

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**STEVİA EKSTRAKSİYONUNDA SANTRİFÜJ KUVVETİNİN STEVİOL
GLİKOZİTLERİN DİFÜZYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**STEVİA EKSTRAKSİYONUNDA SANTRİFÜJ KUVVETİNİN STEVİOL
GLİKOZİTLERİN DİFÜZYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**STEVİA EKSTRAKSİYONUNDA SANTRİFÜJ KUVVETİNİN STEVİOL
GLİKOZİTLERİN DİFÜZYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2021

ANTALYA

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından FDK-2018-4213 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**

**STEVİA EKSTRAKSİYONUNDA SANTRİFÜJ KUVVETİNİN STEVİOL
GLİKOZİTLERİN DİFÜZYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 25/08/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)
Prof. Dr. Ayhan TOPUZ
Prof. Dr. Kenan TURGUT
Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM
Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖZET

STEVİA EKSTRAKSİYONUNDA SANTRİFÜJ KUVVETİNİN STEVİOL GLİKOZİTLERİN DİFÜZYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

Doktora, Gıda Mühendisliği

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Ağustos 2021; 111 sayfa

Tatlandırıcılar günlük hayatta kullanılan şekerlerin yerini almak üzere üretilen genellikle aynı miktarda şekerden daha tatlı olan ve daha az enerji içeren yapay veya doğal maddelerdir. Birçok tatlandırıcının yüksek düzeyde tüketilmesi bazı olumsuz sağlık etkilerine neden olmaktadır. Bu nedenle alternatif kaynaklara ihtiyaç duyulmuştur. Son yıllarda gıda maddelerinin üretiminde yapay tatlandırıcılar ve şeker alkollere alternatif olarak doğal tatlandırıcıların kullanılma eğilimi artmaktadır. Birçok gelişmiş ülkede "yeşil altın" olarak kabul edilen ve şeker otu olarak bilinen stevia bitkisinden (*Stevia rebaudiana* B.) üretilen doğal tatlandırıcıların şeker hastalığı (diyabet) ve obezite gibi kronik hastalıkların önlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Steviol glikozitler sakarozdan 200-300 kat daha tatlıdır ve insan sağlığı üzerinde hiçbir olumsuz etkisi kanıtlanmamış olmakla birlikte kalorik değeri sıfır (0) kabul edilmektedir. Ayrıca stevia bitkisi steviol glikozitler dışında olumlu sağlık etkileri olan fenolik bileşikler gibi biyoaktif antioksidanlara da sahiptir.

Endüstriyel üretimde steviol glikozitlerin ekstraksiyon aşamasını çeşitli saflaştırma aşamaları takip etmektedir. Bitkisel kaynaklardan besin değeri taşıyan bileşiklerin izole edilmesi için geleneksel yöntemler kullanılmaktadır. Bunun için literatürde birçok yöntem önerilmektedir. Bu yöntemlerden bazıları CO₂ ve yardımcı çözücü olarak etanol kullanılarak süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), subkritik su ekstraksiyonu (SCW), ultrason uygulamaları, mikrodalga uygulamaları, ultrafiltrasyon ve yüksek basınçlı sıvı ekstraksiyonu (HPLC) olarak sıralanabilir. Bununla birlikte, günümüzde doğa dostu olarak bilinen sürdürülebilir ve uygulanabilir süreçler elde etme ihtiyacı hem gıda endüstrilerinin hem de gıda bilimcilerinin yeşil ekstraksiyon konseptiyle tam uyumlu yeni süreçler geliştirmesine yol açmıştır. Bu amaçla literatürde steviol glikozitlerin ekstraksiyonu ve tatlandırılmış ürünlerin üretiminde kullanımları ile ilgili devam eden birçok çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda steviol glikozitlerin (SGs) ekstraksiyonu için çevreye duyarlı yeni yaklaşımlar araştırılmıştır. Bunlar örneğin basınçlı sıcak su (PHWE), mikrodalga destekli (MAE) ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) ve yüksek performanslı ince katman kromatografisidir (HPTLC).

Bu araştırmada, stevia yapraklarından majör steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için çeşitli proses koşullarının etkisini belirlemek amacıyla çalışmalar yürütülmüştür. Üç adet ekstraksiyon parametresi kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bu faktörler; seyreltme faktörü, ekstraksiyon sıcaklığı ve santrifüj kuvveti olarak seçilmiştir. Birinci denemede çözücü olarak su ve materyal olarak yaş stevia yaprağı kullanılmıştır. Santrifüjleme için

2400, 2900 ve 3400xG seviyelerinde santrifüj kuvveti uygulanmıştır. Ekstraksiyon sıcaklığı 40, 45 ve 50°C olarak seçilmiş ve seyreltme faktörleri 5 kat, 7,5 kat ve 10 kat olarak ayarlanmıştır. İkinci denemede, çözücü olarak su ve materyal olarak kurutulmuş stevia yaprakları kullanılmıştır. Üçüncü denemede ise çözücü olarak etil alkol ve materyal olarak kurutulmuş stevia yaprağı kullanılarak önceki koşullarda denemeler gerçekleştirilmiştir. Tüm denemelerde, örnekleme koşulları Yüzey-Yanıt Metodu (YYM) kullanılarak ve beş yanıt dikkate alınarak optimize edilmiştir. Stevia ekstraktlarından en yüksek miktarda rebaudiosit A izole etmek amacıyla Box-Behnken Tasarım (BBT) yöntemi tarafından öngörülen optimum koşullar oluşturulmuştur. Buna göre seyreltme faktörü olarak 7,69 kat, santrifüj kuvveti olarak 2915xG ve ekstraksiyon sıcaklığı olarak 44,77°C uygulanmıştır. Ayrıca, kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarına, maksimum rebaudiosit A ve steviosit veriminin sağlanması için 8,44 oranında seyreltme faktörü, 3399,99xG santrifüj kuvveti ve 40°C ekstraksiyon sıcaklığı uygulanmıştır. Etanollü ekstraktlardan maksimum rebaudiosit A ve steviosit ekstraksiyonu için 3002,36xG düzeyinde santrifüj kuvveti ve 40°C ekstraksiyon sıcaklığının uygun olduğu saptanmıştır. En yüksek steviol glikozit verimine çözücü olarak su kullanılan ekstraksiyon denemelerinde ulaşılmıştır.

ANAHTAR KELİMELEER: Ekstraksiyon, Santrifüj kuvveti, *Stevia rebaudiana* B., Steviol glikozitler, Yüzey-Yanıt Metodu.

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM

Dr. Öğr. Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI

ABSTRACT

EFFECT OF CENTRIFUGAL FORCE ON THE DIFFUSION OF STEVIOL GLYCOSIDES IN STEVIA EXTRACTION

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU

Ph.D. Thesis in FOOD ENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

August 2021; 111 pages

Sweeteners are artificial or natural substances produced to replace sugars used in daily life, usually sweeter than the same amount of sugar and contain less energy. High consumption of many sweeteners causes some adverse health effects. Therefore, alternative sources were needed. In recent years, the tendency to use natural sweeteners as an alternative to artificial sweeteners and sugar alcohols has been increasing in the production of foodstuffs. It is thought that natural sweeteners produced from the stevia plant (*Stevia rebaudiana* B.), which is considered "green gold" in many developed countries and known as sugar grass, can be used in the prevention of chronic diseases such as diabetes and obesity. Steviol glycosides are 200-300 times sweeter than sucrose, and although no adverse effects on human health have been proven, their caloric value is considered zero (0). In addition, the stevia plant also has bioactive antioxidants such as phenolic compounds that have positive health effects apart from steviol glycosides.

Various purification steps follow the extraction step of steviol glycosides in industrial production. Traditional methods are used to isolate compounds with the nutritional value from plant sources. For this, many analytical methods are suggested in the literature. Some of these methods can be listed as supercritical liquid extraction (SFE), Subcritical water extraction (SCW), ultrasound applications, microwave applications, ultrafiltration, and high-pressure liquid extraction (HPLC) using CO₂ and ethanol as co-solvent. However, the need to obtain sustainable and viable processes, which are now known as eco-friendly, has led both food industries and food scientists to develop new processes that are fully compatible with the concept of green extraction. For this purpose, there are many ongoing studies on the extraction of steviol glycosides and their use in the production of sweetened products. Recently, new environmentally sound approaches have been investigated for the extraction of steviol glycosides (SGs). These are, for example, pressurized hot water (PHWE), microwave-assisted extraction (MAE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and high-performance Thin-layer chromatography (HPTLC).

In this research, studies were carried out to determine the effect of various process conditions for the extraction of major steviol glycosides from stevia leaves. Experiments were made using three extraction parameters. These factors are; dilution factor, extraction temperature, and centrifugal force were chosen. Water was used as a solvent in the first experiment, and fresh stevia leaf was used as a material. Centrifugal force was applied at

2400, 2900, and 3400xG levels for centrifugation. The extraction temperature was chosen as 40, 45, and 50°C, and the dilution factors were set as 5 fold, 7,5 fold, and 10 fold. In the second experiment, water as a solvent and dried stevia leaves were used as material. In the third experiment, the study was carried out in previous conditions using ethyl alcohol as a solvent and dried stevia leaf as material. In all trials, sampling conditions were optimized using the surface response method and considering five responses. In order to isolate the highest amount of rebaudioside A from stevia extracts, the optimum conditions predicted by the Box-Behnken Design (BBT) method were established. Accordingly, a dilution factor of 7,69 times, a centrifugal force of 2915xG, and an extraction temperature of 44,77°C were applied. In addition, 8,44 dilution factor, 3399,99xG centrifugal force, and 40°C extraction temperature were applied to the aqueous extracts of the dried stevia leaf to extract maximum rebaudioside A and stevioside yield. It was determined that 3002.36xG centrifugal force and 40°C extraction temperature were suitable for maximum rebaudioside A and stevioside extraction from ethanolic extracts. The highest steviol glycoside yield was achieved in extraction experiments using water as solvent.

KEYWORDS: Centrifugal force, Extraction, Response Surface Method, *Stevia rebaudiana* B, Steviol glycosides.

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM

Assist. Prof. Dr. Hatice Reyhan ÖZİYCI

ÖNSÖZ

Günümüz dünyası insan ihtiyaçlarına göre hızla değişime uğramaktadır. Bu perspektifte üreticiler, diyabet ve obezite gibi aşırı şeker tüketimiyle bağlantılı hastalıkları hafifletmek için üretimlerini daha doğal ürünlere yöneltmektedir. Steviol glikozitlerin tüketiminin de son yıllarda arttığı görülmektedir. Bir tatlandırıcı olarak stevia ürünlerinin çeşitli düzenleyici kurumlar tarafından tanımlanan dozajları ve kullanımları stevia bitkisinin artan faydalı etkileri göz önüne alındığında hala günceldir. Ayrıca çay, bisküvi, kek, meyve suyu ve diğer içecekler gibi çeşitli endüstriyel ürünlerde de kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bunun için, bu kanıtlanmış tıbbi etkilerden sorumlu bileşenleri ekstrakte etmek için çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bir tatlandırıcı olarak stevia ürünlerinin yasal kullanım sınırları güncellenmeye devam etmektedir. Bitkinin içerdiği steviol glikozitler üzerine yapılan çalışmalarda faydalı etkileri üzerinde de durulmaktadır. Glikozidik yapıdaki bu tatlı bileşikler steviol glikozitler (SGs) olarak (Steviosit, Rebaudiosit A ve benzeri steviol türevleri) tanımlanmaktadır ve faydalı biyoaktif etkileri stevia'nın değerine katkıda bulunmaktadır. Steviol glikozitlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için uygulanan tekniklerin çoğu kimyasal uygulamaları gerektiren ve maliyeti yüksek uygulamalardır. Daha düşük maliyetli ve çevreye olumsuz etkisi olmayan sulu ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi ve daha çevreci bir anlayışla üretim modellerinin ortaya konması açısından bu tez çalışmasından önemli sonuçlar çıkmıştır.

Bu tez çalışması için yaş ve kuru stevia yaprakları (Levent 93) materyal olarak kullanılmıştır. Solvent olarak saf su ve etanol kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Tez kapsamında ekstraksiyon için uygulanan dekantör ekstraksiyon modeli güvenli uygulama olarak tanımlanmaktadır ve meyve suyu endüstrisinde halihazırda kullanılan bir teknolojidir. Ekstraksiyon sıcaklığı, solvent gücü, hammaddenin taze (yaş) veya kurutulmuş olması ve solvent içinde yaprak ağırlığı gibi diğer önemli parametreler Yüzey-Yanıt Metodu (YYM) ile önceden tanımlanmış koşullar altında değerlendirilmiştir.

Öncelikle, iş birliği politikası, misafirperverliği ve benim gibi yabancı ülke vatandaşlarına kaliteli eğitim alma fırsatı sağladığı için Türkiye Cumhuriyeti'ne teşekkür ederim. Ardından bu diplomayı alma oryantasyonunda çok etkili olan, lisansüstü eğitime başladığım dönemde Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde Enstitü Müdürü olarak görev yapan Prof. Dr. Mustafa ERKAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Doktora danışmanım Prof. Dr. Mustafa KARHAN'a bu çalışmayı denetleyip yönetmeyi kabul etmekle birlikte hem profesyonel hem de kişisel olarak zorlu zamanlarda gösterdiği sabır için en derin minnettarlığımı ifade ederim. Laboratuvar çalışmalarım esnasında beni destekleyen araştırmacılar Melis YILDIZ, Ahmet HACIOĞLU ve Yüksel ALPER'e özellikle teşekkür ederim. Tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Kenan TURGUT ve Dr. Öğretim Üyesi Hatice Reyhan ÖZİYCI'ye bilimsel iş birliği için; çalışmamı değerlendirmeyi kabul eden ve bana önemli tavsiyeler veren diğer jüri üyelerine içten teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, destekleri için tüm aileme, gece gündüz her zaman büyük destek olan nişanlıma ve tez çalışması sırasında bana manevi yardımlarını ve desteklerini ifade eden tüm arkadaşlarıma en derin teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	vi
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Stevia bitkisi, Steviol Glikozitler ve Ekstraksiyonlar	3
2.1.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni bitkisi	3
2.1.1.1. Özellikleri	3
2.1.1.2. Fitokimyasallar	3
2.1.1.3. Üretim ve Pazarlama.....	5
2.1.1.4. Kullanımı	6
2.2. Steviol glikozitler	7
2.2.1. Yapıları	7
2.2.2. Tatlandırıcıların düzenlenmesi	8
2.2.3. Steviol glikozitlerin biyosentezi	9
2.3. Saf stevia bitkisinin elde edilmesi için yeşil ekstraksiyon işlemi	10
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. Deneysel Tasarım	13
3.1.2. Hammaddeler.....	13
3.1.3. Stevia Ekstraktlarının Hazırlanmasında Kullanılan Deneysel Tasarım.....	14
3.1.4. Box-Behnken yazılımının önceden tanımlanmış koşullarının kodlanması .	16
3.1.5. Ekstraksiyon İşleminin Optimizasyonu İçin Deneysel Tasarım.....	16
3.2. Metot	17
3.2.1. Elek Analizleri	17
3.2.2. Stevia yapraklarından Steviol Glikozitlerin Ekstraksiyonu.....	18
3.2.2.1. Saf Su ile Ekstraksiyon	18

3.2.2.2. Etanol ile Ekstraksiyon	19
3.2.2.3. Toplam Kuru Madde (TKM) Tayini	19
3.2.2.4. Suda Çözünen Toplam Madde (SÇM) Tayini	20
3.2.2.5. Titrasyon Asitliği (TA) ve pH tayini	21
3.2.2.6. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini	22
3.2.2.7. Antioksidan Aktivite (AA) Tayini	23
3.2.2.8. Steviol Glikozitlerin Tayini ve Miktarının Hesaplanması	24
3.2.3. İstatistiksel Analizler	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. Ön deneme	27
4.1.1. Ekstraksiyon Parametrelerinin belirlenmesi	27
4.1.2. Ön denemelerin bulguları ve tartışması	27
4.1.3. Ön denemelerinin sonuçları	30
4.2. Tez deneme sonuçları	30
4.2.1. Yaş stevia yapraklarından sulu ekstraksiyon	31
4.2.1.1. Yaş yaprak ekstraktlarının tanımlayıcı analizleri	31
4.2.1.2. Parametrelerin, sulu yaş stevia ekstraktlarından elde edilen toplam fenolik madde (TFM) üzerindeki etkisi	32
4.2.1.3. Ekstraksiyon parametrelerin yaş stevia yaprakları sulu ekstraktlarının antioksidan aktivitesi (AA) üzerine etkisi	38
4.2.1.4. Parametrelerin yaş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi	42
4.2.1.5. Stevia yaprağı sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması	43
4.2.1.6. Box-Behnken tarafından belirlenen yaş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların optimum ekstraksiyon koşulları	51
4.2.2. Kurutulmuş stevia yaprağından sulu ekstraksiyonlar	53
4.2.2.1. Kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların tanımlayıcı analiz sonuçları	53
4.2.2.2. Ekstraksiyon parametrelerinin kuru stevia yapraklarının sulu ekstraktlarında toplam fenolik madde (TFM) miktarı üzerine etkisi	53

4.2.2.3.	Parametrelerin sulu kurutulmuş stevia yaprak ekstraktlarından Antioksidan aktivitesi (AA) üzerindeki etkisi	59
4.2.2.4.	Parametrelerin kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi	63
4.2.2.5.	Kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması	64
4.2.2.6.	Box-Behnken tarafından belirlenen, Kurutulmuş stevia yapraklarından sulu ekstraktların optimum koşulları	72
4.2.3.	Kurutulmuş Stevia Yapraklarından Etanolle Ekstraksiyon.....	74
4.2.3.1.	Kurutulmuş yapraklarından etanolik ekstraktlarının tanımlayıcı analizleri.....	74
4.2.3.2.	Ekstraksiyon Parametrelerinin etanolik kurutulmuş stevia yaprakları ekstraktlarından toplam fenolik madde (TFM) miktarı üzerine etkisi.....	74
4.2.3.3.	Ekstraksiyon parametrelerinin kurutulmuş stevia yapraklarının etanolik ekstraktlarında antioksidan aktivite üzerine etkisi	79
4.2.3.4.	Ekstraksiyon parametrelerinin kurutulmuş stevia yapraklarının etanollü ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi.....	83
4.2.3.5.	Stevia yaprağı sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması.....	83
4.2.3.6.	Box-Behnken tarafından belirlenen kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen etanolik ekstraktların optimum koşulları.....	92
5.	SONUÇLAR.....	94
6.	KAYNAKLAR	97
7.	EKLER	107
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “*Stevia Ekstraksiyonunda Santrifüj Kuvvetinin Steviol Glikozitlerin Difüzyonu Üzerine Etkisi*” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

25/08/2021

Ursula Tania ZOUA ASSOUMOU



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°Bx	: Brix,
°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
inç	: inch
kDa	: Kilodalton
kg	: Kilogram
L	: Litre
m	: Metre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
ppm	: milyonda bir kısım
rcf	: Rölatif santrifüj kuvveti
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
s	: Saniye
v	: Hacim
v/v	: Hacim/ Hacim oranı
w	: Ağırlık

Kısaltmalar

AFSSA	: Gıda Ajansı Tüketici rekabeti
ASE	: Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu
BBT	: Box-Behnken tasarımı
YYM	: Yüzey-Yanıt Metodu
DPPH	: 2,2- Difenil-1-Pikrilhidrazil
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HYDRO	: Hidrosart
JECFA	: Gıda Tarım Örgütü ve Dünya Sağlık Teşkilatı
MAE	: Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon
MLR	: Çoklu doğrusal regresyon
MWCO	: Membran filtre ayırma sınırı (Molecular Weight Cut Off)
PESU	: Polietersülfon
PLE	: Basıncı sıvı ekstraksiyonu
Reb-A	: Rebaudiosit A
Reb-C	: Rebaudiosit C
SÇKM	: Suda Çözünür Kuru Madde
SET	: Elektron Transfer Mekanizması
SF	: Seyreltme Faktörü
SFE	: Süper Kritik Sıvı Ekstraksiyonu
SGs	: Steviol Glikozitler
ST	: Steviosit
TA	: Titrasyon Asitliği

TFM	: Toplam Fenolik Madde
TKM	: Toplam Kuru Madde
TS	: Toplam katı
UAE	: Ultrases Destekli Ekstraksiyon
UDE	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon
UF	: Ultrafiltrasyon



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HPLC yöntemlerinde kullanılan steviol glikozitlerin kimyasal yapısı (Rodenburg vd. 2016)	5
Şekil 2.2. YYT kategorisine göre küresel Yüksek Yoğunluklu Tatlandırıcılar Pazarı (Milyon ABD doları) (Anonymous 2017)	6
Şekil 2.3. Türe göre paylaştırılmış küresel stevia pazarı (%) (Anonymous 2019b)	6
Şekil 2.4. Dört ana steviol glikozitin kimyasal yapısı (Prakash vd. 2008).	8
Şekil 2.5. Bitkide biyosentez aşamalarının yeri (Richman vd. 2005).....	10
Şekil 3.1. Stevia çeşidinin (Levent 93) yaprakları: (a) Kuru, (b) Yaş	14
Şekil 3.2. Üç değişkenli denemenin optimizasyon prosedürü	17
Şekil 3.3. Elek analizinde kullanılan cihaz	18
Şekil 3.4. Stevia yapraklarından sulu ekstraksiyonun bazı adımları: (a) santrifüjleme adımı, (b) santrifüj adımıdan sonra ekstraktların durumu, (c) süpernatant kısmının filtrasyonu	19
Şekil 3.5. Etanol ekstraksiyonunun bazı adımları: (a) tartım ölçümü, (b) etanol ile karıştırma, (c) süpernatant kısmının filtrasyonu	19
Şekil 3.6. TKM analizi için kullanılan kurutucu.....	20
Şekil 3.7. Suda Çözünen Kuru Madde analizi için kullanılan refraktometre cihazı.....	21
Şekil 3.8. Toplam asitlik tayini	22
Şekil 3.9. Galik asit standardı kullanılarak elde edilen curve.....	23
Şekil 3.10. Trolox standardı kullanılarak elde edilen curve	24
Şekil 3.11. Elde edilen ve kullanılan standart Steviol glikozit eğrileri (a) Rebaudiosit A (b) Steviosit (c) Rebaudiosit C.....	25
Şekil 3.12. SGs'lerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan HPLC cihazı	26
Şekil 4.1. Steviol glikozitlerin ön denemelerde ekstraksiyon aşamaları	27
Şekil 4.2. Solvent etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması	28
Şekil 4.3. Sıcaklık etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması	29
Şekil 4.4. Santrifüj kuvveti etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması	30
Şekil 4.5. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklardan deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen TFM değerleri.	36

Şekil 4.6. YYM modeli ile verilen yaş stevia yapraklarının sulu ekstralarından elde edilen TFM veriminin deneysel verilerinin 3B grafiği.	37
Şekil 4.7. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yaprak ekstraktlarında deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA değerleri	40
Şekil 4.8. YYM ile verilen yaş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından AA deneysel verilerinin 3B grafiği.....	41
Şekil 4.9. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklarından ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit A değerleri.....	46
Şekil 4.10. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklarından ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit değerleri	46
Şekil 4.11. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklardan ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C değerleri.....	47
Şekil 4.12. Yaş yapraktan ekstraksiyonda rebaudiosit A değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri.....	48
Şekil 4.13. Yaş yapraktan ekstraksiyonda steviosit değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri.....	49
Şekil 4.14. Yaş yapraktan ekstraksiyonda rebaudiosit C değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri.....	50
Şekil 4.15. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen sulu ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen TFM'nin saflık oranı değerleri	57
Şekil 4.16. YYM modeli tarafından verilen sulu kurutulmuş stevia yaprak ekstraktlarından elde edilen TFM'nin deneysel verilerinin 3B grafiği.....	58
Şekil 4.17. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklardan sulu ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA'nin saflık oranı değerleri	61
Şekil 4.18. YYM modeli ile verilen kurutulmuş stevia yaprakların sulu ekstraktlarından elde edilen AA'nin deneysel verilerinin 3B grafiği.....	62

Şekil 4.19. Yüzey-yanıt metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapralardan sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit A saflık oranı değeri.....	67
Şekil 4.20. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklardan sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit saflık oranı değeri	67
Şekil 4.21. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklardan sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C saflık oranı değeri	68
Şekil 4.22. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Rebaudiosit A Yüzey-Yanıt grafikleri	69
Şekil 4.23. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Steviosit Yüzey-Yanıt grafikleri	70
Şekil 4.24. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Rebaudiosit C Yüzey-Yanıt grafikleri	71
Şekil 4.25. YYM modeli ile elde edilen etanolik ekstraktlardan elde edilen TFM'nin deneysel verilerinin 3B grafiği.....	78
Şekil 4.26. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA saflık oranı değeri.....	81
Şekil 4.27. YYM modeli tarafından verilen etanolik ekstraktlardan elde edilen Antioksidan Aktivitenin deneysel verilerinin 3B grafiği	82
Şekil 4.28. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit A saflık oranı değeri	87
Şekil 4.29. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit saflık oranı değeri.....	87
Şekil 4.30. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C saflık oranı değeri	88
Şekil 4.31. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Rebaudiosit A Yüzey-Yanıt grafikleri	89

Şekil 4.32. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Steviosit Yüzey-Yanıt grafikleri 90

Şekil 4.33. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Rebaudiosit C Yüzey-Yanıt grafikleri .91



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Kurutulmuş stevia yaprağının kimyasal bileşimi (%) (Lemus-Mondaca vd. 2018)	4
Çizelge 3.1. Deneysel tasarımın ekstraksiyon kurulumu.....	13
Çizelge 3.2. Ekstraksiyon parametreleri	15
Çizelge 3.3. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımından ekstraksiyonlar için elde edilen deneme koşulları	15
Çizelge 3.4. Ekstraksiyonlar için üç faktörlü Box-Behnken tasarımında elde edilen tahmin koşullarının kodlanması	16
Çizelge 4.1. Seçilmiş ekstraksiyon parametreleri ve seviyeleri.....	27
Çizelge 4.2. Elek analizi sonuçları.....	31
Çizelge 4.3. Yaş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların suda çözünür kuru madde, pH değeri, titrasyon asitliği (TA) ve Toplam kuru madde (TKM) değerleri.	34
Çizelge 4.4. Box-Behnken tasarımı ve yaş stevia yaprağı ekstraktlarından TFM eldesinin deneysel sonuçları (n=9).....	35
Çizelge 4.5. Yaş stevia yapraklarından elde edilen ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	35
Çizelge 4.6. Box-Behnken tasarımına göre yaş stevia yaprağı sulu ekstraktlarında AA sonuçları (n=9)	39
Çizelge 4.7. Yaş yaprak ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları	39
Çizelge 4.8. Box-Behnken tasarımı ve yaş stevia yaprağı sulu ekstraktlarından majör steviol glikozitlerin deneysel sonuçları (n=9)	44
Çizelge 4.9. Yaş yapraklarından elde edilen ekstraktların Steviosit, Rebaudiosit A ve Rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	45
Çizelge 4.10. Yaş yaprakların sulu ekstraktlarının yüzey-yanıt metodu deneme desenine göre belirlenen optimum ekstraksiyon koşulu	52
Çizelge 4.11. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarının suda çözünür kuru madde (Bx°), pH değeri, titrasyon asitliği (TA) ve Toplam kuru madde (TKM) değerleri	55
Çizelge 4.12. Box-Behnken tasarımı ve sulu ekstraktlardan elde edilen TFM deneysel sonuçları (n=9)	56

Çizelge 4.13. Sulu ekstraktların Toplam Fenolik Maddenin (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	57
Çizelge 4.14. Box-Behnken tasarımı ve kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktlarda TFM deneysel sonuçları (n=9).....	60
Çizelge 4.15. Sulu ekstraktların Antioksidan Aktivitesinin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	61
Çizelge 4.16. Box-Behnken tasarımı ve kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin deneysel sonuçları	65
Çizelge 4.17. Sulu ekstraktlardan elde edilen Steviosit, Rebaudiosit A ve Rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	66
Çizelge 4.18. Kurutulmuş yaprakların sulu ekstraktlarının Yüzey-Yanıt metodu deneme desenine göre belirlenen optimum koşulları, ...	73
Çizelge 4.19. Kurutulmuş yaprakların etanolik ekstraktlarının suda çözünür kuru madde, pH değeri, titrasyon asitliği ve toplam kuru madde (TKM) değerleri.....	76
Çizelge 4.20. Box-Behnken tasarımı ve etanol ekstraksiyonu ile elde edilen TFM sonuçları	77
Çizelge 4.21. Etanolik ekstraktlarda toplam fenolik maddenin (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	77
Çizelge 4.22. Box-Behnken tasarımı ve etanolik ekstraktların deneysel AA sonuçları (n=9).....	80
Çizelge 4.23. Etanolik kurutulmuş yapraklarından ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	80
Çizelge 4.24. Etanolik ekstraktlardan elde edilen majör steviol glikozitin Box-Behnken tasarımı ve deneysel sonuçları	85
Çizelge 4.25. Kurutulmuş yapraklardan elde edilen etanolik ekstraktlarda steviosit, rebaudiosit A ve rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları	86
Çizelge 4.26. Etanolik ekstraktların yüzey-yanıt metodu deneme desenine göre belirlenen optimum koşulları	93

1. GİRİŞ

Dünya genelinde bireylerin sağlık sorunları tükettikleri gıdalar ve yaşam kaliteleri ile ilişkilidir. Sağlık sorunlarının iyileştirilmesi ve alternatif çözümlerin üretilmesi amacıyla bilimsel araştırmaların önemi gün geçtikçe artmaktadır. Son yıllarda tüketiciler tükettikleri gıdaların bileşimlerini inceleme ve bileşenlerin yan etkilerini araştırma konusunda daha bilinçli hale gelmiştir. Artan bilinçlenme ile gıda ve tarım sektörü tüketicilerin istekleri doğrultusunda ürün üretmeye yönelmektedir. Bunun sonucunda doğal ürünlere yönelim tekrar gündeme gelmiş ve artan sağlık sorunları nedeniyle doğal gıdalar tüketicilerin günlük yaşamlarında yerini almıştır. Bu bakış açısı ile son yıllarda bileşimlerindeki doğal zenginliklerinden dolayı birçok ürünün (yağlar, meyveler, tıbbi ve aromatik bitkiler ve kökler) üretiminin ve tüketiminin arttığı görülmüştür.

Gıda sektöründe kullanılan en önemli hammaddelerin başında şekerler gelmektedir. Pek çok gıdanın formülünde şekerler bulunmaktadır. Son 50 yılda şeker kullanımının artması çeşitli sağlık sorunlarını da beraberinde getirmiştir. Dünya çapında 500 milyondan fazla insan obezite hastasıdır ve bu rakam gün geçtikçe artış göstermektedir (Hurt vd. 2010). Ek olarak yüksek şekerli diyetlerin kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, ağız ve diş hastalıkları, karaciğer yağlanması, bilişsel gerileme ve bazı kanser türlerinin oluşumu ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Howard ve Wylie-Rosett 2002; Rippe ve Angelopoulos 2016). Günlük hayatta tükettiğimiz tatlı içecekler, meyveli yoğurtlar, pizza, ketçap, hazır yemekler, soslar, sakız ve kahvaltılık gevrekler gibi pek çok gıdanın bileşiminde şeker yer almaktadır. Avrupa’da, özellikle Macaristan ve Norveç’te yetişkinler için günlük şeker tüketimi %7-8 arasında değişirken bu değer İspanya ve Birleşik Krallık’ta iki katı daha yüksektir. Çocukların şeker tüketimi diğer yaş gruplarına oranla daha yüksek olmakta ve %12 (Danimarka, Slovenya ve İsveç) ile %25 (Portekiz) arasında değişmektedir. Afrika’nın güneyinde şeker tüketimi kırsal alanlarda ve kentsel alanlarda farklılık göstermektedir. Bu oran kırsal alanlar için %7,5 iken kentsel alanlar için %10,3 olarak belirlenmiştir. Dünya genelinde bireylerde gözlenen aşırı kilo alımı, obezite ve yetersiz beslenme gibi sorunlar Türkiye için de istisna değildir. Aşırı şeker tüketimi halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Dünya Sağlık Örgütü, 2014). Dolayısıyla, aşırı şeker tüketimi kamu sağlığı sorunu haline gelmiştir (Rippe ve Angelopoulos 2016). Bu yüzden Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2019 yılında toplam enerji alımında şeker tüketiminin %5’in altına düşürülmesini önermiştir. Bunun sonucunda tüketiciler daha az şeker ve/veya tatlandırıcı içeren ürünler tercih etmeye başlamıştır. Yapay veya doğal olabilen bu tatlandırıcıların şeker ikamesi olarak çeşitli gıda ürünlerinin üretiminde kullanımı artmıştır (Wal vd. 2019). Son zamanlarda piyasada sukraloz, aspartam, sakkarin ve asesülfam gibi şeker ikameleri bulunmaktadır. Doğal bir tatlandırıcı olan stevia ise katkılı içecek ve yiyeceklerin pazar talebinin artması nedeniyle popüler hale gelmiştir.

Güney Amerika kökenli olan stevia bitkisi sakarozdan 250-300 kat daha fazla tatlı olan steviol glikozitleri içermektedir. Stevia bitkisinin yaprakları ferahlatıcı bir tada sahiptir. Sıfır kalorili bir tatlandırıcıdır ve düşük miktarda karbonhidrat içermektedir. Stevia bitkisi üzerinde yapılan çalışmaların artması ile steviol glikozitlerin çeşitli gıda üreticileri tarafından kullanımı da artış göstermiştir. Piyasaya arz edilen çoğu stevia katkılı gıda ürünlerinde yaygın olarak saflaştırılmış steviosit, rebaudiosit A ve rebaudiosit C bulunmaktadır. Ayrıca stevia yapraklarında önemli miktarda polifenoller gibi antioksidan bileşik bulunduğu bilinmektedir. Folik asit gibi besin maddeleri ve temel

amino asitlerin ve fenolik bileşiklerin çoğu stevia yapraklarında bulunmaktadır. Bu bileşiklerin tedavi edici özellikleri insanlarda hastalık riskini azaltmaktadır.

Belirtilen bileşenlerin stevia yapraklarından eldesinde ekstraksiyon en önemli aşamadır ve ekstraksiyon için çok sayıda analitik yöntem önerilmiştir. Özellikle steviol glikozitlerin (SGs) eldesi için maserasyon, infüzyon, kaynatma, soğuk ve sıcak su ekstraksiyonu gibi geleneksel yöntemlerin yanı sıra karıştırma destekli termal ekstraksiyon yöntemleri de geliştirilmiştir. Düşük verim, çevreye dost olmayan ürün ve aşırı enerji kullanımı ve iş yükünün fazla olması gibi nedenler endüstriyel boyutta üreticileri rekabet stratejilerini geliştirmeye yöneltmiştir. Bu nedenle ekstraksiyon teknolojisinde yapılacak araştırmalar önem kazanmıştır.

Stevia yapraklarından steviol glikozitlerin eldesinde çoğunlukla çözücü olarak su veya etil alkol kullanımına dayanan basit, çevreci ve daha az enerji harcayan teknikler üzerinde durulmaktadır. “Yeşil ekstraksiyon” konsepti hem çevreyi hem de tüketicileri koruyarak sektörlerin rekabet gücünü artırmaya katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda daha ekolojik, ekonomik ve yenilikçi hale gelerek sürdürülebilirliği nedeniyle de başarılı bulunmuştur. Yeşil ekstraksiyon konsepti enerji tüketimini azaltan, alternatif solventlerin ve yenilenebilir doğal ürünlerin kullanımına olanak sağlayan, güvenli ve yüksek kaliteli bir ekstrakt ve nihai ürünü garanti eden ekstraksiyon süreçlerinin keşfine ve tasarımına dayanmaktadır.

Bununla birlikte süper kritik sıvı ekstraksiyonu (SFE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ve ultra ses destekli ekstraksiyon (UAE) gibi yeşil ekstraksiyon yöntemleri de geliştirilmiş fakat yüksek miktarlardaki üretimler için uygun olmadığı düşünülmüştür. Bu nedenle çok sayıda hammaddeyi yüksek basınçla kısa sürede işleyebilen Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyon (ASE) yöntemi geliştirilmiştir. Fakat yüksek sıcaklık kullanımı meyve suyu endüstrisi gibi enzim faaliyetlerinin önemli olduğu bazı endüstriler için sınırlayıcı olabilmektedir. Ekstraksiyon prosesi için sürekli dekantör santrifüj yöntemi önerilmiş ve aynı işlevselliğe sahip olduğu için laboratuvar ölçekli santrifüj uygulaması kullanılmıştır. Arslan Kulcan ve Karhan (2020) tarafından yapılan çalışmada dekantör santrifüj ekstraksiyonunun steviol glikozitlerin eldesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Böylece, santrifüjlemenin etkilerini göstermeye yönelik çalışmalar belirli bitki ve meyveler üzerinde yaygın olarak yapılmıştır. Ayrıca, araştırma maliyetlerinin düşürülmesi, aranan metabolitlerin ekstraktlarının maksimum tahmini ve matematiksel bir model elde etmek için Yüzey-Yanıt Metodu (YYM) son yıllarda kullanılmaktadır. Ek olarak, birçok ekstraksiyon parametresinin optimizasyonu için YYM yönteminden yararlanılmaktadır. Arslan Kulcan ve Karhan (2020) tarafından yapılan çalışmada steviol glikozitlerin elde edilmesinde santrifüj kuvvetinin etkili olduğu dekantör ekstraksiyonunun uygun olduğu bildirilmiştir.

Bu tez çalışmasında çevreye saygılı bir tutum sergilenirken yüksek saflıkta steviol glikozitlerin maksimum verimlilikle ekstraksiyonu için uygun koşulları önermek amaçlanmıştır. Tüketicilere zararlı olmadığı bilinen solventler (saf su ve etanol) kullanılarak yapılan ekstraksiyon denemelerinde yaş ve kuru stevia yaprakları hammadde olarak kullanılmış ve steviol glikozitlerin ekstraksiyon verimini etkileyen parametreler sıcaklık, yaprak/solvent oranı (v/v) ve santrifüj kuvveti olarak belirlenmiştir. Araştırma sonucunun yüksek saflıkta ve kaliteli ticari ürünlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmüştür.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Stevia bitkisi, Steviol Glikozitler ve Ekstraksiyonlar

2.1.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi

2.1.1.1. Özellikleri

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) tatlı steviol glikozitler üreten stevia cinsinin 154 üyesinden biri olan çalı formunda bir bitkidir. Dünya çapında 200'den fazla türü tespit edilmiştir ve bunlar çoğunlukla Paraguay sıradağlarında, Amambay bölgesinde ve Brezilya sınırlarında yabani olarak yetişmektedir. Ayrıca güneybatı Amerika Birleşik Devletleri, kuzeydoğu Arjantin, Meksika, Orta Amerika, Vietnam, İsrail, Tanzanya, Tayland, Kore ve Kanada'da da yetişmekte olup (Lemus-Mondaca vd. 2012; Wölwer-Rieck 2012; Kaur vd. 2014; Jentzer vd. 2015) yakın zamanda Kenya, Kamerun, Türkiye, Ruanda ve Fas'ta da üretim denemelerine başlanmıştır. *Stevia*, Magnoliopsida (Dikotiledonlar) sınıfına ait olup Asteraceae veya Compositae (Simonsohn 2009) familyasıdır. Bitki boyu uygun toprak ve iklimde doğal olarak yetiştirildiğinde 65 cm (26 inç) ile 180 cm (72 inç) arasında değişmektedir. Bitki için uygun iklim 21-43°C aralığında ve ortalama 24°C'lik sıcaklıkta olup subtropikal iklim olarak belirtilmektedir (Griffiths 1994). Bu bitkinin orijinal adı "yaprak şekilli bal" anlamına gelen "ka'a eirete" olarak da bilinmektedir (Anonymous 2019a). Ancak, tatlı çimen, bal yaprağı, tatlı yaprak, şeker yaprağı ve yeşil altın gibi bilinen yerel isimleri de vardır (Dünya Stevia Örgütü 2019). *Stevia* bitkisine dünya çapında verilen isimlerdeki farklılığa rağmen hepsi tatlılığıyla ilgilidir. Bu tatlılık ise yapraklarında bulunan doğal diterpenoid glikozit bileşenlerinden kaynaklanmaktadır.

2.1.1.2. Fitokimyasallar

Bugüne kadar stevia türlerinin kimyasal bileşimi henüz tam olarak ortaya konmamıştır. Fakat stevia türlerinin bazı çeşitleri bileşimleri açısından incelenmektedir. Bu çalıların önemli kısımları ağızda saatlerce kalabilen hoş bir tada sahip yapraklarıdır (Singh ve Rao 2005). Bitkinin kalitesi yetiştirme koşulları, sulama yöntemleri, güneş ışığı alma durumu, tarım uygulamaları ve depolama dahil olmak üzere çevreye göre değişmektedir. Kurutulmuş yaprakların kimyasal bileşimi Çizelge 2.1 de verilmiştir ve bileşim öğeleri uygulanan kurutma yöntemine göre değişmektedir (Lemus-Mondaca vd. 2018; Gasmalla vd. 2014). Kurutulmuş yapraklardan elde edilen *Stevia* ekstraktları genellikle birincil metabolitler olarak bitkisel proteinler (polipeptitler), lipitler, mono ve polisakkaritler ve ikincil metabolitler olarak da flavonoidler, diterpenler ve steroller dahil olmak üzere triterpenler, vitaminler ve mineralleri içermektedir (Yadav vd. 2011) ve bileşenlerin miktarları belirli sınırlar içinde değişmektedir (Tadhani ve Subhash 2006). Ayrıca, stevia yaprakları doğal olarak tatlandırılmış diterpen glikozitlerin kompleks bir karışımını içermektedir. Bu yapıda bulunan bileşenler steviosit (%4-13), rebaudiosit A (%2-24), rebaudiosit C (%1-2), dulcosit A (%0,4-0.7), steviolbiosit, rebaudiosit B, rebaudiosit D, rebaudiosit E, rebaudiosit F ve rebaudiosit M (Şekil 2.1) olarak adlandırılmaktadır (Gasmalla vd. 2014; Prakash vd. 2013; Prakash vd. 2014; Mathur vd. 2017).

Çizelge 2.1. Kurutulmuş stevia yaprağının kimyasal bileşimi (%) (Lemus-Mondaca vd. 2018)

Parametreler	Güneşte kurutulmuş	Fırında kurutulmuş	Mikrodalgada kurutulmuş
pH	5.96	5.95	6.24
Nem	10.73±0.05 ^a	7.46±0.05 ^b	4.45±0.92 ^c
Kül	12.06±0.05 ^a	8.06±0.65 ^b	4.65±1.08 ^c
Ham lif	5.03±0.16 ^a	5.26±1.17 ^a	4.35±0.39 ^a
Ham protein	13.68±1.86 ^a	12.44±0.81 ^a	12.83±0.17 ^a
Lipit	6.13±0.63 ^a	4.39±0.30 ^b	4.18±0.45 ^b
Karbonhidrat	63.10±1.20 ^c	69.85±0.05 ^b	73.99±0.02 ^a

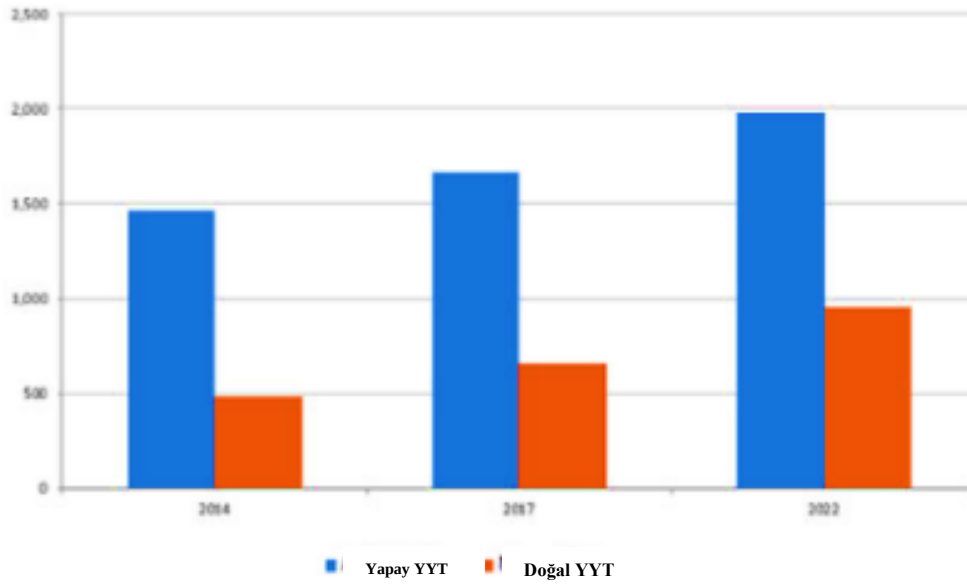
Farklı harfle aynı satırdaki ortalama değerler önemli ölçüde birbirinin farklıdır ($p \leq 0,05$).

İsimler	R ₁	R ₂
Rubusoside	Glcβ ₁ -	Glcβ-
Steviolbioside	H	Glcβ(1-2)-Glcβ ₁ -
Dulcoside A	Glcβ ₁ -	Rhaα(1-2)-Glcβ ₁ -
Rebaudioside B	H	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Stevioside	Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)-Glcβ ₁ -
Rebaudioside C	Glcβ ₁ -	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside F	Glcβ ₁ -	Xylβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside A	Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside E	Glcβ(1-2)-Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)-Glcβ ₁ -
Rebaudioside M	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside D	Glcβ(1-2)-Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside N	Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -
Rebaudioside O	Glcβ(1-3)Rhaα(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ-	Glcβ(1-2)[Glcβ(1-3)]-Glcβ ₁ -

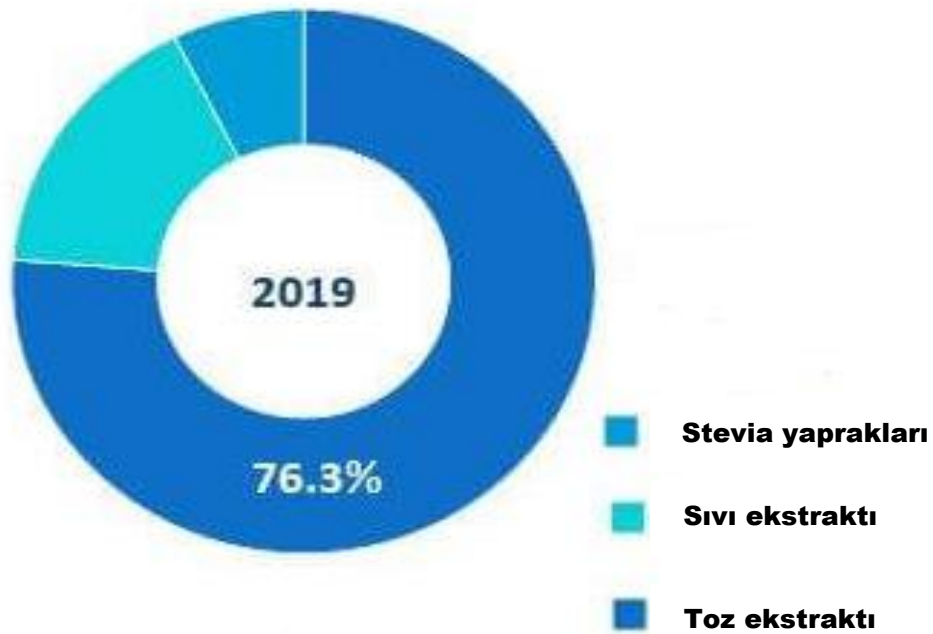
Şekil 2.1. HPLC yöntemlerinde kullanılan steviol glikozitlerin kimyasal yapısı (Rodenburg vd. 2016)

2.1.1.3. Üretim ve Pazarlama

Küresel tatlandırıcılar pazarı 2010'da yaklaşık 1.146.000.000 ABD doları olarak belirlenmiş; yedi yıl sonra 2017'deki değeri (Şekil 2.2) ise 1,7 milyar ABD doları olarak hesaplanmıştır (Anonymous 2017; Leatherhead Food Research 2011). Yüksek yoğunluklu tatlandırıcılar (YYT) şekerden yüzlerce kat daha tatlı olması ve yiyecek ve içeceklerle eklendiğinde yiyeceğin kalori değerini etkilememeleri nedeniyle alternatif tatlandırıcılar veya şeker ikameleri olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle son yıllarda şeker ikamelerine büyük ilgi gösterilmiştir. Bununla birlikte, stevia 2010, 2012 ve 2014 yıllarında sırasıyla 282 milyon ABD doları, 304 milyon ABD doları ve 336 milyon ABD dolarına ulaştığı bildirilen genel küresel piyasa değeriyle vurgulanan talebini sürekli artıran doğal bir tatlandırıcıdır (Anonymous 2016). Bu arada, 2019'da küresel stevia pazar büyüklüğü 2015'teki 445,73 milyon ABD dolarından 510,89 milyon ABD dolarına yükselmiş ve 2020'de COVID-19 krizinin ortasında, stevia için küresel pazarın 569,2 Milyon ABD doları olduğu tahmin edilmiştir (Anonymous 2020b). Stevia üreten başlıca ülkeler olan Brezilya, Paraguay, Uruguay, Çin, Kore, Tayland, Tayvan, İsrail ve Japonya talebe göre üretimlerini artırmıştır. Dahası, Çin dakikada 20 kilogram üretimle dünyanın en büyük imalat pazarı bölgesiyken, sadece Japonya ve Kore bunun yaklaşık 2.000 ila 3.000 tonunu tüketmektedir. Bu durum, dünya üretiminin yılda yaklaşık 6.000 ton olduğu anlamına gelmektedir ve %80'i Çin'e aittir (Anonymous 2020b). Buna ek olarak, birçok ülke stevia yetiştirmeye ve pazarlamaya başlamıştır. Kuzey Afrika, Güney Amerika, Avustralya, Kanada, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan, İsrail, Rusya ve 2010 yılından beri olmak üzere de Fransa ve Türkiye (Anonymous 2019b) bu ülkeler arasındadır. Kanada, Yeni Zelanda, Avustralya ve Avrupa'da Belçika, Almanya ve İngiltere gibi diğer ülkeler endüstri bitkisi olarak stevia üretimini denemektedir. Buna ilave olarak, ekstrakt türüne göre küresel stevia piyasası sıvı, yaprak ve toz şeklinde dallanmıştır (Şekil 2.3). Toz formdaki stevia ürünleri 2019'da "Future Market" öngörülleri tarafından bildirildiği üzere depolama, paketleme ve nakliye konusundaki esnekliği nedeniyle pazara hâkim olmuştur (Anonymous 2019c).



Şekil 2.2. YYT kategorisine göre küresel Yüksek Yoğunluklu Tatlandırıcılar Pazarı (Milyon ABD doları) (Anonymous 2017)



Şekil 2.3. Türe göre paylaştırılmış küresel stevia pazarı (%) (Anonymous 2019b)

2.1.1.4. Kullanımı

Stevia bitkisinden elde edilen toz formdaki tatlandırıcıların tüketimi yılda yaklaşık 6.000.000 kg düzeyine çok büyük bir ivme ile ulaşmıştır. Son yıllarda stevia ürünlerinin dünya çapında piyasa değerinin artışı farklı gıda formüllerinde kullanımındaki

yaygınlaşmanın sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Stevia ürünleriyle ilgili birçok özellik ve kullanım şekli tanımlanmış ve belgelenmiştir. En önemli özelliği doğal olarak düşük kalorili bir tatlandırıcı olmasıdır ancak kayda değer farklı ilginç özellikleri de mevcuttur. Bu özellikler bitkiye endüstriyel önem kazandırmaktadır. Stevia ürünleri yiyecek ve içeceklerde kullanıldığı için ürik asit fazlalığından kaynaklanan hastalıkların tedavisinde anestezik ve antiinflamatuvar olarak da kullanılmaktadır (Jayaraman vd. 2008). Ayrıca bazı çalışmalar kanser, diyabet, hipertansiyon, inflamasyon, kistik fibroz, obezite ve diş çürümesi gibi çeşitli hastalıklara karşı tedavi edici etkilerini göstermiştir (Momtazi-Borojeni vd. 2017; Zhao vd. 2018; Zaidan vd. 2019).

Stevia ürünlerine olan talebinin büyük ölçüde gelişmekte olan bölgelerdeki gıda endüstrisinin büyümesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca, stevia ürünlerinin tüketicinin doğrudan kullanımına uygun ambalajda ve özellikle preparatları da mevcuttur (Anonymous 2019b). Çay, kahve ve benzeri ürünler için tablet veya toz şeklindeki preparatlar, alkolsüz içecekler, likörler, meyve suları, şerbetler, kekler, bisküviler, hamurlu tatlılar, turtalar, fırın ürünleri, reçeller, soslar, turşular, jöleler, sakızlar, şekerlemeler, kremalar, yoğurtlar ve benzeri birçok üründe tüketici ölçeğinde kullanılabilir. Tıbbi ürünlerin yapısında da tatlandırma amacıyla kullanılmaktadır. Diş macunu, ağız gargaraları plak geciktirici/çürük önleyici ürünler, cilt bakımı ürünleri ve özel amaçlı diyabetik gıdalar, egzama ve akne tedavisi ürünleri, hipertansiyon tedavisi ve kan basıncı kontrolü ürünleri gibi ürünlerin bileşiminde de bulunabilmektedir. Bunların dışında toksik bir madde olmamasına rağmen stevia ekstraktları organik bir böcek kovucu olarak bitkisel üretimde de kullanılmaktadır. Bu etkilerin yanı sıra, hipoglisemik etkisi nedeniyle geleneksel tıpta yıllarca diyabet tedavisinde kullanıldığı da bildirilmiştir (Dyrskog vd. 2005).

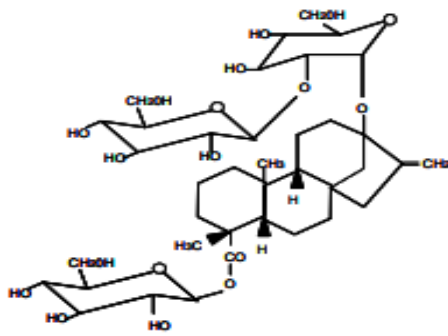
2.2. Steviol glikozitler

2.2.1. Yapıları

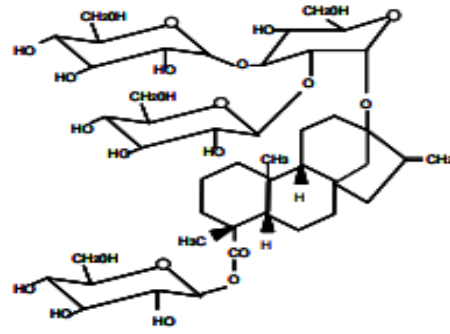
Stevia bitkisinden doğal ürün konseptinde tatlandırıcı elde edilebilmektedir. Bitkide tatlandırıcı özelliği yanında miktar olarak en çok bulunan steviol glikozitler steviosit, rebaudiosit A, rebaudiosit C, rebaudiosit E ve dulcosit A olarak isimlendirilen diterpenoid glikozitlerdir. Şekil 2.4'te gösterilen tatlı bileşiklerin yapılarının tümü aynı köke (steviol halkası) sahiptir ve birkaç farklılık görülmektedir (Brahmachari vd. 2011). Yetiştirme koşullarında ve çeşit seçimindeki iyileştirmeler artık steviol glikozit içeriği kuru ağırlıkta %20'den (ağırlık/ağırlık) fazla olan bitkileri üretmeyi mümkün kılmaktadır. Yabani formda bir stevia bitkisi incelendiğinde kullanılan genotiplere ve iklimsel yetiştirme koşullarına (Kim and Dubois, 1991) bağlı olarak yapraklarda bulunan dört ana

glikozitin bitkinin kuru ağırlığına göre normal oranları aşağıdaki gibi (Wölwer-Rieck 2012) saptanmıştır. Buna göre:

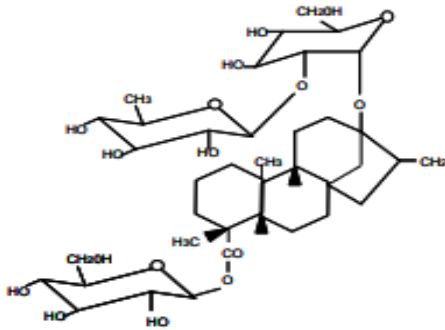
- Steviosit (%5-10),
- Rebaudiosit A (%2-4),
- Rebaudiosit C (%1-2),
- Dulcosit A (%0.5-1) oranındadır.



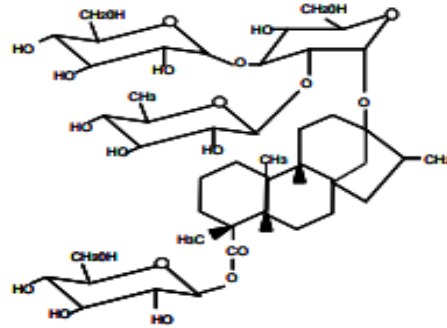
Steviosit



Rebaudiosit A



Dulcosit A



Rebaudiosit C

Şekil 2.4. Dört ana steviol glikozitin kimyasal yapısı (Prakash vd. 2008).

2.2.2. Tatlandırıcıların düzenlenmesi

Önce Paraguay ve Brezilya 1990 sonrasında bitkisel ürün satış noktaları ve sağlıklı gıda marketleri yoluyla stevia bitkisinden üretilen ürünleri üretmiş ve dünya genelinde dağıtımına başlamıştır. Daha sonra 1994 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tatlandırıcılar dahil gıda katkı maddelerinin pazarlanmasına ilişkin kararlardan sorumlu olan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), stevia ürünlerinin diyet takviyesi olarak pazarlanmasına izin veren yasal düzenlemeyi yürürlüğe koymuştur. Bu yasaya göre ürünlerinin güvenliğinden besin takviyesi üreticisi sorumludur (Anonymous 1994).

Ayrıca yeni gıda katkı maddelerinin Avrupa Birliği'nde kullanımı için yetkilendirilmesinden önce güvenlik değerlendirmelerini yapan Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA), 1999 yılında stevia ve türevlerinin gıda veya gıda içeriği olarak piyasaya sürülmesine ilişkin olumsuz görüş vermiştir (Anonim 1999). Sonraki yıllarda; 2004 yılında, Gıda Katkı Maddeleri üzerine Ortak FAO/DSÖ Uzmanlar Komitesi (JECFA) tarafından yapılan toplantılarda gıda katkı maddelerinin güvenliği konusunda öneriler ve görüşler yayınlanmış ve stevia ile ilgili şüpheleri yeniden incelenmiştir (Anonim 2004).

JECFA tarafından 2007 yılında yapılan toplantıda Fransız Gıda Güvenliği Ajansı (AFSSA), Tüketici Rekabet ve Dolandırıcılık Kontrolü Genel Müdürlüğü (DGCCRF) tarafından steviol glikozitlerin insan beslenmesinde tatlandırıcı olarak kullanımına yönelik iki yıllık bir süre için geçici bir izinle ilgili görüş talebine zorlanmıştır (Anonim 2007). Devam etmekte olan toksikolojik ve klinik çalışmaların sonuçlarının, özellikle farmakolojik etkilere ilişkin çalışmaların ardından komite, günlük alım değerini geçici olarak iki katına çıkartma kararı almış ve steviol eşdeğeri olarak 4 mg/kg vücut ağırlığı düzeyine çıkartmıştır. Bunu takiben, Mayıs 2008'de, JECFA tarafından yapılan meta-analizi içeren titiz bir değerlendirme programı, önceki olumlu bulguları doğrulamış ve stevia ürünlerinin güvenliğinin kesin olarak tesis edilmesini sağlamıştır. Bu çalışmalar ışığında bazı büyük gıda üretici firmaları stevia ürünlerini piyasaya sürmüştür (Anonim 2008).

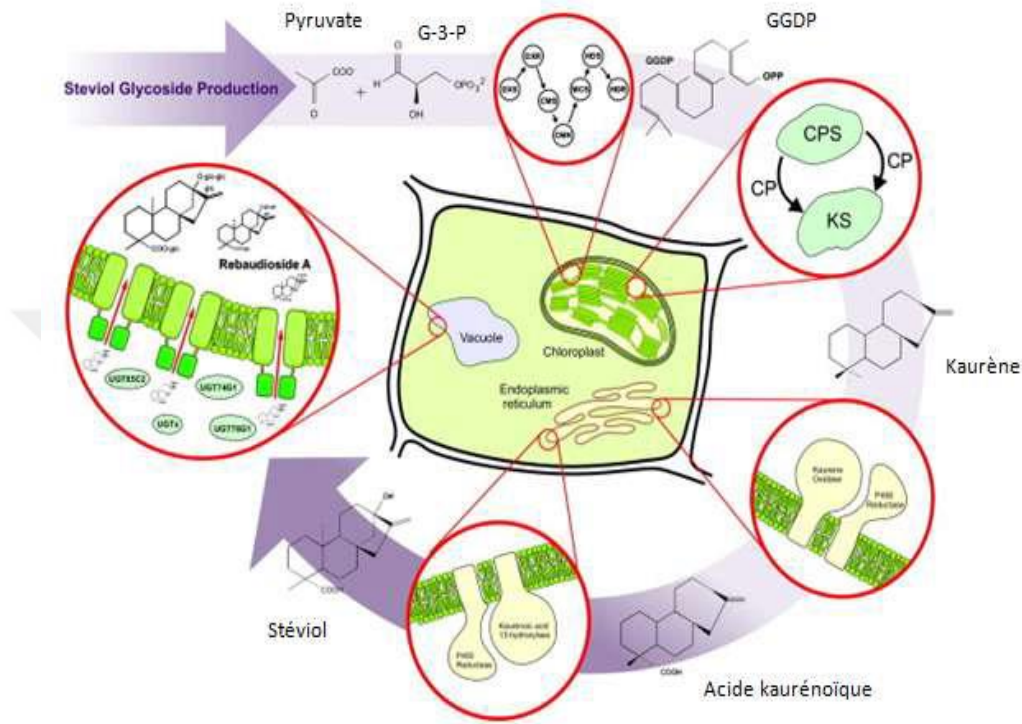
AFSSA, 11 Eylül 2008 tarihli bir görüşünde (AFSSA, 2007), %97'den fazla saflığa sahip stevia ekstraktı olan Rebaudiosit A'nın stabilitesi, kullanım koşulları ve dozları ile ilgili çalışmalara dayanarak tüketici için bir risk oluşturmadığı sonucuna varmıştır. Aralık 2008'de Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA iki steviol glikoziti genel olarak güvenli (Generally Recognized as Safe) veya zararsız olarak kabul etmiştir. Bunlar Rebaudiosit A ve steviosit olarak bildirilmiştir. Bir gıda, yeterince uzun bir süre kullanıldığında ve/veya yeterli sayıda bilimsel çalışma zararsızlığını kanıtladığında (Generally Recognized as Safe) "GRAS" olarak kabul edilmektedir (Anonim 2009).

Fransa'da 26 Ağustos 2009 tarihli bakanlık kararnamesine göre (Fransa Cumhuriyeti Resmi Gazetesi 2009), %97 oranında saflaştırılmış rebaudiosit A gıda maddelerinin bileşiminde görülmesi muhtemel katkı maddesi olarak kabul edilmiştir. Kasım 2011'den bu yana, yukarıda bahsedilen steviol glikozitler, Avrupa Birliği Resmî Gazetesi'nde (Avrupa Birliği Resmî Gazetesi 2011) yayınlanan 1131/2011 sayılı yönetmeliğe göre Avrupa düzeyinde tatlandırıcı (E960) olarak onaylanmıştır.

2.2.3. Steviol glikozitlerin biyosentezi

Genel olarak steviol glikozitler ikincil metabolizma ürünleri olarak mevalonik asitten sentezlenmektedir. Bu glikozitler terpenoid gruplarına aittir ve sentezleri kloroplastlarda başlamaktadır. Şekil 2.5'te gösterildiği gibi, enkaürenik asit oluşumundan sonra glikozitler oluşmaktadır. Ardından steviol oluşturma adımını endoplazmik retikulum başlatmaktadır. Bu glikozilasyon glikozitleri oluşturmak için son adımdır. Bu nedenle oluşan glikozitler hücrenin vakuolünde yoğunlaşmakta ve bu da yaprakların tatlandırıcılar açısından neden daha zengin olduğunu açıklamaktadır (Geuns 2003; Brandle ve Telmer 2007; Brahmachari vd. 2011). Rebaudiosit A, steviol glikozitlerin sentezinin son ürünüdür. Sitozolda gerçekleşen bu sentezden steviosit ve Rebaudiosit A olmak üzere iki ana glikozit elde edilir. Şekil 2.1. HPLC yöntemlerinde kullanılan steviol

glikozitlerin kimyasal yapısı (Rodenburg vd. 2016'de tanımlanan diğer glikozitler, ksiloz ve ramnoz gibi diğer şekerlerin eklenmesiyle üretilir (Starratt vd. 2002; Brandle vd. 2011). Bu şekilde oluşan steviol glikozitler, hidrofilik özelliklerinden dolayı hücrelerin vakuollerinde birikmektedir (Shibata vd.1991). Hidrofobik bir molekül olan steviolün hidrofilik hale gelmesi glikozilasyonlar sayesinde gerçekleşmektedir.



Şekil 2.5. Bitkide biyosentez aşamalarının yeri (Richman vd. 2005)

2.3. Saf stevia bitkisinin elde edilmesi için yeşil ekstraksiyon işlemi

Bitkilerden farklı biyoaktif bileşiklerin izolasyonu için en önemli adım muhtemelen atışın keşfinden beri ekstraksiyon süreci olmuştur. Sakkarozu kıyasla enerjisiz olması nedeniyle stevia yapraklarından yüksek değerli bileşiklerin ekstraksiyonu için yenilikçi yaklaşımlar geliştirilmiş ve optimize edilmiştir. Geleneksel yöntemlerin aksine Bursac Kovacevic vd. (2018) ve Koubaa vd. (2015) tarafından rapor edildiği üzere yenilikçi ekstraksiyon yöntemleri daha kısa sürede daha yüksek verime olanak tanımış; daha az organik solvent kullanımı ve azaltılmış enerji tüketimi oluşturulmuştur.

Biyoaktif bileşik (BAB) için mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) ısı kaynağı olarak mikrodalga enerjisi kullanan ve hedef bileşiklerin solvante taşınmasını kolaylaştıran bir yöntemdir. Ciulu vd. (2017) farklı ekstraksiyon süreleri (5, 10, 15 ve 20 dakika) altında %75 sulu etanol (v/v) kullanarak 100 °C'de MAE'nin stevia yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu üzerindeki etkisini araştırmış; farklı süreler fenolik madde içeriğini değiştirmemiştir.

Ayrıca, mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile steviosit ve rebaudiosit A ekstraksiyonunun Yüzey-Yanıt Metodu ve yapay sinir ağı modellemesi kullanılarak 5 seviyeli ve 3 faktörlü merkezi kompozit tasarımı ile optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Toplam ekstraksiyon verimi (%7,67), steviosit verimi (19,58 mg/g) ve reb-A verimi (15,3 mg/g), %75 etanol konsantrasyonu, 500 W mikrodalga gücü ve 4 dakika ışınlama ile elde edilmiştir. Yapay sinir ağı modelinin steviol glikozitlerin elde edilmesinde Yanıt Yüzeyi Metodolojisi yöntemine göre daha yüksek etkinlik gösterdiği belirlenmiştir (Ameer vd. 2017).

Stevia yapraklarından steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için farklı yöntemler üzerinde de durulmuştur. Rao vd. (2012) kuru yaprakların öğütülmesi, yağdan arındırılması ve basınçlı sıcak su ekstraktörü (BSSE) ile ekstrakte edilmesi ardından ultrafiltrasyon (UF) ve nanofiltrasyon (NF) yoluyla tatlı glikozitlerin yüksek (% 98.2) saflıkta elde edilmesi için uygun yöntemler üzerinde durmuştur. Bu süreç yüksek kaliteli steviol glikozitlerin izolasyonu için "yeşil yöntem" olarak değerlendirilmiştir. Bu yöntem saf steviol glikozitlerin elde edilmesinde basit, ucuz ve çevre dostu bir yöntem olarak tanımlanmıştır.

Ayrıca Bursac Kovacevic vd. (2018) biyoaktif bileşenler (polifenoller, karotenoidler, klorofiller) ve steviol glikozitler açısından zengin stevia ekstraktlarını elde etmek için uygun bir teknik olarak BSSE'yi doğrulamıştır. BSSE, 10.34 MPa'lık sabit bir basınç kullanılarak farklı sıcaklıklarda (100, 130, 160°C), sabit ekstraksiyon sürelerinde (5 ve 10 dakika) gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon geri kazanımını etkileyen ana parametrenin sıcaklık olduğu bulunmuştur. Tüm biyoaktif bileşenlerin en yüksek geri kazanımı, karotenoidler hariç, 160°C'de elde edilmiştir.

Enzimatik ekstraksiyon için stevia yapraklarından elde edilen ekstrakta selüloz, pektinaz ve hemiselülaz gibi enzimler katılarak enzim konsantrasyonu, inkübasyon süresi ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelerle optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hemiselülazın, selüloz ($359 \pm 0,30 \mu\text{g}$) ve pektinazlara ($333 \pm 0,55 \mu\text{g}$) kıyasla 1 saat içinde en yüksek steviol glikozit verimi ($369,23 \pm 0,11 \mu\text{g}$) sağladığı gözlenmiştir. Enzim uygulamaları en iyi koşullarda gerçekleştirilen normal ekstraksiyon ile karşılaştırıldığında verimde önemli bir artış (35 kat) gözlenmiştir. Her biri %2'ye ayarlanmış pektinaz, selüloz ve hemiselülaz karışımlarının 51-54°C'de 36-45 dakikada en iyi sonuçları verdiği görülmüştür (Puri vd. 2012).

Bununla birlikte, Rouhani (2019) stevia yapraklarından steviol glikozitlerin Peleg'in matematiksel metodolojisi ile ekstraksiyonu için optimum prosedür koşullarını değerlendirmek amacıyla ultrason destekli yeşil ekstraksiyonu ve hızlı YPITK analizini kullanmıştır. Stevianın kurutulmuş yapraklarından elde edilen steviosit, yeşil bir gliserol olarak ve genel olarak güvenli (GGOK) bir solvent olarak tanınan prob tipi sonikasyon sistemi vasıtasıyla ekstrakte edilmiştir. Steviadan steviositin ultrason destekli ekstraksiyonu (UDE) için optimum koşullar solvent olarak gliserol, 70 °C sıcaklık, 1:30 bitki:solvent oranı, 0,075 mm bitki tozu partikül boyutu, 200 W ultrason ışınlama gücü ve 20 kHz ultrason ışınlama frekansı olarak bildirilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyonun stevia yapraklarından steviol glikozit ekstraksiyonu için Soxhlet ve maserasyon yöntemleriyle karşılaştırıldığında etkili, hızlı ve ekonomik bir yöntem olduğu bulunmuştur.

Stevia yapraklarından elde edilen Steviol glikozitler, beş değişkenli (zaman, sıcaklık, çalkalama, öğütme ve numune-solvent oranı) faktöriyel tarama tasarımı ve

ardından Box-Behnken Yüzey-Yanıt tasarımı uygulanarak optimize edilmiştir (Lopez-Carbon vd. 2019). Optimize edilmiş ekstraksiyon yöntemi stevia tatlandırıcılarının maliyetleri düşürmek için yardımcı bir enerji kaynağı uygulanmadan çözücü olarak su kullanılarak basit ve verimli bir şekilde geri kazanılmasına izin vermekte ve böylece endüstriyel ölçekte üretimleri için ilginç bir stratejiyi temsil etmektedir.

Arslan Kulcan ve Karhan (2020) dekantör santrifüj ekstraksiyonunda proses parametrelerinin steviosit ve rebaudiosit A üzerindeki etkisini saptamıştır. Stevia yapraklarından steviol glikozitlerin izolasyonu için dekantör ekstraksiyon olasılığını belirlemek amacıyla sıcaklık, zaman ve yaprak/su oranı gibi ekstraksiyon parametreleri "Yüzey-Yanıt Metodu" kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda belirlenen optimum uygulama kombinasyonu 25°C ekstraksiyon sıcaklığı, 1/27,6 yaprak/su oranı ve 105 dakika ekstraksiyon süresi olmuştur. Stevia ekstraksiyonunun dekantör kullanılarak 25°C'de yüksek verimlilikle başarıyla yapılabildiği görülmüştür. Dekantörün dönüş hızı arttıkça "G" değeri yükselmiş ve ekstraksiyon verimi artmıştır. Dekantör ekstraksiyonu uygulaması yapraklarda bulunan toplam steviosit ve rebaudiosit A'nın %73'ünün ekstrakte edilmesini sağlamıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışması Akdeniz Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümünde gerçekleştirilmiş olup kullanılan materyal ve metotlar aşağıda açıklanmıştır.

3.1.1. Deneysel Tasarım

Stevia ekstraktlarının hazırlanmasında kullanılan deneysel kurulum Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel tasarımın kurulumu

Başlık	Açıklama
Yapraklar	Yaş ve kuru Stevia yaprakları
Ekstraksiyon Yöntemleri	Saf su ile ekstraksiyon Etanol ile ekstraksiyon
Tekrar Sayısı	3
Deneme Dizaynı	Box-Behnken
Kalite Parametreleri	Steviol Glikozit İçeriği (SGs), Toplam Kuru Madde (TKM), Titrasyon Asitliği (TA), Toplam Fenolik Madde İçeriği (TFM), Toplam Antioksidan Aktivite (AA), SÇM, pH değeri ve Elek analizi
İstatistiksel Analizler	Verilerin istatistiksel analizi SPSS (IBM Corp.Version 20.0.0) ve Tasarım-Uzman yazılımı (Version 12.0.3, Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD) programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Hammaddeler

Tez çalışmasında hammadde olarak kullanılan stevia yaprakları Akdeniz Üniversitesi Kampüsü içinde yetiştirilen “Levent 93” çeşidinden elde edilmiştir. Yapraklar hasat işleminden sonra yaş (Şekil 3.1b) ve kuru (Şekil 3.1a) olmak üzere iki gruba ayrılarak ekstraksiyon denemelerinde kullanılmıştır. Kurutma işlemi geleneksel yöntemle ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

Yapraklar kurutulduktan sonra yığın içerisinde bulunan yapraklar dışındaki safsızlıklardan arındırılmış daha sonra ekstraksiyona hazır hale getirilmiştir. Kuru Stevia yaprakları saf su ve etanol ile olmak üzere iki çeşit solvent kullanılarak ekstrakte edilirken yaş yapraklar saf su kullanılarak ekstrakte edilmiştir.



Şekil 3.1. Stevia çeşidinin (Levent 93) yaprakları: (a) Kuru, (b) Yaş

3.1.3. Stevia Ekstraktlarının Hazırlanmasında Kullanılan DeneySEL Tasarım

DeneySEL plan, üç seviyeli tasarım olarak belirlenmiştir (Box ve Behnken 1960). Box-Behnken deney tasarımını (BBT) kullanan Design-Expert yazılımının yüzey-yanıt metodu (YYM), Çizelge 3.2’de bildirilen parametrelerin tahmini için kullanılmıştır. Modelde majör steviol glikozitlerin (reb-A, steviosit ve reb-C) ekstraksiyonunu etkileyen üç değişken seyreltme faktörü, proses sırasındaki sıcaklık ve santrifüj kuvveti (G kuvveti) olarak belirlenmiştir. Değişkenlerin etkileri ekstraktların SGs içeriği, SÇM, TKM, pH değeri, toplam fenolik madde konsantrasyonu, antioksidan aktivite ve titre edilebilir asitlik düzeyi analiz edilerek saptanmıştır. Sonuç olarak, yaş ve kuru stevia yapraklarından steviol glikozitlerin ekstraksiyon koşullarının incelenmesi, üç seviyede üç değişken içeren ve toplam üç tekerrür içeren üç merkezi noktada gerçekleştirilmiştir. Yanıt değerleri reb-A, reb-C ve steviosit ekstraksiyon verimi (g/100g kuru yaprak) olarak ifade edilmiştir. YYM için, toplam deney sayısı = (Değişken sayısı) 2 + Değişken sayısı + Merkezi noktalar olmak üzere üç değişkenli deneme deseni için her tekerrürde toplam deney sayısı 15 olarak saptanmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.2. Ekstraksiyon parametreleri

Parametreler	Maksimum	Minimum
Seyreltme faktörü (kat)	10	5
Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)	50	40
Santrifüj kuvveti (xG)	3400	2400

Solventin su veya etanol olmasına bağlı olmaksızın kurutulmuş stevia yaprağı ile yapılan her bir ekstraksiyon denemesi için seyreltme faktörü, işlem sırasındaki sıcaklık ve santrifüj kuvveti Box-Behnken yazılımının önceden tanımlanmış koşullarına göre belirlenmiştir. Deiyonize su ile yaş stevia yaprağından ekstraksiyon için de aynı koşullar uygulanmıştır.

Çizelge 3.3. Üç faktörlü Box-Behnken tasarımından ekstraksiyonlar için elde edilen deneme koşulları

Sıra	Seyreltme faktörü (kat)	Santrifüj kuvveti (xG)	Ekstraksiyon sıcaklığı (°C)
1	7,5	2900	45
2	7,5	2900	45
3	5	2900	50
4	5	2400	45
5	10	2900	40
6	7,5	2900	45
7	7,5	3400	40
8	5	2900	40
9	7,5	3400	50
10	10	2900	50
11	10	3400	45
12	7,5	2400	50
13	5	3400	45
14	7,5	2400	40
15	10	2400	45

3.1.4. Box-Behnken yazılımının önceden tanımlanmış koşullarının kodlanması

Kullanılan faktörler olan, A: seyreltme faktörü (5, 7,5 ve 10 kat), B: ekstraksiyon sıcaklığı (40, 45 ve 50 ° C) ve C: santrifüj kuvvetine bağlı olarak her uygulama için basit bir kodlama oluşturulmuştur (Çizelge 3.4).

Bu, ilk satırın seyreltme faktörüne ait olduğu anlamına gelmektedir; A=5 katı, B=7,5 katı ve C=10 katıdır. İkincisi, ekstraksiyon işlemi sırasındaki sıcaklıkları temsil edmektedir: 40=40°C, 45=45°C ve 50=50°C. Son satır santrifüj kuvveti içindir: A=2400xG, B=2900xG ve C=3400xG.

Örneğin; A40B: 30 dakika boyunca 40°C'de 5 kat seyreltilmiş ekstrakt ve 2900xG'de santrifüj kuvvetini belirtmektedir.

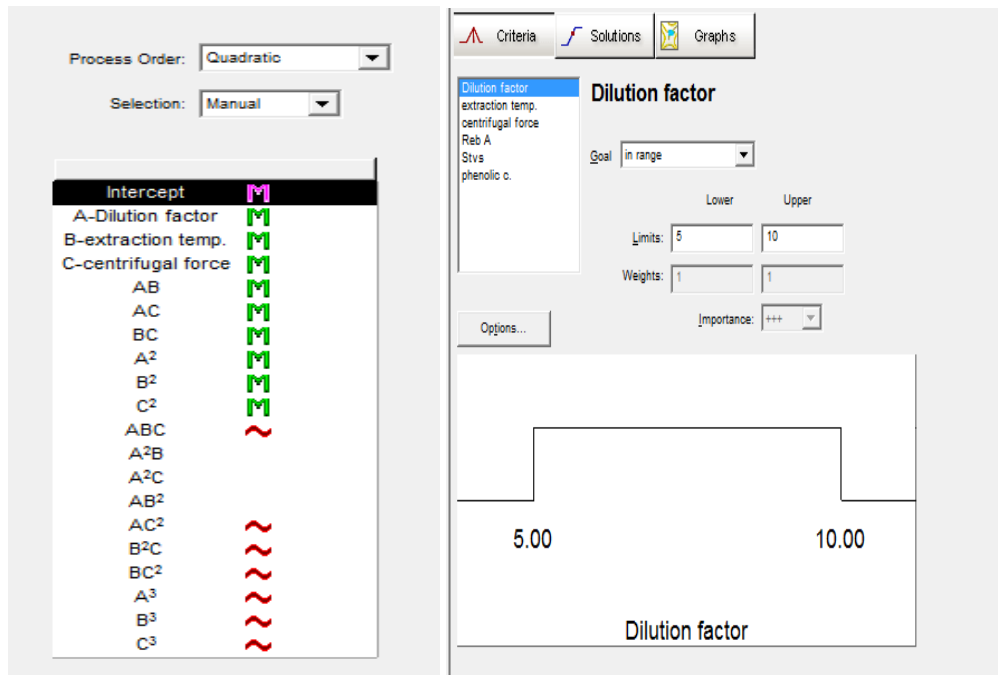
Çizelge 3.4. Ekstraksiyonlar için üç faktörlü Box-Behnken tasarımında elde edilen tahmin koşullarının kodlanması

Sıra	Seyreltme faktörü (kat)	Ekstraksiyon sıcaklık (°C)	Santrifüj kuvveti (xG)	Kodlama
1	7,5	45	2900	B45B1
2	7,5	45	2900	B45B2
3	5	50	2900	A50B
4	5	45	2400	A45A
5	10	40	2900	C40B
6	7,5	45	2900	B45B3
7	7,5	40	3400	B40C
8	5	40	2900	A40B
9	7,5	50	3400	B50C
10	10	50	2900	C50B
11	10	45	3400	C45C
12	7,5	50	2400	B50A
13	5	45	3400	A45C
14	7,5	40	2400	B40A
15	10	45	2400	C45A

3.1.5. Ekstraksiyon İşleminin Optimizasyonu İçin Deneysel Tasarım

Tez kapsamında gerçekleştirilen optimizasyon için Design Expert Software (Stat-Ease® 12.0, Minneapolis, MN, USA) programı kullanılmıştır. Elde edilen verilere çoklu regresyon analizi uygulanmış ve yüzey diyagramları oluşturulmuştur (şekil 3.2). Modelin yeterliliği, F oranı, korelasyon katsayısı (R^2) ve uyumsuzluk testi kullanılarak tespit

edilmiştir. Hesaplanan F oranı F değerinden fazla olduğunda ve uyumsuzluk testi (LoF) önemsiz olduğunda ($P>0,05$) modeller yeterli kabul edilmiştir.



Şekil 3.2. Üç değişkenli denemenin optimizasyon prosedürü

3.2. Metot

3.2.1. Elek Analizleri

Kuru stevia yaprağı tozlarının partikül boyutu dağılımı oda sıcaklığında ve kuru ortamda Lazer Difraksiyon Elek Cihazı (Master Sizer 3000, Malvern Instruments France, Orsay, France) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Parçalanmış yapraklar <50 µm, 50–250 µm, 250–500 µm, 500 µm–1 mm, 1–2 mm ve 2–4 mm partikül boyutu olacak şekilde elenerek sınıflandırılmıştır. Bu şekilde elde edilen standart boyuttaki öğütülmüş örnekler deneme deseni içindeki tüm uygulamalarda kullanılmıştır.



Şekil 3.3. Elek analizinde kullanılan cihaz

3.2.2. Stevia yapraklarından Steviol Glikozitlerin Ekstraksiyonu

Yaş ve kurutulup öğütülmüş stevia yapraklarından steviol glikozitler saf su ve etanol kullanılarak ekstrakte edilmiştir.

3.2.2.1. Saf Su ile Ekstraksiyon

Kurutulup öğütülmüş olan stevia yaprakları bir karıştırıcı yardımıyla sabit oranlarda (5, 7,5 ve 10 kat) 1 dakika boyunca su ile karıştırılmış ve homojen hale getirilmiştir. İşlemin ardından su banyosunda (40, 45 ve 50°C) 30 dakika bekletilen karışım yarım saat santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası Şekil 3.4'te gösterildiği gibi süpernatant kısımda kalan faz alınarak kaba filtreden geçirilmiştir.

Elde edilen ekstrakt oda sıcaklığında soğumaya bırakılmıştır. Aynı işlem basamakları yaş stevia yapraklarına da uygulanmış ve ekstraktlar elde edilmiştir. Yaş ve kuru yapraklardan elde edilen bütün ekstraktlar kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir.



(a)

(b)

(c)

Şekil 3.4. Stevia yapraklarından sulu ekstraksiyonun bazı adımları: (a) santrifüjleme adımı, (b) santrifüj adımıdan sonra ekstraktların durumu, (c) süpernatant kısmının filtrasyonu.

3.2.2.2. Etanol ile Ekstraksiyon

Etanol ile ekstraksiyon işleminde saf su ile ekstraksiyonda olduğu gibi kuru ve yaş yapraklar ağırlıkça sabit oranlarda (120:600, 80:600 ve 60:600 yaprak: etanol) etanol ile karıştırılmıştır. Etil alkolle ekstraksiyonda ise sadece kurutulmuş yapraklar farklı sıcaklıklarda (40, 45 ve 50°C) sabit sürede (30 dakika) %96 saflıktaki etanol ile karıştırılarak ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.5). Isıtma işleminden sonra 30 dakika süreyle santrifüj edilen karışımlar kaba filtre yardımıyla filtre edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar kalitatif ve kantitatif olarak analiz edilmiştir.



(a)

(b)

(c)

Şekil 3.5. Etanol ekstraksiyonunun bazı adımları: (a) tartım ölçümü, (b) etanol ile karıştırma, (c) süpernatant kısmının filtrasyonu

3.2.2.3. Toplam Kuru Madde (TKM) Tayini

Stevia ekstraktlarının toplam kuru madde miktarının tayini amacıyla ekstraktlardan 20 ml alınarak daha önce sabit tartıma getirilen ve daraları alınan petri kaplarına aktarılmıştır. Petri kapları sabit tartıma ulaşana kadar 70° C sıcaklıkta sabit tutulan etüvde (Şekil 3.6) (Memmert, Germany) bekletilmiştir. Yaş ve kurutulmuş stevia

yapraklarındaki kuru madde miktarının tayini için ise 3 g yaprak örneği tartılarak aynı işlemler tekrarlanmıştır.

$$\% \text{ Toplam Kuru Madde} = 100 - [((M2-M1) / M) * 100 * SF]$$

M1: Sabit tartıma getirilen petrinin ağırlığı (g)

M2: Boş petrinin ağırlığı + Örnek miktarı (g)

M: Örnek Miktarı (g)

SF: Seyreltme Faktörü



Şekil 3.6. TKM analizi için kullanılan kurutucu

3.2.2.4. Suda Çözünen Toplam Madde (SÇM) Tayini

Saf su ve etanol kullanılarak elde edilen ekstraktlar vortex (WYA marka) yardımıyla homojenize edilmiştir. Ardından Abbe refraktometresi (Isolab, Almanya) kullanılarak yaklaşık 20 µL ekstrakt prizmaya damlatılarak suda çözünen kuru madde miktarı tayin edilmiştir (Şekil 3.7) (Cemeroğlu, 2007). Elde edilen bulgular °Briks olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.7. Suda Çözünen Kuru Madde analizi için kullanılan refraktometre cihazı

3.2.2.5. Titrasyon Asitliği (TA) ve pH tayini

Örneklerde pH değeri ve asitlik tayini için ekstraksiyon sonrasında alınan örnekler analiz anına kadar 4°C'de saklanmıştır. Her ekstrakttan 10 ml örnek alınıp pH metre (FE20-Five Easy, Mettler-Toledo, Ohio, ABD) yardımıyla pH değeri ve titre edilebilir asitlik miktarı saptanmıştır (Şekil 3.8). Titre edilebilir asitlik meq/100g sitrik asit olarak ifade edilmiştir (Cemeroğlu 2007).

Titrasyon asitliği (%): $(V \cdot F \cdot 100 / M) \cdot E$

F:1

M: titre edilen örneğin gerçek miktarı (g)

E: 1ml 0,1N NaOH'in eş deger asit miktarı

V: Harcanan 0,1 NaOH miktarı (mL)

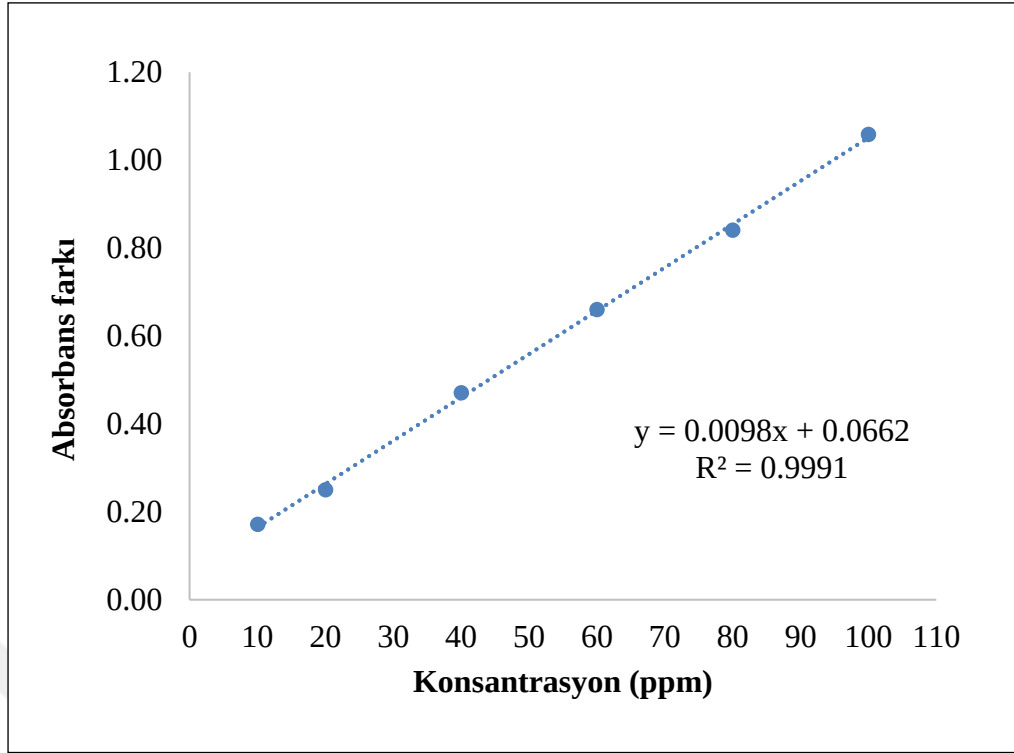


Şekil 3.8. Toplam asitlik tayini

3.2.2.6. Toplam Fenolik Madde (TFM) Tayini

Toplam fenolik madde tayini Singleton vd. (1999) tarafından tanımlanan metotta çeşitli modifikasyonlar yapılarak spektrofotometrik yöntemle Folin-Ciocalteu ayracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 25 kat seyreltilen örneklerden 500 µl alınarak test tüplerine aktarılmış ve örnekler 10 kat hacimde saf su ile seyreltilmiş olan 2,5 ml 2 N Folin-Ciocalteu ayracı eklenerek karıştırılmıştır.

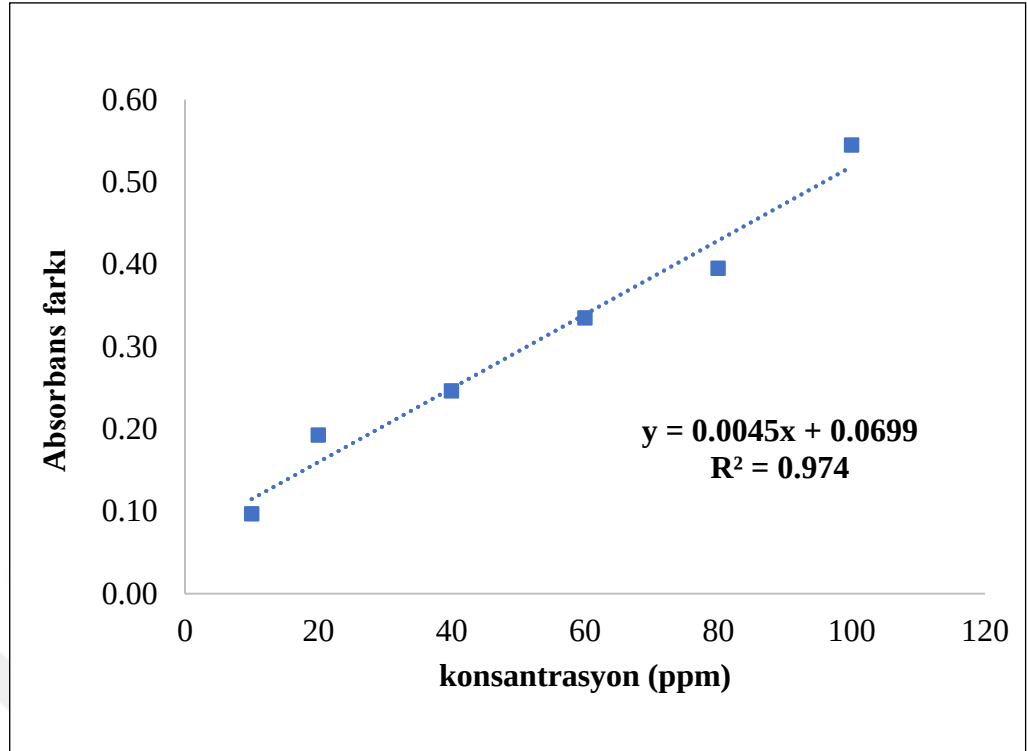
Daha sonra örnekler oda sıcaklığındaki karanlık bir ortamda 3 dakika boyunca bekletilmiştir. Bekleme sonrasında örneklere 2 mL %5'lik sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ilave edilmiş ve renk değişimi için 5 dakika boyunca 50°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında soğutulan örneklere ait absorbans değerleri spektrometre cihazı (Shimadzu UV-160A) kullanılarak ölçülmüştür. Aynı işlem basamakları gallik asit (0,5 g/L) standart eğrisini (0–100 ppm) elde etmek için tekrar edilmiştir (Şekil 3.9). Oluşturulan gallik asit standart eğrisi yardımıyla sonuçlar hesaplanmış ve gallik asit eşdeğeri GAE/100 g kuru madde) cinsinden verilmiştir. Tüm analizler üç tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9. Galik asit standardı kullanılarak elde edilen kurve

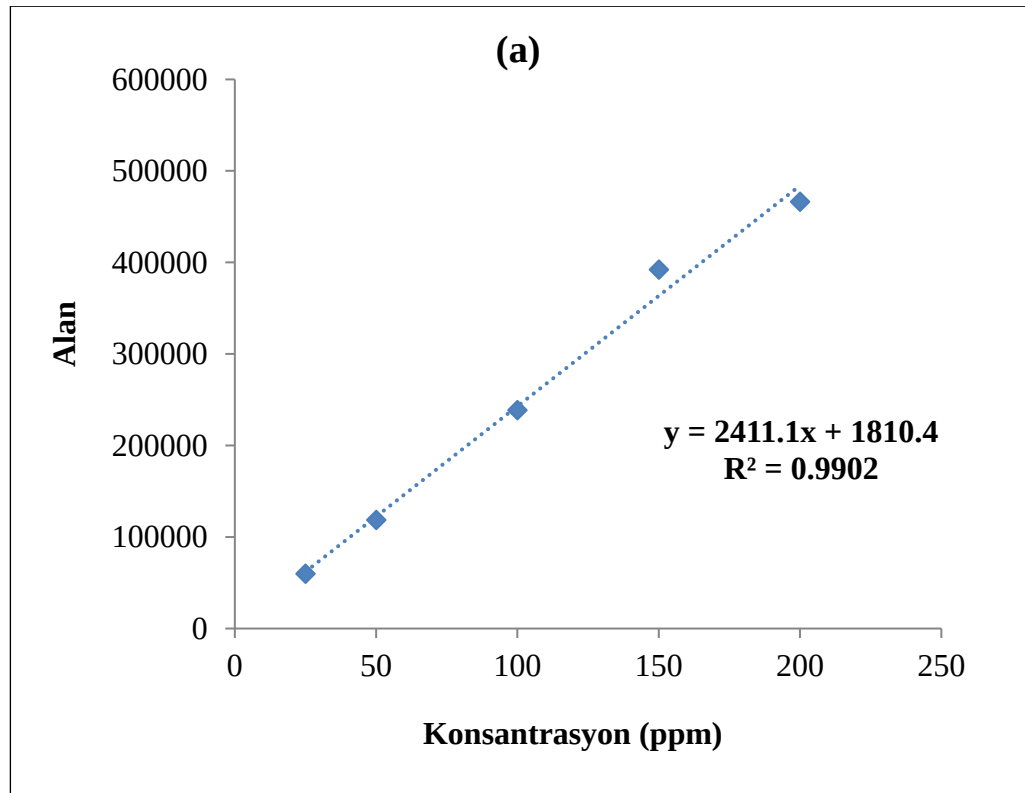
3.2.2.7. Antioksidan Aktivite (AA) Tayini

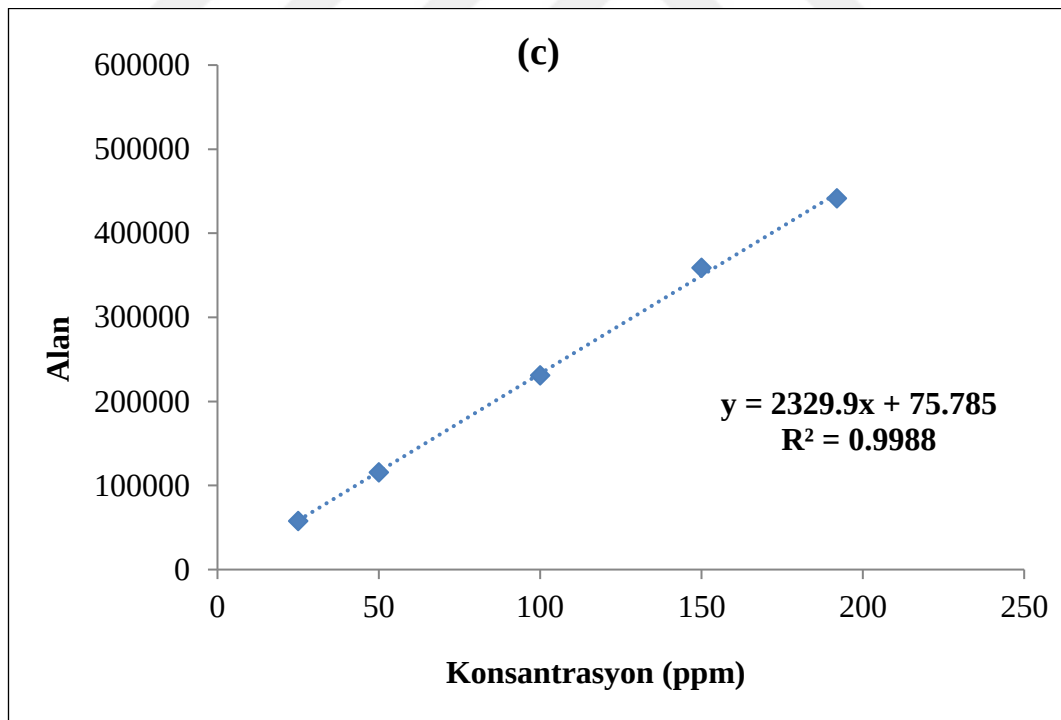
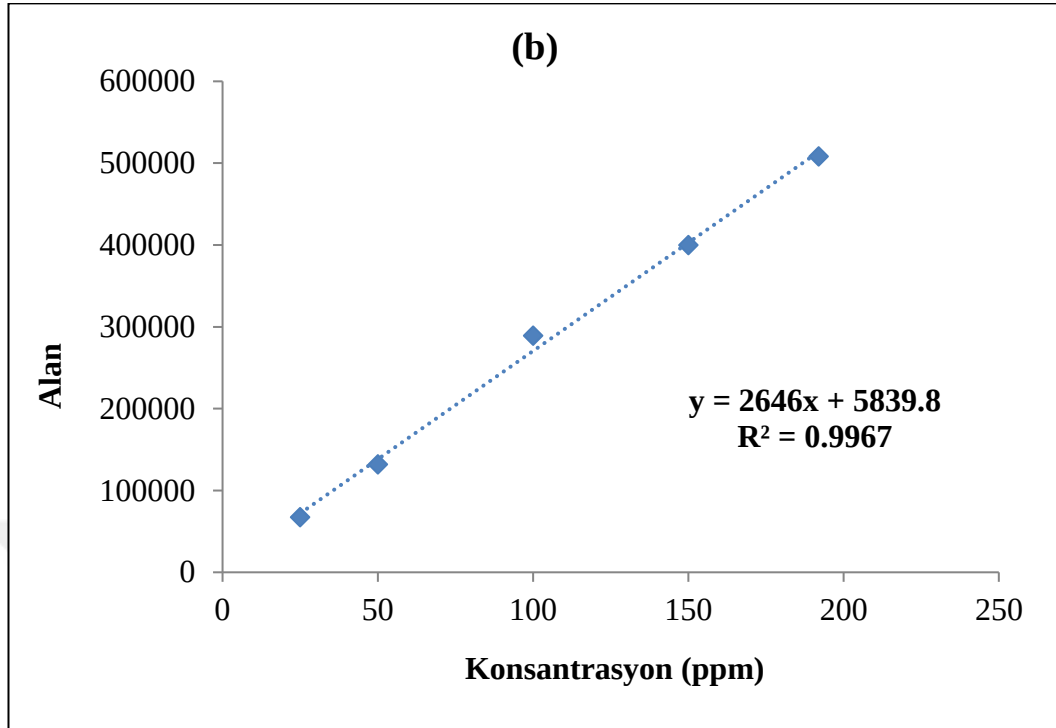
Ekstraktlarda antioksidan kapasite tayini Shahidi vd. (2006) tarafından önerilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Metot antioksidan özellik gösteren maddelerin 2,2 – difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali ile tepkimesine dayanmaktadır. Bu amaçla, elde edilen ekstraktlardan 100 µl alınarak üzerlerine metanol ile hazırlanan 1,9 ml 6×10^{-5} M DPPH çözeltisi eklenerek etkin bir şekilde karıştırılmış ve 30 dakika süreyle karanlıkta bekletilmiştir. İşlem sonunda spektrofotometrede (UV-VIS Shimadzu) 515 nm dalga boyunda örneklerin absorbans değerleri okunmuş, metanol kör örnek olarak kullanılmıştır. Sonuçlar daha önceden oluşturulan Trolox (6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametil kroman-2-karboksilik asit) standart eğrisi (Şekil 3.10) kullanılarak g Trolox/g stevia ekstraktı (kuru madde) cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.10. Trolox standardı kullanılarak elde edilen kurve

3.2.2.8. Steviol Glikozitlerin Tayini ve Miktarının Hesaplanması





Şekil 3.11. Elde edilen ve kullanılan standart Steviol glikozit eğrileri (a) Rebaudiosit A (b) Steviosit (c) Rebaudiosit C.

Sulu ve etanolik ekstraktlarda bulunan toplam steviol glikozitler yüksek performanslı sıvı kromatografisinde harici standart yöntemine göre tanımlanmış ve miktarları saptanmıştır (Anonim 2012). Elde edilen tüm ekstraktlar önce 25 kez seyreltilmiş daha sonra bir Nucleodur MN C18ec kolonu (5 μ m, 250 x 4.6 mm, ID) ile katı faz ekstraksiyonu yapıldıktan sonra analize hazır hale getirilmiştir. PDA (Photodiode Array) dedektör sistemine bağlı HPLC cihazında enjeksiyon öncesinde 0.45 μ m filtreden süzölmüştür. Mobil faz olarak 68:32 oranında (h/h) Asetonitril (HPLC grade, Merck): sodyum fosfat tamponu (pH 2.6) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 0.8 mL/dk, numune enjeksiyon hacmi 10 μ l ve kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır.

Steviol glikozitlerin tespiti PDA dedektörde 210 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve elde edilen piklerin alanı standart kurvelerle (Şekil 3.11) karşılaştırılarak miktar tayini gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. SGs'lerin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılan HPLC cihazı

3.2.3. İstatistiksel Analizler

Tez kapsamında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinin optimize edilmesi ve seçilen parametrelerin interaksiyonlarının belirlenmesi için Box-Behnken YYM (Stat-Ease, Minneapolis, MN, ABD. Stat-Ease, Inc. Design-Expert® 7 programı sürüm 12.0.) kullanılmıştır. Diğer aşamalarda elde edilen sonuçlara ait varyans analizi (ANOVA), temel bileşen analizi (PCA Testi) ve varyasyon kaynaklarının ortalamalarını karşılaştırmak için SPSS (SPSS Inc., Chicago, ABD) yazılımı kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön deneme

4.1.1. Ekstraksiyon Parametrelerinin belirlenmesi

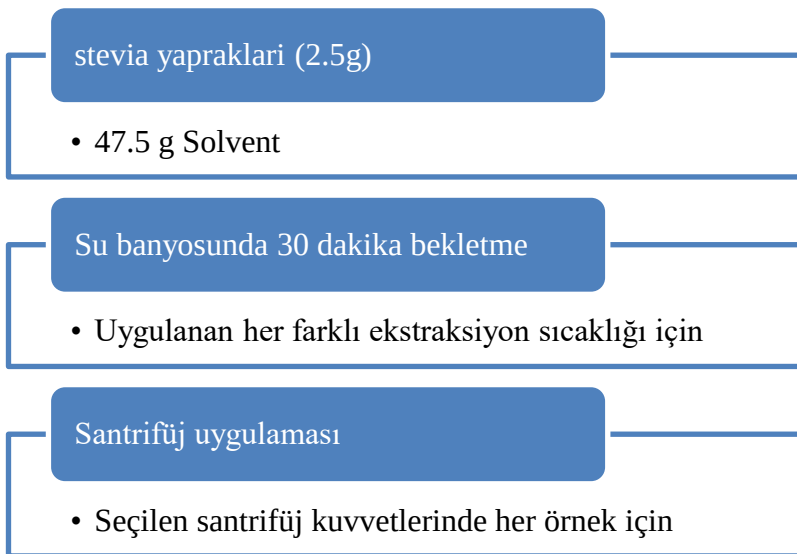
Yapılan ön deneme çalışmasında uygun hammaddenin seçimi ve ekstraksiyonu etkileyen parametrelerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ön denemelerde iki farklı çeşit kurutulmuş stevia yaprakları kullanılmış ve bu örnekler 4K ve 93K olarak kodlanmıştır. Ekstraksiyon parametrelerinin belirlenmesinde ekstraktların biyoaktivitesini ve verimini etkileyen parametreler (ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözünen: solvent oranı, solvent tipi) dikkate alınmıştır (Yang vd. 2010). Gıda endüstrisinde genel olarak güvenli kabul edildiği (GRAS) ve son üründen uzaklaştırılması kolay olduğu için ön deneme çalışmasında solvent olarak su ve etanol kullanılmıştır (Moraes vd. 2013). Ekstraksiyon ve santrifüj süresi her deneme için sabit (30 dakika) tutulmuştur. Daha önce yapılan steviol glikozitlerin eldesindeki optimizasyon çalışmaları dikkate alınarak deneme deseni oluşturulmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Seçilmiş ekstraksiyon parametreleri ve seviyeleri

Parametreler	Maksimum	Orta nokta	Minimum
Solvent	Su/etanol	Su/etanol	Su/etanol
Santrifüj kuvveti (xG)	3400	2900	2400
Sıcaklık (°C)	60	45	30

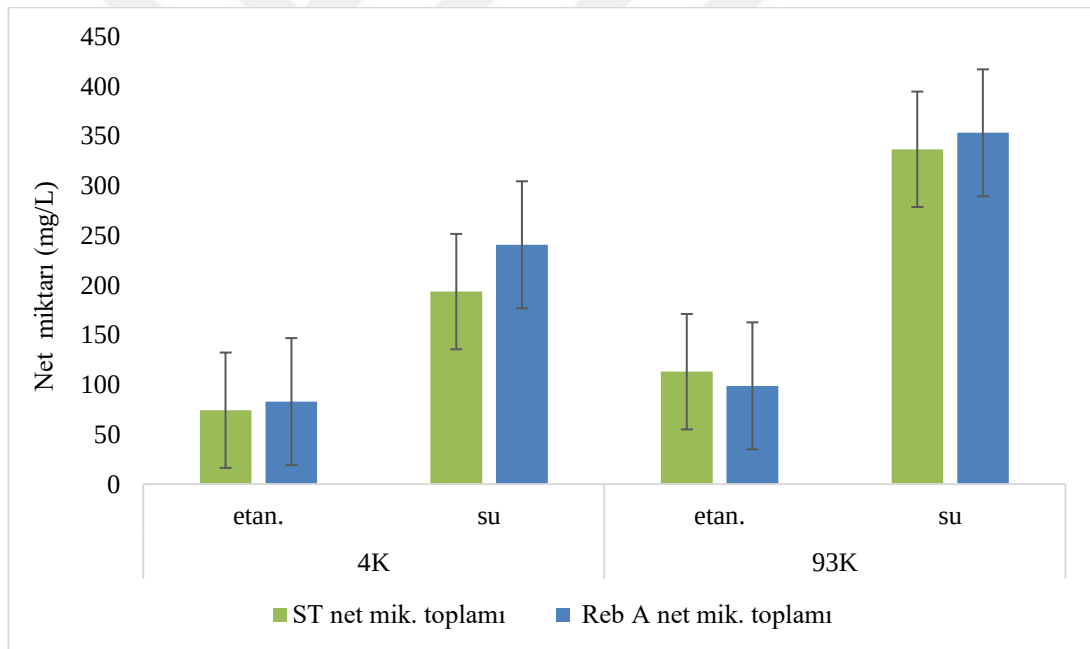
4.1.2. Ön denemelerin bulguları ve tartışması

Şekil 4.1'de açıklanan ekstraksiyon adımlarından sonra yapılan analiz, iki tekerrür olarak gerçekleştirilmiştir. Ön denemelerde ekstraksiyon adımları Şekil 4.1'deki gibi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. Steviol glikozitlerin ön denemelerde ekstraksiyon aşamaları

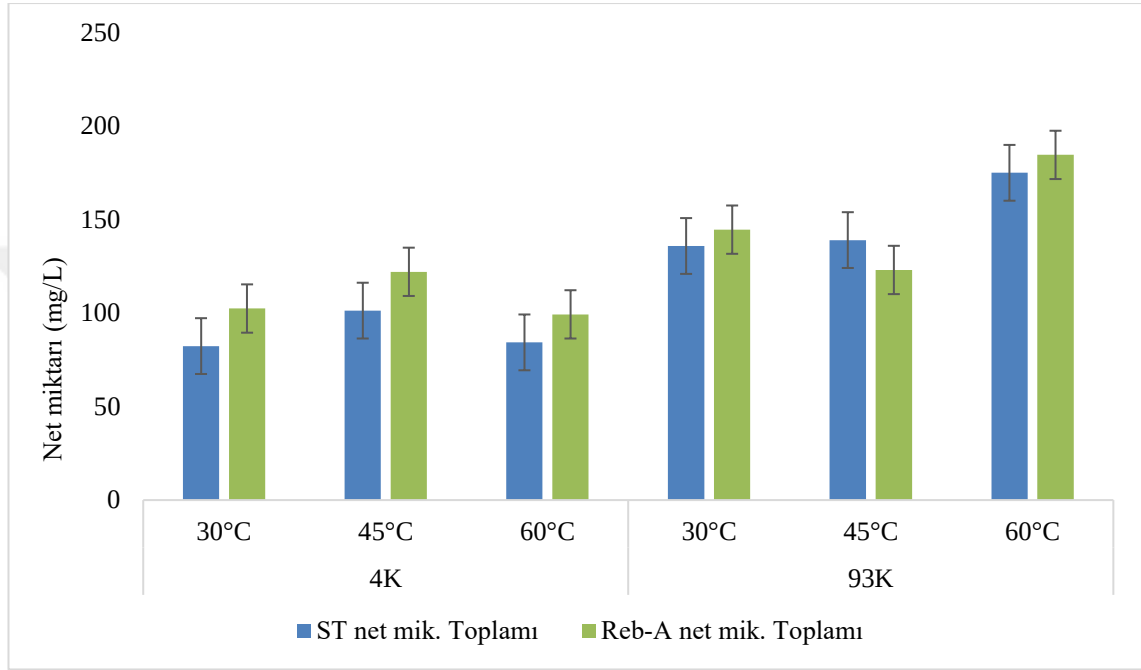
Ekstraksiyon işleminde kullanılan solventlerin steviol glikozitlerin ekstraksiyonu üzerine etkisi Şekil 4.2’de verilmiştir. Ön deneme sonuçlarına göre 93K kodlu stevia yaprağının (Levent 93) 4K kodlu stevia yaprağından daha fazla steviol glikozit içerdiği görülmüştür. Su ve etanol çözgenleri ile yapılan ekstraksiyon işleminde steviol glikozit miktarı 93K yaprak örneğinde su ve etanol çözgenlerinde sırasıyla 690 mg/L ve 312 mg/L; 4K yaprak örneğinde ise sırasıyla 433 mg/L ve 156 mg/L olarak belirlenmiştir. Suyun steviol glikozitleri bağlama gücünün santrifüj kuvvetinin etkisi ile etanolden daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Benzer olarak Yen (2019) tarafından yapılan çalışmada suyun yüksek solvent gücüne sahip olduğu; steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için sıcak su kullanımının biyoaktif bileşik ve diğer çözünenlerin özellikle steviositin çözünürlüğü üzerinde olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ultrases ve mikrodalga destekli ekstraksiyon işlemi yapılmış ve solvent olarak su kullanımının maksimum steviol glikozit verimi sağladığı görülmüştür (Periche vd. 2015b). Yapılan iki çalışmada rebaudiosit A miktarının steviosit miktarından daha az olduğu bildirilmiştir. Reb-A’nın steviosite göre daha az acı tada sahip olması yiyecek ve içecek endüstrisinde kullanımında diğer steviol glikozitlere göre daha çok tercih edilmesine neden olmuştur (Kennelly vd. 2001; Formigoni vd. 2018b).



Şekil 4.2. Solvent etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması

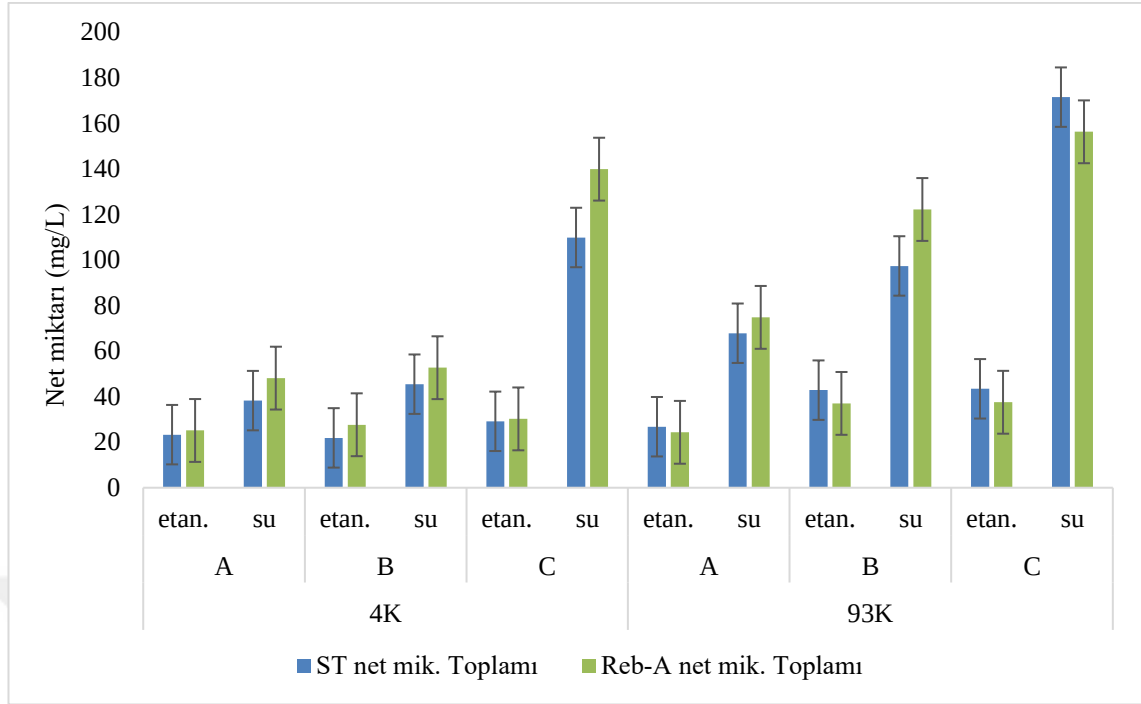
Ekstraksiyon işleminde en önemli parametrelerden biri olan sıcaklığın (Yen 2019) steviol glikozitler üzerindeki etkisi Şekil 4.3'te gösterilmiştir. Ekstraksiyon verimi solvent tipine bağlı olarak büyük ölçüde değişmiştir. Solvent olarak su kullanımında sıcaklığın artmasıyla birlikte SGs miktarının da arttığı; en yüksek SGs miktarının 93K yaprak örneğinde elde edildiği görülmüştür. Etanol ile yapılan ekstraksiyon işleminin sonucunda ise reb-A ve steviosit miktarının su ile yapılan ekstraksiyon işlemine göre daha az olduğu ve sıcaklık uygulamasına bağlı olarak SGs miktarının düzensiz bir davranış sergilediği görülmüştür. Ekstraksiyon veriminde sıcaklık parametresinin solvent tipi ile bağlantılı

olduğu tespit edilmiştir. Ekstraksiyonda sıcaklığın artmasıyla birlikte suyun viskozitesi azalmakta bununla birlikte suyun çözücü gücü de artmaktadır (Rouhani 2019). Yapılan diğer çalışmalarda da sıcaklığın artmasıyla birlikte SGs veriminin de arttığı görülmüştür (Puri vd. 2012; Jentzer vd. 2015). Bu tez çalışmasında kullanılan 93K ve 4K yaprak örnekleri için optimum sıcaklıklar sırasıyla 60 ve 45°C olarak belirlenmiştir. Ayrıca sıcaklığın etkisinin materyalin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlı olarak değişeceği de bilinmektedir (Rodríguez-Pérez vd. 2016).



Şekil 4.3. Sıcaklık etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması

Santrifüj kuvvetinin steviol glikozit difüzyonu üzerine etkisi Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Solvent tipinden bağımsız olarak santrifüj kuvvetinin artması steviol glikozit verimini artırmıştır. Sonuç olarak, SGs verimi toplamı 4K çeşidinin etanol ve su ekstraktları için sırasıyla 2500 ve 3000xG’de 48,44-59,38 mg/L ve 86,36-249,74 mg/L arasında değişmiştir. Sonuçlar dikkate alındığında uygulanan santrifüj kuvvetinin steviol glikozitlerin solvante difüzyonunu artırdığı görülmüştür. Bu durum çözünen madde ile solvent arasındaki temas yüzeyinin artmasından ve büyük moleküllerin santrifüj kuvvetiyle birlikte sürüklenmesinden kaynaklanmaktadır. Benzer bir etkinin sağlanması amacıyla Angoy vd. (2018) tarafından yapılan çalışmada ikincil metabolitler içeren biyolojik materyallerin hücre dışına difüzyonunun sağlanması, toplanması ve yoğunlaştırılması için mikrodalga destekli santrifüj (MW/C) kullanılmıştır.



Şekil 4.4. Santrifüj kuvveti etkisinin steviol glikozit ekstraksiyonunda karşılaştırılması

4.1.3. Ön denemelerinin sonuçları

Ön denemeler sonucunda 93K çeşidinin gıda sektörü hedefleri için daha uygun hammadde olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bunun nedeni 4K çeşidinden daha fazla steviol glikozit içermesi ve rebaudiosit A oranının yüksek olmasıdır. Endüstriyel ekstraksiyon düşünülerek en uygun ve en ekonomik yöntem belirlenmiştir. Buna ek olarak, SGs difüzyonunda itici güç olarak G kuvvetinin etkili olduğu dekantör ya da santrifüj esaslı ekstraksiyon uygulamasında solvent olarak su kullanımının steviol glikozit verimi üzerinde yüksek etki gösterdiği belirlenmiştir.

4.2. Tez deneme sonuçları

Bu çalışmada stevia yapraklarından suda çözünür formdaki steviol glikozitlerin (SGs) ekstraksiyonu amacıyla alternatif bir yöntem olan dekantör ekstraksiyonu tekniğinin optimize edilmesi için farklı santrifüj kuvvetlerinin değişik koşullardaki etkinliği saptanmıştır. Kurutulmuş ve yaş (taze) stevia yapraklarının ekstraksiyonunda dekantör ekstraksiyonu modelinin uygulama koşullarının optimize edilmesi amaçlanmıştır. Dekantör ekstraksiyonunda doğrudan steviol glikozitlerin difüzyonunu belirleyen faktörler olan solvent sıcaklığı ve oranının sabit öğütme düzeyinde ve 2400 - 3400xG santrifüj kuvveti aralığında saptanması ve böylece dekantör ekstraksiyonu tekniğinin optimize edilmesi hedeflenmiştir.

Ön deneme sonuçlarına göre materyal olarak seçilen "Levent 93" stevia çeşidinin kurutulmuş yaprakları öğütüldükten sonra elek analizi yapılarak materyalin parçalanma iriliği belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Elek analizi sonuçları

Gözenek büyüklüğü	Elek üstünde kalan (%)		
	Maksimum	Minimum	Ortalama
4 mm	2,9	2,0	2,4±0,5
2 mm	12,7	10,4	29,3±1,3
1 mm	30,0	28,5	29,3±0,7
500 mikron	34,0	29,7	32,0±2,1
250 mikron	17,3	15,2	16,2±1,1
50 mikron	5,7	4,7	5,1±0,5
Diğer	2,2	1,9	2,1±0,2

4.2.1. Yaş stevia yapraklarından sulu ekstraksiyon

4.2.1.1. Yaş yaprak ekstraktlarının tanımlayıcı analizleri

Araştırma sırasında materyalin yaş yapraklarından elde edilen ekstraktlar üzerinde yapılan tüm tanımlayıcı analizler; pH değeri, toplam kuru madde (TKM), suda çözünür kuru madde (Bx) ve toplam asitlik (TA) Çizelge 4.3'te sunulmuştur.

Suda çözünür kuru madde analizi için kullanılan laboratuvar tipi Abbe Refraktometresi çok düşük verileri (0,28 °Bx) ölçmemiştir. Dolayısıyla çalışmanın sonraki aşamalarında bu sonuçlar dikkate alınmamıştır.

Bununla birlikte toplam asitlik sonuçlarına bakıldığında TA miktarının solvent miktarı arttıkça yükseldiği görülmektedir. Su oranının artması difüzyonu hızlandırdığı için asitlik düzeyinin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle, yüksek miktarda suyun biyoaktif bileşiklerin çözünürlüğünde olumlu bir etki yaptığı açıktır. Katı ve sıvı arasındaki kütle transferi sonucunda elde edilen toplam steviol glikozit içeriğinin (TSC) ekstraksiyonu için sıcak suyun uygun olduğu Yen (2019) tarafından da bildirilmiştir. Ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça suyun viskozite ve yoğunluk gibi özellikleri azalarak difüzyonu kolaylaşmaktadır (Dacome vd. 2005).

Ekstraksiyon parametrelerinin pH üzerindeki etkisi Çizelge 4.3'te vurgulanmıştır. Burada, 2400, 2900 ve 3400xG santrifüj kuvveti için konsantre, daha fazla seyreltilmiş ve orta derecede seyreltilmiş çözeltiler için 0,20, 0,15 ve 0,09 gibi düşük standart sapma değerlerine ulaşılmıştır. Bu sonuçlar "G" kuvvetinin pH üzerindeki etkisizliğini ortaya koymuştur. Aljinat boncuklar kullanılarak stevia ekstraktının arıtılması üzerinde pH etkisinin araştırılması üzerine bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Mahl vd. 2010).

4.2.1.2. Parametrelerin, sulu yaş stevia ekstraktlarından elde edilen toplam fenolik madde (TFM) üzerindeki etkisi

Çizelge 4.4 yaş stevia yaprağı ekstraktlarının Box-Behnken deneme desenine göre TFM değerlerini göstermektedir. Santrifüj kuvveti, ekstraksiyon sıcaklığı ve seyreltme faktörlerinin yaş stevia yaprağı ekstraktlarından TFM ekstrakte edilen miktarın verim üzerindeki etkisi, deneysel verilerin Multi Lineer Regresyon (MLR) analizi ile değerlendirilmiştir. Geliştirilen modelin tahmini için P değerleri (0,0003) anlamlı bulunmuştur. Modelin F değeri 3,92'dir ve ikinci dereceden polinomun tahmin edilen son denklemi (Denklem 1) aşağıdaki gibidir:

$$Y1(TFM) = 2,8956 + 0,3406 A - 0,0331 B + 0,0580 C - 0,0202 AB + 0,2073 AC - 0,0113 BC + 0,0346A^2 - 0,2525 B^2 - 0,0005 C^2$$

Denklem 1

Kodlanmış denklem genellikle faktörlerin faktör katsayılarının karşılaştırılmasıyla göreceli etkilerinin belirlenmesinde fayda sağlamaktadır. Lemus-Mondaca vd. (2016) yaş stevia yapraklarından $28,76 \pm 2,94$ mg GAE/100 g KM TFM saptamış; Lemus-Mondaca vd. (2018) ise yaş stevia yapraklarından 2,58 g GAE/100 g KM ekstrakte edildiğini belirlemiştir. Farklılıkların ekstraksiyon parametrelerindeki değişikliklerden kaynaklanabildiği düşünülmüştür. YYM tarafından verilen deneysel veriler ile tahmin edilen verilerin karşılaştırılması Şekil 4.5'te gösterilmiştir. En yüksek TFM ekstraksiyon verimi (3,57 g GAE/100 g KM) seyreltme faktörü 10 olan, 50°C ekstraksiyon sıcaklığı ve 2900xG santrifüj kuvvetinde bulunmuştur. Lemus-Mondaca vd. (2016) ise sulu ekstraktlarda TFM miktarını $28,76 \pm 2,94$ mg GAE/100 g KM olarak saptamıştır.

TFM miktarının ekstraktların seyreltilmesi ile orantılı olarak değiştiği YYM modeli tarafından verilen deneysel verilerin 3 boyutlu grafiğini gösteren Şekil 4.6'da görülmektedir. Diğer bir ifadeyle, ekstraktların seyreltme oranı arttıkça TFM verimi de artmaktadır. Bu sonuç fenolik maddelerin suda çözünürlüğünün sınırlı olmasına bağlıdır. Nitekim, çözücü miktarının artması TFM miktarının da yükselmesine neden olmaktadır. Benzer sonuçlar Tunchaiyaphum vd. (2013) ve Sood ve Gupta (2015) tarafından mango ve nar kabuklarından fenolik madde ekstraksiyonu üzerine yaptıkları çalışmalarda da açıklanmıştır. Toplam fenolik madde ekstraksiyonunda en önemli faktörün sıcaklık olduğu Yen (2019) tarafından bildirilmiştir. Çalışmada 40-50 °C arasında değişen ekstraksiyon sıcaklığı TFM verimi üzerinde güçlü bir etki göstermiştir (Şekil 4.6). Yüksek sıcaklık bir solvent içinde analitlerin difüzyon hızı ve çözünürlüğünün artması yoluyla ekstraksiyon verimliliğini artırmaktadır. Bu da seyreltilmiş bir çözelti içinde elde edilen verimi açıklamaktadır (Santos vd. 2012).

Santrifüj kuvvetinin TFM verimi üzerine etkisi Şekil 4.6'da gösterilmektedir. Burada G kuvveti arttıkça, TFM veriminin azaldığı fark edilmektedir. Kısmen düşük G kuvvetinden (2400xG) orta düzeye (2900xG) kadar TFM veriminde önemli artış görülmekte; ancak yüksek G kuvvetine (3400xG) yükselirken ise azalma gözlenmektedir. Bu etki aynı zamanda Schubert vd. (2018) tarafından toplam kuru madde (TS) içeriği üzerinde de gözlemlenmiştir. Burada daha yüksek santrifüj kuvvetlerinde sıkıştırılabilir katılar daha fazla sıkışmakta ve çıkış yolunda tıkanmaların oluşmasına neden olmaktadır.

Bu olgu özellikle 3500xG üzerindeki santrifüj kuvvetleri için gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu sonuçlar, santrifüj kuvvetini artırarak, TFM'nin sediment oluşumu yoluyla ayrılma ihtimalinin daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tez çalışmasında en yüksek miktarda TFM 2900xG'de elde edilmiştir.



Çizelge 4.3. Yaş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların suda çözünür kuru madde, pH değeri, titrasyon asitliği (TA) ve Toplam kuru madde (TKM) değerleri.

Ekstralar	SD	Bx°	pH	TA	TKM
A40B	9	1,54 ± 0,06	5,51±0,81	5,3± 0,04	2,82
A45A	9	1,30 ± 0,09	5,23±0,32	5,2± 0,05	2,19
A45C	9	1,16 ± 0,08	5,40±0,14	4,1± 0,10	1,99
A50B	9	1,09 ± 0,15	5,70±0,15	4,0± 0,06	2,10
B40A	9	0,42 ± 0,05	5,63±0,24	7,2± 0,18	1,20
B40C	9	0,48 ± 0,07	5,75±0,22	6,2± 0,22	1,13
B45B1	9	0,44 ± 0,07	5,58±0,06	8,8± 0,37	1,56
B45B2	9	0,44± 0,05	5,59±0,27	8,8± 0,25	1,44
B45B3	9	0,44 ± 0,10	5,66±0,02	8,9± 0,25	1,49
B50A	9	0,56 ± 0,10	5,62±0,30	9,7± 0,70	1,43
B50C	9	0,40 ± 0,00	5,82±0,40	7,1± 2,47	1,32
C40B	9	ND ± ND	5,62±0,20	12,0± 0,08	1,11
C45A	9	ND ± ND	5,59±0,06	10,6± 0,21	0,97
C45C	9	ND ± ND	5,85±0,38	7,6± 0,03	0,88
C50B	9	0,28 ± 0,07	5,88±0,21	12,3± 0,31	1,17

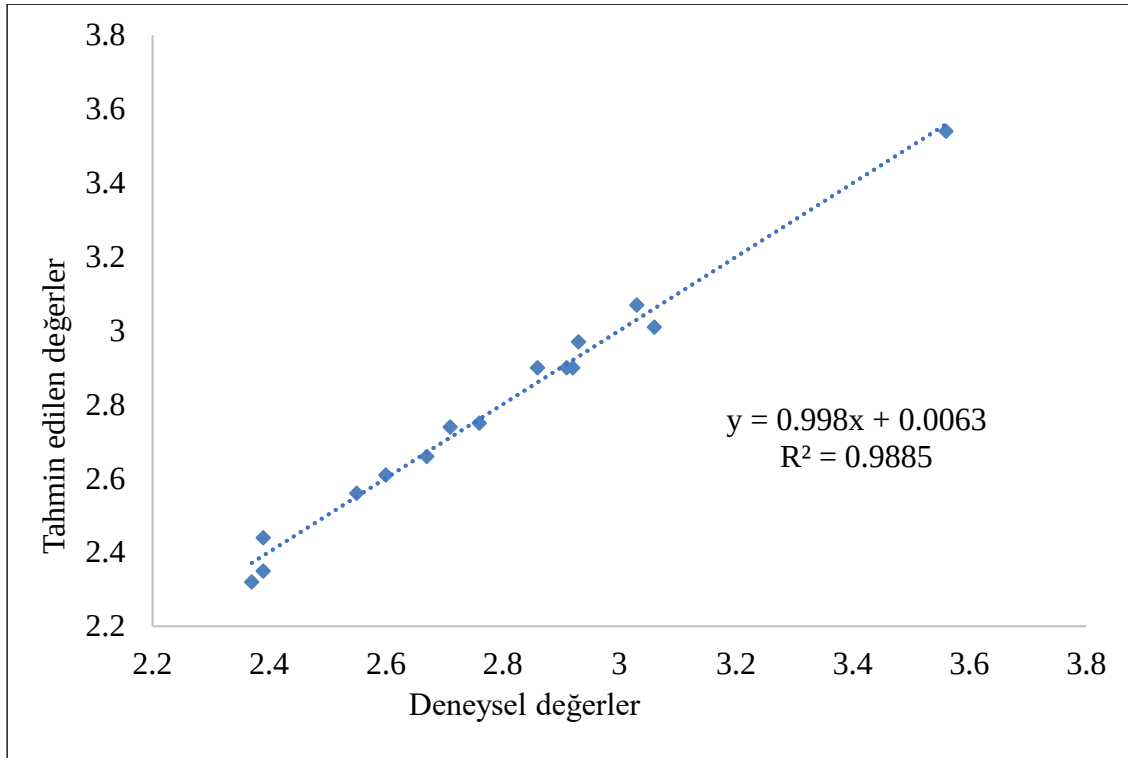
Çizelge 4.4. Box-Behnken tasarımı ve yaş stevia yaprağı ekstraktlarından TFM eldesinin deneysel sonuçları (n=9)

Sıra	B	A	C	TFM (GAE, g/100g KM)
1	2400	5	45	2,39±0,08
2	2400	7,5	50	2,76±0,08
3	2400	7,5	40	2,60±0,13
4	2400	10	45	3,03±0,09
5	2900	7,5	45	2,92±0,14
6	2900	7,5	45	2,91±0,11
7	2900	5	50	2,39±0,09
8	2900	10	40	3,06±0,14
9	2900	7,5	45	2,86±0,08
10	2900	5	40	2,71±0,06
11	2900	10	50	3,56±0,11
12	3400	7,5	40	2,55±0,16
13	3400	7,5	50	2,67±0,15
14	3400	10	45	2,93±0,05
15	3400	5	45	2,37±0,12

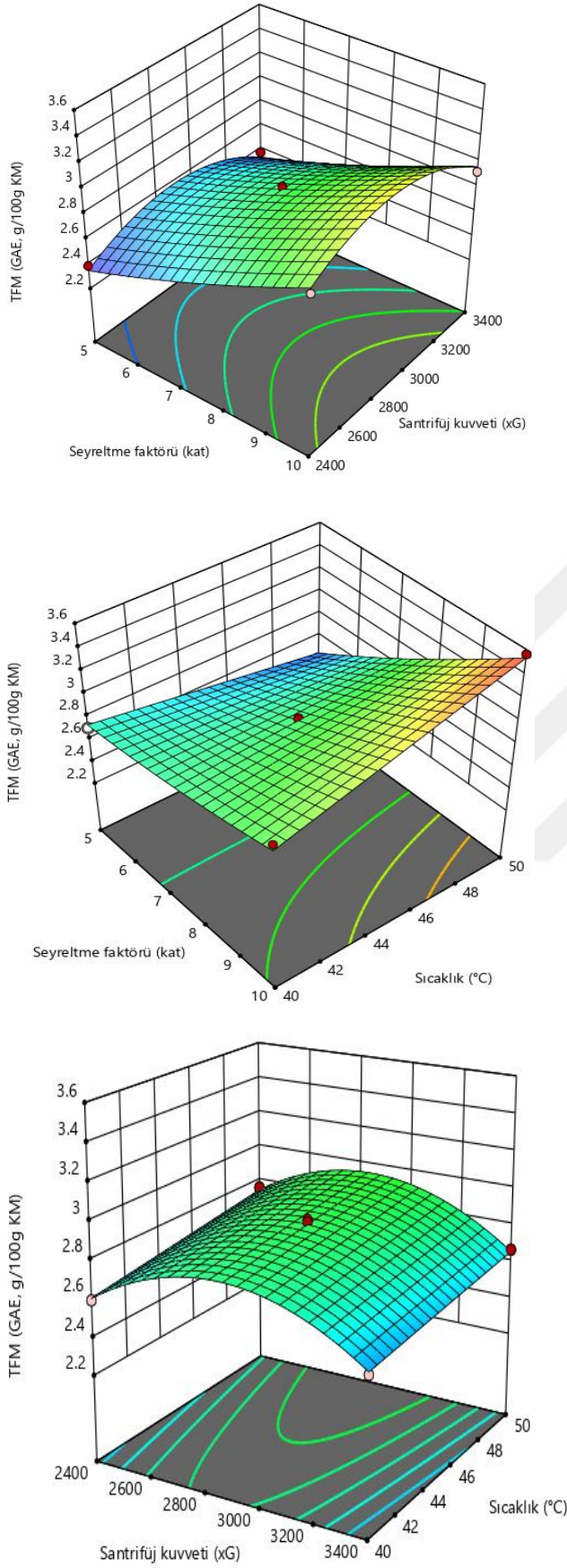
Çizelge 4.5. Yaş stevia yapraklarından elde edilen ekstraktlarının Toplam Fenolik Madde (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	+2,90	0,0003
A	+0,3406	**
B	-0,0331	0,1645
C	+0,0580	*
AB	-0,0202	0,5140
AC	+0,2073	*
BC	-0,0113	0,7095
A ²	+0,0346	0,3001
B ²	-0,2525	*
C ²	-0,0005	0,9884

* P<0,05; ** P<0,01



Şekil 4.5. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklardan deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen TFM değerleri.



Şekil 4.6. YYM modeli ile verilen yaş stevia yapraklarının sulu ekstralarından elde edilen TFM veriminin deneysel verilerinin 3B grafiği.

4.2.1.3. Ekstraksiyon parametrelerinin yaş stevia yaprakları sulu ekstraktlarının antioksidan aktivitesi (AA) üzerine etkisi

Ekstraksiyon değişkenlerinin, Şekil 4.8'te vurgulanan yaş stevia yapraklarının toplam antioksidan aktivitesi (AA) üzerindeki etkileri Trolox kalibrasyonunun elde edilen eğrisinden DPPH radikal aktivitesi ile ölçülmüştür. Tekli elektron transfer mekanizmasına (SET) dayalı α -difenil-pikrilhidrazil (DPPH) analizinin sonuçları Çizelge 4.6'da gösterilmektedir (Dejian Huang vd. 2005). En yüksek AA içeriği, 2900xG santrifüj kuvvetinde, 10 kat seyreltilmiş ekstraktta ve 50°C'lik ekstraksiyon sıcaklığında bulunmuştur. Önceden tanımlanmış farklı koşullar sırasında önemli istatistiksel farklılıklar ($p < 0,05$) gözlenmiştir. Uygulanan modelin korelasyon katsayısı (R^2) 0,9888'dir. Çizelge 4.7'de vurgulanan ikinci dereceden model önemlidir ve ikinci dereceden bir polinom denklemi olan Denklem 2 aşağıdaki gibi belirlenmiştir.

$$Y_2(AA) = 0,0841 + 0,0229A + 0,0211B - 0,0128C - 0,0177 AB + 0,0245 AC + 0,0028 BC + 0,0114A^2 - 0,0052B^2 - 0,0079C^2$$

Denklem 2

AC ve BC'nin etkileşimleri, deney çalışmasının DPPH radikal aktivitesini pozitif olarak etkilerken, seyreltme ve G-kuvveti (AB) arasında negatif bir etki oluşturmuştur. Öte yandan, sonuçların güvenilirliği deneysel ve tahmin edilen değerler karşılaştırılarak Şekil 4.7'da gösterilmiştir. Radikal tahliye aktivitesi (AA) sayısının solvent (saf su) miktarı ve uygulanan G kuvvetleriyle arttığı gözlenmiştir. Ekstraksiyon işleminin 30 dk olması durumunda su hacmi arttığında ekstraktlardaki AA miktarı artmaktadır. Ribeiro vd. (2018) ve Rodríguez-Perez vd. (2016) tarafından elde edilen ve antioksidan reaksiyon mekanizmalarının açıklandığı sonuçlara göre solvent hacmindeki artış bitki vakuollerinden yüksek bir kütle transfer hızına yol açmaktadır. Antioksidan aktivitesinin kurutulmuş stevia yaprakları ekstraktlarından elde edilen ekstraktlarda arttığı ve sıvının viskozite ve yoğunluk gibi özelliklerini azalttığı bulunmuştur. Bu nedenle yüksek sıcaklıklarda ve yüksek solvent oranlarında daha fazla AA verimi elde edilmektedir.

Santrifüj kuvvetinin uygulanması yaş stevia hücrelerine basınç uygulayarak ayırma işleminin hızlanmasına ve elektromekanik etkinin artmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak yüksek santrifüj kuvveti antioksidan aktivite verimini artırmaktadır. Santrifüj kuvvetinin bitki hücrelerinde bazı bileşenlerin elde edilmesi için uygulanmasının etkisini gösteren bazı çalışmalar (Kato vd. 2019; Angoy vd. 2020) bulunmaktadır. Bu çalışmalarda uygulama süresi ve devir sayısı G kuvveti için 600xG'ye etki göstermiştir (Molina-Miras vd. 2018). Ancak elde edilen AA'nın veriminin önceki çalışmalara (Covarrubias-Cardenas vd. 2018; Lemus-Mondaca vd. 2016) kıyasla çok düşük olduğu belirlenmiştir. Bu farklılıkların ekstraksiyon koşullarına ve kullanılan solventlere bağlı olduğu düşünülmektedir. Buna rağmen, elde edilen sonuçlar önceki çalışmalarla uyumludur (Lemus-Mondaca vd. 2018).

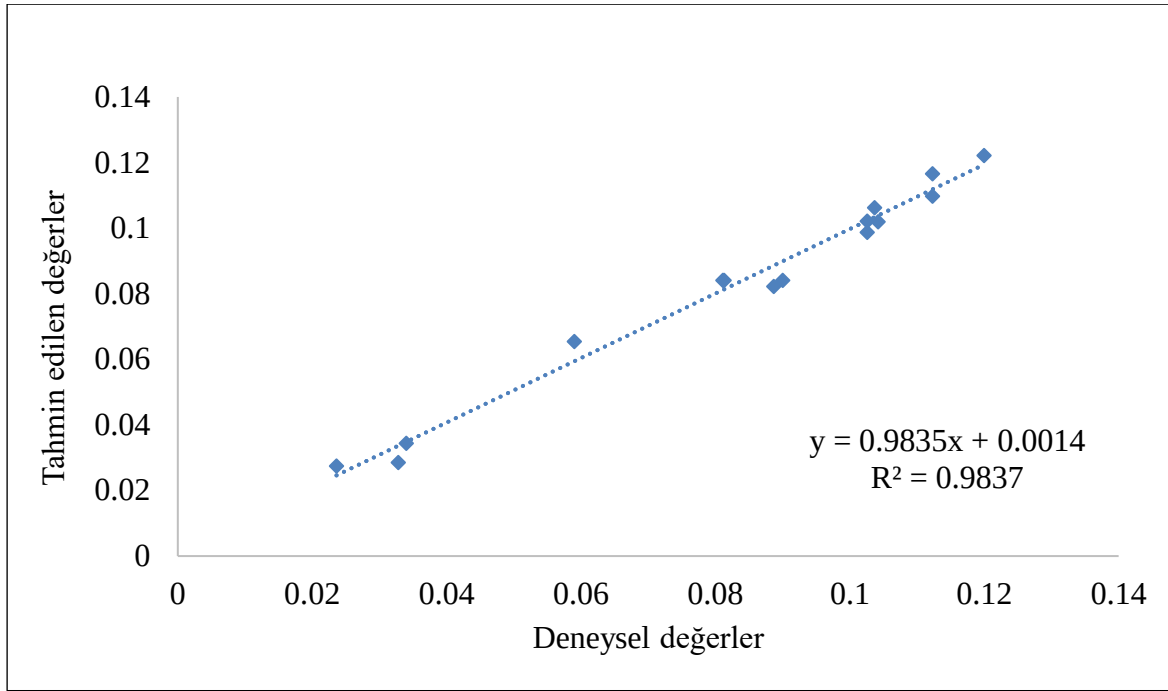
Çizelge 4.6. Box-Behnken tasarımına göre yaş stevia yaprağı sulu ekstraktlarında AA sonuçları (n=9)

Sıra	A	B	C	AA (TE, g /100g KM)
1	7,5	2900	45	0,09±0,007
2	7,5	2900	45	0,08±0,001
3	5	2900	50	0,02±0,001
4	5	2400	45	0,03±0,001
5	10	2900	40	0,10±0,001
6	7,5	2900	45	0,08±0,001
7	7,5	3400	40	0,10±0,004
8	5	2900	40	0,10±0,004
9	7,5	3400	50	0,09±0,003
10	10	2900	50	0,12±0,002
11	10	3400	45	0,11±0,002
12	7,5	2400	50	0,03±0,011
13	5	3400	45	0,10±0,002
14	7,5	2400	40	0,06±0,005
15	10	2400	45	0,11±0,002

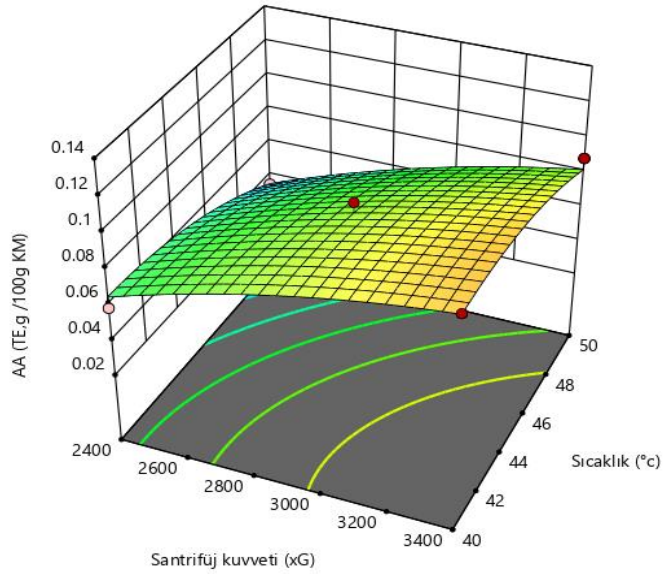
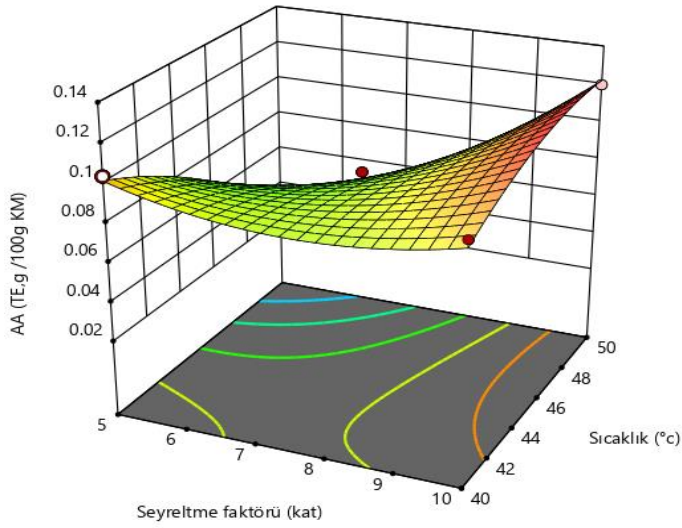
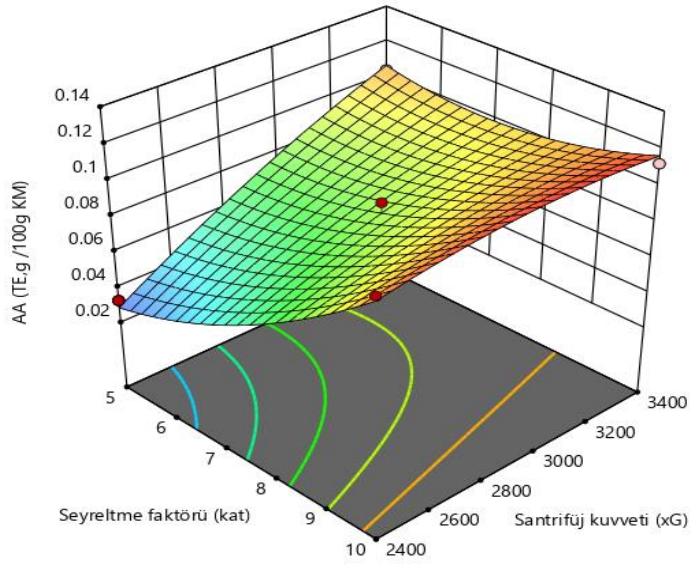
Çizelge 4.7. Yaş yaprak ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesi için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	+0,0841	0,0006
A	+0,0229	*
B	+0,0211	*
C	-0,0128	*
AB	-0,0177	*
AC	+0,0245	*
BC	+0,0028	0,4464
A ²	+0,0114	*
B ²	-0,0052	0,1978
C ²	-0,0079	0,0739

* P<0,05, ** P <0,01



Şekil 4.7. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yaprak ekstraktlarında deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA değerleri



Şekil 4.8. YYM ile verilen yaş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından AA deneysel verilerinin 3B grafiği

4.2.1.4. Parametrelerin yaş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi

Materyal olarak kullanılan “Levent 93” çeşidi yaş stevia yapraklarının 508,06 g toplam steviol glikozit içerdiği Çizelge 4.9’da görülmektedir. Burada en yüksek miktarda bulunan steviol glikozitin reb-A (301,31 g) olduğu; bunu ST (187,19 g) ve reb-C’nin (19,55g) takip ettiği görülmektedir. Çözücü olarak su kullanılan önceki çalışmalardaki (Formigoni vd. 2018a; Periche vd. 2015b) reb-A oranının yüksek olduğu fark edilmiştir. Rebaudiosit A değerinin yüksek olması, aranan en iyi lezzet profiline sahip olması nedeniyle toz, yaş ve kurutulmuş yapraklar üzerinde yapılan araştırmalarda ana hedef olmuştur. Üç bağımsız değişken olarak ekstraksiyon sıcaklığı, seyreltme faktörü ve G-kuvveti için Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’te görülen 3B yanıt yüzeyleri majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon verimini göstermektedir. Burada, seyreltme faktörü ve ekstraksiyon sıcaklığına göre G-kuvveti majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon verimi üzerinde önemli etkilere sahiptir.

Seyreltme faktörü etkisiyle reb-C (Şekil 4.14) veriminde gözlenen düşüşün aksine reb-A ve ST miktarının ekstraktlara su eklenmesiyle arttığı anlaşılmaktadır (Çizelge 4.8). Ayrıca, reb-A’nın verimi 5 ila 7,5 kat seyreltilmiş ekstraktlarda yükselmiştir. Ancak, seyreltme faktörü artınca azalmıştır. Aynı zamanda steviosit verimi konsantre ekstraktlarda (5 kat) ve en yüksek oranda seyreltilmiş olanlarda (10 kat) daha fazla artmaktadır. Solvent oranının artmasıyla birlikte solvent ve hücre matrisi arasındaki konsantrasyon farkının artması (Lou vd. 2010; Rouhani 2019; Panja ve Mukhopadhyay 2019) reb-A ve ST’in ekstraksiyon verimindeki artışı açıklamaktadır. Öte yandan, 30 dk uygulanan farklı santrifüj kuvvetleri majör steviol glikozit ekstraksiyonlarını önemli ölçüde etkilemiştir.

Santrifüj kuvveti çözeltileri saflaştırmak veya süspansiyon halindeki partikülleri sıvı fazdan ayırmak ve partikül boyutu dağılımını, partikül şeklini ve moleküler bağlanma mekanizmalarını etkilemek için uygulanmaktadır (Beveridge ve Harrison 1995; Haller ve Kulozik 2019). Bu nedenle, $1,6 \pm 0,1$ g/cm³ yüksek yoğunluklu ve 961,03-951,03 Da moleküler ağırlığa sahip reb-A ve reb-C partikülleri G-kuvveti altında süspansiyonda kalmaya devam etmektedir. Bu nedenle 2900xG G-kuvveti optimum uygulama olarak görülmektedir. Verimlilik üzerine etkili diğer bir parametre olarak sıcaklığı majör steviol glikozitler difüzyonu üzerine etkisi de incelenmiştir. Farklı sıcaklıklar olan 40°, 45° ve 50°C 30 dakikalık sürelerde uygulanmıştır. Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi tüm SG’lerin difüzyonu sıcaklıktan etkilenmiştir. Rebaudiosit A miktarı 40 °C ‘den 45 °C’ye kadar artmıştır (Şekil 4.12). Bu davranış Rouhani (2019) ve Teo vd. (2010) tarafından da belirtilmiş; çözgenin bitki kısmına penetrasyonu sayesinde çözünen difüzyonunun arttığı bildirilmiştir. Ancak, 45°C’ye kadar reb-A ekstraksiyon verimi üzerinde olumlu bir etki gözlenmemiştir. Ekstraksiyonda çözücü sıcaklığının 45°C olması reb-A difüzyonu açısından optimum ekstraksiyon sıcaklığı olarak kabul edilmiştir. Bu sıcaklık birçok endüstriyel uygulamada kullanılan enzimlerin optimum noktası olarak da bilindiği için ekstraksiyon uygulamasında bir avantaj olarak görülebilir. Şekil 4.12, sulu stevia yaprak ekstraktlarından santrifüj kuvveti, ekstraksiyon sıcaklığı ve solvent oranına (seyreltme faktörü) bağlı olarak ekstrakte edilebilir reb-A veriminin 3B yüzey grafiğini göstermektedir. Burada tüm ekstraksiyon parametreleri reb-A verimini etkilemiştir. Yüzey grafiğinin yüksek dışbükey keskinliği, Denklem 3’te verilen katsayıları kullanarak, Y3 yanıtında aynı başlangıçta artan eğilimleri göstermektedir. Maksimum değer, orta nokta bölgesinin yakınında gözlenmektedir. Steviositin ekstraksiyon verimi 40-50°C arasında; sırasıyla konsantre ve seyreltilmiş çözeltiler halinde 12,372-11,323g/100 g KM ve 12,846-12,402 g/100g KM olarak değişmiştir (Şekil 4.13 ve Şekil 4.14).

4.2.1.5. Stevia yaprağı sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması

Çizelge 4.8'de bildirilen sonuçların çoklu doğrusal regresyonlarından (MLR) elde edilen modelleri değerlendirmek için varyans analizi (ANOVA) uygulanmış ve ikinci dereceden polinom denklemleri Denklem 3, Denklem 4, ve Denklem 5 Çizelge 4.9'da verilmiştir. Dolayısıyla, (Y₃) Rebaudiosit A, (Y₄) steviosit ve (Y₅) Rebaudiosit C'nin kuru bazda 100 g'da g cinsinden ekstraksiyon verimi ve kodlanan bağımsız değişkenler (seyreltme faktörü (X₁), santrifüj kuvveti (X₂), sıcaklık (X₃)) üzerinde çalışılan her faktörle aşağıdaki gibi ilişkilendirilmiştir.

$$Y_3(\text{reb-A}) = 22.6X_0 + 0.2159X_1 + 0.0958X_2 - 1.56E-01X_3 - 0.3115X_1X_2 - 0.3465X_1X_3 - 0.0544X_2X_3 - 1.46X_1^2 - 1.26X_2^2 - 1.99X_3^2$$

Denklem 3

$$Y_4(\text{ST}) = 11.98X_0 + 0.3261X_1 - 0.3317X_2 - 0.292X_3 + 0.5187X_1X_2 - 0.3465X_1X_3 - 0.0544X_2X_3 - 1.46X_1^2 - 1.26X_2^2 - 1.99X_3^2$$

Denklem 4

$$Y_5(\text{reb-C}) = 1.25X_0 - 0.5241X_1 - 0.0679X_2 - 0.2060X_3 - 0.2290X_1X_2 + 0.4280X_1X_3 + 0.0562X_2X_3 + 0.13X_1^2 - 0.43X_2^2 + 0.39X_3^2$$

Denklem 5

Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de vurgulanan ikinci dereceden modeller yanıt yüzeylerinin üç boyutlu temsillerini göstermektedir. Buna göre, bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi sırasıyla reb-A, ST ve reb-C ekstraksiyon verimi için 0,9850, 0,9603 ve 0,9885 yüksek korelasyon katsayısı (R²) aracılığıyla ifade eden deneysel verileri temsil etmektedir. Deneysel veriler ile BBT'nin tahmin ettiği verim arasındaki 0,95'ten yüksek korelasyon katsayılarıyla iyi uyum göstermiştir. Rebaudiosit A için Şekil 4.9'da ST için Şekil 4.10 ve reb-C için Şekil 4.11'de geliştirilen model görülmektedir. Ekstrakte edilebilir reb-A, ST ve reb-c'nin maksimum verimi Çizelge 4.8'da bildirildiği gibi sırasıyla 22,75g, 13,57g ve 3,02 g/100 g KM düzeyindedir. Santrifüj kuvveti Y₃ hariç elde edilen tüm denklemleri olumsuz yönde etkilemiştir. Etkileşimler açısından sadece X₁X₂'nin ST (Y₄) ve reb-C (Y₅) üzerinde anlamlı bir etkisi bulunurken, X₁X₃'ün Y₅ üzerinde diğerlerine göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Maksimum konsantrasyon, seyreltme faktörü olarak 7,5, G kuvveti olarak 2900xG ve ekstraksiyon sıcaklığı olarak 45°C olan orta nokta bölgesine yakın gözlemlenmiştir. Aynı davranış reb-A'da da vurgulanmıştır.

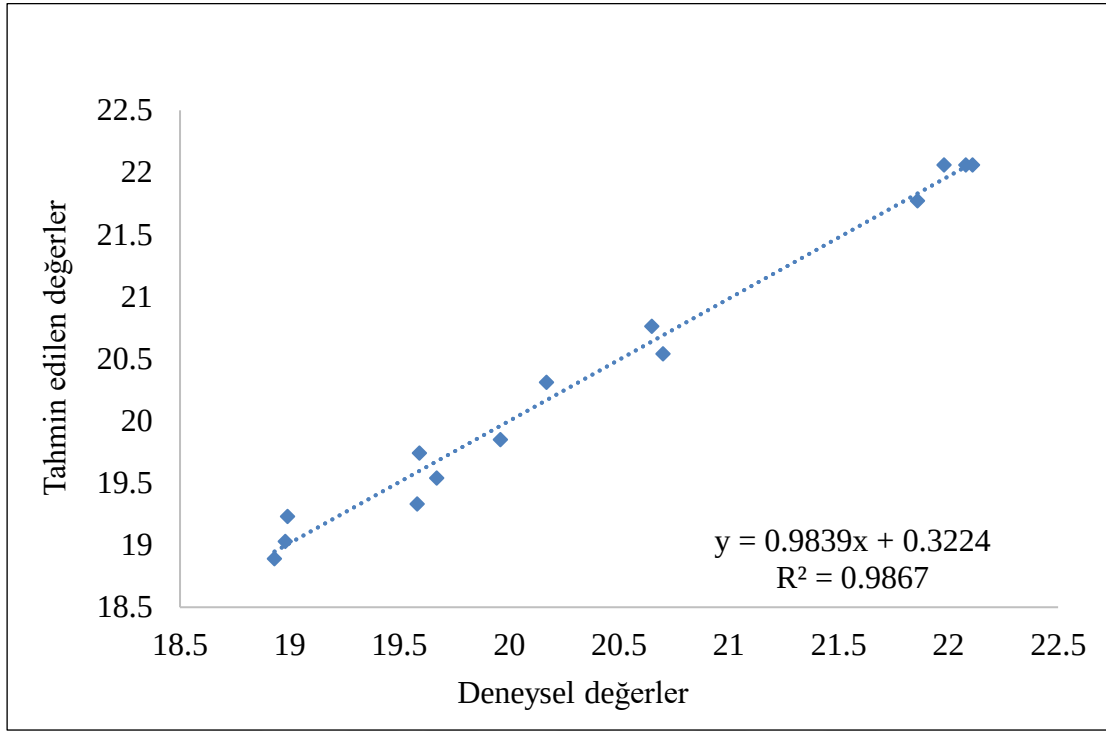
Çizelge 4.8. Box-Behnken tasarımı ve yaş stevia yaprağı sulu ekstraktlarından majör steviol glikozitlerin deneysel sonuçları (n=9)

Sıra	A	B	C	Reb-A (g/100 g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-C (g/100 g KM)
1	7,5	2900	45	22,7502	12,1638	1,3033
2	7,5	2900	45	22,6438	12,1042	1,2051
3	5	2900	50	19,0162	11,3239	1,6739
4	5	2400	45	19,1343	13,5717	1,3376
5	10	2900	40	19,9769	12,8461	1,0352
6	7,5	2900	45	22,4055	11,6666	1,2502
7	7,5	3400	40	19,4294	12,5615	1,3142
8	5	2900	40	18,7131	12,372	3,0188
9	7,5	3400	50	19,0852	12,01	1,0914
10	10	2900	50	18,8939	12,4027	1,4023
11	10	3400	45	19,9977	13,4113	0,1136
12	7,5	2400	50	19,3811	12,778	0,9954
13	5	3400	45	20,3278	11,846	1,5404
14	7,5	2400	40	19,5078	13,0706	1,4430
15	10	2400	45	20,0504	13,0621	0,8269

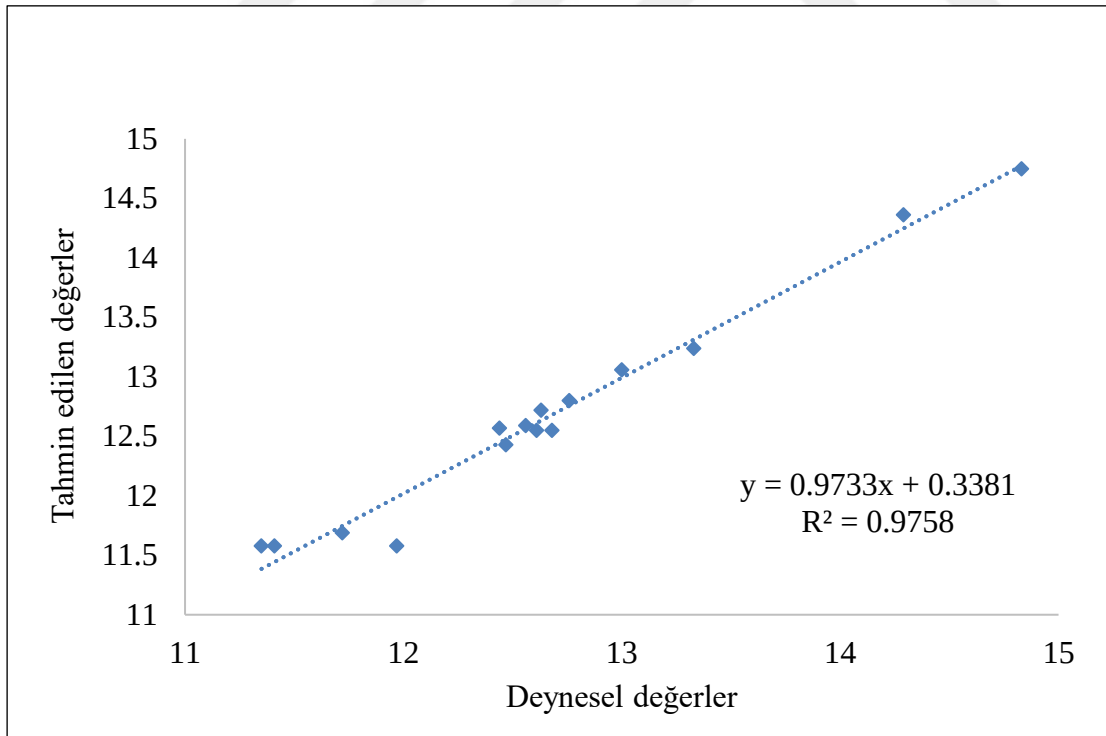
Çizelge 4.9. Yaş yapraklardan elde edilen ekstraktların Steviosit, Rebaudiosit A ve Rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Steviosit		Rebaudiosit A		Rebaudiosit C	
	Katsayılar	P	Katsayılar	P	Katsayılar	P
X ₀	+11,98	0,0053	+22,60	0,0005	+1,25	0,0003
X ₁	+0,3261	*	+0,2159	0,0832	-0,5241	**
X ₂	-0,3317	*	+0,0958	0,3819	-0,0679	0,1340
X ₃	-0,2920	*	-0,1564	0,1786	-0,2060	*
X ₁ X ₂	+0,5187	*	-0,3115	0,0787	-0,2290	*
X ₁ X ₃	+0,1512	0,2193	-0,3465	0,0579	+0,4280	0*
X ₂ X ₃	-0,0647	0,5740	-0,0544	0,7163	+0,0562	0,3437
X ₁ ²	+0,3128	*	-1,46	*	+0,1366	0,0584
X ₂ ²	+0,6817	*	-1,26	*	-0,4349	*
X ₃ ²	-0,0549	0,6450	-1,99	**	+0,3930	*

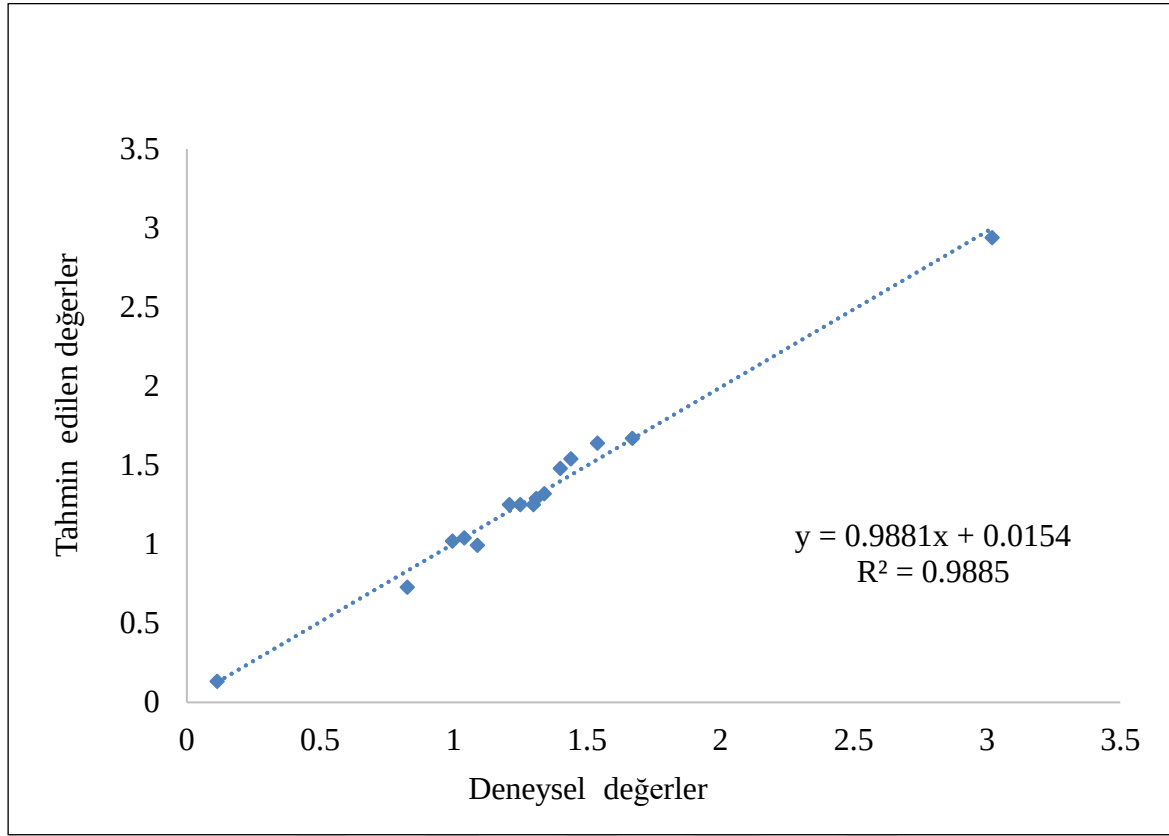
* P<0,05; ** P<0,01



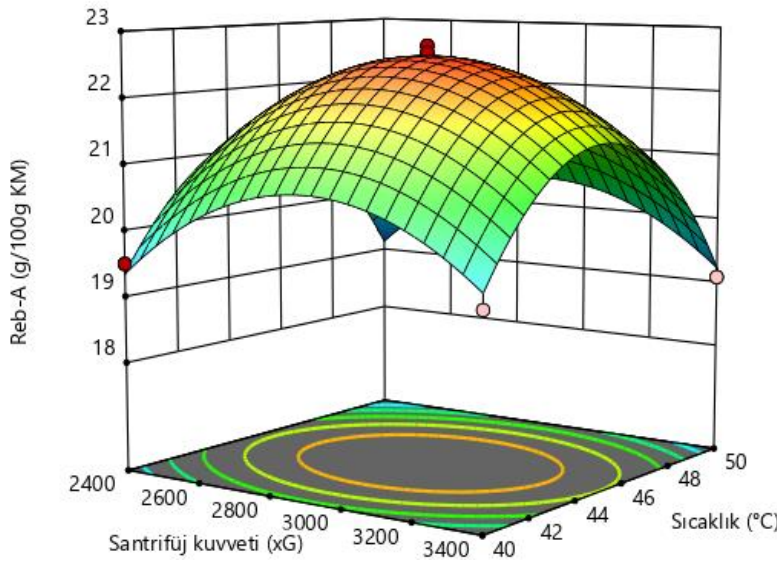
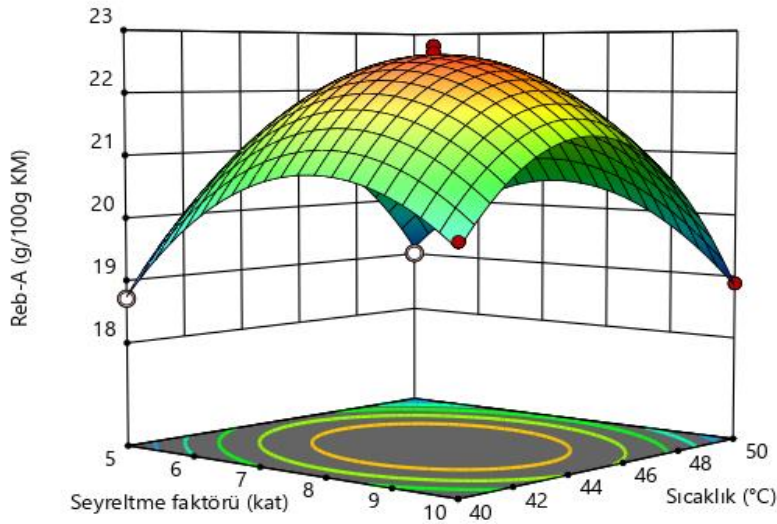
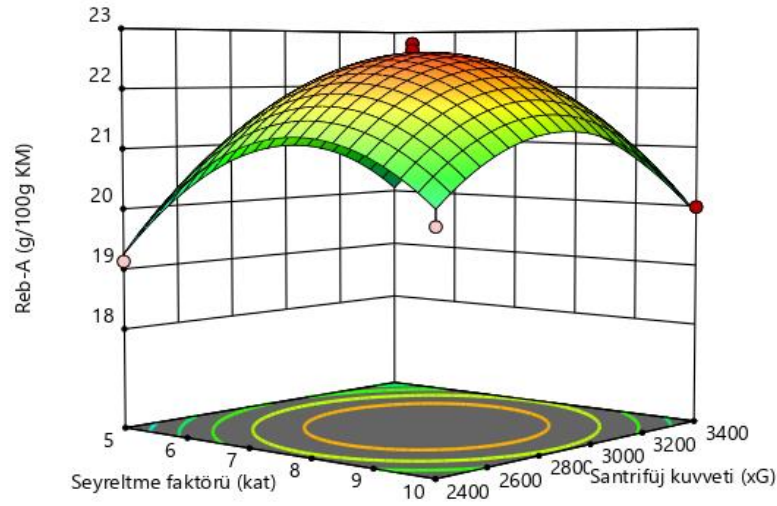
Şekil 4.9. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklarından ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebudiosit A değerleri



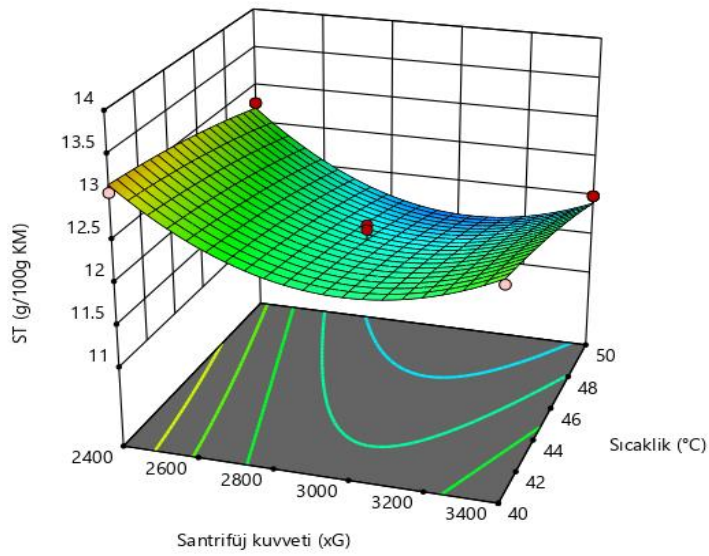
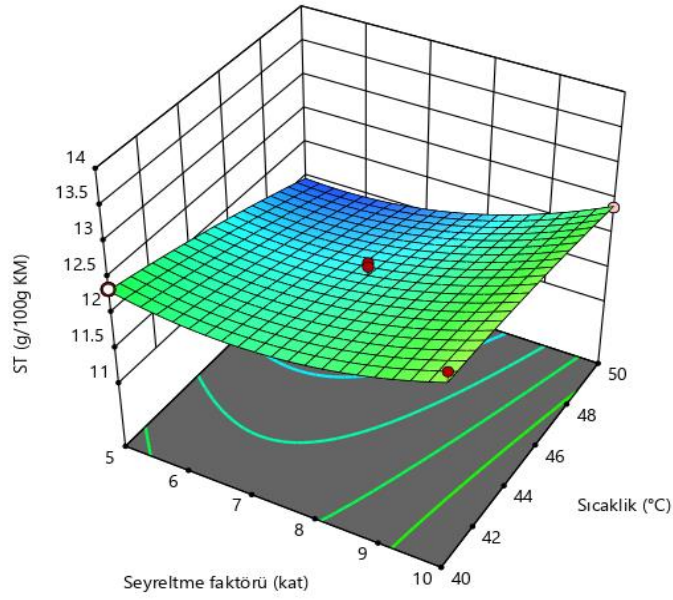
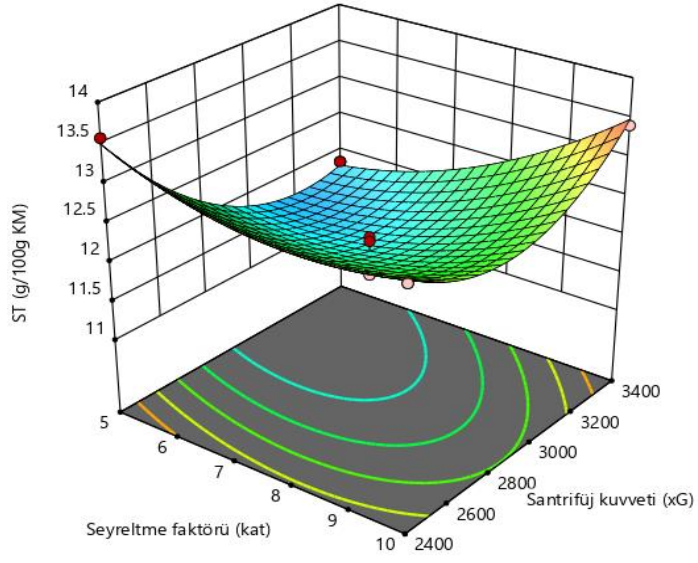
Şekil 4.10. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklarından ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit değerleri



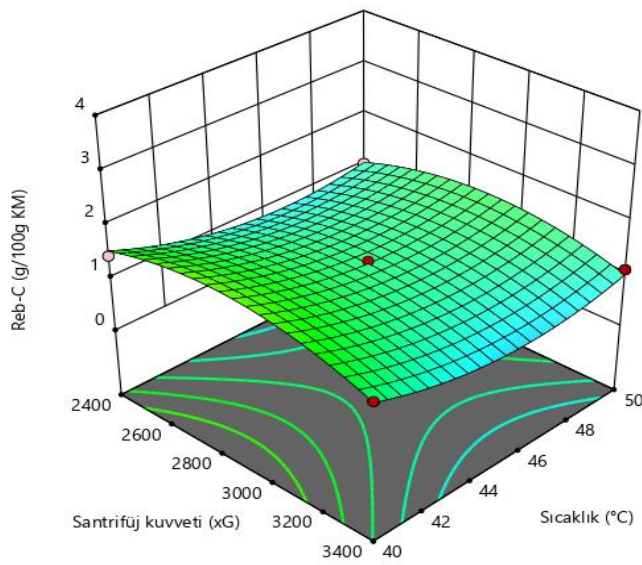
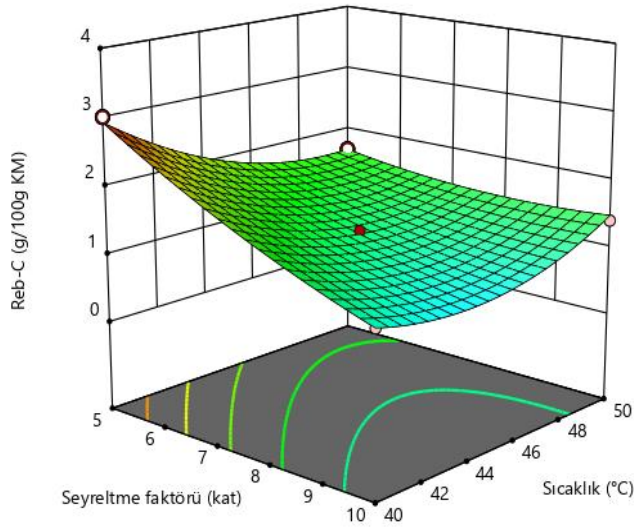
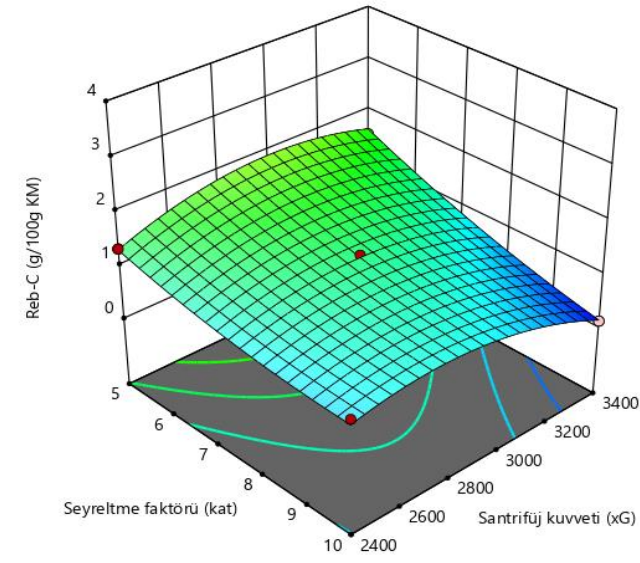
Şekil 4.11. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen yaş stevia yapraklarından ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C değerleri



Şekil 4.12. Yaş yapraktan ekstraksiyonda rebaudiosit A değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.13. Yaş yapraktan ekstraksiyonda steviosit değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.14. Yaş yaprakтан ekstraksiyonda rebaudiosit C değerine bağlı Yüzey-Yanıt grafikleri

4.2.1.6. Box-Behnken tarafından belirlenen yaş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların optimum ekstraksiyon koşulları

Çalışmanın bu bölümünde Box-Behnken deneysel tasarımı (BBT) ile majör steviol glikozitlerin yaş yapraklardan optimum ekstraksiyon koşullarını tanımlamak için üç merkezi nokta tekerrürü dahil 15 farklı deneme koşulu üretilmiştir. İncelenen üç ekstraksiyon faktörüne ait optimum değeri bulmak için reb-A, ST, reb-C, TFM ve AA düzeyleri için oluşturulan regresyon modelleri kullanılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen sonuçlara göre optimum koşullar 7,68'lik seyreltme faktörü, 2915xG santrifüj kuvveti ve 44,77°C ekstraksiyon sıcaklığı olacak şekilde belirlenmiştir. Bu koşullar altında, tahmini maksimum reb-A ve diğer bağımlı değişkenlerin hedef değeri Çizelge 4.10'da verilmiştir.



Çizelge 4.10. Yaş yaprakların sulu ekstraktlarının Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre belirlenen optimum ekstraksiyon koşulu.

Seyreltme faktörü (kat)	G-kuvveti (xG)	Sıcaklık (°C)	Reb-A (g/100 g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-C (g/100 g KM)	TFM (GEA, g/100 g KM)	AA (TE, g/100 g KM)	Arzu edilirlik
7,689	2915,010	44,770	22,613	12,009	1,220	2,917	0,087	0,966

4.2.2. Kurutulmuş stevia yaprağından sulu ekstraksiyonlar

4.2.2.1. Kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktların tanımlayıcı analiz sonuçları

Solvent olarak su kullanılarak elde edilen stevia ekstraktlarının tanımlayıcı analizleri Çizelge 4.11’de verilmiştir. Tüm sonuçlar ekstraksiyon parametrelerinin değerlendirilen faktörler üzerinde önemli etkisi olduğunu göstermektedir.

Suda çözünen kuru madde sonuçları kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktlarda 1,63’lük bir standart sapma göstermiştir. Dahası, çözücü miktarının az olduğu kısmen konsantre ekstraktlarda bu değer 6,50-8,17 Bx° arasında değişirken su oranı yükseldiğinde 2,67-4,22 Bx° arasında değişmiştir. Uygulanan G kuvveti ise solventin içinde bulunan çözünür kuru maddenin ayrılmasına katkıda bulunmaktadır.

Benzer bir sonuç TKM analizlerinde de görülmektedir. DeneySEL verilere göre seyreltme faktörü ve G-kuvveti ekstraksiyon sıcaklığının aksine TKM üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Ancak suyun ve G kuvvetinin artmasına rağmen TKM’nin azalmasına yol açmaktadır. Santrifüj kuvveti artırılarak solventteki TKM içeriği daha da yükseltilebilir. Yukarıda belirtilen sonuçlarla uyumlu olarak bazı araştırmacılar solvent besleme hızındaki artışın TKM’de bir düşüşe neden olduğunu bildirmiştir (Schubert vd. 2018; Jiang ve Xu 2015). Tüm ekstraksiyon parametreleri açısından incelendiğinde pH değerleri üzerinde güçlü bir etki göstermedikleri saptanmıştır.

Su miktarındaki artış kütle transferinin artması nedeniyle ekstraktlardaki TA miktarını artırmaktadır. Sulu ekstraksiyonlarda 5 ve 10 kat seyreltilmiş ekstraktlar için sırasıyla 22,31-25,35 meq/100 g ve 49,63-96,57 meq/100 g TA elde edilmiştir. Titrasyon asitliği ile su oranı arasındaki ilişki santrifüj kuvvetine bağlı olarak değişim göstermektedir.

4.2.2.2. Ekstraksiyon parametrelerinin kuru stevia yapraklarının sulu ekstraktlarında toplam fenolik madde (TFM) miktarı üzerine etkisi

Ekstraksiyon sıcaklığının, seyreltme faktörünün ve santrifüj kuvvetinin kuru stevia yapraklarının sulu ekstraktlarında belirlenen TFM miktarı üzerindeki etkisi Çizelge 4.12’te gösterilmiştir.

Genel olarak deneySEL sonuçlar, seyreltme faktörünün kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen TFM üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ve su hacminin artmasıyla azaldığını göstermiştir (Şekil 4.16). TFM miktarı konsantre ekstraktlarda 5,6’dan 5,23 g GAE/100 g KM; orta miktarda hafif seyreltilmiş ekstraktlarda 4,01-5,75 g GAE/100 g KM ve yüksek seyreltilmiş ekstraktlara 3,77-5,17 g GAE/100 g KM düzeyinde tespit edilmiştir. En yüksek miktarda TFM 5,67 g GAE/100 g KM değeri ile 7,5 kat seyreltme faktöründe elde edilmiştir. Genel olarak sonuçlar literatürde bildirilen sonuçlarla (Tunchaiyaphum vd. 2013) uyum içindedir.

Ayrıca elde edilen sonuçlar ekstraksiyon sıcaklığının ve uygulanan G-kuvvetinin TFM üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Nitekim, TFM düşük G kuvveti (2400xG) uygulaması altında 3,77-5,46 g GEA/100 g KM arasında değişirken, 3400xG G-kuvveti uygulandığında 4,74-5,22 g GEA/100 g KM arasında değişmiştir. Santrifüj kuvvetinin yükselmesiyle beraber fenolik bileşiklerin solvent içinde çözünme düzeyi de artmaktadır. Diğer bir ifadeyle daha yüksek G kuvveti solvent-bitki matrisi temasının artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle santrifüj kuvveti arttıkça daha fazla bileşik solvent içinde süspansiyon halinde kalmakta; bu durum da elde edilen yüksek TFM miktarını açıklamaktadır. Bununla birlikte, ekstraksiyon sıcaklığı da TFM artışını desteklemektedir.

Önceki çalışmalarda yüksek sıcaklığın artan difüzyon hızı ve analitin çözünürlüğünün artması nedeniyle ekstraksiyon verimliliğini iyileştirdiği bildirilmiştir (Santos vd. 2012).

Çizelge 4.13, farklı değişkenlerin (A, B ve C) TFM üzerindeki etkisini göstermektedir. P değerleri her bir katsayının önemini kontrol etmek için bir araç olarak kullanılmıştır ve bu da değişkenler arasındaki etkileşimi gösterebilmektedir (XuJie ve Wei 2008). P değeri ne kadar küçükse ilgili katsayı o kadar önem kazanmaktadır. TFM için değişkenleri içeren model aşağıdaki gibidir:

$$Y_6(\text{TFM}) = 5,28 - 0,4981A + 0,3244B - 0,0527C + 0,4132AB - 0,2636AC - 0,2205BC - 0,0059A^2 - 0,3609B^2 - 0,3139C^2$$

Denklem 6

Santrifüj kuvvetinin aksine diğer tüm parametrelerin TFM ekstraksiyonu üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu görülmektedir. Etkileşimler açısından AB pozitif etkiye sahipken, AC ve BC TFM üzerinde olumsuz bir etki sergilemektedir. Farklı değişkenler için anlamlılık derecesi Çizelge 4.13'den görülebilmektedir. Modelin R^2 değeri %94 ve tahmin edilen R^2 farkı 0,2'den küçüktür. Ancak, TFM'yi etkileyen en önemli parametrenin seyreltme faktörü olduğu fark edilebilmektedir ($P < 0,05$). Sulu ekstraksiyon denemelerinde elde edilen TFM saflığı Şekil 4.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarının suda çözünür kuru madde (Bx°), pH değeri, titrasyon asitliği (TA) ve Toplam kuru madde (TKM) değerleri.

Ekstraktlar	SD	Bx°	pH	TA	TKM
A40B	9	6,89 ± 0,07	6,22±0,23	25,07± 0,13	9,05
A45A	9	7,00 ± 0,09	6,61±0,21	24,68± 0,11	9,62
A45C	9	6,50 ± 0,00	6,28±0,09	22,31± 0,08	8,98
A50B	9	8,17 ± 0,05	6,13±0,01	25,35± 0,15	9,69
B40A	9	6,42 ± 0,05	5,98±0,07	42,45± 0,19	9,32
B40C	9	4,25 ± 0,05	5,91±0,20	41,41± 0,23	8,82
B45B1	9	4,17 ± 0,05	6,56±0,03	46,88± 0,12	9,50
B45B2	9	4,17 ± 0,05	6,18±0,01	43,59± 0,09	8,83
B45B3	9	4,17 ± 0,05	5,80±0,09	42,50± 0,14	9,29
B50A	9	4,33 ± 0,04	6,21±0,40	44,95± 0,12	9,72
B50C	9	4,25 ± 0,05	6,12±0,10	48,96± 0,26	9,50
C40B	9	3,22 ± 0,04	6,17±0,07	96,57± 0,67	9,05
C45A	9	3,44 ± 0,05	6,50±0,09	53,33± 0,10	9,20
C45C	9	2,67 ± 0,05	6,69±0,05	49,63± 0,06	9,44
C50B	9	4,22 ± 0,04	6,10±0,15	53,24± 0,06	9,80

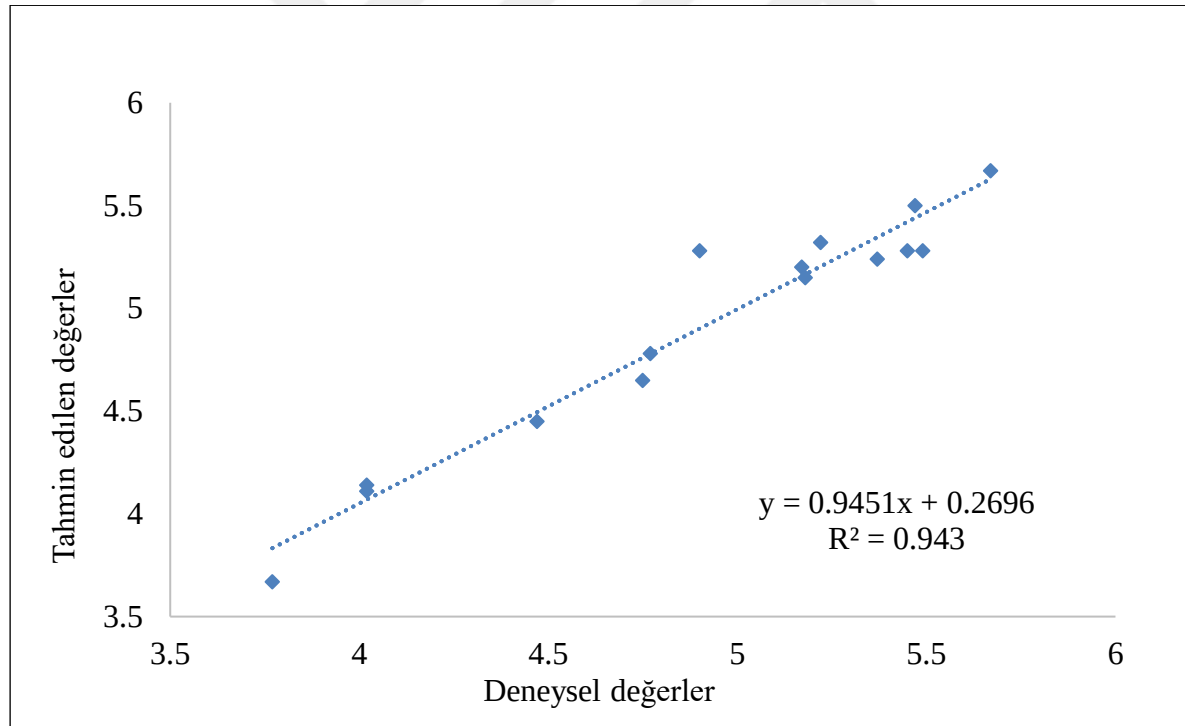
Çizelge 4.12. Box-Behnken tasarımı ve sulu ekstraktlardan elde edilen TFM deneysel sonuçları (n=9)

Sıra	B	A	C	TFM (GAE, g/100g KM)
1	2400	5	45	5,45±0,05
2	2400	7,5	50	5,49±0,05
3	2400	7,5	40	5,67±0,03
4	2400	10	45	5,47±0,04
5	2900	7,5	45	4,77±0,02
6	2900	7,5	45	4,90±0,01
7	2900	5	50	5,17±0,01
8	2900	10	40	5,37±0,01
9	2900	7,5	45	4,75±0,01
10	2900	5	40	4,02±0,01
11	2900	10	50	5,18±0,02
12	3400	7,5	40	4,47±0,02
13	3400	7,5	50	5,22±0,01
14	3400	10	45	4,02±0,01
15	3400	5	45	3,77±0,01

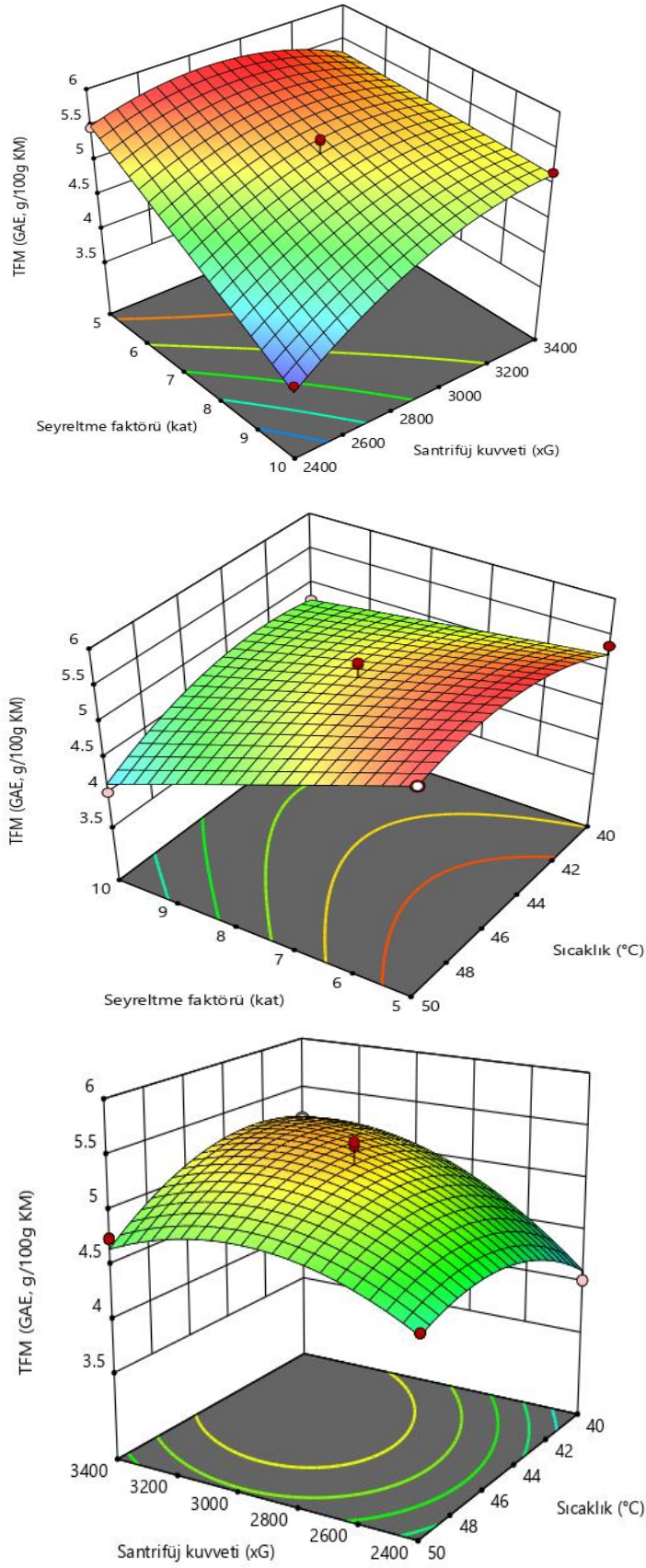
Çizelge 4.13. Sulu ekstraktların Toplam Fenolik Maddenin (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	+5,28	0,0120
A	-0,4981	*
B	+0,3244	*
C	-0,0527	0,5594
AB	+0,4132	*
AC	-0,2636	0,0781
BC	-0,2205	0,1237
A ²	-0,0059	0,9642
B ²	-0,3609	*
C ²	-0,3139	0,0527

* P<0,05



Şekil 4.15. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen sulu ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen TFM'nin saflık oranı değerleri



Şekil 4.16. YYM modeli tarafından verilen sulu kurutulmuş stevia yaprak ekstraktlarından elde edilen TFM'nin deneysel verilerinin 3B grafiği

4.2.2.3. Parametrelerin sulu kurutulmuş stevia yaprak ekstraktlarından Antioksidan aktivitesi (AA) üzerindeki etkisi

Kuru stevia yaprağının sulu ekstraktlarında ekstraksiyon parametrelerinin antioksidan aktivite üzerindeki etkisi Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Tüm sulu ekstraktlar 0,002 ila 0,134 g TE/100 g KM arasında değişen antioksidan aktivitesini göstermiştir. Kurutulmuş stevia yaprağı ekstraktında antioksidan aktivitesinin sulu yaş yapraklardan daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, Lemus-Mondaca vd. (2016), Martínez-Las Heras vd. (2014) ve Kim vd. (2011) tarafından sulu ekstraktlarda antioksidan kapasitesini gösteren önceki verilerle aynı düzeydedir. İkinci dereceden polinom denklemi elde etmek için deneysel verilerde aşağıdaki gibi çoklu regresyon analizi kullanılmıştır:

$$Y_7(AA) = 0,0588 + 0,0344A - 0,0115B - 0,0111C - 0,0063AB - 0,0013AC - 0,0393BC + 0,0228A^2 + 0,0009B^2 + 0,0004C^2$$

Denklem 7

İkinci dereceden A^2 , B^2 ve C^2 modelleri, deney çalıştırmalarının DPPH radikal aktivitesi üzerinde olumlu bir etkiye sahiptir. Öte yandan, AB, BC ve AC değişkenlerinin üçü arasındaki etkileşim modelleri. DPPH radikal aktivitesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. Çizelge 4.15 bildirilen P değeri sonuçları her bir faktörün önemini ($P < 0,05$) tahmin etmek için uygulanmış ve Şekil 4.17'de deneysel ve tahmin edilen değerlerin karşılaştırmalı bir grafiğiyle ifade edilmiştir. Tüm değişkenler Şekil 4.18'de belirtildiği gibi AA üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ancak etkileşimler açısından yalnızca BC en yüksek verimliliği göstermektedir ($P < 0,01$). Veri analizinden sonra, optimum ekstraksiyon koşulları olarak 10 kat (A), 2400xG (B) ve 45°C (C) tanımlanmıştır.

Seyreltme faktörünün serbest radikal kapasitesi (DPPH) üzerindeki etkisi Şekil 4.18'de gösterilmiştir. Genel olarak, ekstraktlardaki su hacminin artmasıyla radikal bağlama yeteneği artmıştır. Benzer şekilde, Liu vd. (2019), alg *Ascophyllum nodosum*'un ham ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin solvent-katı oranı arttıkça arttığını bildirmiştir. Durling vd. (2007) solvent-katı oranının artmasının kurutulmuş adaçayı (*Salvia officinalis*) rosmarinus asidi gibi biyoaktif bileşiklerin geri kazanılmasına neden olacağını bulmuştur. Bunun nedeni, artan temas yüzeyi nedeniyle bitki matrisinden solvante daha fazla biyoaktif bileşiğin aktarılabilmesi olabilir. Bununla birlikte, daha yüksek AA oranı en yüksek seyreltme faktöründe (10 kat) elde edilmiştir.

Sulu ekstraktlarından antioksidan aktivite üzerindeki santrifüj kuvvetinin etkisine gelince; santrifüj kuvveti arttıkça AA'de hafif bir azalma olduğu fark edilmiştir. Burada uygulanan seyreltme faktörü ne olursa olsun santrifüjleme kuvvetinin hücre içi içeriğin çıkışını hızlandıran bir itici güç uygulamasından kaynaklanmaktadır.

Yüksek santrifüj hızları uygulanarak kurutulmuş stevia yaprağından antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu hızlandırılmıştır. Ayrıca, düşük ekstraksiyon sıcaklıklarında santrifüj kuvveti arttıkça AA'da bir artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, 2900xG'den daha düşük santrifüj kuvvetleri kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından optimum antioksidan aktivite için uygun görünmektedir. Bunu göz önünde bulundurarak, 2400xG'nin en yüksek AA miktarlarından birini elde etmeye izin verdiği için optimum G kuvveti olduğu sonucuna varılmıştır.

Ekstraksiyon sıcaklığı etkileri ile ilgili olarak sıcaklığın artmasıyla radikal bağlama yeteneğinin azaldığı gözlemlenmiştir. Daha fazla seyreltilmiş ekstraktlarda (10 kat) daha yüksek olmasına rağmen ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça tüm ekstraktlarda antioksidan aktivite önemli ölçüde azalmıştır. Benzer şekilde Liu vd. (2010) ayrıca *Folium eucommiae*'de daha yüksek sıcaklıkta DPPH aktivitesinin inhibisyonunu gözlemlemiştir. Ayrıca, düşük

ekstraksiyon sıcaklığı altında santrifüj kuvveti ne kadar yüksek olursa bitki matrisinin AA değeri de o kadar yüksek olmaktadır. Bu durum santrifüjlemenin ısı alışverişine yukarıda bahsedilen katkısını doğrulamaktadır ve kurutulmuş stevia yaprağından AA verimliliğinde bu her iki parametrenin etkileşim değişkeni BC'nin elde edilen yüksek etkisini ($P < 0,0001$) açıklamaktadır.

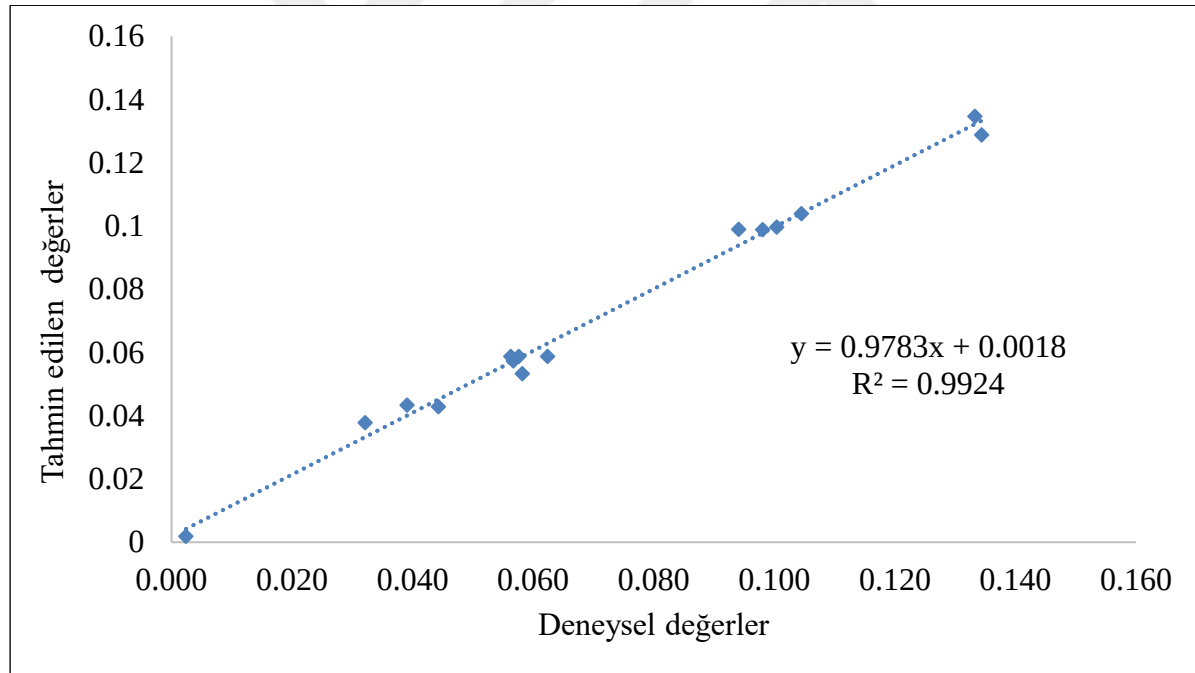
Çizelge 4.14. Box-Behnken tasarımı ve kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen sulu ekstraktlarda TFM deneysel sonuçları (n=9)

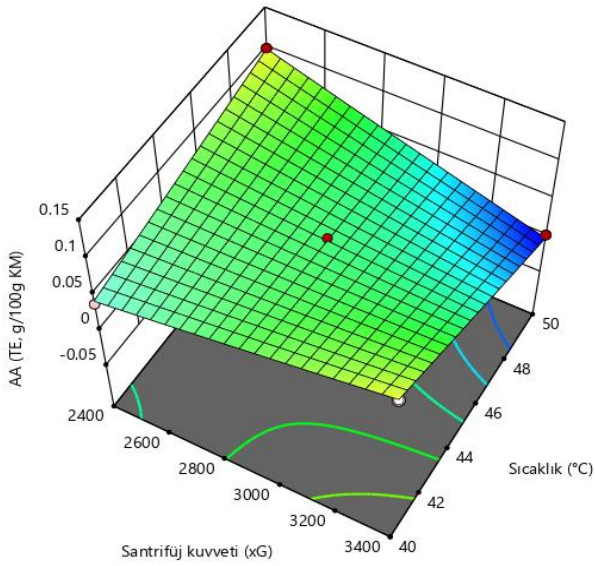
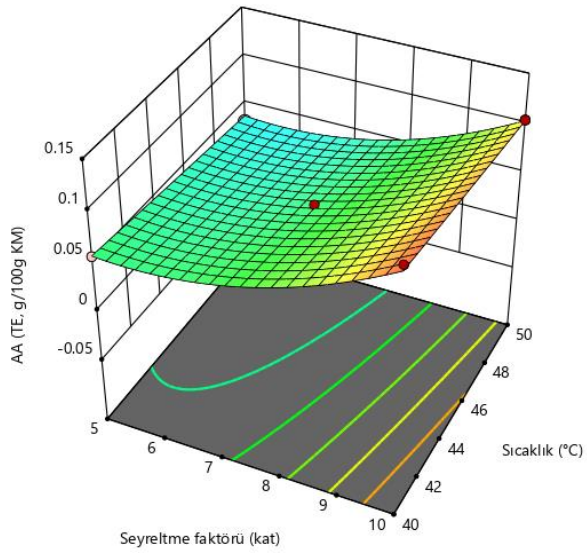
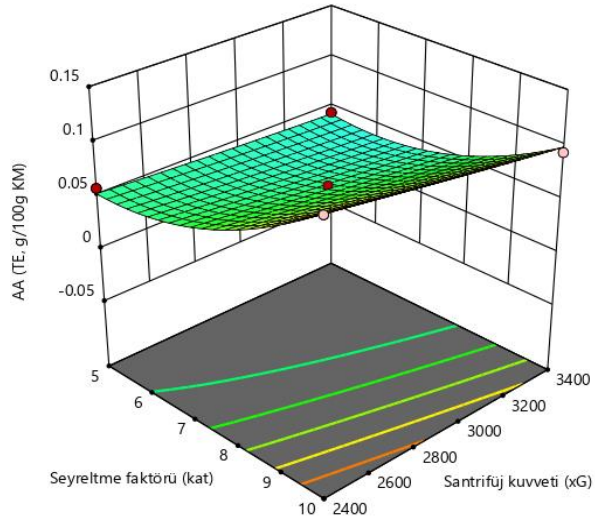
Sıra	A	B	C	AA (TE, g/100 g KM)
1	7,5	2900	45	0,056±0,003
2	7,5	2900	45	0,062±0,025
3	5	2900	50	0,032±0,004
4	5	2400	45	0,058±0,017
5	10	2900	40	0,134±0,042
6	7,5	2900	45	0,058±0,002
7	7,5	3400	40	0,098±0,010
8	5	2900	40	0,057±0,015
9	7,5	3400	50	0,002±0,029
10	10	2900	50	0,105±0,014
11	10	3400	45	0,094±0,014
12	7,5	2400	50	0,090±0,003
13	5	3400	45	0,044±0,004
14	7,5	2400	40	0,039±0,004
15	10	2400	45	0,133±0,005

Çizelge 4.15. Sulu ekstraların Antioksidan Aktivitesinin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	0,0588	0,0001
A	+0,0344	**
B	-0,0115	*
C	-0,0111	*
AB	-0,0063	0,0865
AC	-0,0013	0,6750
BC	-0,0393	**
A ²	+0,0228	*
B ²	+0,0009	0,7882
C ²	+0,0004	0,9110

* P<0,05, ** P < 0,01

**Şekil 4.17.** Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklarından sulu ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA'nin saflık oranı değerleri



Şekil 4.18. YYM modeli ile verilen kurutulmuş stevia yaprakların sulu ekstraktlarından elde edilen AA'nin deneysel verilerinin 3B grafiği

4.2.2.4. Parametrelerin kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi

Steviol glikozitler arasında reb-A fraksiyonu daha az acı tada sahiptir ve bu nedenle gıda endüstrisinde tercih edilmektedir. Arslan Kulcan ve Karhan (2020), López-Carbón vd. (2019) ve Formigoni vd. (2018) tarafından elde edilen bulgularla kıyaslandığında bu çalışmada elde edilen bulgularla önemli farklılıklar olduğu görülmektedir. Bu farklılık kullanılan stevia çeşidinin özelliğinden de kaynaklanabilir. Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24 BBT'den elde edilen önceki koşullara göre üç bağımsız değişkenin majör glikozitlerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisinin 3B çizim tepki yüzeyini göstermektedir. Genel olarak, değerlendirilen ekstraksiyon parametreleri majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminde önemli etkiye sahiptir. Bunların miktarları reb-A, ST ve reb-C için sırasıyla 16,03-20,01; 10,09-10,67; ve 0,26-2,93g/100 g KM arasında değişmektedir.

Seyreltme faktörü etkisi göz önüne alındığında ekstraktlardaki su miktarı ne kadar yüksek olursa reb-A, ST ve reb-C'nin ekstrakte edilen kısmının o kadar yüksek olduğu görülebilir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Ayrıca, aynı davranışın yaş stevia yaprağının sulu ekstraktlarında ST ve reb-A üzerinde de fark edildiğini belirtmek gerekir. Bununla birlikte, majör steviol glikozitlerin ekstrakte edilen kısmındaki artış kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraksiyonunda solventle hücre matrisi arasındaki konsantrasyon farkının artmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Panja ve Mukhopadhyay 2019). Uygulanan G-kuvveti ve ekstraksiyon sıcaklığı ne olursa olsun ST ve reb-C'nin çözünme ve kütle aktarımının artması için uygundur. Oysa sadece yüksek G kuvveti ve düşük ekstraksiyon sıcaklığı, reb-A'nın ekstrakte edilen kısmını önemli ölçüde artırmaktadır. Tüm denemelerde 10 kat seyreltme faktörünün en yüksek reb-C (2,93 g/100 g KM), ST (10,68 g/100 g KM) ve reb-A (19,94 g/100 g KM) miktarlarını sağladığı belirlenmiştir.

Uygulanan farklı santrifüj kuvvetleri ekstrakte edilen majör steviol glikozitleri önemli ölçüde etkilemiştir. G-kuvveti arttıkça büyük miktarda reb-A ve reb-C'nin ekstraksiyonu için daha az su ve düşük ekstraksiyon sıcaklığı yeterlidir. Örneğin, G-kuvveti 2400xG'den 3400xG'ye arttıkça ekstrakte edilen reb-A ve reb-C verimi sırasıyla 16,03-18,66 g/100 g KM ve 0,69-1,81 g/100 g KM arasında değişmiştir. Ekstraktların konsantrasyonlarından veya ekstraksiyon sıcaklıklarından bağımsız olarak G-kuvvetinin 2400xG ile 2900xG arasında artması ST'nin ekstraksiyon veriminin düşmesine neden olmuştur (Şekil 4.23). Daha fazla uygulanan G-kuvveti, ekstrakte edilen ST veriminde önemli bir artış miktarı sağlamıştır. Yüksek hızlı laboratuvar santrifüjünün meyve suyu, yağ ve süt işleme gibi endüstrilerde yaygın olarak kullanılan sürekli dekantör santrifüj gibi çalıştığı bildirilmiştir (Beveridge ve Harrison, 1995; Altieri vd. 2013; Schubert vd. 2018). Bu sonuçlar, yüksek santrifüj kuvvetinin yalnızca tortu oluşumuna değil aynı zamanda sıcaklığın homojen yayılmasına ve bitki bileşenlerinin daha iyi çözünmesine de katkıda bulunduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak 2900xG reb-C için optimal uygulanan G kuvveti gibi görünürken 3400xG en yüksek miktarda reb-A ve ST değerlerini vermiştir (Çizelge 4.16).

Ekstraksiyon sıcaklığının kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitler üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve genel olarak olumsuz bir etki belirlenmiştir. Farklı sıcaklıklar (40°, 45° ve 50°C) 30 dakikalık sürelerde uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.16'da sunulmuştur. Ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça ekstrakte edilen steviosit miktarı tüm ekstraktlarda azalmaktadır (Şekil 4.23). Ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça reb-C miktarında önemli bir azalma görülmektedir (Şekil 4.23). Temel olarak bu sonuçlar yüksek ekstraksiyon sıcaklığının ekstrakte edilen steviol glikozit veriminde bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. Sonuç olarak, 40°C'lik sıcaklık kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraksiyonunda maksimum reb-A elde edilmesi için optimum gibi görünmektedir. Rouhani (2019) 50-60°C arasında steviosit ekstraksiyon veriminde önemli bir fark olmadığını

bulmuştur. Panja (2019) basınçlı sıcak su kullanarak steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için en uygun sıcaklığı 120°C olarak bildirmiştir. Görgüç vd. (2019) ise mikrodalga destekli enzimatik yöntem kullanılarak kurutulmuş ve öğütülmüş stevia yapraklarından maksimum reb-A ve ST ekstraksiyonu için optimum sıcaklığı 53°C olarak belirlemiştir.

4.2.2.5. Kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması

Ekstraksiyon değişkenlerinin majör steviol glikozitler üzerindeki etkisinin sonuçları BBT koşullarına göre Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. Optimum ekstraksiyon koşullarının maksimum reb-A (Eq.8), ST (Eq.9) ve reb-C (Eq.10) konsantrasyonlarını tahmin etmek için deneysel veriler MLR analizine tabi tutularak ikinci dereceden model denklemleri oluşturulmuştur. Reb-A, ST ve reb-C için öngörülen model sırasıyla aşağıdaki denklemlerle açıklanmıştır:

$$Y_8(\text{reb-A}) = 19,33X_0 - 0,1339X_1 + 0,0446X_2 - 0,8297X_3 - 1,13X_1X_2 - 0,9285X_1X_3 - 0,4349X_2X_3 - 1,11X_1^2 - 0,9234X_2^2 + 0,3097X_3^2$$

Denklem 8

$$Y_9(\text{ST}) = 10,17X_0 + 0,0462X_1 - 0,0001X_2 - 0,1100X_3 + 0,0886X_1X_2 - 0,0150X_1X_3 - 0,0141X_2X_3 + 0,1212X_1^2 + 0,2649X_2^2 + 0,0591X_3^2$$

Denklem 9

$$Y_{10}(\text{Reb-C}) = 2,19X_0 + 0,5603X_1 + 0,1550X_2 + 0,1907X_3 - 0,3187X_1X_2 + 0,8083X_1X_3 - 0,4182X_2X_3 - 0,2482X_1^2 - 0,1079X_2^2 - 0,5763X_3^2$$

Denklem 10

Rebaudiosit A, steviosit ve rebaudiosit C'nin Model F değeri sırasıyla 18,79, 10,70 ve 24,52 olup modellerin anlamlı olduğunu göstermektedir. Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de vurgulanan ikinci dereceden modeller yanıt yüzeylerinin üç boyutlu temsillerini göstermektedir. Buna göre, bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi sırasıyla reb-A, ST ve reb-C ekstraksiyon verimi için 0,9713, 0,9507 ve 0,9778 gibi yüksek korelasyon katsayıları (R^2) temsil etmektedir. Modellerin ekstraksiyon işlemi sırasında ekstrakte edilen reb-A, steviosit ve reb-c değişkenliğini sırasıyla %97, 95 ve 97 oranında açıkladığını göstermektedir. Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de gösterilen reb-A, steviosit ve reb-C için deneysel veriler ile BBT tarafından öngörülen verim arasındaki korelasyon katsayılarının 0.95'ten yüksek olduğu görülmektedir.

Tüm deneysel parametreler elde edilen polinom denklemleri (Y_8 , Y_9 , ve Y_{10}) yoluyla reb-C'nin verimi üzerinde olumlu bir etki gösterirken sırasıyla reb-A ve ST için sadece santrifüj kuvveti ve seyreltme faktörü etkilidir. Rebaudiosit A, steviosit ve rebaudiosit C'nin maksimum ve minimum ekstrakte edilebilir verimi Çizelge 4.16'da verilmiştir. Etkileşimler açısından ST (Y_9) üzerinde yalnızca X_1X_2 , reb-A (Y_8) üzerinde X_1X_2 ve X_1X_3 önemli bir etkiye sahiptir ($p < 0,05$). Çizelge 4.17'de görüldüğü gibi hepsinin Y_{10} üzerinde daha etkili olduğu bulunmuştur.

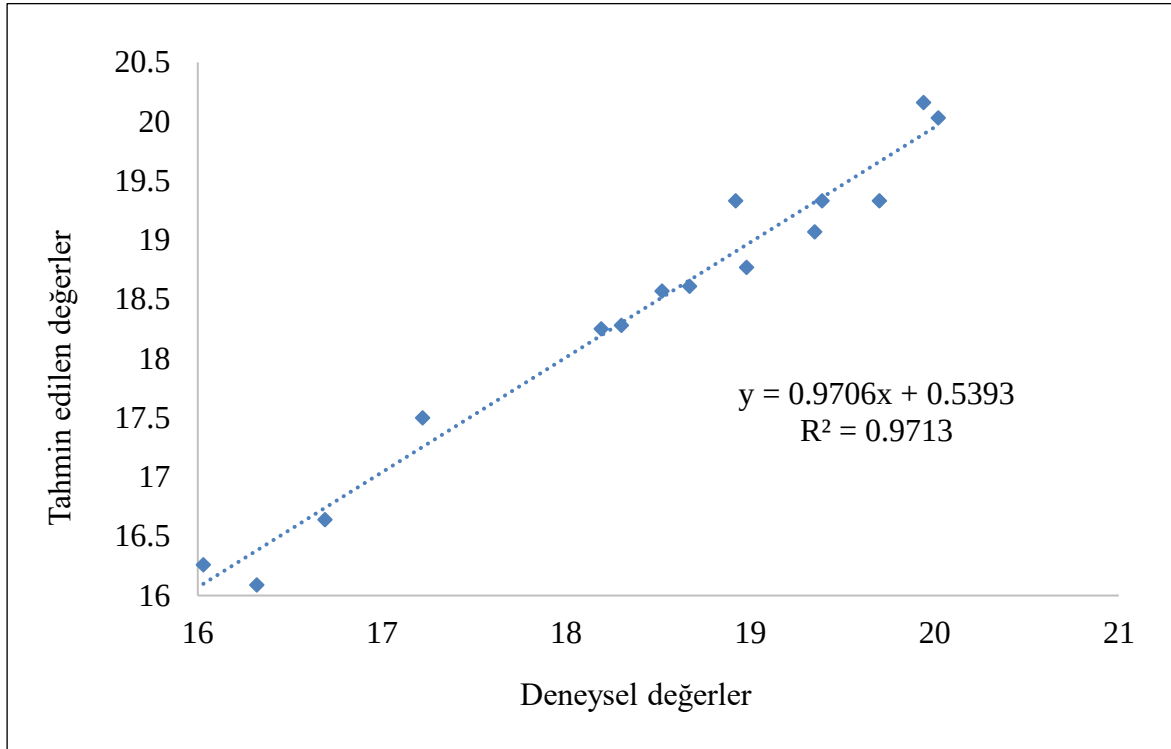
Çizelge 4.16. Box-Behnken tasarımı ve kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin deneysel sonuçları

Sıra	A	B	C	Reb-A (g/100g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-C (g/100 g KM)
1	7,5	2900	45	18,9165	10,2702	2,3976
2	7,5	2900	45	19,7008	10,0927	2,1711
3	5	2900	50	18,9834	10,1471	0,2684
4	5	2400	45	16,0347	10,6077	0,8545
5	10	2900	40	19,9434	10,5206	0,8384
6	7,5	2900	45	19,3869	10,1429	1,9898
7	7,5	3400	40	20,0161	10,5966	2,0278
8	5	2900	40	18,5229	10,4099	1,4052
9	7,5	3400	50	17,224	10,3612	1,4742
10	10	2900	50	16,6899	10,3179	2,9347
11	10	3400	45	16,3159	10,6791	2,1682
12	7,5	2400	50	18,2955	10,4169	1,8128
13	5	3400	45	18,668	10,4576	1,6140
14	7,5	2400	40	19,3482	10,5958	0,6934
15	10	2400	45	18,1886	10,4746	2,6836

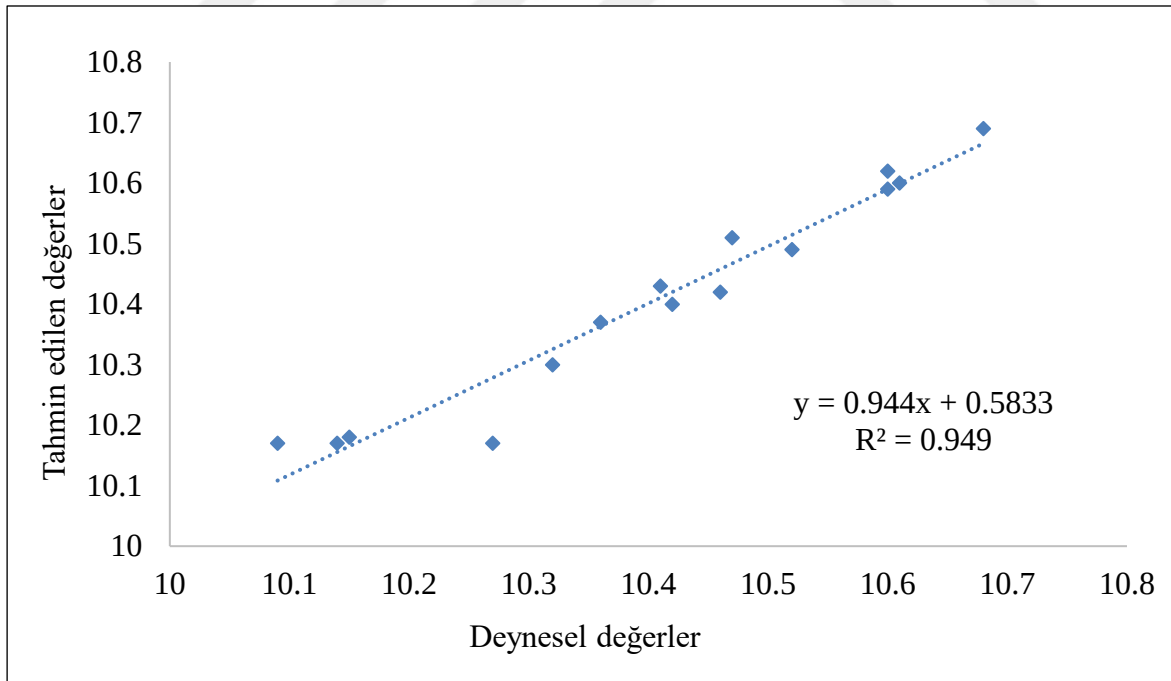
Çizelge 4.17. Sulu ekstraktlardan elde edilen Steviosit, Rebaudiosit A ve Rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Rebaudiosit A		Steviosit		Rebaudiosit C	
	Katsayılar	P	Katsayılar	P	Katsayılar	P
X_0	+19,33	0,0024	+10,17	0,0089	+2,19	0,0013
X_1	-0,1339	0,3503	+0,0462	0,1131	+0,5603	*
X_2	+0,0446	0,7454	-0,0001	0,9980	+0,1550	0,0709
X_3	-0,8297	*	0,1100	*	+0,1907	*
X_1X_2	-1,13	*	+0,0886	*	-0,3187	*
X_1X_3	-0,9285	*	+0,0150	0,6777	+0,8083	*
X_2X_3	-0,4349	0,0644	-0,0141	0,6957	-0,4182	*
X_1^2	-1.11	*	+0.1212	*	-0.2482	0.0552
X_2^2	-0.9234	*	+0.2649	*	-0,1079	0,3287
X_3^2	+0,3097	0,1666	+0,0591	0,1567	-0,5763	*

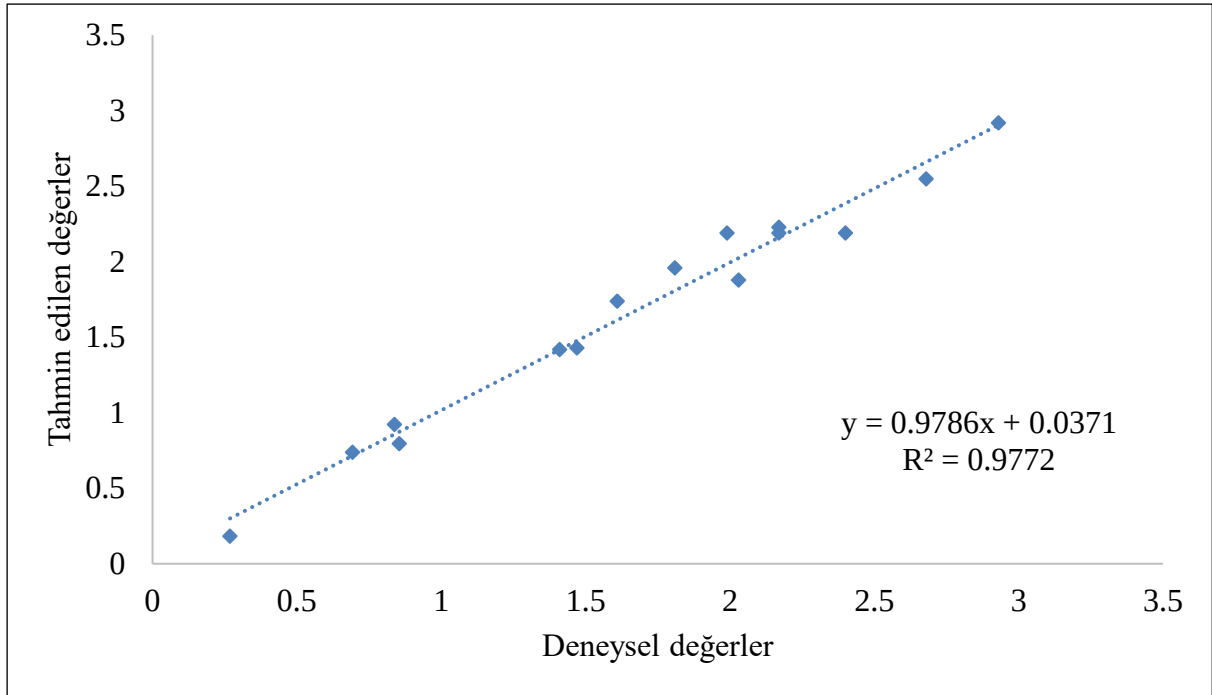
* P<0,05; ** P<0,01



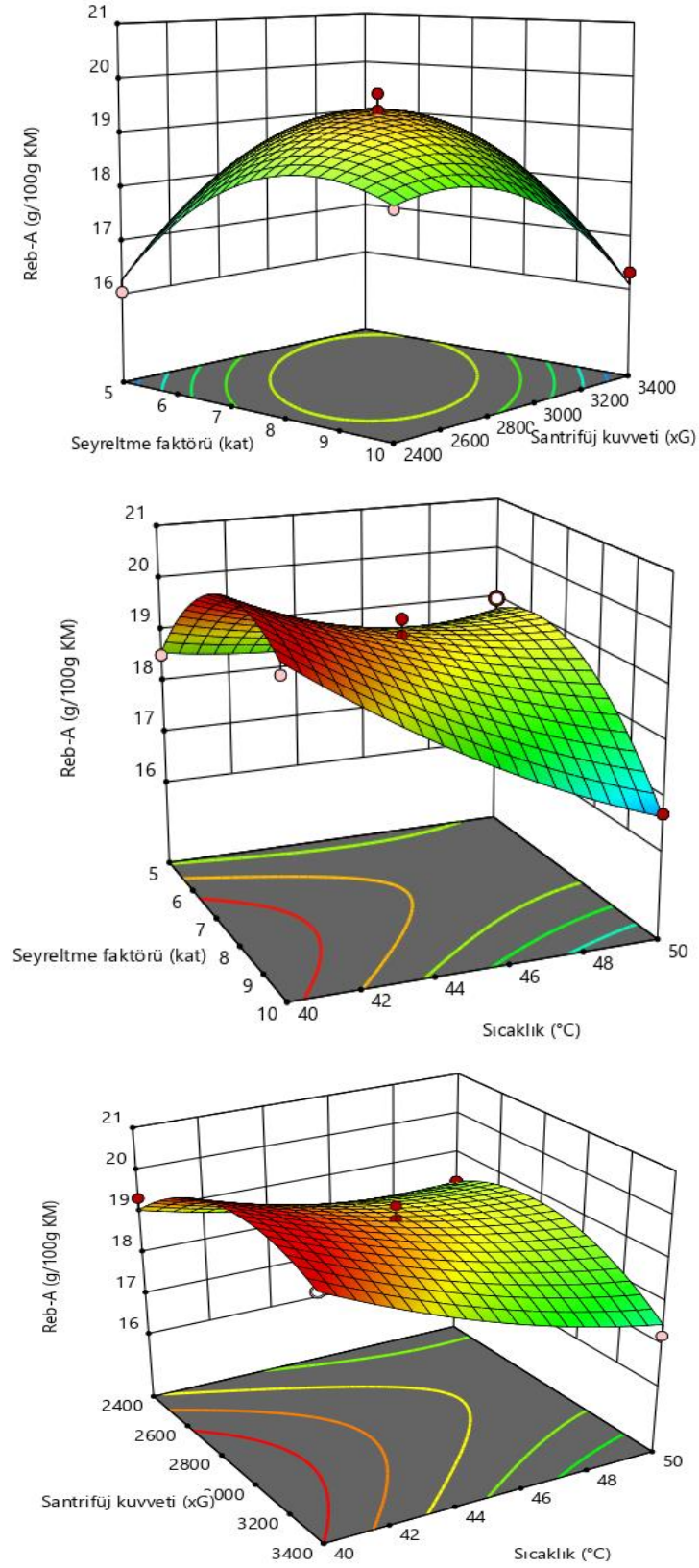
Şekil 4.19. Yüzey-yanıt metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklarından sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebudiosit A saflık oranı değerleri



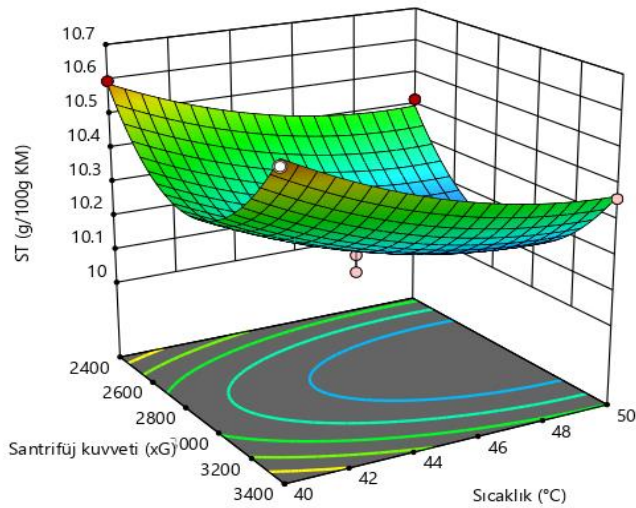
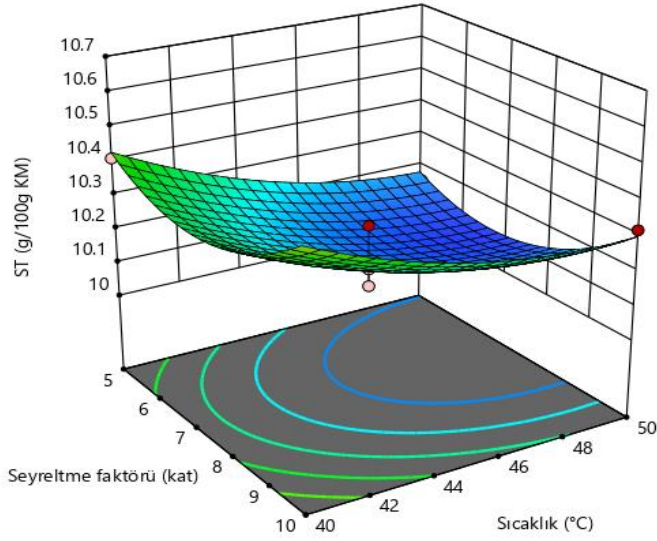
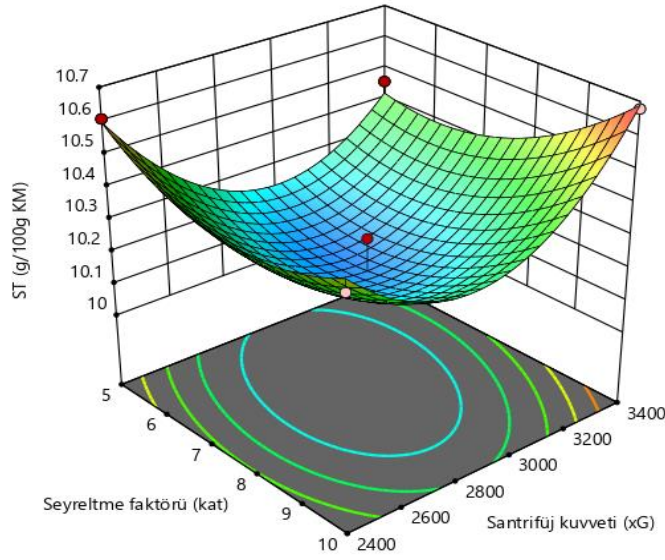
Şekil 4.20. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklarından sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit saflık oranı değerleri



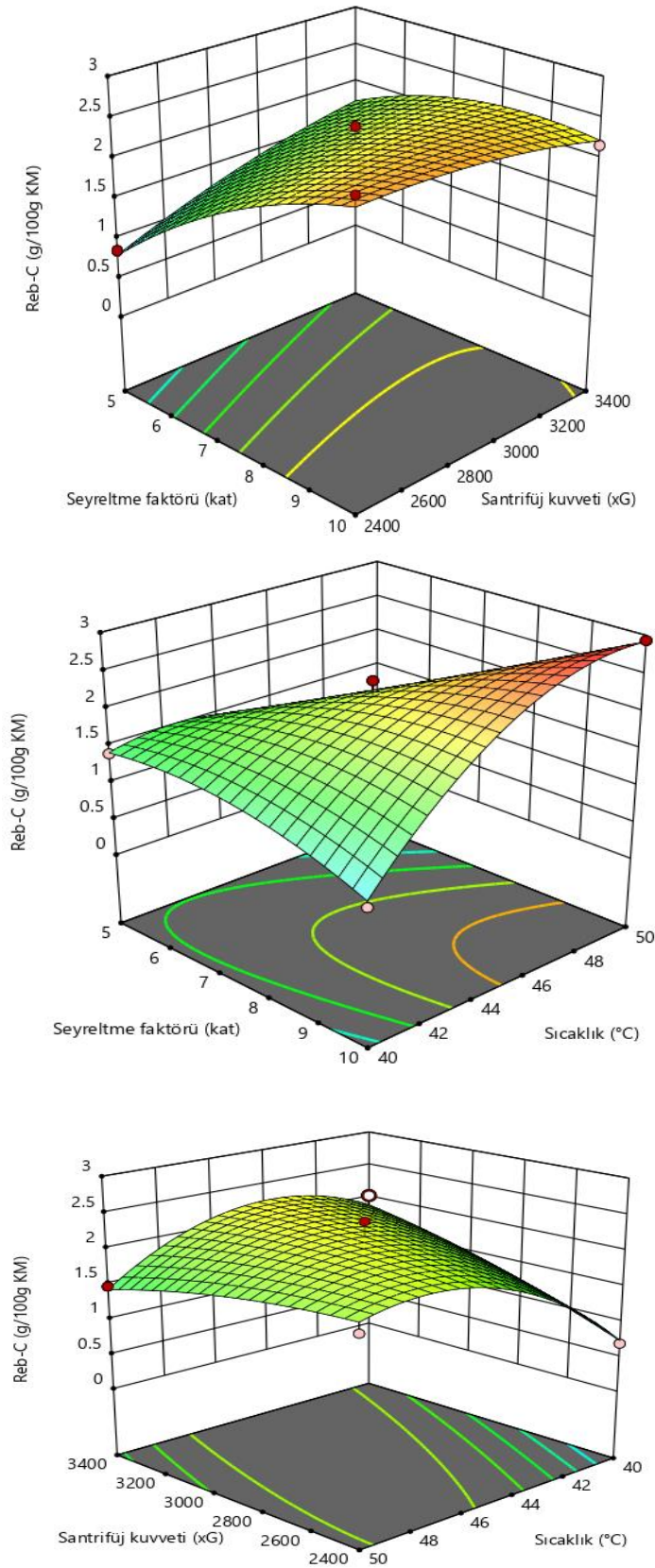
Şekil 4.21. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen kurutulmuş stevia yapraklardan sulu ekstraksiyonun sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C saflık oranı değerleri



Şekil 4.22. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Rebaudiosit A Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.23. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Steviosit Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.24. Kurutulmuş stevia yapraklarının sulu ekstraktlarından elde edilen Rebaudiosit C Yüzey-Yanıt grafikleri

4.2.2.6. Box-Behnken tarafından belirlenen, Kurutulmuş stevia yapraklarından sulu ekstraktların optimum koşulları.

Box-Behnken tasarımı (BBT) kurutulmuş stevia yaprağının sulu ekstraktlarından majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon koşullarının optimal deneysel değerlerini tanımlamak için orta nokta tekrarı dahil 15 ekstraksiyon koşulu üretmiştir. Rebaudiosit A ve steviosit miktarını en yüksek seviyeye çıkartmak amacıyla optimizasyon yapılmıştır.

Kurutulmuş stevia ekstraktlarından Rebaudiosit A ve steviosit ekstraksiyonu için optimal koşulların elde edilmesi için Çizelge 4.18'de belirtilen koşullar saptanmıştır. Optimum seyreltme faktörü, G-kuvveti ve ekstraksiyon sıcaklıkları sırasıyla 8,44 kat, 3399,999xG ve 40°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda elde edilen reb-A ve ST içeriği sırasıyla 12,75 ve 10,68 g/100 g KM düzeyindedir.



Çizelge 4.18. Kurutulmuş yaprakların sulu ekstraktlarının yüzey-yanıt metodu deneme desenine göre belirlenen optimum koşulları.

Seyreltme faktörü (kat)	G-kuvveti (xG)	Sıcaklık (°C)	Reb-A (g/100 g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-c (g/100 g KM)	TFM (GEA, g/100 g KM)	AA (TE, g/100 g KM)	Arzu edilirlik
8,443	3399,999	40	19,747	10,679	1,636	5,266	0,113	0,966

4.2.3. Kurutulmuş Stevia Yapraklarından Etanolle Ekstraksiyon

4.2.3.1. Kurutulmuş yapraklarından etanolik ekstraktlarının tanımlayıcı analizleri

Çizelge 4.19 solvent olarak etanol ile elde edilen ekstraktlardan ekstraksiyon sıcaklığı, seyreltme faktörü ve santrifüj kuvvetinin pH, titrasyon asitliği ve TKM üzerindeki etkisini göstermektedir. Ekstraksiyon parametrelerindeki değişiklikler, etanol hacmi arttıkça TA miktarı artacak şekilde olup 22,60'lık bir standart varyasyon ile, sırasıyla 5 ve 10 kat seyreltilmiş ekstraktlara 24,0-28,26 meq/100 g ve 67,12-79,63 meq/100 g arasında değişen bir farklılık saptanmıştır. Bu sonuçlar solventin polaritesinin bitki bileşenlerinin çözünürlüğünde güçlü bir etkiye sahip olduğunu doğrulamaktadır. Uygulanan ekstraksiyon sıcaklığı TA miktarının artmasına neden olmaktadır. Maksimum TA miktarı (92,67) 50°C'de elde edilmiştir. G-kuvveti arttıkça TA miktarı azalmaktadır. Maksimum TA miktarı 2400, 2900 ve 3400xG santrifüj kuvvetinde 50°C'de elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Bunun yanında sırasıyla düşük ve daha fazla seyreltilmiş ekstraktlarda 2,77-3,59 g ve 3,73-3,96 g aralasında değişiklik göstermiştir. Ekstraksiyon sıcaklığının ve TKM üzerinde etkisinin olmaması santrifüj kuvvetinin güçlü bir etkisi olduğunu göstermiştir. Düşük santrifüj kuvveti (2400xG) altında 10 kat seyreltilmiş ekstrakt ve 45 ° C ekstraksiyon sıcaklığında yüksek miktarda TKM ve Bx derecesi elde edildiği görülmüştür.

4.2.3.2. Ekstraksiyon Parametrelerinin etanolik kurutulmuş stevia yaprakları ekstraktlarından toplam fenolik madde (TFM) miktarı üzerine etkisi

Solvent olarak etanol kullanılan ekstraktlarda TFM 0,46-1,10 g GEA/100 g KM arasında değişmektedir (Çizelge 4.20). Etanolik ekstraktlarda saptanan TFM miktarının sulu ekstraktlara göre yaklaşık yarısı kadar olduğu belirlenmiştir. Bulgular, Periche vd. (2015a) tarafından kurutulmuş stevia yapraklarının etanolik ekstraktlarında bulunan değerlere yakın çıkmıştır.

Üretilen modelin korelasyon katsayısı R^2 ve P değeri sırasıyla 0,9572 ve 0,0063 olarak saptanmıştır. Santrifüj kuvvetinin ikinci dereceden modeli ekstraktların TFM'si üzerinde olumlu etkiye sahiptir (Çizelge 4.21). Etanolik kurutulmuş stevia yapraklarından ekstrakte edilen TFM için önerilen genelleştirilmiş ikinci dereceden polinom modeli aşağıdaki gibidir:

$$Y_2 \text{ (TFM)} = 0,7417 - 0,0561A + 0,0144B - 0,0616C - 0,0169AB + 0,1480AC - 0,1120BC + 0,2348A^2 + 0,0629B^2 - 0,1891C^2$$

Denklem 11

Şekil 4.26 farklı değişkenlerin (A, B, C) TFM üzerindeki etkisinin 3 boyutlu grafiğini göstermektedir. BBT tarafından verilen deneysel ve tahmin edilen verilerin karşılaştırılmasının deneyin saflığını ifade ettiği Şekil 4.25'de gösterilmiştir. En yüksek miktarda TFM verimi (1,10 g GEA/100 g KM) 5 kat seyreltme faktöründe, 45°C ekstraksiyon sıcaklığında ve 3400xG santrifüj kuvvetinde bulunmuştur.

Ayrıca, etanol miktarının artması sırasında TFM içeriğinde azalma eğilimi gözlenmiştir (Şekil 4.26). Bu, yüksek etanol konsantrasyonunun TFM ekstraksiyonunu engellediğini ortaya koymaktadır. Nitekim, Ciulu vd. (2017) MAE kullanarak kurutulmuş stevia yapraklarından TFM ekstraksiyonu için saf ekstraksiyon solventlerinin (su ve etanol) kullanımıyla en düşük sonuçları elde etmiştir.

İncelenen sıcaklık seviyelerine gelindiğinde TFM verimi üzerinde güçlü bir etki fark edilmiştir. Şekil 4.26, uygulanan ekstraksiyon sıcaklığı ile etanolik ekstraktların TFM verimi arasındaki etkileşimleri göstermekte ve sıcaklığın TFM ekstraksiyon sürecine etkisini

doğrulamaktadır. Yüksek sıcaklığın fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü artırma özelliğinden dolayı 40° C'den 45°C'ye artan sıcaklıkla birlikte TFM miktarı yükselmiştir. TFM ekstraksiyonu için en uygun ekstraksiyon sıcaklığı 45 °C olarak bulunmuştur (Şekil 4.25). Yüksek sıcaklıklar fenolik bileşikleri degrade edebilmektedir (Gironi ve Piemonte 2011)

Uygulanan santrifüj kuvveti, etanolik ekstraktlardan elde edilen TFM'yi önemli ölçüde etkilememiştir. Bununla birlikte, santrifüj kuvveti arttıkça TFM'de hafif bir artış gözlenmektedir (Şekil 4.26). Optimum santrifüj kuvveti 3400xG olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon işlemi sırasında santrifüj kuvvetindeki artışa rağmen, 50°C'de TFM'de bir azalma olduğu da fark edilmektedir. Bu durum sıcaklığın fenolik madde üzerindeki olumsuz etkisinden kaynaklanmaktadır (Yen 2019).



Çizelge 4.19.Kurutulmuş yaprakların etanolik ekstraktlarının, pH değeri, titrasyon asitliği (TA) ve toplam kuru madde (TKM) değerleri.

Ekstraktlar	SD	pH	Titrasyon Asitliği (TA)	TKM
A40B	9	6,15± 0,05	28,26± 0,07	3,32
A45A	9	5,80± 0,15	27,08± 0,29	3,57
A45C	9	5,71± 0,05	26,20± 0,02	3,59
A50B	9	5,73± 0,09	24,07±0,17	2,77
B40A	9	5,80± 0,05	54,27± 0,33	2,76
B40C	9	5,77± 0,02	47,19± 0,04	3,58
B45B1	9	5,65± 0,15	41,09± 0,20	4,02
B45B2	9	5,73± 0,15	55,83± 0,37	3,51
B45B3	9	5,87± 0,19	54,17± 0,27	3,83
B50A	9	6,01± 0,08	92,66± 0,05	3,76
B50C	9	6,09± 0,10	81,67± 0,31	3,5
C40B	9	6,0± 0,26	67,13± 0,16	3,73
C45A	9	5,76± 0,01	73,43± 0,03	3,87
C45C	9	5,89± 0,37	79,63± 0,10	3,96
C50B	9	5,74± 0,02	74,81± 0,03	3,83

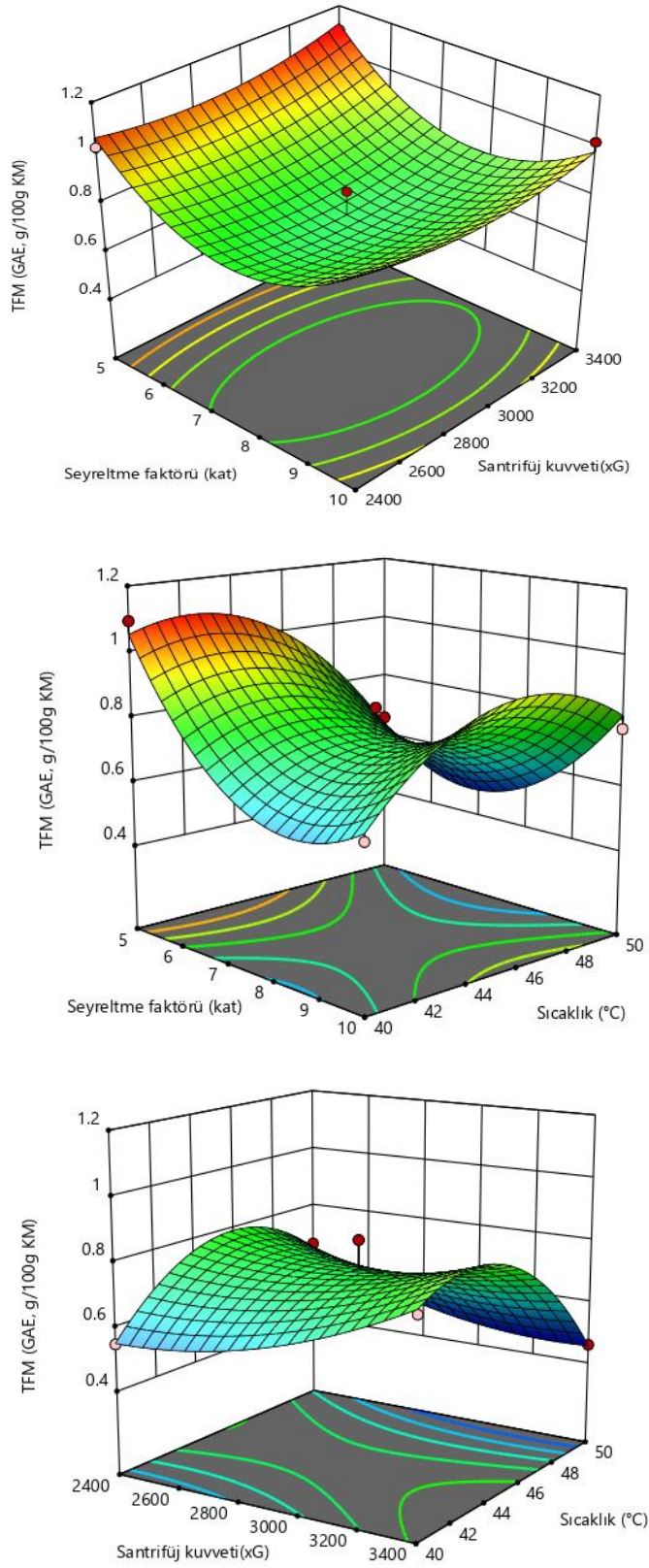
Çizelge 4.20. Box-Behnken tasarımı ve etanol ekstraksiyonu ile elde edilen TFM sonuçları

Sıra	B	A	C	TFM (GAE, g /100 g KM)
1	2900	7,5	45	0,73±0,03
2	2900	7,5	45	0,65±0,02
3	2900	5	50	0,66±0,02
4	2400	5	45	1,03±0,02
5	2900	10	40	0,62±0,00
6	2900	7,5	45	0,84±0,02
7	3400	7,5	40	0,79±0,01
8	2900	5	40	1,09±0,01
9	3400	7,5	50	0,46±0,00
10	2900	10	50	0,78±0,03
11	3400	10	45	1,02±0,00
12	2400	7,5	50	0,67±0,02
13	3400	5	45	1,10±0,02
14	2400	7,5	40	0,55±0,01
15	2400	10	45	1,01±0,00

Çizelge 4.21. Etanolik ekstralarda toplam fenolik maddenin (TFM) saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	+0,7417	0,0063
A	-0,0561	0,0774
B	+0,0144	0,5935
C	-0,0616	0,0590
AB	-0,0169	0,6556
AC	+0,1480	*
BC	-0,1120	*
A ²	+0,2348	*
B ²	+0,0629	0,1518
C ²	-0,1891	*

* P<0,05, ** P<0,01



Şekil 4.25. YYM modeli ile elde edilen etanolik ekstraktlardan elde edilen TFM'nin deneysel verilerinin 3B grafiği

4.2.3.3. Ekstraksiyon parametrelerinin kurutulmuş stevia yapraklarının etanolik ekstraktlarında antioksidant aktivite üzerine etkisi

Çizelge 4.22 kurutulmuş stevia yaprağı etanolik ekstraktlarından elde edilen antioksidan aktivitenin sonuçlarını göstermektedir. Antioksidan kapasitesi 0,48-0,17g TE/100 g KM arasında değişmektedir ve ekstraktların antioksidan özelliklerini doğrulamaktadır. Burada, DPPH aktivitesinin miktarı sulu ekstrelerdekinden biraz daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç etanolün sudan daha polar olmasından ve antioksidan bileşiklerin çözünürlüğünü artırmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 4.27’de etanolik kurutulmuş stevia yaprak ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri üzerinde ekstraksiyon parametrelerinin etkileşimli etkisi gösterilmektedir. Genel olarak, kurutulmuş stevia yapraklarının antioksidan kapasitesi etanol oranının artmasıyla birlikte artmaktadır. En yüksek AA verimi 10 kat seyreltilmiş örneklerde elde edilmiştir.

Sıcaklığın yükselmesiyle beraber elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitesi azalmakta, ancak, seyreltme faktörünün yükselmesinin pozitif etkisi olduğu görülmektedir. Bu sonuç da önceki bazı çalışmalarla örtüşmemektedir (Thoo vd. 2010; Bachir vd. 2014; Topuz vd. 2016). Bu çalışmalarda artan sıcaklık ve solvent-katı oranının ekstraktların antioksidan aktivitesini artırabildiği bildirilmiştir. En güçlü antioksidan aktivite 45°C’de elde edilmiştir. Burada stevia yapraklarının bir miktar ısıya duyarlı bileşenler içerebileceği de düşünülmektedir. Uygulanan ekstraksiyon sıcaklığı 40-45°C arasında iken bir artış görülmüştür. Prasad vd. (2011) *M. pajang* kabuğunun ekstraktlarının daha yüksek etanol konsantrasyonu ve daha yüksek sıcaklık ile ekstrakte edildiğinde daha düşük antioksidan aktivite gösterdiğini; çünkü artan sıcaklığın antioksidan aktivitede bir düşüşe neden olacağı gerçeğini ve sıcaklığın daha fazla artması fenolik bileşiklerin bozunmasına neden olacağını bildirmiştir.

Santrifüj kuvvetinin yükselmesi ekstraktların DPPH aktivite gücünün azalmasına neden olmaktadır. Ekstraksiyonda 2900xG kuvveti optimum olarak kabul edilmektedir. Bu koşullarda elde edilen ekstraktlarda en yüksek AA elde edilmiştir (Şekil 4.28). Seyreltme faktörü ve santrifüj kuvveti antioksidan etkinliği üzerinde nispeten daha güçlü bir etkileşim oluşturmaktadır. En güçlü antioksidan aktivite etanol ile en yüksek seviyede seyreltilmiş etanol ekstraktlarında ve yüksek santrifüj kuvvetinde gözlenmiştir (Çizelge 4.22). Santrifüj kuvveti ve seyreltme faktörünü içeren iki değişkenin etanolik ekstraktlarda antioksidan aktivite üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu doğrulanmıştır ($p < 0,05$). Bu sonuç Şekil 4.27’deki seyreltme faktörünün ve santrifüj kuvvetinin büyük etkiye sahip olduğu ve ekstraksiyon sıcaklığının etkilerinin önemli ölçüde algılanmadığı gözlemiyle uyum içindedir. Deneyin saflığı Şekil 4.27’de gösterilmektedir ve etanolik ekstraktlarda AA için önerilen genelleştirilmiş ikinci dereceden polinom modeli aşağıdaki gibidir.

$$Y_{12}(AA) = 0,1088 + 0,0450A - 0,0170B - 0,0101C - 0,0219AB + 0,0005AC + 0,0306BC + 0,0090A^2 - 0,0304B^2 - 0,0352C^2$$

Denklem 12

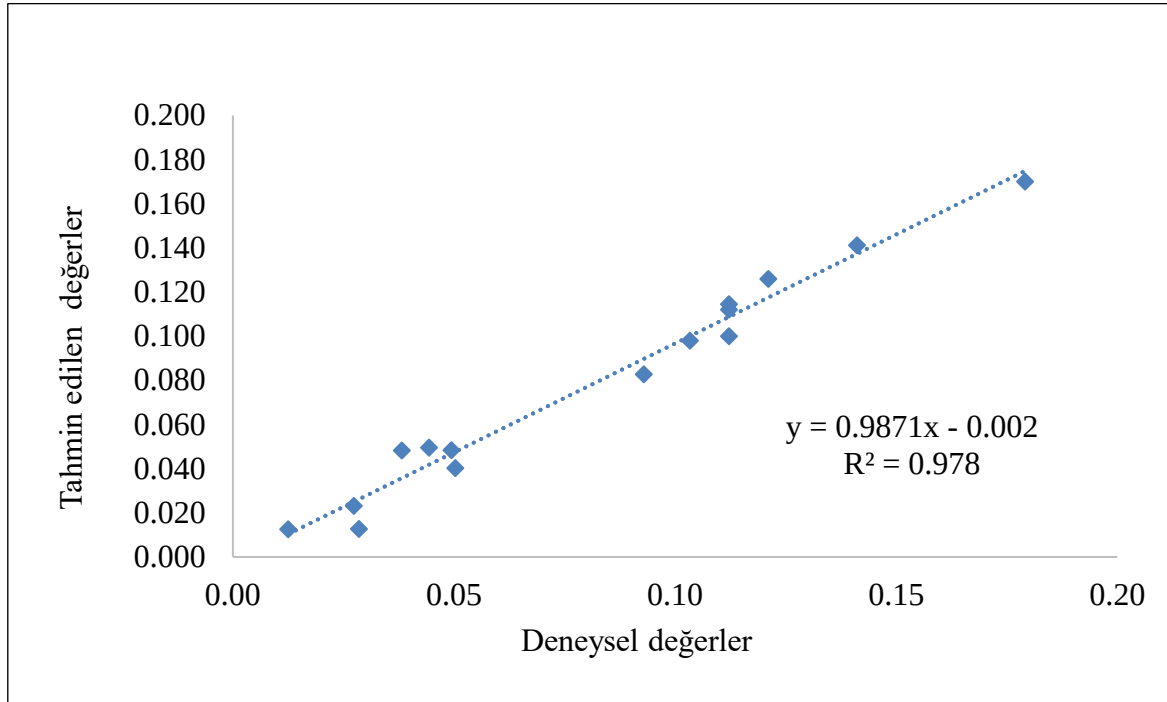
Çizelge 4.22. Box-Behnken tasarımı ve etanolik ekstraktların deneysel AA sonuçları (n=9)

Sıra	A	B	C	AA (TE g/100 g KM)
1	7,5	2900	45	0,115±0,09
2	7,5	2900	45	0,112±0,10
3	5	2900	50	0,023±0,06
4	5	2400	45	0,048±0,10
5	10	2900	40	0,141±0,10
6	7,5	2900	45	0,100±0,07
7	7,5	3400	40	0,013±0,05
8	5	2900	40	0,040±0,11
9	7,5	3400	50	0,050±0,02
10	10	2900	50	0,126±0,09
11	10	3400	45	0,083±0,08
12	7,5	2400	50	0,013±0,03
13	5	3400	45	0,048±0,13
14	7,5	2400	40	0,098±0,05
15	10	2400	45	0,170±0,08

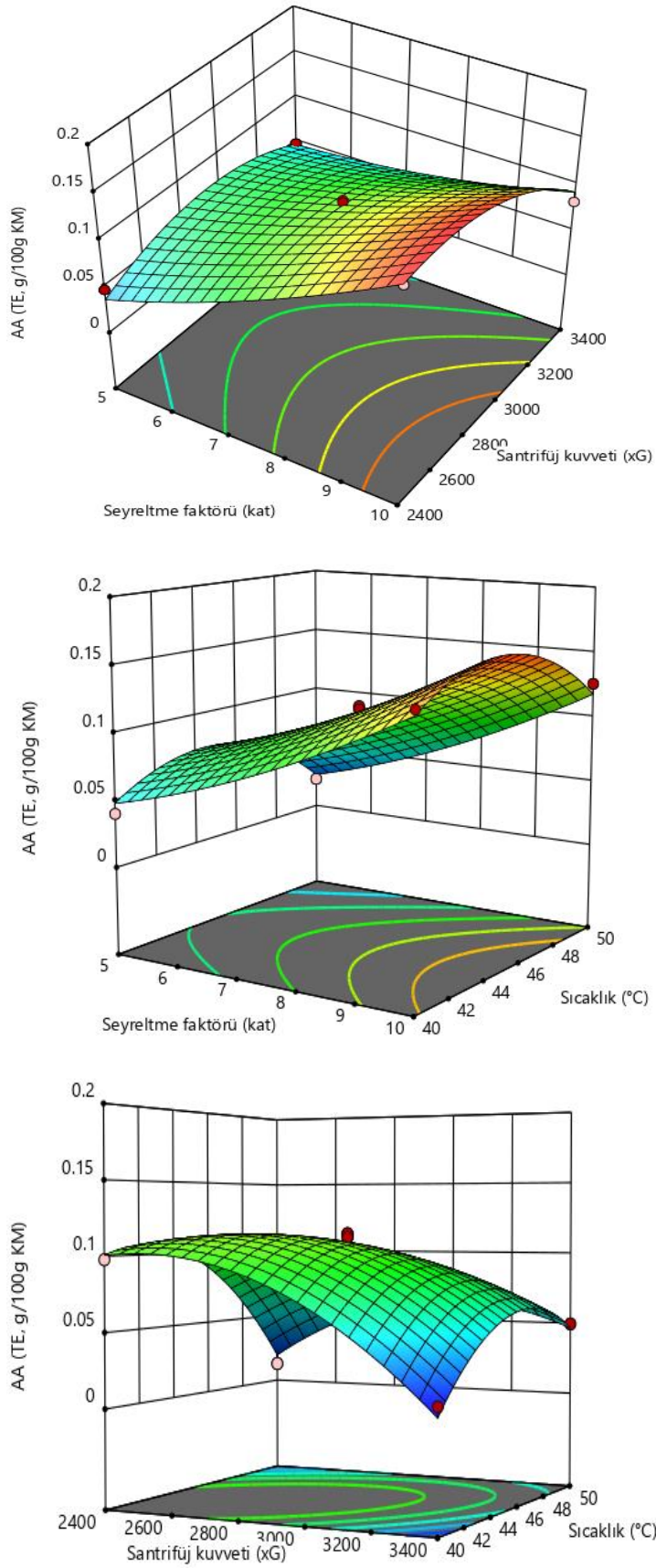
Çizelge 4.23. Etanolik kurutulmuş yapraklarından ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesinin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Katsayılar	P
Sabit	0,1088	0,0008
A	+0,0450	**
B	-0,0170	*
C	-0,0101	0,0502
AB	-0,0219	*
AC	+0,0005	0,9292
BC	+0,0306	*
A ²	+0,0090	0,1818
B ²	-0,0304	0,0033
C ²	-0,0352	0,0017

* P<0,05, ** P < 0,01



Şekil 4.26. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen AA saflık oranı değerleri



Şekil 4.27. YYM modeli tarafından verilen etanolik ekstraktlardan elde edilen Antioksidan Aktivitenin deneysel verilerinin 3B grafiği.

4.2.3.4. Ekstraksiyon parametrelerinin kurutulmuş stevia yapraklarının etanollü ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozit verimi üzerindeki etkisi

Ekstraksiyonda kullanılan bağımsız değişkenler için Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te gösterilen tepki yüzeyleri 3B grafiği, etanolik ekstraktlardan majör steviol glikozitlerin elde edilen verimi göstermektedir. Burada, tüm ekstraksiyon parametreleri reb-A ve ST'nin verimi üzerinde önemli etkilere sahipken sadece seyreltme faktörü ve ekstraksiyon sıcaklığı reb-C verimi üzerinde önemli bir etki göstermiştir.

Ekstraktlarda santrifüj kuvvetinden bağımsız olarak reb-A verimi 16,75- 10,34 g/100 g bulunmuştur. Santrifüj kuvveti sabitken (2900xG) seyreltme faktörü ile ekstrakte edilen steviol glikozit verimi artış göstermiştir. Ekstrakte edilen ST ve reb-C miktarı 40°C'de sırasıyla 10,99-20,40 g/100 g KM ve 0,0003-0,39 g/100 g KM düzeyine yükselmiştir. Bu sonuçlar steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin solvente ve solvent hacmine bağlı olduğunu göstermiştir. Solvent ve hücre matrisi arasındaki konsantrasyon farkının artmasının ekstraksiyon verimini artırdığı Panja ve Mukhopadhyay (2019) tarafından bildirilmiştir. Yüksek etanol oranı elde edilen reb-A veriminin yükselmesine katkıda bulunmuştur.

Santrifüj kuvvetinin reb-A (Şekil 4.31), ST (Şekil 4.32) ve reb-C (Şekil 4.33) üzerindeki etkisine bakıldığında ekstraksiyon sıcaklığı 45°C'de sabit tutulduğunda farklı santrifüj kuvvetlerinin farklı etkiler oluşturduğu görülmektedir. Ekstraktların konsantrasyonuna bakılmaksızın santrifüj kuvvetinin artmasıyla reb-A verimi de artmaktadır. Seyreltilme oranı yüksek ekstraktlarda ST ve reb-C veriminde de bir artış vardır. Çizelge 4.24'te gösterildiği gibi reb-A, ST ve reb-C'nin en yüksek elde edildiği santrifüj kuvvetleri sırasıyla 2900 ve 3400 xG olarak saptanmıştır.

Majör steviol glikozit verimi üzerine sıcaklığının etkisini saptamak için 40°, 45° ve 50°C'de 30 dakika süreyle ekstraksiyon uygulanmıştır. Çizelge 4.24'te görüldüğü gibi tüm steviol glikozitler sıcaklıktan etkilenmiştir. Santrifüj kuvveti 2900xG'de sabit olduğunda ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça ST azalmış; etanolik ekstraktların konsantrasyonuna bakılmaksızın reb-C verimi artmış ve reb-A verimi seyreltme oranı arttıkça yükselmiştir. Bununla birlikte, seyreltme faktörü merkez noktada sabit olduğunda (7,5 kat) sıcaklık arttıkça uygulanan G kuvvetine bakılmaksızın ST azalmakta ve reb-C artmaktadır. Rebaudiosit A ise yüksek santrifüj kuvveti ile azalmaktadır. Bu sonuçlar ekstraksiyon sıcaklığının ekstraksiyon yöntemine (Yen, 2019), solvent yapısına ve içerdiği bileşik miktarına bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Elde edilen sonuçlara göre optimum ekstraksiyon sıcaklığı reb-A ve reb-C için 50°C ve ST için 45°C'dir.

4.2.3.5. Stevia yaprağı sulu ekstraktlarından elde edilen majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon veriminin optimizasyonu için modellerin doğrulanması

Ekstraksiyon parametrelerinin etanolik ekstraktlarda majör steviol glikozitler üzerindeki etkisi Çizelge 4.24'te verilmiştir. Bildirilen sonuçların çoklu doğrusal regresyonlarından (MLR) elde edilen modelleri değerlendirmek için varyans analizleri (ANOVA) uygulanmış ve ikinci dereceden polinom denklemleri Denklem 13, Denklem 14 ve Denklem 15 Çizelge 4.25'te listelenmiştir. Burada (Y₁₃) reb-A, (Y₁₄) ST ve (Y₁₅) reb-C'nin ekstraksiyon verimi ve kodlanan bağımsız değişkenler (seyreltme faktörü (X₁), santrifüj kuvveti (X₂), sıcaklık (X₃)) üzerinde çalışılan her faktöre bağlanmıştır:

$$Y_{13}(\text{reb-A}) = 11,19X_0 - 3,69X_1 + 1,37X_2 - 1,12X_3 + 0,0352X_1X_2 - 2,61X_1X_3 + 1,78X_2X_3 + 7,29X_1^2 - 3,04X_2^2 + 4,19X_3^2$$

Denklem 13

$$Y_{14}(ST) = 13,46X_0 + 2,79X_1 + 1,61X_2 - 2,23X_3 + 2,46X_1X_2 - 1,98X_1X_3 - 0,8884X_2X_3 - 0,3000X_1^2 + 0,1079X_2^2 - 0,6784X_3^2$$

Denklem 14

$$Y_{15}(\text{Reb-C}) = 0,9443X_0 + 0,3634X_1 + 0,0148X_2 + 0,1993X_3 + 0,4248X_1X_2 + 0,1015X_1X_3 + 0,0468X_2X_3 - 0,1768X_1^2 + 0,2576X_2^2 - 0,4055X_3^2$$

Denklem 15

Şekil 4.31, Şekil 4.13 ve Şekil 4.33'te vurgulanan yerleştirilmiş ikinci dereceden modeller yanıt yüzeylerinin üç boyutlu temsillerini göstermektedir. Buna göre, reb-A, ST ve reb-C verimi için sırasıyla 0,9899, 0,9800 ve 0,9845'lik yüksek bir korelasyon katsayısı (R^2) saptanmıştır. Ayrıca, deneysel veriler ile BBT tarafından öngörülen verim arasında bulunan %97'nin üzerindeki yüksek korelasyon katsayıları geliştirilen modelin reb-A (Şekil 4.28), ST (Şekil 4.29) ve reb-C (Şekil 4.30) için uyumlu olduğunu göstermektedir. Maksimum ve minimum ekstrakte edilen steviol glikozitler Çizelge 4.24'de sunulmuştur. Bununla birlikte, elde edilen denklemler ekstrakte edilen tüm majör steviol glikozitlerde santrifüj kuvvetinin pozitif etkisini göstermiştir. Seyreltme faktörü sadece reb-A (Y_{13}) için negatif, ekstraksiyon sıcaklığı ise sadece reb-C (Y_{15}) için pozitifdir. Etkileşimler açısından, sadece X_1X_2 'nin reb-C (Y_{15}) üzerinde anlamlı bir etkisi vardır ($p < 0,05$). Steviosit verimi (Y_{14}) üzerinde ise X_1X_3 ve X_1X_2 'nin daha etkili olduğu bulunmuştur.

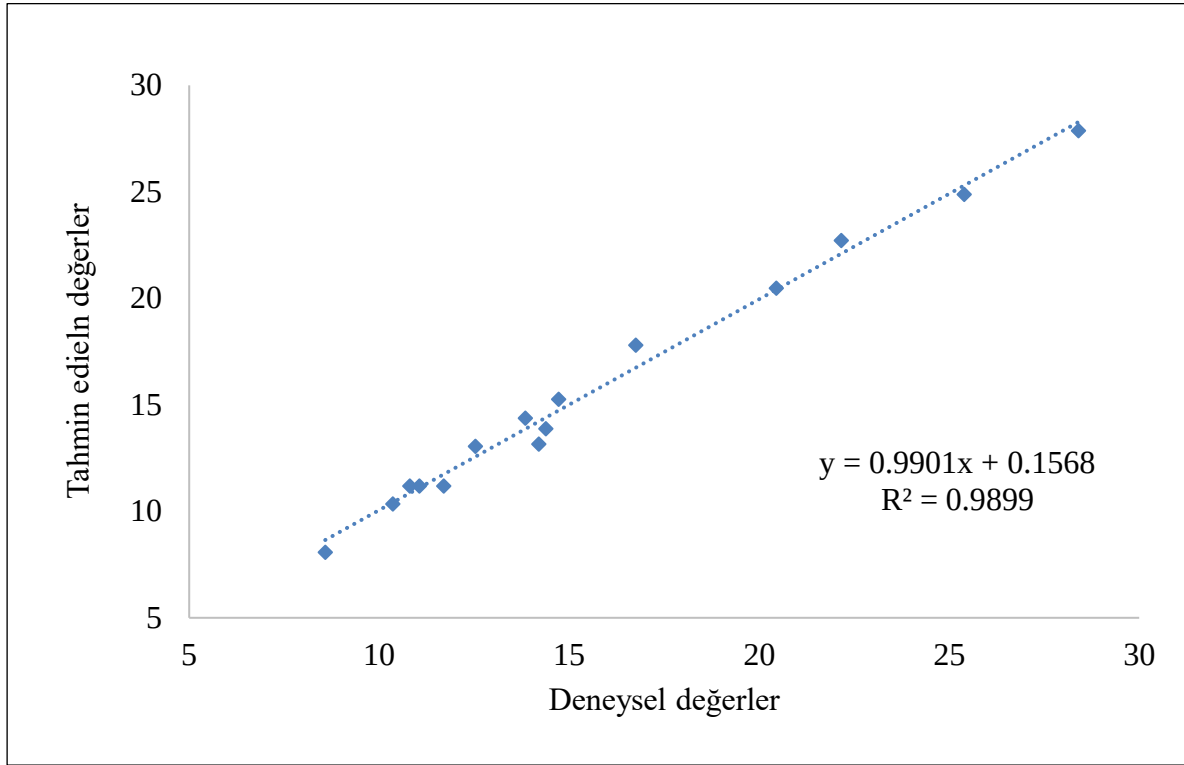
Çizelge 4.24. Etanolik ekstraktlardan elde edilen majör steviol glikozitin Box-Behnken tasarımı ve deneysel sonuçları

Sıra	A	B	C	Reb-A (g/100 g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-C (g/100 g KM)
1	7,5	2900	45	10,8132	12,4832	0,8989
2	7,5	2900	45	11,7001	14,1586	0,9360
3	5	2900	50	28,3985	9,72397	0,1309
4	5	2400	45	16,7488	11,5654	0,9975
5	10	2900	40	22,1641	20,394	0,3898
6	7,5	2900	45	11,0643	13,7435	0,9978
7	7,5	3400	40	12,5314	16,9422	0,5256
8	5	2900	40	25,3951	10,9983	0,0003
9	7,5	3400	50	13,8456	11,4877	1,0825
10	10	2900	50	14,7206	11,2172	0,9267
11	10	3400	45	14,2013	21,1002	1,9021
12	7,5	2400	50	8,57933	10,6172	0,9735
13	5	3400	45	20,4491	10,439	0,1917
14	7,5	2400	40	14,3911	12,5182	0,6036
15	10	2400	45	10,36	12,3741	1,0089

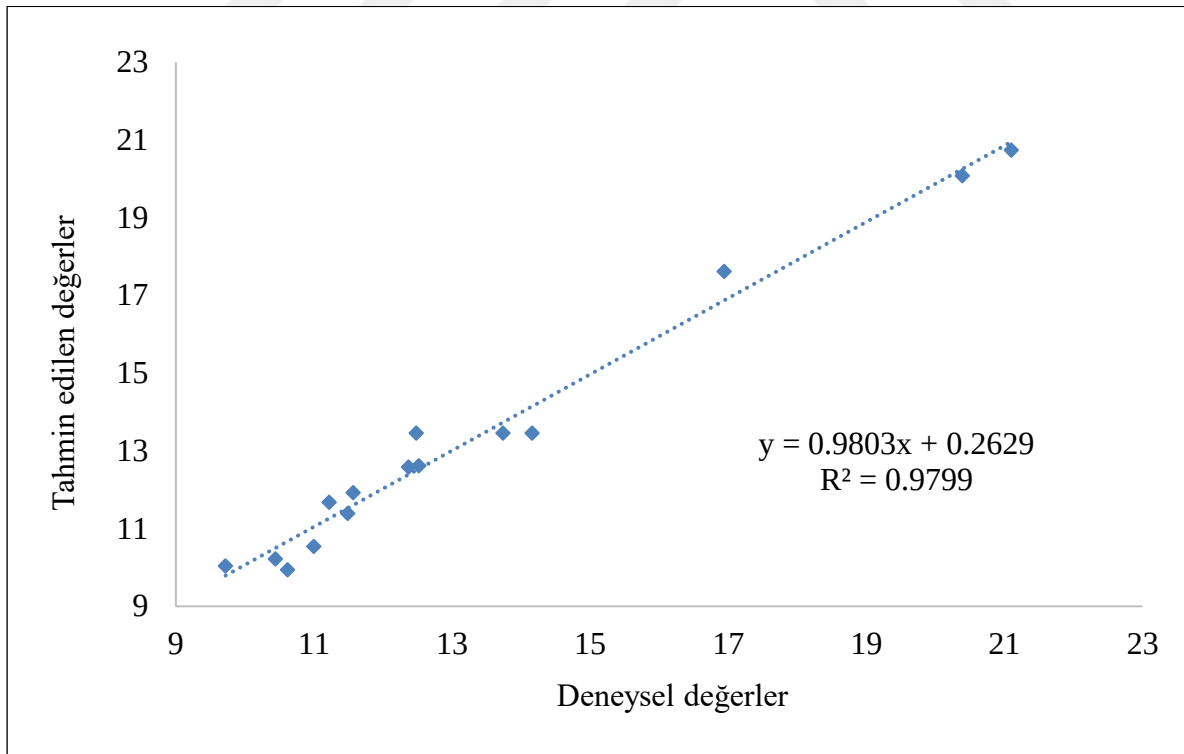
Çizelge 4.25. Kurutulmuş yapraklardan elde edilen etanolik ekstraktlarda steviosit, rebaudiosit A ve rebaudiosit C'nin saflık oranı için tahmin edilen regresyon katsayıları

Terim	Rebaudiosit A		Steviosit		Rebaudiosit C	
	Katsayılar	P	Katsayılar	P	Katsayılar	P
X_0	+11,19	0,0002	+13,46	0,0010	+0,9443	0,0005
X_1	-3,69	*	+2,79	*	+0,3634	*
X_2	+1,37	*	+1,61	*	+0,0148	0,6920
X_3	-1,12	*	-2,23	*	+0,1993	*
X_1X_2	+0,0352	0,9457	+2,46	*	+0,4248	*
X_1X_3	-2,61	*	-1,98	*	+0,1015	0,0974
X_2X_3	+1,78	*	-0,8884	0,0847	+0,0468	0,3915
X_1^2	+7,29	**	+0,3000	0,5173	-0,1768	*
X_2^2	-3,04	*	+0,1079	0,8121	+0,2576	*
X_3^2	+4,19	*	-0,6784	0,1762	-0,4055	*

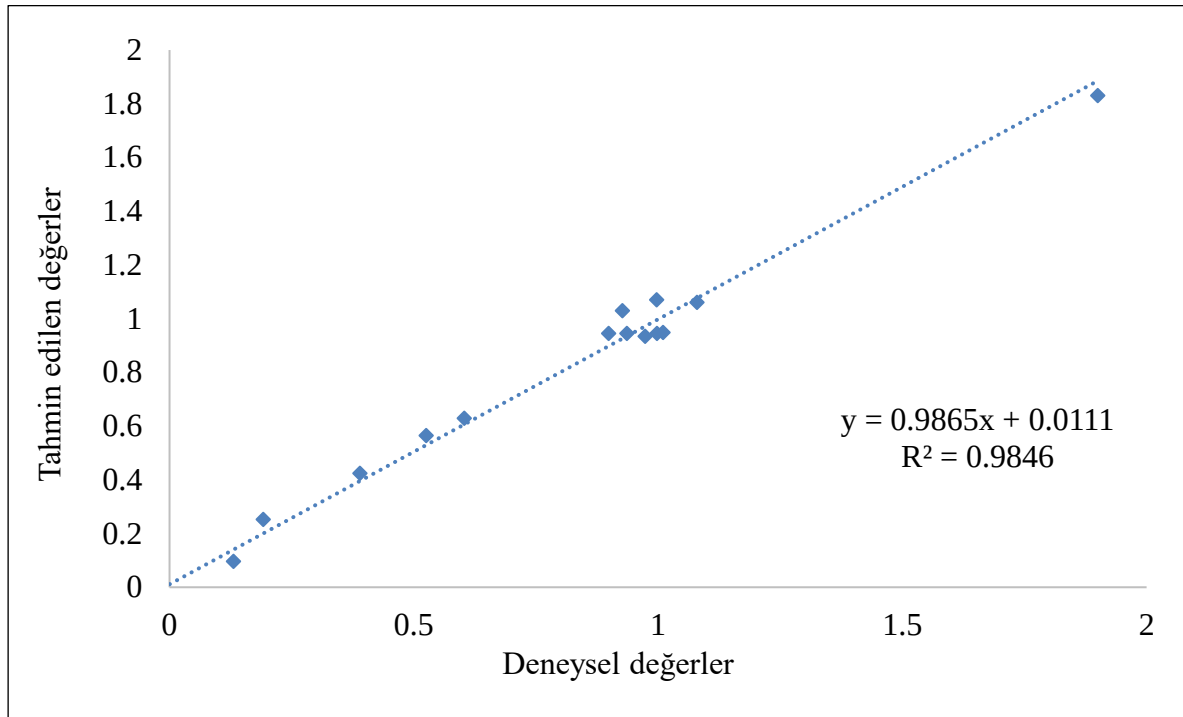
* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$



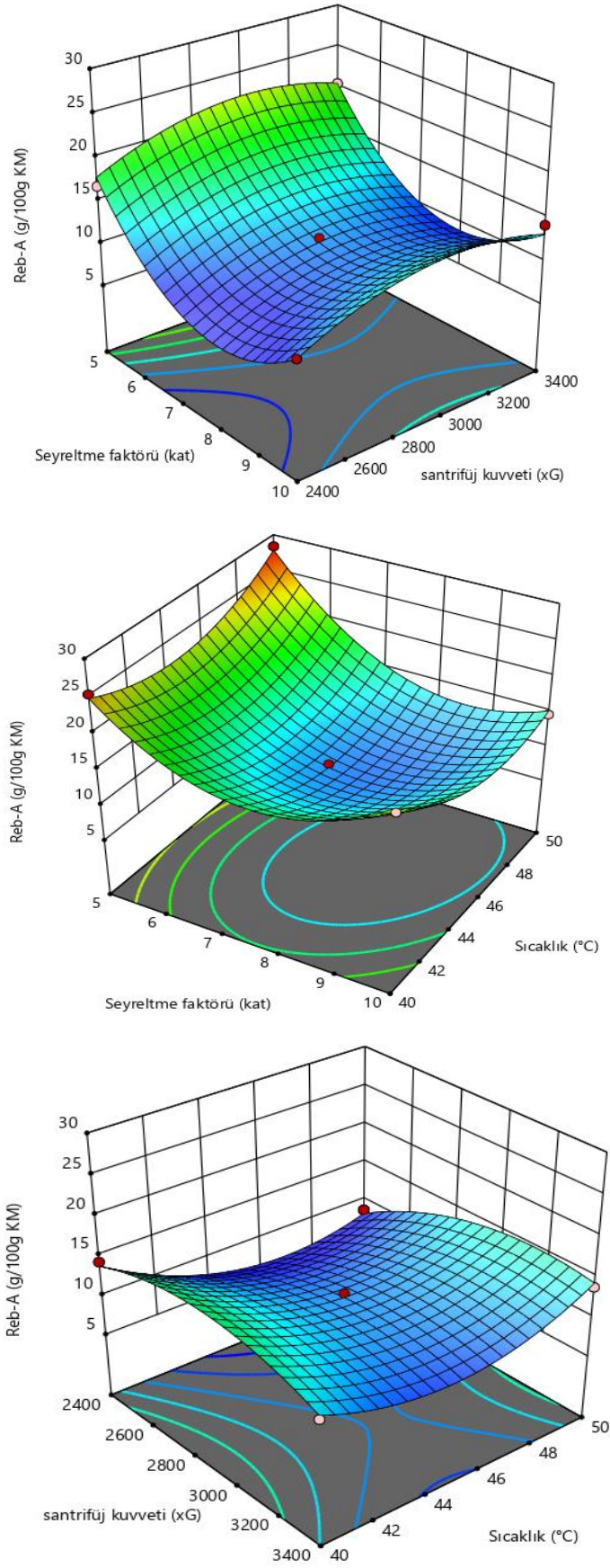
Şekil 4.28. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit A saflık oranı değerleri



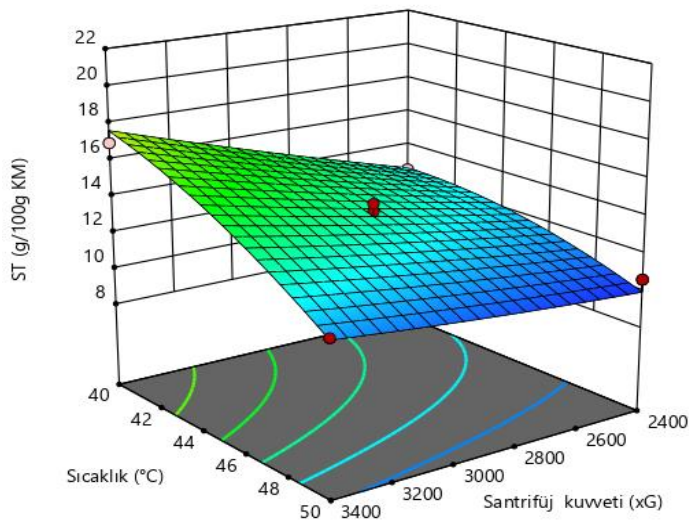
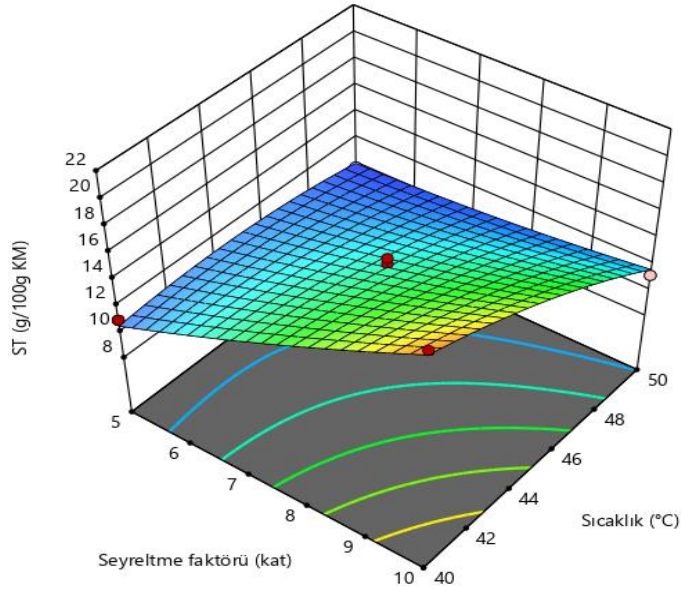
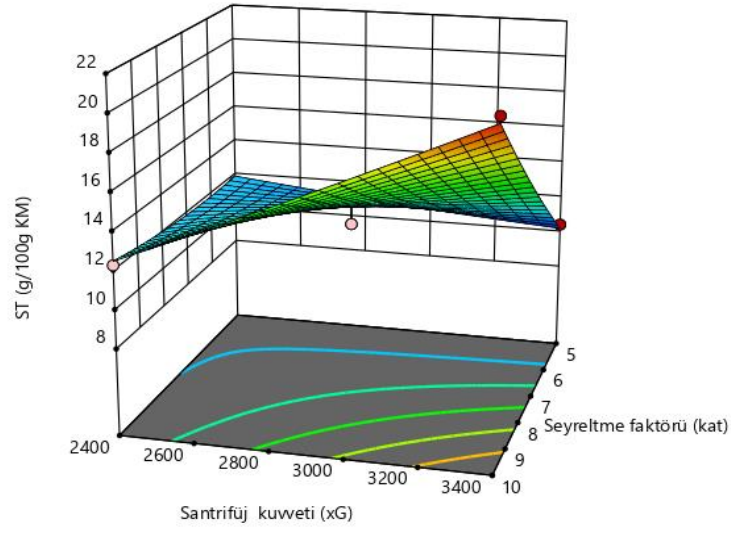
Şekil 4.29. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen steviosit saflık oranı değerleri



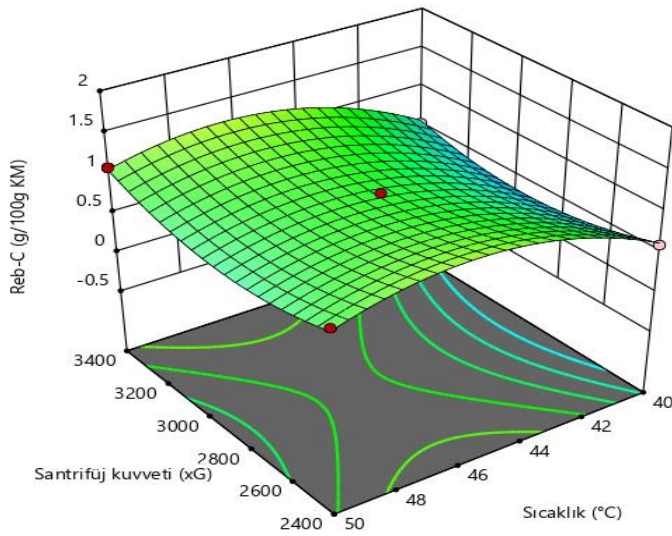
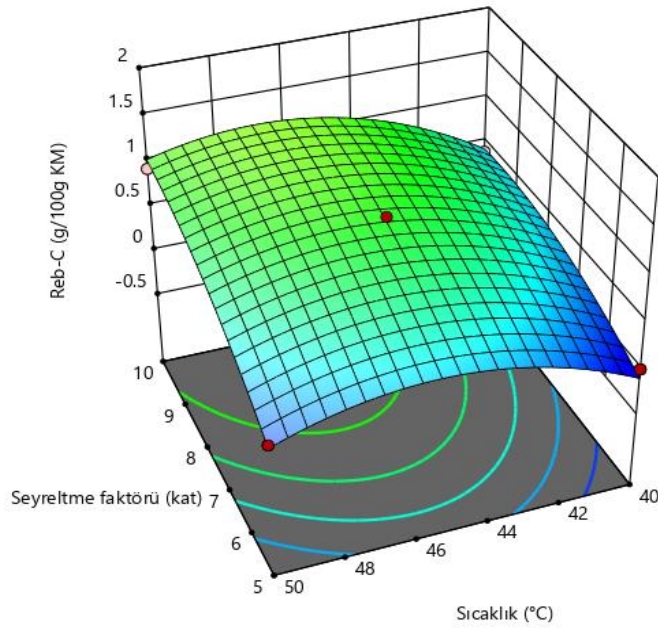
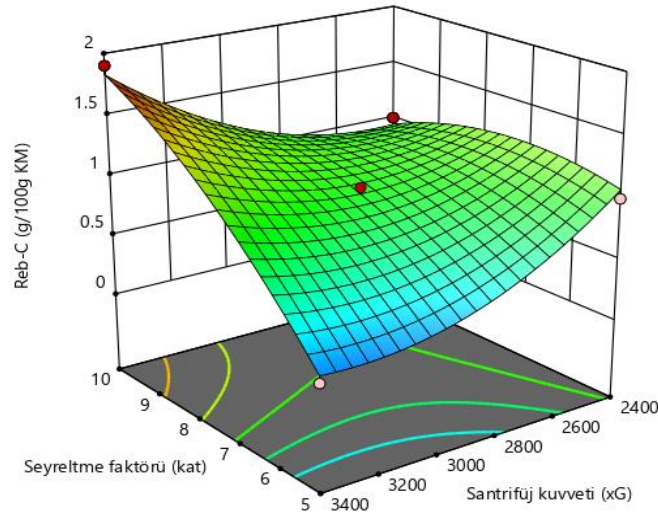
Şekil 4.30. Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre gerçekleştirilen etanolik ekstraksiyon sonucu deneysel olarak elde edilen ve tahmin edilen Rebaudiosit C saflık oranı değerleri



Şekil 4.31. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Rebaudiosit A Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.32. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Steviosit Yüzey-Yanıt grafikleri



Şekil 4.33. Etanolik ekstraktlardan elde edilen Rebaudiosit C Yüzey-Yanıt grafikleri

4.2.3.6. Box-Behnken tarafından belirlenen kurutulmuş stevia yapraklarından elde edilen etanolik ekstraktların optimum koşulları

Çalışmada kurutulmuş stevia yapraklarından etanol ekstraksiyonu ile elde edilen majör steviol glikozitlerin maksimum verimleri için ekstraksiyon koşullarını belirlemek amacıyla Box-Behnken Tasarımı (BBT) ile üretilen 15 koşuldan yararlanılmıştır. Arzu edirlilik modelinin belirlenmesi için her bir bağımsız değişkenin optimum sonucu kullanılmıştır. Sıfır (0) ile 1 arasındaki arzu edilebilirlik tek bir yanıt içinde birden çok tek yanıtın bir bileşimidir ve optimum ekstraksiyon koşulunun tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. İncelenen üç ekstraksiyon faktörü için optimum değeri bulmak amacıyla reb-A, steviosit, reb-C, toplam fenolik bileşikler ve antioksidan aktivite için regresyon modelleri kullanılmıştır. Elde edilen model arzu edirlilik fonksiyonu uygulandığında yukarıda bahsedilen ekstraksiyon parametreleri arasındaki etkileşimleri gösterilmektedir ve Çizelge 4.26'da verilmiştir. Optimum koşullar seyreltme faktörü 10 kat, santrifüj kuvveti 3400xG ve ekstraksiyon sıcaklığı 40°C olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.26. Etanolik ekstraktların Yüzey-Yanıt Metodu deneme desenine göre belirlenen optimum koşulları.

Seyreltme faktörü (kat)	G kuvveti (xG)	Sıcaklık (°C)	Reb-A (g/100 g KM)	ST (g/100 g KM)	Reb-C (g/100 g KM)	TFM (GEA, g/100 g KM)	AA (TE, g/100 g KM)	Arzu edirlilik
10,000	3002,361	40,000	22,500	21,100	0,516	0,670	0,122	0,838

5. SONUÇLAR

Bu doktora tez çalışması, değişen proses koşullarının majör steviol glikozitlerin ekstraksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) yaprakları kullanılarak yürütülmüştür. Materyal olarak kullanılan stevia bitkisi "Levent 93" çeşidi Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde yürütülmüş çalışmalarda ıslah edilmiştir. Denemeler için materyale ait yaş ve kurutulmuş yapraklar kullanılmıştır. Yaş ve kuru yapraklar bir solvent (su veya etanol) ile karıştırılıp Box-Behnken Tasarım programı tarafından önceden tanımlanan değişen ekstraksiyon koşullarına tabi tutulmuştur. Seyreltme faktörü, ekstraksiyon sıcaklığı ve santrifüj kuvveti olmak üzere üç ekstraksiyon parametresi ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Santrifüjleme için 2400, 2900 ve 3400xG seviyelerinde santrifüj kuvveti kullanılmıştır. Ekstraksiyon sıcaklıkları 40°, 45° ve 50°C ve seyreltme faktörleri 5, 7,5 ve 10 kat olarak uygulanmıştır. Tüm denemelerde ekstraksiyon koşulları Yüzey-Yanıt Metodu (YYM) kullanılarak optimize edilmiştir. Toplam kuru madde içeriği (%), Suda Çözünür Madde (°Brix), Titre edilebilir asitlik (meq/100 g) ve pH değeri tanımlayıcı analizler olarak gerçekleştirilmiştir. Yanıtlar için elde edilen veriler YYM'ye göre ikinci dereceden polinom içine yerleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara varyans analizi (ANOVA) uygulanarak geliştirilen modellerin uyumu kontrol edilmiştir. En uygun koşulları bulmak amacıyla Design Expert yazılımını kullanan sayısal bir optimizasyon tekniği uygulanmıştır. Farklı yöntemler arasında karşılaştırma yapılarak aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır:

- Yaş stevia yapraklarının ekstraksiyonu,
 - Tanımlayıcı analizler sonunda; TKM, su miktarı arttıkça azalan seyreltme faktöründen önemli ölçüde etkilenmiştir. Ayrıca, solvent miktarının artmasıyla beraber TA miktarı da artmıştır. Buna rağmen, 5,24 ile 5,88 arasında değişen pH değeri ekstraksiyon parametrelerinin hiçbirisi tarafından etkilenmemiştir.
 - TFM miktarı ekstraktların seyreltilmesi ile orantılı olarak 2,37 ila 3,57g GAE/100 g KM arasında değişmiştir. Sıcaklık ve G-kuvveti arttıkça TFM miktarı da artmıştır. En yüksek TFM içeriğine (3,57g GAE/100 g KM) seyreltme faktörü 10 kat, ekstraksiyon sıcaklığı 50°C ve santrifüj kuvveti 2900xG olduğunda ulaşılmıştır.
 - Antioksidan aktivite yüksek fenolik bileşenlerin varlığında yükselmiştir. En yüksek AA değeri 2900xG santrifüj kuvvetinde, 10 kat seyreltilmiş ekstraktlarda ve 50°C ekstraksiyon sıcaklığında 0,0235 ila 0,12003g TE/100 g KM arasında değişmek üzere elde edilmiştir.
 - Materyal olarak kullanılan Levent 93 çeşidinin yaş yapraklarında reb-A (301,31 mg/100g KM), ST (187,19 mg/100 g KM) ve reb-C (19,55 mg/100 g KM) konsantrasyonlarında tespit edilmiştir.
 - En yüksek reb-A miktarı (22,75g/100g KM) 7,5 kat seyreltme, 2900xG santrifüj kuvveti ve 45°C ekstraksiyon sıcaklığı koşullarında bulunmuştur.
 - En yüksek reb-C miktarına (3,02g/100g KM) 5 kat seyreltme, 2400xG santrifüj kuvveti ve 50°C ekstraksiyon sıcaklığı koşullarında ulaşılmıştır,
 - En yüksek steviosit miktarı (13,57g/100g KM) ise 5 kat seyreltme, 2900xG santrifüj kuvveti ve 40°C ekstraksiyon sıcaklığında saptanmıştır.

- Maksimum majör steviol glikozit ekstraksiyonu için YYM tarafından sağlanan optimum koşullar şu şekilde belirlenmiştir: Seyreltme faktörü 7,68, santrifüj kuvveti 2915xG ve ekstraksiyon sıcaklığı 44,77 °C.
- ,Toplam fenolik madde 3,77-5,67 g GAE/100 g KM arasında değişmiş ve ekstraktlara su hacmi arttıkça azalmıştır. En yüksek TFM miktarına (5,67 g GAE/100 g KM) 7,5 kat seyreltme faktörü, 40°C sıcaklık ve 2400xG santrifüj kuvvetinde ulaşılmıştır. ekstraksiyon sıcaklığı ve uygulanan G-kuvveti arttıkça TFM miktarı da artmıştır.
- Antioksidan aktivite 0,002 ila 0,134g TE/100 g KM arasında değişmiş ve ekstraktlara su hacminin artmasıyla artmıştır. ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça tüm ekstraktlarda antioksidan aktivite önemli ölçüde azalmıştır. Seyreltme faktörü 10 kat, santrifüj kuvveti 2400xG ve ekstraksiyon sıcaklığı 45°C olduğunda en yüksek seviyeye ulaşılmıştır.
- Majör steviol glikozitlerin ekstraksiyon verimi reb-A, ST ve reb-C için sırasıyla 16,03-20,01, 10,09-10,67 ve 0,26-2,93 g/100 g KM arasında değişmiştir.
- En yüksek miktarda reb-A (19,94 g/100 g KM), 10 kat seyreltme, 2900xG santrifüj kuvveti ve 40°C ekstraksiyon sıcaklığının uygulandığı koşullarında bulunmuştur.
- En yüksek steviosit miktarına (10,67g/100 g KM) 10 kat seyreltme faktörü, 3400xG santrifüj kuvveti ve 45°C uygulama sıcaklığında ulaşılmıştır.
- En yüksek reb-C miktarı da (3,02g/100g KM) 10 kat seyreltme faktörü, 2400xG santrifüj kuvveti ve 45°C sıcaklıkta belirlenmiştir.
- Maksimum majör steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için YYM tarafından sağlanan optimum koşullar seyreltme faktörü 8,44, santrifüj kuvveti 3400xG ve ekstraksiyon sıcaklığı 40°C'dir. Bu koşullarda reb-A, ST ve reb-C sırasıyla 19,74, 10,679 ve 1,636 g/100 g KM olarak öngörülmüştür.

- Kuru stevia yaprağının etanol ile ekstraksiyonuna ait sonuçlar

- Etanol hacmi arttığında TA miktarı artmaktadır. Maksimum TA miktarı (92,67 mEq/100 g) 50°C'de elde edilmiştir. Bununla birlikte, ekstraksiyon parametreleri pH değerini etkilememiştir. Ayrıca, düşük santrifüj kuvveti (2400xG) altında 10 kat seyreltilmiş ekstrakt ve 45°C ekstraksiyon sıcaklığında yüksek miktarda TKM (3,87g) elde edilmiştir.
- Toplam fenolik madde 0,46-1,10 g GAE/100 g KM aralığında saptanmıştır. Etanol hacminin artması TFM miktarında azalmaya neden olmuştur. En yüksek TFM ekstraksiyon verimi 5 kat seyreltme faktöründe, 45°C ekstraksiyon sıcaklığında ve 3400xG santrifüj kuvvetinde bulunmuştur.
- Antioksidan kapasitesi 0,48-0,17g TE/100 g KM arasında değişmiştir ve en yüksek değer 10 kat seyreltme faktörü, 45°C sıcaklık ve 2900xG santrifüj kuvveti koşullarında elde edilmiştir.
- En yüksek Rebaudiosit A miktarı (28,39g/100 g KM) 5 kat seyreltme, 2900xG santrifüj kuvveti ve 50°C ekstraksiyon sıcaklığının uygulandığı koşullarında bulunmuştur.
- En yüksek steviosit miktarı (21,10 g/100 g KM) 10 kat seyreltme, 3400xG santrifüj kuvveti ve 45°C sıcaklıkta elde edilmiştir.

- En yüksek reb-C miktarı (1,08g/100 g KM) 7,5 kat, 3400xG santrifüj kuvveti ve 50°C sıcaklıkta bulunmuştur.
- Maksimum majör steviol glikozitlerin ekstraksiyonu için YYM tarafından sağlanan optimum koşullar seyreltme faktörünün 10 kat, santrifüj kuvvetinin 3002,36xG ve ekstraksiyon sıcaklığının 40°C olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda reb-A, ST ve reb-C için sırasıyla 22,50, 21,10 ve 0,516 g/100 g KM düzeyinde verim tahmin edilmiştir.

Stevia yapraklarından steviol glikozitlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak etanol ekstraksiyonu yapılmaktadır. Etanol suya göre daha güçlü bir çözücü olmakla birlikte maliyeti yüksektir. Geleneksel katı-sıvı ekstraksiyonunda etanol suya göre avantaj sağlamaktadır. Ancak bu tez çalışmasının sonuçları incelendiğinde santrifüj kuvvetinin etkili olduğu ekstraksiyonda suyun etanole karşı dezavantajı ortadan kalkmaktadır. Burada çözücü gücü ve konsantrasyona bağlı olarak değişen etkiye sahip difüzyon kuvvetinin yerini santrifüj kuvveti almıştır. Ayrıca dekantör ekstraksiyonu yönteminde çözücü olarak su kullanılması durumunda stevia yapraklarının kuru olmasına da gerek yoktur. Bunun dışında kurutulmamış ve kuru stevia yapraklarından yüksek santrifüj kuvveti uygulanarak reb-A ve ST ekstraksiyonu için suyun en uygun solvent olduğu tespit edilmiştir. Çözücü olarak su kullanıldığında TFM (5,67g GAE/100 g KM) ve antioksidan aktivite (0,134 g TE/100 g KM) açısından daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların daha ekonomik ve çevreci yaklaşımı yanında yüksek verim sağlaması nedeniyle endüstriyel uygulamaya aktarılabilir nitelikte olduğu düşünülmüştür. Araştırma konusu ile ilgili gelecekteki çalışmalar için bazı öneriler de sunulmuştur.

- Su-etanol karışımı gibi diğer solventler de bu amaçla denenebilir.
- Öğütme düzeyi ve sürekli karıştırma gibi farklı parametreler üzerinde çalışmalara devam edilebilir.
- Saflaştırma çalışmaları üzerine ekstraksiyon koşullarının etkisini içeren bir çalışma yapılabilir.
- Farklı zaman aralıkları, daha düşük sıcaklık ve yaprak: solvent oranı denenebilir.
- Dekantör ekstraksiyonu uygulandığında farklı G-kuvvetleri, sıcaklık ve solvent oranlarında posada ve sulu kısımda detaylı içerik analizleri yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas Momtazi-Borojeni, A., Esmaeili, S.-A., Abdollahi, E., and Sahebkar, A. 2017. A review on the pharmacology and toxicology of steviol glycosides extracted from *Stevia rebaudiana*. *Current Pharmaceutical Design*, 23(11), 1616–1622.
- Ali, M., and Wu, J. 2021. Emulsifying properties of plasma fractionated from egg yolk using low centrifugal forces—Mayonnaise preparation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6), e15553.
- Altieri, G., Di Renzo, G. C., and Genovese, F., 2013. Horizontal centrifuge with screw conveyor (decanter): optimization of oil/water levels and differential speed during olive oil extraction. *Journal of Food Engineering*, 119(3), 561-572. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.06.033>.
- Ameer, K., Bae, S.-W., Jo, Y., Lee, H.-G., Ameer, A., and Kwon, J.-H. 2017. Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling. *Food Chemistry*, 229 198-207.
- Angoy, A., Ginies, C., Goupy, P., Bornard, I., Ginisty, P., Sommier, A., Valat, M., and Chemat, F. 2020. Development of a green innovative semi-industrial scale pilot combined microwave heating and centrifugal force to extract essential oils and phenolic compounds from orange peels. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 61, 102338. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102338>
- Angoy, A., Valat, M., Ginisty, P., Sommier, A., Goupy, P., Caris-Veyrat, C., and Chemat, F. 2018. Development of microwave-assisted dynamic extraction by combination with centrifugal force for polyphenols extraction from lettuce. *LWT*, 98, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.059>
- Anonymous 1994. <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/default.html> [Son erişim tarihi 25.04.2020].
- Anonymous 1999. <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/default.html> [Son erişim tarihi: 07.10.2020]
- Anonymous 2004. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v60je01.pdf> [Son erişim tarihi: 09.06.2019]
- Anonymous 2007. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v60je01.pdf> [Son erişim tarihi: 03.06.2019]
- Anonymous 2008. <https://www.fdalawblog.net/wp-content/uploads/archives/docs/grn253responseletter.pdf> [Son erişim tarihi: 05.07.2019]
- Anonymous 2009. <http://www.fda.gov/food/dietarysupplements/default.html> [Son erişim tarihi: 03.06.2019]
- Anonymous 2016. <https://www.statista.com/statistics/367976/global-stevia-awareness-by-country> [Son erişim tarihi: 29.08.2019]

- Anonymous 2017. Industry Experts. <http://industry-experts.com> [Son erişim tarihi 27.05.2020].
- Anonymous 2019a. <http://test.lamaisondustevia.com/origine-stevia-rebaudiana-bertoni-a-1.html> [Son erişim tarihi: 10.07.2019]
- Anonymous 2019b. 13. <https://www.datamintelligence.com/research-report/stevia-market> [Son erişim tarihi: 24.09.2019]
- Anonymous 2019c. Stevia Market: Industry Analysis. Size. Share. Trends and Forecast to 2029. futuremarketinsights.com [Son erişim tarihi: 21.08.2019]
- Anonymous 2020a. Wikimedia Commons Stevia *rebaudiana*, classification APG III: http://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Stevia_rebaudiana?uselang=fr [Son erişim tarihi 20.01.2020].
- Anonymous 2020b. <https://www.planetoscope.com/agriculture-alimentation/1573-production-mondiale-de-stevia.html> [Son erişim tarihi: 28.07.2018]
- Arslan Kulcan, A., and Karhan, M. 2020. Effect of process parameters on stevioside and rebaudioside A content of stevia extract obtained by decanter centrifuge. *Journal of Food Processing and Preservation*. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15168>
- Bachir bey, M., Meziant, L., Benchikh, Y., and Louaileche, H. 2014. Deployment of response surface methodology to optimize recovery of dark fresh fig (*Ficus carica* L., var. Azenjar) total phenolic compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 162, 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.054>
- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., and Mussatto, S. I. 2014. Selection of the Solvent and Extraction Conditions for Maximum Recovery of Antioxidant Phenolic Compounds from Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(5), 1322–1332. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1115-7>.
- Barba, A. A., Amore M. d., Rispol, M., Marra, F., and Lamberti, G. 2014. Microwave assisted drying of banana: Effects on reducing sugars and polyphenols contents andnbsp; Czech Journal of Food Sciences, 32(No. 4), 369–375.
- Beveridge, T., and Harrison, J., 1995. Juice extraction with the decanter centrifuge: sweet and sour cherries, peaches and apricots. *Food Research International*, 28(2), 173–177. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(95\)90802-H](https://doi.org/10.1016/0963-9969(95)90802-H).
- Box, G.E.P., and Behnken, D.W. 1960. Simplex-Sum Designs: A Class of Second Order Rotatable Designs Derivable From Those of First Order. *Ann. Math. Statist.*, 31 (4): 838-864.
- Brahmachari G., Mandal L.C., Roy R., Mondal S., and Brahmachari A.K. 2011. Stevioside and related compounds – molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. *Arch Pharm*. 344 : 5-19.
- Brandle J.E., and Telmer P.G. 2007, Steviol glycoside biosynthesis *Phytochemistry*, 68: 1855-1863.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N., and Gijzen, M. 1998. Stevia *rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties, *Can. J. Plant Sci.*, 78, 527.

- Brandle, J. E., Starratt, A. N., and Gijzen, M. 2011. Stevia *rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. Canadian Journal of Plant Science. <https://doi.org/10.4141/P97-114>
- Bursać Kovačević, D., Maras, M., Barba, F.J., Granato, D., Roohinejad, S., Mallikarjunan, K., Montesano, D., Lorenzo, J.M., and Putnik, P. 2018. Innovative technologies for the recovery of phytochemicals from Stevia *rebaudiana* Bertoni leaves: A review. Food Chemistry, 268 513-521.
- Cacace, J. E., and Mazza, G. 2003. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. Journal of Food Engineering, 59(4), 379–389. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00497-1)
- Cemeroglu, B. 2007. Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler. Gıda Analizleri (Food Analysis), ed. By B. Cemeroglu. GTD Yayınları, (34): 45-128
- Chubert, T., Meric, A., Boom, R., Hinrichs, J., and Atamer, Z. 2018. Application of a decanter centrifuge for casein fractionation on pilot scale: Effect of operational parameters on total solid, purity and yield in solid discharge. International Dairy Journal, 84, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.002>
- Ciulu, M., Quirantes-Piné, R., Spano, N., Sanna, G., Borrás-Linares, I., and Segura-Carretero, A. 2017. Evaluation of new extraction approaches to obtain phenolic compound-rich extracts from Stevia *rebaudiana* Bertoni leaves, Industrial Crops and Products, 108, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.024>
- Covarrubias-Cárdenas, A. G., Martínez-Castillo, J. I., Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., García-Cruz, N. U., and Pacheco, N. (2018). Antioxidant capacity and UPLC-PDA ESI-MS phenolic profile of Stevia *rebaudiana* dry powder extracts obtained by ultrasound assisted extraction, Agronomy, 8(9), 170.
- Dacome, A. S., da Silva, C. C., da Costa, C. E. M., Fontana, J. D., Adelman, J., and da Costa, S. C. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of Stevia *rebaudiana* (Bert.) Bertoni: Isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic, and electrophoretic methods. Process Biochemistry, 40(11), 3587–3594. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.03.035>
- Dejian Huang, A. Boxin Ou, and, and Prior, R. L. 2005. February 25, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays (world) [Review-article]. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Dünya Stevia Örgütü 2019 (world stevia organisation) <https://www.wso-site.com/9th-wso-world-congress-on-stevia>.
- Dyrskog, S. E. U., Jeppesen, P. B., Chen, J., Christensen, L. P., and Hermansen, K. 2005. The Diterpene Glycoside. Rebaudioside A. Does not Improve Glycemic Control or Affect Blood Pressure After Eight Weeks Treatment in the Goto-Kakizaki Rat. The Review of Diabetic Studies, 2(2), 84-91. <https://doi.org/10.1900/RDS.2005.2.84>
- Esmat Abou-Arab, A., Azza, A., and Ferial, M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from Stevia *rebaudiana* bertoni plants.

- Formigoni, M., Milani, P. G., da Silva Avíncola, A., dos Santos, V. J., Benossi, L., Dacome, A. S., Pilau, E. J., and da Costa, S. C. 2018a. Pretreatment with ethanol as an alternative to improve steviol glycosides extraction and purification from a new variety of stevia. *Food Chemistry*, 241, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.022>
- Formigoni, M., Milani, P. G., Dacome, A. S., and Costa, S. C. 2018b, Effect of enzymatic pretreatment on the extraction yield of *Stevia rebaudiana* leaves, *International Food Research Journal*, 25(4).
- Gasmalla, M., Yang, R., Amadou, I., and Hua, X. 2014. Nutritional Composition of *Stevia rebaudiana* Bertoni Leaf: Effect of Drying Method. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 61. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.9>.
- Gasmalla, M.A.A., Yang, R., Musa, A., Hua, X., and Zhang, W., 2014. Physico-chemical assesment and Rebaudioside A. productively of natural sweeteners (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Journal of Food and Nutrition Research*, 2(5):209-214 pp.
- Geuns, J.M.C. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*, 64 (5): 913-921.
- Gong, Y., Hou, Z., Gao, Y., Xue, Y., Liu, X., and Liu, G. 2012. Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 90(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.12.004>
- Görgüç, A., Gençdağ, E., and Yılmaz, F. M. 2019. Optimization of microwave assisted enzymatic extraction of steviol glycosides and phenolic compounds from *Stevia* leaf. *Acta Periodica Technologica*, 50, 69–76.
- Griffiths, M. 1994. The new Royal Horticultural Society dictionary: Index of garden plants. The New Royal Horticultural Society Dictionary: Index of Garden Plants. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000311671>
- Hacıoğlu, A., Assoumou, U. T. Z., Yıldız, M., Kulcan, A. A., Yavuz, İ., and Karhan, M. 2020. Optimization of Enrichment of D-Pinitol in Carob Extract Using Nanofiltration Application Using the Response Surface Methodology. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(9), 1846–1853. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v8i9.1846-1853.3429>
- Haller, N., Kulozik, U., 2019. Separation of whey protein aggregates by means of continuous centrifugation. *Food and Bioprocess Technology*, 12(6), 1052-1067. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02275-1>.
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F. Z., Rebey, I. B., Bourgou, S., Limam, F., and Marzouk, B. 2013. Total Phenolics, Flavonoids, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Plants as Affected by Different Drying Methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 806–817. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0877-7>
- Howard, B. V., and Wylie-Rosett, J. 2002. Sugar and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Committee on Nutrition of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism of the American Heart

- Association, Circulation, 106(4), 523–527.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000019552.77778.04>
- Hurt, R. T., Kulisek, C., Buchanan, L. A., and McClave, S. A. 2010. The obesity epidemic: Challenges, health initiatives, and implications for gastroenterologists. *Gastroenterology and Hepatology*, 6(12), 780.
- Jayaraman, S., Manoharan, M. S., and Illanchezian, S. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(4), 1143–1149.
- Jentzer, J.-B., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L., and Vilarem, G. 2015. Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 166, 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.078>.
- Jiang, J., and Xu, G. 2015. Application of decanter centrifuges on sludge dewatering in urban lakes. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 9, 453–458.
- Kato, N., Lum, T., Légeret, B., Li-Beisson, Y., and Ndathe, R. 2019. Centrifugation-induced production of triacylglycerols in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresource Technology Reports*, 5, 326–330. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.10.003>
- Kaur, G., Pandhair, V., and Cheema, G. S. 2014. Extraction and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Med. Plants. Stud.* 2(5), 41–45.
- Kennelly, E. J. 2001. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana*. *Stevia, the Genus Stevia (Medical and Aromatic Plants-Industrial Profiles)*, 19, 68–85.
- Kim, I.-S., Yang, M., Lee, O.-H., and Kang, S.-N. 2011. The antioxidant activity and the bioactive compound content of *Stevia rebaudiana* water extracts. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1328–1332.
- Kim, S.-H., and Dubois, G. E. 1991. Natural high potency sweeteners. In S. Marie and J. R. Piggott (Eds.). *Handbook of Sweeteners* (pp. 116–185). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5380-6_6
- Koubaa, M., Roselló-Soto, E., Šic Žlabur, J., Režek Jambrak, A., Brnčić, M., Grimi, N., Boussetta, N., and Barba, F. J. 2015. Current and New Insights in the Sustainable and Green Recovery of Nutritionally Valuable Compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6835–6846. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01994>
- Kroyer, G.T. 1999. The Low-Calorie Sweetener Stevioside: Stability and Interaction with Food Ingredients. *LWT- Food Science and Technology*, 32 (8): 509–512.
- Kulthe, A.A., Pawar, V.D., Kotecha, P.M., Chavan, U.D. and Bansode, V.V. 2014. Development of high protein and low-calorie cookies. *Journal of food science and technology*, 51 (1): 153–157.
- Lazic, Z. R. 2006. *Design of experiments in chemical engineering: A practical guide*. John Wiley and Sons.

- Leatherhead Food Research, 2011. The global food additives market, 5th ed. Leatherhead (UK): Leatherhead Food Research.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Rojas, P., Stucken, K., Delporte, C., Valenzuela-Barra, G., Jagus, R. J., Agüero, M. V., and Pasten, A. 2018. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory potential of *Stevia rebaudiana* leaves: Effect of different drying methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 11, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.10.003>
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., and Ah-Hen, K. 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121–1132.
- Li, J., Chen, Z., and Di, D. 2012. Preparative separation and purification of Rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* Bertoni crude extracts by mixed bed of macroporous adsorption resins. *Food Chemistry*, 132 (1): 268-276.
- Liu, J., Li, J.-W. and Tang, J. 2010. Ultrasonically assisted extraction of total Carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and Bioproducts Processing*, 215-221 s.
- López-Carbón, V., Sayago, A., González-Domínguez, R., and Fernández-Recamales, Á. 2019. Simple and Efficient Green Extraction of Steviol Glycosides from *Stevia rebaudiana* Leaves. *Foods*. 8(9), 402. <https://doi.org/10.3390/foods8090402>
- Lou, Z., Wang, H., Zhang, M., and Wang, Z., 2010. Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. *Journal of Food Engineering*. 98(1), 13-18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.015>.
- Mahl, C. R., de Oliveira, S. P., da Silva, B. B., da Igreja, G., Simões, M. R., and da Silva, C. F. 2010. Effect of pH on the clarification of *Stevia rebaudiana* Bertoni extract using alginate beads. *Adsorption Science and Technology*, 28(2), 189–194.
- Manish Tadhani, and Rema Subhash. 2006. Preliminary studies on *Stevia rebaudiana* leaves: Proximal Composition. Mineral analysis and Phytochemical screening J. Med. Sci., 6 (3): 321-326. Mai-Juin.
- Martínez-Alvarado, J.C., Torrestiana-Sánchez, B., and Aguilar-Uscanga, M.G. 2017. Isolation of steviol glycosides by a two-step membrane process operating under sustainable flux. *Food and Bioproducts Processing*, 101 223-230
- Martínez-Las Heras, R., Heredia, A., Castelló, M. L., and Andrés, A. 2014. Influence of drying method and extraction variables on the antioxidant properties of persimmon leaves. *Food Bioscience*, 6, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.01.002>
- Mathur, S., Bulchandani, N., Parihar, S., and Shekhawat, G. S. 2017. Critical Review on Steviol Glycosides: Pharmacological. Toxicological and Therapeutic Aspects of High Potency Zero Caloric Sweetener. *International Journal of Pharmacology*, 13, 916–928. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.916.928>

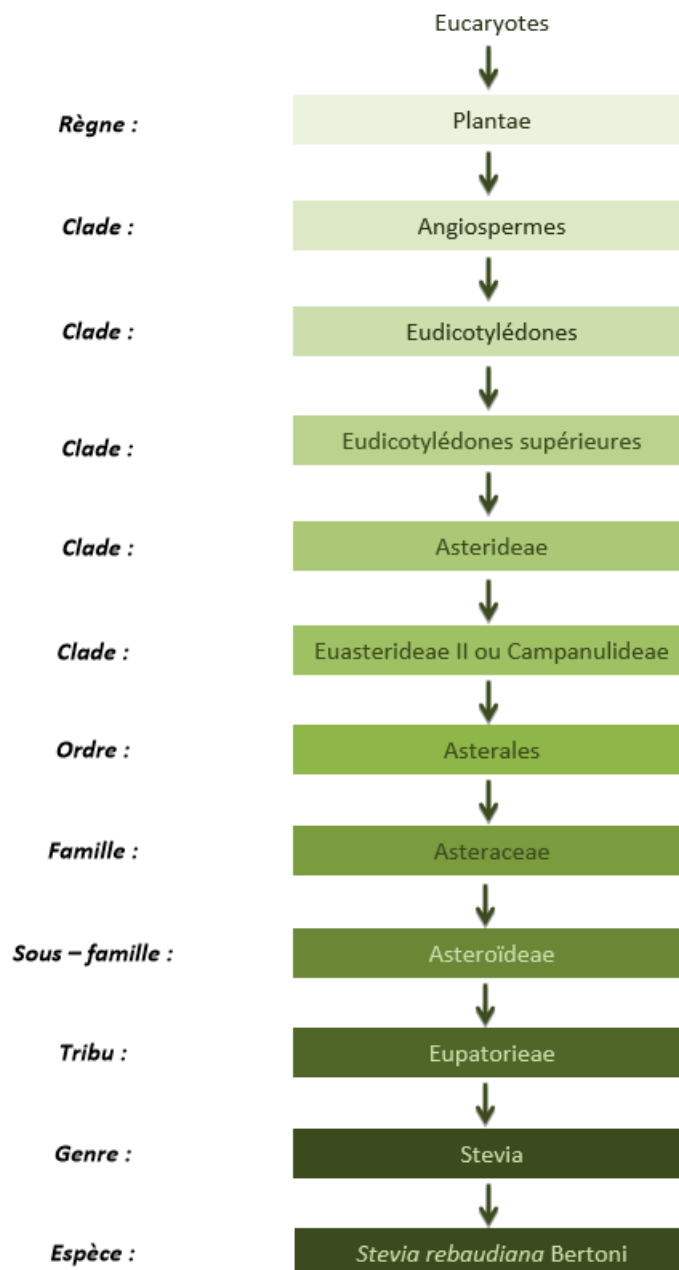
- Menon, A. S., Hii, C. L., Law, C. L., Shariff, S., and Djaeni, M. 2017. Effects of drying on the production of polyphenol-rich cocoa beans. *Drying Technology*, 35(15), 1799–1806. <https://doi.org/10.1080/07373937.2016.1276072>
- Mokrani, A., and Madani, K. 2016. Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit, *Separation and Purification Technology*, 162, 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.01.043>
- Molina-Miras, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., and Molina-Grima, E. 2018. CFD-aided optimization of a laboratory-scale centrifugation for a shear-sensitive insect cell line. *Food and Bioprocess Technology*, 107, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.11.005>
- Moraes, M., L. Zabet, G., M. Prado, J., Angela A. and Meireles, M. 2013. Obtaining Antioxidants from Botanic Matrices Applying Novel Extraction Techniques. *Food and Public Health*, 3(4), 195–214. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20130304.04>
- Panja, P., and Mukhopadhyay, M., 2019. Extraction of natural sweetener from stevia leaves using pressurized hot water. *Journal of Nutraceuticals and Food Science*, 4(1: 3), 1-9.
- Periche, A., Castelló, M. L., Heredia, A., and Escriche, I. 2015a. Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 172, 1–6.
- Periche, A., Castelló, M.L., Heredia, A., and Escriche, I. 2015b. Influence of Extraction Methods on the Yield of Steviol Glycosides and Antioxidants in *Stevia rebaudiana* Extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 70 (2): 119-127.
- Peters, K., Hjorth, M., Jensen, L. S., and Magid, J. 2011. Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Distribution in Particle Size-Fractionated Separated Pig and Cattle Slurry. *Journal of Environmental Quality*, 40(1), 224–232.
- Prakash, I., DuBois, G. E., Clos, J. F., Wilkens, K. L., and Fosdick, L. E. 2008. Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem, Toxicol.*, 46, S75.
- Prakash, Indra, Chaturvedula, V. S. P., and Markosyan, A. 2013. Isolation, Characterization and Sensory Evaluation of a Hexa β -D-Glucopyranosyl Diterpene from *Stevia rebaudiana*. *Natural Product Communications*, 8(11), 1934578X1300801106. <https://doi.org/10.1177/1934578X1300801106>
- Prakash, Indra, Markosyan, A., and Bunders, C. 2014. Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M. *Foods*, 3(1), 162-175. <https://doi.org/10.3390/foods3010162>
- Prasad, K. N., Hassan, F. A., Yang, B., Kong, K. W., Ramanan, R. N., Azlan, A., and Ismail, A. 2011. Response surface optimisation for the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities of underutilised *Mangifera pajang* Kosterm, Peels. *Food Chemistry*, 128(4), 1121–1127. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.105>

- Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J., and Tiwary, A. K. 2012. Optimisation of novel method for the extraction of steviosides from *Stevia rebaudiana* leaves. *Food Chemistry*, 132(3), 1113–1120.
- Rao, A. B., Prasad, E., Sridhar, G. R. S., and Ravikumar, Y. V. L. 2012. Simple extraction and membrane purification process in isolation of steviosides with improved organoleptic activity. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 03(04), 327–335. <https://doi.org/10.4236/abb.2012.34048>
- Ribeiro, L. O., Pereira, R. N. C., Tonon, R. V., Cabral, L. M. C., Santiago, M. C. P. A., Vicente, A. A., Teixeira, J. A. C., Matta, V. M., and Freitas, S. P. 2018. Antioxidant Compounds Recovery from Juçara Residue by Thermal Assisted Extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(1), 68–73. <https://doi.org/10.1007/s11130-017-0651-0>
- Richman A., Swanson A., Humphrey T., Chapman R., MC Garvey B., Pocs R., and Brandle J. 2005. Functional genomics uncovers three glucosyltransferases involved in the synthesis of the major sweet glucosides of *Stevia rebaudiana*. *Plant J*, 41: 56-67.
- Rippe, J. M., and Angelopoulos, T. J. 2016. Relationship between Added Sugars Consumption and Chronic Disease Risk Factors: Current Understanding. *Nutrients*, 8(11), 697.
- Rodríguez-Pérez, C., Gilbert-López, B., Mendiola, J. A., Quirantes-Piné, R., Segura-Carretero, A., and Ibáñez, E. 2016. Optimization of microwave-assisted extraction and pressurized liquid extraction of phenolic compounds from *Moringa oleifera* leaves by multiresponse surface methodology. *Electrophoresis*, 37(13), 1938–1946.
- Rouhani, M. 2019. Modeling and optimization of ultrasound-assisted green extraction and rapid HPTLC analysis of stevioside from *Stevia rebaudiana*. *Industrial Crops and Products*, 132, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.02.029>
- Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. M., and Wall, D. S. 2006. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chemistry*, 99(3), 478–483. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.08.009>
- Santos, D. T., Veggi, P. C., and Meireles, M. A. A. 2012. Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 444–452. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.08.022>
- Schubert, T., Meric, A., Boom, R., Hinrichs, J., and Atamer, Z. 2018. Application of a decanter centrifuge for casein fractionation on pilot scale: Effect of operational parameters on total solid, purity and yield in solid discharge. *International Dairy Journal*, 84, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.04.002>
- Shibata H., Sonoke S., Ochiai H., Nishihashi H., and Yamada M. 1991. Glucosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol*, 95 : 152-156.

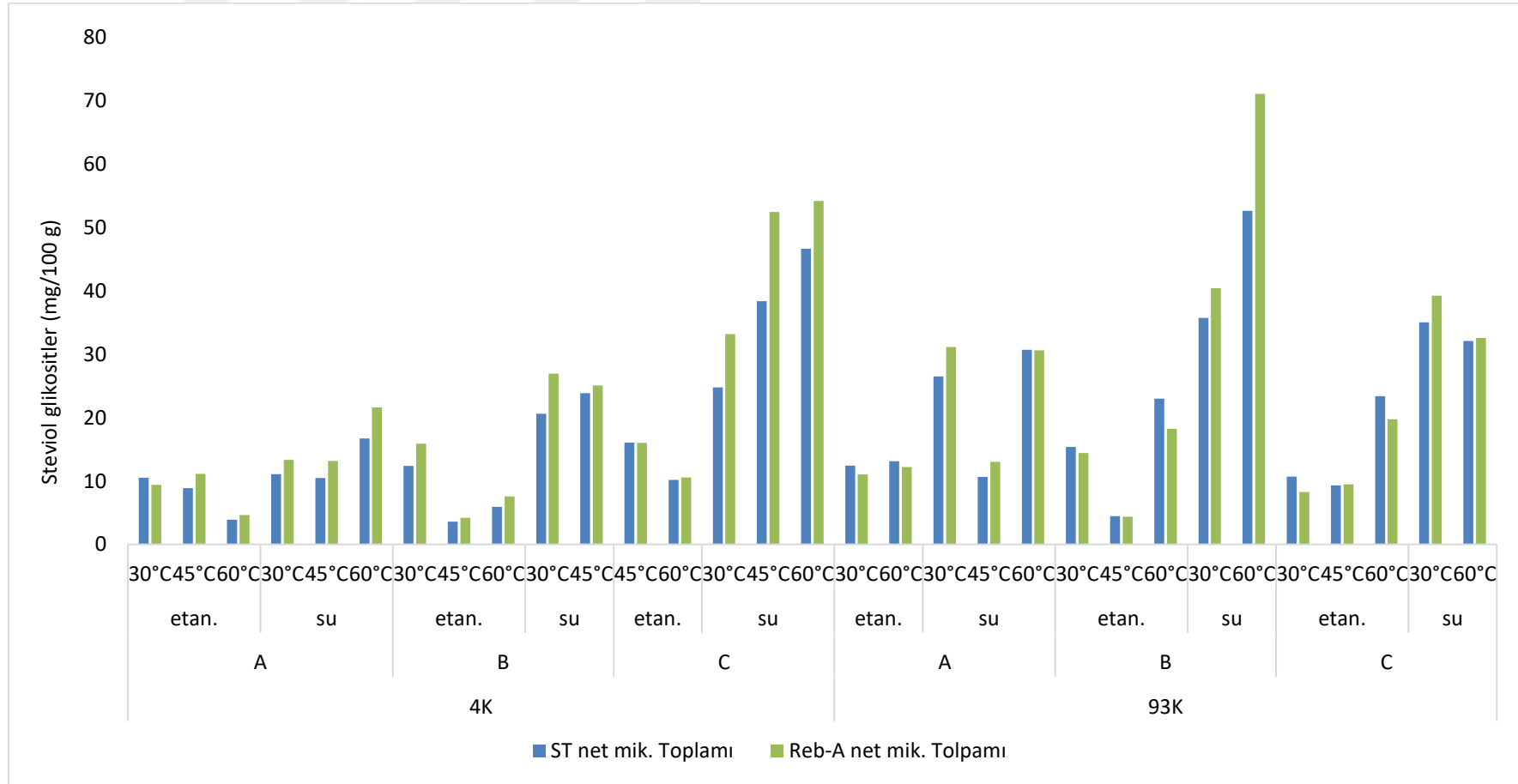
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Ježek, D., Bosiljkov, T., and Brncic, M. 2013. *Stevia rebaudiana Bertoni* - A Review of Nutritional and Biochemical Properties of Natural Sweetener, 25-30 s.
- Simonsohn Barbara 2009. *La Stévia rébaudiana – Herbe douce au pouvoir sucrant sans glucose ni calories* Editions Médicis.
- Singh, S. D., and Rao, G. P. 2005. Stevia: The herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech.* 7(1), 17–24. <https://doi.org/10.1007/BF02942413>
- Singleton, V.L., Orthofer, R., and Lamuela-Raventós, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 152-178 s.
- Sood, A., and Gupta, M. 2015. Extraction process optimization for bioactive compounds in pomegranate peel. *Food Bioscience*, 12, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.09.004>
- Starratt A.N., Kirby C.W., Pocs R., and Brandle J.E. 2002. Rebaudioside F. a diterpene glycoside from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry*, 59: 367-370.
- Strixner, T., and Kulozik, U. 2013. Continuous centrifugal fractionation of egg yolk granules and plasma constituents influenced by process conditions and product characteristics. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.009>
- Thoo, Y. Y., Ho, S. K., Liang, J. Y., Ho, C. W., and Tan, C. P. 2010. Effects of binary solvent extraction system, extraction time and extraction temperature on phenolic antioxidants and antioxidant capacity from mengkudu (*Morinda citrifolia*). *Food Chemistry*, 120(1), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.064>
- Topuz, O. K., Gokoglu, N., Yerlikaya, P., Ucak, I., and Gumus, B. 2016. Optimization of Antioxidant Activity and Phenolic Compound Extraction Conditions from Red Seaweed (*Laurencia obtuse*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(3), 414–422. <https://doi.org/10.1080/10498850.2013.868844>
- Tunchaiyaphum, S., Eshtiaghi, M. N., and Yoswathana, N. 2013. Extraction of bioactive compounds from mango peels using green technology. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 4(4), 194.
- Typek, R., Dawidowicz, A. L., and Bernacik, K. 2020. Aqueous and alcoholic adducts of steviol and steviol glycosides in food products containing stevia. *Food Chemistry*, 317, 126359. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126359>
- Wal, P., Pal, R. S., and Wal, A. 2019. A review on the sugar alternates. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 2320-5148.
- Dünya Sağlık Örgütü, 2013. Global action plan for the prevention and control of non-communicable diseases: 2013-2020. http://apps.DSÖ.int/iris/bitstream/10665/94384/1/9789241506236_eng.pdf
- Dünya Sağlık Örgütü, 2014. Regional Office for Europe; Copenhagen: European food and nutrition action plan 2015–2020.

- Dünya Sağlık Örgütü, 2019. Reducing consumption of sugar-sweetened beverages to reduce the risk of childhood overweight and obesity, e-Library of Evidence for Nutrition Actions (eLENA).
- Wölwer-Rieck, U. 2012. The Leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Their Constituents and the Analyses Thereof: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(4), 886–895. <https://doi.org/10.1021/jf2044907>.
- XuJie, H., and Wei, C. 2008. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology, *Carbohydrate Polymers*, 72(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.034>
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., and Ahuja, P. S. 2011. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1–27.
- Yang, L., Cao, Y.-L., Jiang, J.-G., Lin, Q.-S., Chen, J., and Zhu, L. 2010. Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var, *Amara* Engl. *Journal of Separation Science*, 33(9), 1349–1355. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900776>
- Yen, N. T. H. 2019. Extraction of total stevioside content from dried *stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Forestry. Wood Industry. Agricultural Food Engineering, Series II*, 12(1), 137–144.
- Zaidan, U. H., Zen, N. I. M., Amran, N. A., Shamsi, S., and Abd Gani, S. S. 2019. Biochemical evaluation of phenolic compounds and steviol glycoside from *Stevia rebaudiana* extracts associated with in vitro antidiabetic potential, *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 18, 101049.
- Zhao, L., Yang, H., Xu, M., Wang, X., Wang, C., Lian, Y., Mehmood, A., and Dai, H. 2019. Stevia residue extract ameliorates oxidative stress in d-galactose-induced aging mice via Akt/Nrf2/HO-1 pathway. *Journal of Functional Foods*, 52, 587-595.

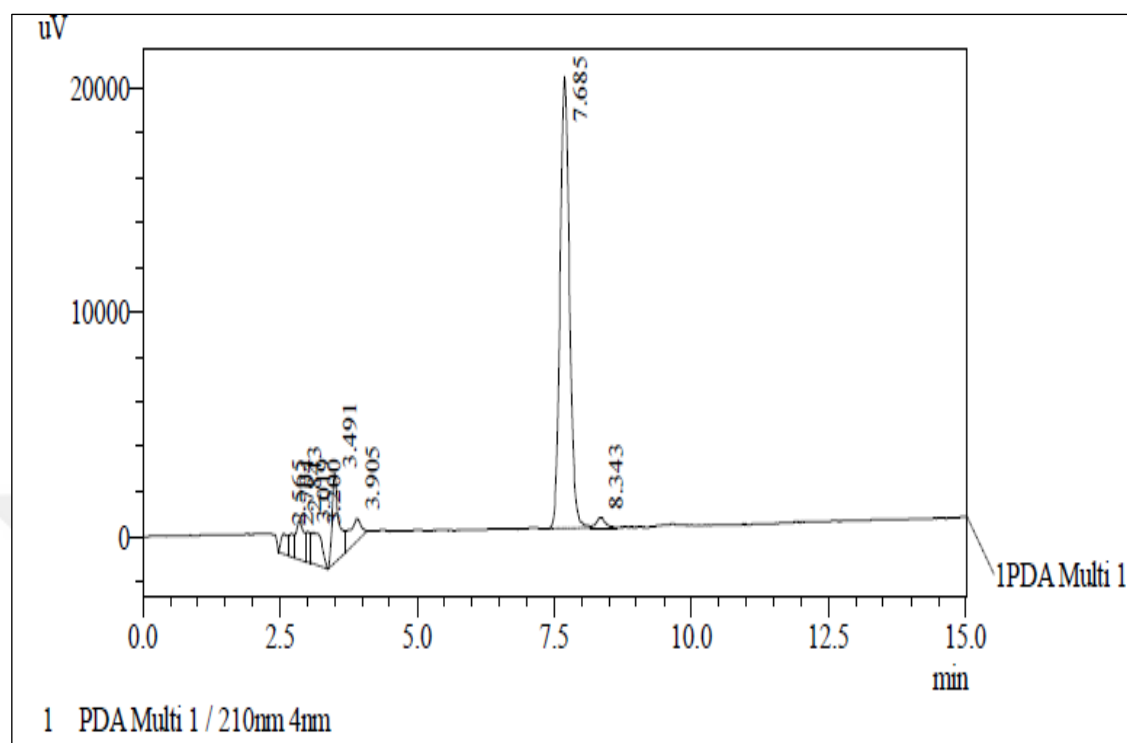
7. EKLER



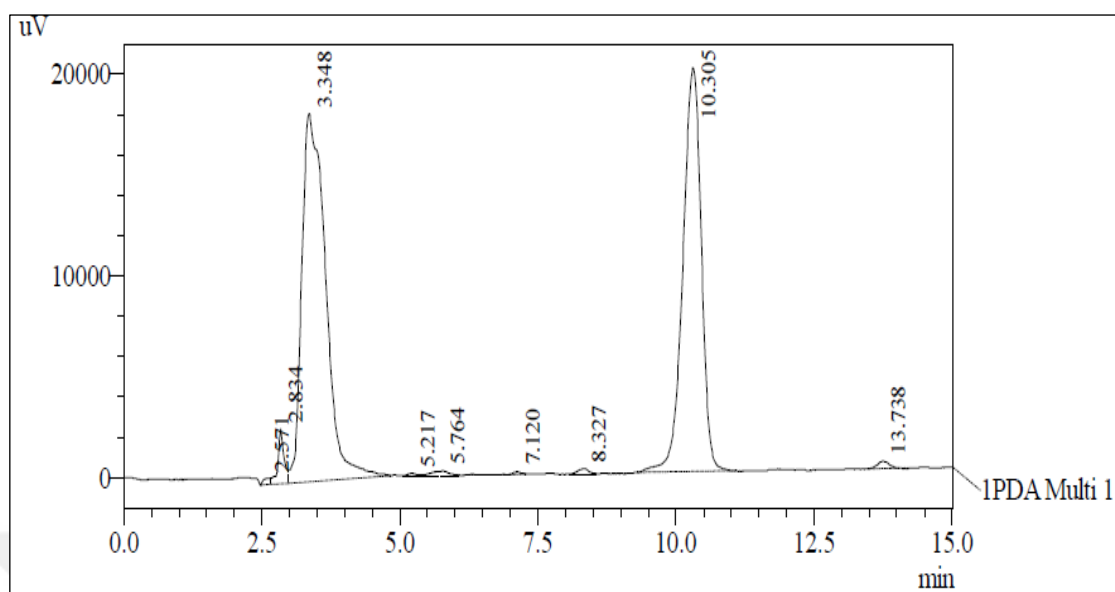
Ek 1. Stevia bitkisinin sistematik APG III'ü (Anonymous 2020a)



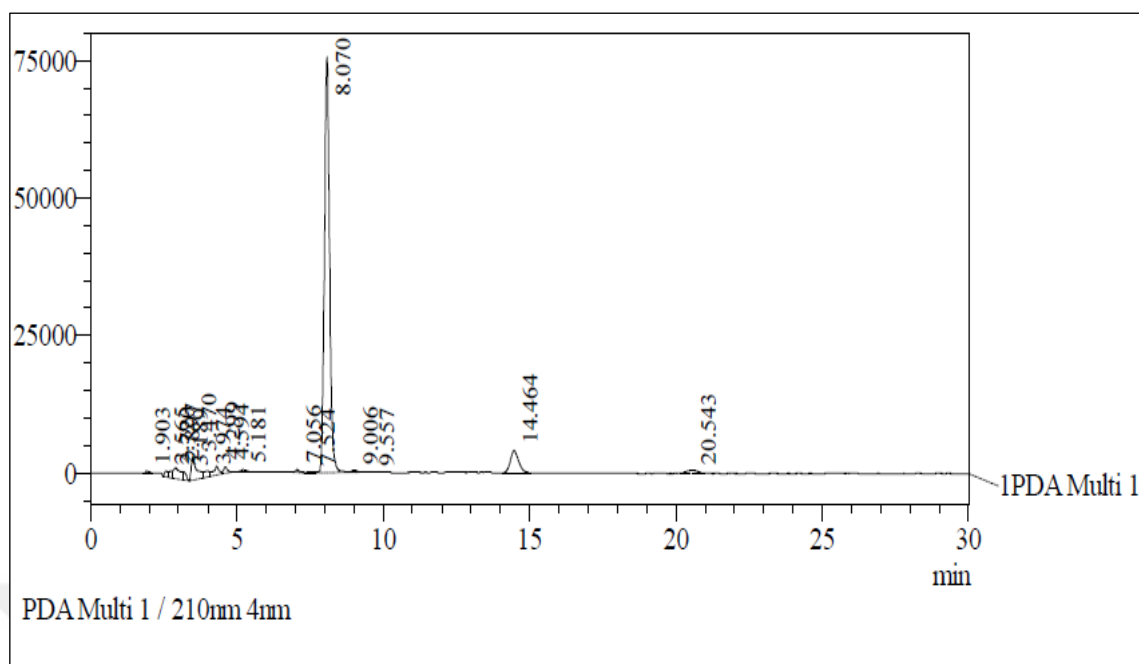
Ek 2. Ön denemelerden elde edilen toplam sonuçlar



Ek 3. Rebaudiosit A standardına (100 ppm) ait kromatogram



Ek 4. Rebaudiosit C standardına (100 ppm) ait kromatogram



Ek 5. Steviosit standardina (50 ppm) ait kromatogram

ÖZGEÇMİŞ

ZOUA ASSOUMOU URSULA TANIA

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya.
Yüksek Lisans	Universite des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTOMB) Mühendislik Fakültesi, Bioteknoloji Bölümü
Lisans	Universite des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTOMB) Mühendislik Fakültesi, Bioteknoloji Bölümü

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	African University of Management (AUM) Fen Fakültesi, Gıda Müh, Bölümü, Libreville
---------------------	---

ESERLER

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

- 1- Optimization of Enrichment of D-Pinitol in Carob Extract Using Nanofiltration Application Using the Response Surface Methodology, Turkish Journal of Agriculture- Food Science and Technology, 8(9), 1846–1853, <https://doi.org/10,24925/turjaf.v8i9,1846-1853,3429>,
- 2- Impact of carob extract supplementation on chemical and sensory properties of yogurt and ice cream, Gıda 46 (2021), <https://doi.org/10,15237/gida,GD21043>

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Impact of carob extract supplementation on chemical and sensory properties of yogurt and ice on the 3rd International Congress on Food Technology on October 10-12, 2018, Nevşehir/ Turkey,
- 2- Enrichment of D-Pinitol in Carob Pod Extract on 13th International Conference of Food Physicists- ICFP 2018 on October, 23-25th, Antalya/Turkey,
- 3- Effects of centrifugal force on the phenolic content and antioxidant activity of fresh stevia leaves on 9th WSO World Convention, on October 24-25, 2019 Amsterdam/Netherlands,