed Tropical Leafy Vegetables Indigenous to Africa*. **Food and Nutrition Sciences**. 02(08), 793–802.
- [32] Zanfini, A., Corbini, G., La Rosa, C., Dreassi, E. (2010). *Antioxidant activity of tomato lipophilic extracts and interactions between carotenoids and α -tocopherol in synthetic mixtures*. **LWT - Food Science and Technology**, 43(1), 67–72.
- [33] Mech-Nowak, A., Świderski, A., Kruczek, M., Łuczak, I., Kostecka-Gugała, A. (2012). *Content of carotenoids in roots of seventeen cultivars of *Daucus carota* L.* **Acta Biochimica Polonica**, 59(1), 139-141.
- [34] Ndolo, V. U., Beta, T. (2013). *Distribution of carotenoids in endosperm, germ, and aleurone fractions of cereal grain kernels*. **Food Chemistry**. 139(1-4), 663–671.
- [35] Tena, M. T., Valcarcel, M., Hidalgo, P. J., Uebera, J. L. (1997). *Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: Comparison with liquid solvent sonication*. **Analytical Chemistry**. 69(3), 521–526.
- [36] Go'mez-Prieto, M.S., Caja, M.M., Herraiz, M., Santa-Mari'a, G. (2003). *Supercritical fluid extraction of all-trans-Lycopene from tomato*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 3–7.

- [37] Baysal, T., Ersus, S., Starmans, D.A.J. (2000). *Supercritical CO₂ extraction of beta-carotene and lycopene from tomato paste waste*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** .48, 5507–5511.
- [38] Gamlieli-Bonshtein, I., Korin, E., Cohen, S. (2002). *Selective separation of cis–trans geometrical isomers of -Carotene via CO₂ supercritical fluid extraction*. **Biotechnology and Bioengineering**. 80, 169–174.
- [39] Mustafa, A., Turner, C. (2011). *Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review*. **Analytica Chimica Acta** .703, 8-18.
- [40] Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., Li, Q.X. (2004). *Pressurized fluid extraction of carotenoids from Haematococcus pluvialis and Dunaliella salina and kavalactones from Piper methysticum*. **Analytica Chimica Acta**. 501(2), 175–181.
- [41] Quan, C., Turner, C. (2009). *Extraction of Astaxanthin from Shrimp Waste Using Pressurized Hot Ethanol*. **Chromatographia**, 70(1-2), 247–251.
- [42] Loranty, A. (2010). *Identification, quantification and availability of carotenoids and chlorophylls in fruit, herb and medicinal teas*. **Journal of Food Composition and Analysis**, 23(5), 432-441.
- [43] McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., Bird, A. R. (2007). *Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 8(4), 543–548.
- [44] Santana, R. C., Perrechil, F. A., Cunha, R. L. (2013). *High- and Low-Energy Emulsifications for Food Applications: A Focus on Process Parameters*. **Food Engineering Reviews**. 5(2), 107–122.
- [45] Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., Graves, S. M. (2006). *Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties*. **Journal of Physics: Condensed Matter**, 18(41), R635–R666.
- [46] Windhab, E. J., Dressler, M., Feigl, K., Fischer, P., Megias-Alguacil, D. (2005). *Emulsion processing—from single-drop deformation to design of complex processes and products*. **Chemical Engineering Science**, 60(8–9), 2101–2113.
- [47] Jafari, S. M., He, Y., Bhandari, B. (2007). *Effectiveness of encapsulating biopolymers to produce sub-micron emulsions by high energy emulsification techniques*. **Food Research International**, 40(7), 862–873.
- [48] Kralova, I., Sjoblom, J. (2009). *Surfactants Used in Food Industry : A Review*. **Journal of Dispersion Science and Technology**, 30(9), 1363-1383.

- [49] Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., McClements, D. J. (2011). *Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(11), 6247–6255.
- [50] Leser, M.E. (2006). *Self-assembly of polar food lipids*. **Advances in Colloid and Interface Science**, 123-126(SPEC. ISS.), 125-136.
- [51] Flanagan, J., Singh, H. (2006). *Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 46(3), 221–37.
- [52] Amiri-Rigi, A., Abbasi, S., Scanlon, M.G. (2016). *Enhanced lycopene extraction from tomato industrial waste using microemulsion technique: Optimization of enzymatic and ultrasound pre-treatments*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 35, 160-167.
- [53] Amiri-Rigi, A., Abbasi, S. (2016). *Microemulsion-based lycopene extraction: Effect of surfactants, co-surfactants and pretreatments*. **Food Chemistry**, 197, 1002-1007.
- [54] Papaioannou, 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.
- [55] 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.
- [56] A. Chatzilazarou, E. Katsoyannos, M. Lagopoulou, J. Tsaknis. J. Ernährung. (2011). *Application of cloud point extraction with the aid of Genapol X-080 in the pre concentration of lycopene and total carotenoids from red fleshed orange*. 35, 5–13.
- [57] Büyüktuncel, E. (2012). *Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri 1*. **Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**. 32(2), 209-242.
- [58] Demirdöven, A., Baysal, T. (2008). *The Use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation*. **Food Reviews International**, 25(1), 1-11.
- [59] Ye, J., Feng, L., Xiong, J., Xiong, Y. (2011). *Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol*. **International Journal of Food Science and Technology**, 46(10), 2131–2136.
- [60] Calle, M. M., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M. D. (2015) *Ultrasound-assisted emulsification–extraction of orange peel metabolites prior to tentative identification by LC–QTOF MS/MS*. **Talanta**, 141, 150-157.

- [61] Hiranvarachat, B., Devahastin, S. (2014). *Enhancement of microwave-assisted extraction via intermittent radiation: Extraction of carotenoids from carrot peels*. **Journal of Food Engineering**, 126, 17–26.
- [62] Ho, K. K. H. Y., Ferruzzi, M. G., Liceaga, A. M., San Martin-Gonzalez, M. F. (2015). *Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields*. **LWT-Food Science and Technology**, 62(1), 160-168.
- [63] Zuorro, A., Fidaleo, M., Lavecchia, R. (2011). *Enzyme-assisted extraction of lycopene from tomato processing waste*. **Enzyme and Microbial Technology**, 49(6-7), 567–573.
- [64] Çınar, I. (2005). *Effects of cellulase and pectinase concentrations on the colour yield of enzyme extracted plant carotenoids*. **Process Biochemistry**, 40(2), 945-949.
- [65] Choudhari, S. M., Ananthanarayan, L. (2007). *Enzyme aided extraction of lycopene from tomato tissues*. **Food Chemistry**, 102(1), 77-81.
- [66] 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.
- [67] Cuccolini, S., Aldini, A., Visai, L., Daglia, M., Ferrari, D. (2013). *Environmentally friendly lycopene purification from tomato peel waste: Enzymatic assisted aqueous extraction*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 61(8), 1646-1651.
- [68] Toprak Aktas, E., Yildiz, H. (2011). *Effects of electroporation treatment on chlorophyll and carotenoid extraction yield from spinach and tomato*. **Journal of Food Engineering**, 106(4), 339–346.
- [69] Aflakı N. (2012). *Optimization of carotenoid extraction in peel and flesh of cantaloupe (*Cucumis melo* L.) with ethanol solvent*. Yüksek lisans tezi, Laval University, Québec.
- [70] Blanco, P., Sieiro, C., Villa, T. G. (1999). *Production of pectic enzymes in yeasts*. **FEMS Microbiology Letters**, 175, 1-9.
- [71] Gailing, M.F., Guibert, A., Combes, D. (2000). *Fractional factorial designs applied to enzymatic sugar beet pulps pressing improvement*. **Bioprocess Engineering**, 22, 69-74.
- [72] Kopec, R. E., Cooperstone, J. L., Cichon, M. J., Schwartz, S. J. (2012). *Analysis Methods of Carotenoids. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*, **Wiley-Blackwell**. (105-148).
- [73] <http://medicaljournals.se/acta/content/?doi=10.1080/000155599750208040>
(Erişim Haziran 2016)

- [74] EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), *EFSA Journal* 13(7), 4152, (2015).
- [75] <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-320.pdf>
(Erişim Haziran 2016)
- [76] <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-322.pdf>.
(Erişim Haziran 2016)
- [77] <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-323.pdf>
(Erişim Haziran 2016)
- [78] <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-321.pdf>
(Erişim Haziran 2016)
- [79] Strati, I. F., Oreopoulou, V. (2011). *Effect of extraction parameters on the carotenoid recovery from tomato waste*. **International Journal of Food Science and Technology**, 46(1), 23-29.
- [80] Calvo, M. M., Dado, D., Santa-Maria, G. (2007). *Influence of extraction with ethanol or ethyl acetate on the yield of lycopene, -carotene, phytoene and phytofluene from tomato peel powder*. **European Food Research and Technology**, 224,567–571.
- [81] Shi, J., Dai, Y., Kakuda, Y., Mittal, G., Xue, S. J. (2008). *Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato puree*. **Food Control**, 19,514–520.
- [82] Kaur, D., Wani, A. A., Oberoi, D. P. S., Sogi, D. S. (2008). *Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology*. **Food Chemistry**, 108,711–718.
- [83] Melendez-Martinez, A. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007). *Review: Analysis of carotenoids in orange juice*. **Journal of Food Composition and Analysis**, 20, 638-649.
- [84] Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A., Costa, H. S. (2006). *Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review*. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, 97-111.
- [85] Rivera, S. M., Canela-Garayoa, R. (2012). *Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials*. **Journal of Chromatography A**, 1224, 1-10.
- [86] Oliver, J., Palou, A. (2000). *Chromatographic determination of carotenoids in foods*. **Journal of Chromatography A**, 881, 543-555.
- [87] Bernal, J. L., Martín, M. T., Toribio, L. (2013). *Supercritical fluid chromatography in food analysis*. **Journal of Chromatography A**, 1313, 24-36.

- [88] Wada, Y., Matsubara, A., Uchikata, T., Iwasaki, Y., Morimoto, S., Kan, K., Okura, T. (2011). *Metabolic profiling of B-cryptoxanthin and its fatty acid esters by supercritical fluid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry*. **Journal of Separation Science**, 34(24), 3546-3552.
- [89] Chen, B. H., Chen, Y. Y. (1992). *Determination of carotenoids and chlorophylls in water convolvulus (Ipomoea aquatica) by liquid chromatography*. **Food Chemistry**, 45(2), 129-134.
- [90] Belin, G. K., Gülaçar, F. O. (2007). *Separation of chlorins and carotenoids in capillary electrophoresis*. **Journal of chromatographic science**, 45, 593-9.
- [91] Yildirim, A., Mavi, A., Kara, A. A. (2001). *Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(8), 4083-4089.

7. EKLER

EK-1. Toplam Fenolik Madde İstatistik Sonuçları

Örnek 0, 1, 2, 3, 4 sırasıyla kontrol, T-20, T-40, T-60, T-80'i temsil etmektedir.

YAM 1,2,3,4 ise sırasıyla % 0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4'ü temsil etmektedir.

yam1

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1	3	104,6070	
0	3	105,4793	
2	3	105,4797	
4	3	106,2723	
3	3	110,8740	
Sig.		,063	

yam2

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
3	2	88,8200	
2	3	95,0873	95,0873
4	3	96,9120	96,9120
0	3		102,3857
1	3		106,7490
Sig.		,191	,078

yam3

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
1	3	91,4380	
2	2	98,2210	
3	2	98,3400	
0	2	100,1250	
4	3	101,1167	
Sig.		,148	

yam4

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	
0	2	90,4860	
3	3	94,6113	
2	2	95,0080	
4	2	98,2210	
1	3	104,2897	
Sig.		,064	

EK-2. Antioksidan Aktivite İstatistik Sonuçları

Örnek 0, 1, 2, 3, 4 sırasıyla kontrol, T-20, T-40, T-60, T-80'i temsil etmektedir.

YAM 1,2,3,4 ise sırasıyla % 0,1, 0,2, 0,3 ve 0,4'ü temsil etmektedir.

yam1

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	329,5783
2	3	330,1707
0	2	334,3155
4	3	344,3820
3	3	347,9347
Sig.		,159

yam2

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3	2	271,2540
2	3	276,8793
1	3	290,4980
4	3	297,0117
0	3	298,7877
Sig.		,083

yam3

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	327,8023
1	2	332,5390
4	2	344,0855
2	3	346,1580
3	2	350,3030
Sig.		,226

yam4

Duncan

örnek	N	Subset for alpha = 0.05
		1
0	3	318,9200
3	2	330,7630
2	3	337,8683
4	2	345,8620
1	3	347,9343
Sig.		,114

8. ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad : Kübra Tekelioğlu
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya / 1988
Adres : Malatya
E-Posta : kubratekelioglu@gmail.com
Lisans : İnönü Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

