

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**STEVIA EKSTRAKTLARININ SAFLAŞTIRMA AŞAMALARINDA FONKSİYONEL
BİLEŞİKLERİN DEĞİŞİMİNİN SAPTANMASI**

Yeşim KAPİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**STEVIA EKSTRAKTLARININ SAFLAŞTIRMA AŞAMALARINDA FONKSİYONEL
BİLEŞİKLERİN DEĞİŞİMİNİN SAPTANMASI**

Yeşim KAPİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

ANTALYA

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



**STEVIA EKSTRAKTLARININ SAFLAŞTIRMA AŞAMALARINDA FONKSİYONEL
BİLEŞİKLERİN DEĞİŞİMİNİN SAPTANMASI**

Yeşim KAPİ

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2021-5553 nolu proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

STEVIA EKSTRAKTLARININ SAFLAŞTIRMA AŞAMALARINDA FONKSİYONEL
BİLEŞİKLERİN DEĞİŞİMİNİN SAPTANMASI

Yeşim KAPİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 14/07/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)

Prof. Dr. Nevzat KONAR

Doç. Dr. İrfan TURHAN



7.2.2021

ÖZET

STEVIA EKSTRAKTLARININ SAFLAŞTIRMA AŞAMALARINDA FONKSİYONEL BİLEŞİKLERİN DEĞİŞİMİNİN SAPTANMASI

Yeşim KAPİ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Temmuz 2021; 55 sayfa

Literatürde aynı miktardaki şekerden daha az enerjili olan ve şeker yerine kullanılabilen bileşikler tatlandırıcı olarak adlandırılır. Tatlandırıcıların yüksek oranda kullanılmasının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri hakkında birçok görüş bulunması insanları alternatif kaynaklara yöneltmiştir. Doğal tatlandırıcılardan biri olan ve şeker otu olarak bilinen stevia bitkisi sakkarozdan 200-300 kat daha tatlı olup, insan sağlığı üzerinde birçok olumlu etkisi bulunmaktadır. Obezite ve şeker hastalığı gibi hastalıkların tedavisinde düzenli tüketilmesi durumunda kan şekeri ve kolesterol düzeyini düşürdüğü belirlenmiştir. Vücutta hücre yenilenmesini geliştirmekte ve kan basıncını düşürmektedir. Ayrıca, steviol glikozitlerin vücuttaki antioksidan miktarını artırmakla beraber herhangi bir karsinojenik veya mutajenik etkisi görülmemiştir.

Günümüze kadar stevia ekstraktlarının tatlandırıcı özellikleriyle ilgili birçok formülasyon çalışmaları yapılmış olmakla beraber içerdikleri diğer fonksiyonel bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyel etkisi üzerinde de durulmuştur. Bu çalışmada steviol glikozit konsantrasyonu açısından zengin ekstraktlarda önemli fonksiyonel bileşiklerin devamlılığının tespit edilmesi, saptanacak optimum işleme tekniğinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bağlı tatlılığı yüksek ekstraktlarda sağlığa faydalı olan bileşiklerin korunması durumunda insan sağlığı açısından önemli bir fonksiyonel ürün elde edilmesi hedeflenmiştir.

Çalışmada öğütülmüş ve kurutulmuş stevia yaprakları kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmış ve ekstraktlar ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon işlemleri ile zenginleştirilmiştir. Ekstraksiyon “1:15 yaprak:su ve “1:15 yaprak: etil alkol” oranında 20°C’de 30 dakikada yapılmıştır. Santrifüj işlemi ise 2900xg kuvvetinde 20°C’de 15 dakikada gerçekleştirilmiştir. Berraklaştırma aşamasında ekstraktlara sırasıyla durultma enzimi, jelatin, bentonit ve kizelzol eklenerek durultma işlemi yapılmıştır. Ultrafiltrasyon için 30 kDa ayırma sınırına sahip polietersülfon (PESU) membran, nanofiltrasyon işlemi için 5 kDa ayırma sınırına sahip hydrosart membran (HYDRO) kullanılmıştır. Ultrafiltrason sonucunda elde edilen permeat akısına nanofiltrasyon uygulanmıştır.

Elde edilen ara ürünler ve son üründe suda çözünür kuru madde analizi (Briks), pH tayini, titrasyon asitliği tayini, steviol glikozit kompozisyonu tayini, renk analizi, antioksidan kapasitesi tayini ve fenolik madde dağılımı için gerekli analizler yapılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Fenolik maddeler, HPLC, Ultrafiltrasyon, Nanofiltrasyon, Reb A, Steviol glikozitler, Tatlandırıcı

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Nevzat KONAR

Doç. Dr. İrfan TURHAN

ABSTRACT

DETERMINING THE CHANGE OF THE FUNCTIONAL COMPOUNDS IN THE PURIFICATION STAGES OF STEVIA EXTRACTS

Yeşim KAPİ

MSc. Thesis in FOOD ENGINEERING

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

July 2021; 55 pages

Compounds with less energy than the same amount of sugar can be used instead of sugar are called sweeteners in the literature. Many opinions about the harmful effects of the high use of sweeteners on human health have led people to alternative sources. Stevia plant, one of the natural sweeteners known as sugar grass, is 200-300 times sweeter than sucrose and has many positive effects on human health. It has been determined that it reduces blood sugar and cholesterol levels if consumed regularly in treating diseases such as obesity and diabetes. It improves cell regeneration in the body and lowers blood pressure. In addition, although steviol glycosides increased the amount of antioxidants in the body, no carcinogenic or mutagenic effect was observed.

Although many formulation studies have been conducted on the sweetening properties of stevia extracts to date, the antioxidant and antimicrobial effects of other functional compounds they contain have also been emphasized. This study is essential to determine the persistence of functional compounds, especially quercetin, in extracts rich in steviol glycoside concentration to determine the optimum processing technique to be determined. If beneficial compounds such as quercetin are preserved in extracts with high relative sweetness, it will be possible to obtain a functional product important for human health.

In the study, extraction was done using ground and dried stevia leaves, and the extracts were enriched by ultrafiltration and nanofiltration processes. Extraction was carried out at a ratio of “1:15 leaf: water and 1:15 leaf: ethyl alcohol” at 20°C for 30 minutes. Centrifugation was carried out at 2900xg at 20°C for 15 minutes. In the clarification phase, clarification was carried out by adding clarification enzyme, gelatin, bentonite, and kieselsol to the extracts, respectively. Polyethersulfone (PESU) membrane with 30 kDa separation limit was used for ultrafiltration, and hydrosart membrane (HYDRO) with 5 kDa separation limit was used for nanofiltration. Nanofiltration was applied to the permeate flux obtained as a result of ultrafiltration.

Critical analyses for water-soluble dry matter (Brix), pH value, titration, steviol glycoside composition, color values, antioxidant capacity, and phenolic substance distribution were obtained intermediates the final product was performed.

KEYWORDS: Phenolic substances, HPLC, Quercetin, Ultrafiltration, Nanofiltration, Steviol glycosides, Sweetener

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Nevzat KONAR

Assoc Prof. Dr. İrfan TURHAN

ÖNSÖZ

Şeker otu olarak bilinen stevia bitkisinden (*Stevia rebaudiana* B.) elde edilen tatlı bileşiklerin kullanımı günümüzde hızlı bir ivme ile artmaktadır. Steviol glikozitlerin tatlandırıcı özelliği dışında fonksiyonel özelliğinden dolayı bazı hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde yardımcı olacağı da düşünülmektedir. Stevia bitkisinin yapraklarında steviol glikozitlerle birlikte antimikrobiyel ve antioksidan özelliklere sahip olan flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler yer almaktadır. Dolayısıyla, saflaştırılmış steviol glikozitler yerine kısmen saflaştırılmış ve aynı zamanda bazı fenolik maddeler gibi bitkinin doğasından kaynaklanan fonksiyonel bileşikleri de içeren zenginleştirilmiş stevia ekstraktlarının ürün formülasyonlarında kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür. Bu tez çalışmasında, önceki çalışmalarla optimum işleme koşulları belirlenmiş olan stevia ekstraksiyonu ve steviol glikozitlerin zenginleştirilmesi aşamalarında bazı fenolik maddeler gibi fonksiyonel bileşiklerin değişiminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa KARHAN'a, bütün bilgi ve becerisiyle bana katkı sağlayan değerli çalışma arkadaşım Ahmet HACIOĞLU'na, yakın arkadaşlarım ve değerli hocalarıma ve aileme teşekkür ederim.

AKADEMİK BEYAN

Yüksek lisans Tezi olarak “Stevia Ekstraktlarının Safılaştırma Aşamalarında Fonksiyonel Bileşiklerin Değişiminin Saptanması” adlı çalışmanın, akademik kurallar ve etki değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

14/07/2021

Yeşim KAPİ



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
AKADEMİK BEYAN.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	3
2.1. Stevia bitkisi.....	3
2.2 Fenolik Bileşikler ve Özellikleri	6
2.3. Stevia Bitkisinden Ekstrakt Üretimi.....	9
2.4. Stevia Ekstraktlarının Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi	10
3. MATERYAL VE METOT.....	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Metot	13
3.2.1. Stevia yapraklarının su ve etil alkol ile ekstraksiyonu	13
3.2.2. Analiz yöntemleri	17
3.2.2.1 Suda çözünür kuru madde tayini.....	17
3.2.2.2. pH tayini.....	17
3.2.2.3. Toplam asitlik tayini	17
3.2.2.4. Renk analizi.....	18
3.2.2.5. Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi.....	18
3.2.2.6. Fenolik madde dağılımının belirlenmesi.....	18
3.2.2.7. Steviol glikozit kompozisyonunun belirlenmesi.....	19
3.2.2.8. İstatistiksel analizler.....	19
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	20
4.1. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Bx, pH ve Titrasyon Asitliği Üzerine Etkisi.....	20
4.2. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Renk Değerleri Üzerine Etkisi ..	22
4.3. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Reb A ve Steviosit Miktarları Üzerine Etkisi.....	24

4.4. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Antioksidan Kapasite Değerleri Üzerine Etkisi	26
4.5. Sulu ve etil alkollü ekstraktların tüm işlem basamaklarından sonra fenolik bileşik değerlerinin karşılaştırılması.....	28
4.6. Membran Filtrasyon İşleminin Suda Çözünür Kuru Madde (Bx), pH ve Titrasyon Asitliği Üzerine Etkisi.....	32
4.7. Sulu ve Etil Alkollü Stevia Ekstraktlarının Renk Değerlerinin Karşılaştırılması.....	34
4.8. Sulu ve alkollü stevia ekstraktlarının Reb A ve steviosit değerlerinin karşılaştırılması	36
4.9. Sulu ve Etil Alkollü Stevia Ekstraktlarının Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması.....	39
5. SONUÇLAR.....	42
6. KAYNAKLAR.....	44
7.EKLER.....	48
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°Bx	: Briks
d	: Dakika
g	: Gram
s	: saniye
P	: Permeat
R	: Retentat
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
Mm	: Mikrometre
Nm	: Nanometre
G	: Santrifüj kuvveti
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HYDRO	: Hydrosart
PESU	: Polietersülfon
Reb A	: Rebaudiosit A
UF	: Ultrafiltrasyon
NF	: Nanofiltrasyon
MWCO	: Membran filtre ayırma sınırı (Molecular Weight Cut Off)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 0.1. Stevia (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) Bitkisi	3
Şekil 2.2. Steviol, Steviosid ve Reb A Kimyasal Yapısı.....	4
Şekil 2.3. Stevia bitkisinde bulunan önemli fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.5. Endüstride kullanılan membran prosesleri.....	12
Şekil 3.1. Kurutulmuş stevia yaprakları	13
Şekil 3.2. Öğütülmüş kuru stevia yaprakları.....	14
Şekil 3.3. Stevia ekstraktlarına uygulanan işlemler.....	15
Şekil 3.4. Ekstraktların 30 kDa ayırma sınırına sahip membran ile mikrofiltrasyonu....	16
Şekil 3.5. Ekstraktların 5 kDa ayırma sınırına sahip membran ile nanofiltrasyonu.....	16
Şekil 3.6. Etil alkollü ekstraktlarda ki alkolün evaporatör ile uzaklaştırılması.....	17
Şekil 4.1. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işleminin sonrasındaki örneklerin suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri.....	21
Şekil 4.2. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işleminin sonrasındaki örneklerin renk analizi (L^* , a^* , b^*) değerleri.....	23
Şekil 4.3. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işleminin sonrasındaki örneklerin steviosit ve reb A değerleri.....	25
Şekil 4.4. Ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işleminin sonunda sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki antioksidan kapasite değerleri	27
Şekil 4.5. Tüm işlem basamakları sonrasında sulu ekstraktlardaki klorojenik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin-3-glikozit, luteolin, apigenin ve kuersetin miktarı değerleri.....	29
Şekil 4.6. Tüm işlem basamakları sonrasında alkollü ekstraktlardaki klorojenik asit, kafeik asit, rutin, kuersetin-3-glikozit, luteolin, apigenin ve kuersetin miktarı değerleri.....	30
Şekil 4.7. Her iki kontrol grubu için 30 kDa ve 5 kDa permeat ile retentat akılarının, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri.....	33
Şekil 4.8. Her iki kontrol grubu için 30 kDa ve 5 kDa permeat ile retentat akılarının, renk analizi (L^* , a^* , b^*) değerleri.....	35
Şekil 4.9. Her iki kontrol grubu için 30 kDa ve 5 kDa permeat ile retentat akılarının, steviosit ve reb A değerleri.....	37
Şekil 4.10. Her iki kontrol grubu için 30 kDa ve 5 kDa permeat ile retentat akılarının, antioksidan kapasitesi değerleri.....	40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Stevia yapraklarında bulunan antioksidan bileşikler.....	7
Çizelge 4.1. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri.....	20
Çizelge 4.2. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, renk değerleri.....	22
Çizelge 4.3. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, Reb A ve Steviosit değerleri (mg/L).....	24
Çizelge 4.4 Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki antioksidan kapasite değerleri.....	26
Çizelge 4.5. Her iki kontrol grubunun tüm işlem basamaklarından sonra ki klorojenik asit, kafeik asit, Rutin, Kuercetin-3-glikozit, Luteolin, Apigenin ve Kuersetin değerleri miktarlarının karşılaştırılması.....	28
Çizelge 4.6. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akıllarının, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri	32
Çizelge 4.7. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akıllarının L*, a*, b* renk değerleri.....	34
Çizelge 4.8. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa ayırma sınırındaki membran filtrasyon uygulaması sonunda permeat (P) ve retentat (R) akıllarının Reb A ve Steviosit miktarları (mg/kg).....	36
Çizelge 4.9. Sulu (S) ve etil alkollü (A) ekstraktlarda 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akıllarının antioksidan kapasitesi değerleri	38

1. GİRİŞ

Günümüzde birçok gıdada bulunan şeker insan beslenmesinin temel gıda bileşenlerinden biri haline gelmiştir. Basit şekerlerin kolay elde edilebilmesi çok fazla tüketilmesine yol açmış ve bu nedenle aşırı şeker tüketiminin sebep olduğu hastalıkların artmasına neden olmuştur. Bu durum şekere alternatif olarak diğer tatlandırıcıların kullanımını artırmıştır. Günlük hayatta kullandığımız şekerin yerine aynı miktardaki şekerden daha tatlı olan ve daha az enerjili yapay tatlandırıcıların laksatif etkiye sahip olmaları gibi olumsuz özelliklerinin olmasının yanı sıra mevzuatlar gereği belirli katkılama limitlerinin olması tüketicilerin doğal ürünlere karşı ilgisinin artmasına sebep olmuştur; sonuç olarak bu durum doğal tatlandırıcıları daha önemli hale getirmiştir.

Stevia bitkisi Paraguay orjinli bir bitkidir. Çok yıllık çalı formunda olup bu bitkiden elde edilen ekstraktlar doğal tatlandırıcı grubuna girmektedir. Türkiye’de şeker otu olarak bilinen stevia bitkisi (*Stevia rebaudiana* B.) Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yayımlanan bitki listesinde “pozitif” olarak yer almakla beraber Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliğine uygun olduğu bildirilmiştir. Steviol glikozitlerin E960 kodu ile birçok üründe kullanılmasına izin verilmiştir (Gedik ve Tansı 2017).

Stevia bitkisi tatlandırıcı özelliği yanı sıra sağlığa olumlu etkisi açısından da önemli bir bitki olup, günümüze kadar yapılan çalışmalarda olumsuz hiçbir etkisi bildirilmemiştir. Diyabet, hipertansiyon ve obezite gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmasının yanı sıra sakaroza göre 200-300 kat daha fazla bağıl tatlılığa sahip sıfır kalorili steviol glikozitleri içerir. Yapısında bulunan steviol glikozitler içerisinde rebaudiosit A (reb A) ve steviosit büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada stevia bitkisinden, insan sağlığını olumlu etkileyen bazı fonksiyonel bileşikler de içeren doğal bir tatlandırıcının elde edilmesini sağlayan tekniğin belirlenmesi amaçlanmıştır. Endüstriyel olarak stevia yaprağındaki steviol glikozitler; özellikle rebaudiosit A (reb A) fraksiyonu saflaştırılarak piyasaya arz edilmektedir. Piyasadaki stevia içeren tatlandırıcılar steviol glikozitler dışında diğer fonksiyonel bileşikler içermeyecek şekilde bir saflaştırma prosedürü ile elde edilmekte olup bu amaçla su dışında organik çözümler, reçineler ve çeşitli çöktürme ajanları kullanılmaktadır. Yaygın olan ticari üretimlerde ayrıca reb A dışındaki diğer steviol glikozitler uzaklaştırılmakta veya kimyasal ya da biyokimyasal yollarla bağıl tatlılığı daha yüksek fraksiyonlara dönüştürülmektedir. Dolayısıyla yaygın üretim prosesleri çok sayıda ve kimyasal uygulama gerektiren üretim basamağını içermektedir. Bu proje ile ise fiziksel uygulamalarla zenginleştirilmiş ve faydalı fonksiyonel bileşenleri de içeren kabul edilebilir düzeyde bağıl tatlılığa sahip bir stevia ürününün üretim sürecinde fonksiyonel bileşenler ve steviol glikozitlerin kompozisyonundaki değişimin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu projenin sonuçları kullanılarak minimal işlem görmüş, kabul edilebilir tatlılığa sahip ve insan sağlığına faydalı bir ürünün yerli kaynaklarla üretilebilmesi için gerekli bilimsel sonuçların elde edilmesi hedeflenmiştir.

Steviol glikozitler açısından zenginleşen ekstraktlarda üretim basamaklarında fenolik bileşiklerin devamlılığının tespit edilmesi, saptanacak optimum işleme tekniğinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bağlı tatlılığı yüksek ekstraktlarda fonksiyonel bileşiklerin korunması durumunda insan sağlığı açısından önemli bir fonksiyonel ürün elde edilmiş olacaktır. Stevia ekstraktlarının tatlandırıcı özellikleriyle ilgili çalışmalar yapılmış olmakla beraber içerdiği diğer fonksiyonel bileşiklerin antioksidan ve antimikrobiyel etkisi üzerinde de durulmuştur.

Projede materyal olarak kuru stevia yapraklarından steviol glikozitler su ve etil alkolle ekstrakte edilip membran teknolojisiyle zenginleştirilmiş ve bu prosesin tüm aşamalarında bazı fonksiyonel bileşiklerin varlığı saptanmıştır.

Üretilen ürünlerin her aşamasında, suda çözünür kuru madde (briks), pH değeri, titrasyon asitliği, renk değerleri, antioksidan kapasite, fenolik madde dağılımının belirlenmesi (LC-MS/MS), HPLC analizi ile steviosit ve reb A tayini yapılmıştır.

Bu çalışmada stevia ekstraksiyonu ve saflaştırmada sadece santrifüj kuvveti ve membran ayırma sistemi gibi fiziksel etkiler kullanılmıştır. Dolayısıyla bitki kaynaklı safsızlıklardan özellikle fenolik maddelerin önemli düzeyde kalması beklenmiştir. Bu fenolik bileşenler içinde özellikle kuersetin ve kuersetin-3-glikozit varlığı uygulama başarısı açısından önemlidir. Çalışma sonunda bağlı tatlılığı yeterli, glikozidik acılığı kabul edilebilir seviyede ve özellikle kuersetin varlığı korunmuş; özet olarak bağlı tatlılığı yanında fonksiyonel özellikleri de korunmuş bir ürünün elde edildiği üretim koşullarının saptanması hedeflenmiştir. Daha önce bu tarz bir çalışma yapılmamış olması projenin bilimsel çalışmalar ve endüstriyel uygulama açısından farklı bir bakış açısı yaratabileceği düşünülmüştür.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Stevia bitkisi

Stevia bitkisi (*Stevia rebaudiana* Bertoni), Güney Amerika'nın kuzey bölgelerinde doğal olarak yetişen çok yıllık çalı formunda bir bitki olup Asteraceae familyasına aittir (Geuns 2003). Bu bitki nemli ve sıcak ortamlarda yetiştirilmektedir. Ayrıca deniz seviyesinden 3500 m yüksekliğe kadar yetişebildiği tespit edilmiştir (Cariño-Cortés vd. 2007). Stevia bitkisinin ilk yetiştiği yer Güney Amerika'nın Paraguay bölgesindeki Amambey tepeleridir fakat zamanla Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Brezilya, Meksika, Singapur, Endonezya, Malezya ve ABD gibi ülkelerde de yetiştirilmeye başlamıştır (Sivaram ve Mukundan 2003).



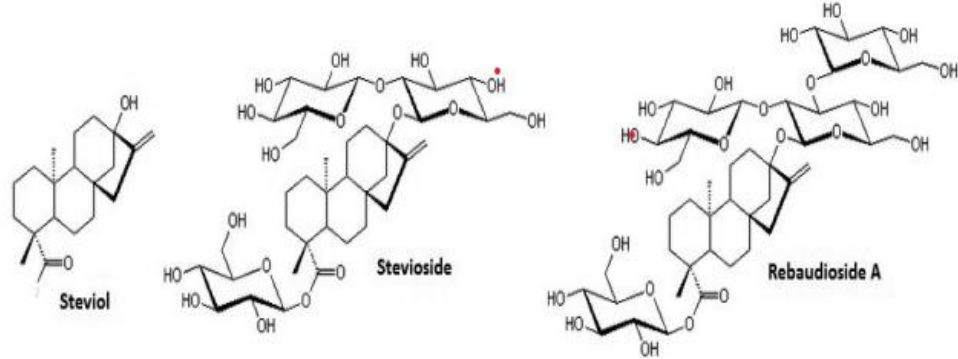
Şekil 0.1. Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Bitkisi (Anonim 2017)

Stevia nemli ortamlarda yetişebilen, 60-90 cm boyunda, 20-24°C ideal sıcaklığı olan bir bitkidir. Bitki, tuzluluğa karşı hassasiyeti yüksek olmakla birlikte 9°C'nin altındaki sıcaklıklara tolerans göstermemektedir. Genel olarak pH değeri 4-5 olan asidik özellikteki topraklarda yetişirken pH 6.5-7.5 olan topraklarda da az miktarda gelişim sağlayabilmektedir.

Stevia bitkisi T.C. Tarım ve Ormanlık Bakanlığı'nın pozitif bitkiler listesine 2004 yılında girmiştir. Stevianın insan sağlığı üzerindeki etkisi üzerinde yapılan birçok çalışma sonucunda steviol glikozitlerin insanlar tarafından uzun süreli tüketiminin sağlık açısından bir sorun teşkil etmediği tespit edilmiş ve stevianın tüketimin güvenli olduğu belirtilmiştir (Koyama vd. 2003; Maki vd. 2008; Wheeler vd. 2008).

Günümüzde stevia bitkisinden elde edilen ürünlerin gıda katkı maddesi olarak kullanımına birçok ülkede izin verilmektedir. Stevianın gıda katkı maddesi olarak kullanımına ABD'de 2008, Avrupa'da 2011, Türkiye'de ise 2013 yılından beri izin verilmektedir. Steviadan elde edilen tatlandırıcılar E960 kodu ile kullanılmaktadır. Yaş stevia yaprakları sakarozdan 10-15 kat, kurutulmuş stevia yaprakları ise 200-300 kat daha

fazla tatlandırıcı özelliğe sahiptir (Ghanta vd. 2007). Stevia bitkisinin yapılan araştırmalara göre yaklaşık 150 alt türü bulunmaktadır (Nunes vd. 2007).



Şekil 2.2. Steviol, Steviosit ve Reb A Kimyasal Yapısı (Nunes vd. 2007)

Stevia bitkisinin yapraklarında bulunan tatlı bileşikler diterpen glikozit (steviol glikozit) bileşiklerdir. Önemli bir bitki hormonu olan giberellik asidin başlangıç aşamasına çok benzeyen bir oluşum mekanizması kullanılarak sentez edilirler. Steviol glikozit ve giberellin mekanizmaları ara bileşik kauren sentezinden sonra ayrılır. Steviadaki lauren steviole (tatlı glikozitin temel yapısı) dönüştürülür, daha sonra esas tatlandırıcıları oluşturmak için glikolize edilirler (Smith ve Vanstadin 1992).

Steviosit, stevia yapraklarının kuru maddesinde yaklaşık %4-20 oranındadır. Bu oran tür ve işleme tekniklerine göre farklılık gösterebilir. Reb A, stevioside kıyasla genellikle daha az miktarda bulunur fakat bağıl tatlılığı steviositten daha yüksektir (Kumar vd. 2012, Sic Zlabur vd. 2013). Bu iki steviol glikozit genellikle majör steviol glikozitler olarak bilinmektedir.

Yapılan araştırmalara göre stevia yetiştiriciliği ve kullanımı Çin, Brezilya, Paraguay, Meksika, Rusya, Endonezya, Kore, ABD, Kanada ve Arjantin dahil olmak üzere dünyanın birçok yerinde yayılmaktadır. Tüm dünyada üretilen stevia ekstraktlarının büyük bir bölümü olan yaklaşık %80'ini Çin kökenli firmalar karşılamaktadır. Türkiye de ise ilk olarak 2009 yılında deneme üretimine Antalya'da başlanmıştır (Tursun vd. 2017).

Stevia yapraklarında birden çok steviol glikozit bileşiği bulunmaktadır. Stevianın kurutulmuş yapraklarının sakarozdan 200-300 kat daha fazla tatlılığa sahip olan steviol glikozitler içerdiği bilinmektedir (Lemus vd. 2012).

Stevia bitkisinin kuru yapraklarının 100 mg'lık kısmında 51-56 mg karbonhidrat, 17-19 mg ham lif, 3-5 mg yağ, 11-16 mg protein ve 7-11 mg arasında kül olduğunu tespit edilmiştir (Khiranoi vd. 2017). Ancak işlenmemiş stevia yaprağının gıda formüllerinde kullanımı yaygın değildir.

Yapılan bir araştırmada stevia yapraklarında glutamik asit, aspartik asit, lizin, serin, alanin, prolin, tirozin, izolösin ve metiyonin gibi 9 esansiyel amino asit tespit edilmiştir (Mohammad vd. 2007). Abou-Arap vd. (2010) tarafından ise stevia yapraklarında toplam 17 aminoasit tanımlanmıştır.

Bir başka araştırmaya göre kuru stevia yapraklarının 1.9-5.6 g /100g arasında lipit içerdiği bildirilmiştir (Goyal ve Samsheer 2010).

Stevia bitkisi üzerinde yapılan toksikoloji ile ilgili araştırmalarda stevianın, mutajenik ve kanserojenik herhangi bir etkisi olduğunu gösteren bir sonuç bulunmamıştır (Klongpanichpak vd. 1997).

Stevia bitkisinin diğer tatlandırıcılarla karşılaştırıldığında fenilketonuri ve diyabet hastaları üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır. Steviol glikozitlerin, sakaroz yerine kullanılıp obezite, hipertansiyon ve diyabet hastalarının tedavisinde de kullanabileceği belirtilmiştir (Jaroslav vd. 2007).

2.2. Fenolik Bileşikler ve Özellikleri

Flavonoidler kimyasal yapı ve özellikleri birbirinden kısmen farklı olan, fenolik bileşikler sistematüğinde çok sayıda üyesi olan ve bitkilerde yaygın olarak bulunan çoğu fonksiyonel özelliklere sahip bileşiklerdir. Flavonoller, flavonlar, flavanonlar, kateşinler ve antosiyanidinleri içeren ana flavonoid grubu içinde karakterize edilmiş 4.000'den fazla flavonoid vardır (Cook vd. 1996).

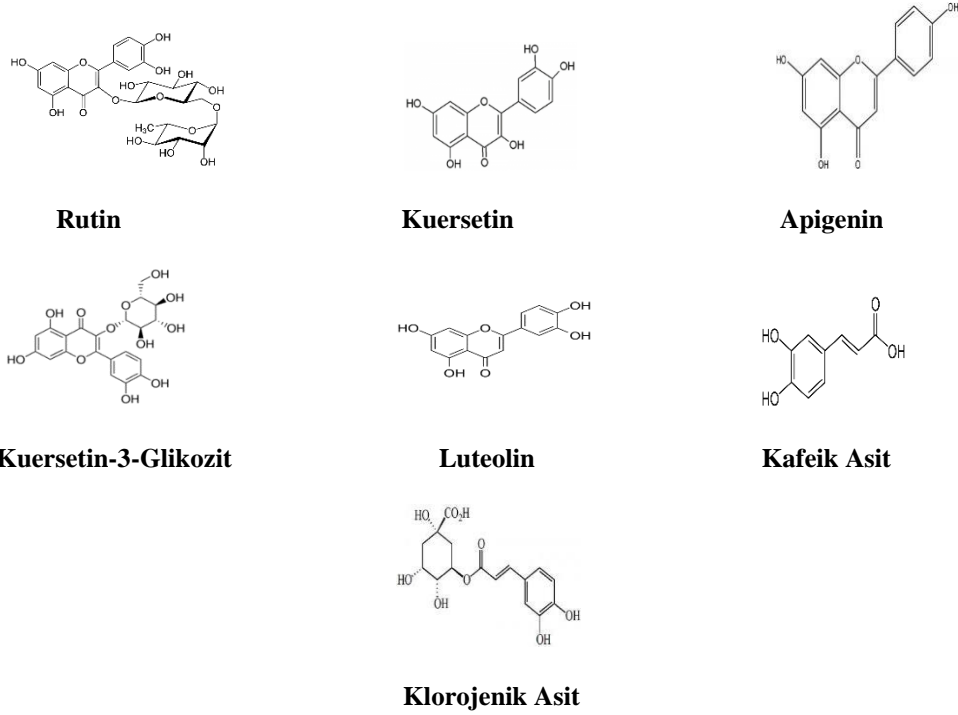
Fenolik bileşikler, esasen fenolik asitler ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Flavonoidler, bitkisel çayların, meyve ve sebzelerin doğal yapılarında bulunan polifenolik antioksidanlardır (Nizamlıoğlu ve Nas 2010). Fenolikler doğal yapıya sahip olan çok aktif antioksidanlardan olup, radikalleri bağlama, metallerle şelatları oluşturma ve lipoksigenaz enzimini inhibe etme özellikleri ile yüksek antioksidan etkiye sahip olmaları gibi fonksiyonlarıyla bilinmektedir (Nichenametla vd. 2006).

Fenolik bileşikler, hidroksil grubunun (-OH) aromatik bir hidrokarbon grubuna bağlı olduğu aromatik yapıdaki kimyasal bileşiklerdir. En basit yapı fenole (C_6H_5OH) aittir. Fenolik bileşikler, moleküldeki fenol ünitelerinin sayısına bağlı olarak basit fenoller veya polifenoller olarak sınıflandırılır. Fenolik bileşikler, birçok fizikokimyasal özelliklere sahip bileşiklerdir. Hidroksil grupları (-OH) asitlik düzeylerini, benzen halkaları (aromatik halka) ise bazlık düzeylerini belirlemektedir.

Farmasötik ve tıbbi endüstrilerde birçok fenolik bileşik, kanser gibi patolojilerin ve bazı hastalıkların önlenmesinde kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin çoğu antioksidanlar, anti-kanserojenler, antimutajenler ve hatta anti-inflamatuarlar olarak sınıflandırılmakla beraber bunlardan bazılarının programlanmış hücre ölümünü veya hücre döngüsünün tutuklanmasını engellediği ve metabolizmayı düzenlediği, hücre yapışmasını önlediği, çoğalmayı düzenlediği; böylece potansiyel olarak tümörlerin tedavisinde kullanılabileceği tespit edilmiştir.

Çizelge 2.1. Stevia yapraklarında bulunan antioksidan bileşikler (Kim vd. 2012; Christaki vd. 2013; Ghanta vd. 2007; Wolver-Rieck vd. 2012)

Polifenolik Bileşikler	
Polifenolik asitler	pirogallol 4-metoksibenzoik asit 4-kumarik asit 4-metilkatekol sinapik asit sinnamik asit
Klorojenik asitler	3-kafeoilkinik asit (3-CQA) 5-kafeoilkinik asit (5-CQA) 4-kafeoilkinik asit (4-CQA) 3,5-dikafeoilkinik asit (3,5-diCQA) 3,4-dikafeoilkinik asit (3,4-diCQA) 4,5-dikafeoilkinik asit (4,5-diCQA) 5-kafeoylshikimic asit 5-feriloylikinik asit Diğer klorojenik asitler
Flavonoitler	
Flavanoller	kuersetin kuersetin-3-O- β -D-arabinosit kuersetin-3-O- β -D-ramnosit kuersetin-3-O-glukozit kuersetin-3-O-rutinosit kuersetin-3-O-(4-O-trans-kafeoil) α -L-ramno-piranosil-(1-6)- β -D-galatopiranosit kaempferol-3-O-ramnosit
Flavonlar	apigenin apigenin-4'-O- β -D-glikozit apigenin-7-O- β -D-glikozit luteolin luteolin-7-O- β -D-glikozit



Şekil 2.3. Stevia bitkisinde bulunan önemli fenolik bileşiklerin kimyasal yapısı

Antioksidan etkisi en yüksek bileşikler; gallik asit, floroglusik asit, kafeik asit ve gentisik asittir. Yapılarında flavanoidler, sinamik asit türevleri, kumarinler ve benzeri fenolik bileşikler bulundurmalarından dolayı çoğu bitkinin antioksidan kapasitesi yüksektir. Yapılan çalışmalarda fenolik bileşiklerin; antialerjik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyel, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik özellikleri ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, diyabete mellitus ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır (Macdougall 2002).

Ruiz vd. (2015) stevia yapraklarının antioksidan özelliğinin klorofil, karotenoid, fenolik bileşikler ve flavonoidler gibi polar bileşiklerden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Şekil 2.2).

Stevia ekstraktları içerisinde antimikrobiyel etkiye sahip gallik asit, kafeik asit ve protokateşik asit gibi bazı fenolik asitler ve stevia ekstraktında mevcut olabilen kaempferol, kuersetin, izokuersetin, apigenin ve luteolin gibi bazı flavonoid maddelerin olduğu tespit edilmiştir (Cushnie ve Lamb 2005).

Kuersetinin antioksidan karakteri kimyasal yapısı, hidroksil (–OH) ikameleri ve özellikle kateşol tipi B halkasının varlığı ve konumundan kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Rice-Evans vd. 1996; Wang vd. 2006).

Kuersetin (3, 5, 7, 3', 4'-pentahidroksiflavon), beş alt sınıftan biri olan bir flavonol olup hem ekili hem de yabani bitkilerde bulunan başlıca flavonoidlerden birisi olarak sınıflandırılır (Cook vd.1996; D'Andrea 2015).

Yapılan bir dizi epidemiyolojik çalışmada günde 68 mg düzeyine kadar toplam flavonoid tüketimi ile (büyük oranda yüksek kuersetin düzeyi ile) tüm kanser türlerinin olgu sıklığı arasında negatif bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır (Hertog vd 1995; Lin vd. 2006). Ayrıca, günde 40 mg seviyesine kadar flavonoid tüketimi (%95'i kuersetin) ile kanser olgusu arasında negatif bir ilişki olduğunu gösteren çalışmalar vardır (Knekt vd. 1997; Knekt vd. 2002).

Hayvanlar üzerinde yapılan bazı deneysel çalışmalarda kuersetinin antioksidan etkilerinin beyin ve kalp gibi dokulardaki oksidatif hasarı, iskemik reperfüzyon hasarında ve oksidatif stres oluşturan ajanlara maruz kalmayı azalttığı bildirilmektedir (Doğan vd. 2015; Bayne vd. 2002).

Japonya'da yapılan bir çalışmada, plazmadaki kuersetin miktarının artmasıyla hem toplam hem de LDL-kolesterol konsantrasyonunda bir azalma olduğu görülmüştür (Hertog vd. 1994). Finlandiya'da yapılan başka bir çalışmada ise elma ve soğan açısından zengin diyetin kuersetin düzeyini artırdığını ve bunun da koroner mortaliteyi azaltmaya yardımcı olduğunu göstermiştir (Knekt vd. 1996).

Sytar vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada kökeni farklı 5 stevia bitkisinin yapraklarının antioksidan kapasitesi ve fenolik madde dağılımı saptanmıştır. Yapraklardaki fenolik maddelerin yarısından fazlasını kuersetinin oluşturduğu belirlenmiştir. Bunun yanında p-kumarik asit ve kateşinin de miktarlarının fazla olduğunu ve fenolik bileşikler içinde sarımsı yeşil renk veren kuersetin bileşiğinin anti karsinojenik özelliğinden dolayı (Baghel vd. 2016; Rauf vd. 2018; Farias ve Pozo 2019) saflaştırılmış ve kapsüllenmiş şekilde tüketime arz edildiği belirtilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar bazı flavonoidlerin lipit peroksidasyonuna neden olan süperoksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunu engellediğini göstermektedir (Preedy vd. 2014).

2.3. Stevia Bitkisinden Ekstrakt Üretimi

Bu çalışmada stevia bitkisinin ekstraktlarında saflaştırma işlemi yapılacağı için belirli işlemler uygulanmıştır. Fonksiyonel bileşiklerin, stevia ekstraktları üzerinden incelemesi sağlanacağı için ürüne ekstraksiyon işlemi uygulanmış; çalışmada su ve etil alkol olmak üzere iki farklı çözücü kullanılmıştır.

Ghosh vd. (2008) *Stevia rebaudiana* yapraklarının antimikrobiyel özellikleri üzerine yaptıkları çalışmada 6 farklı çözücü kullanılarak (su, etanol, petrol eteri, siklo hekzan, aseton ve kloroform) elde ettikleri ekstraktların gıdalarda bozulmaya neden olan 10 patojen (*Alternaria solani*, *Helminthosporium solani*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) üzerindeki etkisini incelemiştir. Sonuç olarak 250 µg/mL petrol eterli ekstraktın, *E. coli*'nin petride büyümesini engellediğini, bakterilerden ise *S. aureus* ve küfler arasında *P. chrysogenum* 'un dört ekstrakta da (su, petrol eteri, siklo hekzan ve kloroform) duyarlı olduğunu, fakat *B. subtilis*'in petrol eteri ve aseton ekstraktı dışında kalan bütün

ekstraktlara karşı en fazla direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, stevia yaprakları dört farklı solvent (etil asetat, aseton, kloroform ve su) ile ekstrakte edilmiş ve bu ekstraktların *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila* ve *Vibrio cholerae*'ye karşı antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada kuru stevia yapraklarında bulunan steviol glikozitleri (SGs) sıcak su ile ekstrakte edilip proses parametrelerinin yanıt yüzey metodolojisi ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. Çalışmada yaprak su oranı (1:5-1:20), ısıtma süresi (10-120 dakika) ve sıcaklık (30-90°C) olarak belirlenmiştir. Çalışma sonucunda steviol glikozit ve renk açısından en iyi koşulun su sıcaklığının 78°C, ekstraksiyon süresinin 56 dakika ve yaprak su oranının 1:14 (g/ml) olduğu koşullarda sağlandığı tespit edilmiştir (Rai vd. 2012).

2.4. Stevia Ekstraktlarının Saflaştırılması ve Zenginleştirilmesi

Stevia bitkisinden elde edilen ekstraktlarının acı ve otsu kokusu ürünlerde direk olarak kullanımını engellemektedir. Stevianın ürün formülasyonlarında kullanılabilmesi için belirli işlemlerden geçmesi gerekmektedir. Bunlardan en önemlisi saflaştırma ve zenginleştirme işlemleridir. Saflaştırma ve zenginleştirme işlemlerinde yaygın olarak kullanılan yöntem membran filtrasyon yöntemidir.

Filtrasyon sistemi bir akışkan sistemde boyut farkına dayanarak iki veya daha fazla bileşenin ayrılması membran proses olarak tanımlanır (Girard ve Fukumoto 2000).

Membran filtrasyon teknikleri içinde en yaygın uygulama olan ultrafiltrasyon (UF) aynı zamanda saflaştırma, konsantre etme ve makro molekülleri veya çok küçük kolloidal süspansiyonları fraksiyonlarına ayırma yöntemi olarak da görülebilir. Genel olarak UF membranları moleküler büyüklüğü 20 kDa'dan büyük molekülleri tutma kabiliyetine sahiptirler. Nanofiltrasyon membranları (NF) ise 20 kDa'dan daha küçük molekülleri ters ozmos (RO) uygulaması sınırına kadar ayırabilmektedir. UF ve NF uygulamalarında 2-10 bar arasında basınç uygulanmaktadır. Genelde UF membran tarafından geçirilmeyen maddeler şekerleri, biyomolekülleri, polimerleri ve kolloidal partikülleri ihtiva ederler. Literatürde Stevia ekstraktının ultrafiltrasyon gibi membran ayırma teknikleriyle zenginleştirildiği az sayıda çalışma mevcuttur (Fuh ve Chiang 1990). yaptıkları çalışmada ultrafiltrasyon işleminde ayırma sınırları 25-100 kDa arasında değişen membranlardan yararlanarak steviositin zenginleştirilmesini sağlamışlardır. Ayrıca ters ozmos yöntemiyle konsantrasyon ve iyon değiştiricide daha ileri düzeyde saflaştırma yapılmıştır (Zhang vd. 2000).

Stevia ekstraktının tatlandırıcıya işlenmesinde 0,35 mikron seramik filtre kullanarak yapılan mikrofiltrasyonun ön işlem olarak kullanıldığı basamağı izleyen 2,5 kDa ayırma sınırında nanofiltrasyon işleminin uygulandığı bir zenginleştirme prosesi ortaya konmuştur. Başka bir çalışmada ise mikrofiltrasyon işleminin ön basamağı olarak ham ekstrakta modifiye edilmiş zeolit kullanılmıştır (Silva vd. 2007). Sonuç olarak permeatta yani üründe istenilen bileşen kompozisyonuna ulaşabilmek için membran karakteri ve proses parametrelerinin seçimi oldukça önem arz etmektedir. Literatürde membran filtrasyon teknikleriyle steviol glikozitlerin yüksek oranda saflaştırılmasını sağlayan tanımlanmış kesin bir metot mevcut değildir. Ancak çeşitli çalışmaların

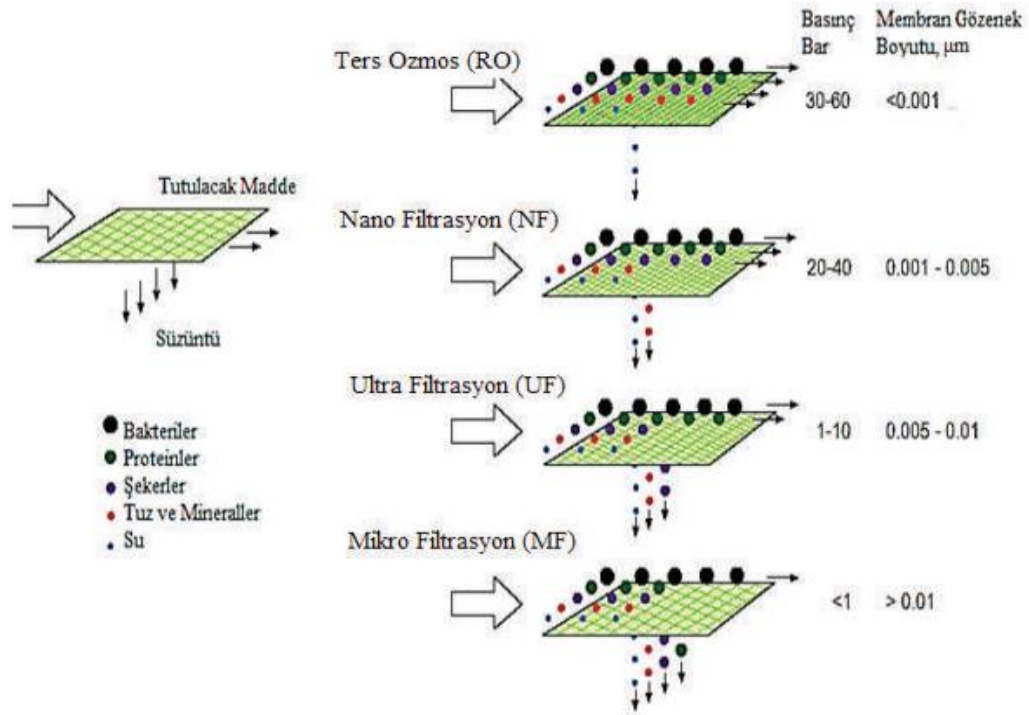
sonuçlarına göre kademeli bir membran prosesi ile steviol glikozitlerin fraksiyonlarına ayrılacağı anlaşılmaktadır.

Membran prosesler genelde saflaştırma, derişiklendirme ve fraksiyonlara ayırma gibi farklı özelliklere sahipken endüstride birçok kullanım alanı mevcuttur. Bir membran ayırma prosesinde membranlar giren maddeyi permeat ve retentat olarak adlandırılan iki akıma ayırır. Permeat ya da filtrat yarı geçirgen membrandan geçen akışkan kısımdır. Retentat ya da konsantrat akımı ise membrandan geçemeyen kısmı oluşturur. Membranın kalınlığının mikron seviyesinden birkaç milimetreye kadar değişebileceği belirtilmiştir (Dinçer vd. 2006).

Membran prosesler bileşenlerin moleköl ağırlıkları ve boyutlarına göre ayırım yapan sistemlerdir. Endüstride gelişmiş ve hala gelişmekte olan membran prosesler mevcuttur. Aralarında tam anlamıyla gelişimini tamamlamış ve endüstriyelleşmiş olan membran prosesleri mikrofiltrasyon, nanofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve ters ozmostur (Şekil 2.5). MF, UF ve NF'da ayırma şekli birbirine benzerdir ve moleküler eleme prensibine dayanır. RO membranlarda gözenek boyutu son derece küçük olduğundan ayırma mekanizması membranı oluşturan zincirlerin ısıl hareketine dayanmaktadır.

Stevia yapraklarının ekstraksiyon ve saflaştırma basamakları endüstriyel olarak uygulanmaktadır. Yüksek kalitede ürün veren, basit ve ekonomik yöntemler ile çalışmaların geliştirilmesi adına yöntemler de mevcuttur (Shi vd. 2002).

Günümüzde steviol glikozitlerin ekstraksiyonuyla ilgili farklı metotların geliştirildiği birçok patent de mevcuttur. Bu çalışmalar arasında ekstraktlara çelatlama ajanı ilave edilerek saflaştırma (Kumar 1986), kalsiyum oksit ile çöktürme ve iyon değiştiricilerle saflaştırma (Giovanetto 1990), metanol ekstraksiyonuyla safsızlıkları uzaklaştırma (Payzant vd. 1999) ve Ca-zeolit dolgulu kolonla saflaştırma (Mantovaneli vd. 2004) gibi uygulamalar yer almaktadır.



Şekil 2.5. Endüstride kullanılan membran prosesleri (Anonim 2018)

Reb A'nın saflaştırılması üzerine yapılan bir çalışmada 10, 20, 30 ve 50 kDa ayırma sınırına sahip membranlar kullanılmış ve en etkili membranın 30 kDa ayırma sınırına sahip membran olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda 30 kDa membrandan geçirilen ekstraktın permeat akısındaki reb A ve steviosit miktarlarının %44.43 ile %44.22 olduğu tespit edilmiş ve bu akıdan elde edilen sonuçların en yüksek sonuçlar olduğu bildirilmiştir (Das vd.2015).

Stevia bitkisinin yapısında bulunan steviol glikozitlerin saflaştırılması için yapılan diğer bir çalışmada saflaştırma amacıyla özel olarak tasarlanmış polietersülfon (PESU) membranları NF, UF ve MF uygulanarak stevia ekstraktlarının safsızlıklarının uzaklaştırılmasında kullanılmış ve %37 saflık ve %30 verim elde edildiği belirtilmiştir (Vanneste vd. 2011).

Yaygın olan birçok proste organik çözücüler kullanılarak stevia yapraklarından glikozit bazlı bileşiklerin ekstraksiyonu ve rafine edilmesi pek çok işlemi de beraberinde getirmektedir. Bu amaçla yapılan başka bir çalışmada hem işlem proseslerinin miktarını hem de ürüne kullanılan kimyasalların miktarlarını azaltmak adına membran proses basamakları uygulanmıştır (Zhang vd. 2000).

Bu çalışma kapsamında etil alkol ve su olmak üzere iki kontrol grubu kullanılıp , ekstraksiyon, santrifüj, durultma ve kademeli membran filtrasyon işlemleri yapılp elde edilen ara ürünler ve son üründe tanımlayıcı analiz, steviol glikozit kompozisyonu tayini, antioksidan kapasitesi tayini ve fenolik madde dağılımı için gerekli analizler yapılp, çalışmanın amacı olan fonksiyonel bileşiklerin miktarlarının ve varlığının devamlılığının tespiti yapılmıştı

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Projede hammadde olarak Akdeniz Üniversitesi Yerleşkesinde bulunan Tarla Bitkileri Bölümü deneme alanındaki LEVENT93 kodlu stevia bitkisi çeşidi kullanılmıştır. Materyal Eylül 2019 da elle hasat edilip yaprakları dallarından ayrıldıktan sonra 70°C sıcaklıkta etüvde kurutulmuş; kurutma işlemine su oranı %5 oluncaya kadar devam edilmiştir. Kurutulmuş yapraklar hali hazırda oda sıcaklığında kapalı dolaplarda öğütme işlemine kadar muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1 Kurutulmuş stevia yaprakları

Bitkilerin yetiştiği arazi Akdeniz kırmızı toprak özelliğini taşımakta olup killi-tınlı yapıya sahiptir. Hafif alkali, kireçli ve organik maddesi düşüktür. Denemede kullanılan parsellerdeki bitki sıklığı 60 cm x 40 cm olup yaz dönemindeki sulama damlama sulama yöntemi ile yapılmıştır. Damlama sulama ile 10 kg/da N ile 5 kg/da P₂O₅ ve K₂O olacak şekilde gübreleme yapılmıştır. Yetiştirme döneminde yabancı ot mücadelesi çapa ile yapılmıştır ve herhangi bir kimyasal kullanılmamıştır. Bitkiler çiçeklenme başlangıcında (Eylül ayı ilk haftası) toprak yüzeyinden yaklaşık 10 cm yüksekte elle hasat edildikten sonra yaprakları ayrılarak kurutma ortamına alınmış ve kurutma 40°C’de kurutma dolabında yapılmıştır. Bitkilerin tüm yaprakları alınarak karıştırılmış ve materyal olarak saklanmıştır (Kurunç vd.2020).

3.2. Metot

3.2.1. Stevia yapraklarının su ve etil alkol ile ekstraksiyonu

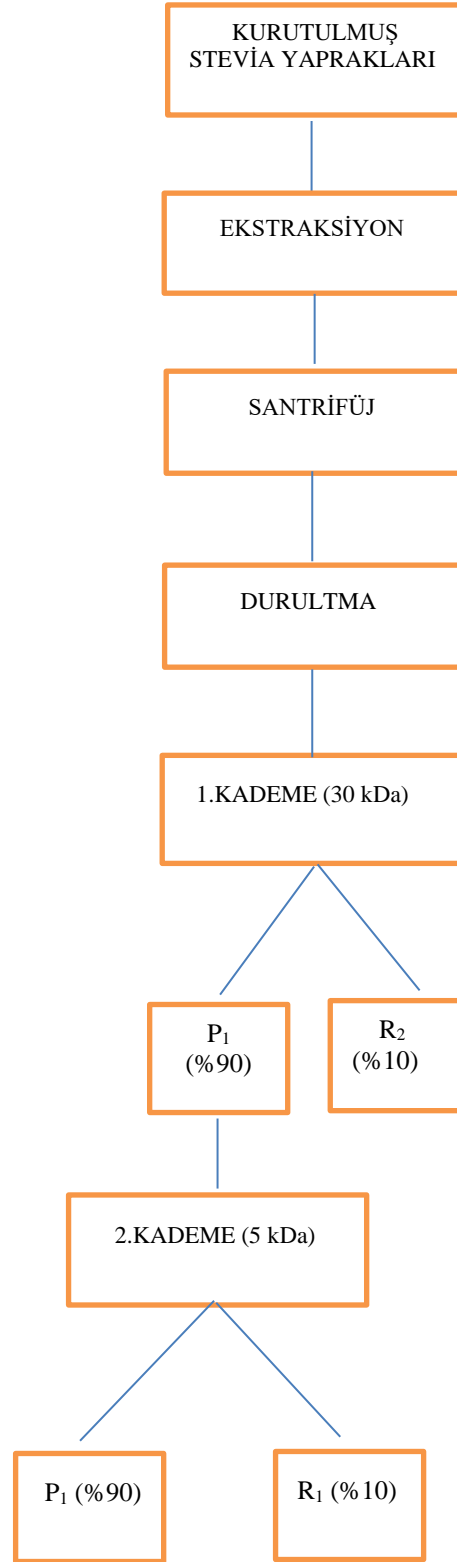
Bu araştırmada "Kademeli membran filtrasyon uygulamalarının stevia ekstraktlarının saflaştırılmasında kullanılması" adlı projenin (TÜBİTAK 1002, Proje ID: 462420) ara çıktısı yöntem olarak kullanılmıştır. Kuru stevia yaprakları yabancı maddelerden ayıklanarak laboratuvar tipi öğütücü (Waring, ABD) yardımı ile parçalanmıştır. Öğütülmüş kuru stevia yaprakları ekstraksiyon işlemi için 1:15 öğütülmüş yaprak:su oranında karıştırılarak malaksörde 20 C’de 30 dakika boyunca karıştırılmış daha sonra 2900xg kuvvetinde 20°C’de 15 dakika boyunca santrifüj edilerek kaba filtre kağıdından geçirilmiştir



Şekil 3.2. Öğütülmüş kuru stevia yaprakları

Ham stevia ekstraktlarına katı partiküller ve fenolik maddeler gibi makro moleküllerden oluşan safsızlıkların giderilmesi için jelatin ve bentonit gibi durultma yardımcı maddeleri kullanılarak 50°C deki su banyosunda sıcak durultma uygulanmıştır. Berraklaştırma aşamasında durultma enzimi ve durultma yardımcılarının dozajı ön demelerle saptanmış ve bu amaçla bentonit (%5), jelatin (%1) ve kizelzol (%3) durultma yardımcı maddelerinin stok çözeltilerinin her birinden belirlenen konsantrasyonda alınarak 40 ml ekstrakt üzerine ilave edilerek ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Sıcak durultma aşamasında su banyosunda (Jeio Tech, BS-06/31, Seoul, Korea) 50 °C’de tutulan stevia ekstraktına durultma yardımcı maddeleri ilave edilip bu sıcaklıkta 3 saat bekletildikten sonra durultma sonlandırılmıştır. Durultma sonunda oluşan tortu alınmadan üst kısımdaki berrak ekstrakt kaba filtreden süzülerek ayrılmıştır (Kulcan vd.2020).

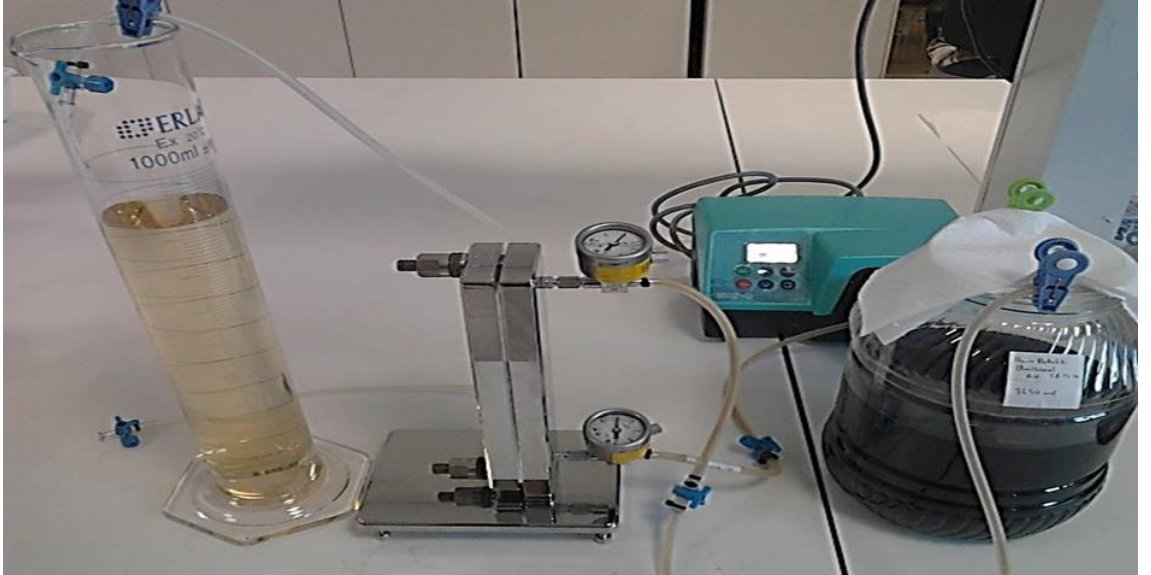
Elde edilen berrak sıvı kısma polietersülfon, (PESU) membran kullanılarak 30 kDa ayırma sınırında ultrafiltrasyon uygulanmıştır(Şekil 3.4). İşlem sonunda %90’lık permeat akısı ayrılmış (P₁) ve permeat akısına hydrosart, (HYDRO)membran kullanılarak 5 KDa ayırma sınırında nanofiltrasyon uygulanmıştır(Şekil 3.5). Nanofiltrasyonda elde edilen retentat akısı ana ürün olarak değerlendirilmiştir. Nanofiltrasyon ile elde edilen retentat akısının çeşitli şekerli ürünlerin formülasyonunda kullanılabilir nitelikte olduğu belirlenmiştir. Bahsi geçen proses su ve etil alkol olmak üzere iki farklı çözücü ile ve en az üç tekerrür halinde gerçekleştirilmiştir. UF ve NF sonrası retentat ve permeat akısında analizler ayrı ayrı yapıp stevia ekstraksiyonunda yaygın olan etil alkol kontrol grubunun üretiminde çözücü olarak kullanılmıştır. Kontrol grubunun etil alkol olduğu örneklerin alkolü, filtrasyon işlemi sonucunda evaporatör yardımıyla uçurulup, aynı miktarda su eklenerek analizleri yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.3. Stevia ekstraktlarına uygulanan işlemler



Şekil 3.4. Ekstraktların 30 kDa ayırma sınırına sahip membran ile mikrofiltrasyonu



Şekil 3.5. Ekstraktların 5 kDa ayırma sınırına sahip membranlar ile nanofiltrasyonu



Şekil 3.6. Etil alkollü ekstraktlarda ki alkolün evaporatör ile uzaklaştırılması

3.2.2. Analiz yöntemleri

3.2.2.1 Suda çözünür kuru madde tayini

Sulu ve alkollü stevia ekstraktlarına yapılan işlemler sonrasında kuru madde tayini dijital refraktometre (Isolab, Almanya) kullanılarak tespit edilmiştir (Cemeroğlu 2007).

3.2.2.2. pH tayini

Tüm ürünlerin pH tayini 20°C de 10 mL'lik örneklere pH metrenin (FE20-Five, Mettler-Toled, Ohio, ABD) cam elektrotunun daldırılmasıyla yapılmıştır.

3.2.2.3. Toplam asitlik tayini

Tüm ürünlerin toplam asitlik tayini ölçülürken 10 mL örnek alınıp, pH 8,1 değerine gelinceye kadar 0,1 N NaOH (Merck, Almanya) ile titre edilerek toplam asitlik tayini yapılmıştır. Toplam asitlik, susuz sitrik asit cinsinden aşağıda verilen formül baz alınarak hesaplanmıştır (Cemeroğlu 2007).

$$\text{Titrasyon Asitliği (\%)} = (V * F * 100 / M) * E$$

V: Harcanan 0,1 N NaOH miktarı (mL)

F: 1

E: 1 Ml 0,1 N NaOH'in susuz sitrik asit cinsinden eşdeğer asit miktarı

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı (mL)

3.2.2.4. Renk analizi

Tüm örneklerin renk değerlerinin ölçümünde UltraScan-VIS (Hunterlab) renk ölçüm cihazı kullanılarak, sonuçlar L, a, b değerleri olarak ifade edilmiştir.

3.2.2.5. Antioksidan kapasitesinin belirlenmesi

Ekstraktların antioksidan aktivitesi Shahidi vd. (2006)'ne göre belirlenmiştir. Bu amaçla 1,9 mL 6×10^{-5} M DPPH çözeltisine (saf metanol ile hazırlanmış) 100 uL ekstrakt eklenerek karışım çalkalandıktan sonra karanlık odada oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda örneklerin absorbans değeri kontrol olarak metanol kullanılarak spektrofotometrede 515 nm'de ölçülüp standart Trolox (6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) kurvesi kullanılarak miktar tayini yapılmıştır.

3.2.2.6. Fenolik madde dağılımının belirlenmesi

Fenolik bileşen analizi Roupael et al. (2016) tarafından belirtilen yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 0,5 g örnek 15 ml 10 mM formik asit içeren %75'lik metanol (LC-MS saflıkta) çözeltisi ile buz banyosunda 3 dakika ultraturaks yardımıyla ekstrakte edilmiş ve daha sonra 15 ml aynı çözelti ile tekrar aynı ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Ekstraktlar daha sonra 4000 d/d hızda santrifüj edilerek ve supernatant kısmı 0,2 mikron selüloz şırınga ucu filtreden geçirilip LC-MS/MS (Thermo Scientific, TSQ serisi) cihazına enjekte edilmiştir. Örneklerin LC-MS/MS cihazında enjeksiyonunda Thermo Hpyersil Gold, 50 x 2.1 mm, 1.9 um C18 kolon kullanılmış olup kromatografik ayırmada 4 mM amonyum format ve %0,1 formik asit içeren su (A) ve 4 mM amonyum format ve %0,1 formik asit içeren methanol çözeltileri (B) hareketli faz olarak kullanılmıştır.

3.2.2.7. Steviol glikozit kompozisyonunun belirlenmesi

Materyal olarak kullanılan stevia yapraklarında başlangıçta ve ekstraktlardan alınan örneklerde steviosit ve rebaudiosit A miktarları HPLC ile harici standart metodu kullanılarak belirlenmiştir (Anonim 2012). Analizde Shimadzu marka HPLC cihazı (LC 20 AD) C18 kolon (5 µm, 250 x 4.6 mm, ID) ve photodiode array (PDA) dedektör sistemi (210 nm) ile birlikte kullanılmıştır. Hareketli faz olarak fosfat tamponu (10 mmol/L sodyum fosfat, pH 2.6) ve asetonitril (HPLC saflığında, Merck) karışımı (68:32) kullanılıp hareketli faz akış hızı 0.8 ml/dk olarak ayarlanmıştır. Örnekler 0,45 µm'lik filtreden süzöldükten sonra enjekte edilmiştir.

3.2.2.8. İstatistiksel analizler

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 25.0) istatistik programı kullanılmıştır. Verilere öncelikle normal dağılım testi uygulanmış; bu test neticesinde ulaşılan sonuca göre Bağımsız Örneklem T testi ve Mann-Whitney U testinden yararlanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Bx, pH ve Titrasyon Asitliği Üzerine Etkisi

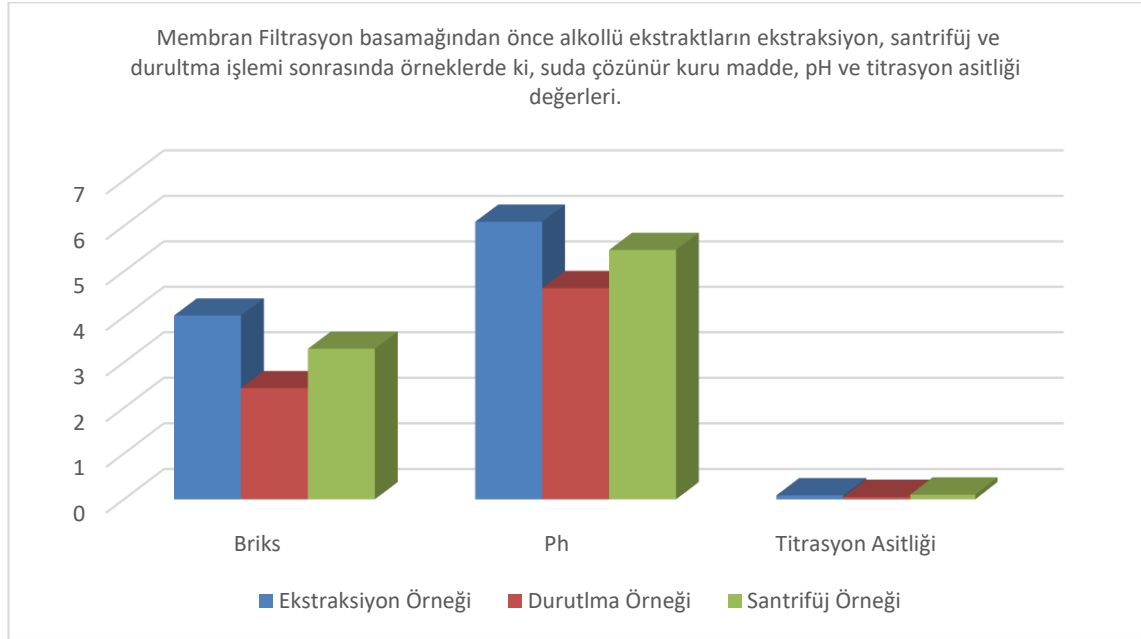
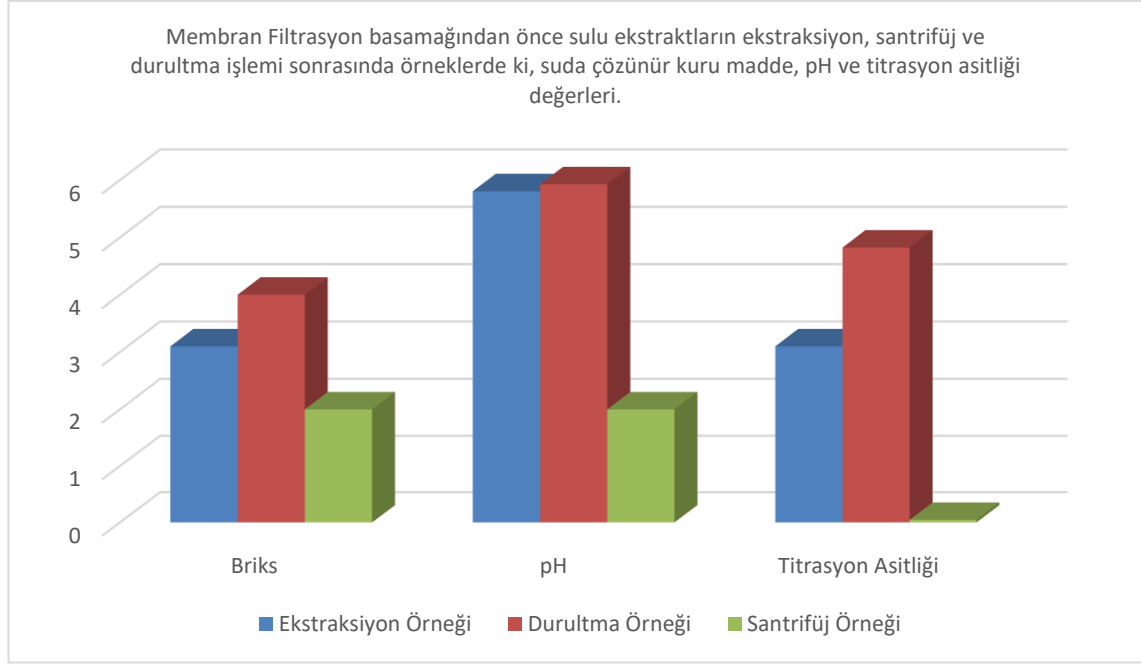
Sulu ve etil alkollü stevia ekstraktlarının membran filtrasyonun her kademesinde 3 paralel şekilde suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri ölçülmüş ve analiz sonuçları çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri

Stevia Ekstraktı	Bx° (%)	pH	Titrasyon Asitliği
Ekstraksiyon Örneği (S)	3.10 ^a ± 0.000	5.806 ^a ± 0.003	0.100 ^a ± 0.002
Ekstraksiyon Örneği (A)	4.03 ^b ± 0.070	6.093 ^b ± 0.018	0.088 ^b ± 0.002
Santrifüj Örneği (S)	3.100 ^a ± 0.000	4.823 ^a ± 0.015	0.047 ^a ± 0.002
Santrifüj Örneği (A)	3.300 ^b ± 0.000	5.473 ^b ± 0.037	0.102 ^b ± 0.004
Durultma Örneği (S)	4.000 ^a ± 0.058	5.927 ^a ± 0.003	0.092 ^a ± 0.002
Durultma Örneği (A)	2.433 ^b ± 0.088	4.633 ^b ± 0.007	0.052 ^b ± 0.000

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 incelendiğinde sulu örneklerin işlemler sonrasında suda çözünür kuru madde içeriği artarken alkollü örneklerin suda çözünür kuru madde içeriğinin azaldığı; pH ve titrasyon değerlerinin sulu örnekler de santrifüj işleminden sonra azalıp tekrar yükseldiği, alkollü örneklerde ise her işlem basamağından sonra azalma olduğu tespit edilmiştir. Membran filtrasyon basamağından önce yapılan işlemlerdeki örneklerin suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliğine bakıldığında sulu ve alkollü ekstraktlar arasında istatistiksel açıdan fark olduğu görülmektedir. Santrifüj ve durultma uygulamaları ekstraktların tanımlayıcı özelliklerini etkilemiştir.



Şekil 4.1. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasındaki örneklerin suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri

4.2. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Renk Değerleri Üzerine Etkisi

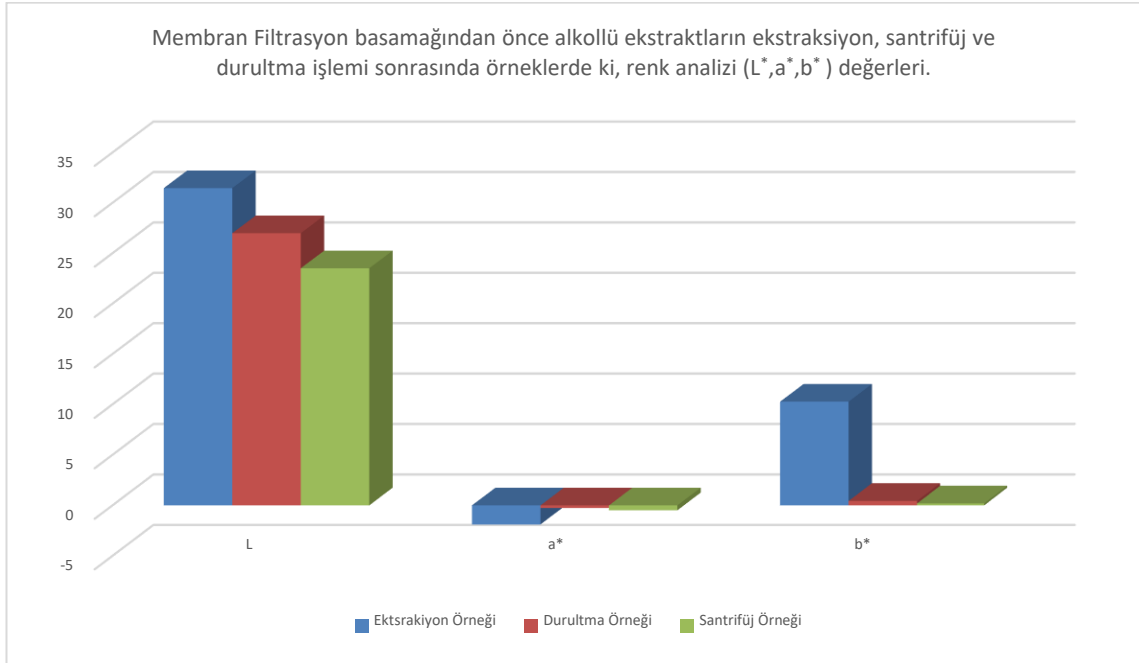
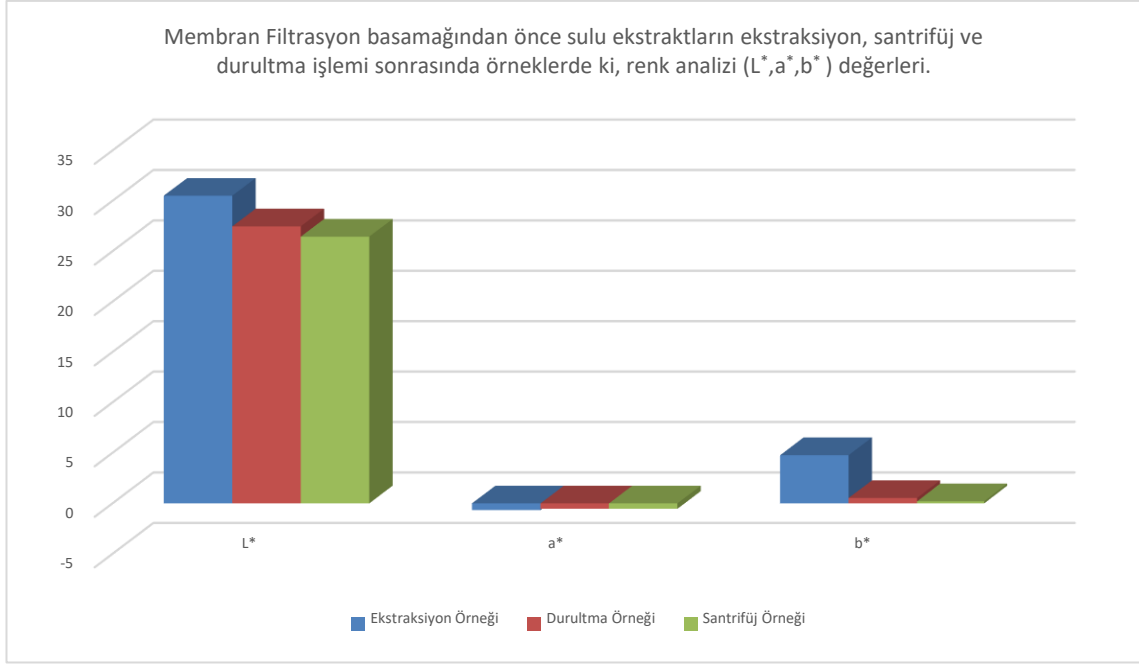
Sulu ve alkollü stevia ekstraktlarının yapılan işlemlerin her kademesinde, renk değerleri (L^* , a^* , b^*) değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, renk değerleri

Stevia Ekstraktı	L^*	a^*	b^*
Ekstraksiyon Örneği (S)	30.513 ^a ± 0.030	-0.663 ^a ± 0.057	4.773 ^a ± 0.586
Ekstraksiyon Örneği (A)	31.460 ^b ± 0.663	-1.887 ^b ± 0.697	10.277 ^b ± 0.343
Santrifüj Örneği (S)	26.450 ^a ± 0.020	-0.533 ^a ± 0.026	0.207 ^a ± 0.017
Santrifüj Örneği (A)	23.510 ^b ± 0.171	-0.480 ^a ± 0.065	0.193 ^a ± 0.050
Durultma Örneği (S)	27.473 ^a ± 0.128	-0.530 ^a ± -0.012	0.534 ^a ± 0.023
Durultma Örneği (A)	2.990 ^b ± 0.038	-0.253 ^a ± 0.506	0.447 ^a ± 0.007

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin $p < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

L değeri parlaklığı, a değeri kırmızılık ve yeşilliği, b değeri ise sarılık ve maviliği belirtmektedir. Bu değerler 0 ile 100 arasında değişkenlik göstermektedir. Bu durumda a değerindeki artışı kırmızılığın artışı gösterirken, azalması yeşilliğin arttığını gösterir. Diğer durumda b değerinin artması sarılığın, azalması ise maviliğin arttığını belirtir. Analiz sonuçlarına bakıldığında alkollü örneklerin L değerinin sulu ekstraktlara göre daha yüksek, aynı zamanda a değerlerinin daha düşük olmasından kaynaklı yeşilliğin hakim olduğu görülmektedir (Şekil 4.2). Santrifüj işlemi sonrasında alkollü örneklerde b değeri düşüktür. Tablodaki değerlere göre durultma örnekleri ile santrifüj örneklerinin a ve b değerleri hariç diğer sulu ve alkollü stevia ekstraktlarında L^* , a^* , b^* değerleri arasında istatistiksel açıdan fark olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasındaki örneklerin renk analizi (L^* , a^* , b^*) değerleri

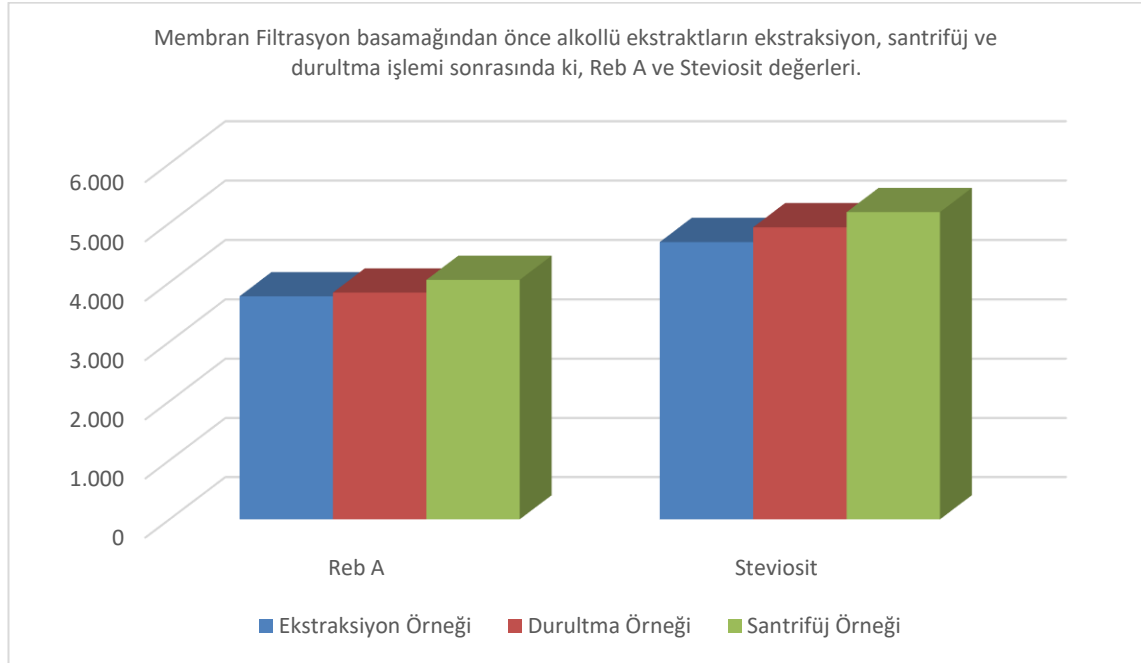
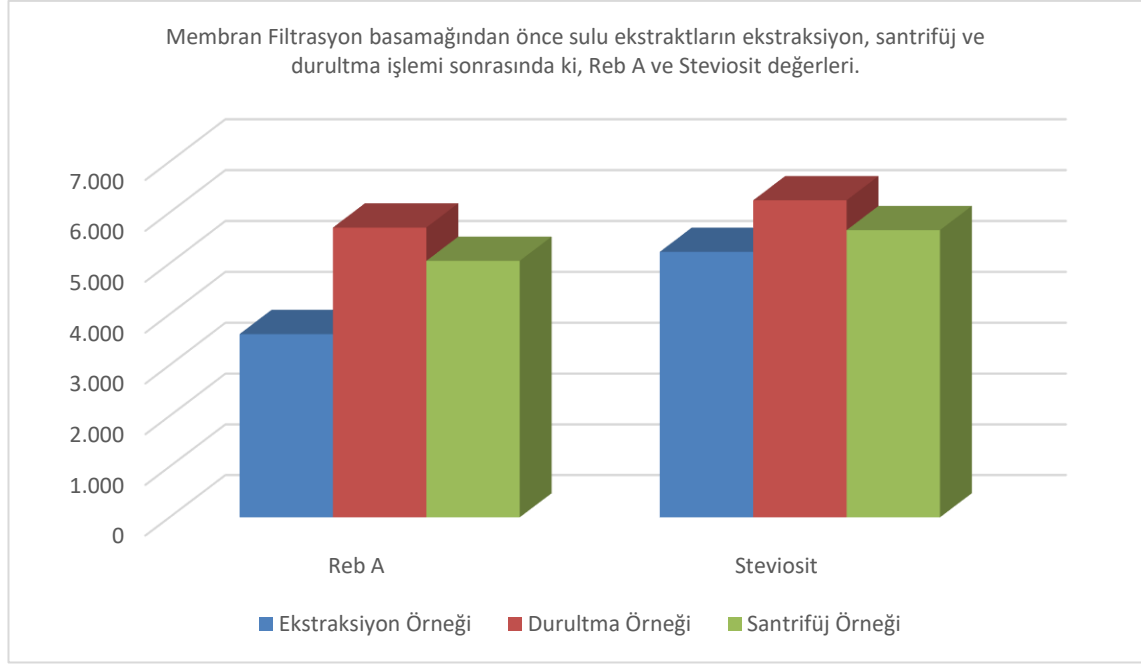
4.3. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Reb A ve Steviosit Miktarları Üzerine Etkisi

Çizelge 4.3. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki, Reb A ve Steviosit değerleri (mg/L)

Stevia Ekstraktı	Reb A	Steviosit
Ekstraksiyon Örneği (S)	3611.491 ^a ± 177.527	5227.173 ^a ± 188.820
Ekstraksiyon Örneği (A)	3765.648 ^b ± 56.037	4679.570 ^b ± 17.134
Santrifüj Örneği (S)	5050.503 ^a ± 33.158	5654.203 ^a ± 31.103
Santrifüj Örneği (A)	4041.919 ^b ± 18.950	5183.059 ^b ± 44.707
Durultma Örneği (S)	5704.930 ^a ± 124.243	6240.288 ^a ± 125.530
Durultma Örneği (A)	3828.010 ^a ± 12.010	4928.262 ^b ± 12.288

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Sulu stevia ekstraktlarında reb A ve steviosit miktarlarında işlem basamaklarından sonra artış; alkollü örneklerde ise durultma işlemi sonrasında azalma görülmüş (Şekil 4.3) ve her iki kontrol grubunda da reb A için durultma işlemi sonrası hariç steviosit ve reb A miktarları için istatistiksel açıdan fark olduğu tespit edilmiştir. Santrifüj ve durultma işlemleri sırasında ekstraktların saflaşma düzeyi reb A ve steviosit miktarlarındaki oransal artışın nedeni olarak düşünülmüştür.



Şekil 4.3. Her iki kontrol grubu için ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasındaki örneklerin steviosit ve reb A değerleri

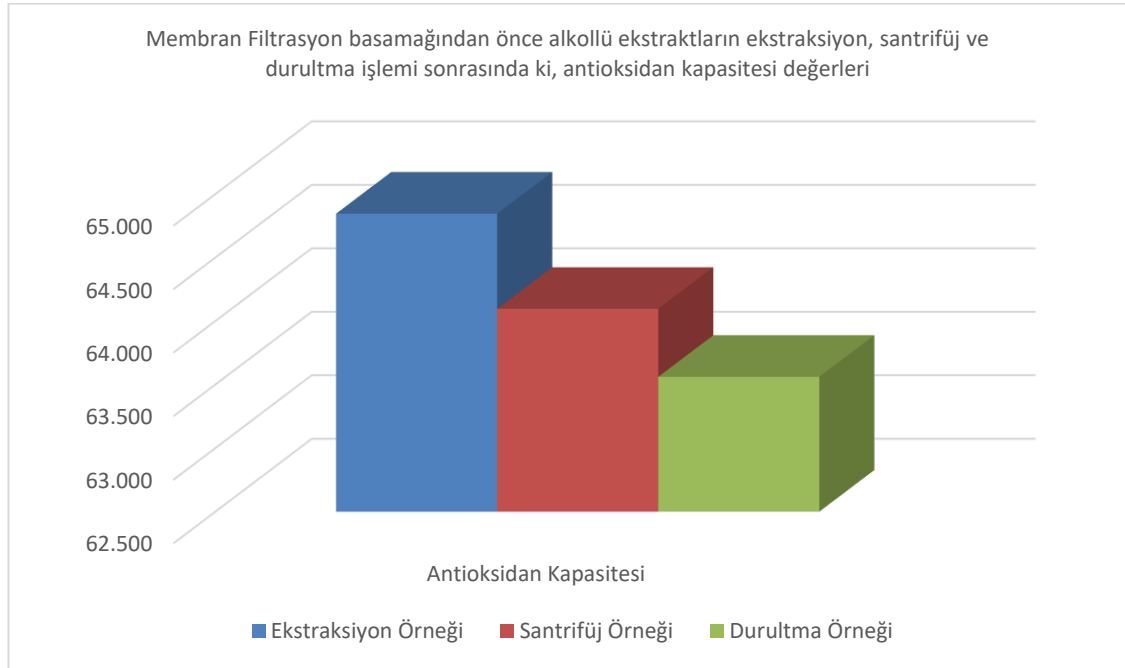
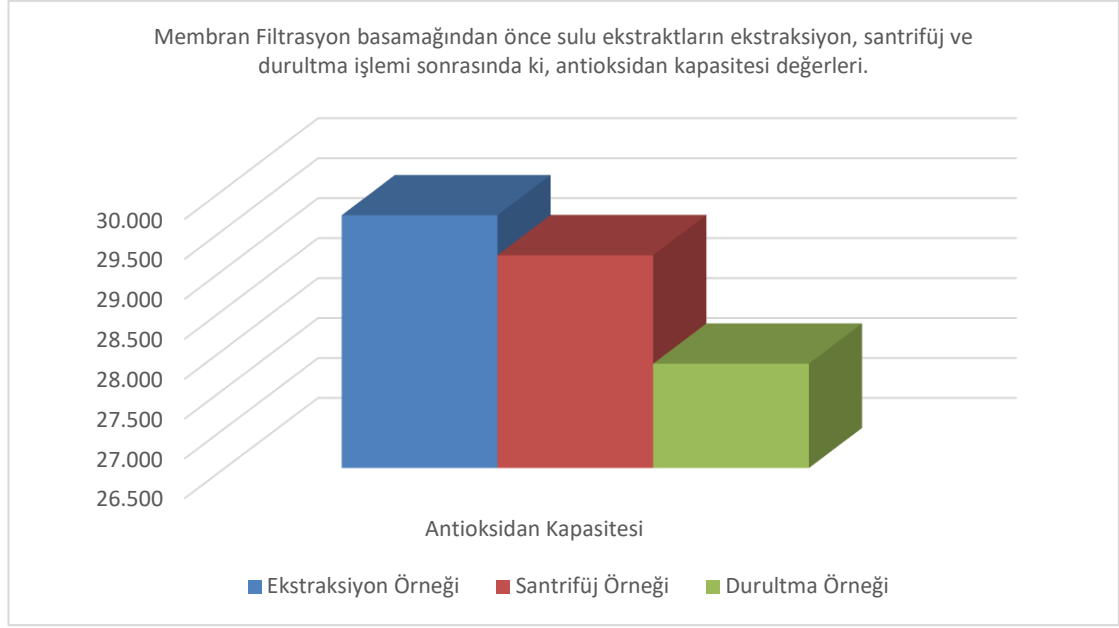
4.4. Ekstraksiyon, Santrifüj ve Durultma İşleminin Antioksidan Kapasite Değerleri Üzerine Etkisi

Çizelge 4.4. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki antioksidan kapasite değerleri

Stevia Ekstraktı	Antioksidan Kapasitesi (mg/100 g trolox eşdeğeri)
Ekstraksiyon Örneği (S)	29667.857 ^a ± 163.663
Ekstraksiyon Örneği (A)	64846.427 ^b ± 38.814
Santrifüj Örneği (S)	29167,857 ^a ± 27.263
Santrifüj Örneği (A)	64096.428 ^b ± 35.714
Durultma Örneği (S)	27810,915 ^a ± 128,769
Durultma Örneği (A)	63560.680 ^b ± 33.246

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin $p < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.

Stevia yaprak ekstraktlarının kullanılan çözücü tipine bağlı olarak antioksidan kapasitesi belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Ekstraktların antioksidan kapasitesini büyük ölçüde fenolik bileşikler belirlemektedir. Dolayısıyla, etil alkolle gerçekleştirilen ekstraksiyonda fenolik bileşik konsantrasyonunun daha yüksek olması bu örneklerde antioksidan kapasitesinin de yüksek olmasına neden olmuştur. Sulu ve etil alkollü ekstraktlar arasında antioksidan kapasite açısından istatistiksel olarak farklılık tespit edilmiştir ve işlem basamakları arttıkça her iki kontrol grubunun da antioksidan kapasitesi başlangıç örneklerine göre azalma göstermiştir (Şekil 4.4).



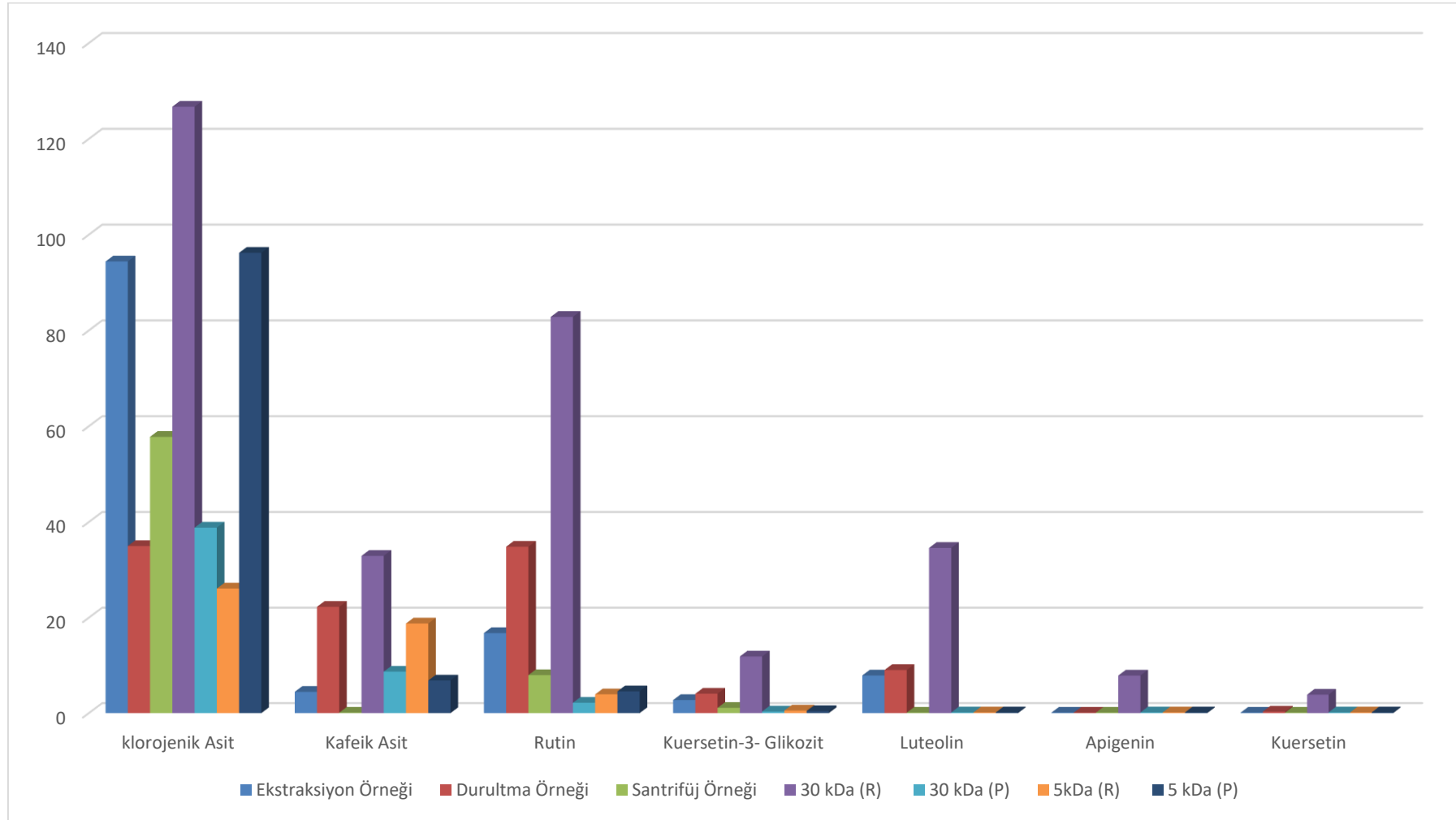
Şekil 4.4. Ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında sulu (S) ve etil alkollü (A) örneklerdeki antioksidan kapasite değerleri (mg/100 g trolox eşdeğeri)

4.5. Sulu ve etil alkollü ekstraktların tüm işlem basamaklarından sonra fenolik bileşik değerlerinin karşılaştırılması

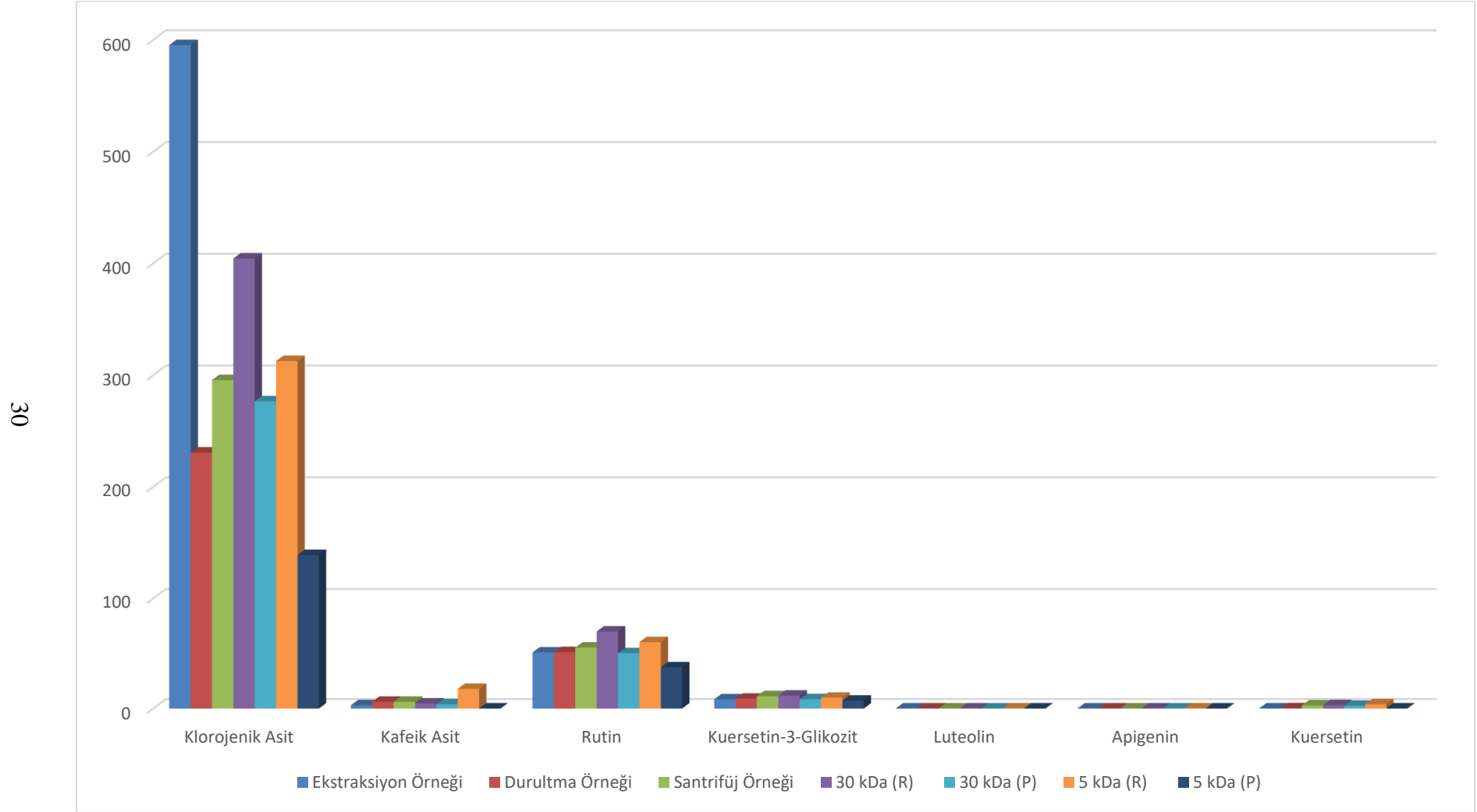
Çizelge 4.5. Membran Filtrasyon basamağından önce ekstraksiyon, santrifüj ve durultma işlemi sonrasında örneklerdeki klorojenik asit, kafeik asit, Rutin, Kuersetin-3-glikozit, Luteolin, Apigenin ve Kuersetin değerleri (mg/kg)

Stevia Ekstraktı	Klorojenik Asit	Kafeik Asit	Rutin	Kuersetin-3-glikozit	Luteolin	Apigenin	Kuersetin
Ekstraksiyon Örneği (S)	94.396 ^a ± 28.308	4.461 ^a ± 4.593	16.770 ^a ± 2.603	2.738 ^a ± 0.327	7.889 ± 2.093	-	-
Ekstraksiyon Örneği (A)	595.350 ^b ± 8.061	3.009 ^a ± 0.980	50.951 ^b ± 1.211	8.400 ^b ± 0.108	-	-	-
Durultma Örneği (S)	34.987 ^a ± 0.904	22.278 ^a ± 0.010	34.841 ^a ± 0.631	4.072 ^a ± 0.135	9.024 ± 0.214	-	0.318 ^a ± 0.903
Durultma Örneği (A)	230.763 ^b ± 14.852	6.173 ^b ± 0.459	51.290 ^b ± 0.606	9.008 ^b ± 0.748	-	-	0.270 ^a ± 0.759
Santrifüj Örneği (S)	57.789 ^a ± 4.551	-	7.960 ^a ± 369	3.965 ^b ± 0.090	1.099 ^a ± 0.122	-	-
Santrifüj Örneği (A)	295.601 ^b ± 2.840	6.173 ± 0.458	55.378 ^b ± 1.443	11.246 ^b ± 0.200	-	-	2.895 ± 0.307
30 kDa (R) ^S	126.720 ^a ± 40.227	32.934 ^a ± 12.380	82.830 ^a ± 40.316	11.870 ^a ± 5.906	34.591 ± 4.593	7.870 ± 0.779	3.860 ^a ± 3.048
30 kDa (R) ^A	404.393 ^b ± 2.466	4.655 ^b ± 1.551	70.028 ^b ± 3.691	11.756 ^b ± 0.289	-	-	3.141 ^a ± 1.193
30 kDa (P) ^S	38.828 ^a ± 10.271	8.695 ^a ± 8.913	2.167 ^a ± 0.25	0.330 ^a ± 0.162	-	-	-
30 kDa (P) ^A	276.585 ^b ± 76.369	3.965 ^b ± 3.135	50.302 ^b ± 18.37	8.534 ^b ± 2.832	-	-	2.522 ± 1.677
5 kDa (R) ^S	26.107 ^a ± 8.699	18.779 ^a ± 5.243	3.937 ^a ± 1.276	0.545 ^a ± 0.102	-	-	-
5 kDa (R) ^A	312.618 ^b ± 71.880	17.923 ^a ± 22.048	60.300 ^b ± 3.110	9.839 ^b ± 1.953	-	-	3.859 ± 0.567
5 kDa (P) ^S	96.207 ^a ± 36.784	6.834 ± 10.432	4.567 ^a ± 1.46	0.420 ^a ± 0.128	-	-	-
5 kDa (P) ^A	139.027 ^b ± 3.614	-	37.451 ^b ± 2.587	7.159 ^b ± 0.611	-	-	0.505 ± 0.352

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir



Şekil 4.5. Tüm işlem basamakları sonrasında sulu ekstraktlardaki klorojenik asit, kafeik asit, Rutin, Kuersetin-3-glikozit, Luteolin, Apigenin ve Kuersetin değerleri (mg/kg).



Şekil 4.6. Tüm işlem basamakları sonrasında alkollü ekstraktlarda ki klorojenik asit, kafeik asit, Rutin, Kuersetin-3-glikozit, Luteolin, Apigenin ve Kuersetin değerleri (mg/kg)

Fenolik bileşiklerin dağılımı incelendiğinde (Çizelge 4.5) sulu ve etil alkollü grupların kontrol örneklerinde kafeik asit miktarı, durultma örneklerinde ise kuersetin miktarı açısından istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir. Diğer örnek gruplarında ise istatistiksel açıdan farklılık tespit edilmiştir ($p<0,05$). Tabloda miktarları verilmeyen örnekler raporlama limitinin (0,2 mg/kg) altında kaldığı için miktarları tespit edilememiştir.

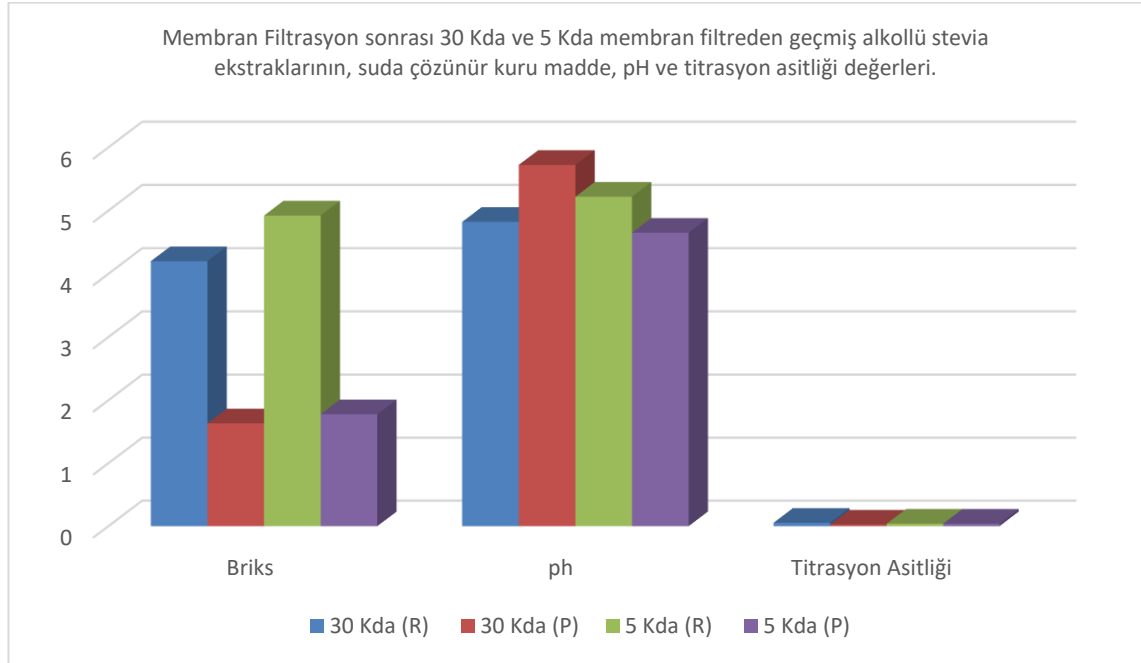
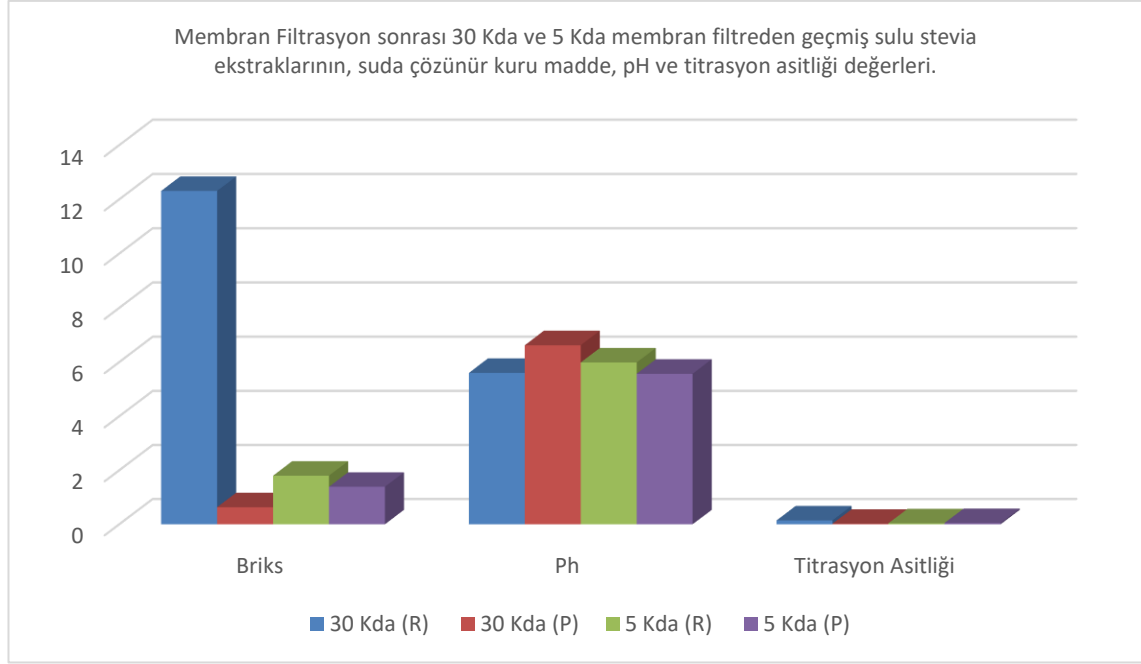
Stevia yapraklarının ekstraksiyonunda steviol glikozitler dışında kalan bileşenler safsızlık olarak kabul edildiği için ticari ürünlerde fenolik maddeler gibi bazı fonksiyonel bileşiklerin varlığı üzerine yeterli çalışma yapılmamıştır. Sytar vd. (2015) farklı stevia tiplerinde fenolik bileşiklerin yarısından fazlasını kuersetinin oluşturduğunu bildirmiştir. Kuersetin dışında p-kumarik asit ve kateşin bulunduğunu da belirtmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sulu ve etil alkollü ekstraktların fenolik bileşik dağılımları arasındaki önemli farklar (Çizelge 4.5) her iki çözgenin fenolik bileşikler üzerindeki çözücü gücünün farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Nitekim, insan sağlığı üzerine en fazla olumlu etki yapan kuersetin etil alkolde kolay çözünürken sulu çözeltilerde sınırlı çözünürlüğe sahiptir. Buna rağmen sulu stevia örneklerine uygulanan zenginleştirme aşamalarında önemli düzeyde kuersetinin glikozidik formu olan kuersetin-3-glikozit belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bu bileşiğin anti karsinojenik özellik göstermesi (Baghel vd. 2016; Rauf vd. 2018; Farias ve Pozo 2019) sulu ve etil alkollü stevia ekstraktları açısından safsızlık olarak değerlendirilmeyip olumlu bir özellik olarak kabul edilmesi yanlış olmayacaktır. Diyet yoluyla alınan flavonoid bileşikler içinde kuersetin varlığının yüksek olması ile maruz kalınan kanser olgusu sıklığı arasında negatif bir ilişki olduğu kanıtlanmıştır (Knekt vd. 1997; Hertog vd 1995; Knekt vd. 2002; Lin vd. 2006). Kuersetinin antioksidan etkilerinin beyin ve kalp dokularındaki oksidatif hasarı azalttığı da (Doğan vd. 2015; Bayne vd. 2002) tespit edilmiştir. Bunun dışında, kandaki kuersetin miktarının artmasıyla total ve LDL-kolesterol seviyesinde azalma olduğu da saptanmıştır. Stevia ekstraktlarına ileri saflaştırma prosesleri uygulamak yerine basit fiziksel ayırma tekniklerinin uygulanmasıyla zenginleştirilmiş ekstraktların hem tatlandırıcı özelliğinden hem de insan sağlığına olumlu etkilerinden faydalanmak mümkün görünmektedir.

4.6. Membran Filtrasyon İşleminin Suda Çözünür Kuru Madde (Bx), pH ve Titrasyon Asitliği Üzerine Etkisi

Çizelge 4.6. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akılarının, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri

Stevia Ekstraktı	Bx°	pH	Titrasyon Asitliği
Ekstraksiyon Örneği (S)	3.10 ^a ± 0,000	5.806 ^a ± 0,003	0.100 ^a ± 0,002
Ekstraksiyon Örneği (A)	4.03 ^b ± 0,070	6.093 ^b ± 0,018	0.088 ^b ± 0,002
30 kDa (R) ^S	12.311 ^a ± 1.389	5.601 ^a ± 0.192	0.144 ^a ± 0.027
30 kDa (R) ^A	4.200 ^b ± 0.292	4.822 ^b ± 0,064	0.054 ^b ± 0,003
30 kDa (P) ^S	0.633 ^a ± 0,100	6.622 ^a ± 0,0637	0.021 ^a ± 0.007
30 kDa (P) ^A	1.633 ^b ± 0,087	5.723 ^b ± 0,071	0.026 ^a ± 0.013
5 kDa (R) ^S	1.800 ^a ± 0.620	5.986 ^a ± 0,269	0.038 ^a ± 0.016
5 kDa (R) ^A	4.922 ^b ± 0.826	5.220 ^b ± 0,226	0.041 ^a ± 0.006
5 kDa (P) ^S	1.389 ^a ± 0.520	5.569 ^a ± 0,398	0.045 ^a ± 0.009
5 kD (P) ^A	1.778 ^a ± 0.120	4.650 ^b ± 0.347	0.041 ^a ± 0.010

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.6. Her iki kontrol grubu için 30 Kda ve 5 Kda permeat ile retentat akıların, suda çözünür kuru madde, pH ve titrasyon asitliği değerleri

Membran filtrasyon uygulamaları etil alkollü ve sulu stevia ekstraktlarının suda çözünür kuru madde, pH değeri ve titrasyon asitliğini istatistiksel açıdan önemli düzeyde ($p < 0,05$) değiştirmiştir. Bu çalışmada her iki çözgen arasında pH ve çözünür kuru madde açısından farklılık tespit edilmiş olsada tabloya göre iki grup arasında titrasyon asitliği açısından 30 kDa'dan geçmiş akıllar dışında farklılık görülmemiştir (Çizelge 4.6). Yapılan kademeli filtrasyon işlemlerinden sonra suda çözünür kuru madde miktarında pH ve titrasyon asitliğine kıyasla daha fazla azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.6).

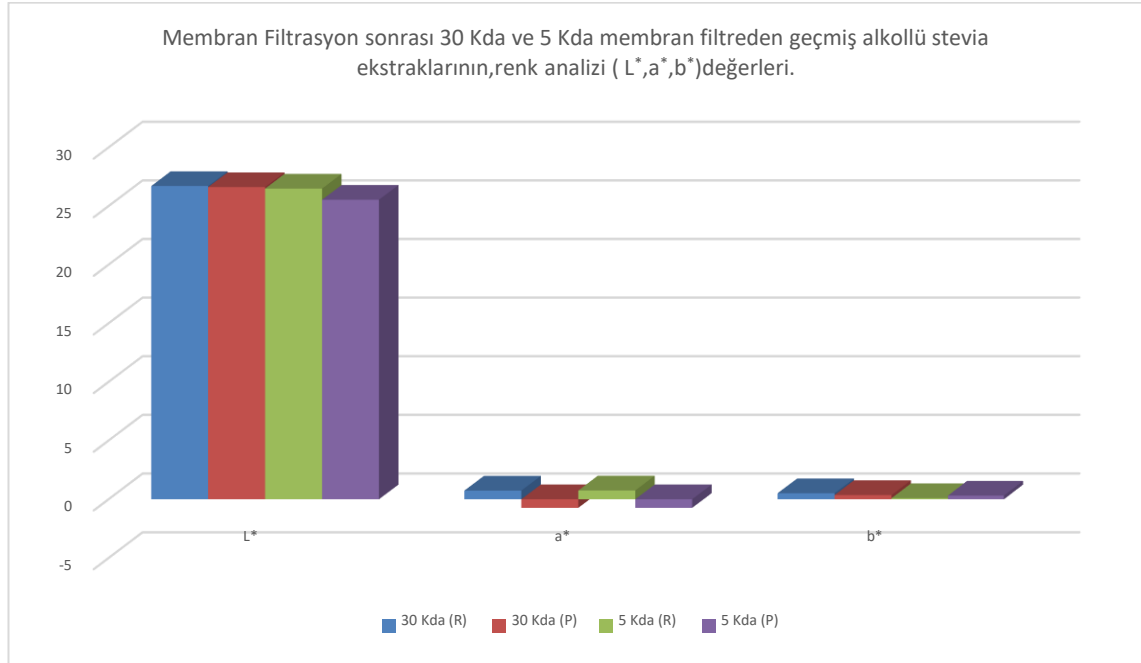
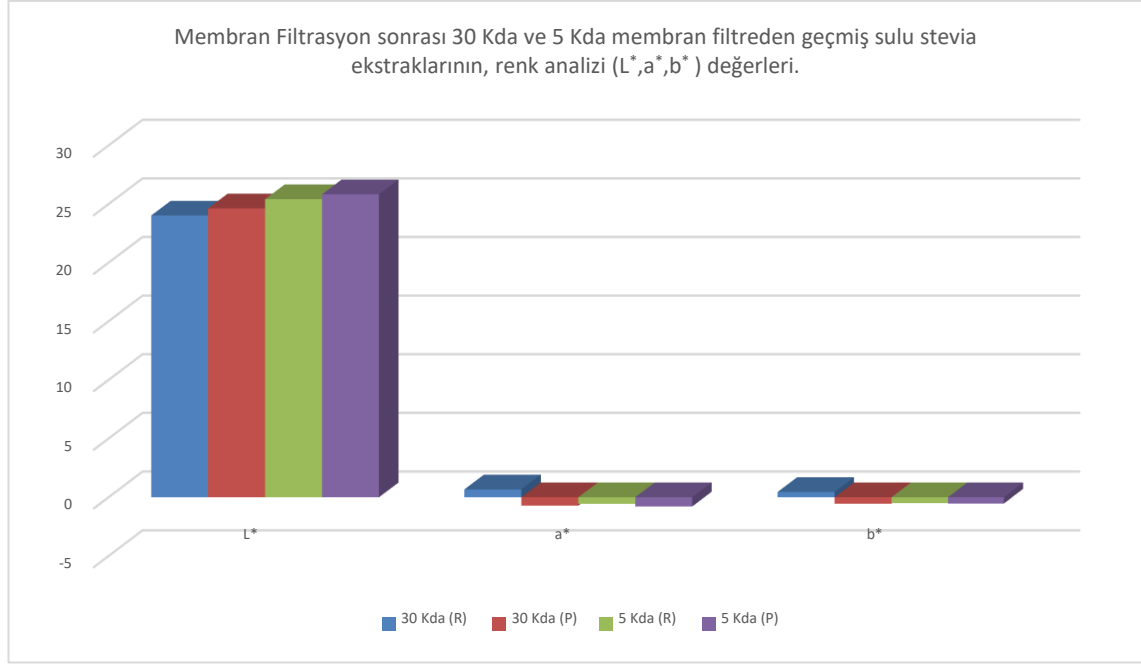
Farklı tatlandırıcılar kullanılarak üretilen meyve sularının titrasyon asitliği değerlerinin incelendiği bir çalışmada stevia ekstraktı katkılanan meyve sularında titrasyon asitliği %0.5262 olarak tespit edilmiş ve farklı tatlandırıcıların pH üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirtilmiştir (Rocha ve Bolini 2015). Reb A katkılı mango meyve sularıyla yapılan bir araştırmada da başlangıçta titrasyon asitliği %0,1538 olan ürünün depolamaya bağlı titrasyon asitliği değişimi incelenmiş ve başlangıç örneği ve son örnek arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Cadena vd. 2013). Dolayısıyla, stevia ekstraktlarının yüksek bağıl tatlılığı nedeniyle pH değeri ve titrasyon asitliği düzeyinin, katkılanan miktarının düşük olması nedeniyle, eklendiği formülasyonun pH değerini etkilemeyeceği düşünülmüştür.

4.7. Sulu ve Etil Alkollü Stevia Ekstraktlarının Renk Değerlerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.7. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akıllarının L^* , a^* , b^* renk değerleri

Stevia Ekstraktı	L^*	a^*	b^*
Ekstraksiyon Örneği (S)	30.513 ^a ± 0.030	-0.663 ^a ± 0.057	4.773 ^a ± 0.586
Ekstraksiyon Örneği (A)	31.460 ^b ± 0.663	-1.887 ^b ± 0.697	10.277 ^b ± 0.343
30 kDa (R) ^S	24.023 ^a ± 1.810	0.672 ^a ± 0.099	0.449 ^a ± 0.175
30 kDa (R) ^A	26.710 ^b ± 0.535	0.740 ^a ± 0.052	0.511 ^b ± 0.586
30 kDa (P) ^S	24,633 ^a ± 1.057	-0.710 ^a ± 0.598	-0.544 ^a ± 0.064
30 kDa (P) ^A	26,619 ^b ± 0.477	-0.727 ^a ± 0.316	0.359 ^b ± 0.616
5 kDa (R) ^S	25,416 ^a ± 0.742	-0.558 ^a ± 0.740	-0.491 ^a ± 0.116
5 kDa (R) ^A	26,489 ^a ± 0.327	-0.748 ^b ± 0.070	0.092 ^b ± 0.094
5 kDa (P) ^S	25.833 ^a ± 0.834	-0.783 ^a ± 0.253	-0.531 ^a ± 0.218
5 kDa (P) ^A	25.538 ^a ± 1.462	-0.729 ^a ± 0.055	0.314 ^b ± 0.368

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin $p < 0,05$ seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.8. Her iki kontrol grubu için 30 Kda ve 5 Kda permeat ile retentat akıllarının, renk analizi (L^* , a^* , b^*) değerleri

Ekstraksiyonda kullanılan çözügen tipine bağlı olarak permeat akılarındaki L değerinin retentat akılarındaki L değerine göre daha düşük olduğu; aynı zamanda a ve b değerlerinde de azalma olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8). Fenolik bileşiklerin etil alkollü ekstraktlarda daha yüksek çözünürlüğe sahip olmasından dolayı özellikle yeşilimsi sarı renkteki kuersetin ve türevlerinin varlığından dolayı etil alkollü ekstraktların renginin daha yeşilimi olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Çalışma sonucunda her iki kontrol grubunun renk değerleri arasında önemli farklılıkların sayısının az olması stevia ekstraktlarının katkı olarak kullanıldığı ürünlerde renk açısından önemli bir değişime neden olmayacağını düşündürmüştür.

Literatürde steviol glikozitler ve diğer tatlandırıcılarla katkılı mango meyve sularıyla yapılan bir araştırmada L*, a*, b* değerleri incelenmiş ve steviol glikozit katkılı ürünlerde bu değerlerin daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır (Cadena vd. 2013).

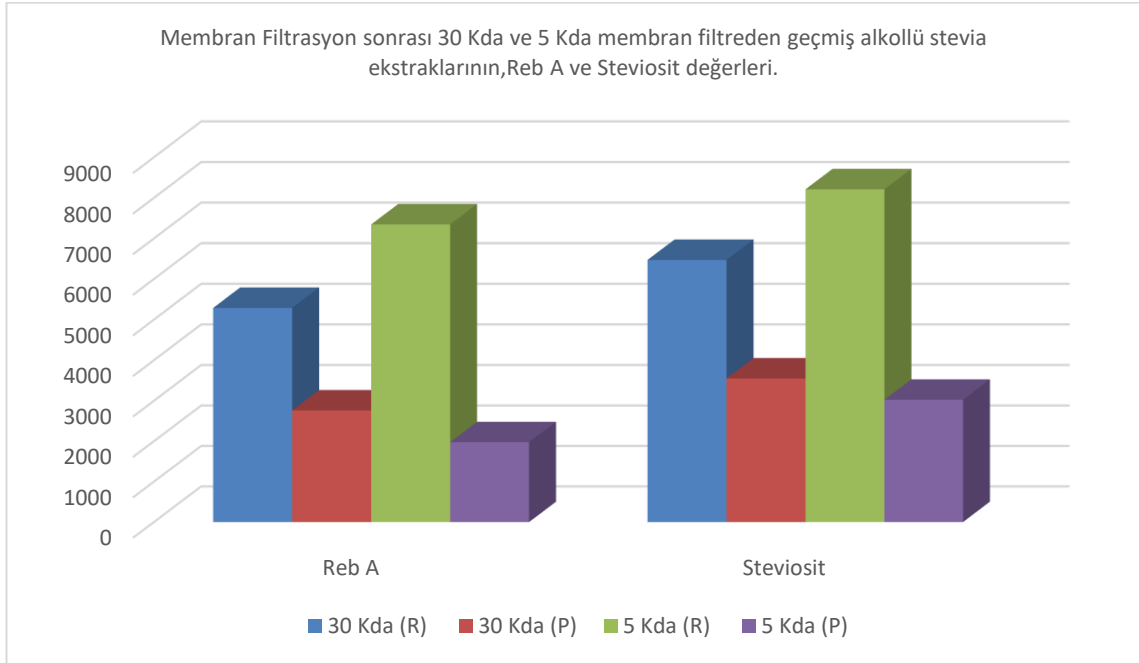
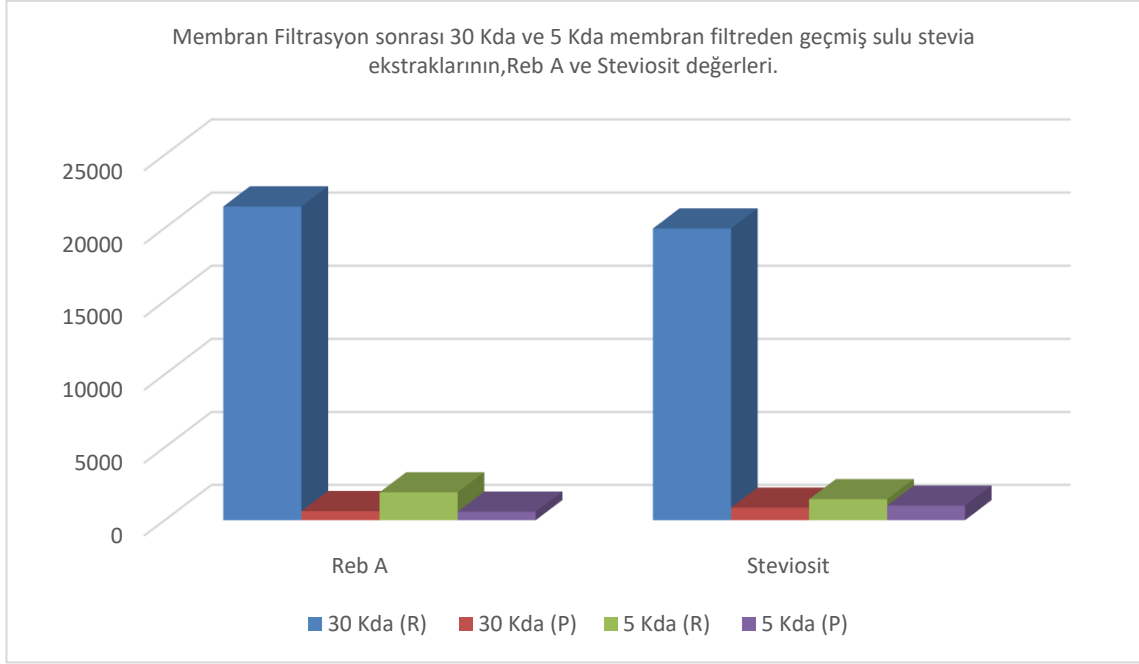
4.8. Sulu ve alkollü stevia ekstraktlarının Reb A ve steviosit değerlerinin karşılaştırılması

Sulu ve etil alkollü stevia ekstraktlarının membran filtrasyon uygulamaları sonunda Reb A ve steviosit konsantrasyonları Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Sulu (S) ve etil alkollü (A) 30 kDa ve 5 kDa ayırma sınırındaki membran filtrasyon uygulaması sonunda permeat (P) ve retentat (R) akılarının Reb A ve Steviosit miktarları (mg/kg)

Stevia Ekstraktı	Reb A	Steviosit
Ekstraksiyon Örneği (S)	3611.491 ^a ± 177.527	5227,173 ^a ± 188.820
Ekstraksiyon Örneği (A)	3765.648 ^b ± 56.037	4679,570 ^b ± 17.134
30 kDa(R) ^S	21472.393 ^a ± 11135.326	19965.954 ^a ± 10356.034
30 kDa(R) ^A	5288.109 ^b ± 862.098	6470.329 ^b ± 909.916
30 kDa(P) ^S	620.146 ^a ± 58.015	857.398 ^a ± 62.418
30 kDa(P) ^A	2762.590 ^b ± 51.138	3550.029 ^b ± 44.199
5 kDa(R) ^S	1909.761 ^a ± 2862.673	1437.485 ^a ± 271.700
5 kDa(R) ^A	7343.236 ^b ± 2224.538	8209.983 ^b ± 2217.144
5 kDa(P) ^S	583.073 ^a ± 56.638	995.866 ^a ± 146.450
5 kDa(P) ^A	1974.435 ^b ± 204.208	3025.758 ^b ± 318.229

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.9. Her iki kontrol grubu için 30 Kda ve 5 Kda permeat ile retentat akıllarının, steviosit ve reb A değerleri (mg/kg)

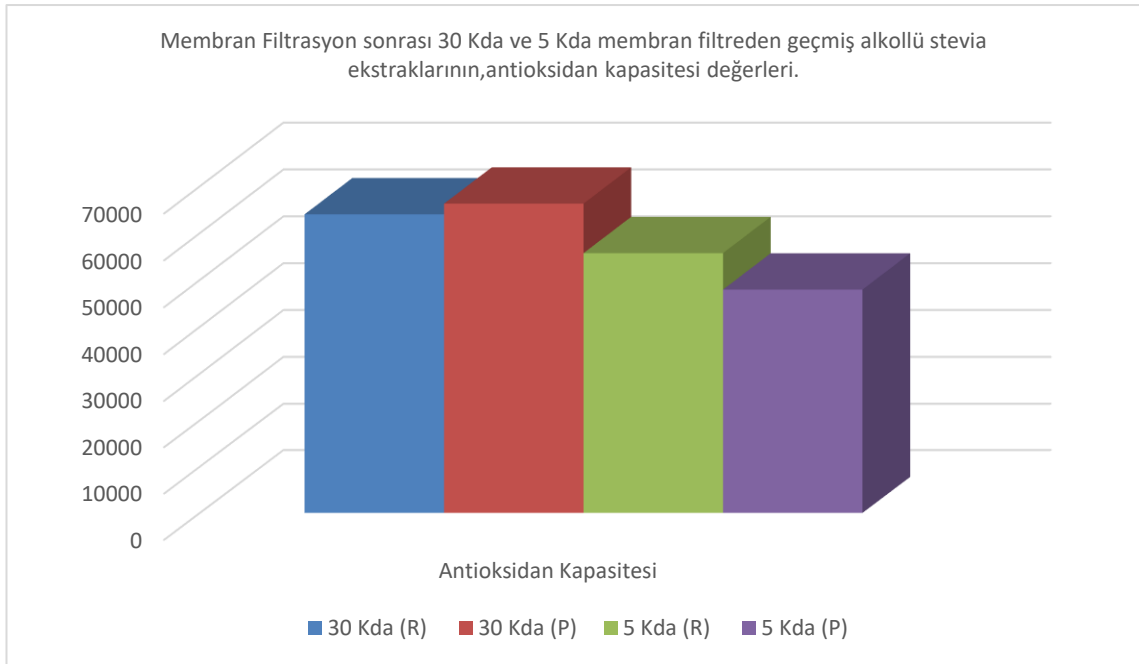
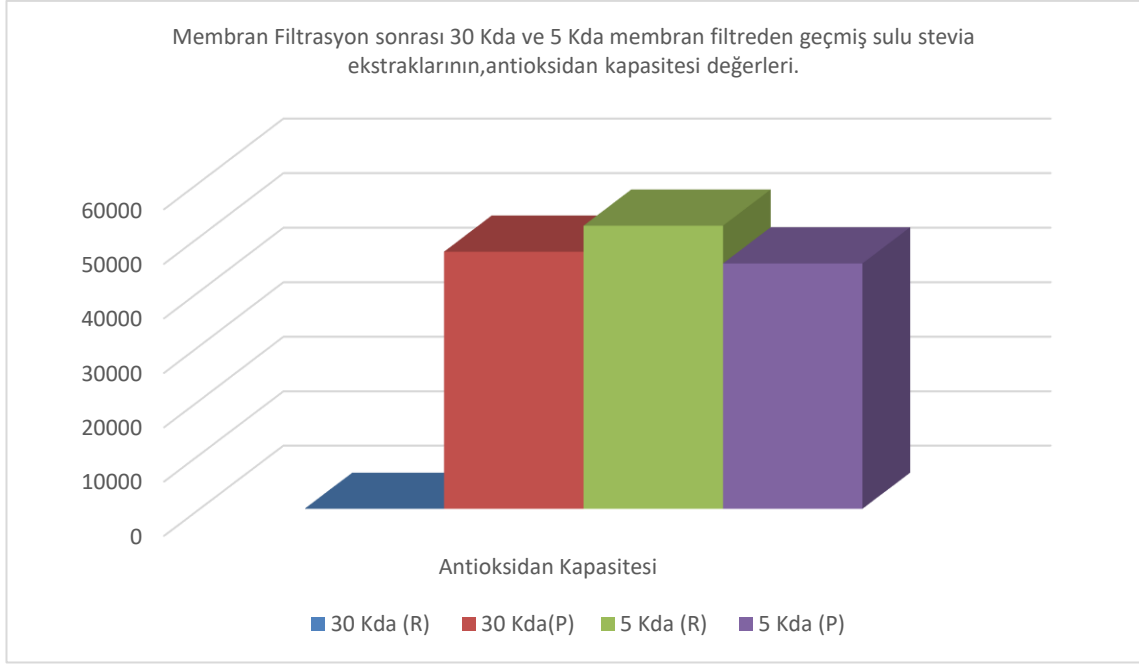
Ultrafiltrasyon uygulaması için kullanılan 30 kDa ve nanofiltrasyon uygulaması için 5 kDa ayırma sınırında membranlar kullanılarak yapılan çalışmada toplam ekstraktın %90'lık kısmı permeat olarak alınmıştır. Her iki membran filtrasyonda sulu ve etil alkollü ekstraktlarda reb A ve steviosit miktarları açısından istatistiksel olarak fark önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Her iki uygulamadan sonra reb A ve steviosit miktarlarındaki azalmanın sulu örneklerde alkollü örneklere kıyasla daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.9). Steviol glikozit ekstraksiyonunda yaygın olarak uygulanan endüstriyel yöntemlerde çözücü gücünün yüksek olmasından dolayı etil alkol tercih edilmektedir. Bu çalışmada uygulanan ekstraksiyonda itici güç olarak dekantör ekstraksiyon modelini temsil edecek şekilde santrifüj kuvveti kullanıldığı için suyun çözücü gücünün etil alkole karşı kısmen zayıf olmasının yüksek "g" kuvveti nedeniyle dezavantaja dönüşmemesi için diafiltrasyon uygulamasının şart olduğu öngörülmektedir. Nitekim, zenginleştirme amacıyla uygulanan kademeli membran filtrasyon modelinde ultrafiltrasyon uygulamasında elde edilen permeat akıları karşılaştırıldığında sulu ekstraktlarda steviol glikozit konsantrasyonunun düşük olduğu; steviol glikozitlerin retentat akısında kaldığı görülmektedir. Burada etil alkolün yüksek çözücü gücünün membrandaki alıkonma gücünden yüksek olması etkili olmaktadır. Son ürünün nanofiltrasyon uygulaması (5 kDa) sonunda elde edilen retentat akısı etil alkol ekstraksiyonu sonunda elde edilen retentat akısına göre çok yüksek miktarda reb A ve steviosit içermektedir. Sulu ekstraksiyon sonrasında uygulanan membran uygulamalarında retentat akısının başlangıç hacmine su ile tamamlanarak tekrar filtre edildiği diafiltrasyon uygulamasının verimlilik açısından fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Fonksiyonel fenolik bileşiklerin zenginleştirilen ekstraktlar içinde konsantrasyonunun olması açısından da benzer bir etkinin diafiltrasyon uygulamasıyla sağlanabileceği öngörülmektedir. Membran ayırma tekniklerinin etkinliğinde uygulama basıncı ve sıcaklığı da etkili olabilmektedir. Araştırmada kullanılan laboratuvar tipi membran filtrasyon sistemi 2,5 bar basıncın üzerinde çalışmaya izin vermediği için farklı değerlerde çalışma imkanı sağlanamamıştır. Reis vd. (2009) tarafından yapılan bir çalışmada farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanılmış ve membranlara farklı basınç değerleri uygulanarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Çalışma sonucunda ortalama steviosit ve reb A konsantrasyonları sırasıyla 25.333 g/L ve 20.570 g/L bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen verilerin uygulama koşullarıyla değiştiği görülmüştür. Martinez-Alvarado vd. (2017) tarafından stevia ekstraktlarının durultması üzerine yapılan çalışmada 0,2 µm gözenekli membran kullanılarak elde edilen stevia ekstraktlarının filtrasyon öncesi ve sonrası reb A ve steviosit miktarları belirlenmiş ve filtrasyondan önce reb A ve steviosit miktarlarının sırasıyla 4.61 g/L ile 0.66 g/L iken filtrasyondan sonra bu değerlerin 3.94 g/L ile 0.57 g/L düzeyine düştüğü tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Chhaya vd. (2012) tarafından yapılan çalışmada da elde edilmiştir.

4.9. Sulu ve Etil Alkollü Stevia Ekstraktlarının Antioksidan Kapasite Değerlerinin Karşılaştırılması

Çizelge 4.9. Sulu (S) ve etil alkollü (A) ekstraktlarda 30 kDa ve 5 kDa permeat ve retentat akıllarının antioksidan kapasitesi değerleri

Stevia Ekstraktı	Antioksidan Kapasitesi (mg/100 g trolox eşdeğeri)
Ekstraksiyon Örneği (S)	29667.857 ^a ± 163.663
Ekstraksiyon Örneği (A)	64846.427 ^b ± 38.814
30 kDa (R) ^S	35513.095 ^a ± 7785.591
30 kDa (R) ^A	63989.285 ^b ± 4314.413
30 kDa (P) ^S	47227.381 ^a ± 3798.831
30 kDa (P) ^A	66275.000 ^b ± 4333.991
5 kDa (R) ^S	51989.285 ^a ± 7422.302
5 kDa (R) ^A	55715.476 ^a ± 9745.501
5 kDa (P) ^S	45072.620 ^a ± 851.731
5 kDa (P) ^A	47929.761 ^a ± 4723.139

Değerler üzerinde bulunan harfler örneklerin kendi grubu içindeki değerinin p<0,05 seviyesinde farklı olduğunu gösterir.



Şekil 4.10. Her iki kontrol grubu için 30 Kda ve 5 Kda permeat ile retentat akıllarının, antioksidan kapasitesi değerleri (mg/100 g trolox eşdeğeri)

Sulu ve etil alkollü örneklerde antioksidan kapasite açısından nanofiltrasyon uygulamasında istatistiksel olarak farklılık mevcut değilken ultrafiltrasyon uygulamasında etil alkollü ve sulu örneklerde antioksidan kapasite açısından farklılık mevcuttur ($p < 0,05$). Etil alkollü örneklerin antioksidan kapasitesinin sulu örneklere göre daha yüksek miktarda olduğu Çizelge 4.9 ve Şekil 4.10'da görülmektedir. Bu durum fenolik bileşiklerin kontrol grubunun alkol olduğu örneklerdeki çözünme miktarının sulu örneklere göre daha yüksek olmasından kaynaklandığı açıktır.

Shukla vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada etil alkolle ekstrakte edilen stevia yapraklarının antioksidan ve antimikrobiyel etkileri incelenmiş ve ekstraktlardaki hidroksil radikal süpürme aktivitesi 81.08 $\mu\text{g/mL}$, nitrik oksit radikal süpürme aktivitesi 132.05 $\mu\text{g/mL}$, DPPH radikal süpürme aktivitesi 93.46 $\mu\text{g/mL}$, süperoksit radikal süpürme aktivitesi ise 109.01 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Ghanta vd. (2007) tarafından yapılan çalışmada ise etil asetat ve metanol ile ekstrakte edilen stevia yapraklarının antioksidan kapasitesi incelenmiş ve DPPH radikal süpürme aktivitesi etil asetatlı ekstraktlar için 9.26 $\mu\text{g/mL}$, metanollü ekstraktlar için ise 47.66 $\mu\text{g/mL}$) olarak bulunmuştur.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada kurutulmuş stevia bitkisinin yaprakları su ve etil alkol olmak üzere iki farklı karakterde çözücüyle ekstrakte edilerek steviol glikozitler fiziksel ayırma teknikleriyle zenginleştirilmiştir. Saflaştırma proseslerinden farklı olarak bitkinin yapraklarından gelen ve fonksiyonel özellikleri olan bazı bileşiklerin proses basamaklarındaki varlığı ve bazı tanımlayıcı değerler belirlenmiş ve uygulanan işlemlerle ilişkilendirilerek yorumlanmıştır.

Araştırmada uygulanan işlem basamaklarında başlangıç örneklerinin analiz sonuçları ile membran filtrasyon işlemi sonrasındaki örneklerin analiz sonuçları arasında bazı değerlerde farklılıklar oluşmuştur. Tanımlayıcı değerlerden suda çözünür kuru madde içeriğinde azalma olmuş, pH ve titrasyon asitliği açısından önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Ekstraktların renk değerleri incelendiğinde parlaklığı ifade eden L değerinde etil alkol ve su ile ekstrakte edilen örneklerde azalma görülmüş; a değerinin azalmasıyla yeşillik artmış ve b değerinin azalması ile sarılık azalmıştır. Steviosit ve reb A miktarlarında ise her iki grupta da başlangıç miktarlarına göre proses basamaklarında azalma meydana gelmiştir. Tüm zenginleştirme basamaklarında Reb A miktarındaki azalmanın steviosit miktarına göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Reb A ve steviosit miktarlarının etil alkollü ve sulu ekstraktlarda değişimine bakıldığında yapılan işlemler sonrasında etil alkollü ve sulu stevia ekstraktlarındaki miktarlarının düşük olmadığı; alkollü örneklerdeki reb A ve steviosit miktarlarının sulu ekstraktlardaki örneklere oranla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Steviol glikozit varlığı açıdan çözücü farkının etkili olduğu saptanmıştır.

Stevia ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin karşılaştırması yapılmıştır. Özellikle etil alkollü ekstraktlarda sulu ekstraktlara kıyasla antioksidan kapasitesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Antioksidan kapasitesi değerlerinin yapılan zenginleştirme ve saflaştırma işlemleri sonrasında da miktarlarının büyük bir bölümünü koruduğu tespit edilmiştir.

Membran filtrasyon prosesleri uygulandıktan sonra ekstraktlardaki fenolik bileşiklerin değişimi HPLC/MSMS analiz tekniği ile saptanmıştır. Kaynak taramalarına göre stevia yaprağı bileşimindeki çok önemli fonksiyonel bileşenler olarak ifade edilen kuersetin ve türevleri ve apigenin gibi fenolik bileşiklerin varlığı araştırılmıştır. Kuersetin ve beraberinde bazı fenolik maddelerin saflaştırılmış preparatların anti kanserojen doğal madde olarak tüketime sunulduğu bilinmektedir. Sulu ve etil alkollü ekstraktlarda apigenin tespit edilememiştir. Ancak kuersetin ve türevleri önemli miktarlarda bulunmuştur. Her iki çözgen kullanılarak elde edilen ekstraktlarda hakim olan fenolik bileşik klorogenik asit olmakla beraber kuersetin-3-glikozit miktarı da önemli seviyede saptanmıştır. Genel olarak fenolik madde kompozisyonu işlem basamaklarından etkilenmiştir. Etil alkollü ekstraktlar fenolik maddeler bakımından daha zengin bulunmuştur.

Bu tez çalışması sonunda elde edilen bulgulara göre sadece zenginleştirme prosesleri uygulanarak minimal işlem görmüş, belirli bir bağıl tatlılığa sahipken aynı zamanda anti kanserojen maddeler de içeren doğal bir tatlandırıcının endüstriyel ölçekte üretilebileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Özellikle sulu ekstraktların “doğal ve az işlem

görmüş” gıda konseptine uygun üretim modelinde değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır.

Literatürde stevia bitkisi için birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Ancak, stevia bitkisinin çoğu hastalığın tedavi süresini destekleyici bileşenleri de içermesi bu bitkinin ekstraktlarının sadece gıda endüstrisinde değil sağlık sektöründe de kullanılabilceğini düşündürmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abou-Arab, A.E., Abou-Arab, A.A., Abou-Salem, F.M. 2010. Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii*. *Plant. Afric. J. Food Sci.*, 4, 269–280.61 (1): 155-163
- Anonim 2019. <http://www.hazarsu.com> (Son erişim tarihi: 05.06.2021)
- Anonymous 2004. <http://www.fao.org> (Son erişim tarihi: 18.05.2021)
- Cadena, R.S., Cruz, A.G., Netto, R.R., Catro, W.F., Faria, J.D.A.F and Bolini, H.M.A. 2013. sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. *Food Research International*, 54 (2) : 1670-1679.
- Cemeroğlu, B. 2007. Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler. Gıda Analizleri (Food Analysis), ed. By B. Cemeroğlu, GTD Yayınları, (34): 45-128
- Chhaya, sharma, C., Mondal, S., Majumdar, G.c. and De, S 2012. Clarification of stevia extract by ultrafiltration: Selection criteria of the membrane and effects of operating conditions. *Food an Bioproducts Processing*, 90 (3): 525-532.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Karatzia, M.A., Florou-Paneri, P. 2013. *Stevia rebaudiana* as a novel source of food additives. *J. Food Nutr. Res.*, 52(4): 195–202
- Das, A., Paul, D., Golder, A.K. and Das, C. 2015 Separation of Rebaudioside-A from stevia extract: Membrane selection, assessment of permeate quality and fouling behavior in laminar flow regime. *Separation and Purification Technology*, 144 8-15.
- Doğan Z, Kocahan S, Erdemli E, Köse E, Yılmaz , Ekincioglu Z, Ekinci N, Türköz Y. 2015. Effect of chemotherapy exposure prior to pregnancy on fetal brain tissue and the potential protective role of quercetin. *Cytotechnology*. 67: 1031–1038
- Fuh, W., & Chiang, B. 1990. Purification of steviosides by membrane and ion exchange processes. *Journal of Food Science*, 55, 1454–1457.
- Garavand, F., Vatankhah, M., Elhamirad, A. And Yaghbani, M. 2014. Influence of sugar replacement by stevioside on physicochemical and sensory properties of biscuits. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*
- Geuns, J.M.C. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5):913-921
- Ghanta, S., Banerjee, A., Poddar, A. And Chattopadhyay, S. 2007. Oxidative DNA Damage Preventive Activity and Antioxidant Potential of *Stevia rebaudiana* (Bertonii), a Natural Sweetener. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26): 10962-10967

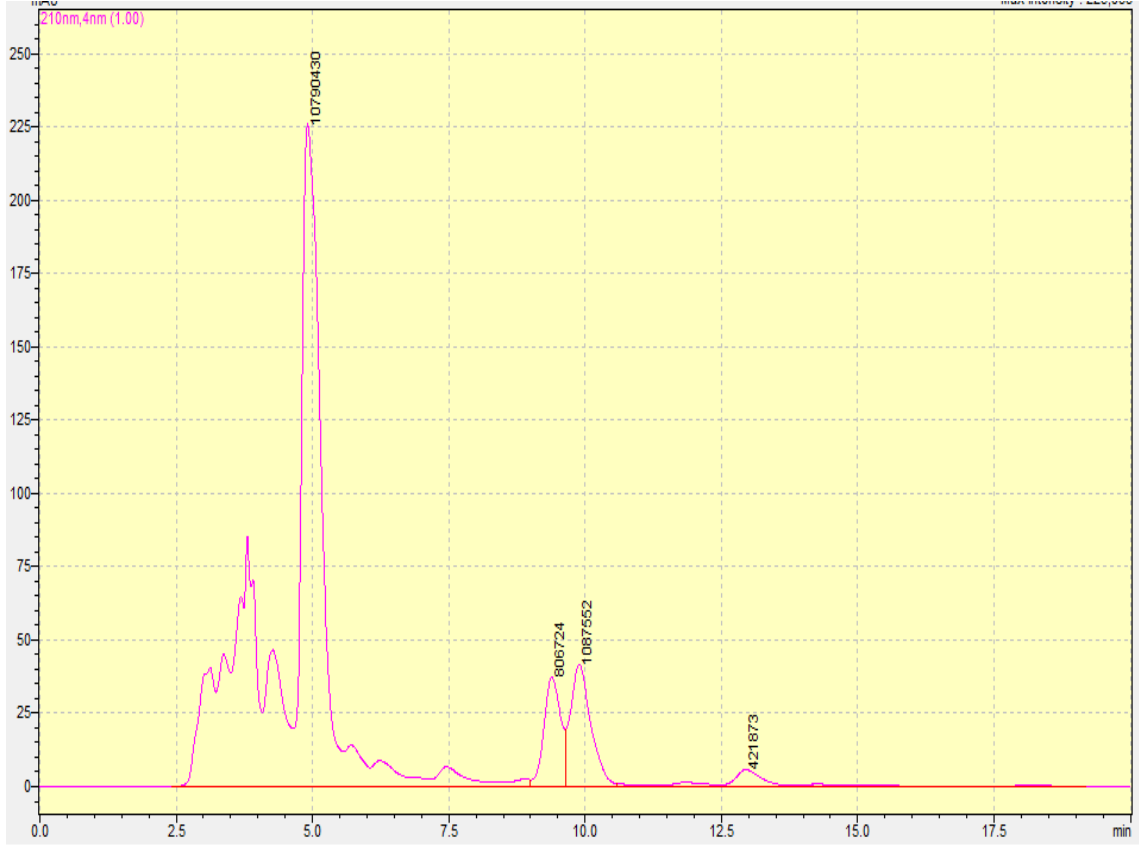
- Ghosh, S., Subudhi, E., Nayak, S. 2008. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *IJIB*, 2, 27–31.
- Goyal, S., Samsheri, G. R. 2010. *Stevia (Stevia Rebaudiana) A Biosweetener: A Review. Int. J. Food Sci. Nutr.*, 61:1-10.
- Gupta, E., Purwar, S., Sundaram, S. ve Rai, G. K. 2013. Nutritional and therapeutic values of *Stevia rebaudiana*: A review. *J. Med. Plant Res.*, 7 (46):3343–3353.
- Hertog MG, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. 1994. Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study. *Nutr Cancer*. 22: 175–184.
- Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, Giampaoli S, Jansen A, Menotti A, Nedeljkovic S, Pekkarinen M, Simic BS, Toshima H, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB. 1995. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. *Arch Int Med*. 155: 381–386.
- Jayaraman, S., Saranana Manoharan, M., Illanchezian, S. 2008. In-vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (asteraceae) leaf extracts. *Trop. J. Pharm. Res.*, 7, 1143-1149.
- 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.
- Klongpanichpak, S., Temcharoen, P., Toskulkaeo, C., Apibal, S., Glinsukon, T. 1997. Lack of mutagenicity of stevioside and steviol in salmonella typhimurium TA98 and TA100. *J Med Assoc Thai*, 80(1):121–128.
- Knekt P, Järvinen R, Seppänen R, Heliövaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. 1997. Dietary intake of flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am J Epidemiol*. 146: 223–230.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 76 (3): 560–568.
- Komes, D., Belscak-Cvitanovic, A., Ljubicic, I., Durgo, K., Cindric, I., Busic, A., Vojvodic, A. 2014. Formulating blackberry leaf mixtures for preparations of infusion with plant derived sources of sweeteners. *Food Chem*, 151:385-393.
- Kumar, H., Kaul, K., Bajbai-Gupta, S., Kaul, V.K. and Kumar, S. 2012. A comprehensive analysis of fifteen genes of steviol glycosides biosynthesis pathway in *stevia rebaudiana* (Bertoni). *Gene*, 492 (1): 276-284.

- Kulcan A.A., Karhan M., "6. Proses parametrelerinin stevioside ve rebaudioside üzerine etkisi Dekanter santrifüj ile elde edilen stevia özü içeriği", GIDA İşleme VE KORUMA GAZETESİ, no.e15168, ss.1-9, 2020
- Kurunç A., Aslan G.E., Karaca C., Tezcan A., Turgut K., Karhan M., vd., "Tuz kaynağı ve sulama suyu tuzluluğunun Stevia rebaudiana Bertoni'nin büyüme, verim ve kalite parametrelerine etkileri", *SCIENTIA HORTICULTURAE*, cilt.270, ss.1-10, 2020
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, 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.
- Marcinek, K., Krejpcio, Z. 2015. *Stevia rebaudiana bertoni*; chemical composition and functional properties. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 14(2), 145–152.
- Martinez-Alvarado, J.C., Torrestiana-Sanchez, 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
- Mohammad, M.R., Mohammad, U.D., Sher, M.M., Habib, A.N., Lqbal, A.Q. 2007. In vitro clonal propagation and biochemical analysis of field established *Stevia rebaudiana bertoni*. *Pakistan Journal of Botany*, 39, 2467–2474.
- Nizamlioğlu, N.M., Nas, S. 2010. Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler; yapıları ve önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35
- Pol, J., Varad'ova Ostra, E., Karasek, P., Roth, M., Benesova, K., Kotlarikova, P. And Caslavsky, J. 2007. Comparison of two different solvents employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *Stevia rebaudiana*: methanol versus water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388 (8): 1847-1857.
- Rai, C., C. Majumdar, G. And De, 2012. Optimization of proces Parameters for water extraction of Stevioside using Response Surface Methodology. *Seperation Science and Technology*, 47(7): 1014-1022 s.
- Reis. MH.M., Da Silva, F.V., Andrade, C.M.G., Rezende, S.L., Wolf Maciel, M.R. and Bergamasco, R.2009. Clarification And Purification Of Aqueous Stevia Extract Usin Membrane Seperation Proces. *Journal Of Food Process Engineering*, 32 (3):338-354.
- Rocha, I.F.D.O. and Bolini, H.M.A. 2015. Passion fruit juice with different sweeteners: sensory profile by descriptive analysis and acceptance. *Food Science & Nutrition*, 3 (2): 129-139.

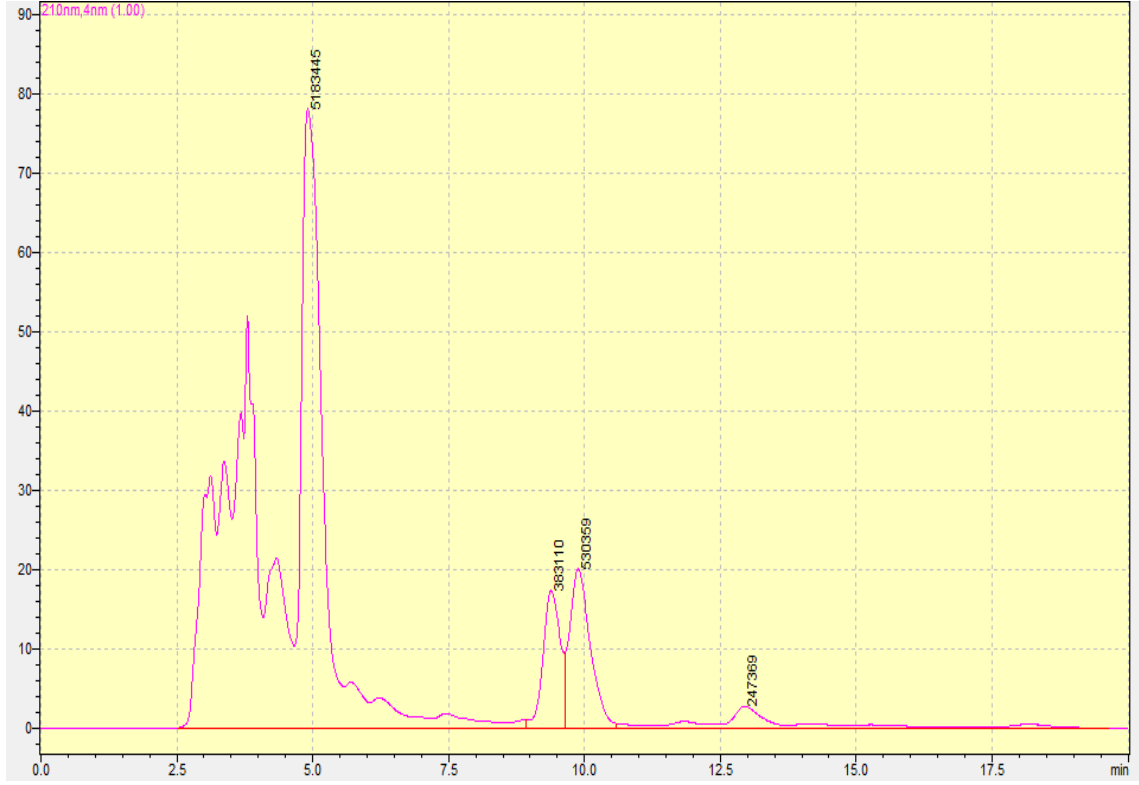
- Rouphael, Y., Bernardi, J., Cardarelli, M., Bernardo, L., Kane, D., Colla, G. *et al.* 2016. Phenolic compounds and sesquiterpene lactones profile in leaves of nineteen artichoke cultivars. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 64, 8540-8548.
- Ruiz Ruiz, C., Moguel Ordoñez, Y.B., Matus Basto, Á., Segura Campos, M.R. 2015. Antioxidant capacity of leaf extracts from two *Stevia rebaudiana bertonii* varieties adapted to cultivation in Mexico. *Nutr. Hosp.*, 31(3), 1163-1170.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., & Shukla, S. 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2338–2343.
- Smith J and Vanstadin H. 1992. Subcellular pathway for glycoside synthesis. *South Afr J Sci*, 88:206.
- Vatankhah, M., Garavand, F., Elhamirad, A., Yaghbani, M. (2015). Influence of sugar replacement by stevioside on physicochemical and sensory properties of biscuit. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 7 (3): 393-400.
- Yücesan, B., Büyükgöçmen, R., Mohammed, A., Sameeullah, M., Altuğ, C., Gurel, S., Gürel, E. 2016. An efficient regeneration system and Steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural highintensity sweetener. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 52:330–337.
- Zhang, S.Q., Kumar, A. And Kutowy, O. 2000. Membrane-based separation scheme for processing sweeteners from stevia leaves. *Food Research International*, 33 (7): 617

7.EKLER

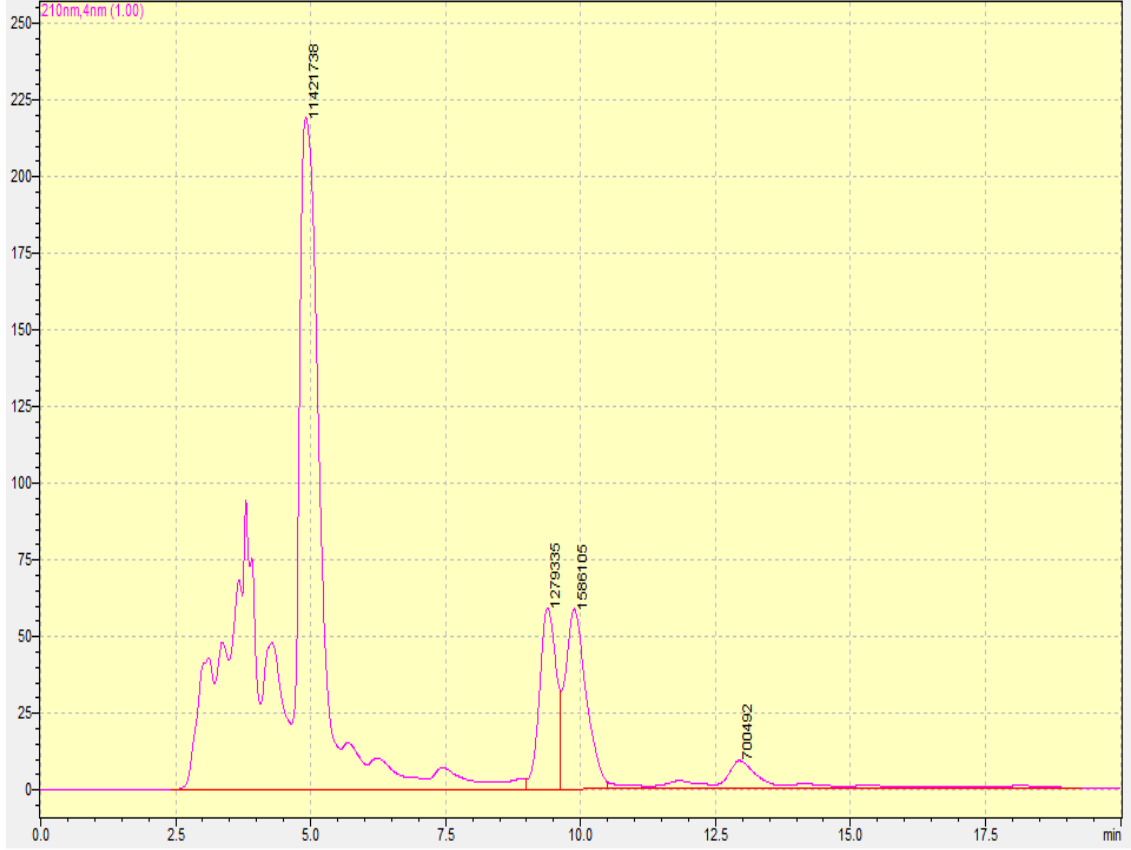
EK-1 Birinci kademe filtrasyon (30 kDa) sonucunda etil alkollü ekstraktlardan elde edilen retentat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



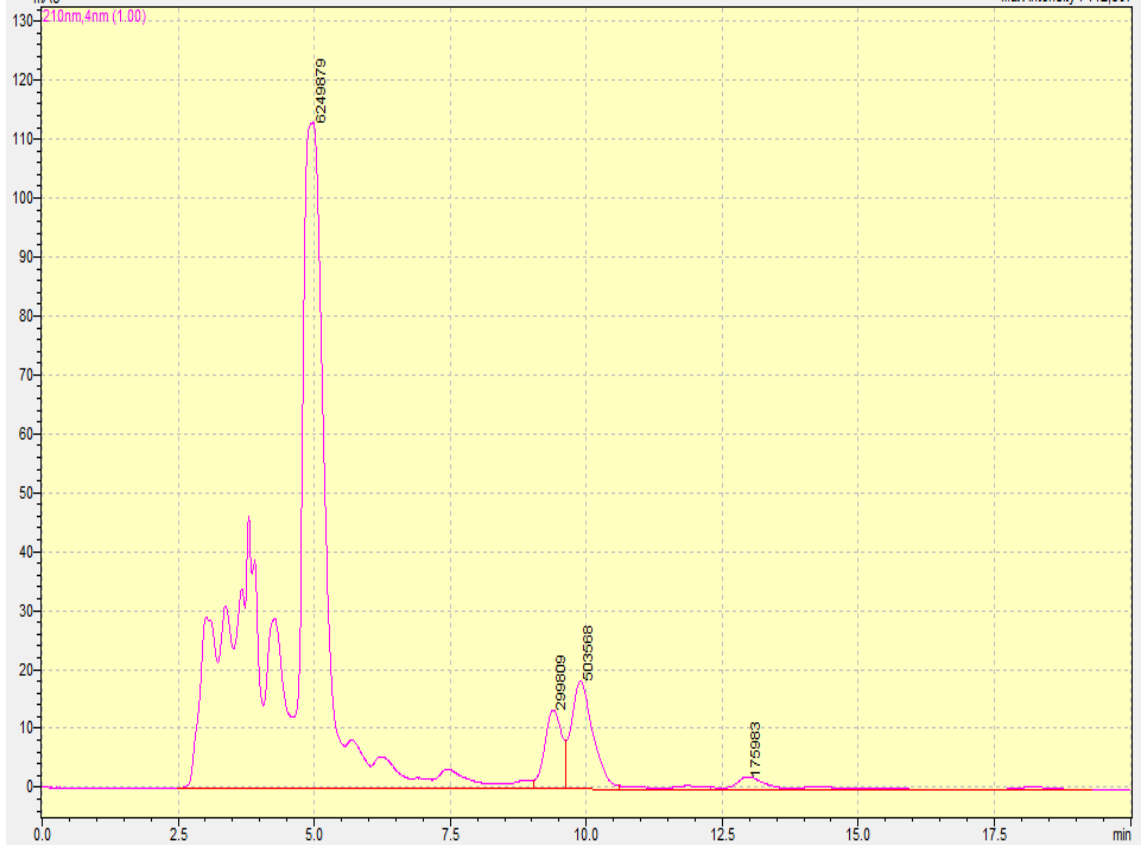
EK-2 Birinci kademe filtrasyon (30 kDa) sonucunda etil alkollü ekstraktlardan elde edilen permeat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



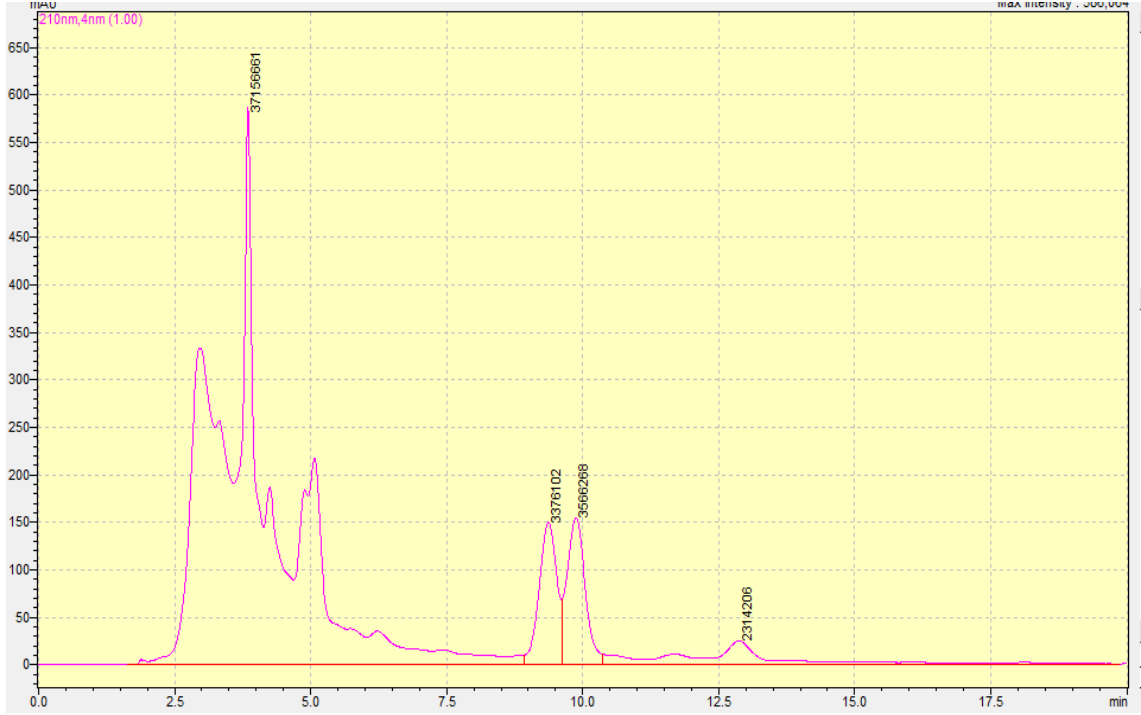
EK-3 İkinci kademe filtrasyon (5 kDa) sonucunda etil alkollü ekstraktlardan elde edilen retentat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



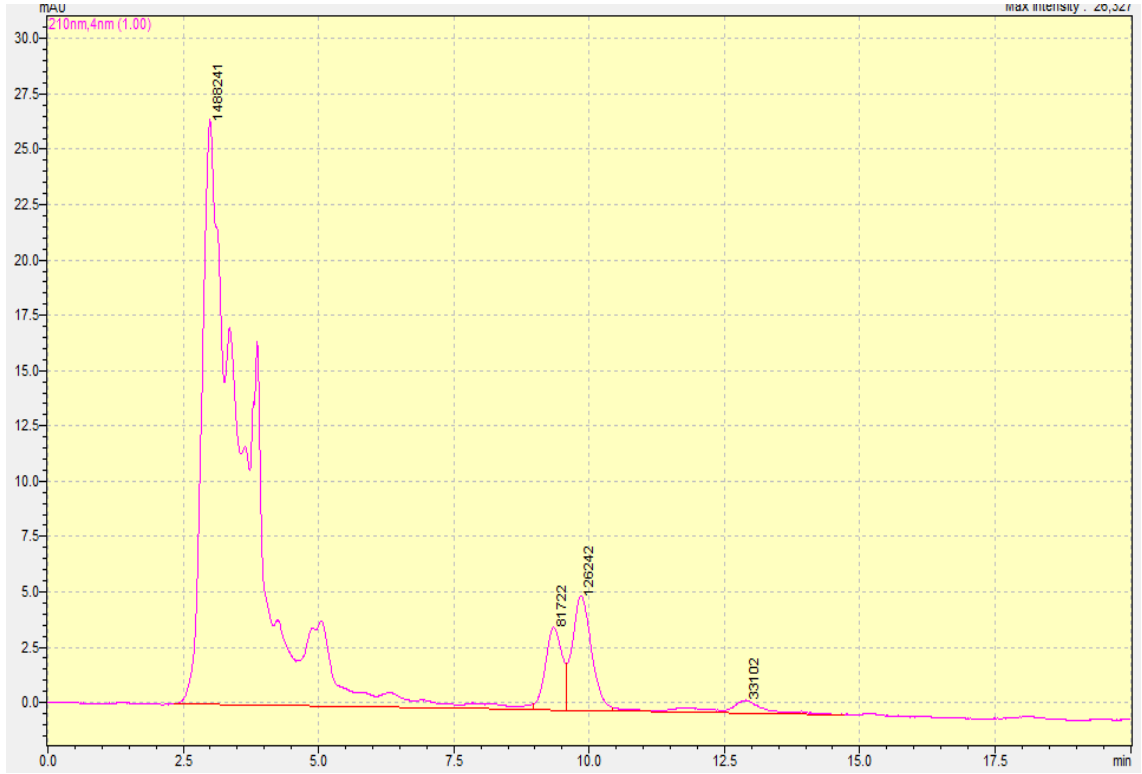
EK-4 İkinci kademe filtrasyon (5 kDa) sonucunda etil alkollü ekstraktlardan elde edilen permeat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromatogram



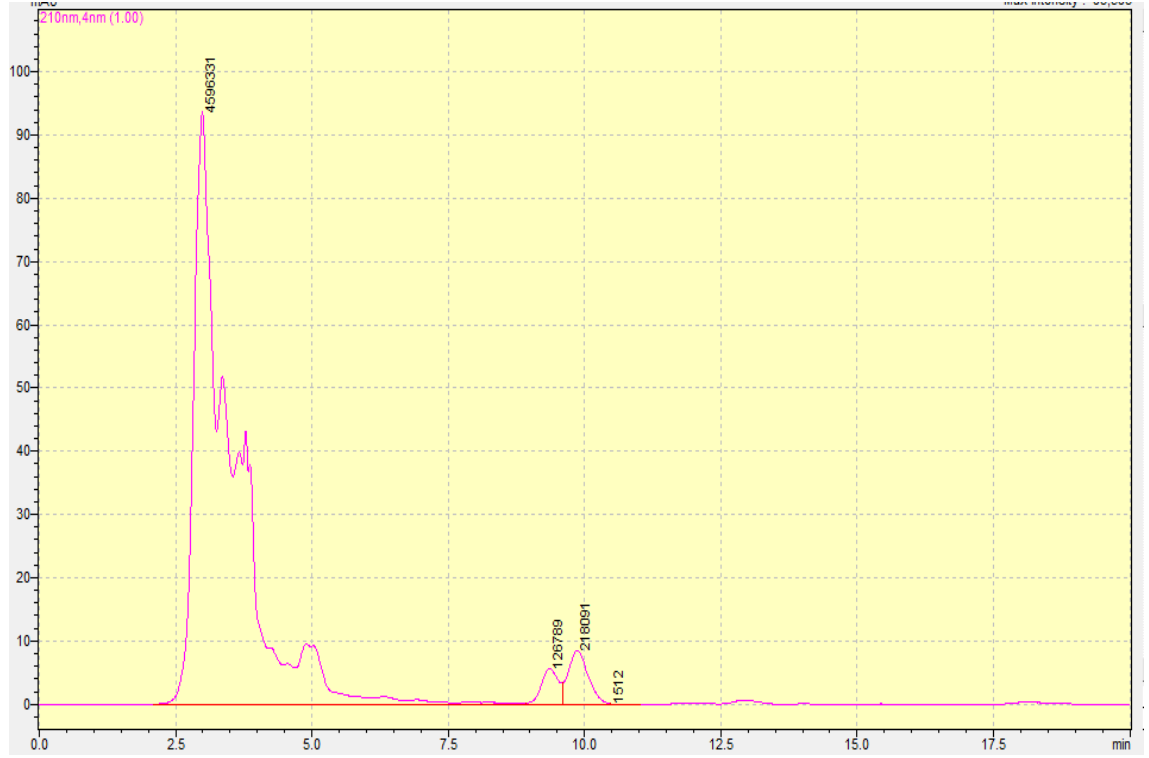
EK-5 Birinci kademe filtrasyon (30 kDa) sonucunda sulu ekstraktlardan elde edilen retentat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



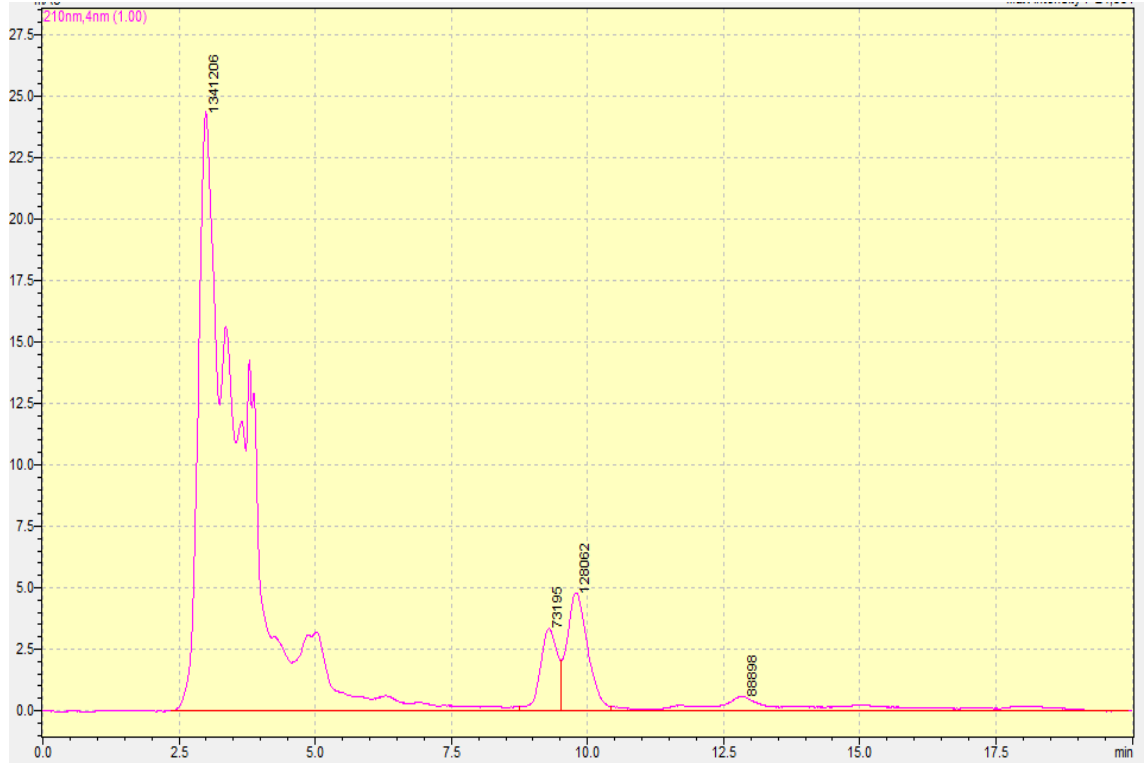
EK-6 Birinci kademe filtrasyon (30 kDa) sonucunda sulu ekstraktlardan elde edilen permeat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



EK-7 İkinci kademe filtrasyon (5 kDa) sonucunda sulu ekstraktlardan elde edilen retentat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromotogram



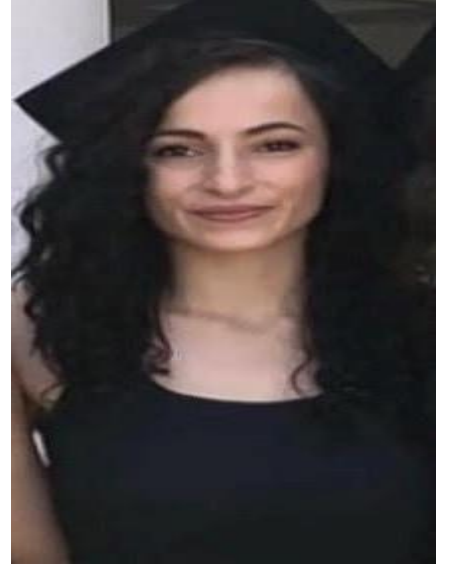
EK-8 İkinci kademe filtrasyon (5 kDa) sonucunda sulu ekstraktlardan elde edilen permeat akısının reb A ve steviosit değerlerine ait kromatogram



ÖZGEÇMİŞ

Yeşim KAPİ

yesimkapi@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2018	Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya