

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

**KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) MEYVESİNDEN D-PİNİTOL
EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

HATİCE REYHAN ÖZİYCI

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

2014

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

**KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) MEYVESİNDEN D-PİNİTOL
EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR**

HATİCE REYHAN ÖZİYCI

**DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Ünivesitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2011.03.0121.019 nolu proje ile desteklenmiştir.**

2014

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) MEYVESİNDEN D-PİNİTOL
EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

HATİCE REYHAN ÖZİYCI

DOKTORA TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu tez 11/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

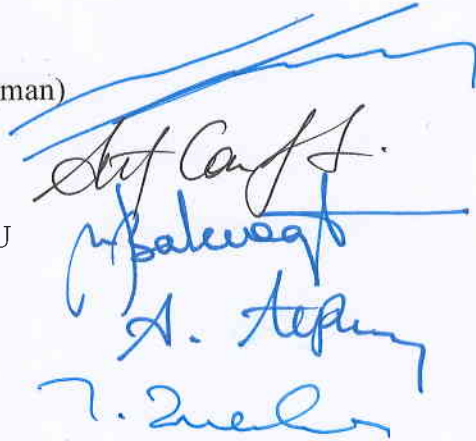
Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)

Prof. Dr. Atif Can SEYDİM

Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Doç. Dr. İrfan TURHAN



The image shows four handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names listed on the left. The signatures are: Mustafa Karhan, Atif Can Seydim, Murat Soner Balcioğlu, and İrfan Turhan.

ÖZET

KEÇİBOYNUZU (*Ceratonia siliqua* L.) MEYVESİNDEN D-PİNİTOL EKSTRAKSİYONU ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Hatice Reyhan ÖZİYCI

Doktora Tezi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Haziran 2014, 115 sayfa

İnsülin benzeri bir etkisi olan D-pinitol, son yıllarda insülin mekanizmasıyla ilişkilendirilen birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği belirtilen, umut vadeden fonksiyonel bileşiklerinden birisi olarak görülmektedir. Bu nedenle, D-pinitolün zenginleştirilmesi ve saflaştırılmasına yönelik bilimsel çalışmalar popüler hale gelmeye başlamıştır.

D-pinitolü gıda takviyesi olarak üreten firmalar esas olarak bu bileşiği içeren gıda matrislerinden uygun saflaştırma teknikleriyle ayrıştırmakta ve yüksek saflıkta D-pinitol elde etmektedir. Hâlihazırda bu amaca yönelik en çok tercih edilen yöntemler olan iyon değiştirici reçineler, aktif kömür kromatografileri ve solvent ekstraksiyonu yöntemleridir. Ancak bu tekniklerin uygulanabilirlik açısından zor ve yüksek maliyetli oluşu üreticileri bu amaçla kullanılabilecek yeni teknikler aramak zorunda bırakmıştır.

Son yıllarda, yüksek oranda D-pinitol içeriğine (% 5-7) sahip olan keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) meyvesinden bu bileşiğin elde edilmesine yönelik birçok araştırma yapılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada enzim uygulama, sıcak durultma, CaO uygulama, ultrafiltrasyon, etanol fermentasyonu ve kristalizasyon gibi teknikler uygulanarak D-pinitolün keçiboynuzu ekstraktında zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca proje kapsamında yer almayan kademeli ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve solvent ekstraksiyonu teknikleri de uygulanarak bu tekniklerin D-pinitol konsantrasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; keçiboynuzu ekstraktından D-pinitolün zenginleştirilmesinde özellikle etanol fermentasyonu öncesinde uygulanan invertaz enziminin *Saccharomyces cerevisiae* mayasının metabolik faaliyetlerini artırdığı, dolayısıyla bu metabolik faaliyet sonucu açığa çıkan serbest D-pinitol molekülünün konsantrasyonunda da artış meydana geldiği görülmüştür.

Öte yandan, kademeli ultrafiltrasyon ve etanolik solvent ekstraksiyonu ile kombine edilen zenginleştirme tekniklerinin tez kapsamında belirtilen diğer tekniklere göre daha başarılı olduğu ve keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün konsantrasyonunun başlangıç seviyesine göre yaklaşık 3.5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan küçük bir membran filtrasyon deneyi ile de, ultrafiltrasyondan ziyade nanofiltrasyon tekniğinin kullanılmasının bu matriksten D-pinitolün zenginleştirilmesinde daha etkili olduğu ortaya konulmuştur. Nitekim 5 kDa ayırma sınırındaki membran filtre kullanıldığında filtrasyon sonunda elde edilen keçiboynuzu ekstraktının permeat (21.69 g/L) ve retentat (22.35 g/L) kısımlarında D-pinitol konsantrasyonu açısından önemli bir farklılık meydana gelmemiştir. 2 kDa'luk membran

filtre kullanıldığında ise keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün önemli bir kısmının retanat (17.69 g/L) kısmında kaldığı, çok az bir kısmının da permeat kısmına geçtiğı (5.79 g/L) görölmüştür. Sonuç olarak; tez kapsamındaki zenginleştirme metotlarına ilave olarak farklı metotların da kullanılmasıyla yapılan denemelere göre keçiboynuzu ekstraktındaki başlangıçta bulunan D-pinitol seviyesi 2-3.5 kat oranında artırılmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: Keçiboynuzu, D-pinitol, zenginleştirme, invertaz, etanol fermentasyonu, membran filtrasyon

JÜRİ: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Danışman)

Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM

Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Doç. Dr. İrfan TURHAN

ABSTRACT

INVESTIGATIONS on D-PINITOL EXTRACTION from CAROB (*Ceratonia siliqua* L.) POD

Hatice Reyhan ÖZİYCI

PhD Thesis in Food Engineering
Supervisor: Prof. Dr. Mustafa KARHAN
Haziran 2014, 115 pages

D-pinitol, an insulinomimetic compound which has a potential use for curing of diseases associated with insulin metabolism, is one of the promising functional compounds. Hence, scientific studies intended for enhancement and purification of D-pinitol, have become popular.

Manufacturers, producing D-pinitol as a dietary supplement, extract this compound mainly with suitable purification techniques from the rich food matrixes and obtain high-purity D-pinitol. At present, the most favourite techniques are ion exchange resins, active charcoal chromatography and solvent extraction. However, due to the high cost and difficulties in applicability, manufacturers have had to look for new techniques that can be used for this purpose.

In recent years, many researches have been made about obtaining D-pinitol from carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruit, which has a rich content (5-7 %) for it. In this study, techniques such as enzyme treatment, hot clarification, CaO treatment, ultrafiltration, ethanol fermentation and crystallization were performed to enhance the D-pinitol content of the carob extract. Besides, some other techniques (fractional ultrafiltration, nanofiltration and solvent extraction), which were not within the project, were also investigated for the aim of enhancing the D-pinitol. According to the results; especially invertase enzyme treatment before the ethanol fermentation stage increased the metabolic activity of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Therefore, the concentrations of the free D-pinitol molecules in the carob extract increased depending on this metabolic activity.

On the other hand, enhancement application which was combined with fractional ultrafiltration and solvent extraction with ethanol was found to be more successful than other applications mentioned in this study and an approximate increase of 3.5 - fold in D-pinitol concentration of carob extract was observed when compared to the initial concentration. It has also been demonstrated by a small test that nanofiltration rather than ultrafiltration was more effective in enrichment of D-pinitol in this matrix. Thus, the permeate (21.69 g/L) and retentate (22.35 g/L) compositions in respect to D-pinitol were not significantly different from each other when the membrane filter with a 5 kDa-molecular weight cut-off (MWCO) was used. But, when the membrane filter with a 2 kDa-MWCO was used, most of the D-pinitol molecules couldn't pass the membrane therefore the D-pinitol concentration of the retentate (17.69 g/L) was higher than the permeate (5.79 g/L). Consequently, a concentration increment in the range of 2-3.5-folds

occurred by using the enhancement techniques stated in this study and other techniques added later on to the study.

KEYWORDS: Carob, D-pinitol, enhancement, invertase, ethanol fermentation, membrane filtration

COMMITTEE: Prof. Dr. Mustafa KARHAN (Supervisor)

Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM

Prof. Dr. Murat Soner BALCIOĞLU

Prof. Dr. Ayhan TOPUZ

Doç. Dr. İrfan TURHAN

ÖNSÖZ

Halkalı şeker alkolleri ve türevleri, potansiyel farmakolojik özelliklerinden dolayı birçok araştırmacının dikkatini çeken bileşiklerdir. D-pinitol baklagil familyasına ait birçok bitkide yaygın olarak bulunan ve *chiro*-inositolün metilenmiş formu (3-O-metil D-*chiro*-inositol) olan halkalı yapıda bir şeker alkolüdür. İnsülin-benzeri bir etkiye sahip olduğu belirtilen bu bileşiğin herhangi bir toksisitesi ve yan etkisi bulunmadığı ve insan beslenmesinde kullanıldığında diğer karbohidratlarda olduğu gibi ilave bir kalori sağlamadığı bildirilmektedir.

Bilimsel araştırmalar besinlerle vücuda alınan D-pinitolün sadece üçte birlik bir kısmının D-pinitol gibi fonksiyonel olan D-*chiro*-inositol formuna dönüşebildiğini göstermektedir. Bu nedenle bu bileşiğin dışarıdan besinlerle alınması gerektiği görülmektedir. İnsülin-benzeri etkisi nedeniyle de glukoz metabolizmasını geliştirmede mükemmel bir yardımcı madde olacağı düşünülen D-pinitol gıda takviyeleri endüstrisinde üzerinde oldukça fazla araştırma yapılan bir bileşik haline gelmiştir.

D-pinitolün yüksek saflıkta elde edilmesinde genellikle bileşiği içeren bitkisel kaynakların farklı zenginleştirme ve saflaştırma tekniklerine tabi tutulmasından yararlanılmaktadır. Ancak bu tekniklerin pahalı ve uygulamada zor olması ve istenen hedefe ulaşabilmek için çok fazla teknik kullanılması gerekliliği elde edilecek ürünün maliyetini artırmaktadır. Dolayısıyla devamlı olarak D-pinitol bakımından zengin olan kaynaklardan daha basit yollarla D-pinitol elde edilmesine yönelik araştırmalar yapılmaktadır.

Ticari olarak D-pinitol elde edilmesinde genel olarak iyon değiştirici reçine kullanımı, aktif kömür kromatografisi, solvent ekstraksiyonu gibi pahalı teknikler tercih edilmekte ve materyal olarak da soya fasulyesi kullanılmaktadır. Oysaki soya fasulyesine göre daha yüksek D-pinitol içeriğine sahip olan keçiboynuzunun bu amaçla kullanılmasına ve bu meyveden elde edilecek D-pinitol için araştırmalar yapılmasına yakın zamanda başlanmıştır. Dolayısıyla bu meyve ve meyveden elde edilecek D-pinitol üzerine farklı tekniklerin etkisinin daha ayrıntılı bir şekilde araştırılması gerekmektedir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların aynı konuda araştırma yapacak diğer araştırmacılara ışık tutacağı ve endüstriyel açıdan meyvenin bu yönüyle daha da değerli hale geleceği düşünülmektedir.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren ve benden desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa KARHAN'a, çalışmalarım esnasında değerli fikirleriyle beni yönlendiren Sayın Doç. Dr. İrfan TURHAN ve Sayın Doç. Dr. Nedim TETİK'e, kurutma analizi için sistemlerini kullanmama müsaade eden Sayın Prof. Dr. Ayhan TOPUZ ve Sayın Prof. Dr. Ahmet KÜÇÜKÇETİN'e ve bu analizde yardımlarını gördüğüm Sayın Arş. Gör. İsmail TONTUL ve Sayın Gıda Mühendisi Aysen Güher GÜNDEŞ'e, etanol fermentasyonunu ve fermentasyon sonrasındaki analizleri gerçekleştirmemde yardımcı olan Sayın Gıda Yüksek Mühendisi Ercan YATMAZ'a ve Sayın Arş. Gör. Mustafa GERMEÇ'e, proje kapsamında diğer bazı analizlerde katkıları bulunan Sayın Dr. Aslı ARSLAN KULCAN ve Sayın Gıda Yüksek Mühendisi TUBA AKKOYUN'a, projeyi destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, bu süreçte maddi ve manevi desteğini benden hiç esirgemeyen

ve beni yalnız bırakmayan hayat arkadaşım, eşim Hilmi ÖZİYCI'ye, mutluluk kaynağım biricik kızım İlknur Aylin ÖZİYCI'ye ve yoğun çalışma sürecimde benden desteklerini esirgemeyen anne-babalarımıza çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT..... | i |
| ÖNSÖZ..... | i |
| İÇİNDEKİLER..... | iii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | vii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | x |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI..... | 1 |
| 2.1. Keçiboynuzu Meyvesinin Fiziksel Yapısı, Yetiştirme Koşulları ve Üretildiği Ülkeler..... | 1 |
| 2.2. Keçiboynuzu Meyvesinin Kimyasal Kompozisyonu..... | 3 |
| 2.3. Keçiboynuzunun Kullanım Alanları | 7 |
| 2.3.1. Keçiboynuzu gamı (Locust Bean Gum)..... | 8 |
| 2.3.2. Metabolik fermentasyon ürünlerinin üretimi..... | 9 |
| 2.3.3. Diğer kullanım alanları..... | 12 |
| 2.4. D-pinitolün Kimyasal Yapısı, Bitkilerde Oluşum Mekanizması, Bulunduğu Kaynaklar ve Bitki Bünyesinde Sentezlenmesini Teşvik Eden Faktörler..... | 16 |
| 2.5. D-pinitolün Sağlık Üzerine Etkileri | 20 |
| 2.6. D-pinitolün Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması Üzerine Yapılan Çalışmalar .. | 21 |
| 2.7. D-pinitolün Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması Amacıyla Yapılan Çalışmalarda Yaygın Olarak Kullanılan Teknikler Hakkında Bazı Bilgiler..... | 27 |
| 2.7.1. Solvent ekstraksiyonu tekniği..... | 27 |
| 2.7.2. Adsorpsiyon tekniği..... | 29 |
| 2.7.3. İyon değiştirme tekniği..... | 30 |
| 2.8. Araştırma Kapsamında Kullanılan Teknikler Hakkında Bazı Bilgiler | 33 |
| 2.8.1. Enzim uygulama..... | 33 |
| 2.8.2. Durultma..... | 35 |
| 2.8.3. Ultrafiltrasyon..... | 37 |
| 2.8.4. CaO ile muamele (Steffen işlemi)..... | 39 |
| 2.8.5. Kristalizasyon..... | 41 |
| 2.8.6. Etanol fermentasyonu..... | 42 |

| | |
|--|-----|
| 3. MATERYAL ve METOT..... | 47 |
| 3.1. Materyal | 47 |
| 3.2. Metot | 47 |
| 3.2.1. Araştırmanın genel iş akış şeması..... | 47 |
| 3.2.2. Zenginleştirme metotları..... | 48 |
| 3.2.3. Analiz metotları..... | 54 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 57 |
| 4.1. Ön denemeler | 57 |
| 4.1.1. Enzim uygulaması işleminin optimizasyonu..... | 57 |
| 4.1.2. Sıcak durultma işleminin optimizasyonu..... | 59 |
| 4.1.3. Ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonu..... | 60 |
| 4.1.4. CaO uygulama işleminin optimizasyonu..... | 64 |
| 4.1.5. Etanol fermentasyonunun optimizasyonu..... | 67 |
| 4.2. Araştırma Kapsamında Yapılan Denemeler | 69 |
| 4.2.1. Birinci deneme..... | 69 |
| 4.2.2. İkinci deneme..... | 73 |
| 4.2.3. Başlangıç ekstraktının ve denemelerin son aşamalarından elde edilen ekstraktların bazı tanımlayıcı değerlerinin kıyaslanması..... | 75 |
| 4.2.4. Araştırma haricinde tasarlanan üçüncü deneme..... | 76 |
| 4.2.5. Düşük gözenek çapına sahip membran filtrelerle yapılan membran filtrasyonun D-pinitolün zenginleştirilmesine etkisi..... | 81 |
| 5. SONUÇLAR..... | 84 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 88 |
| 7. EKLER..... | 102 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

| | |
|-----------------|--|
| Å | Angstrom |
| °Baume | Sıvıların yoğunluğunu ölçmede kullanılan skala |
| °Bx | Sulu bir çözeltinin sakkaroz cinsinden şeker içeriği |
| °C | Celsius |
| dm ³ | Desimetre küp |
| g | Gram |
| kDa | Kilo Dalton |
| kg | Kilogram |
| L | Litre |
| m | Metre |
| m ² | Metrekare |
| mL | Mililitre |
| mm | Milimetre |
| µ | Mikro |
| nm | Nanometre |
| rpm | Revolutions per minute |
| % T | % Transmittance |
| U | Unit |

Kısaltmalar

| | |
|------------------|---|
| AIDS | Acquired immunodeficiency syndrome |
| C | CaO ile muamele sonrası |
| CYM | Cevap yüzey metodu |
| D | Durultma sonrası |
| DCI | D- <i>chiro</i> -inositol |
| DPPH | 1 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl |
| E | Ekstraksiyon sonrası |
| EMP | Embden-Meyerhof-Parnas |
| F | Fermentasyon sonrası |
| FE | Evaporasyon sonrası |
| HDL | High density lipoprotein |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IE | İnvertaz uygulanan; ekstraksiyon sonrası |
| ID | İnvertaz uygulanan; durultma sonrası |
| IU | İnvertaz uygulanan; ultrafiltrasyon sonrası |
| IF | İnvertaz uygulanan; fermentasyon sonrası |
| IFE | İnvertaz uygulanan; evaporasyon sonrası |
| LBG | Locust bean gum |
| LDL | Low density lipoprotein |
| M/G | Mannoz/glukoz oranı |
| MF | Mikrofiltrasyon |
| MI | <i>myo</i> -inositol |
| MIPS | L- <i>myo</i> -inositol 1-fosfat sentaz |
| NAD ⁺ | Nikotinamid adenin dinükleotit |

| | |
|-------------------------|---------------------------------------|
| NADP | Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat |
| NF | Nanofiltrasyon |
| N ⁵ -met-THF | N ⁵ -metil-tetrahidrofolat |
| PES | Polietersülfon |
| PGNU | Poligalakturonaz |
| RO | Reverse osmosis |
| SAM | S-adenozil metiyonin |
| SAH | S-adenozil homosistein |
| SÇKM | Suda çözünür kuru madde |
| STZ | Streptozotosin |
| TA | Toplam asitlik |
| TKM | Toplam kuru madde |
| U | Ultrafiltrasyon sonrası |
| UF | Ultrafiltrasyon |
| UV | Ultra viyole |
| w/w | Weight/weight |
| w/v | Weight/volume |
| v/v | Volume/volume |
| VLDL | Very low density lipoprotein |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin önemli kısımları: Meyve eti (A ve B), Çekirdek (C) | 1 |
| Şekil 2.2. Dünyada keçiboynuzunun üretildiği bölgeler | 3 |
| Şekil 2.3. Dünyada keçiboynuzu üretimi yapan başlıca ülkeler | 3 |
| Şekil 2.4. Fermente keçiboynuzu ekstraktında gaz kromatografisi ile analiz edilen şeker alkollerini (1: Ksilitol (internal standart), 2: D-pinitol, 3: Sorbitol ve <i>chiro</i> -inositol, 4: Sequoyitol, ononitol ve bornestiol, 5: <i>myo</i> -inositol, 6: Belirlenemeyen disakkaritler)..... | 7 |
| Şekil 2.5. Galaktomannan polisakkaritinin yapısı | 8 |
| Şekil 2.6. Keçiboynuzu çekirdeğinin yapısı ve bileşimi | 9 |
| Şekil 2.7. Türkiye'nin orman yangınlarına karşı hassasiyet durumu..... | 15 |
| Şekil 2.8. Türkiye'de bulunan bazı Orman Bölge Müdürlükleri'nin on yıllık yangın ortalamaları..... | 16 |
| Şekil 2.9. Keçiboynuzu ağaçlarının yangına dirençliliği | 16 |
| Şekil 2.10. İnositollerin yapısı: (a) <i>D-chiro</i> inositol, (b) D-pinitol, (c) <i>myo</i> -inositol | 17 |
| Şekil 2.11. Baklagil tohumlarında bulunan esas siklitollerin ve metil-siklitollerin sentezlenmesindeki metabolik iz yolları..... | 18 |
| Şekil 2.12. Metil döngüsüne bağlı inositolden D-pinitol sentezi | 19 |
| Şekil 2.13. D-pinitolün kan şekeri seviyesinin artışı mekanizmasındaki etkisi..... | 21 |
| Şekil 2.14. Benzenden D-pinitol sentezlenmesi..... | 22 |
| Şekil 2.15. Osmotik strese maruz bırakılan ve bırakılmayan (Kontrol) <i>M. crystallinum</i> bitkisinin <i>IMT1</i> aktivitesi | 22 |
| Şekil 2.16. <i>myo</i> -inositolün (MI) <i>D-chiro</i> -inositole (DCI) biyodönüşümü (Beyaz yuvarlaklar: Hücre gelişimi-optik yoğunluk, Siyah yuvarlaklar: DCI/MI konsantrasyonu) | 23 |
| Şekil 2.17. Gelişen embryonik dokuların 0., 2. ve 4. Haftalardaki ononitol (A) ve D-pinitol (B) seviyeleri (Noktalı çizgi kontrol (Jack) grubunun D-pinitol seviyesini göstermektedir) | 24 |
| Şekil 2.18. Yüksek saflıkta D-pinitol elde edilmesine yönelik model çalışma (Shin vd 2003)..... | 26 |
| Şekil 2.19. Yüksek saflıkta D-pinitol elde edilmesine yönelik başka bir model çalışma | 27 |
| Şekil 2.20. İvertazın etki mekanizması | 33 |
| Şekil 2.21. Pektolitik enzim aktivitesinin meyve dokuları üzerine etkisi..... | 35 |

| | |
|--|----|
| Şekil 2.22. Bazı membran filtrasyon sistemlerinin gözenek çapları..... | 37 |
| Şekil 2.23. Çapraz-akış filtrasyonu..... | 38 |
| Şekil 2.24. Ultrafiltrasyon membran yüzeyinden kolloidal veya tanecikli maddelerin uzaklaştırılması ve membran yüzeyi kirlenmesinin şematik gösterimi..... | 39 |
| Şekil 2.25. Sakkarozun tri kalsiyum sakkarat formunda presipitasyonu..... | 40 |
| Şekil 2.26. Sakkarozun çözünürlüğü ve aşırı doygunluğu (X: Konsantrasyon, kg/kg su; β : Aşırı doygunluk oranı)..... | 42 |
| Şekil 2.27. Maya hücresinin şeker kullanımında glikolitik iz yolu (Embden-Meyerhof-Parnas)..... | 44 |
| Şekil 2.28. Enerji ve hücre döngüsü..... | 45 |
| Şekil 3.1. Aşılı keçiyoynuzu meyvesinin meyve eti ve çekirdeği..... | 47 |
| Şekil 3.2. Araştırmanın genel iş akış şeması..... | 48 |
| Şekil 3.3. Keçiyoynuzu ekstraktının durultulması..... | 49 |
| Şekil 3.4. Sıcak durultma sonrası keçiyoynuzu ekstraktında oluşan tortu kısmı..... | 50 |
| Şekil 3.5. Durultulan keçiyoynuzu ekstraktının filtre edilmesi..... | 50 |
| Şekil 3.6. Optimize edilmiş parametreler kullanılarak ekstraktların ultrafiltre edilmesi..... | 51 |
| Şekil 3.7. Steffen işlemi iş akış şeması..... | 52 |
| Şekil 3.8. Keçiyoynuzu ekstraktının evaporatörde kristalizasyonu..... | 53 |
| Şekil 3.9. YSI Biyoanalitik sistemi..... | 56 |
| Şekil 4.1. Ultrafiltrasyon düzeneği..... | 62 |
| Şekil 4.2. CaO uygulama işleminden görüntüler (A: Soğutma aşaması, B: Filtrasyon aşaması, C: Filtre keki)..... | 64 |
| Şekil 4.3. CaO ile temas süresinin optimizasyonu..... | 65 |
| Şekil 4.4. Soğutma-ısıtma aşamalarında beklenecek sürenin optimizasyonu..... | 66 |
| Şekil 4.5. CaO miktarının optimizasyonu..... | 67 |
| Şekil 4.6. Reaktörde etanol fermentasyonu..... | 68 |
| Şekil 4.7. Etanol fermentasyonunun süresinin optimizasyonu..... | 69 |
| Şekil 4.8. Keçiyoynuzu ekstraktının evaporasyonu..... | 70 |
| Şekil 4.9. Birinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol miktarlarındaki değişim..... | 71 |
| Şekil 4.10. Birinci denemenin farklı aşamalarındaki şeker ve D-pinitol değişimleri..... | 72 |
| Şekil 4.11. İkinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol miktarlarındaki değişim..... | 74 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.12. İkinci denemenin farklı aşamalarındaki şeker ve D-pinitol değişimleri | 75 |
| Şekil 4.13. Üçüncü deneme için tasarlanan iş akış şeması | 78 |
| Şekil 4.14. Dondurarak kurutucudan elde edilen keçiboynuzu ekstraktı (Liyo)..... | 79 |
| Şekil 4.15. Üçüncü denemenin farklı aşamalarında alınan örneklerin şeker konsantrasyonlarındaki değişim | 80 |
| Şekil 4.16. Üçüncü denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin D-pinitol konsantrasyonundaki değişim..... | 80 |
| Şekil 4.17. Farklı gözenek çapına sahip membran filtrelerden geçirilen keçiboynuzu ekstraktının D-pinitol konsantrasyonu..... | 82 |
| Şekil 7.1. Keçiboynuzundan elde edilen ham polifenolik fraksiyonu ve diğer polifenolik bileşenlerin β -karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi..... | 104 |
| Şekil 7.2. Keçiboynuzundan elde edilen ham polifenolik fraksiyonu ve diğer polifenolik bileşenlerin DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi | 104 |
| Şekil 7.3. Ultrafiltre edilen örneklerin sakkaroz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği | 111 |
| Şekil 7.4. Ultrafiltre edilen örneklerin glukoz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği | 111 |
| Şekil 7.5. Ultrafiltre edilen örneklerin D-pinitol içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği | 112 |
| Şekil 7.6. Ultrafiltre edilen örneklerin fruktoz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği | 112 |
| Şekil 7.7. CaO ile temas süresinin optimizasyonunda farklı işlem aşamalarında şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim..... | 113 |
| Şekil 7.8. CaO işleminin soğutma ve ısıtma aşamalarında beklenilmesi gereken süre için yapılan deneme | 114 |
| Şekil 7.9. CaO işleminde ilave edilecek CaO miktarının belirlenmesi için yapılan deneme | 115 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----|
| Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin kimyasal kompozisyonu..... | 4 |
| Çizelge 2.2. Keçiboynuzunda bulunan bazı mineral maddeler..... | 5 |
| Çizelge 2.3. Keçiboynuzunda* bulunan bazı polifenolik bileşikler | 5 |
| Çizelge 2.4. Keçiboynuzunun yağ asidi kompozisyonu | 6 |
| Çizelge 2.6. Reçine kolonundan geçirilen ekstraktların siklitol geri kazanımları | 25 |
| Çizelge 2.7. Soya sütü peynir altı suyunda gelişen farklı mikroorganizmaların serbest formda D-pinitol oluşturmaları | 25 |
| Çizelge 2.8. Yaygın olarak kullanılan solventlerin azalan polariteye göre sıralanması .. | 28 |
| Çizelge 2.9. Sıvıların saflaştırılmasında kullanılan ticari adsorpsiyon ayırma yöntemlerine örnekler | 30 |
| Çizelge 2.10. Temel iyon değiştirme uygulamalarına örnekler | 31 |
| Çizelge 2.11. Pektolitik enzimlerin sınıflandırılması..... | 34 |
| Çizelge 2.12. Ana fermentasyon ürünü olarak etanol üreten mikroorganizmalar | 43 |
| Çizelge 3.13. Ultrafiltrasyon aşamasının optimizasyonu için kullanılan parametreler .. | 51 |
| Çizelge 3.14. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> için gerekli besiyeri bileşimi..... | 53 |
| Çizelge 4.1. Pektolitik enzim miktarını belirlemek için yapılan ön denemenin sonuçları | 57 |
| Çizelge 4.2. İnvertaz enzimi miktarı ve inkübasyon süresini belirlemek için yapılan ön deneme sonuçları..... | 59 |
| Çizelge 4.3. Sıcak durultma denemeleri sonucu elde edilen ekstraktların görsel durumu ve ışık geçirgenliği (% T) değerleri..... | 60 |
| Çizelge 4.4. Box-Behnken CYM ile oluşturulan ultrafiltrasyon şartları | 61 |
| Çizelge 4.5. Box-Behnken CYM ile oluşturulan parametre kombinasyonu kullanılarak yapılan ultrafiltrasyon işlemleri ile elde edilen filtrat kısımlarının içeriği .. | 63 |
| Çizelge 4.6. Keçiboynuzu ekstraktının başlangıç örneğinde ve denemelerin son aşamalarından elde edilen örneklerde yapılan bazı tanımlayıcı değerlerin bulguları..... | 76 |
| Çizelge 4.7. Üçüncü denemeden elde edilen başlangıç ve son ekstraktlara ait bazı kimyasal değerler | 81 |
| Çizelge 7.1. Ultrafiltre edilen örneklerin sakkaroz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri | 107 |
| Çizelge 7.2. Ultrafiltre edilen örneklerin glukoz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri | 108 |

| | |
|---|-----|
| Çizelge 7.3. Ultrafiltre edilen örneklerin D-pinitol içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri..... | 109 |
| Çizelge 7.4. Ultrafiltre edilen örneklerin fruktoz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri..... | 110 |

1. GİRİŞ

Bilimsel araştırmalar diyetlerle alınan gıdaların değişik vücut fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle gıdaların içerdikleri fonksiyonel bileşiklerin bazı hastalıkların azaltılmasında/oluşumunun önlenmesinde etkili olabileceğine dair birçok *in vivo* ve *in vitro* çalışma yürütülmektedir. Elde edilen bulgular nedeniyle de bu fonksiyonel bileşiklerin gıda takviyesi olarak günlük diyetlerde alınmasına yönelik bir eğilim gelişmektedir. Bu bileşiklerin elde edilmesi kimyasal veya moleküler tekniklerle sentezlenebilmeleriyle mümkün olabileceği gibi bu bileşikleri ihtiva eden gıda matrikslerinden uygun tekniklerle ayrıştırılmaları ile de sağlanabilmektedir. Ancak kimyasal veya moleküler tekniklerle ilgili bileşiklerin üretiminin hem çok zor hem de maliyetli oluşu üreticileri bu bileşiklerce zengin gıda matrikslerini kullanma ve uygun tekniklerin belirlenmesi ile ilgili fonksiyonel bileşiğin elde edilmesi yoluna itmektedir.

Son yıllarda fonksiyonelliği yapılan birçok araştırma ile ortaya konan bileşiklerden birisi de D-pinitol olmuştur. D-pinitol özellikle insülin benzeri bir etkiye sahip olduğu için (Bates vd 2000) insülinin insan vücudundaki temel mekanizmasıyla ilişkili birçok hastalığın tedavisinde de yararlanılabilecek potansiyel bir bileşik haline gelmiştir. Dolayısıyla bu bileşiğin gıda takviyesi amacıyla kullanılabilmesi için farklı kaynaklardan ekstrakte edilebilmesi veya üretilebilmesine yönelik birçok araştırma yapılmıştır.

D-pinitolün ekstraksiyonu amacıyla en çok kullanıldığı kaynak soya fasulyesi olmuştur. Dolayısıyla bu bileşiğin soya fasulyesinden yüksek saflıkta elde edilmesine yönelik değişik çalışmalar tanımlanmış ve bu çalışmalardan elde edilen bulgular da patent altına alınmıştır (Streeter 2001; Shin vd 2003). Ancak soya fasulyesinde bu bileşiğin % 1 (kuru ağırlık) düzeyinde olması (Phillips vd 1982), zenginleştirme ve saflaştırma çalışmalarının aynı bileşiği daha yüksek oranda içeren başka materyallerin de araştırılması konusunu gündeme getirmiştir. Bu kapsamda bileşiminin % 5-7'sini D-pinitolün oluşturduğu (Baumgartner vd 1986; Tetik vd 2011b) keçiboynuzu meyvesi de bu çalışmalarda kullanılmaya başlamıştır (Camero ve Merino 2004).

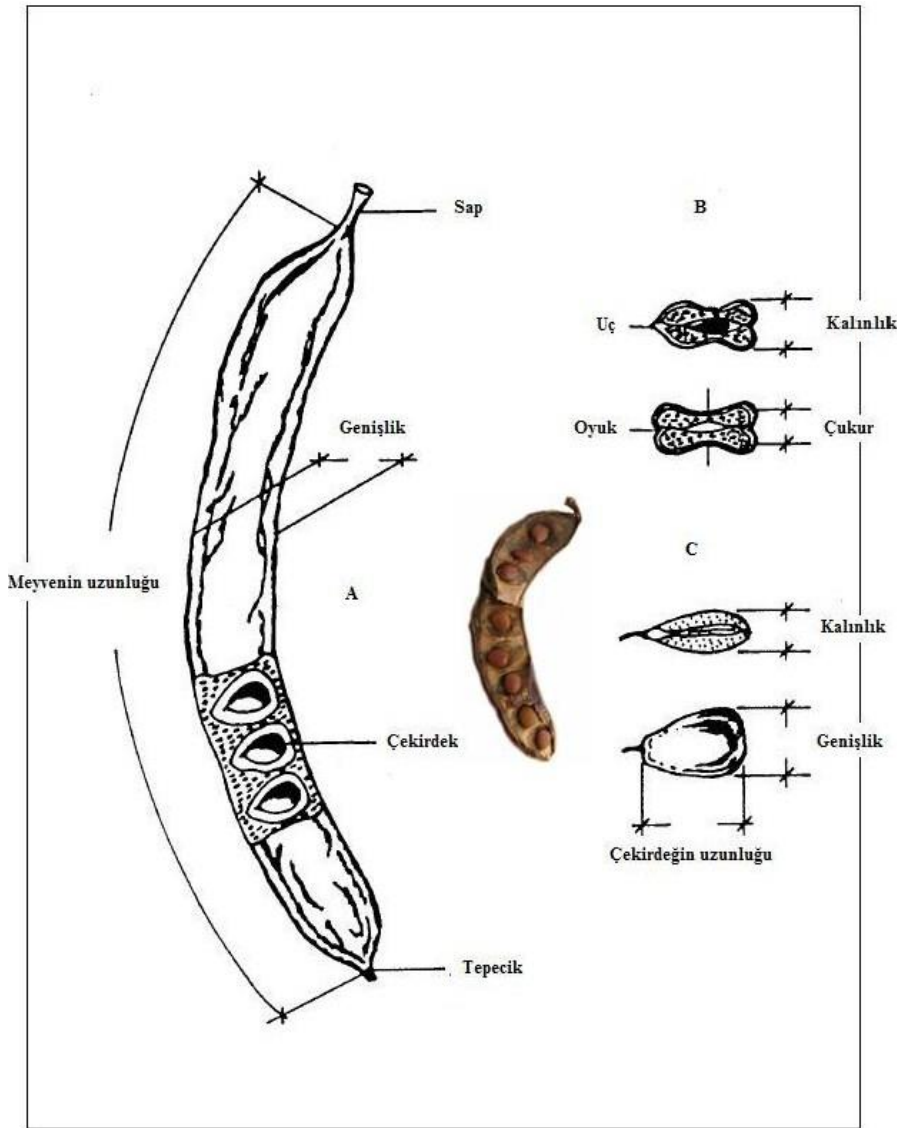
D-pinitol ve türevlerinin yüksek saflıkta elde edilmesine yönelik güncel çalışmaların pek çoğu birden fazla saflaştırma aşaması kullanmaktadır. Bu aşamalarda yaygın olarak kullanılan işlemler ise mikrobiyal fermentasyon, iyon değiştirme reçinelerinin kullanımı, aktif kömür ile afinasyon, solvent ekstraksiyonu gibi pahalı ve uygulanması zor olan tekniklerdir. Uygulanan tekniğin kompleks oluşuna bağlı olarak da son ürünün maliyeti o oranda artmaktadır. Dolayısıyla bu anlamda değerlendirildiğinde D-pinitolün, zengin olduğu bir materyalden daha kolay ve ucuz tekniklerle elde edilmesi önemlidir.

Bu tez çalışmasında keçiboynuzu meyvesinden D-pinitol ekstraksiyonu üzerine farklı işlemlerin etkisi incelenmiştir. Bu kapsamda enzim uygulama, sıcak durultma, CaO uygulama, ultrafiltrasyon, etanol fermentasyonu, kristalizasyon ve etanolik solvent ekstraksiyonu gibi farklı teknikler denenerek bu tekniklerin keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün ekstraksiyonunu kolaylaştırmadaki etkileri araştırılmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Keçiboynuzu Meyvesinin Fiziksel Yapısı, Yetiştirme Koşulları ve Üretildiği Ülkeler

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Rosales takımı Leguminosae (Fabaceae) familyasının Caesalpinioideae alt familyasına ait çok yıllık bir bitki cinsidir (Batlle ve Tous 1997). Meyve eti (% 80-90) ve çekirdek (% 10-20) kısımlarından oluşan (Naghmouchi vd 2009; Tetik vd 2011a) keçiboynuzu düz veya kıvrık yapıdadır ve genellikle 10-30 cm uzunluğa, 1.5-3.5 cm genişliğe ve 1 cm kalınlığa sahiptir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin önemli kısımları: Meyve eti (A ve B), Çekirdek (C) (Batlle ve Tous 1997)

Meyve yüzeyi kırışık görünümlüdür ve olgun meyvelere dokunulduğunda derimsi bir izlenim bırakmaktadır. Meyve eti perikarp olarak adlandırılan derimsi dış tabaka ve

mezokarp olarak adlandırılan yumuşak iç bölgeden oluşmaktadır. Çekirdekler meyvede enine oluşur ve mezokarp tabakasından ayrılır. Çekirdekler genellikle oval-dikdörtgen şeklindedir ve boyutları da 8-10 mm x 7-8 mm x 3-5 mm (uzunluk-genişlik-kalınlık) civarındadır (Şekil 2.1) (Batlle ve Tous 1997).

Keçiboynuzu her dem yeşil olan bir bitkidir. Soğuk olmayan, baharları hafif sıcak, yazları ise hafif yağmurlu ve sıcak bir iklim özelliğine sahip olan Akdeniz ikliminde iyi gelişir. Olgun ağaçların soğuk zararı görmemesi gerekir. Bu nedenle bitki ancak -7°C'den düşük olmayan kış sıcaklıklarına karşı dayanabilmektedir (Zografakis ve Dasenakis 2000). Her ne kadar keçiboynuzu ağacı yazları 40 °C'nin üzerinde seyreden sıcak havaya ve esen kuru rüzgârlara karşı dayanıklı da olsa hasat edilecek meyvenin ticari kalitesi için yeterli düzeyde yağış almalıdır (Rachie 1979).

Keçiboynuzunun sıcaklık isteği ortalama 24 °C olup özellikle 30-45 °C aralığında iyi gelişim gösterdiği ifade edilmektedir. Günümüzde keçiboynuzunun yayılış gösterdiği alanların yıllık sıcaklık ortalaması genellikle 20 °C'nin üzerindedir (Bkz. EK-1). Kuzey yarım kürede meyvenin olgunlaşmaya başlaması Haziran-Temmuz aylarında olmakta ve sıcaklıklar ortalama 26-35 °C'yi bulmaktadır. Güney yarım kürede ise Ocak-Şubat ayları meyvenin olgunluk sürecinin başlangıcıdır ve bu dönemde sıcaklıklar ortalama 29-30 °C'dir (Grados ve Cruz 1996). Bitki dona karşı oldukça duyarlıdır ve bu durum verime yansıtmaktadır. Sıcaklık ve ışık isteği yüksek olan bitkinin meyvesi, ideal sıcaklık koşullarına kavuştuğu yerlerde o derece iyi kaliteye sahip olmaktadır. Bu kapsamda, Türkiye'de kuzeye doğru gidildikçe İzmir civarında çalı formunu almakta (Günel 1998), Hırvatistan'ın Adriyatik kıyılarından uzaklaştıkça ise meyveler küçülmektedir.

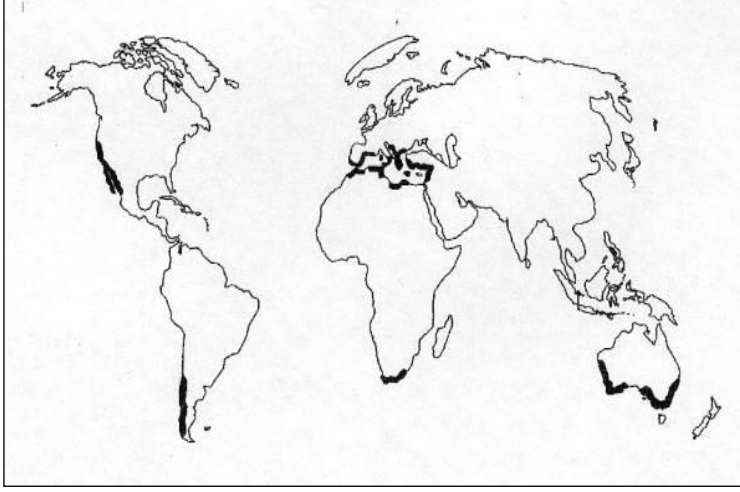
Bitki, kuraklığa karşı oldukça dayanıklı olup, oldukça derinlere inen (20 – 25 m) kök sistemine sahiptir. Bu sayede şiddetli kuraklıkların yaşandığı dönemlerde bile meyve verebilmektedir. Bitkinin gelişebilmesi için yıllık ortalama 500 – 600 mm yağış ideal olmakla birlikte meyvenin oluşabilmesi için en az yıllık 350 mm yağış alması gerekmektedir (Grados ve Cruz 1996; Batlle ve Tous 1997; Demirtaş 2007). Keçiboynuzunun ışık isteğinin yüksek olması, bulutlu gün sayısının az olmasına bağlıdır. Buna bağlı olarak su ihtiyacını karşıladığı yağışlı günlerin kısalması ise oldukça önemlidir. Nitekim yağışlı gün sayısı, Mersin'de 72.2, Antalya'da 77.3, Muğla'da 96.3 ve Adana'da 81.6 gün olarak belirlenmiştir (Taşlıgil 2011).

Bitkinin gelişmesi açısından en ideal toprak yapısı nötr, asit düzeyi düşük ve hafif bünyeli olan toprak yapısıdır. Bitki ayrıca çoğunlukla kumlu topraklarda iyi gelişmektedir (Taşlıgil 2011). Ayrıca yüksek kireç içeriğine sahip kalkerli topraklarda da iyi gelişebilir.

Bitkinin tuza karşı toleransı da oldukça iyidir. Nitekim Winer (1980) yaptığı çalışmada bitkinin % 3'e varan düzeyde NaCl içeren toprağa tolerans gösterebildiğini tespit etmiştir. Derin olmayan taşlı toprak alanlarda keçiboynuzu ağacının boyutu ve üretkenliği azalabilmektedir (Batlle ve Tous 1997).

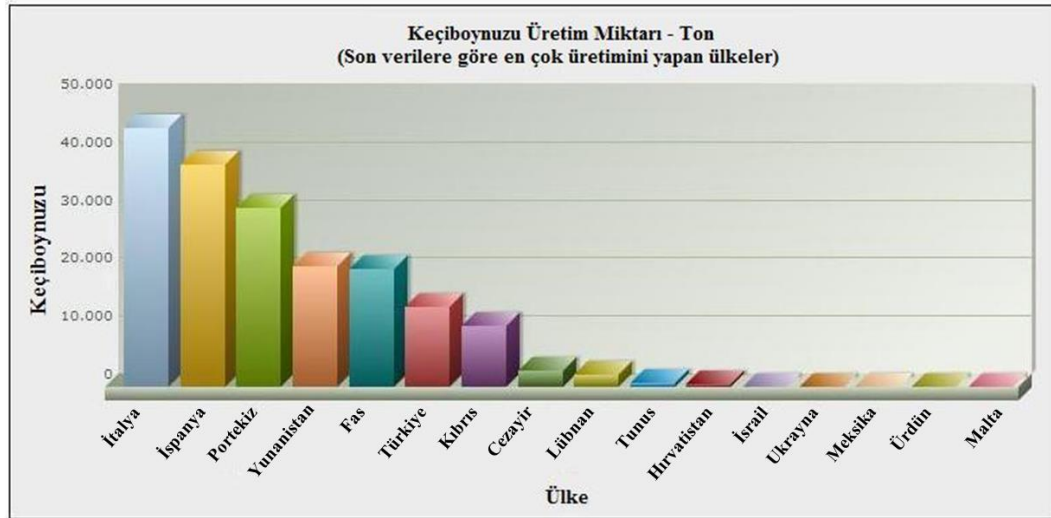
Dünyada keçiboynuzu meyvesinin üretimini ve ihracatını yapan en önemli ülkeler olan İtalya, İspanya, Portekiz, Yunanistan ve Fas'ın 2011 yılı yıllık üretim kapasiteleri sırasıyla 44,749 ton, 38,380 ton, 31,067 ton, 20,901 ton ve 20,489 ton olarak bildirilmiştir (Şekil 2.2 ve 2.3) (Zografakis ve Dasenakis 2000; Anonymous 2013a, 2014a). İspanya

genel olarak dünyada keçiboynuzu üretimi ve ihracatının en çok yapıldığı ülke olmakla birlikte Gıda ve Tarım Organizasyonu tarafından bildirilen 2011 yılı verilerine göre yıllık üretim kapasitesinde İtalya'nın gerisinde kalmıştır.



Şekil 2.2. Dünyada keçiboynuzunun üretildiği bölgeler (Zografakis ve Dasenakis 2000)

Türkiye ise, artan üretim miktarı ve ürün kapasitesi ile bu ülkeleri altıncı sırada takip etmektedir. Nitekim 2008 yılında Türkiye'nin keçiboynuzu yetişen toplam alanı 2,850 hektar ve bu alanlardan elde edilen toplam ürün miktarı 12,097 ton iken, 2011 yılında toplam alan 2,910 hektara ve bu alanlardan elde edilen toplam ürün miktarı ise 13,972 tona ulaşmıştır (Anonymous 2013a).



Şekil 2.3. Dünyada keçiboynuzu üretimi yapan başlıca ülkeler (Anonymous 2014a)

2.2. Keçiboynuzu Meyvesinin Kimyasal Kompozisyonu

Keçiboynuzu meyvesinin kimyasal kompozisyonu birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Avallone vd 1997; Yousif ve Alghzawi 2000; Kumazawa vd 2001; Biner vd 2007; Özcan vd 2007; Khelifa vd 2013; Oziyci vd 2014). Yapılan çalışmalar

incelendiğinde özellikle meyvenin şekerler ve mineral maddeler açısından zengin bir içeriğe sahip olduğu görülmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Keçiboynuzu meyvesinin kimyasal kompozisyonu

| Parametre | Konsantrasyon (g/100g) |
|------------------------|-------------------------------|
| Nem | 5.29-11.07 |
| Protein | 2.74-6.00 |
| Yağ | 0.23-1.15 |
| Diyet lifi | 6.90-10.99 |
| Tanen | 3.15-4.37 |
| Toplam kül | 2.79-2.99 |
| Toplam şeker | 45.00-71.90 |
| Siklik şeker alkolleri | 3.6-12.6 |

KAYNAK: (Avallone vd 1997; Yousif ve Alghzawi 2000; Kumazawa vd 2001; Camero ve Merino 2004; Biner vd 2007; Özcan vd 2007; Khelifa vd 2013; Youssef vd 2013)

Keçiboynuzundaki baskın şekerler sakkaroz (29.9-38.4 g/100 g), glukoz (3.3-3.72 g/100 g) ve fruktozdur (5.58-11.5 g/100 g) (Avallone vd 1997; Biner vd 2007). Bu şekerlerin haricinde meyvede ksiloz ve maltoz gibi diğer şekerler de az miktarda bulunmaktadır (Petit ve Pinilla 1995).

Literatürde keçiboynuzundaki baskın şekerlerin konsantrasyonlarında meyve tipine göre değişim meydana geldiği ifade edilmektedir. Nitekim Biner vd (2007)'nin aşılı ve yabani keçiboynuzu tiplerinin şeker profili üzerine yaptıkları araştırmada her iki tipte de hâkim şekerlerin sakkaroz, fruktoz ve glukoz olduğu bildirilmiştir. Bu şekerlerden sakkaroz ve fruktozun aşılı tiplerde (38.4 g/100 g-sakkaroz ve 11.5 g/100 g-fruktoz) yabani tiplere (29.9 g/100 g-sakkaroz ve 10.2 g/100 g-fruktoz) göre daha yüksek konsantrasyonda, glukozun ise daha düşük konsantrasyonda bulunduğu (3.3 g/ 100 g-aşılı ve 3.68 g/100 g-yabani) tespit edilmiştir. Turhan (2014)'ın farklı keçiboynuzu tiplerine ait şeker profilleri ile D-pinitol konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi incelediği çalışmada ise aşılı keçiboynuzu meyvelerinin yabani tiplere göre daha yüksek oranda sakkaroz (43.7 g/100 g-aşılı, 35.5 g/100 g-yabani) ve daha düşük oranda glukoz (9.2 g/100 g-aşılı ve 9.78 g/100 g-yabani) ve fruktoz içeriğine (5.73 g/100 g-aşılı ve 6.45 g/100 g-yabani) sahip olduğu belirtilmiştir.

Şeker içeriğinin yanı sıra mineral madde (% 1-6) içeriği ile de dikkat çeken keçiboynuzunda bu mineral maddelerden özellikle kalsiyum, potasyum, magnezyum, sodyum, fosfor ve demirin önemli miktarda bulunduğu bildirilmektedir (Çizelge 2.2) (Özcan vd 2007; Oziyci vd 2014). Meyvenin mineral madde konsantrasyonu sıcaklık (Cruz vd 1993), kuraklık (Nunes vd 1992), sulama ve aşılama (Correia ve Martins-Loução 1997), tuzluluk (El-Dengawy vd 2011) vb. çevresel faktörlere bağlı olarak değişim gösterebilmektedir.

Çizelge 2.2. Keçiboynuzunda bulunan bazı mineral maddeler

| Mineral Madde | Konsantrasyon (g/100 g; Yaş ağırlık) |
|---------------|--------------------------------------|
| Potasyum | 45.69-148.24 |
| Magnezyum | 8.63-9.63 |
| Fosfor | 7.71-32.62 |
| Sodyum | 1.06-7.58 |
| Kalsiyum | 11.23-29.11 |
| Mangan | 0.03-0.54 |
| Bakır | 0.03-0.27 |
| Demir | 0.21-2.56 |
| Çinko | 0.05-0.13 |

KAYNAK: (Özcan vd 2007; Khelifa vd 2013; Youssef vd 2013)

Keçiboynuzunun polifenol içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerine de bazı araştırmalar yapılmıştır. Papagiannopoulos vd (2004) keçiboynuzunun 44.82 mg/100 g düzeyinde ekstrakte edilebilir toplam fenolik madde içerdiğini ve bu maddelerin genel olarak gallik asit, hidrolize edilebilir tanenler, kondanse tanenler, flavonol-glikozidler ve iz miktarda da izoflavonoidlerden oluştuğunu bildirmiştir (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Keçiboynuzunda* bulunan bazı polifenolik bileşikler (mg/100g)

| | |
|-------------------------------|-------|
| Gallik asit | 17.41 |
| Hidrolize edilebilir tanenler | 2.63 |
| Kondanse tanenler | 1.48 |
| Mirisetin türevleri | 17.11 |
| Kuersetin türevleri | 5.33 |
| Kaempferol türevleri | 0.86 |

*: Meyvenin çekirdekleri çıkarılmasıyla elde edilen meyve eti kısmı, KAYNAK: (Papagiannopoulos vd 2004)

Üretim işleminin keçiboynuzu ve keçiboynuzundan üretilen farklı ürünlerin (keçiboynuzu gamı ve şurubu) fenolik madde miktarı üzerine de etkili olduğunu ifade eden Papagiannopoulos vd (2004) (Bkz. EK-2), meyvedeki polifenolik maddelerin çoğunluğu meyve eti kısmında yer aldığını tespit etmiştir. Keçiboynuzu gamının ise genel olarak meyve etinde bulunan polifenolik bileşiklerle benzer bir kompozisyondan ancak daha düşük konsantrasyonda bulunduğunu, keçiboynuzu şurubunda ise esas olarak gallik asit tespit ettiklerini bildirmiştir.

Kumazawa vd (2001) yaptıkları çalışmada değişik antioksidan aktivite belirleme metotları (β -karoten ağartma ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal yakalama vb.) kullanarak keçiboynuzunun antioksidan aktivitesini belirlemiştir. Keçiboynuzundan elde ettikleri kaba polifenolik fraksiyon β -karotenin renksizleşmesine karşı kateşin ve prosiyanidinler gibi güçlü önleyici etki göstermiş (Bkz. EK-3 Şekil 7.1) ancak DDPH metodunda ise gerçek polifenolik bileşiklerin aynı konsantrasyonlarıyla kıyaslandığında daha düşük antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. EK-3 Şekil 7.2).

Youssef vd (2013) keçiyoynuzunun kimyasal kompozisyonu üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada meyvenin yağ asitleri (Çizelge 2.4) içeriğini incelemişlerdir. Analizler meyvenin etli kısmının öğütülmesiyle elde edilen keçiyoynuzu tozunda gerçekleştirilmiştir.

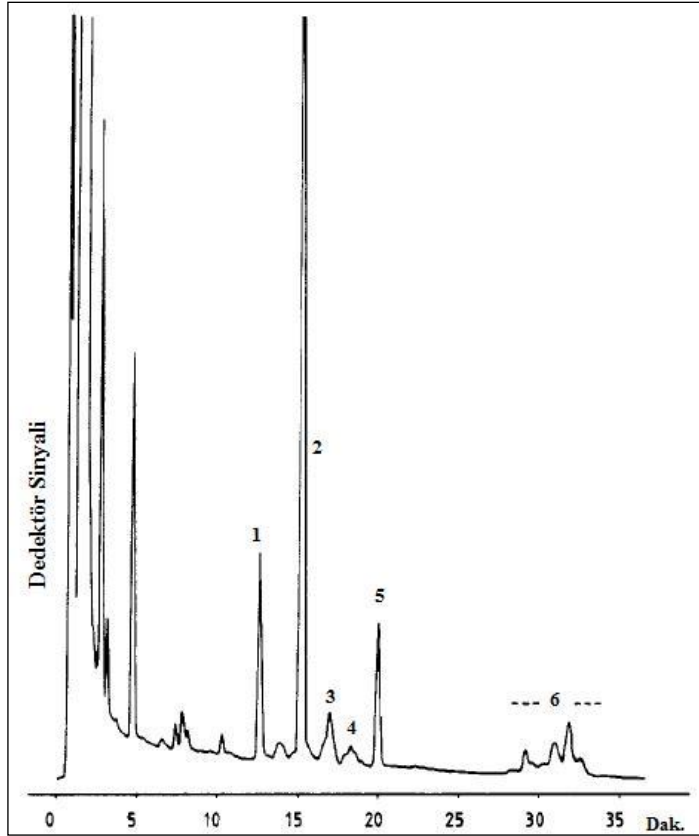
Çizelge 2.4. Keçiyoynuzunun yağ asidi kompozisyonu (Toplam yağ asidi - %)

| Yağ Asitleri | Karbon Zinciri | Toplam Yağ Asitleri (%) |
|------------------------------|----------------|-------------------------|
| Laurik asit | C 12 : 0 | 0.75 |
| Mirisitik asit | C 14: 0 | 1.11 |
| Palmitik asit | C16 : 0 | 11.01 |
| Palmitolik asit | C 16 : 1 | 0.65 |
| Heptadekanoik asit | C 17 : 0 | 0.30 |
| Heptadekenoik asit | C 17: 1 | 0.15 |
| Stearik asit | C 18 : 0 | 3.08 |
| Oleik asit | C 18 : 1 | 40.45 |
| Linoleik asit | C 18 : 2 | 23.19 |
| Linolenik asit | C 18 : 3 | 2.47 |
| Araşidik asit | C 20 : 0 | 1.51 |
| Gadoleik asit | C 20 :1 | 2.68 |
| Behenik asit | C 24 : 0 | 0.43 |
| Toplam doymuş yağ asitleri | | 29.46 |
| Toplam doymamış yağ asitleri | | 66.98 |

KAYNAK: Youssef vd (2013)'nin makalesinden uyarlanmıştır.

Keçiyoynuzunun yağ asidi kompozisyonu incelendiğinde (Çizelge 2.4), meyvenin değişik yağ asitleri içermesine rağmen baskın olarak dört yağ asidine (Oleik: % 40.45, Linoleik: % 23.19, Palmitik: % 11.01 ve Stearik: % 3.08) sahip olduğu görülmektedir. Meyvenin toplam doymamış yağ içeriği % 66.98 iken toplam doymuş yağ içeriği ise % 29.46 olarak belirlenmiştir (Youssef vd 2013).

Keçiyoynuzunda ayrıca Leguminosae familyasına ait diğer türlerde olduğu gibi halkalı yapıda şeker alkollerini (siklitoller) de bulunmaktadır. Meyvenin bu şeker alkollerinden özellikle D-pinitolü (5-8 g/100 g kuru ağırlık) önemli miktarda içerdiği bildirilmiştir (Şekil 2.4) (Baumgartner vd 1986; Tetik vd 2011b). D-pinitol haricinde ise meyvede az miktarda *myo*-inositol (0.5-1 g/100 g kuru ağırlık), *chiro*-inositol (0.1 g/100 g kuru ağırlık), ononitol, sequoyitol ve bornesitol olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2.4) (Baumgartner vd 1986).



Şekil 2.4. Fermente keçiboynuzu ekstraktında gaz kromatografisi ile analiz edilen şeker alkolleri (1: Ksilitol (internal standart), 2: D-pinitol, 3: Sorbitol ve *chiro*-inositol, 4: Sequoyitol, ononitol ve bornestiol, 5: *myo*-inositol, 6: Belirlenemeyen disakkaritler) (Baumgartner vd 1986)

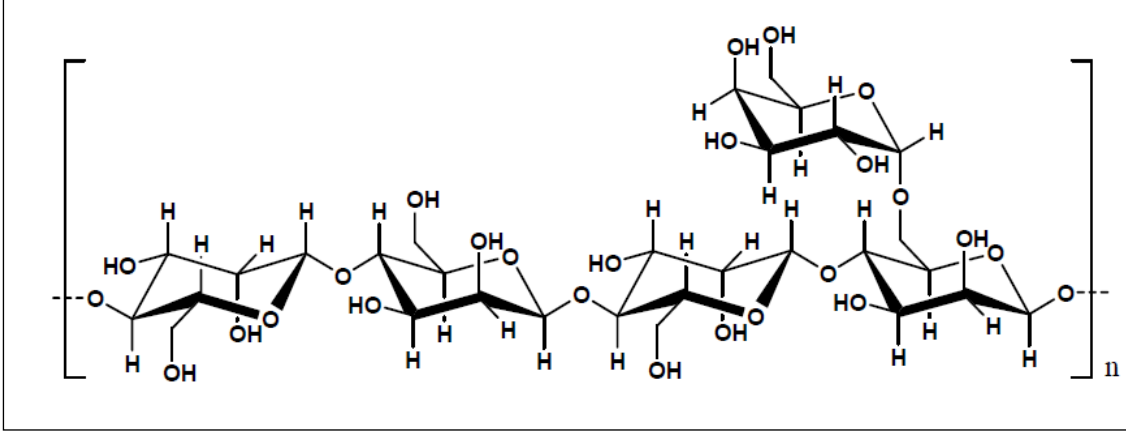
2.3. Keçiboynuzunun Kullanım Alanları

Uzun yıllar keçiboynuzu meyvesi, özellikle çekirdeğinden üretilen gam maddesi (Locust bean gum) nedeniyle ticari açıdan değerli olarak kabul edilmiştir (Kawamura 2008). Ancak meyvenin etli kısmının da ticari açıdan önemli olduğu yapılan bir takım bilimsel araştırmalar ile ortaya konulmuştur. Nitekim keçiboynuzundan etanol (Roukas 1994b; Turhan vd 2010b), sitrik asit (Roukas 1999), laktik asit (Yáñez vd 2007; Turhan vd 2010a), mannitol (Carvalho vd 2011), pullulan (Roukas ve Biliaderis 1995), mannanaz (Youssef vd 2006) gibi metabolik fermentasyon ürünlerinin yanı sıra keçiboynuzu tozu (Yousif ve Alghzawi 2000; Fadel vd 2006), biyogübre (Parrado vd 2008), hayvan yemi (Karabulut vd 2006) ve şeker şurubu (Petit ve Pinilla 1995) gibi endüstriyel açıdan değerli başka ürünler de üretilebilmektedir.

Ayrıca keçiboynuzu ağacının yanmaya dirençli ve her dem yeşil olan bir ağaç olması sebebiyle de orman ağaçlandırılmasında ve yangınların azaltılmasında yararlanabilecek önemli bir tür olduğu da bilinmektedir. Bütün bu kullanım alanlarına alternatif olarak keçiboynuzunun son yıllarda fonksiyonel bir bileşik olan D-pinitolün ticari olarak saflaştırılmasında da kullanılmaya başlandığı bildirilmektedir (Camero ve Merino 2004; Tetik vd 2011b).

2.3.1. Keçiboynuzu gamı (Locust Bean Gum)

Keçiboynuzu gamı (LBG-Locust Bean Gum) meyvenin çekirdeğinde bulunan endosperm tabakasından elde edilen beyaz renkli bir galaktomannan polisakkaritidir (Batlle ve Tous 1997). Galaktomannanlar mannoz zincirine galaktoz yan gruplarının bağlanmasıyla oluşmaktadır. Düz zincirinde $1\beta \rightarrow 4$ bağı ile bağlı mannopiranozil ünitelerine yan grup olarak $1\alpha \rightarrow 6$ bağı ile galaktopiranoz üniteleri bağlanmıştır (Şekil 2.5). LBG'nin % 73-86'sı mannoz, % 27-14'ü ise galaktoz ünitelerinden oluşmaktadır (Kawamura 2008).



Şekil 2.5. Galaktomannan polisakkaritinin yapısı

Galaktomannan yapıları gamlarda moleküldeki mannoz:glukoz (M/G) oranı gamın suda çözünürlüğünü etkilediği için önemli bir özelliktir. Nitekim guar gamın soğuk suda çözünürlüğü yüksek iken (M/G: 2:1), LBG'nin ise (M/G: 4:1) oda sıcaklığında çözünürlüğü çok düşüktür (Coviello vd 2007; Kawamura 2008). LBG'nin yüksek M/G oranına sahip olmasının reolojik özelliklerini etkilediği; dolayısıyla bu gamın yüksek derecede koyulaştırma özelliğine sahip olduğu da ifade edilmektedir (Lazaridou vd 2001).

LBG'nin su tutma kapasitesinin çok iyi olabilmesi için maksimum çözünürlüğe ulaşması gerekir ki; bu da ısı işlem uygulamasını zorunlu kılar (Gaisford vd 1986). LBG 80 °C'lik suda tamamen çözünür haldedir. Bu yüzden pseudo-plastik bir koyulaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca LBG κ -karregen ve ksantan ile elastik, oldukça yapışkan ve nispeten sineresis olayının az görüldüğü bir jel yapı oluşturmaktadır. LBG stabilizatör olarak dondurmalarda, et, balık ve diğer deniz ürünleri ile hazırlanan soslarda ve diabetik ürünlerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Gidley ve Grand Reid 2006).

Keçiboynuzu çekirdeği kahverengi bir kabuk ile sıkıca sarılı bir durumdadır (Şekil 2.6). Çekirdekte bulunan gamın ekstrakte edilebilmesi için bu kabuk tabakasının çekirdekten ayrıştırılması gerekir.



Şekil 2.6. Keçiboynuzu çekirdeğinin yapısı ve bileşimi (Dakia vd 2008; Mathur 2011)

Endüstride genel olarak keçiboynuzu çekirdeğinin kabuk kısmı ısıtılarak veya asitle muamele edilerek endosperm ve germ tabakalarından ayrıştırılmaktadır. Asitle muamele işleminde çekirdekler belli bir sıcaklıkta sülfürik asit ile muamele edilmekte ve çekirdeğin kabuk kısmı kömürleştirilmektedir. Kabuk kısmından geri kalan parçalar ise etkili bir yıkama ve fırçalama işlemi ile endospermden uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemle elde edilen LBG beyazımsı renktedir ve yüksek viskoziteye sahiptir. Isıl işlem uygulamasında ise çekirdekler döner bir fırında kavrulmakta ve böylelikle de kabuk kısmı endosperm tabakasından ayrılmaktadır. Bu işlem ile daha koyu renkli bir LBG üretilmektedir (Prajapati vd 2013).

2.3.2. Metabolik fermentasyon ürünlerinin üretimi

Keçiboynuzu karbonhidrat içeriğinin zengin olması nedeniyle birçok biyoteknolojik araştırmada mikroorganizmaların besin kaynağı olarak kullanılmıştır. Bu araştırmalardan büyük çoğunluğu mikroorganizmaların faaliyeti sonucunda oluşan etanol (biyoetanol) üretimi üzerine olmuştur.

Etanol üretiminde en çok tercih edilen mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Literatürde bu mayanın etanol üretiminde keçiboynuzu ekstraktını kaynak olarak kullanmasına yönelik farklı çalışmalar yer almaktadır.

Roukas (1993) keçiboynuzu ekstraktı ve *S. cerevisiae* mayası kullanarak biyoetanol üretimi üzerine yaptığı bir araştırmada durgun ve çalkalamalı fermentasyon ile keçiboynuzu ekstraktlarının sterilize edilme durumunun biyoetanol üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. Araştırma sonunda çalkalamalı fermentasyonun etanol üretiminde durgun fermentasyona göre daha iyi bir fermentasyon sistemi olduğu ve keçiboynuzu ekstraktının sterile edilmesinin ekstraktan elde edilecek etanol konsantrasyonunu etkilemeyeceği sonucu elde edilmiştir.

Roukas (1994a) ayrıca dolgulu yatak reaktörü ve immobilize *S. cerevisiae* hücreleri kullanarak sürekli sistemde etanol üretilebilirliğini de araştırmıştır. Çalışmada 30 gün boyunca 0.5/saat sabit akış hızında yürütülen biyoreaktör sisteminde orijinal immobilize maya hücresi aktivitesinde herhangi bir kayıp meydana gelmediği, fermentasyonda besleme materyali olarak 200 g/dm³ toplam şeker içeren keçiboynuzu

ekstraktı kullanıldığı takdirde % 85.5 şeker kullanımına, 25 g/dm³saat etanol üretkenliğine ve % 58.8 teorik etanol verimine ulaşılabildiği bildirilmiştir.

Turhan vd (2010b) de keçiyoynuzu ekstraktı ve *S. cerevisiae* mayası kullanarak etanol üretilebilirliği üzerine bir araştırma yapmışlardır. Bu amaçla ekstraksiyon (sıcaklık, süre ve meyve:su oranı) ve fermentasyon koşulları (pH, inokulum miktarı ve nitrojen kaynağı) optimize edilerek mayanın şekerlerce zengin bir keçiyoynuzu ekstraktında etanol üretme verimliliği artırılmaya çalışılmıştır. Elde edilen bulgulara göre nitrojen kaynağı olarak kemik unu kullanıldığında % 44.51'lik etanol konsantrasyonuna ulaşılabilmektedir. Yatmaz vd (2013) de keçiyoynuzu ekstraktının etanol üretiminde kullanılmasına yönelik immobilize *S. cerevisiae* hücreleri kullanarak bir çalışma gerçekleştirmişler ve bu çalışmada % 46.32'lik bir etanol verimine ulaşılabildiğini bildirmişlerdir.

Literatürde ayrıca *Zymomonas mobilis* ile etanol üretiminde keçiyoynuzu ekstraktının substrat olarak kullanıldığı çalışmalar da yer almaktadır. Vaheed vd (2011) *Z. mobilis* inoküle edilen keçiyoynuzu ekstraktının etanol üretebilme verimliliğini araştırdıkları çalışmada bazı parametreleri (başlangıç şeker konsantrasyonu, pepton ve maya ekstraktı, karıştırma hızı, pH ve fermentasyon süresi) optimize etmişlerdir. Çalışmada ekstraktta bulunan şekerlerin hidrolize edilmesinin etanol verimini artırmadığı bunun aksine hidrolize edilmeyen ekstrakt ile daha yüksek etanol verimi ve kalıntı şeker içeriğine ulaşıldığı bildirilmiştir. Etanol üretkenliğinin (g/L.saat) ise artan bakteri, maya ekstraktı, pepton ve başlangıç şeker seviyesi ile doğru orantılı olarak artış gösterdiği ifade edilmiştir. Çalışmada en yüksek etanol konsantrasyonuna (0.34 g/g başlangıç şekeri) 30 °C'de, başlangıç pH'sı: 5.2'de ve 80 rpm karıştırma hızında ulaşılmıştır. Bu sonucun elde edilmesi için besiyerine (50 mL'lik besiyeri için) 0.017 g bakteri (kuru ağırlık), 5.78 g şeker, 0.43 g pepton, 0.43 g maya ekstraktı ilave edilmiş ve optimum fermentasyon süresi de 36 saat olarak belirlenmiştir.

Mazaheri vd (2012) yaptıkları çalışmada *Z. mobilis* ile keçiyoynuzu partikülleri kullanarak katı-kültür fermentasyonunda etanol üretilebilirliğini araştırmışlardır. Keçiyoynuzu partiküllerine bakteriyel gelişimin sağlanması ve dolgu maddesi olması amacıyla buğday kepeği de ilave edilmiştir. Bu çalışmada da sıcaklık, başlangıç nem içeriği, keçiyoynuzu partikül boyutu vb parametreler optimize edilmiştir. Çalışmada en yüksek etanol konsantrasyonuna (0.30 g/g başlangıç şekeri) 31 °C sıcaklık, % 80 (w/w) başlangıç nem içeriği, 1 mm keçiyoynuzu partikül boyutu, % 0.7 (w/w) pepton konsantrasyonu, 6.74×10^8 hücre/g materyal başlangıç hücre konsantrasyonu ve 43 saatlik fermentasyon süresi ile ulaşılmıştır.

Saharkhiz vd (2013) ise yaptıkları çalışma ile keçiyoynuzu kullanarak katı kültür fermentasyonunda *S. cerevisiae* ile *Z. mobilis*'in etanol üretebilirliğini kıyaslamışlardır. Buna göre sabit koşullar altında (30 °C sıcaklık, başlangıç pH'sı: 5.3, % 5 (v/v) inokulum miktarı, 9 g keçiyoynuzu tozu/50 ml besiyeri, 0 rpm karıştırma hızı ve 40 saat fermentasyon süresi) *Z. mobilis*'in ürettiği etanol konsantrasyonu 0.42 g/g başlangıç şekeri iken bu değer *S. cerevisiae*'da 0.40 g/g başlangıç şekeri olmuştur.

Biyoteknolojik uygulamalarda etanol haricinde keçiyoynuzu kullanılarak sitrik asit, laktik asit, mannitol, pullulan, galaktosidaz ve mannanaz gibi değişik ürünlerin

üretilmesine yönelik de araştırmalar yapılmıştır. Roukas (1998) farklı pH değerlerinde *Aspergillus niger* ATCC 9142 küfö hücrelerinin yeniden kullanımı ile keçiboynuzu ekstraktından sitrik asit üretilebilirliği üzerine bir çalışma yapmıştır. Buna göre maksimum sitrik asit üretimi (85.5 g/L) pH: 5'te gerçekleştirilen fermentasyonla elde edilmiş ve bu teknikle sitrik asit üretilebilirliği 60 gün boyunca sabit tutulabilmiştir. Ayrıca ekipmanın yıkanması ve yeniden steril hale getirilmesi ve mikroorganizmanın üç tekrara kadar rahatlıkla kullanılmasının muhtemel maliyetleri azaltacağı ifade edilmiştir.

Roukas (1999) keçiboynuzundan *A. niger* ile sitrik asit üretiminde katı kültür fermentasyonunun kullanılabilirliğini de araştırmıştır. Buna göre uygun koşullar sağlandığında (30 °C, pH: 6.5, % 65 nem, 0.5 mm partiköl boyutu) % 55 verimle 176 g/kg kuru materyal düzeyinde sitrik asit üretilebilmiştir. Bu değer substrata % 6 (w/w) oranında metanol ilave edildiğinde 264 g/kg kuru madde düzeyine yükselmiştir.

Roukas ve Biliaderis (1995) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise *Aureobasidium pullulans* küfö ile inoküle edilen keçiboynuzu ekstraktından yarı kesikli fermentasyon sisteminde pullulan polisakkariti üretilmiştir. Pullulan üretiminde optimum koşulların 25 g/L başlangıç şeker konsantrasyonu, pH: 6.5 başlangıç pH değeri, 25-30 °C sıcaklık olduğunu belirten Roukas ve Biliaderis (1995), % 10'luk bir inokulum miktarı ile maksimum 6.5 g/L polisakkarit üretilebildiğini ve bu polisakkarit konsantrasyonunun ise % 70'inin pullulandan oluştuğunu bildirmişlerdir.

Turhan vd (2010a)'nin keçiboynuzu ekstraktından *Lactobacillus casei* bakterisi kullanarak laktik asit üretilebilirliğini araştırdıkları çalışmalarında kompleks şekerleri metabolize edemeyen bu bakterinin keçiboynuzu ekstraktında bulunan şekerleri kullanabilmesi için fermentasyon öncesinde invertaz enzimi kullanarak inversiyona uğratmışlardır. 37 °C, pH: 5 ve 200 rpm fermentasyon koşullarında gerçekleştirilen inkübasyon işlemi sonrasında ekstraktan 59.27 g/L laktik asit üretilebildiği görölmüştür.

Bulut vd (2004) *Rhizopus oryzae* küfö kullanarak üretilcek L-(+)-laktik asit konsantrasyonu üzerine glukoz, sakkaroz, şeker pancarı melası, keçiboynuzu ve buğday kepeği gibi değişik karbon kaynaklarının etkisini incelemişlerdir. Çalışmada maksimum laktik asit miktarı glukoz kullanıldığında elde edilirken (60 g/L), keçiboynuzundan ekstraksiyon ile elde edilen kısmın santrifüjleme işleminde sonra elde edilen berrak kısmının fermentasyonda kullanılmasıyla da karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında elde edilen maksimum laktik asit konsantrasyonuna yakın bir düzeyde laktik asit üretimi gerçekleştirilebildiği ifade edilmiştir (58 g/L). Bu sonuç ise keçiboynuzu ekstraktının laktik asit üretimi için iyi bir alternatif kaynak olduğunu gösterir niteliktedir.

Carvalho vd (2011) uygun besiyeri bileşenleri ile katkılanırılmış keçiboynuzu şurubunun mannitol üretiminde kullanılabilirliği üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırmada sekiz farklı mannitol üreten laktik asit bakterisi kullanılarak (*Lactobacillus intermedius*, *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc fructosum*, *Leuconostoc ficulneum*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* ve *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*) bu mikroorganizmaların mannitol üretimindeki metabolik kapasiteleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre en yüksek mannitol üretimi (2.36 g/L.saat) ile *L. fructosum* bakterisinde görölmüştür.

Youssef vd (2006) ise farklı karbon kaynakları kullanımının *Aspergillus niger* küfünün β -mannanaz üretimi üzerine bir araştırma tasarlamışlardır. Elde ettikleri bulgulara göre mannanaz aktivitesi açısından mikroorganizmanın en iyi faaliyet gösterdiği besiyeri hindistancevizi pulpu ile hazırlanan besiyeri olurken (8.56 U/mL mannanaz aktivitesi), keçiyoynuzu ile hazırlanan besiyerinden elde edilen β -mannanaz enzimi oldukça düşük bir aktivite (1.21 U/mL) göstermiştir. Literatür çalışmaları zengin bir kimyasal içeriğe sahip olan keçiyoynuzunun daha pek çok biyoteknolojik araştırmada kullanılabilecek değerli bir materyal olduğunu göstermektedir.

2.3.3. Diğer kullanım alanları

2.3.3.1. Keçiyoynuzu tozu

Keçiyoynuzunun meyve etinin öğütülmesi ve kavrulması ile elde edilen keçiyoynuzu tozunun aroması ve görünüşü kakaoya çok benzemektedir. Bu nedenle sıklıkla kakao veya çikolata yerine kullanılmaktadır (Brand 1984).

Keçiyoynuzunun kalsiyum içeriğinin yüksek olması ve çikolata veya kafein gibi bağımlılık yapan bir yan etkisinin bulunmaması kakao yerine ikame olarak kullanılabilirliğini artırmaktadır (Salem ve Fahad 2012). Nitekim keçiyoynuzunda kafein ve teobromin bulunmadığı ancak çikolata ve kakaoda besinlerin absorpsiyonunu engelleyen bu iki maddenin oldukça yüksek miktarlarda bulunduğu bildirilmiştir (Craig ve Nguyen 1984).

Al-Ghizawi (1996) keçiyoynuzu tozunun kakao yerine ikame olarak kullanılabilirliğini araştırdığı tez çalışmasında keçiyoynuzu tozunun özellikle dondurmanın duysal özelliklerini geliştirme açısından başarılı olduğunu, ancak kek ve şekerlemelere ilave edildiğinde panelistler tarafından ürünün kabul edilebilirliğini azalttığını, yer fıstığı ile hazırlanan ürünlerde ise formülasyona ilavesinin bu ürünlerin satın alınabilirliğini olumsuz yönde etkilediğini ifade etmiştir.

Yousif ve Alghzawi (2000) ise gerçekleştirdikleri araştırmada kavrulmuş ve kavrulmamış keçiyoynuzu tozu ile kakao tozunun bileşimini kıyaslamışlardır. Elde ettikleri bulgulardan 150 °C'de 60 dakika kavurma işleminin keçiyoynuzu tozunda arzu edilen duysal özelliklerin oluşması için yeterli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Ayrıca keçiyoynuzu tozunun kakao tozuna göre yüksek şeker ve lif içeriği ile düşük protein ve yağ içeriğine sahip olması kakao ikamesi olarak kullanılabilirliğindeki önemli etmenler olarak görülmüştür. Nitekim kavrulmuş keçiyoynuzu tozunun toplam şeker içeriği % 38.7, ham lif içeriği % 7.24, ham yağ içeriği % 0.74 ve ham protein içeriği % 5.82 iken bu değerler analiz edilen kakao tozunda sırasıyla % 2.16, % 4.93, % 22.88 ve % 22.9 olarak tespit edilmiştir.

Salem ve Fahad (2012) keçiyoynuzu tozunun kakao ikamesi olarak kullanılabilirliğini araştırmak için gerçekleştirdikleri çalışmada farklı oranlarda keçiyoynuzu tozu ile katkılanmış sütü çikolata ile kakao tozu ile hazırlanmış sütü çikolata örneklerini kıyaslamışlardır. Salem ve Fahad (2012) elde ettikleri çikolataların genel görüntülerinin önemli derecede birbirinden farklı olduğunu, çikolata formülasyonuna eklenen

keçiboynuzu tozunun konsantrasyonu arttıkça da bu farklılığın arttığını belirtmişlerdir. Panelistlerce yapılan duyuusal değerlendirmede keçiboynuzu katkılı çikolatalar tadıldıktan sonra ağızda bıraktığı tat açısından en başarılı bulunan formülasyon % 25 oranında keçiboynuzu katkılı çikolata formülasyonu olmuştur. Katkılı çikolataların tat ve kokusu ise normal çikolataninkinden farksız bulunmuştur ($P>0.05$)(Bkz. EK-4). Yapılan çalışmalar keçiboynuzu tozunun kakao tozuna benzer nitelikte özelliklere sahip olduğunu için kakao tozuna alternatif olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

2.3.3.2. Şeker şurubu

Zengin şeker içeriğine sahip keçiboynuzu meyvesinin şeker şurubu üretiminde kullanılabilmesi için meyvede bulunan yoğun koku ve renk ve aromanın belirli bir düzeyde azaltılması gerekmektedir.

Petit ve Pinilla (1995) farklı özelliklerdeki iyon değiştirici reçine kolonlarını kombine bir şekilde kullanarak keçiboynuzu ekstraktından yüksek saflıkta şeker şurubu elde etmişlerdir. Çalışmada ekstraksiyon işlemi özel bir çoklu kolon sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiş, bu sistemden elde edilen ekstrakt ise sönmüş kireç sütü ile ön saflaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra üç iyon değiştirici kolondan oluşan başka bir çoklu kolon sistemiyle de saflaştırılmıştır. Bu sistem ile % 92.9 saflıkta şeker şurubu üretilebildiği bildirilmiştir.

Diaz (1997) ise patent aldığı çalışmasında keçiboynuzunun kendine has aroma, koku ve renk bileşiklerini keçiboynuzundan elde edilen ekstraktan uzaklaştırmak amacıyla kristal şeker endüstrisinde kullanılan teknikleri (dekalsifikasyon, iyon değiştirici reçine kolonu kullanımı) uygulamıştır. Teknikler sonunda keçiboynuzu ekstraktının doğal yapısında bulunan aroma, koku ve renk bileşiklerinden arınmış ve kimyasal kompozisyonunun % 55-75'ini sakkaroz, % 7-15'ini fruktoz, % 7-16'sını glukoz, % 0.5-3'ünü diğer şekerler, % 4-14'ünü siklitoller ve % 0.5-2'sini ise diğer organik safsızlıkların oluşturduğu bir şeker şurubu elde edilmiştir.

2.3.3.3. Biyogübre

Son yıllarda tarımsal ekim alanlarının organik madde ihtiyacının karşılanmasında bitki atıkları (De Neve ve Hofman 2000), kompost (Tejada ve Gonzalez 2003), kanalizasyon çamuru (Albiach vd 2001) gibi organik atıkların kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu alanda kullanılan yeni ürünler ise bitki bünyesine doğrudan alınabilen, bu nedenle de düşük enerji tüketimi gerektiren biyogübre veya biyo-uyaranların kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Bu biyogübrelerin yapısı daha çok peptit, amino asit, polisakkarit, humik asit ve fitohormonlar gibi organik bileşenlerden oluşmaktadır. Literatürde keçiboynuzunun bu amaçla kullanılabilirliği üzerine herhangi bir araştırmaya rastlanmıştır.

Parrado vd (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada keçiboynuzu çekirdeğindeki germ tabakasını biyolojik bir işlem ile suda çözünebilir enzimatik hidrolizat ekstraktı haline dönüştürülmüş ve ekstraktın % 68 oranında protein (yüksek oranda glutamin ve arginin içeriğine sahip serbest amino asitler ve peptitlerden oluşan) içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. Ekstraktın biyogübre kapasitesini belirlemek için ise

domates bitkisinin büyüme, çiçeklenme ve meyve verme dönemlerine etkisi araştırılmıştır. Çalışma hayvan enzimatik protein hidrolizatı ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilmiştir. Bulgulara göre; keçiboynuzunun germ tabakasından elde edilen ekstraktın bitkinin özellikle boyu ve bitki başına oluşan çiçek ve meyve sayılarını artmaktadır.

2.3.3.4. Hayvan yemi

Keçiboynuzunun hayvan yemi olarak kullanılabilirliği de araştırılmıştır. Sahle vd (1992) farklı oranlarda keçiboynuzu içeren özel bir diyetle beslemenin kazların fizyolojisi ve psikolojisine üzerine etkilerini araştırmışlardır. Buna göre kazların diyetine 200 g/kg düzeyine kadar keçiboynuzu eklenmesinin herhangi bir performans olumsuzluğu yaratmadığı ancak bu düzeyin üzerinde kullanılan konsantrasyonun ise kazları oldukça bunalıma soktuğu tespit edilmiştir. Ayrıca diyete ilave edilen keçiboynuzu miktarı arttıkça diyetdeki proteinin sindirilebilirliği doğrusal olarak azalmıştır.

Priolo vd (1998) kuzuların yem rasyonlarının et kalitesine etkisini araştırmışlar ve bu amaçla ticari yemler ile yemlerde kullanılan arpanın yerine kısmi olarak keçiboynuzu (% 20) ilave edilmiş yemi kullanmışlardır. Yapılan analizler sonucunda kuzuların rasyonunda keçiboynuzu kullanılmasının karkas ve et kalitesini etkilemediği ancak kuzularda yağlanmayı azalttığı görülmüştür.

Karabulut vd (2006) de keçiboynuzunun koyun rasyonlarına meyve eti, çekirdek ve tüm meyve olarak ilave edilmesinin koyunların metabolizmasına etkisini araştırmışlardır. Çalışmada koyun rasyonlarında keçiboynuzunun tüm meyve olarak kullanılmasının koyunların enerji ihtiyacı için önemli olduğu ancak diyetle keçiboynuzu yer aldığı zaman protein takviyesi yapılması gerektiği vurgulanmıştır.

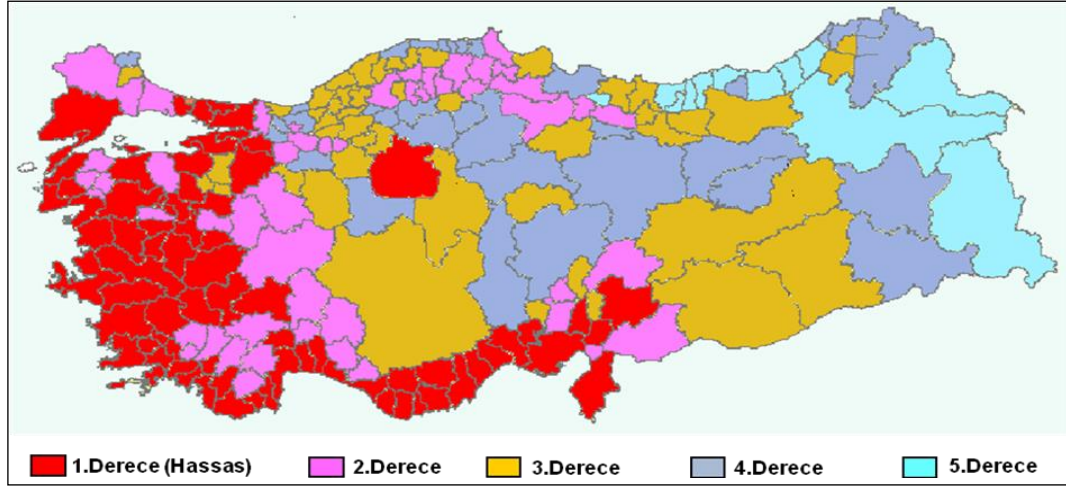
Kotrotsios vd (2012) ise domuzların diyetlerine ilave edilen keçiboynuzunun hayvanların yağlanması ve et kalitesi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Çalışmanın sonuçları diyete 75-100 g/kg düzeyinde keçiboynuzu ilave edilmesinin domuzların boyunu ve karkas ağırlığını artırdığını buna karşılık karkasın analiz edilen parametrelerinde (cilt altı yağ kalınlığı, etin kimyasal kompozisyonu ve yağ asidi profili) herhangi bir değişikliğe yol açmadığını göstermiştir.

2.3.3.5. Ormanların yangına karşı dirençli hale getirilmesi

Keçiboynuzu Akdeniz ikliminde sıkça karşılaşılan kuraklığa dayanıklı ve çam ağaçları ile kıyaslandığında orman yangınlarına karşı dirençli olan bir türdür (Geraldo vd 2014). Ağacın yaprakları yaz mevsiminin en kurak geçen aylarında bile su içeriğini % 95'e kadar koruyabilmektedir (Gullo ve Salleo 1988).

Yangına dirençli bitkiler genel olarak düşük bitki özü ve reçine içeriğine sahip, ölü yaprak olmadan büyüyen, bakımı ve budaması kolay olan, bodur, düşük biyokitle ve yoğunluklu, yüksek nem içeriğine sahip geniş ve/veya kalın yapraklı bitkiler olarak tanımlanmaktadır (Anonymous 2013b). Bu özellikler incelendiğinde keçiboynuzu ağacının yapısı itibarıyla yangına direnç gösteren bitkilerin sahip olması gerektiği belirtilen özellikleri taşıdığı açıkça görülmektedir. Ülkemizde bulunan ormanlarının %

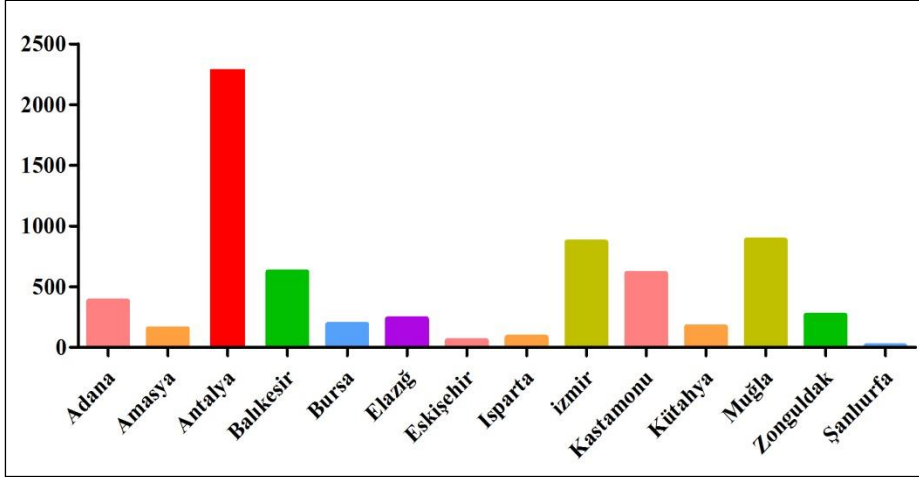
60'ının yangına çok hassas olan bölgelerde bulunması bu bölgelerdeki ağaçlandırma çalışmalarına bir kat daha fazla önem verilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Türkiye'nin orman yangınlarına karşı hassasiyet durumu

Yangına karşı hassasiyeti yüksek olan bölgelerde orman yangını sayısı da fazla olmaktadır (Şekil 2.8). Dolayısıyla bu bölgelerin yangına karşı dirençsiz ağaç türleri ile ağaçlandırılmasının aksine keçiboynuzu ağacı gibi hem yangına direnç gösterebilen hem de kurak şartlara dayanıklı, yetiştirilmesi kolay ve elde edilecek meyveleri endüstriyel açıdan değerli olan türler ile ağaçlandırılması gerekmektedir.

Nitekim Karhan vd (2010) tarafından yapılan çalışmanın materyal örnekleme zamanında Manavgat ve Serik arasında meydana gelen büyük orman yangınında bölgenin doğal bitki örtüsünde yer alan kızılçam ormanlarının tamamen hasar gördüğü ancak ilgili bölgede bulunan keçiboynuzu ağaçlarının ise yangına direnç gösterdiği görülmüştür (Şekil 2.9). Bu durum da Türkiye'nin orman yangınlarına hassas bölgelerinde ağaçlandırma amacıyla keçiboynuzu bitkisinin rahatlıkla kullanılabileceğini, bu sayede de olası herhangi bir yangının yayılma riskinin de minimize edilebileceğini göstermektedir.



Şekil 2.8. Türkiye’de bulunan bazı Orman Bölge Müdürlükleri’nin on yıllık yangın ortalamaları (Anonim 2012)



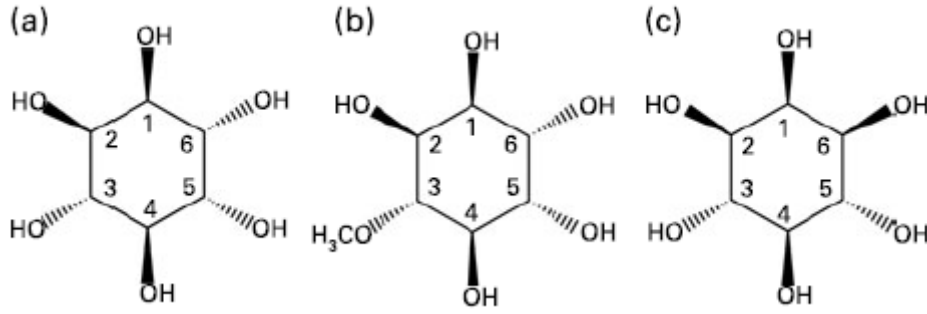
Şekil 2.9. Keçiboynuzu ağaçlarının yangına dirençliliği (Karhan vd 2010)

2.3.3.6. D-pinitolün saflaştırılması

Keçiboynuzu zengin şeker ve mineral içeriğinin yanı sıra son yıllarda fonksiyonelliği yapılan çalışmalarla ortaya konulan D-pinitol isimli şeker alkolünü de yüksek oranda içerdiği belirlenen değerli bir meyvedir. D-pinitolün saflaştırılma çalışmaları yaygın olarak soya fasulyesinde gerçekleştirilmişse de yeni çalışmalar bu bileşiğin saflaştırılması amacıyla keçiboynuzunun kullanımı yönünde bir eğilim olduğunu göstermektedir (Bkz. 2.5. D-pinitolün Sağlık Üzerine Etkileri ve 2.6. D-pinitolün Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması Üzerine Yapılan Bilimsel Araştırmalar).

2.4. D-pinitolün Kimyasal Yapısı, Bitkilerde Oluşum Mekanizması, Bulunduğu Kaynaklar ve Bitki Bünyesinde Sentezlenmesini Teşvik Eden Faktörler

D-pinitol değişik bitkisel kaynaklarda bulunan siklik bir şeker alkolüdür. İsmi ilk olarak izole edildiği çam ağacından (Pine) alan D-pinitol D-chiro inositolün 3-O-metil eteridir (Şekil 2.10). İnositol ve ononitolün etiketlenmesiyle yapılan izleme çalışmaları, D-pinitolün inositolden başlayan iki kademeli bir dönüşüm sonucu sentezlendiğini göstermektedir (Dittrich ve Brandl 1987).



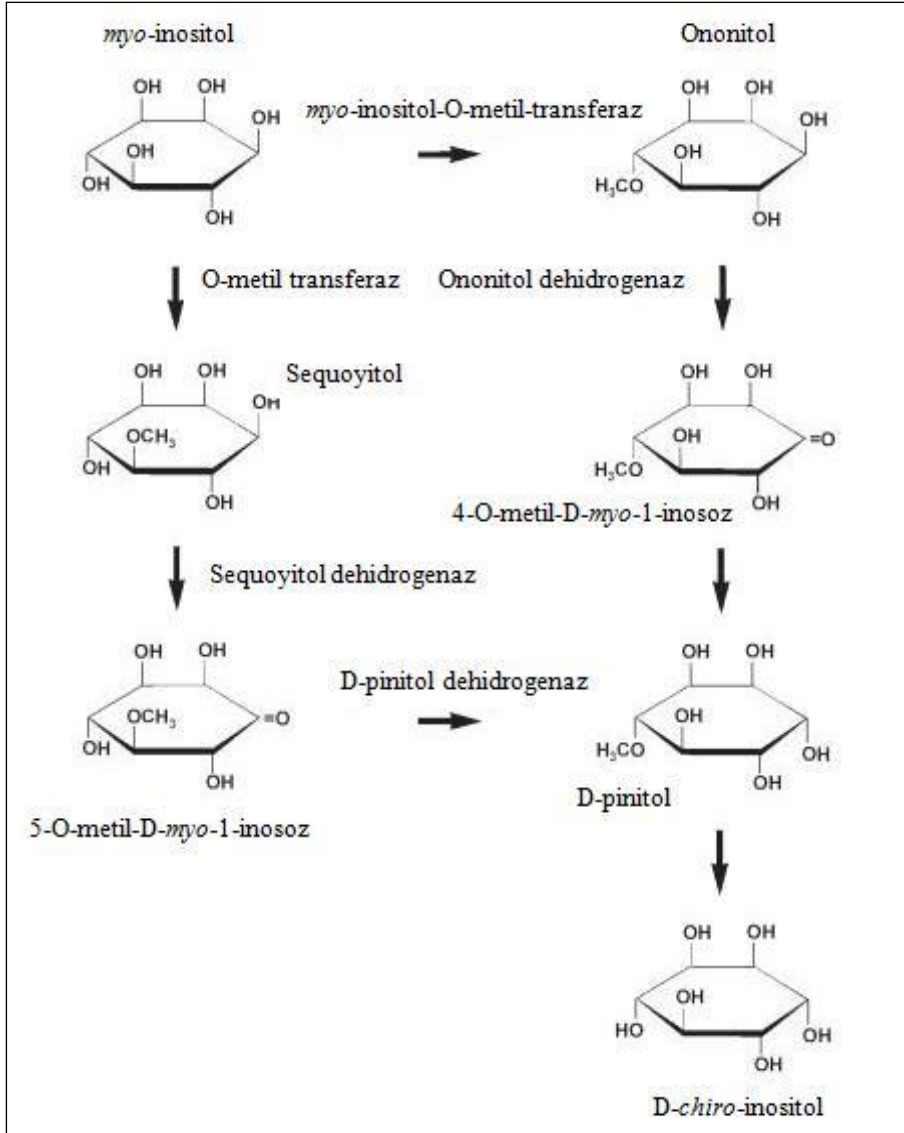
Şekil 2.10. İnositollerin yapısı: (a) *D-chiro* inositol, (b) *D-pinitol*, (c) *myo*-inositol (Lin vd 2009)

*D-pinitol*ün öncü maddesi *myo*-inositoldür. *myo*-inositol aynı zamanda birçok siklik şeker alkolünün biyosentezinde de başlıca kaynaktır (Şekil 2.11). Bu şeker alkollerinin sentezinde başlıca iki metabolik iz yolu mevcuttur.

Birinci metabolik iz yolunda *myo*-inositol O-metil transferaz aktivitesi ile sequoyitole dönüşür. Sequoyitolden ise iki aşamalı epimerizasyon ile *D-pinitole* oluşur. Birinci aşamada NAD^+ -spesifik dehidrogenaz enzimi ile 5-O-metil-*D-my*o-1-inozoz oluşur. İkinci aşamada ise bu ara bileşik NADP^+ -spesifik-*D-pinitol* dehidrogenaz enzimi ile *D-pinitole* dönüşür.

İkinci metabolik iz yolunda ise *myo*-inositol *D-ononitole* metillenir. *D-ononitol*ün *D-pinitole* dönüşümünde ise *D-ononitol* 1-dehidrogenaz enziminin 4-O-metil-*D--inositol* *D-ononitole* metillenir. *D-ononitol*ün *D-pinitole* dönüşümü ise *D-ononitol* 1-dehidrogenaz enziminin 4-O-metil-*D-my*o-1-inozoz moleküle etki etmesi ile meydana gelir (Şekil 2.11).

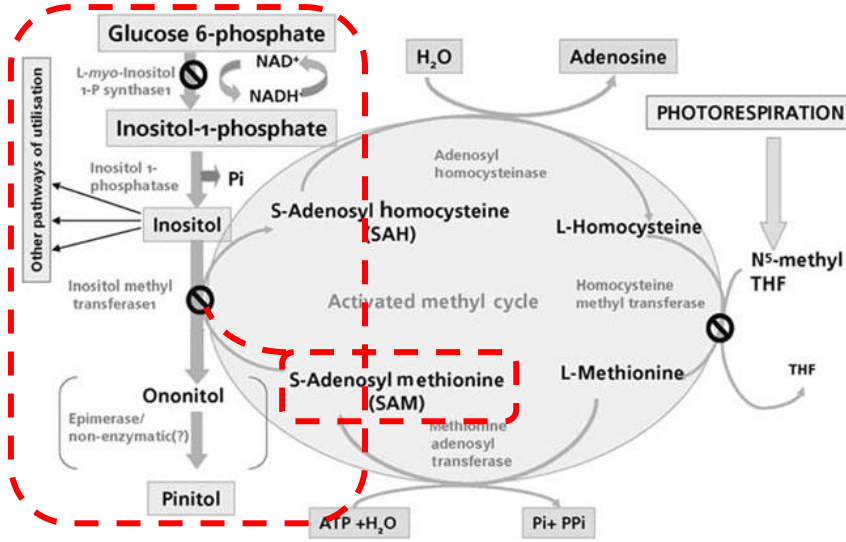
Bitki bünyesinde *myo*-inositolden *D-pinitol* oluşum mekanizmasına daha ayrıntılı bakılacak olunursa bu mekanizmanın *INO1* geni tarafından kodlanan *L-my*o-inositol 1-fosfat sentaz (MIPS) enzimi vasıtasıyla sentezlenen *myo*-inositol ile başladığı görülür (Şekil 2.11) (Majumder vd 2003). Daha sonra Mg^{+2} bağlı *L-my*o-inositol 1-fosfat fosfataz enziminin aktivitesiyle defosforile olan MIPS enzimatik ürününden serbest inositol oluşur. İnositol de *IMT1* geninin kodladığı S-adenozil metiyonine (SAM) bağlı bir reaksiyonda inositol metil transferaz enzimi katalizörliğünde *D-pinitole* metillenir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Baklagil tohumlarında bulunan esas siklitollerin ve metil-siklitollerin sentezlenmesindeki metabolik iz yolları (Górecki vd 2001)

SAM bu reaksiyonda yardımcı substrat olarak kullanılmaktadır. Ayrıca SAM bu reaksiyonda ikincil bir metil vericisi olarak görev yapmakta ve S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşmektedir. SAH ise adenzil homosisteinaz enzimi vasıtasıyla adenzin ve homosisteine parçalanmaktadır.

Homosistein metiyoninin ve ondan türetilen SAM'in rejenerasyonu için kullanılmaktadır. Bu rejenerasyon solunum aktivitesinde meydana gelen birincil metil vericisi olan N⁵-metil tetrahidrofolatı (N⁵-met-THF) kullanan metiyonin sentaz/homosistein metil transferaz aracılığıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Metil döngüsüne bağlı inositolden D-pinitol sentezi (Sengupta vd 2008)

Literatür çalışmaları D-pinitolün çoğunlukla baklagil (Leguminosae) familyasına ait bitkilerden izole edildiğini göstermektedir. Ayrıca bu bileşiğin çamgiller (Pinaceae), papatyagiller (Asteraceae), karanfilgiller (Caryophyllaceae), yabancı kimyongiller (Zygophyllaceae), servigiller (Cupressaceae), loğusa otugiller (Aristolochiaceae) ve sabun ağacıgiller (Sapindaceae) familyalarına ait bitkilerde de tespit edildiği bildirilmiştir. D-pinitol bitkilerin gövde, yaprak, sap, kök, çiçek, ağaç özü gibi bölgelerinde yer almakta, bazı türlerde ise bitkinin tamamında bulunmaktadır (Poongothai ve Sripathi 2013).

Soğuk zararlanması, tuzluluk, kuraklık, oksidatif stres, donma, yüksek sıcaklık, ağır metal stresi ve düşük sıcaklık gibi abiyotik stres faktörleri bitki türlerinde çeşitli zararlara neden olmaktadır (Rathinasabapathi 2000).

Bitkiler bünyelerinde şeker alkollerini (siklik ve düz zincirli şeker alkollerini) gibi özel kimyasal maddeleri sentezleyerek metabolizmalarını bu faktörlerin olumsuz etkilerinden korumaktadır. Bu bileşikler genel olarak bitki sitoplazmasında suyun alıkonmasını sağlayan osmolitler gibi rol oynamakta veya membran, protein kompleksi veya enzimler ile etkileşimde bulunarak selüler yapıları korumaktadır (Bohnert vd 1995).

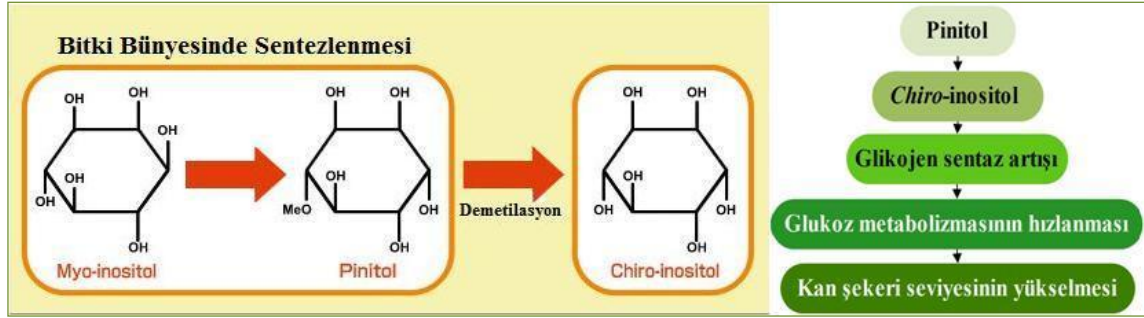
Abiyotik stres faktörleri varlığında bitki bünyesinde akümüasyonu arttığı bildirilen şeker alkollerinden birisi de D-pinitoldür. Nitekim kuraklık stresine maruz kalan soya fasulyesinde (*Glycine max* L.) (Streeter vd 2001) ve yüksek sıcaklık ve kuraklık streslerine maruz kalan erguvan ağacında (*Cercis canadensis*) (Griffin vd 2004) bu şeker alkolünün akümüasyonunda artış olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde tuzluluk stresine maruz kalan buz bitkisi (*Mesembryanthemum crystallinum*) (Paul ve Cockburn 1989), eğrelti otu bitkisi (*Acrostichum aureum*) (Sun vd 1999) ve yabancı pirinç bitkisinde de (*Porteresia coarctata*) (Sengupta vd 2008) D-pinitolün bitki tarafından daha fazla sentezlendiği görülmüştür.

2.5. D-pinitolün Sağlık Üzerine Etkileri

D-pinitol hayvansal dokularda sentezlenemeyen veya metabolik iz yolunda yer alan bileşiklere dönüşemeyen (Lin vd 2009), insan sağlığı üzerine olumlu etkileri olabileceği ifade edilen bir şeker alkolüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalara göre bu bileşiğin (türevleri ve metabolitleri de dahil olmak üzere) diyabet, obezite, dislipidemi (kanda bulunan lipit seviyesinin normalin üzerindeki değişimi), damar tıkanıklığı, hipertansiyon, kalp-damar rahatsızlıkları, AIDS, kanser, aşırı zayıflık, septisemi (kan zehirlenmesi), yanıklarla meydana gelen travmalar, yetersiz beslenme ve stres, yaşlanma, tüberküloz ve diğer otoimmün hastalıkları, endokrin hastalıkları, polikistik over sendromu, hiperürisemi (kanda ürik asit seviyesinin aşırı derecede olması), atletik aktivite veya hareketsizlikten kaynaklanan komplikasyonlar gibi insülin direnci ile ilişkili rahatsızlıkların tedavisinde yararlı olabileceği düşünülmektedir (Ostlund ve Sherman 1998).

Nitekim Streptozotosin (STZ - memelilerdeki pankreasın insülin üreten beta hücrelerine toksik etki gösteren doğal bir kimyasal) - diyabetik laboratuvar sıçanlarında yürütülen bir çalışmada D-pinitolün kan serumunda LDL (Low density lipoprotein – düşük yoğunluklu lipoprotein) ve VLDL (Very low density lipoprotein – Çok düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyelerini düşürdüğü ve HDL (High density lipoprotein – Yüksek yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesinde de artış meydana getirdiği yani antihiperlipidemik (kan serumunun içerdiği lipit konsantrasyonunu azaltıcı) etki gösterdiği bildirilmiştir (Geethan ve Prince 2008). Benzer şekilde soya fasulyesinden elde edilen D-pinitolün katkılındığı diyeti tüketen deneklerle yürütülen başka bir çalışmada da D-pinitolün toplam kolesterol, LDL-kolesterol, LDL/HDL kolesterol oranı, sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürdüğü ve HDL-kolesterol düzeyini ise artırdığı ifade edilmiştir (Kim vd 2004). Yine STZ-diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada farelerin diyetinde D-pinitol kullanımı ile böbrek enzimatik antioksidanlarının aktivitelerinde ve böbrek lipit peroksidleri, hidroperoksidleri ve protein karbonilleri seviyelerinde ciddi azalma meydana geldiği dolayısıyla D-pinitolün böbrekleri koruyucu etkisinin olduğu bildirilmiştir (Sivakumar vd 2010).

İnsan vücudunun kreatin depolaması üzerine D-pinitolün etkisini belirlemek amacıyla erkek deneklerle gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise düşük dozda D-pinitol ile katkılındırılan kreatin takviyesinin vücudun kreatin depolamasını teşvik ettiği sonucu ortaya çıkmıştır (Greenwood vd 2001). Lin vd (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada D-pinitolün prostat kanserinin yayılımını önlemek amacıyla gerçekleştirilen tedavilerde yayılımı önleyici ajan olarak kullanılabileceği sonucu ortaya çıkmıştır. Bates vd (2000) hipoinsülinamik STZ-diyabetik farelerde yürüttükleri araştırmada D-pinitolün insülin benzeri etki gösterdiği ve bu sayede de glisemik kontrolün geliştiğini bildirmiş, D-pinitolün glukoz alımını etkileyen insülin metabolik iz yolunda post-reseptör olarak görev yapabileceğini vurgulamışlardır (Şekil 2.13).



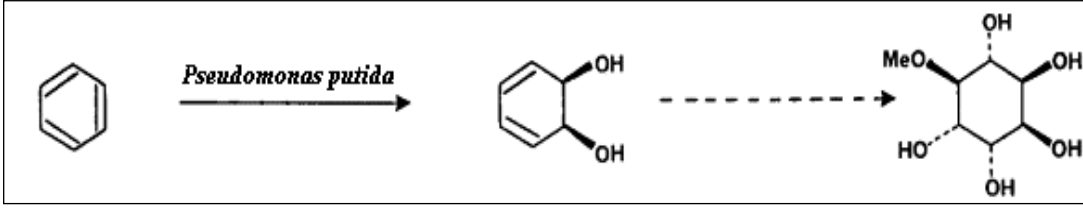
Şekil 2.13. D-pinitolün kan şekeri seviyesinin artışı mekanizmasındaki etkisi (Bates vd 2000)

Choi vd (2009) ise yağ ve kolesterol seviyesi yüksek diyetle beslenen hamsterlarda yürüttüğü araştırmada deney hayvanlarının günlük diyetinin % 0.05-0.1 oranında D-pinitol ile katkılandırılmasının lipid ve antioksidan mekanizmasını geliştirdiğini açıklamışlardır. Park vd (2004) ise STZ-diyabetik sıçanlarda yürüttüğü çalışmada D-pinitolün kataraktın ve hiperglisemik koşullarda oksidatif stres nedeniyle oluşan kornea ödeminin önlenmesinde etkili olabileceğini belirtmişlerdir. Literatür çalışmalarından da görülebileceği gibi bilim insanları D-pinitolün farklı hastalıkların geriletilmesindeki veya tedavi edilmesini kolaylaştırmadaki etkisini araştırmış ve genel olarak da bu araştırmalardan D-pinitolün kullanımı üzerine olumlu yönde sonuçlar elde edilmiştir.

2.6. D-pinitolün Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması Üzerine Yapılan Çalışmalar

Hızlı yaşam şartlarının getirisi olarak yetersiz veya dengesiz beslenmenin gıda takviyeleri ile giderilmeye çalışıldığı günümüzde fonksiyonel işlevliği bilinen bütün kimyasal bileşiklerin saflaştırılmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Bu doğrultuda yapılan tıbbi çalışmalarla çeşitli hastalıkların tedavisinde yararlanılabilecek bir kimyasal olarak düşünülen D-pinitol ve türevlerinin saflaştırılmasında da değişik bilimsel araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmalar genel olarak bu bileşiğin kimyasal olarak sentezlenmesi, moleküler tekniklerle üretilebilirliğinin araştırılması ve hâlihazırda var olduğu matriksten ayrıştırılması üzerine olmuştur. Ley vd (1987)

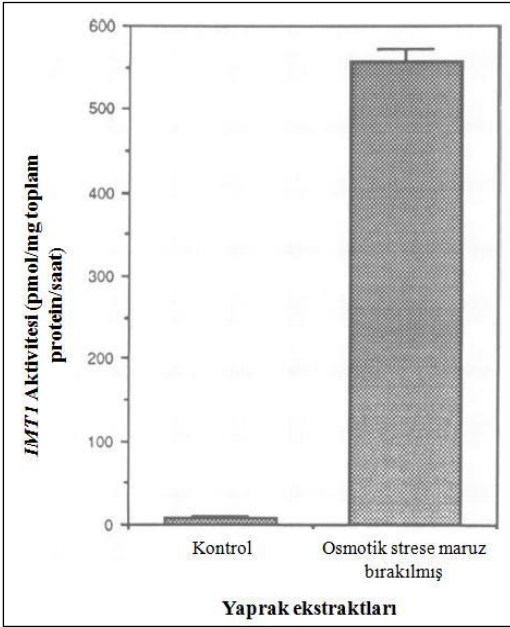
D-pinitolün kimyasal olarak sentezlenebilirliği konusunda yaptıkları araştırmada temel reaksiyon basamağını mikrobiyal oksidasyon etkisiyle benzenden cis-1,2-dihidroksisikloheksa-3,5-dienin oluşturduğu bir yöntem tanımlamışlar ve bu yöntemle de % 35 verimle D-pinitol sentezlenebildiğini bildirmişlerdir (Şekil 2.14). Riley vd (1995)'nin geliştirdiği ve patent aldığı bir başka araştırmada ise kasugamisin antibiyotiklerinden kademeli olarak gerçekleştirilen reaksiyonlarla D-chiro-inositol üretilmiştir.



Şekil 2.14. Benzenden D-pinitol sentezlenmesi (Ley vd 1987)

Bu amaçla asetile edici bir ajanla reaksiyona sokulan kasugamisinden ilk olarak ham hekza-asetat ara bileşiği oluşmuş, daha sonra saflaştırılan bu bileşikten de asetil grubunun ayrıştırılmasıyla *D-chiro*-inositol elde edilmiştir. Uygulanan bu işlemin etkisiyle kasugamisinden ileri kromatografik saflaştırma aşamalarına ihtiyaç duyulmadan yüksek verimlilikle hedef bileşiğin üretilebildiği bildirilmiştir.

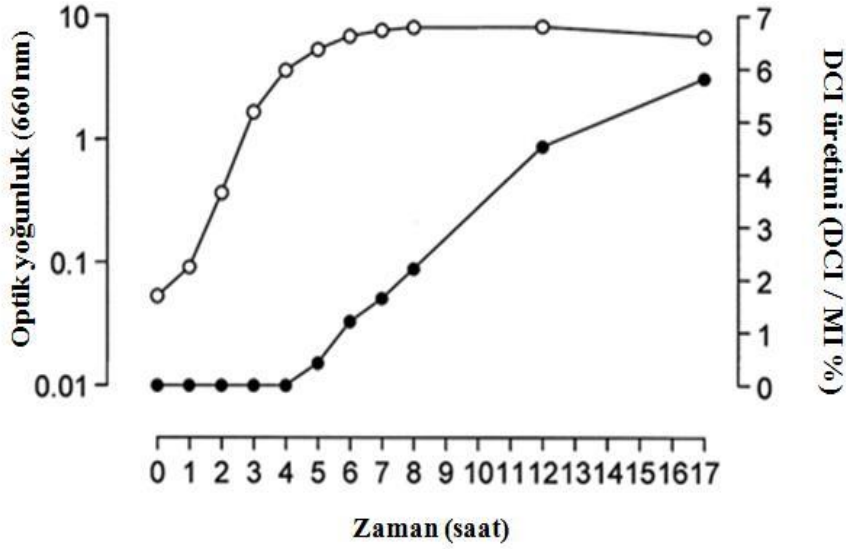
Bilim insanları D-pinitolün kimyasal sentezlenebilirliğine alternatif olarak moleküler yöntemlerle bitki bünyesinde daha çok sentezlenip sentezlenemeyeceği de araştırmışlardır. Vernon ve Bohnert (1992) tarafından yürütülen bir çalışmada bir glikofit (tuzlu koşullara orta düzeyde dayanıklı) olan transgenik tütün bitkisinin siklitol üretimini incelemek amacıyla bitkiye halofitik buz bitkisinden (*Mesebryanthemum crystallinum*) izole edilen *IMT1* geni aktarılmıştır. Oluşan transformantların osmotik strese maruz bırakıldıklarında (halofitik koşullarda) *myo*-inositol O-metil transferaz aktivitesi gösterdiği ve bu sayede kontrol bitkisinde belirlenmeyen ononitolün önemli derecede akümüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Osmotik strese maruz bırakılan ve bırakılmayan (Kontrol) *M. crystallinum* bitkisinin *IMT1* aktivitesi (Vernon ve Bohnert 1992)

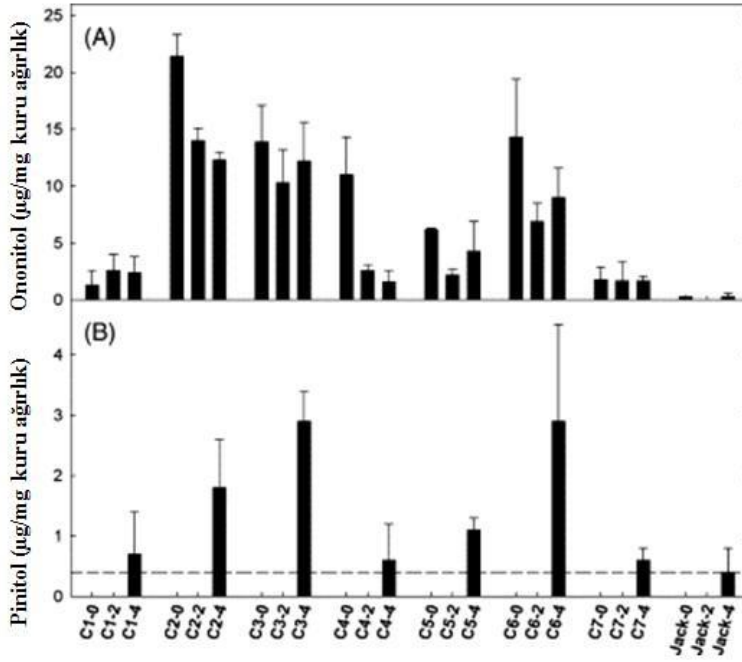
Yoshida vd (2006) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada ise genetiği değiştirilen *Bacillus subtilis* bakterisinden *D-chiro* inositol (DCI) üretimi amaçlanmıştır. İlgili mikroorganizmanın DCI oluşturması logaritmik fazdan durgun faza geçişte besiyeri

ortamında DCI akümüasyonu ile doğrulanmıştır (Şekil 2.16). Ancak bu mikroorganizma başlangıçta bulunan *myo*-inositol'ün sadece % 6'lık kısmını DCI'ya dönüştürülebilmştir.



Şekil 2.16. *myo*-inositolün (MI) *D-chiro*-inositole (DCI) biyodönüşümü (Beyaz yuvarlaklar: Hücre gelişimi-optik yoğunluk, Siyah yuvarlaklar: DCI/MI konsantrasyonu) (Yoshida vd 2006)

Chiera vd (2006) ise buz bitkisinden aldıkları *IMT1* genini partikül bombardımanı ile soya fasulyesinin (*Glycine max* (L). Merr. Cv. 'Jack') embriyogenik dokusuna aktarmış ve gelişen transgenik embriyolarda ononitol gelişimi araştırmışlardır. Bu amaçla transgenik ve kontrol örneklerinden alınan embriyogenik doku ekstraktları kültür ortamına aktarılmış ve 0., 2. ve 4. haftalarda ononitol ve *D*-pinitol konsantrasyonları analiz edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre birinci klon (C1) hariç bütün transgenik dokuların ononitol seviyelerinin transgenik olmayan dokuların (Kontrol-Jack) ononitol seviyelerinden 10-80 kat arasında değişen oranlarda daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 2.17). En fazla ononitol gelişimi ikinci klonda (C2) görülmüştür. Embryo gelişimi ilerledikçe transgenik soya fasulyesi embriyolarının ononitol seviyelerinde genel bir azalma olmuştur. *D*-pinitol ise hem transgenik dokularda hem de kontrol grubunda ilk defa 4. haftada tespit edilmiştir. C1, C4 ve C7 kolanlarının *D*-pinitol seviyeleri kontrol grubunun *D*-pinitol seviyeleri ile benzer seviyedeysen, C2, C3, C5 ve C6 klonları ise kontrol grubuna göre 2-8 kat daha fazla *D*-pinitol seviyesi içermiştir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Gelişen embriyonik dokuların 0., 2. ve 4. Haftalardaki ononitol (A) ve D-pinitol (B) seviyeleri (Noktalı çizgi kontrol (Jack) grubunun D-pinitol seviyesini göstermektedir) (Chiera vd 2006)

Siklik şeker alkollerinin saf olarak üretiminde kimyasal ve moleküler sentez yöntemlerin genellikle zor ve maliyetli olması bu bileşiklerin ticari olarak üretilmesinde belirtilen yöntemlerin kullanılabilirliğini etkilemektedir. Nitekim yapılan araştırmalar D-pinitol ve türevlerini gıda takviyesi olarak piyasaya sunan ticari firmaların bu amaçla daha çok hedef bileşiklerce zengin soya fasulyesi, keçiyoynuzu gibi materyalleri özel tekniklerle (solvent ekstraksiyonu, kromatografik ayırma gibi) kullanarak işlediklerini göstermektedir (Anonymous 2014b, 2014d). Araştırmacılar D-pinitol ve türevlerinin gıda matrikslerinden ayrıştırılmasında değişik yöntemler geliştirmiştir.

Baumgartner vd (1986)'nin keçiyoynuzu ekstraktında gerçekleştirdiği çalışmada fermentasyon (*Saccharomyces bayanus*), evaporasyon, anyonik ve katyonik iyonik reçine kullanımı (anyonik ve katyonik) ve solvent (etanol) muamelesi ile kristalizasyon aşamaları sonucu ekstraktta bulunan siklitollerini fraksiyonlarına ayırmış ve bu bileşiklerin konsantrasyonlarını ince kolon kromatografisi, gas kromatografisi ve gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi yöntemleriyle belirlemişlerdir (Bkz. Şekil 2.4). Analiz sonuçlarına göre keçiyoynuzu ekstraktının kuru madde bazında % 5-7.5 düzeyinde D-pinitol içerdiği ifade edilmiştir.

Agrawal ve Rabinowitz (1997)'in patent aldığı çalışmada materyal olarak karbonhidrat ve siklitollerce zengin badem kabuğu ekstraktı kullanılmıştır. Materyal, siklitollerini kullanmaması (tercihen sorbitolü kullanması) için adapte edilen yabancı *Saccharomyces cerevisiae* mayası ile fermente edilmiş, fermentasyon sonunda elde edilen karışım sırasıyla filtrasyon, konsantrasyon ve kristalizasyon işlemlerine tabi tutularak yüksek saflıkta ve verimde siklitoller elde edilmiştir.

Soya fasulyesi yapraklarını farklı konsantrasyonlardaki etanol çözeltileri (1. deneme: 700 g etanol/L, 2. deneme: 630 g etanol/L) ve bu işlemlerden elde edilen ekstraktları da kloroform-su karışımı ile muamele eden Streeter (2001) son aşamada iyon değiştirici reçine kolonu kullanarak ekstraktları saflaştırmıştır.

Çizelge 2.5. Reçine kolonundan geçirilen ekstraktların siklitol geri kazanımları (Streeter 2001)

| Siklitol | 1. deneme | | | 2. deneme | | |
|------------------------|-----------|-------|--------------|-----------|-------|--------------|
| | Önce | Sonra | Geri kazanım | Önce | Sonra | Geri kazanım |
| | mg | | % | mg | | % |
| D-pinitol | 499.0 | 484.1 | 97 | 849.0 | 839.9 | 99 |
| <i>chiro</i> -inositol | 27.7 | 31.4 | 113 | 48.4 | 48.6 | 100 |
| <i>myo</i> -inositol | 17.9 | 18.6 | 104 | 42.2 | 33.0 | 78 |

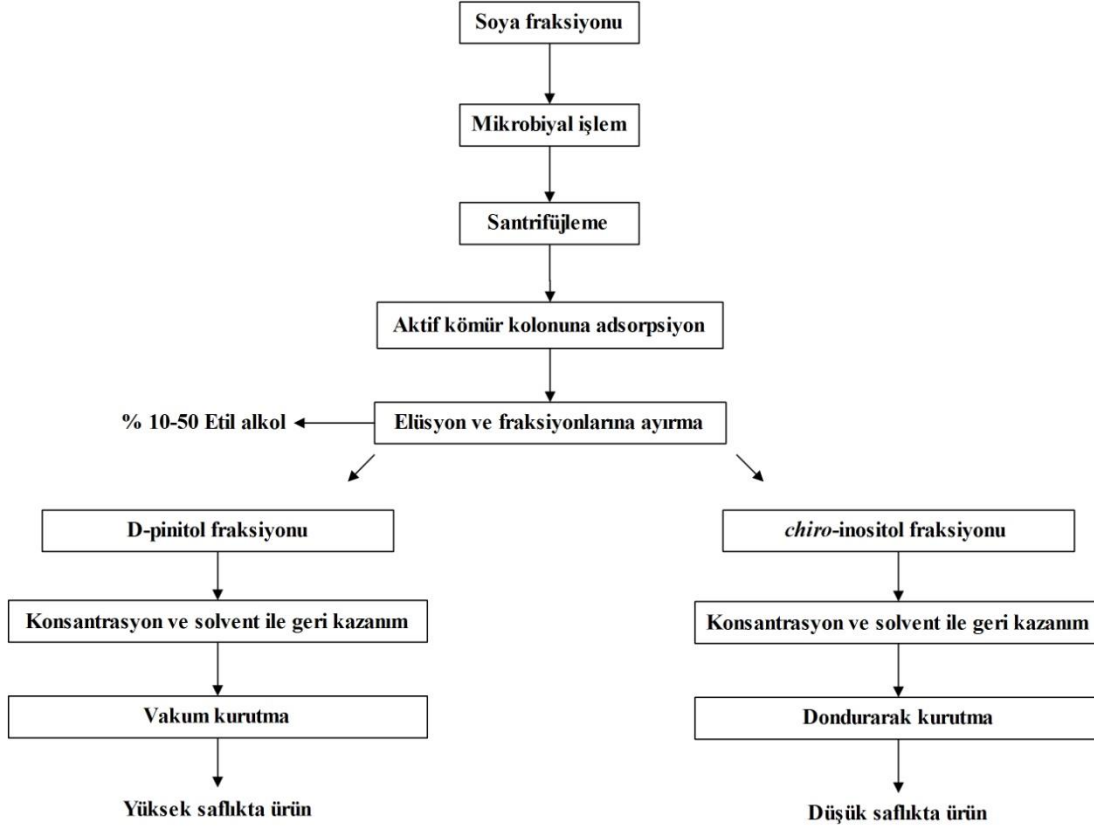
Yapraklardan elde edilen ham ekstraktın iyon değiştirici reçine kolonundan geçirilmesi siklitollerin neredeyse tamamının geri kazanılmasına yol açmıştır (Çizelge 2.6). Streeter (2001)'in uyguladığı bu kısmi saflaştırma yöntemiyle altı bitkiden toplanan 325 g soya fasulyesi yaprağından 1.8 g D-pinitol elde edilmiştir. Ancak Streeter bu çalışmadan elde ettiği D-pinitolün saf olmadığını bu amaçla ileri düzeyde çalışmalar gerçekleştirilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Shin vd (2003) ise farklı soya fraksiyonlarından D-pinitol veya *chiro*-inositol elde edilmesinde geri kazanım verimliliğini artırmak amacıyla bir çalışma tasarlamışlardır (Şekil 2.18). Çalışmada farklı mikroorganizma kültürleri kullanılarak fraksiyonlardaki D-pinitol türevlerinin serbest D-pinitol formuna dönüşümü sağlanmıştır. Bu amaçla mikroorganizmaların faaliyeti ile soya sütü peynir altı suyunda (soybean curd whey) bulunan D-pinitol glikozitleri, D-pinitol fosfatlar, D-pinitol fitatlar, D-pinitol esterleri, D-pinitol fosfolipitleri ve lipit-bağlı D-pinitoller gibi bağlı formdaki D-pinitol türevlerini serbest D-pinitol formuna dönüştürmüşdür (Çizelge 2.7).

Çizelge 2.6. Soya sütü peynir altı suyunda gelişen farklı mikroorganizmaların serbest formda D-pinitol oluşturması (Shin vd 2003)

| | Mikroorganizma Suşu | D-pinitol Üretim Oranı | Şeker Asimilasyonu | Endüstriyel Kullanımı |
|---------|--------------------------------|------------------------|--------------------|-----------------------|
| Maya | <i>S. carlsbergensis</i> | +++++ | +++++ | Bira |
| | <i>S. cerevisiae</i> | ++++ | ++ | İnvertaz |
| | <i>S. pastorianus</i> | +++ | ++ | Bira |
| | <i>C. utilities</i> | +++ | + | 5-adenilik asit |
| Küf | <i>A. niger</i> | ++++ | +++++ | α -amilaz |
| | <i>P. funiculosum</i> | ++ | ++ | Pektinaz |
| | <i>T. viride</i> | ++++ | + | Ksilanaz |
| | <i>B. stearrowthermophilus</i> | +++ | + | α -amilaz |
| Bakteri | <i>E. coli</i> | ++++ | + | - |
| | <i>P. amyloclavata</i> | ++ | + | izoamilaz |

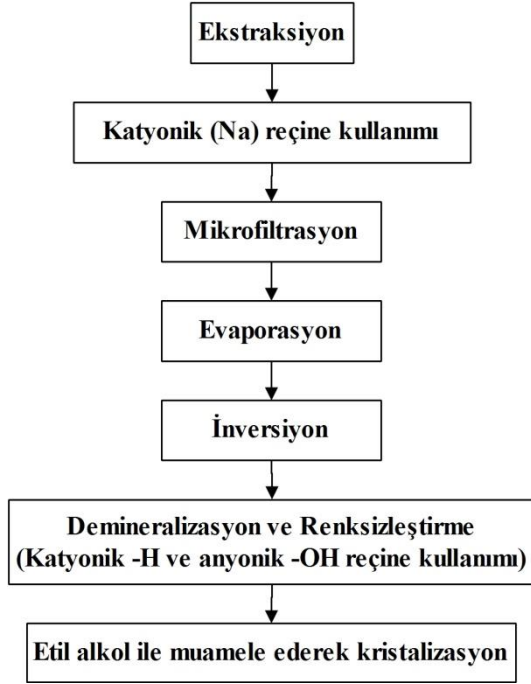
Dolayısıyla fermentasyon sonunda D-pinitol konsantrasyonunda bir miktar artış meydana gelmiştir (Shin vd 2003). Fermentasyon aşamasından sonra ilgili fraksiyonlarda bulunan hedef iki bileşik aktif kömüre tutuklandırılarak bu kimyasaldan kademeli organik solvent elüsyonu yöntemiyle geri kazanılmıştır. Patent altına alınan bu metot ile % 95'lere varan saflık düzeyinde D-pinitol ve *chiro*-inositol elde etmek mümkün olmuştur (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Yüksek saflıkta D-pinitol elde edilmesine yönelik model çalışma (Shin vd 2003)

Camero ve Merino (2004)'nin patent aldıkları başka araştırmada ise keçiyoynuzu ekstraktından % 95 saflıkta D-pinitol elde etmişlerdir. Çalışmada ilk aşama olarak çekirdekleri çıkarılmış keçiyoynuzu meyvesinden kompozisyonunun % 55-75'ini sakkarozun, % 7-15'ini fruktozun, % 7-16'sını glukozun, % 0.5-3'ini diğer şekerlerin, % 4-14'ünü siklitollerin ve % 0.5-2'sini ise organik ve inorganik safsızlıkların oluşturduğu bir ekstrakt elde edilmiştir. Daha sonra bu ekstrakt sırasıyla Şekil 2.19'da gösterilen işlemlere tabi tutulmuş ve en son aşamada da % 95 saflıkta D-pinitol elde edilmiştir.

Camero ve Merino (2004) ön işlemlerden geçirilen keçiyoynuzu ekstraktının deminerilzasyon ve renksizleştirme aşamasından sonra % 90 oranında D-pinitol içerdiğini, bu oranın da etanol ilave edilerek yapılan kristalizasyon işleminden sonra % 95'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi D-pinitolün farklı bitkisel kaynaklardan ekstraksiyonunda ve saflaştırılmasında en çok kromatografik ayırma ve solvent ekstraksiyonu teknikleri kullanılmış bunun yanı sıra inversiyon, etanol fermentasyonu, kristalizasyon gibi saflaştırma tekniklerinden de yararlanılmıştır.



Şekil 2.19. Yüksek saflıkta D-pinitol elde edilmesine yönelik başka bir model çalışma (Camero ve Merino 2004)

2.7. D-pinitolün Zenginleştirilmesi ve Saflaştırılması Amacıyla Yapılan Çalışmalarda Yaygın Olarak Kullanılan Teknikler Hakkında Bazı Bilgiler

Bir bileşiğin bulunduğu ortamdan ayrıştırılması için çok farklı metotlardan yararlanılabilir. Bu amaçla filtrasyon, santrifüjleme, evaporasyon, kristalizasyon, kurutma, ters osmoz ve ultrafiltrasyon gibi mekanik işlemler kullanılabileceği gibi adsorpsiyon, iyon değiştirme, kolon kromatografisi, afinite kromatografisi, solvent ekstraksiyonu, elektroforez ve elektrodializ gibi kimyasal işlemler de kullanılabilir. Ayrıca hedef bileşiğin özelliğine bağlı olarak bu metotların kombine olarak kullanılması da gerekli olabilir. Literatürde D-pinitolün ilgili bir matrikste zenginleştirilmesi veya bu matriksten saflaştırılmasına yönelik yapılan araştırmalar incelendiğinde, bu amaçla özellikle solvent ekstraksiyonu, adsorpsiyon ve iyon değiştirme tekniklerinin yaygın olarak kullanıldığı görülmüştür.

2.7.1. Solvent ekstraksiyonu tekniği

Solvente dayalı ayırma teknikleri bir karışımdan çözünen maddenin uzaklaştırılması veya ayrıştırılmasında distilasyon gibi klasik bir ayırma tekniği ile kolaylıkla ayırma sağlanmadığında gerekli hale gelmektedir (Harper ve Hostrup 2000). Solvent ekstraksiyonu saflaştırma işleminin herhangi bir aşamasında uygulanabilir ancak genellikle ayırma işleminin başında uygulanması daha yararlı olmaktadır. Çözünen madde stabil yapıdaysa ve solvent kolaylıkla uzaklaştırılabiliyorsa solvent ekstraksiyonu ile yüksek verim elde edilebilmektedir (Dechow 1989).

Solvent ekstraksiyonunda çözünen maddenin çözünürlüğü solvente ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Çözünürlüğü belirlemede en önemli faktörlerden birisi

solvent ve çözünen maddenin polaritesidir. Polarite molekülün tamamında ve kimyasal bağlarda dağılmış halde bulunan elektronlarla ilişkilidir. Polar moleküller polar solventlerde çözülmektedir. Solventlerin polarizasyon dereceleri birbirinden farklıdır (Çizelge 2.8). Polarite dereceleri bakımından kıyaslandığında en polar solvent sudur (Dobbs ve Smart 2002). Dolayısıyla birçok polar bileşiğin çözünmesinde yaygın olarak su kullanılmaktadır.

Çizelge 2.7. Yaygın olarak kullanılan solventlerin azalan polariteye göre sıralanması

| Solvent | Formül | İyonik Bileşikleri Çözme Durumu | Polarizasyon Derecesi |
|----------------|---|---------------------------------|-----------------------|
| Su | H ₂ O | + | En polar |
| Asetik asit | CH ₃ COOH | + | |
| Metanol | CH ₃ OH | + | |
| Etanol | C ₂ H ₅ OH | + | |
| Aseton | (CH ₃)C=O | + | Orta derece |
| Etil asetat | CH ₃ COOC ₂ H ₅ | - | |
| Dietil eter | CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃ | - | |
| Triklorometan | CHCl ₃ | - | |
| Toluen | C ₆ H ₅ CH ₃ | - | |
| Benzen | C ₆ H ₆ | - | |
| Hidrokarbonlar | CH ₃ (CH ₂) ₃ CH ₃ vb. | - | En az polar |

KAYNAK: (Dobbs ve Smart 2002)

D-pinitol ve diğer siklitollerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen birçok araştırmada da etanol, metanol, petrol eteri ve aseton gibi farklı solventler kullanılmıştır (Kennington vd 1992; Abreu ve Relva 2002; Shin vd 2003; Dewangan vd 2014). Çalışmalarda kullanılan bu solventlerin genellikle hedef bileşiklerin ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı veya bu bileşiklerce zengin hale getirilen son ürünlerin saflık değerini artırdığı görülmüştür. Bu çalışmalarda en çok kullanılan ve başarılı bulunan solvent etanol olmuştur.

Nitekim soya fasulyesi bitkisinin yapraklarında bulunan D-pinitolün kısmi olarak saflaştırılması üzerine bir araştırma yapan Streeter (2001) farklı oranlarda etanol içeren solventler (630 ve 700 g/L etanol) kullanarak yapraklardan siklitollerce zengin ekstraktlar elde etmiştir. İyon değiştirici reçine kullanılmasıyla saflaştırılan ekstraktların D-pinitol geri kazanımları kıyaslandığında ise daha düşük konsantrasyonda etanol ile yapılan ekstraksiyonda daha yüksek geri kazanım (630 g/L etanol kullanılan denemede % 99, 700 g/L etanol kullanılan denemede % 97) elde edilebildiği görülmüştür.

Shin vd (2003) ise farklı konsantrasyonlarda etanol içeren kademeli kademeli olarak yapılan işlemlerle yüksek saflıkta D-pinitol üretmenin mümkün olduğunu ifade etmiştir. Buna göre; *Saccharomyces carlsbergensis* mayası ile fermente edilen soya sütü peynir altı suyunda bulunan D-pinitolün konsantrasyonu % 95'lik etanol ile muamele edildiğinde 4 kat artmıştır. Bu işlemde elde edilen ekstrakt ise aktif kömür kolonundan geçirildikten ve sonra da % 20'lik etanol ile muamele edilmiş ve D-pinitol konsantrasyonundaki artış 20 kat olmuştur. Daha sonra % 95'lik etanol ile muamele

edilen ve 5 °C’de 12 saat bekletilen ekstrakttan % 96.5 saflıkta D-pinitol içeren bir çökelti elde edilmiştir.

2.7.2. Adsorpsiyon tekniği

Adsorpsiyon işlemleri bir gaz veya sıvıda bulunan bir veya birden fazla bileşiğin (adsorbat) mikro-gözenekli bir katının (adsorbent) yüzeyinde seçici olarak konsantre hale gelmesidir. Adsorpsiyona neden olan çekici kuvvetler genellikle kimyasal bağlardan daha güçsüzdür. Adsorbentın sıcaklığının artırılması veya adsorbatın kısmi basıncının/sıvı içerisindeki konsantrasyonunun azaltılması ile adsorbat sistemden ayrıştırılabilmektedir (Keller vd 1987).

Adsorpsiyon adsorbentın yüzeyinde meydana geldiği için toplam yüzey alanı önemli bir parametredir. Adsorbentın yüzeyi tamamen homojen ise kaplanan yüzeyin miktarı çözünen maddenin boyutu yerine şeklinin bir fonksiyonu olmaktadır. Adsorbent gözenekli bir yapıya sahip değilse çözünen maddenin partikül boyutu azaldıkça adsorplanabildiği maksimum miktar artmaktadır. Bu durum partikül boyutu aşırı derecede küçükse adsorbent dolgulı kolonun yüksek basıncının azalmasına neden olur. Endüstriyel saflaştırma işlemlerinde kullanılan birçok adsorbent 100 m²/g’den büyük yüzey alanına ve 150-1500 µ aralığında değişen partikül büyüklüğüne sahiptir. Bu yüzden adsorbentlerin yüzey alanının büyük bir kısmı gözenekli bir yapıya sahip olmalıdır. Gözeneklerin boyutu ve homojen bir yapıda olması büyük moleküllerin adsorpsiyonunu etkilemektedir. Adsorpsiyonda etkili yüzey alanı adsorbe edilen maddelerin moleküler boyutu arttıkça azalmaktadır (Dechow 1989).

Bir adsorbentın saflaştırma işleminde kullanılabilir olması kompozisyonuna, yüzeyinde bulunan fonksiyonel gruplara, gözenekli yapısına ve yüzey alanına, polarite derecesine ve hidrofilik veya hidrofik olmasına bağlıdır. Saflaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılan adsorbentler silika jel, alumina, zeolit ve aktif karbondur. Silika jel sentetik, gözenekli, küresel topaklar şeklinde oluşan kristal olmayan bir jel yapıdadır. Alumina ise silika jelden farklı olarak kristal bir jel yapısına sahiptir. Zeolit tipi aluminosilikatlar ise % 100 oranında homojen bir boyuta sahip olan gözenekli bir hacim oluşturma özelliğine sahip tek adsorbenttir. Saflaştırma işlemlerinde yaygın olarak kullanılan adsorbentlerden aktif kömür ise odun veya kömürün pirolizi ile oluşan boyutlu granüllerdir (Dechow 1989). Sıvıların saflaştırılmasında bu adsorbentler arasında en çok aktif kömür kullanılmaktadır (Çizelge 2.9).

Ticari aktif karbon adsorbentleri hidrojen ve oksijen molekülleri ile kaplı geniş yüzey alanları ile karakterize edilirler. Bu yüzeyleri reaktif polar gruplardan oluşmaktadır. Adsorbentın gözenek boyutunun bir fonksiyonu olarak gözenek hacminin belirlenmesi aktif kömür tarafından adsorbe edilen moleküler boyutunu gösterebilmek için önemlidir.

Çizelge 2.8. Sıvıların saflaştırılmasında kullanılan ticari adsorpsiyon ayırma yöntemlerine örnekler

| Ayırma | Adsorbent |
|---|-------------------------|
| H ₂ O ilaveli, oksijenli veya klorlu organik maddeler vb. | Silika, alumina, zeolit |
| Koku ve tat bileşikleri, içme suyu | Aktif karbon |
| Sülfürlü bileşikler/organik maddeler | Zeolit ve diğerleri |
| Çeşitli fermentasyon ürünleri/fermentör atıkları | Aktif karbon |
| Petrolün renksizleştirilmiş fraksiyonları, şeker şurupları, bitkisel yağlar vb. | Aktif karbon |

KAYNAK: Keller vd (1987)'nin makalesinden uyarlanmıştır.

Yüksek moleküler ağırlığa sahip çözünebilir organik moleküller düşük molekül ağırlığa sahip moleküllere göre aktif kömüre daha çok adsorbe olmaktadır. Ayrıca adsorpsiyon moleküllerin polar olup olmamasıyla da alakalıdır. Metanol gibi polar ve düşük molekül ağırlıklı organik bileşikler adsorbente çok zayıf bir şekilde tutunur, dolayısıyla diğer organik maddelerin hareketi ile adsorbentin yüzeyinden kolaylıkla hareket ettirilebilir. Toluen gibi aromatik, polar olmayan bileşikler ise aktif karbon yüzeyine etkili bir şekilde tutunurlar ve rejenere edilene kadar da bu şekilde kalırlar. Suyun pH değeri ve çözünen maddenin solvent içerisindeki çözünürlüğü de aktif kömüre adsorplanabilirliğini etkilemede oldukça önemli olan faktörlerdir. Farklı çözünen maddelerin olması, belirli bir kontaminantın uzaklaştırılmasında adsorpsiyon karakteristiğini etkileyen diğer önemli bir faktördür (Dechow 1989).

D-pinitol ve diğer siklitollerin ekstraksiyonu ve saflaştırılması amacıyla yapılan araştırmalarda ticari adsorbentlerden özellikle aktif kömürün kullanıldığı görülmüştür. Nitekim Ostlund ve Sherman (1998) D-pinitol ve türevi bileşiklerinin metabolik düzensizlikler üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında iyon değiştirme kolonu kullanmadan önce aktif kömür adsorpsiyonu uygulamışlardır. Burada aktif kömür ile muamele etmenin renksizleştirmeden ziyade iyon değiştirici reçineye yapışabilecek diğer maddelerin ayrıştırılması için gerekli olduğunu ifade etmişlerdir. İyon-değiştirici reçine kullanımından önce aktif kömür adsorpsiyonu yapılması yoluyla bu istenmeyen bileşiklerin asit/baz uygulamasına direnç göstermesinin ve istenmeyen şekerin uzaklaştırılma hızını düşürmesinin önüne geçildiği bildirilmiştir.

Soya fasulyesi fraksiyonlarından yüksek verimle D-pinitol ve *chiro*-inositol geri kazanımını amaçladıkları çalışmalarında Shin vd (2003) aktif kömür dolgululu kolon ile bu bileşiklerin ayrıştırılmasının iyon değiştirici reçine, zeolit veya mikrobiyal fermentasyon yöntemlerinin kullanılmasına göre ekonomik açıdan tercih sebebi olan bir metot olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu işlem ile proteinler gibi çözünmeyen makromoleküllerin ortamdaki kolaylıkla uzaklaştırılabildiğini, böylelikle yüksek verimde D-pinitol ve *chiro*-inositol üretebilmenin mümkün olduğunu ifade etmişlerdir.

2.7.3. İyon değiştirme tekniği

İyon-değiştirici reçineler ile yapılan ayırma ve saflaştırma işlemlerinin esası çözünmez bir reçine ile (iyon değiştirme materyali) solüsyonda bulunan ve iyonlaşabilir bir madde arasındaki iyonların tersinir bir şekilde değiştirilmesi prensibine

dayanmaktadır (Dechow 1989). İyon değiştirme tekniğinin endüstriyel uygulamaları oldukça fazladır. Teknik su gibi düşük maliyetli maddelerin saflaştırılmasından yüksek maliyetli altın ve platin gibi kıymetli metallerin yanı sıra farmasötik türevlerin işlenmesi ve saflaştırılmasına kadar değişen geniş bir aralıkta kullanılmaktadır (Çizelge 2.10). İyon değiştirme tekniğinin en çok kullanıldığı alan ise yumuşatma, dealkalizasyon, demineralizasyon gibi işlemlere tabi tutulan su işlemedir. Atık su işleme, çevre kirliliğinin kontrolü gibi alanlarda da başarıyla kullanılabilmektedir (Streat ve Cloete 1987).

Çizelge 2.9. Temel iyon değiştirme uygulamalarına örnekler

| | |
|---------------------------------------|---|
| Su | Yumuşatma, dealkalizasyon, deiyonizasyon, florür, oksijen, demir ve manganez, nitrat, amonyak ve renk maddelerinin uzaklaştırılması |
| şekerler ve polihidrik alkoller | şeker kamışı, mısır ve şeker pancarı şekerlerinin saflaştırılması, gliserin ve sorbitolün saflaştırılması |
| Biyolojik geri kazanım ve saflaştırma | Antibiyotikler, vitaminler, amino asitler, proteinler, enzimler, plazma, kan ve virüsler |
| Hidrometalurji | Uranyum, toryum, nadir topraklar, geçiş metalleri, uranyumdan daha ağır elementler, altın, gümüş, platin ve krom |
| Solvent saflaştırma | Alkoller, benzen, klorlu hidrokarbonlar, aseton, karbon tetraklorür |
| Reaktif saflaştırma | Hidroklorik asit, formaldehit, fenol, akrilatlar |
| İnorganik kolloidlerin hazırlanması | SiO ₂ , Fe(OH) ₃ , Al(OH) ₃ , toryum oksit, zirkonyum dioksit |
| Kataliz | Sakkarozun iversiyonu, esterifikasyon, kondensasyon |
| İlaç | Antasitler, sodyumun indirgenmesi, tadın maskelenmesi, sürekli salınım, tedavi, tabletlerin ufalanması, pH kontrolü, potasyum ve toksinlerin uzaklaştırılması, kaplama uygulaması |
| Analiz | Ayırma, konsantre etme, saflaştırma |

KAYNAK: Streat ve Cloete (1987)'nin makalesinden uyarlanmıştır.

İyon değiştirici materyaller tamamen inorganik olan reçineler ve sentetik organik reçineler olarak sınıflandırılmaktadır. İnorganik iyon değiştiriciler mineral zeolitler, yeşil kum taşı, kil ve jel zeolitler gibi doğal olarak bulunan materyaller ile çok değerlikli metallerin sulu oksitleri ve çok değerlikli metallerin polibazik asitlerin çözünmeyen tuzlarını bir arada bulundurmaktadır. Sentetik organik reçineler ise çapraz bağlı polimer matriksi yapıları sayesinde iyon değiştirme kapasitesine sahip olmaktadır. Bu matriksin genel olarak güçlü ve zayıf asit katyonu ve güçlü ve zayıf baz anyonu özelliklerini kazanacak şekilde ilave reaksiyonlar geçirmesi gerekmektedir (Dechow 1989).

İyon değiştirici reçinelerden hedef bileşiğin elüsyonu özel bir ayırma işlemi gerektirmektedir. Bazı durumlarda hedef bileşiık/bileşiıklar adsorbe edilmeden kalırken iyon değiştirme işlemi hammaddeden safsızlıkların uzaklaştırılması için kullanılır. Bu durumda iyon değiştiricinin rejenere edilebilmesi için güçlü bir asit veya alkali ile muamele edilmesi gerekirken, özel bir elüsyon metodunun uygulanmasına gerek yoktur.

Diğer durumlarda hedef bileşik iyon değiştirici tarafından adsorbe edilirken safsızlıklar kolonu terk eder. Bu aşamadan sonra istenen bileşik kolondan ayrıştırılarak geri kazanılır (Grandison 1996).

Adsorbe edilen maddenin elüsyonu tamponun pH'sının veya iyonik gücünün değiştirilmesinden etkilenmektedir. Tamponun iyonik gücünün artırılması iyon değiştirici üzerindeki yüklü bölgeler için rekabeti artırmaktadır. Bu sayede yüksek derecede yük yoğunluğuna sahip olan küçük tampon iyonları daha sonra ayrışacak olan polielektrolitlerle yer değiştirir. Tampon pH'sının değiştirilmesi ise adsorbe edilen polielektrolitin yükü nötralize edildiği veya iyon değiştirici ile aynı yüke sahip hale getirildiği için desorpsiyona uğramasına neden olur (Grandison 1996).

Literatürde D-pinitol ve türevlerini yüksek saflıkta elde etmede iyon değiştirme tekniğinin yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Camero ve Merino (2004) keçi boynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolü ayrıştırılabilmek için iyon değiştiricilerin de kullanıldığı farklı tekniklerden yararlanmışlardır. D-pinitolün güçlü anyonik ve katyonik iyon değiştirici reçinelerle ekstraktan ayrıştırılabileceğini ifade eden Camero ve Merino (2004) D-pinitolün saflık düzeyi üzerine katyonik ve anyonik reçine kullanımının etkisini araştırmışlardır. Buna göre; Na^+ ve Ca^{+2} formundaki güçlü katyonik reçineleri kullandıkları denemede % 95 saflıkta D-pinitol elde ettiklerini; OH^- formundaki güçlü anyonik reçine kullandıklarında ise % 91 saflıkta D-pinitol elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte anyonik reçine kullanımının alkali ortamda şekerlerin dekompoze olmasına neden olduğunu, adsorpsiyonun geri dönüşsüz gerçekleştiğini dolayısıyla reçinelerin rejenerasyonunda zorluklar yaşandığını bunun da yüksek maliyetlere ve reçine ömürlerinin kısa olmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle ve adsorpsiyon etkileri geri dönüşümlü olan stabil katyonik reçinelerin kullanımının istenen hedefe ulaşılmada yararlı olacağını ifade etmişlerdir.

Ostlund ve Sherman (1998) soya fraksiyonlarından D-pinitol ve türevlerini ayırmak için iyon değiştirici reçine kullanımının da yer aldığı bir takım işlemler uygulamışlardır. Deiyonizasyon ve şekerlerin ekstraktan uzaklaştırılması amacıyla OH^- formunda güçlü anyonik iyon değiştirici reçine kullanarak D-pinitol ve türevlerince zengin bir ürün elde etmişlerdir. Ostlund ve Sherman (1998) deiyonizasyonun kesikli yapılmasının iyon değiştirici kolonlar kullanılarak yapılan uygulamalara göre daha az etkili olduğunu, bu sistemde reçinenin rejenerasyonunun daha zor olduğunu ve deiyonizasyonun da çok uzun sürdüğünü ifade etmişlerdir.

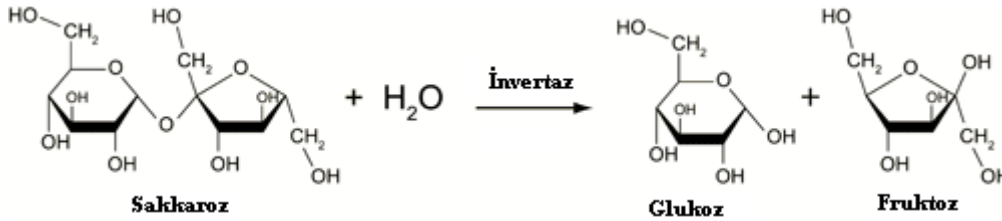
Saska ve Diack (1996) düşük konsantrasyonlu NaOH çözeltisi ile şartlandırdıkları Cl^- formundaki güçlü baz anyonik iyon değiştirici reçine sistemi kullanarak şeker ve şeker alkollerine göre afinitesi daha düşük olan inositoller ilgili solüsyondan ayırmışlardır. Soya fasulyesi bitkisinin yapraklarında bulunan D-pinitolün kısmi olarak saflaştırılması amacıyla bir çalışma gerçekleştiren Streeter (2001) ise H^+ formundaki güçlü katyonik ve OH^- formundaki güçlü anyonik iyon değiştirici reçineleri kullanarak ekstrakta bulunan siklitollerin konsantrasyonunu artırmıştır. Streeter (2001) iyon değiştirici kolonlar kullanılmadan önce kuru madde içeriğinin % 26'lık kısmını şekerler ve siklitollerin oluşturduğunu, iyon değiştirici kolonlar kullanıldığında ise elde edilen ekstraktlarda şekerler tespit edilemezken siklitollerin kuru ağırlığın % 93.5'lik bir kısmını oluşturduğunu belirtmiştir.

2.8. Araştırma Kapsamında Kullanılan Teknikler Hakkında Bazı Bilgiler

2.8.1. Enzim uygulama

Araştırmada keçiyoynuzu meyvesi sıcak su ile muamele edilerek meyvede bulunan suda çözünen bileşiklerin (D-pinitol, şekerler vb.) belli bir kısmının sıvı ekstrakta geçmesi sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra ekstraktın D-pinitol içeriğini zenginleştirebilmek için uygulanan ilk aşama enzim uygulama ve sıcak durultma olmuştur. Enzim uygulamada keçiyoynuzu ekstraktında bulunan sakkaroz molekülüne ve pektik maddelere etki edecek enzimler (pektolitik enzim karışımı ve invertaz) kullanılmıştır.

Invertaz (β -D-fruktofuranosid fruktohidrolaz, β -fruktofuranosidaz, sükröz, invertin, sakkaraz, EC 3.2.1.26) sakkaroz ve glikozitlerinin hidrolizini katalizleyen en basit ticari karbohidrazlardan birisidir (Şekil 2.20). Özellikle konfeksiyoneri endüstrisinde sakkarozla göre daha tatlı olan ve kolaylıkla kristalize olmayan fruktozun arzu edildiği durumlarda bu enzimin aktivitesinden yararlanılmaktadır (Aranda vd 2006).



Şekil 2.20. İinvertazın etki mekanizması (Alper 2005)

İnvertaz enziminin üretiminde birçok mikroorganizma kullanılmaktadır. Maya kaynaklı invertaz β -fruktosidaz tipi invertaz olurken fungal kaynaklı invertaz ise α -fruktosidaz tipi invertaz olmaktadır. Her iki tip invertaz da sakkarozu hidrolize etmektedir ancak β -fruktosidaz tipi invertaz sakkaroz molekülünü fruktoz ucundan parçalarken, α -fruktosidaz tipi olan invertaz ise glukoz ucundan parçalamaktadır (Kulp 1975).

Literatürde *Schwanniomyces occidentalis* (Costaglioli vd 1997), *Aspergillus niger* (Romero-Gomez vd 2000), *Candida utilis* (Chávez vd 1997), *Rhodotorula glutinis* (Rubio vd 2002) gibi birçok mikroorganizmadan invertaz üretildiğine dair araştırmalar mevcuttur. Ancak bu enzimin ticari olarak üretiminde en çok karakteristik olarak sakkarozu yüksek derecede fermente edebilme özelliğine sahip olan *Saccharomyces cerevisiae* mayası kullanıldığı bilinmektedir (Venesh Kumar vd 2011).

Bu araştırmada invertaz enzimi kullanılma amacı araştırmada yer alan etanol fermentasyonu aşamasında mikroorganizmanın sakkarozla göre glukozu daha çok tercih etmesinden dolayı etanol üretme hızını, dolayısıyla da fermentasyon etkinliğini artırmak olmuştur. Pektolitik enzimler etki ettikleri substrata (pektin, pektik asit, oligo-D-galakturonat vb.), etki şekli (hidroliz veya trans-eliminasyon) ve substratı parçalama bölgelerine (endo-, ekzo-) göre sınıflandırılmaktadır (Alkorta vd 1998; Kashyap vd 2001) (Çizelge 2.11).

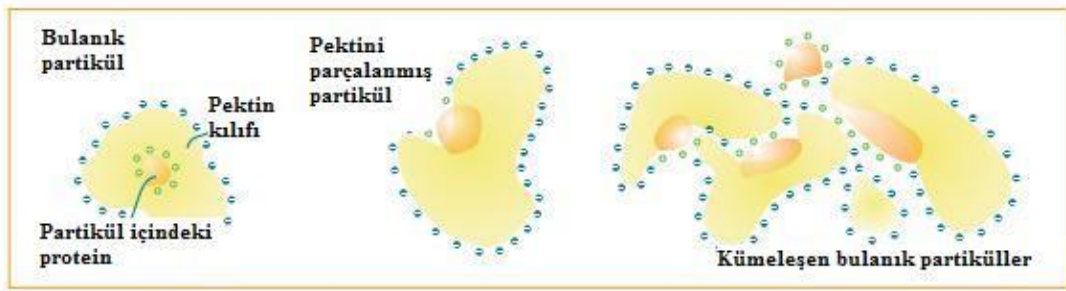
Çizelge 2.10. Pektolitik enzimlerin sınıflandırılması

| | Enzim Grubu | Substrat | Etki Mekanizması | |
|------------------------------|--|------------------------------------|---|--|
| | Pektinesterazlar (PE, Pektinmetil hidrolazlar) | Pektin | Metoksil grubunu deesterifiye ederek pektik asit oluşturma | |
| Depolimerize Enzimler | Hidrolizasyon | Polimetilgalakturonaz (PMG) | Endo PMG: α -1,4-glikozidik bağları rastgele parçalama Ekzo PMG: α -1,4-glikozidik bağları sırayla parçalama | |
| | | Poligalakturonazlar (PG) | Endo PG: α -1,4-glikozidik bağları rastgele parçalama Ekzo PG: α -1,4-glikozidik bağları sırayla parçalama | |
| | Trans-eliminasyon | Polimetilgalakturonat liyaz (PMGL) | Endo PMGL: α -1,4-glikozidik bağları rastgele trans-eliminatif ayırma Ekzo PMGL: α -1,4-glikozidik bağları sırayla trans-eliminatif ayırma | |
| | | Poligalakturonat liyaz (PGL) | Endo PGL: α -1,4-glikozidik bağları rastgele trans-eliminatif ayırma Ekzo PGL: α -1,4-glikozidik bağları sırayla trans-eliminatif ayırma | |
| | | Protopektinaz | Protopektin | Yüksek derecede polimerleşmiş çözünebilir pektin |

KAYNAK: (Alkorta vd 1998; Kashyap vd 2001)

Pektik enzimler meyve suyu endüstrisinde özellikle meyve suyu randımanının artırılmasında ve meyve sularının durultulmasında uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Whitaker 1990). Filtrasyonu kolaylaştırmak ve bulanıklığa neden olan partikülleri meyve suyundan uzaklaştırmak amacıyla uygulanan durultma işleminde pektik enzimlerin kullanımı bu enzimlerin bilinen en eski kullanım alanıdır (Rombouts ve Pilnik 1980). Pektik enzimler ayrıca meyve suyu ekstraksiyonunda da önemli bir role sahiptir. Pektinin bu enzimler tarafından parçalanması preslemeyi kolaylaştırmakta dolayısıyla elde edilen meyve suyu verimi artmaktadır. Frenk üzümü, ahududu gibi yumuşak meyveler ezildikten sonra elde edilen ham meyve suları aşırı derecede viskoz olmakta dolayısıyla katı partiküllerin meyve sularından ayrıştırılması zorlaşmaktadır. Pektik enzimlerin aktivitesi viskozitede azalmaya neden olup preslemede meydana gelebilecek bu problemi ortadan kaldırmaktadır (Sakai vd 1993).

Pektik maddeler meyve sularının yoğunluğunu, bulanıklığını ve görünüşünü etkileyen maddelerdir (Borrego vd 1989) ve taze meyve ağırlığının % 0.5-4'ü bu bileşiklerden oluşturmaktadır (Pilnik ve Voragen 1993). Preslenen ham meyve sularında ve bitkisel kaynaklı bütün meyvelerin ekstraktlarında pektik bileşikler gibi çözünmeyen partiküller bulunur. Bu partiküller "bulanıklık oluşturan partiküller" olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. Pektolitik enzim aktivitesinin meyve dokuları üzerine etkisi (Anonymous 2014c)

Partiküllerde pozitif yüklü protein çekirdeği negatif yüklü pektin molekülü ile sarılmıştır (Pilnik ve Voragen 1993). Pektin moleküllerinin negatif yüklü olması aynı yüklü diğer partikülleri itmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla bulanıklık oluşturan bu partiküllerin agregasyon ve flokülasyonu için bu pektin kılıfının parçalanması gerekmektedir.

Pektolitik enzimler partiküllerdeki pektin kılıfını parçalayarak protein çekirdeğinin ortaya çıkmasını sağlamakta, karşı karşıya gelen zıt yüklü partiküller de elektrostatik çekim kuvvetinin etkisiyle büyük agregatlar oluşturmaktadır (Anonymous 2014c). Bu partiküller kendiliğinden çökebilse de çökme işlemini hızlandırmak ve etkinliğini artırmak amacıyla durultma aşamasında bentonit, jelatin ve kizelzol gibi çökmeyi teşvik eden yardımcı maddeler kullanılmaktadır (Kashyap vd 2001).

2.8.2. Durultma

Geleneksel durultma işleminde yaygın olarak kullanılan durultma yardımcı maddeleri bentonit, jelatin ve kizelzoldur. Bunlardan kizelzol ve bentonit negatif yük taşıyan, jelatin meyve suyu pH'sında pozitif yüklüdür. Meyve suyunda bulunan ve bulanıklık sorunu yaratan fenolik bileşiklerin negatif, meyve suyu proteinlerinin ise pozitif yüklü olduğu dikkate alınacak olursa, uygun miktar, kombinasyon ve koşullarda eklenecek durultma yardımcı maddeleri ile etkin bir berraklaştırma işlemi gerçekleştirmek mümkündür. Böylece aynı tür elektriksel yük taşıyan kolloidlerin üzerine zıt yük taşıyan bir kolloidin eklenmesi ile daha önce aynı tür yük taşıdığı için birbirini iten parçacıklar floklar halinde çökmeye başlamakta ve oluşan floklar sedimentasyon veya filtrasyon gibi bir uygulamayla ayrılabilir nitelik kazanmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Durultma yardımcı maddelerinden jelatin; kemik, deri, kıkırdak gibi hayvansal kaynaklardan elde edilen kollagen tipi bir proteindir. Ekstraksiyon yöntemine göre asidik hidrolizasyon (Tip-A) ve bazik hidrolizasyon ile elde edilen (Tip-B) olmak üzere iki tipi mevcuttur. Durultma açısından jelatinin izoelektrik noktası ve bloom sayısı gibi özellikleri önemlidir (Ekşi 1988). A tipi jelatinin izoelektrik noktası pH 7.0-9.0 arasındadır. Bu izoelektrik noktadaki pH değerinde A tipi jelatin eşit miktarda pozitif ve negatif yükler içereceği için dışarıya karşı nötr olarak davranmakta, bu pH derecesinin altında pozitif, üstünde ise negatif yük kazanmaktadır. B tipi jelatin ise, izoelektrik noktası pH 4.5-5.0 olan jelatindir. Bu jelatinin izoelektrik noktasındaki pH derecesi ile meyve suyunun pH

derecesi arasındaki fark arttıkça jelatinin pozitif yükü de arttığı için meyve suyu durultmasında A tipi jelatin kullanımı tercih edilmektedir.

Jelatinin izoelektrik noktası hariç diğer bir özelliği de bloom sayısıdır. Bloom sayısı ile jelatinin molekül ağırlığı hakkında bilgi edinilebilmektedir. Bir jelatin preparatının molekül ağırlığı ne kadar yüksekse o kadar sert bir jel oluşturur, yani bloom sayısı o kadar yüksektir. Durultmada en iyi sonuç veren jelatinlerin bloom sayısı 80–100 arasında olan jelatinler olduğu belirtilmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004).

Meyve suyuna eklenen pozitif yüklü jelatin, negatif yüklü fenolik bileşiklerin yükünü yok etmekte, böylece floklar meydana gelmektedir. Jelatinin aşırı buruk ve acı tat veren bazı fenolikleri de uzaklaştırması sonucu meyve suyunun tadı düzelmekte ve duyuşsal açıdan olumsuz olarak nitelendirilen aşırı burukluk ortadan kalkmaktadır. Fenolik maddelerin polimerizasyon derecesi arttıkça jelatinle ortamdan uzaklaştırılma oranı da artmaktadır (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004). Optimum durultma için gerekli jelatin miktarı fenolik madde miktarı arttıkça artmakta, pH değeri düştükçe ise azalmaktadır (Ekşi 1988).

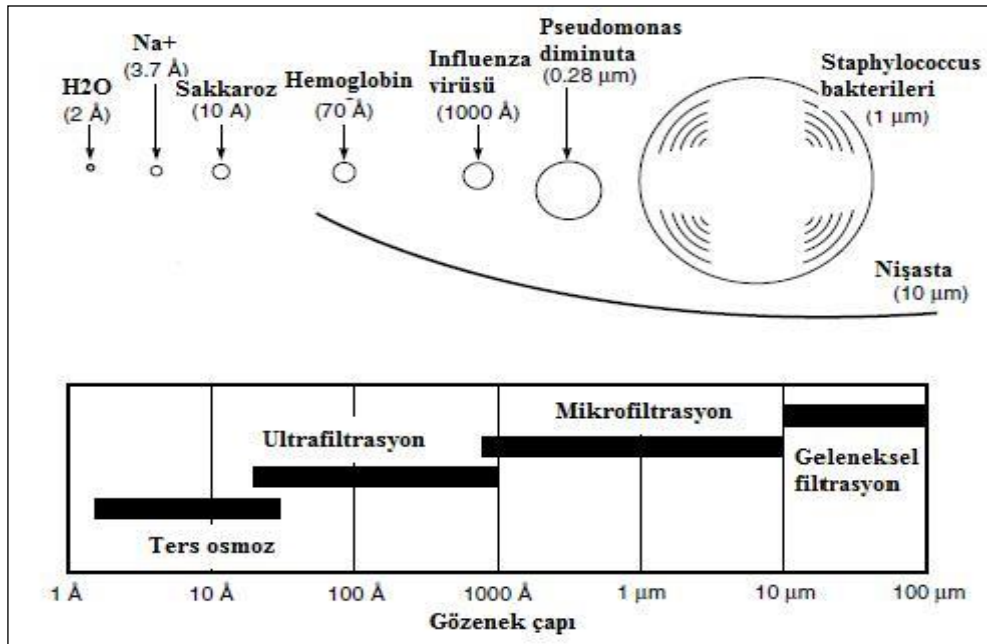
Meyve suyu durultmada kullanılan diğer durultma yardımcı maddesi bentonittir. Bentonit doğal kildir ve en önemli bileşen olarak % 60-80 oranında montmorillonit içermektedir. Orta katmanında bulunan katyon türüne göre Na ve Ca-bentonit olmak üzere iki tipi mevcuttur. Na-bentonitin adsorpsiyon kapasitesi Ca-bentonitinkinden daha iyidir ancak meyve suyu durultmada Na ve Ca-bentonitlerin kombinasyonlarının kullanılmasının daha etkili sonuç verdiği belirtilmektedir (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004). Bu bileşikler proteinleri, ağır metal iyonlarını, pestisitleri ve koyu renkli bileşikleri yüzeyde adsorbe eden bir berraklaştırma mekanizmasına sahiptir (Koyuncu vd 2007). Durultmada kullanılması esmerleşme potansiyelini de azaltabilmektedir (Gómez-Plaza vd 2000). Bentonitin etkinliği 20-60 °C'de yüksek düzeydeyse de maksimum etkinliğini 35 °C civarında göstermektedir.

Durultma işleminde yaygın olarak kullanılan diğer durultma yardımcı maddesi ise kizelzoldür. Kizelzol; saf silisyum dioksidin sudaki sol formudur. Silikazol olarak da adlandırılmaktadır. Meyve suyunun asit ortamında negatif yük kazanmakta ve protein gibi pozitif yüklü bileşikler ile sıkı bir tortu oluşturmaktadır. Özellikle sıcak durultmada jelatin kullanıldığı zaman kizelzolun da kullanılması gerekmektedir. Aksi takdirde meyve suyu için gereken optimum jelatin dozu aşılma ve üründe jelatin kalıntısı bulanıklığı meydana gelmektedir (Bayındırlı vd 1994). Bununla birlikte jelatinin negatif yüklü parçacıklar ve fenoliklerle sıkı bir flok oluşturabilmesi için 10 °C'ye kadar soğutulmuş olması gerekmektedir. Ancak tek başına kullanıldığında 40 °C'nin üzerinde floklaşma yapamaması nedeniyle bu, sadece soğutma ile mümkün olmaktadır. Bu sebeple 40-50 °C'de mükemmel ve hızlı bir flok oluşturabilmek amacıyla da kizelzol ile beraber kullanılması gerekliliği söz konusudur (Cemeroğlu ve Karadeniz 2004). Kizelzol miktarı meyve suyunda bulunan fenolik bileşikler az ise artırılabilir. Ancak bu durumda önce kizelzolun, daha sonra jelatinin eklenmesi tavsiye edilmektedir (Oszmiański ve Wojdyło 2007). Kizelzolun aşırı kullanımı ise ince flok oluşumuna yol açmaktadır. İnce flok oluşumu daha fazla hacim kaplaması ve oluşan tortunun daha geç çökmesi sebebiyle istenmeyen bir olgudur (Ekşi 1988). Araştırmada keçiyoynuzu ekstraktında bulunan muhtemel bileşikler (protein, fenolik bileşikler vb.) ekstraktan uzaklaştırarak D-

pinitolün zenginleştirilmesine katkı sağlamak amacıyla enzim uygulama ve sıcak durultma işlemleri kullanılmıştır.

2.8.3. Ultrafiltrasyon

Membran filtrasyon $2 \mu\text{m}$ 'den daha küçük olan partiküllerin ayrıştırılması için uygulanan bir işlemdir. Membran filtrasyon sistemleri mikrofiltrasyon (MF), ultrafiltrasyon (UF), nanofiltrasyon (NF) ve hiperfiltrasyon/ters osmoz (RO) olarak sınıflandırılmaktadır. Her filtrasyon sisteminin membranı kendi karakteristik gözenek çapına ve ayırma limitine sahiptir (Şekil 2.22).



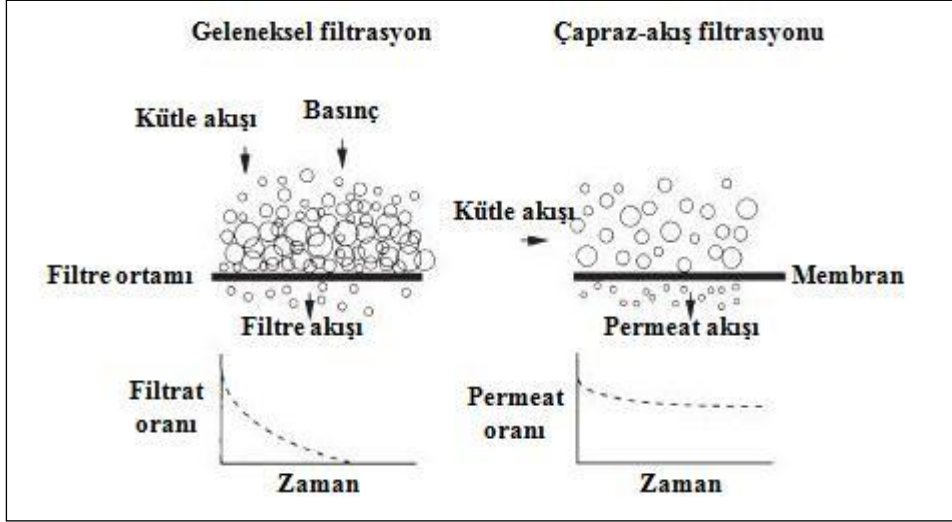
Şekil 2.22. Bazı membran filtrasyon sistemlerinin gözenek çapları (Baker 2004)

Bu membranlardan UF membranlar 400-400,000 g/mol molekül ağırlığına sahip küçük partiküllerin ayrıştırılması için uygun olan membranlardır (Hassan ve Price 2014). Diğer birçok membran sisteminde olduğu gibi UF sisteminde de temel filtrasyon prensibi çapraz-akış filtrasyonudur (Şekil 2.23).

Geleneksel filtrasyonda filtre sıvı akışına karşı bir pozisyonadır. Dolayısıyla sıvının tamamı bir basınç oluşturarak filtreden geçmektedir. Bu tip filtrasyonda askıda kalan katı partiküllerin çoğu veya tamamı az-çok berraklaştırılmış bir sıvıdan ayrıştırılmaktadır (Şekil 2.23). Çapraz-akış filtrasyonunda ise sıvının akışı membrana paraleldir. Bu tip filtrasyonda askıda kalan partiküllerin çok azı membran yüzeyinde kalır. Dolayısıyla bu yöntemle oldukça berrak filtratlar (permeatlar) elde edilebilmektedir (Şekil 2.23) (Sutherland 2008)

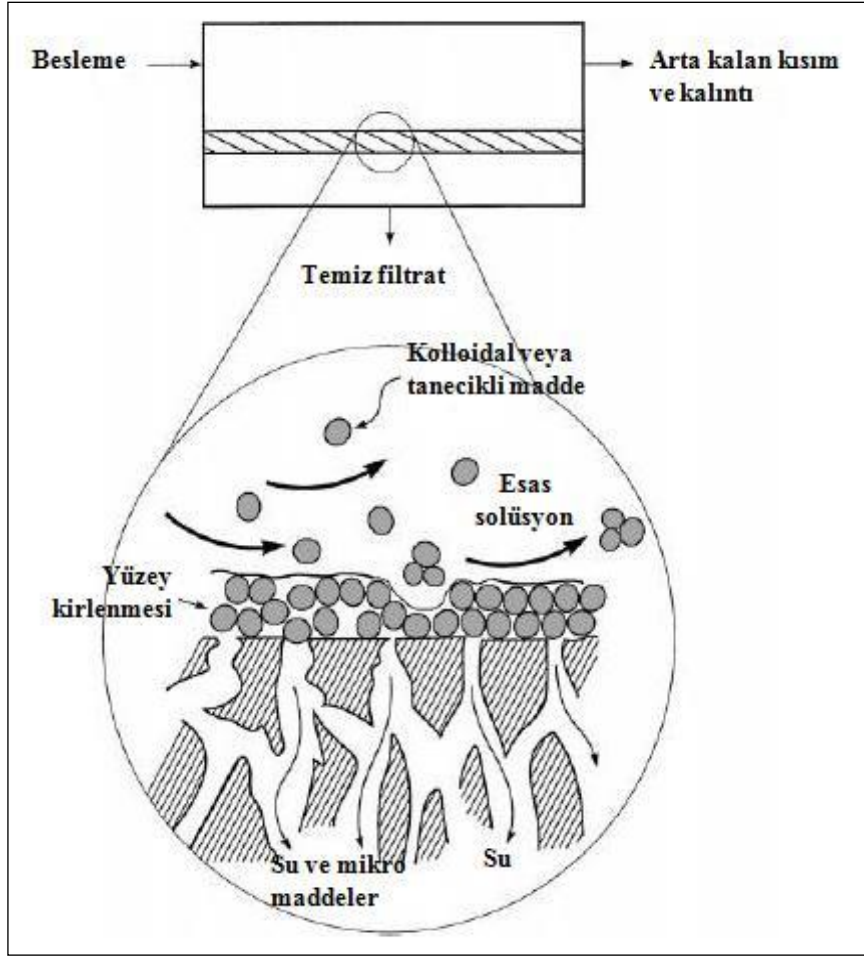
UF membranlarda başlıca kullanılan materyaller poliakrilonitril, polivinil klorid-poliakrilonitril kopolimerleri, polisülfon, polietersülfon, polivinilidenflorid, bazı aromatik poliamidler ve selüloz asetatıdır (Baker 2004). Bu materyallerden polietersülfon (PES) yapılı membranlar rutin uygulamalarda yüksek sıcaklıklara ve geniş pH aralıklı

solüsyonlara dayanıklı, klorlu bileşiklere yüksek derecede direnç gösteren, farklı ölçü ve şekillerde kolaylıkla kullanılabilen, UF ve MF uygulamaları için geniş bir gözenek çapı aralığına sahip ($10 \text{ \AA} - 0.2 \text{ \mu}$) ve alifatik hidrokarbonlara, halojene hidrokarbonlara, alkollere ve asitlere karşı iyi düzeyde kimyasal dayanıklılığa sahiptir ve gıda uygulamalarında çok tercih edilen membranlardandır.



Şekil 2.23. Çapraz-akış filtrasyonu (Sutherland 2008)

UF membranların geçirgenliğini filtre edilecek sıvıda bulunan moleküllerin boyutu ve şekli, membran materyalinin yapısı, sıvıdaki diğer çözünen bileşiklerin varlığı, pH ve iyonik kuvvet gibi faktörler etkilemektedir (Cheryan 1998). Ultrafiltrasyon membranlarının kullanımıyla ilgili en önemli problem membranların yüzeyinin kirlenmesidir (Şekil 2.24). Membrandan geçemeyen madde membran yüzeyinde birikerek katı jel yapısında bir film tabakası oluşturur ve bu film tabakası da membrandan permeat akışına karşı bir engel görevi görmektedir. Bu tabakanın kalınlığı membran yüzeyinden geçen besleme çözeltisinin yüzeydeki kirleri sürüklemeye faaliyeti ile kontrol edilmektedir (Baker 2000). Sürekli olarak sirküle edilen besleme çözeltisinin akışı nedeniyle yüzeydeki bu film tabakası sürekli olarak yüzeyden ayrılmaktadır. Dolayısıyla membran yüzeyinde bulunan kir tabakasını ayıran besleme çözeltisinin sirkülasyonu ve permeat akışı arasında bir dengedir. Bu yüzden ultrafiltrasyonda beslemenin sadece bir kısmı membrandan permeat olarak geçer, diğer kısmı ise kalıntı maddelerin birikmesiyle konsantre hale gelir (Baker 2000).



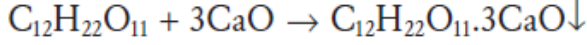
Şekil 2.24. Ultrafiltrasyon membran yüzeyinden kolloidal veya tanecikli maddelerin uzaklaştırılması ve membran yüzeyi kirlenmesinin şematik gösterimi (Baker 2000)

Gıda endüstrisinde ultrafiltrasyon işlemi en çok süt endüstrisinde sütün konsantr edilmesinde veya seçici olarak laktoz ve tuzların ayrıştırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca sakkaroz çözeltilisinin ve domates salçasının konsantr edilmesinde, biracılık ve damıtık içki endüstrisinde atıkların işlenmesinde, enzimlerin, proteinler ve pektinin ayrıştırılması ve konsantrasyonunda, bal ve şuruplardan protein bulanıklığının uzaklaştırılmasında da ultrafiltrasyon işleminden yararlanılmaktadır. İşletmelerde kullanılan suyun bakteri ve diğer kontaminantlardan arındırılmasında ve ters osmoz membranlarının süspanse organik materyaller ve kolloidal bileşiklerle tıkanmasını önlemek amacıyla da ultrafiltrasyon işlemi kullanılmaktadır (Fellows 2009). Bu tez çalışmasında keçiboynuzu ekstraktının pH değeri, sıcaklığı ve ultrafiltrasyon membranlarının gözenek çapı değiştirilerek filtre edilen ekstrakttaki hedef bileşiklerin konsantrasyonlarındaki değişim araştırılmıştır.

2.8.4. CaO ile muamele (Steffen işlemi)

CaO ile muamele (Steffen işlemi) Carl Steffen tarafından 1883'te patent altına alınmış, şeker endüstrisinde eskiden daha çok tercih edilen ve seyreltik şekerli sıvılardan

veya melastan (10-12 °Bx) sakkaroz elde edilmesinde kullanılan bir metottur. Steffen işlemi sakkarozun CaO tarafından tri-kalsiyum sakkarat formunda çöktürülmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 2.25). Bu bileşiğin düşük sıcaklıklarda bile suda çözünürlüğü oldukça azdır (Asadi 2007).



Şekil 2.25. Sakkarozun tri kalsiyum sakkarat formunda presipitasyonu (Asadi 2007)

Günümüzde şeker endüstrisinde uygulanan Steffen işleminde CaO şeker şuruplarına 200-300 g CaO/L konsantrasyonda olacak şekilde sönmüş kireç sütü formunda ilave edilmektedir. Bazı sistemlerde de CaO'in kuru toz formunda şeker şuruplarına ilave edildiği bildirilmiştir. Bu şekilde CaO kullanılması şeker şurubunda daha iyi düzeyde saflaştırma ve filtrasyon uygulanmasına olanak sağladığı bunun nedeninin de kuru formda ilave edilen kirecin (CaO) yavaş yavaş sönmeye dolayısıyla da bu işlemin kademeli gerçekleşmiş olmasını sağladığı ifade edilmektedir (Van Der Poel vd 1998).

CaO'ten sönmüş kireç sütü üretilmek istenildiğinde genellikle kremi bir sıvı haline gelen bu kimyasalın 15-20 °Baume'lik bir solüsyonu hazırlanmaktadır (Prinsen Geerlings 1924). Presipitasyon düşük sıcaklıklarda (9-14 °C) gerçekleştiğinde sıvıda bulunan sakkarozun % 90'ı geri kazanılmaktadır. Presipitat filtre edildikten sonra 90 °C'ye ısıtıldığında geri kalan sakkarozun % 6.5'i de çöktürülebilmektedir (Van Der Poel vd 1998).

Sıvıların rafinoz ve indirgen şekerler gibi diğer safsızlıkları içermesi sakkarozun kristal formda ayrıştırılmasını engellemektedir. Dolayısıyla şeker endüstrisinde şeker şuruplarının saflaştırılmasında CaO ve CO₂ ile muamele işlemleri uygulanarak diğer safsızlıkların ortamdan uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Yeterli düzeyde CaO kullanımı bu safsızlıkların uzaklaştırılmasında önemli olan faktörlerden birisidir. Sakkaroz haricindeki safsızlıkları dört gruba ayırmak mümkündür:

- a. CaO ile reaksiyon veren ve presipitat oluşturan safsızlıklar
- b. CaO ile reaksiyon vermeyen ancak kararsız yapıda olan safsızlıklar
- c. CaO ile reaksiyon vermeyen ancak başka bileşiklere dönüşen safsızlıklar
- d. Hiçbir koşulda CaO ile reaksiyon vermeyen safsızlıklar

Bu safsızlıklardan ilk üç grupta yer alan bileşikler şeker şurubundan uzaklaştırılabilmektedir. Okzalıklar, fosfatlar ve sülfatlar ilk grupta, kolloidal bileşikler ise ikinci grupta yer almaktadır. Kolloidal bileşikler CaO ile çöktürülemezler ancak yapısal değişikliğe uğrayıp koloidal kalsiyum karbonat oluştururlar. Bu formda ise şuruptan sedimentasyon ve filtrasyon yoluyla ayrıştırılabilirler. İndirgen şekerler ise üçüncü grupta yer alan bileşiklerdendir. CaO ile reaksiyon vermezler ancak CaO etkisiyle laktik asit ve diğer asitlere dönüşürler. Dolayısıyla bu formları ile CaO bulunan ortamda presipite olup filtrasyon ile sıvıdan uzaklaştırılabilirler. Rafinoz, betain ve amino asitler dördüncü grupta yer almaktadır. Bu bileşikler hiçbir şekilde şuruptan uzaklaştırılamazlar ve şurupta kalırlar (Asadi 2007).

Şeker endüstrisinde olduğu gibi kristal formda, saf sakkaroz elde edebilmek için sakkarozun elde edilmek istendiği materyalde bulunan ve yukarıda ifade edildiği gibi sakkarozun saflaştırılmasını engelleyen diğer safsızlıkların ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu nedenle bu çalışmada keçiyoynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolü saflaştırmak amacıyla kullanılan aşamalarla yan ürün olarak kristal formda sakkaroz elde edilebilirliği de araştırılmak istenmiş ve bu amaçla ekstrakt CaO ile muamele edilmiştir.

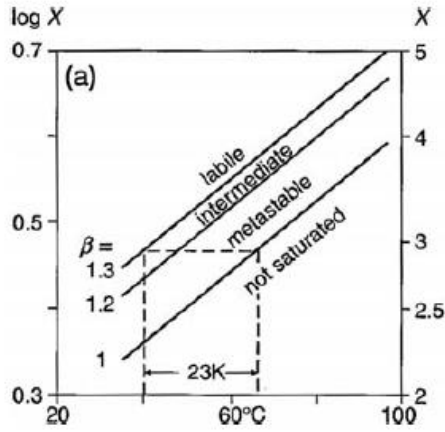
2.8.5. Kristalizasyon

Organik kimyasalların üretilmesinde kristalizasyon ürünün geri kazanılması, ara reaksiyon kimyasallarının saflaştırılması ve istenmeyen tuzların uzaklaştırılması için kullanılan bir işlemdir (Rousseau 1987). Kristalizasyon işleminde çözeltinin koşulları, çözeltide çözülmüş bileşiklerden birisi için ayarlanmakta böylece de bu bileşik çözeltiyi katı olarak terk etmektedir (Dechow 1989).

Herhangi bir maddenin kristalizasyon işlemi ile elde edilebilmesi için bulunduğu çözeltide aşırı doymun hale gelmesi gerekmektedir. Aşırı doymunluk sıcaklığın değiştirilmesi, çözgenin evaporasyonu edilmesi, kimyasal reaksiyon ve çözgen kompozisyonunun değiştirilmesi ile sağlanabilmektedir. Eğer bir solventte çözülmüş halde bulunan çözünen maddenin çözünürlüğü sıcaklığın düşürülmesi ile azalmıyorsa solüsyonun aşırı doymun hale getirilebilmesi için solventin bir kısmının uzaklaştırılması gerekmektedir (Mullin 2001).

Soğutmadan sonra bir çözeltiyi aşırı doymun haline getirmek için en çok tercih edilen metot evaporasyondur. Evaporasyonda çözgen sistemden uzaklaştırılarak sistemin konsantrasyonu artırılmış olur. Eğer bu sisteme sabit sıcaklık uygulanırsa sistem en sonunda aşırı doymun hale gelmekte ve kristalizasyon başlamaktadır (Schwartz ve Myerson 2002). Şekerli şuruplardan kristal sakkaroz elde edilmesinde de çözelti aşırı doymun hale getirilmektedir.

Şekil 2.26'da sakarozun çözünürlük ve aşırı doymunluk grafiği yer almaktadır. Konsantrasyon değerlerinin logaritmasının sıcaklık değerlerine karşı çizilmesiyle elde edilen grafikte eğer β 1'den küçükse çözelti doymun halde değildir (not saturated), dolayısıyla kristalizasyon başlamamaktadır. β 'nin 1.3'ten büyük olduğu durumlarda ilgili bölge "kararsız – labile" olarak gösterilir ve kristalizasyon kendiliğinden oluşur. "Yarı kararlı – metastable" bölgede kristalizasyon belli bir süre meydana gelmemekte ve "orta – intermediate" bölgede de kristalizasyon gereken zamana ve çözeltinin saflık düzeyine bağlı kalmaktadır (Walstra 2003).



Şekil 2.26. Sakkarozun çözünürlüğü ve aşırı doyumluğu (X: Konsantrasyon, kg/kg su; β : Aşırı doyumluk oranı) (Walstra 2003)

Çözeltide sakkaroz haricinde düşük molekül ağırlıklı şekerler (glukoz ve fruktoz vb.) gibi diğer bileşiklerin bulunması sakkarozun kristalizasyonunu engellemektedir (Bhandari ve Hartel 2002). Mısır şurubunda yapılan bir araştırma glukoz, fruktoz ve glukoz polimerlerinin şuruba ilave edilmesiyle bu bileşiklerin sakkarozun kristal yüzeyini absorbe ettikleri dolayısıyla da sakkaroz moleküllerinin bir araya gelmesini engelledikleri bildirilmiştir (Hartel 2001; Laos vd 2007). Ayrıca bir trisakkarit olan rafinozun da sakkarozun kristalizasyonunun başlamasını geciktirdiği ve depolama boyunca oluşabilecek kristalizasyon oranını da azalttığı bilinmektedir (Belcourt ve Labuza 2007).

Bu tez çalışmasının tasarlanmasındaki esas amacı keçiyoynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün zenginleştirilmesi oluştursa da bu amaçla uygulanan işlemlerle yan ürün olarak kristal şeker elde edilebilirliği de genel iş akış esnasında incelenmiştir. Uygulanan işlemlerin etkisiyle keçiyoynuzu ekstraktında bulunan indirgen şekerler vb. safsızlıkların yeterince ortamdan uzaklaştırması mümkün olursa ekstraktta bulunan sakkarozun kristal formda elde edilebilmesinin de mümkün olacağı düşünülmüştür.

2.8.6. Etanol fermentasyonu

Günümüzde biyoetanol şeker içeren şeker pancarı, şeker kamışı, tatlı sorgum ve keçiyoynuzu gibi materyallerden, nişasta gibi hidrolize edilebilir polisakkaritlerden ve lignoselülozik materyallerden üretilmektedir (Mazaheri vd 2012). Endüstriyel etanol üretiminde kullanılan hammaddeler şekerler, nişasta ve selüloz materyalleri olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Şekerler (şeker pancarı, şeker kamışı, melas ve meyvelerden elde edilen) doğrudan etanole dönüştürülebilmektedir. Nişastaların (mısır, patates ve bazı bitki köklerinden elde edilen) ise malt veya küf enzimleri ile fermente edilebilir şekerlere hidrolize edilmesi gerekmektedir. Selüloz (odun, zirai kalıntılar ve kağıt atıklarından elde edilen) ise mineral asitlerin etkisi ile şekerlere dönüştürülmektedir. Basit şekerler oluştuğunda da mikroorganizmalar bu şekerleri kolayca etanole metabolize etmektedir (Lin ve Tanaka 2006).

Farklı mikroorganizmaların etanol üretebilirliği üzerine araştırmalar da yapılmış, böylelikle etanol üretme kabiliyeti yüksek türler de belirlenmiştir. (Çizelge 2.12). Bu

çalışmalarda etanol üretebilen mayalardan *Saccharomyces cerevisiae*'nin, bakterilerden ise *Escherichia coli* LY01'in etanol üretme veriminin yüksek olduğu vurgulanmıştır (Lin ve Tanaka 2006).

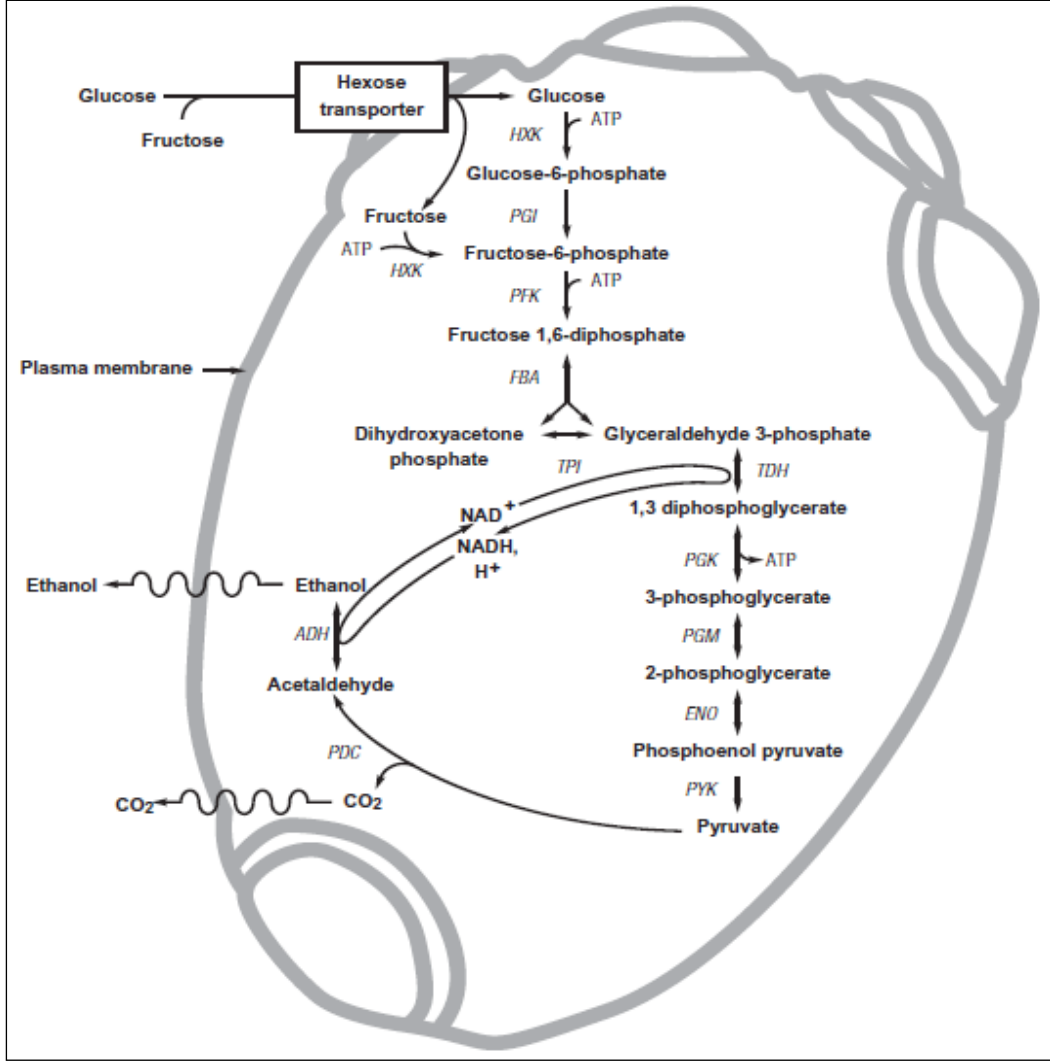
Çizelge 2.11. Ana fermentasyon ürünü olarak etanol üreten mikroorganizmalar

| Maya (Cins-Tür) |
|--|
| 27817- <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| 27774- <i>Kluyveromyces fragilis</i> |
| 30016- <i>Kluyveromyces marxianus</i> |
| 30091- <i>Candida utilis</i> |
| ATCC-32691- <i>Pachysolen tannophilus</i> |
| Bakteri (Cins-Tür) |
| <i>Clostridium sporogenes</i> |
| <i>Clostridium indoli</i> |
| <i>Clostridium sphenoides</i> |
| <i>Clostridium sordelli</i> |
| <i>Zymomonas mobilis</i> |
| <i>Zymomonas mobilis</i> subs. <i>pomaceas</i> |
| <i>Spirochaeta aurantia</i> |
| <i>Erwinia amylovora</i> |
| <i>Escherichia coli</i> KO11 |
| <i>Escherichia coli</i> LY01 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| <i>Klebsiella aerogenes</i> |

KAYNAK: Lin ve Tanaka (2006)'nın makalesinden uyarlanmıştır.

Etanol fermentasyonu amacıyla en çok kullanılan mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae*'dir. Diğer mayalarda olduğu gibi *S. cerevisiae* da şekerleri aerobik ve anaerobik koşullarda kullanabilmektedir. Bu maya hem glukoz gibi basit şekerleri hem de sakkaroz disakkaritini metabolize edebilmektedir. Ayrıca genellikle güvenli olarak kabul edilen (GRAS) bir mikroorganizma olduğu için tüketime doğrudan sunulan gıdaların üretiminde veya bu gıdalara katkı maddesi olarak kolaylıkla kullanılabilir. Bu yüzden alkollü içkiler ve ekmek üretiminde de yaygın olarak kullanılmaktadır (Lin ve Tanaka 2006).

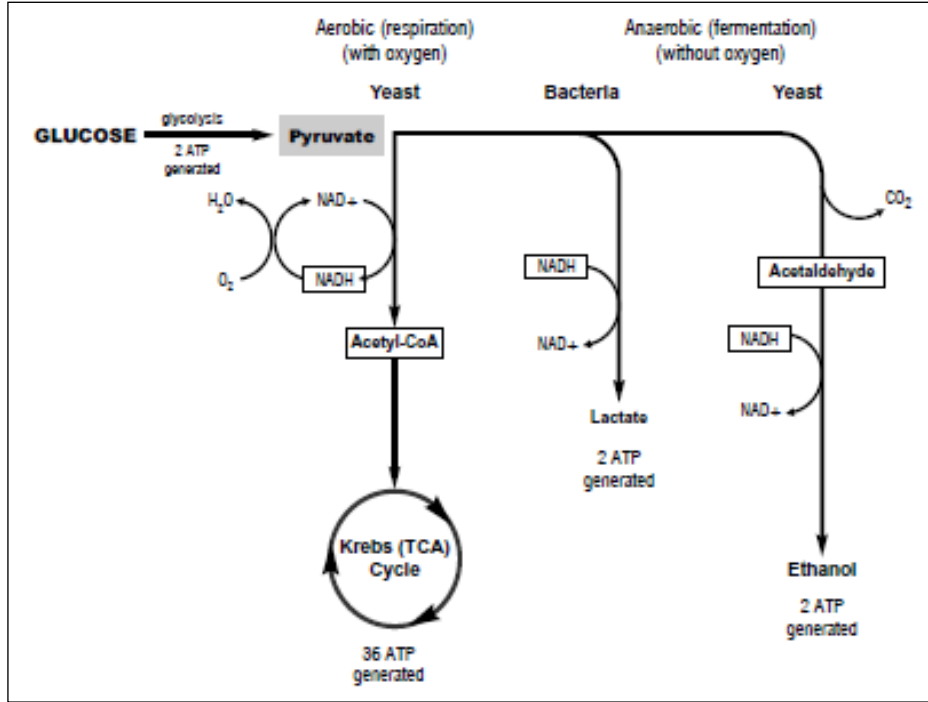
Maya sitoplazmasında glukozu pirüvik aside oksidatif olarak dönüştüren reaksiyonları katalizleyen enzimler dizisine glikolizis denmektedir (Şekil 2.27 ve 2.28). Glikolitik iz yolu (EMP) oksijen varlığında veya yokluğunda glukozu pirüvik asit, enerji ve indirgen nikotinamid adenin dinükleotide (NADH + H⁺) dönüştürmektedir (Şekil 2.27).



Şekil 2.27. Maya hücresinin şeker kullanımında glikolitik iz yolu (Embden-Meyerhof-Parnas) (Russell 2003)

Oksijen varlığında ve şeker seviyesi düşük seviyede tutulduğunda gelişen maya ya hiç etanol üretmemekte ya da çok az miktarda üretmektedir. Maya şekerin tamamını yeni maya hücreleri üretmek için enerji kaynağı olarak kullanmaktadır. Ancak oksijen azaldığında ve/veya glukoz seviyesi % 0.1'in (w/v) altına düştüğünde etanol üretimi başlamaktadır. % 5'in altında oksijen bulunan koşullarda şekerler gelişme için metabolize edilmektedir (Russell 2003).

Aerobik yıkılma (katabolizma) solunum olarak adlandırılmakta ve daha çok enerji açığa çıkmaktadır. Anaerobik katabolizmada ise daha az enerji açığa çıkmakta ve bu da fermentasyon olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.28). Şekerler hücreye girdiğinde glikolitik iz yolu ile (Embden-Meyerhof-Parnas veya EMP yolu) pirüvata kadar parçalanmaktadır.



Şekil 2.28. Enerji ve hücre döngüsü (Russell 2003)

Anaerobik koşullarda piruvat CO₂ açığa çıkmasıyla etanole kadar indirgenmektedir. Teorik olarak metabolize edilen glukoz kütlesi esas alındığında; etanol verimi 0.511 iken CO₂ verimi 0.489 olmaktadır (Bai vd 2008). Bu teorik verim uygulamada kesikli, yarı-kesikli ve sürekli-beslemeli fermentasyon sistemlerinde daha farklı olmakla birlikte sürekli-beslemeli fermentasyonlarda genel olarak etanol verimi yüksek olmaktadır.

Keçiboynuzu meyvesi yüksek şeker içeriği nedeniyle son yıllarda etanol üretiminde sıklıkla tercih edilen bir materyal haline gelmiştir. Bu amaçla meyveden etanol üretimindeki verimi artırmaya yönelik değişik çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Roukas 1993, 1994b; Roukas ve Biliaderis 1995; Turhan vd 2010b; Vaheed vd 2011).

Nitekim Sánchez-Segado vd (2010) zenginleştirdikleri keçiboynuzu ekstraktına *S.cerevisiae* inokülasyonu yaparak gerçekleştirdikleri çalışmada etanolde % 47.5'lik bir verime ulaştıklarını bildirmişlerdir. Turhan vd (2010b) ise aynı mikroorganizmanın keçiboynuzu ekstraktındaki fermentasyon şartlarını optimize ederek ekstrakta herhangi bir besin takviyesine gerek olmadan 34.24 g/L düzeyinde etanol üretilbileceğini ifade etmişlerdir.

Yatmaz vd (2013) de Ca-aljinat kullanarak immobilize hale getirdikleri *S. cerevisiae* hücrelerinin keçiboynuzu ekstraktından etanol üretimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda maya hücrelerine immobilizasyon işlemi uygulanmasının keçiboynuzu ekstraktından % 46.32'lik bir verimle 40.10 g/L düzeyinde etanol üretimini sağladığı ve bu miktar için 24 saatlik bir fermentasyon süresinin yeterli olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca ekstraktın zenginleştirilmesine gerek olmadığı, normal haliyle immobilize maya hücrelerinin gelişimi için yeterli olduğu da bildirilmiştir.

Bu araştırmada yararlanılan etanol fermentasyonu ile keçiboynuzu ekstraktında bulunan şekerler *S. cerevisiae* mayası tarafından metabolize ettirilerek ekstrakt içerisinde bulunan D-pinitolün kısmen zenginleştirilmesi denenmiştir. İlgili çalışmada, önemli çalışmaların bazılarında olduğu gibi keçiboynuzu ekstratına herhangi bir besin maddesi ilave edilmeden, ekstraktın etanol fermentasyonuna doğal haliyle bırakılması uygun görülmüştür.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

Araştırmada keçiboynuzu pekmezi üretimi yapan yerel bir firmadan temin edilen kırılmış ve çekirdekleri çıkarılmış aşılı keçiboynuzu meyveleri kullanılmıştır (Şekil 3.1). Buna göre; fabrikadan getirilen keçiboynuzu meyveleri analiz edilinceye kadar kapaklı plastik kutularda 5 °C'nin altında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Aşılı keçiboynuzu meyvesinin meyve eti ve çekirdeği

3.2. Metot

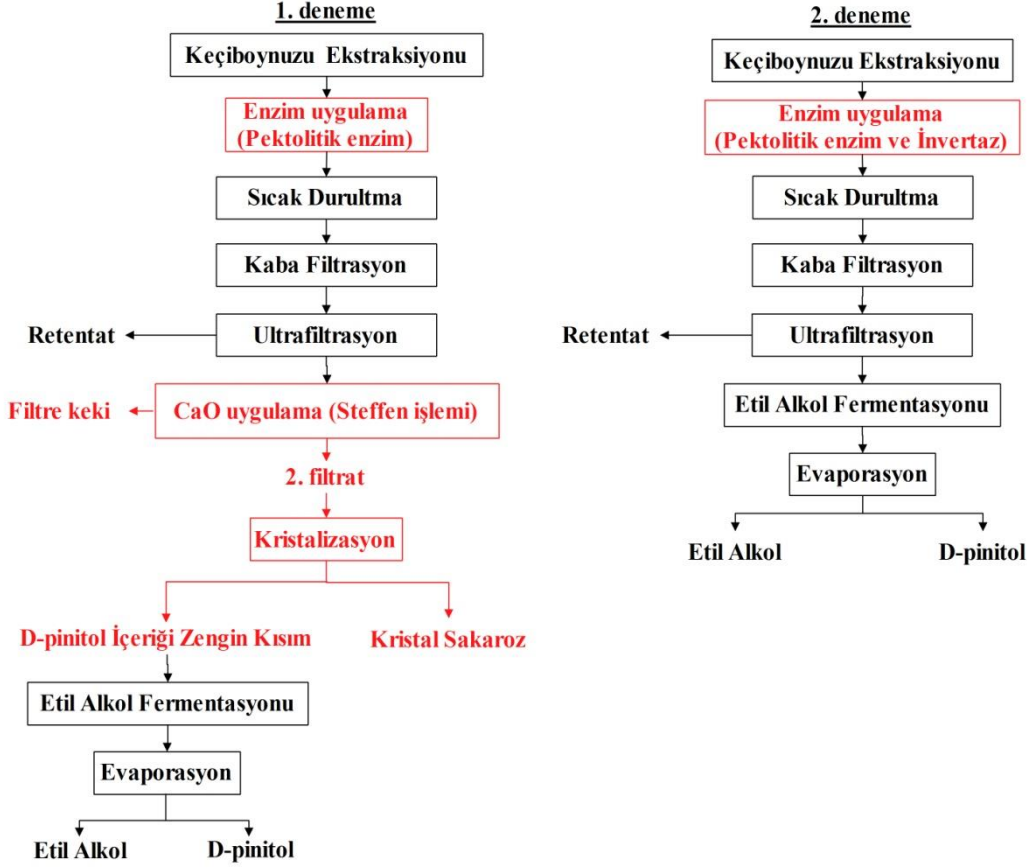
3.2.1. Araştırmanın genel iş akış şeması

Araştırmada keçiboynuzu ekstraktının D-pinitol içeriği bakımından zengin hale getirilmesi için uygulanması planlanan temel işlem basamakları Şekil 3.2'de özetlenmiştir. Bu işlem aşamalarında gerekli ön denemeler gerçekleştirildikten sonra optimize edilen işlem parametreleri kullanılmıştır.

Araştırma kapsamında tasarlanan birinci denemede sakkaroz içeriği bakımından zengin olan keçiboynuzu ekstraktında yer alan D-pinitolün zenginleştirilmesinin yanı sıra ekstraktın içindeki sakkaroz molekülünün de mevcut deneme deseni ile ekstraktan kristal formda ayrıştırılıp ayrıştırılamayacağı araştırılmak istenmiştir. Bu sebeple birinci denemenin enzim uygulaması aşamasında sakkarozun inversiyonu istenmediği için sadece pektolitik enzim preparatı kullanılmış, zenginleştirme aşamalarına da şeker endüstrisinde sakkarozun ayrıştırılması için kullanılan CaO uygulama ve kristalizasyon aşamaları da eklenmiştir.

Sakkarozun ekstraktan ayrıştırılmasının mümkün olmama ihtimali göz önünde bulundurularak tasarlanan ikinci denemede ise ekstrakttaki sakkarozun etanol fermentasyonunda mayanın kolaylıkla yararlanabileceği forma dönüştürülmesini sağlamak amacıyla zenginleştirme prosedürünün başlangıç aşamalarında yani enzim uygulaması aşamasında pektolitik enzim aktivitesinin yanında invertaz enzimi

aktivitesinden de yararlanılmasına karar verilmiştir. Bu denemede sakkarozun ayrıştırılmasıyla bağlantılı olan CaO uygulama ve kristalizasyon aşamaları da iş akış şemasından çıkartılmıştır.



Şekil 3.2. Araştırmanın genel iş akış şeması

3.2.2. Zenginleştirme metotları

3.2.2.1. Ekstraksiyon

Ekstraksiyon aşaması ile keçiboynuzu meyvesinde bulunan suda çözünen maddeleri ve dolayısıyla D-pinitolü de optimum düzeyde ekstrakta geçirmek hedeflenmiştir. Buna göre Turhan vd (2010b)'nin yürüttüğü çalışmada belirtilen optimum koşullar (1:4 meyve:su oranı, 80 °C, 2 saat) referans alınarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon aşaması için ağırlığının 4 katı oranda su ile karıştırılan parçalanmış keçiboynuzu meyvesi 80 °C'ye ısıtıldıktan sonra bu sıcaklıkta 2 saat tutulmuştur. Bu sürede meyveden ekstrakta madde geçişini hızlandırmak için karışım belirli zaman aralıklarıyla cam çubuk yardımıyla karıştırılmıştır. Süre sonunda kaba filtre kağıdından süzülen ekstrakt enzim uygulama aşamasının girdisini oluşturmuştur.

3.2.2.2. Enzim uygulama

Enzim uygulama aşamasında keçiyoynuzu ekstraktına ilave edilen pektolitik enzim preparatının kullanılma amacı keçiyoynuzu ekstraktında bulunan ve bulanıklığa yol açan pektik maddeleri parçalamak iken invertaz enziminin kullanılma amacı ise ekstratta bulunan sakkaroz molekülünü etanol fermentasyonu öncesinde mayanın doğrudan kullanabildiği glukoz + fruktoz formuna dönüştürmektir. Bu aşamada ilave edilmesi gereken enzim miktarlarını belirlemek için hem pektolitik (Pectinex Smash XXL: Pektin liyaz aktivitesi (30,000 PGNU/mL) ve Pectinex Ultra Clear: Poligalakturonaz aktivitesi (7900 PGNU/mL); Novozymes A/S, Denmark) enzim preparatı hem de invertaz (Invertase, MP Biomedicals, California, USA) enzimi (K değeri: 0.3 U/mL) için ön denemeler gerçekleştirilmiştir.

Denemeler enzim üreticisinin tavsiye ettiği sıcaklık değerlerinde (pektolitik enzim için 50 °C, invertaz enzimi için 30 °C) gerçekleştirilmiş olup ilgili enzimin etki ettiği substratın en kısa sürede parçalanmasını sağlayan enzim miktarı ve inkübasyon süresi araştırma için o enzime ait optimum enzim uygulama koşulu olarak kabul edilmiştir. Buna göre; pektolitik enzim için belirlenen optimum kombinasyon 50 °C sıcaklık, 100 µL/L enzim miktarı ve 45 dakika inkübasyon süresi iken; invertaz enzimi için belirlenen optimum kombinasyon 30 °C sıcaklık, % 1 (v/v) enzim miktarı ve 2 saat inkübasyon süresi olmuştur.

3.2.2.3. Sıcak durultma ve kaba filtrasyon

Sıcak durultma işleminin uygulanması ile keçiyoynuzu ekstraktında var olan protein, polifenol gibi moleküllerin ortamdan uzaklaştırılması dolayısıyla da D-pinitolün ekstrakt içinde zenginleştirilmesine engel olabilecek olası safsızlık unsurlarının azaltılması başlıca hedef olmuştur. Ayrıca bu sayede bir sonraki aşama olan ultrafiltrasyon işleminde besleme olarak kullanılacak olan ekstraktın oransal olarak daha az safsızlık içermesi sağlanarak işlemde kullanılan UF membranlarının tıkanması da kısmen önlenmiştir.



Şekil 3.3. Keçiyoynuzu ekstraktının durultulması

Enzim uygulanan keçiyoynuzu ekstraktına ön denemelerle belirlenen konsantrasyonlarda durultma yardımcı maddeleri ilave edilmiş ve bu maddelerle karıştırılan ekstrakt 50 °C'lik sıcak su banyosunda 3 saat bekletilmiştir (Şekil 3.3). Bu

sürede durultma yardımcı maddelerinin etkisiyle oluşan agregatların tortu şeklinde durultma kabının dibine çökmesi beklenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Sıcak durultma sonrası keçiyoynuzu ekstraktında oluşan tortu kısmı

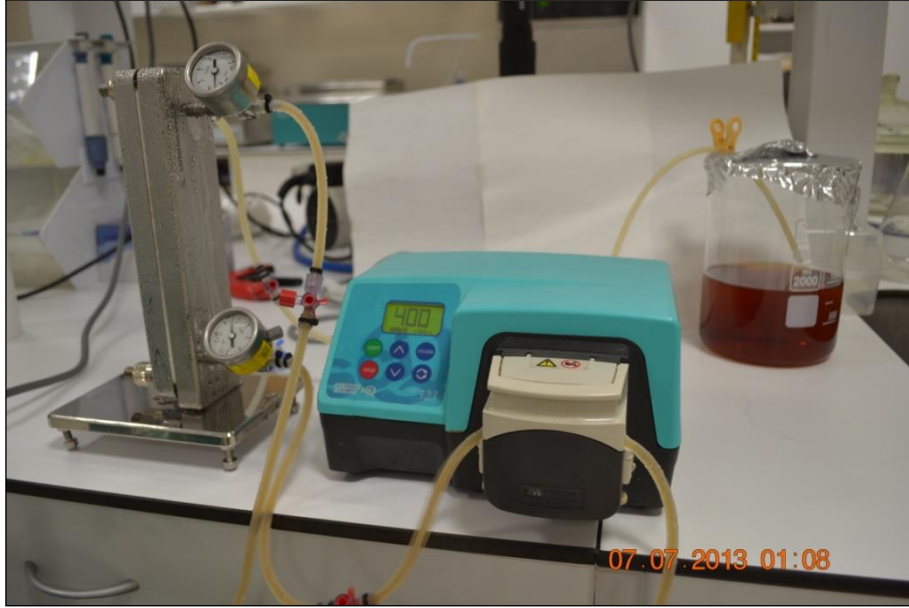
Süre sonunda berrak kısım alınarak kaba filtre kağıdının kullanıldığı vakum manifold düzeneğinde filtre edilmiştir (Şekil 3.5). Bu aşamadan elde edilen filtre edilmiş ekstrakt ultrafiltrasyon aşamasında besleme olarak kullanılmıştır.



Şekil 3.5. Durultulan keçiyoynuzu ekstraktının filtre edilmesi

3.2.2.4. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon (UF) işleminin keçiboynuzu ekstraktı bileşimi üzerine etkisini incelemek amacıyla farklı besleme sıcaklıkları ve pH değerleri ile farklı gözenek çapına sahip polietersülfon (PES) yapıları ultrafiltrasyon membranları kullanılmıştır (Şekil 3.6, Çizelge 3.1). Bu aşamanın optimizasyonu Box-Behnken Cevap Yüzey Metodu (CYM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6. Optimize edilmiş parametreler kullanılarak ekstraktların ultrafiltre edilmesi

Optimizasyonda ekstraktta maksimum düzeyde sakkaroz ve D-pinitol ile minimum düzeyde glukoz ve fruktoz kalması hedeflenmiş olup yapılan optimizasyon sonucunda en uygun kombinasyon 10 kDa gözenek çapına sahip UF membranı, 3.89 besleme pH değeri ve 6.7 °C besleme sıcaklığı olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda ultrafiltre edilen keçiboynuzu ekstraktı CaO uygulama (Steffen işlemi) aşamasında besleme olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.12. Ultrafiltrasyon aşamasının optimizasyonu için kullanılan parametreler

| Değişken | Minimum | Maksimum |
|--------------------------------|---------|----------|
| Besleme sıcaklığı (°C) | 5 | 50 |
| Besleme pH değeri | 3 | 8 |
| UF membranı gözenek çapı (kDa) | 10 | 50 |

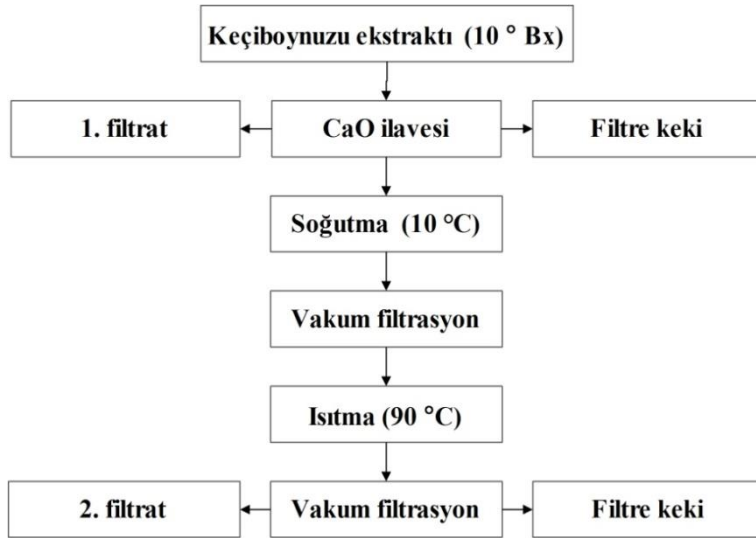
3.2.2.5. CaO uygulama

CaO uygulama, yani Steffen işlemi keçiboynuzu ekstraktında bulunan sakkaroz molekülünü kristal formda ayrıştırabilmenin mümkün olup olmadığını araştırmak amacıyla uygulanmıştır. Bu işlemde şekerce zengin matrikste bulunan sakkarozun CaO ile muamelesi sonucu suda çözünmeyen formu olan tri-kalsiyum sakarata dönüştürülmesi

sağlanmakta ve böylece de bu bileşiğin çöktürme işlemi ile ayrıştırılması kolaylaşmaktadır (Asadi 2007).

Bu işlemde besleme olarak ultrafiltrasyon işleminden elde edilen filtrat kısmı kullanılmıştır. Bu işlemde suda çözünür kuru madde miktarı 10 °Bx'e ayarlanmış keçiboynuzu ekstraktına CaO ilave edilerek belirli bir süre kimyasalın ekstrakt ile karışımı sağlandıktan sonra önce soğutma ve daha sonra da ısıtma işlemleri uygulanarak matriksteki sakkaroz suda çözünmeyen formuna dönüştürülmüştür (Şekil 3.6).

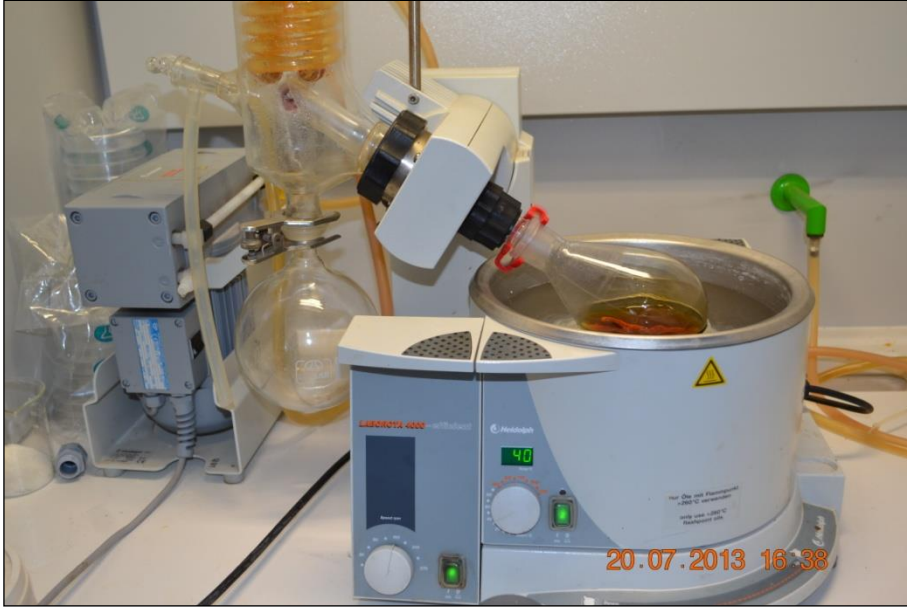
İşlemin uygulanmasında önemli olan parametreler CaO miktarı, CaO ile temas süresi ve ısıtma ve soğutma aşamalarındaki bekleme süresi olduğu için bu parametrelerin optimizasyonu ön denemelerle gerçekleştirilmiştir. Denemelerde ekstraksiyon işlemi ile yaklaşık olarak 12 °Bx'e ulaşan keçiboynuzu ekstraktı 10 °Bx'e seyreltilerek kullanılmış olup her bir deneme 100 mL'lik ekstrakt ile gerçekleştirilmiştir. Buna göre; en uygun parametre kombinasyonu % 2 CaO miktarı, 10 dakika temas süresi ve ısıtma ve soğutma aşamalarında 15'er dakika bekleme süresi olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.7. Steffen işlemi iş akış şeması

3.2.2.6. Kristalizasyon

Araştırmanın genel iş akış şemasında yer alan birinci denemede CaO ile muamele edildikten sonra sakkaroz ve D-pinitolce zengin hale geleceği öngörülen keçiboynuzu ekstraktına kristalizasyon işlemi uygulanarak sakkarozun kristal formda ayrıştırılması hedeflenmiştir. Kristalizasyon işleminde parametre olarak 40 °C sıcaklık ve 200 mbar vakum kullanılmıştır. Ekstraktta kristal şeker oluşturmak için bu parametrelerin kullanıldığı döner buharlaştırıcıda (Heidolph, HEI-VAP Value, Germany) uzun süre evaporasyona bırakılan keçiboynuzu ekstraktında sıcaklığın kademeli olarak düşürülmesi yöntemiyle kristal yapı oluşturmaya çalışılmıştır ve elde edilen konsantrede bu yapının olup olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 3.8. Keçiboynuzu ekstraktının evaporatörde kristalizasyonu

3.2.2.7. Etanol fermentasyonu

Araştırmanın genel iş akış şemasında birinci ve ikinci denemelerde farklı işlemlerden sonra yer alan etanol fermentasyonu aşamasında ekstraktta kalan şekerin etanole dönüştürülerek ortamdan uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Bu aşamada Turhan vd (2010b) tarafından gerçekleştirilen çalışmadaki fermentasyon şartları referans alınmıştır. Fermentasyon laboratuvar tipi; pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve köpük kontrolü yapabilen, karıştırma özelliğine sahip reaktörde gerçekleştirilmiş olup saf kültür olarak *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36858) mikroorganizması kullanılmıştır.

Çizelge 3.13. *Saccharomyces cerevisiae* için gerekli besiyeri bileşimi

| Medya İçeriği | Miktar (g/L) |
|---|--------------|
| Glukoz | 50 |
| Maya Ekstraktı | 6 |
| Kalsiyumklorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0.3 |
| Amonyumsülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) | 4 |
| Magnezyumsülfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 1 |
| Potasyumdihidrojenfosfat (KH_2PO_4) | 1.5 |

Laboratuvarda stok kültür formunda muhafaza edilen mikroorganizmanın fermentasyonda kullanılabilmesi aktif hale geçirilmesi gerektiğinden mikroorganizma için uygun bileşimde hazırlanan ve sterilize hale getirilen besiyeri mikroorganizmanın çoğaltılması amacıyla kullanılmıştır. Bu aşamada Çizelge 3.2’de belirtilen kimyasallarla hazırlanan 100 mL besiyeri erlenmayere konulmuştur. Daha sonra sterilize edilen besiyerine 1 mL stok kültürden eklenmiş ve erlenmayer 30 °C ve 150 rpm inkübasyon koşullarında 24 saat tutularak mikroorganizmanın fermentasyona eklenmeye hazır logaritmik çoğalma fazına ulaşması sağlanmıştır. Öte yandan genel iş akış şemasında belirtilen işlemlere göre elde edilen 4 L keçiboynuzu ekstraktı ise reaktöre konulmuş ve

121 °C’de 15 dakika sterilize edildikten sonra 30 °C’ye soğutulmuştur. Bu sıcaklıktaki ekstraktın başlangıç pH değeri 4 N sodyum karbonat çözeltisi kullanılarak 5.5’e ayarlanmıştır. Daha sonra ekstrakta logaritmik çoğalma fazındaki mikroorganizma kültüründen % 1 oranında inokülasyon yapılarak fermentasyon başlatılmıştır. Fermentasyon işleminin sonlandırılma zamanı ön denemelere göre belirlenmiştir.

3.2.2.8. Evaporasyon

Etanol fermentasyonu sonunda D-pinitolce zenginleştirilmiş keçiyoynuzu ekstraktının içerdiği etanol döner buharlaştırıcı (IKA RV 10 Control V, Germany) kullanılarak ekstrakttan uzaklaştırılmıştır. Bu amaçla evaporasyon parametreleri olarak 60 °C sıcaklık, 50 rpm dönüş hızı ve 200 mbar basınç kullanılmıştır. Evaporasyonda ekstrakta kademeli olarak saf su ilavesi yapılmış, bu şekilde ekstrakta kalan etanolün tamamı ayrıştırılmıştır.

3.2.3. Analiz metotları

3.2.3.1. Tanımlayıcı analizler

Keçiyoynuzu meyvesinden elde edilen başlangıç ekstraktında ve her iki denemede belirtilen tüm zenginleştirme işlemleri tamamlandıktan sonra elde edilen son ürünlerde tanımlayıcı analizler olarak pH, titrasyon asitliği, suda çözünür kuru madde (Cemeroğlu 2007), toplam kuru madde (Hammond 2005a) ve toplam kül içeriği (Hammond 2005b) analizleri yapılmıştır.

3.2.3.2. Berraklık

Sıcak durultma aşamasında ilave edilecek en uygun durultma yardımcı maddeleri kombinasyonunu belirlemek amacıyla ekstraktların bulanıklık düzeyi ölçülmüştür. Bu amaçla spektrofotometrede (Thermo Scientific, Evolution 201, UV-Visible Spectrophotometer, USA) 660 nm dalga boyunda transmittans (T %) ölçümü gerçekleştirilmiştir (Krop ve Pilnik 1974).

3.2.3.3. Enzim uygulama kontrol testleri

Birinci denemenin enzim uygulaması aşaması sadece pektolitik enzim karışımı kullanımını içerirken ikinci denemenin enzim uygulaması aşaması ise pektolitik enzim karışımına ilave olarak invertaz enziminin de kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Pektolitik enzim karışımının keçiyoynuzu ekstraktında yer alan pektik maddelere olan etkisi alkol testi ile takip edilmiştir (Ekşi 1988). Bu amaçla dilüsyon tüpüne konulan 5 mL ekstrakta 10 mL % 96’lık etanol-HCl karışımı ilave edilerek karışım sağlanmış ve dilüsyon tüpü 10 dakika boyunca hareketsiz olarak bekletilmiştir. Süre sonunda tüpte bulanıklık/tortu meydana gelmesi ekstrakta bulunan pektik maddelerin tamamının parçalanmadığı anlamına gelmiştir. İvertaz enziminin sakkaroz substratına etkisini gözlemleyebilmek amacıyla şeker analizi yapılmıştır (Bkz. 3.2.3.4. D-pinitol ve şeker kompozisyonunun belirlenmesi).

3.2.3.4. D-pinitol ve şeker kompozisyonunun belirlenmesi

Çalışmada öngörülen ve denemeleri gerçekleştirilen her işlem basamağında örneklerin D-pinitol ve şeker kompozisyonlarındaki değişim yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak gözlenmiştir (Tetik vd 2011b). Bu amaçla 1 mL örnek üzerine 9 mL ultra saf su eklenerek homojenize edilen karışımdan 0.1 mL alınmış ve üzerine 9.9 mL ultra saf su eklenerek başlangıç örneği 200 kat seyreltilmiştir. Daha sonra 0.45 µm'lik membran filtrelerden (Macherey-Nagel, Chromafil PET-45/25, Germany) geçirilen örnek enjeksiyona hazır hale getirilmiştir.

Örneklerdeki D-pinitol ve şeker kompozisyonu konsantrasyonları harici standart metodu kullanılarak hesaplanmıştır. Analizde kullanılan analitik kolon karbonhidratları ve şeker alkollerini birlikte analiz edebilen bir özelliğe sahip olduğu için tek bir HPLC metodu kullanılarak hem şekerlerin hem de D-pinitolün konsantrasyonu belirlenebilmiştir (EK-5 Şekil 7.3).

Kromatografi koşulları (Shimadzu, LC 20A Serisi)

Hareketli faz: Milli-Q su (izokratik), 0.6 mL/dakika

Analitik ve koruyucu kolon: Trasngenomic Nucleogel 87P (300x7.8 mm ID, 20x4.0 mm ID)

Enjeksiyon hacmi: 20 µL, Kolon fırını sıcaklığı: 85 °C

Dedektör: RID, hücre sıcaklığı: 60 °C

3.2.3.5. Etanol konsantrasyonunun belirlenmesi

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen etanol fermentasyonu esnasında belirli sürelerde reaktörden alınan örneklerde etanol miktarı YSI 2700 Biyoanalitik Sistemi (YSI Life Sciences, OH, USA) kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.9). Bu sistemin ana prensibine göre; cihaza örnek alındığında analiz edilmek istenen bileşiğe etki eden enzimi içeren membran örnekle reaksiyona girerek elektrokimyasal probun platinyum anodu okside olmakta ve hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu bileşiğin konsantrasyonuna bağlı olarak da elde edilen sinyalle etanol konsantrasyonu belirlenmektedir. Cihazı kalibre etmek amacıyla üretici firma tarafından gönderilen etanol standardı (3.20 g/L) kullanılmıştır. Analiz kapsamında fermentasyon ortamından alınan örnekler (1 mL) cihazın kalibrasyon standardı konsantrasyonuna uyacak oranlarda saf su ile seyreltilerek cihaza okutulmuş ve etanol konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.2.3.6. Biyokitle miktarı

Optik yoğunluk yöntemi ile biyokitle miktarının belirlenmesinde *Saccharomyces cerevisiae* mayası için Turhan vd (2010b) tarafından oluşturulan eşitlik kullanılmıştır (Eşitlik 3.1). Bu eşitliğin oluşturulması için kendi besiyerinde fermentasyona bırakılan *Saccharomyces cerevisiae* mayasından belli aralıklarla iki paralelli olarak örnekler alınmış ve birinci örnek filtre kağıdından (Whatman No:1) süzülerek 60 °C'de 24 saat kurutulduktan sonra ağırlığı ölçülmüştür. İkinci örneğin ise fermentasyon başlangıcındaki besiyeri kontrol olarak kullanılmak suretiyle optik yoğunluk değeri (620 nm'deki Absorbans değeri) ölçülmüştür. Filtre edildikten sonra tartılan ağırlık miktarlarına karşılık aynı zamanlara ait optik yoğunluk değerleri için

çizilen grafik ile de bu mikroorganizma için spesifik olan denklem elde edilmiştir (Turhan 2009a; Turhan vd 2010b).



Şekil 3.9. YSI Biyoanalitik sistemi

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen etanol fermentasyonu esnasında belirli sürelerde reaktörden alınan örneklerde canlı gelişimini takip etmek için canlı hücre miktarı analiz edilmiştir (Turhan 2009a; Turhan vd 2010b). Bu amaçla örneklerden 0.5 mL alınarak üzerine 4.5 mL saf su eklenip 10 kat seyrelttikten sonra kontrol olarak inoküle edilmemiş örnek kullanılarak spektrofotometrede (Thermo Scientific, Evolution 201, UV-Visible Spectrophotometer, USA) 620 nm’de elde edilen absorbans (A) değerleri elde edilmiştir. Bu değerlere göre aşağıdaki eşitlik kullanılarak *Saccharomyces cerevisiae* için biyokitle miktarı hesaplanmıştır.

S. cerevisiae için;

$$\text{Canlı hücre (g/L)} = 0.10634 + 0.666019 * A_{620 \text{ nm}} \quad (3.1)$$

3.2.3.7. İstatistiksel analizler

Tesadüf parselleri faktöriyel deneme desenine göre planlanan ve iki tekerrürlü olarak yürütülen çalışmada her bir analiz aşamasında üç paralelli olarak veri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar varyans analizine, analiz sonucunda önemli bulunan ana varyasyon kaynakları ise Duncan çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur. Değerlendirmede SAS istatistik programı (Anonymous 2002) kullanılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön denemeler

Tez çalışması dâhilinde enzim uygulama, sıcak durultma, ultrafiltrasyon, CaO uygulama ve etil alkol fermentasyonu aşamalarının parametreleri farklı zaman dilimlerinde yapılan optimizasyon çalışmalarıyla belirlenmiştir. Bu amaçla ilgili işlem için araştırmanın genel iş akış şemasında yer alan önceki işlem aşamaları optimize edildikleri koşullarda tekrarlanarak bir sonraki işlemin optimizasyonuna geçilmiştir. Bu nedenle depolanan keçiyoynuzu meyvelerinden her defasında yeni bir ekstraksiyon işlemi yapılarak keçiyoynuzu ekstraktı edilmiş ve bu işlemin etkinliğine bağlı olarak ekstraktların hedef bileşik (sakkaroz, glukoz, D-pinitol ve fruktoz) konsantrasyonlarında farklılıklar meydana gelmiştir. Bu farklılıklar bağımsız ön denemelerden elde edildiği için göz ardı edilmiştir.

4.1.1. Enzim uygulaması işleminin optimizasyonu

Çalışma kapsamında keçiyoynuzu ekstraktında D-pinitolün zenginleştirilmesine yönelik iki ana deneme tasarlanmış bu denemelerin ilkinde sadece pektolitik enzim preparatı kullanılırken diğerinde ise pektolitik enzim preparatına ilave olarak invertaz enzimi kullanılmıştır (Bkz. Şekil 3.2). Pektolitik enzim preparatları ekstraktta bulunan koloidal pektik maddelerin parçalanmasını sağlamak dolayısıyla da durultma aşamasında oluşması beklenen flok yapısını teşvik etmek amacıyla kullanılmıştır (Ekşi 1988).

Araştırmada yer alan birinci denemede D-pinitolün zenginleştirilmesinin yanı sıra ekstraktta bulunan sakkarozun da kristal formda ayrıştırılıp ayrıştırılamayacağı araştırılmak istendiği için enzim uygulaması aşamasında sadece pektolitik enzim karışımı (Pectinex Smash XXL ve Pectinex Ultra Clear; Novozymes A/S, Denmark) kullanılmıştır. İlave edilecek pektolitik enzim miktarını belirlemek için bir ön deneme tasarlanmıştır. Buna göre enzimin üretimini yapan firma tarafından önerilen optimum çalışma sıcaklığı ve süresinde (50 °C'de 45 dakika) ekstraktta farklı oranlarda pektolitik enzim karışımı ilave edilmiştir. Süre sonunda ekstrakttaki pektik madde kalıntısının varlığı alkol testi ile kontrol edilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Pektolitik enzim miktarını belirlemek için yapılan ön denemenin sonuçları

| Enzim Çeşidi | Miktar (µL/L) | Alkol Testi Sonucu |
|----------------------|---------------|--------------------|
| Pectinex Ultra Clear | 15 | Tortu var |
| | 25 | Tortu var |
| | 50 | Tortu yok |
| Pectinex Smash XXL | 15 | Tortu var |
| | 25 | Tortu var |
| | 50 | Tortu yok |

Alkol testinde ilave edilen enzim ekstrakttaki pektik maddelerinin tamamını parçalayabilecek bir dozda değilse ekstraktta tortu meydana gelmiş dolayısıyla bu enzim

miktarının yeterli olmadığı kanaatine varılmıştır. Elde edilen bulgulara göre; ekstraktta bulunan pektik maddelerin parçalanması için farklı etki mekanizmalarına sahip her iki enzimden de 50 µL/L düzeyinde ilave edilmesinin istenen amaca ulaşmada yeterli olacağı görülmüştür (Çizelge 4.1).

Karkacier vd (1995) keçiyoynuzunun ekstraksiyonu ve berraklaştırılması üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada Novo Ferment firmasının Pectinex 3 XL isimli pektolitik enzim preparatını 0-0.5 mL/L aralığında keçiyoynuzu ekstratlarına ilave ederek depektinizasyon işlemi gerçekleştirmiş ve bu işlemin berrak ekstrakt üzerine etkisini incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre; enzim uygulanan ve uygulanmayan örneklerin durultma işlemi sonrasında berraklık düzeylerinde herhangi bir değişim olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada depektinizasyon işlemine koloidal pektik maddelerin de ekstrakttan uzaklaştırılmasını sağlamak amacıyla yer verilmiştir. Dolayısıyla geri kalan ekstraktta D-pinitolün kısmen de olsa daha kolay zenginleştirilebileceği düşünüldüğü için enzim uygulanmaması durumu çalışmanın başlangıç aşamasında tasarlanmamıştır. Ancak Karkacier vd (1995) 'nin gerçekleştirdikleri çalışmayla bu araştırma kıyaslandığında kullanılan enzim miktarlarının daha düşük olduğu görülmektedir.

İkinci denemede pektolitik enzime ilave olarak kullanılan invertaz enzimi (Invertase, Novozymes A/S, Denmark) ise ekstraktta bulunan sakkaroz molekülünü monomerleri olan glukoz ve fruktoz formuna dönüştürmek amacıyla kullanılmıştır. Bu enzimin meyveden ekstraktta geçen sakkarozun tamamını parçalayabilmesi için gereken enzim miktarı ve inkübasyon süresini belirlemek için bir ön deneme tasarlanmıştır. Denemede farklı enzim miktarları (% 1, % 2 , % 5 ve % 10) ve inkübasyon süreleri (0., 2., 4. ve 6. saat) kullanılmıştır.

Kullanılan parametrelere göre elde edilen örneklerin şeker kompozisyonu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen bulgulara göre; % 1 invertaz enzimi inoküle edilmiş ekstraktın 2 saat inkübasyona bırakılması başlangıç sakkaroz içeriğinin (47.13 g/L) tamamının inversiyonu için yeterli olmuştur. Dolayısıyla çalışmada kullanılacak invertaz enzimi için optimum kullanım şartları % 1 enzim miktarı – 2 saat inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir.

Keçiyoynuzu meyvesinin etanol ve laktik asit üretimindeki potansiyelini araştırdığı doktora tez çalışmasında Turhan (2009b) da aynı konsantrasyonlarda invertaz enzimi kullanarak keçiyoynuzu ekstraktında bulunan sakkaroz molekülünü en kısa zamanda inversiyona uğratabilecek minimum invertaz konsantrasyonunu belirlemiştir. Turhan (2009b)'a göre % 1 invertaz enzimi 12 saat inkübasyona bırakıldığında süre-enzim miktarı kombinasyonu değerlendirildiğinde bu miktarın ekstraktta bulunan sakkaroz molekülünü inversiyona uğratabilmek için yeterli olduğu görülmüştür. Bu çalışmada ise aynı enzim konsantrasyonu inversiyon için yeterli bulunurken 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda yeterli düzeyde inversiyon meydana gelmiş olmasına rağmen (Çizelge 4.2), çalışmanın etil alkol fermentasyonu aşamasında reaktöre mikroorganizma inokülasyonu yapılmadan 12 saat önce invertaz enzimi ilave edilmiştir.

Çizelge 4.2. İnvvertaz enzimi miktarı ve inkübasyon süresini belirlemek için yapılan ön deneme sonuçları*

| Uygulama | | Analiz Edilen Bileşik (g/L) | | |
|--------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| İnkübasyon süresi (Saat) | Enzim miktarı (%) | Sakkaroz | Glukoz | Fruktoz |
| Başlangıç | - | 47.13±0.00 | 15.48 ^a ±0.01 | 14.32 ^a ±0.06 |
| 2. saat | 1 | - | 38.69^b±0.37 | 39.84^b±3.88 |
| | 2 | - | 41.62 ^b ±0.23 | 44.60 ^b ±1.00 |
| | 5 | - | 38.47 ^b ±0.62 | 39.42 ^b ±2.44 |
| | 10 | - | 38.87 ^b ±0.27 | 37.79 ^b ±1.99 |
| 4. saat | 1 | - | 39.47 ^b ±0.88 | 38.31 ^b ±0.18 |
| | 2 | - | 40.24 ^b ±0.06 | 37.82 ^b ±0.31 |
| | 5 | - | 40.12 ^b ±0.24 | 37.66 ^b ±0.24 |
| | 10 | - | 39.11 ^b ±0.06 | 38.13 ^b ±2.17 |
| 6. saat | 1 | - | 40.76 ^b ±0.82 | 41.37 ^b ±1.73 |
| | 2 | - | 39.48 ^b ±0.08 | 37.82 ^b ±0.31 |
| | 5 | - | 39.63 ^b ±0.17 | 39.70 ^b ±2.49 |
| | 10 | - | 38.77 ^b ±0.12 | 35.45 ^b ±0.26 |

* Aynı sütun içerisinde farklı harf ile gösterilen ortalamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).

4.1.2. Sıcak durultma işleminin optimizasyonu

Araştırmada yer alan sıcak durultma aşamasının optimize edilmesi amacıyla durultmada kullanılması kararlaştırılan bentonit (% 5), jelatin (% 5) ve kizelzol (% 1.5) stok çözeltileri farklı oranlarda (bentonit: 4-6 g/L, jelatin: 1-3 g/L, kizelzol: 3-6 mL/L) keçiyoynuzu ekstraktına ilave edilerek 50 °C'lik su banyosunda (Jeio Tech, BS-06/31, Seoul, Korea) 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda oluşan tortuların sıklık durumları ve sıvı kısmın berraklık düzeyi değerlendirildikten sonra kaba filtre kağıdı ile süzülen berrak kısımların ışık geçirgenliği 660 nm'de ölçülmüştür.

Elde edilen bulgular Çizelge 4.3'te verilmiştir. Bulgulara göre en berrak görüntüyü veren ve aynı zamanda da tortusu sıkı olan keçiyoynuzu ekstraktı 26. uygulamada kullanılan durultma yardımcı maddeleri kombinasyonu ile elde edilmiştir. Ekstraksiyon ve durultma koşullarını optimize ettikleri çalışmalarında Karkacier vd (1995) keçiyoynuzu ekstraktı için en uygun durultma kombinasyonunu 0.4 g/L bentonit, 0.2 g/L jelatin ve 0.45 mL/L kizelzol (% 15'lik solüsyonu) olarak belirlemişler ve bu kombinasyon ile durulttukları ekstraktın % 71 oranında bir berraklık düzeyine (660 nm'de ışık geçirgenliği, % T ölçümü) sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada ise Karkacier vd (1995)'nin kullandıkları durultma yardımcı maddeleri dozlarından daha yüksek dozların kullanılmasına rağmen özellikle her iki çalışmada da kullanılan bentonit, jelatin ve kizelzol arasındaki oranların değişmediği buna rağmen bu çalışmadan elde edilen ekstraktın daha yüksek bir berraklık düzeyine sahip olduğu (% T_{660nm}: 88.77) görülmüştür (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Sıcak durultma denemeleri sonucu elde edilen ekstraktların görsel durumu ve ışık geçirgenliği (% T) değerleri

| Uygulama | Jelatin (g/L) | Bentonit (g/L) | Kizelzol (mL/L) | Tortu sıklığı | Tortu görünümü | % T (660 nm)* |
|----------|---------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|---------------------|
| 1 | 1 | 4 | 3 | Gevşek | Berrak | 74.6 ⁿ |
| 2 | 1 | 4 | 4.5 | Gevşek | Berrak | 67.83 ^r |
| 3 | 1 | 4 | 6 | Sıkı | Bulanık | 67.47 ^r |
| 4 | 1 | 5 | 3 | Sıkı | Berrak | 75.13 ⁿ |
| 5 | 1 | 5 | 4.5 | Gevşek | Berrak | 70.63 ^q |
| 6 | 1 | 5 | 6 | Gevşek | Bulanık | 72.83 ^p |
| 7 | 1 | 6 | 3 | Gevşek | Bulanık | 73.57 ^o |
| 8 | 1 | 6 | 4.5 | Gevşek | Berrak | 79.23 ^k |
| 9 | 1 | 6 | 6 | Sıkı | Berrak | 76.80 ^m |
| 10 | 2 | 4 | 3 | Gevşek | Bulanık | 81.27 ^j |
| 11 | 2 | 4 | 4.5 | Gevşek | Bulanık | 82.67 ^{gh} |
| 12 | 2 | 4 | 6 | Gevşek | Bulanık | 83.57 ^e |
| 13 | 2 | 5 | 3 | Gevşek | Bulanık | 81.93 ⁱ |
| 14 | 2 | 5 | 4.5 | Gevşek | Bulanık | 82.97 ^{fg} |
| 15 | 2 | 5 | 6 | Gevşek | Bulanık | 83.30 ^{ef} |
| 16 | 2 | 6 | 3 | Gevşek | Bulanık | 79.33 ^k |
| 17 | 2 | 6 | 4.5 | Gevşek | Bulanık | 78.57 ^l |
| 18 | 2 | 6 | 6 | Gevşek | Bulanık | 74.87 ⁿ |
| 19 | 3 | 4 | 3 | Gevşek | Bulanık | 82.30 ^{ih} |
| 20 | 3 | 4 | 4.5 | Gevşek | Berrak | 86.53 ^c |
| 21 | 3 | 4 | 6 | Gevşek | Berrak | 88.50 ^a |
| 22 | 3 | 5 | 3 | Gevşek | Bulanık | 84.73 ^d |
| 23 | 3 | 5 | 4.5 | Sıkı | Berrak | 87.77 ^b |
| 24 | 3 | 5 | 6 | Gevşek | Bulanık | 88.47 ^a |
| 25 | 3 | 6 | 3 | Gevşek | Berrak | 86.87 ^c |
| 26 | 3 | 6 | 4.5 | Sıkı | Berrak | 88.77 ^a |
| 27 | 3 | 6 | 6 | Sıkı | Berrak | 88.63 ^a |
| 28 | 2 | - | 4.5 | Gevşek | Bulanık | 53.34 ^s |

*: Aynı sütun içerisinde aynı harfle gösterilen ortalamalar arasında fark yoktur ($P>0.05$)

Sıcak durultma aşamasında ilave edilecek durultma yardımcı maddelerinin miktarlarına karar vermede sadece ışık geçirgenliği (% T) değerleri referans alınmamış aynı zamanda oluşan tortuların sıklık durumu da değerlendirilmiştir. Çünkü berrak kısmın oluşan tortu kısmından ayrılmasında sıkı bir yapıya sahip olmayan tortuların berrak kısımlara daha fazla bulaştığı dolayısıyla berrak kısımları yeniden bulandırdığı görülmüştür. Dolayısıyla sıcak durultma aşamasında bentonit, jelatin ve kizelzol çözeltilerinden sırasıyla 6 g/L, 3 g/L ve 4.5 mL/L kullanılmasıyla ekstraktta istenen düzeyde berraklık sağlanacağı sonucuna ulaşılmıştır.

4.1.3. Ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonu

Ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonu amacıyla araştırmada belirtilen parametreler (Membran ayırma sınırı: 10, 30 ve 50 kDa, Besleme Sıcaklığı: 5, 27.5 ve 50

°C, Besleme pH değeri: 3, 5.5 ve 8) Box-Behnken CYM'ye göre oluşturularak kullanılmıştır (Çizelge 4.4).

Bu parametrelerden membran ayırma sınırı seçiminde meyve suyu endüstrisinde yaygın olarak kullanılan ultrafiltre membranlarından 100 kDa ve 50 kDa membran ayırma sınırları arasında basit bir ön deneme de tasarlanmış ancak her iki membrandan elde edilen filtratların arasında hedef bileşiklerin konsantrasyonu açısından herhangi bir farklılık olmadığı görüldüğü için CYM'na göre membran ayırma sınırı parametresinin orta değerinin daha kolay seçilebilmesi için maksimum membran ayırma sınırı 50 kDa olarak belirlenmiştir. Minimum membran ayırma sınırı da ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon membran filtrasyon sistemleri arasında sınır teşkil edebilecek bir değer olarak 10 kDa seçilmiştir.

Çizelge 4.4. Box-Behnken CYM ile oluşturulan ultrafiltrasyon şartları

| Sıra | Membran ayırma sınırı (kDa) | Besleme pH değeri | Besleme sıcaklığı (°C) |
|------|-----------------------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 30 | 5.5 | 27.5 |
| 2 | 50 | 8 | 27.5 |
| 3 | 30 | 3 | 50 |
| 4 | 10 | 5.5 | 5 |
| 5 | 50 | 5.5 | 50 |
| 6 | 10 | 8 | 27.5 |
| 7 | 10 | 5.5 | 50 |
| 8 | 50 | 5.5 | 5 |
| 9 | 30 | 8 | 50 |
| 10 | 30 | 3 | 5 |
| 11 | 30 | 5.5 | 27.5 |
| 12 | 50 | 3 | 27.5 |
| 13 | 10 | 3 | 27.5 |
| 14 | 30 | 8 | 5 |
| 15 | 30 | 5.5 | 27.5 |

Ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonunda ikinci parametre olan besleme pH değerinin maksimum ve minimum sınırları ise keçiyoynuzu ekstraktının asidik/bazik karakteristikte olmasının hedef bileşiklerin konsantrasyonuna etkisi olup olmayacağını belirlemek amacıyla pH: 3 ve pH: 8 olarak seçilmiştir. Aynı şekilde ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonunda etkisinin görülmek istendiği diğer bir parametre olan besleme sıcaklığının minimum ve maksimum değerlerinin seçiminde ise laboratuvar ekipmanları ile uygulanabilecek ölçüde olmak üzere 5 ve 50 °C değerleri sınır değerleri olarak seçilmiştir.

İstatistiksel metoda göre tasarlanan 15 deneme 2 tekerrürlü olarak yapılmıştır. Denemelerde keçiyoynuzu ekstraktının doğal haldeki pH değerinden asidik pH değeri elde etmede 2 N sitrik asit; bazik pH değeri elde etmede ise 4 N sodyum karbonat kullanılmıştır.

Denemelerde istenen besleme sıcaklığına su banyosu kullanılarak ulaşılmış ve ekstrakt hedef membran ayırma sınırında ultrafiltre edilmiştir. Membran filtrelerin istenen sıcaklık düzeylerine ulaşmasını sağlamak amacıyla ultrafiltrasyon sisteminden çıkan retentat kısmı su banyosuna daldırılmış halde bulunan besleme rezervuarına geri döndürülerek besleme sıvısı ile karıştırılmıştır (Şekil 4.1). Tüm denemelerde homojenliği sağlayabilmek için ekstraktın % 80'i filtre edilinceye kadar (permeat olarak elde edilinceye kadar) ultrafiltrasyon işlemine devam edilmiştir. (Şekil 4.1). Tüm denemelerden elde edilen filtrat kısımlarında şeker ve D-pinitol analizleri yapılmıştır.



Şekil 4.1. Ultrafiltrasyon düzeneği

Box-Behnken CYM'nun belirlediği şartlarda gerçekleştirilen ultrafiltrasyonlar sonucu elde edilen bulgular Çizelge 4.5'te gösterilmiştir. İstatistiksel değerlendirme sonucu elde edilen regresyon eşitlikleri sakkaroz (EK-6, Çizelge 7.1), glukoz (EK-6, Çizelge 7.2), D-pinitol (EK-6, Çizelge 7.3) ve fruktoz (EK-6, Çizelge 7.4) bileşikleri için aşağıda görülmektedir:

$$\text{Sakkaroz (g/L)} = 32.55 - 0.28 * M + 0.81 * P + 0.09 * S + 0.01 M * M + 0.01 P * P - 0.002 S * S - 0.01 M * P + 0.001 M * S + \epsilon \quad (4.1)$$

$$\text{Glukoz (g/L)} = 18.20 - 0.17 M + 3.41 P + 0.20 S + 0.004 M * M - 0.25 P * P - 0.003 S * S - 0.01 M * P + 0.001 M * S - 0.01 P * S + \epsilon \quad (4.2)$$

$$\text{D-pinitol (g/L)} = 5.70 - 0.06 M + 0.76 P + 0.04 S + 0.001 M * M - 0.06 P * P - 0.001 S * S - 0.002 M * P + 0.00003 M * S - 0.001 P * S + \epsilon \quad (4.3)$$

$$\text{Fruktoz (g/L)} = 19.58 - 0.14 M + 2.14 P + 0.15 S + 0.003 M * M - 0.16 P * P - 0.002 S * S - 0.002 M * P - 0.01 P * S + \epsilon \quad (4.4)$$

Eşitliklerde yer alan ϵ hatayı; M membran ayırma sınırını; P ekstrakt pH değerini ve S ekstraktın sıcaklık değerini ifade etmektedir. CYM ve varyans analizi ile değerlendirilen sonuçlara göre (Bkz. EK-6 ve EK-7); ultrafiltrasyonun etkinliğini belirlemede kullanılan bütün bileşenlerin uyum eksikliği değerlerinin istatistiksel olarak

önemsiz olması ($P>0.05$) ilgili modelin optimum bir parametre kombinasyonu belirleyebilmek için uygun olduğu anlamına gelmektedir (Bkz. EK-6 ve EK-7).

Bilindiği üzere bu çalışmada esas olarak iki farklı deneme tasarlanmış ve bu denemelerin keçiyoynuzu ekstraktından D-pinitolün zenginleştirilmesine olan etkisi değerlendirilmeye çalışılmıştır. Denemelerde işlemlerin çoğu ortak olduğu için optimizasyon çalışmalarında belirlenen optimum parametreler her iki denemede de aynı değerlerle kullanılmıştır. Böylelikle denemelerin birbirleriyle kıyaslanması mümkün hale gelmiştir. Bu kapsamda ultrafiltrasyon işleminin optimizasyonunda esas olarak yüksek oranda elde edilmek istenen D-pinitol ve kristal formda ayrıştırılabilirliği araştırılmak istenen sakkaroz moleküllerinin konsantrasyonları maksimum olacak şekilde bir optimizasyon tasarlanmıştır. Bu amaçla Çizelge 4.5'te yer alan ham veriler Minitab istatistik programının optimizasyon analizi kısmında kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. Box-Behnken CYM ile oluşturulan parametre kombinasyonu kullanılarak yapılan ultrafiltrasyon işlemleri ile elde edilen filtrat kısımlarının içeriği

| Sıra | Membran (kDa) | pH | Sıcaklık (°C) | Sakkaroz (g/L) | Glukoz (g/L) | D-pinitol (g/L) | Fruktoz (g/L) |
|------|---------------|-----|---------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|
| 1 | 10 | 3 | 27.5 | 33.52±0.08 | 27.05±0.18 | 7.40±0.03 | 25.51±0.15 |
| 2 | 50 | 3 | 27.5 | 37.11±0.04 | 28.63±0.05 | 7.75±0.02 | 26.14±0.10 |
| 3 | 10 | 8 | 27.5 | 37.57±0.11 | 29.63±0.21 | 8.20±0.04 | 26.83±0.29 |
| 4 | 50 | 8 | 27.5 | 38.39±0.07 | 29.61±0.12 | 8.14±0.04 | 27.19±0.12 |
| 5 | 10 | 5.5 | 5 | 35.54±0.13 | 28.28±0.06 | 7.79±0.03 | 25.81±0.13 |
| 6 | 50 | 5.5 | 5 | 36.85±0.20 | 29.14±0.10 | 8.12±0.05 | 26.62±0.21 |
| 7 | 10 | 5.5 | 50 | 32.86±0.18 | 28.25±0.05 | 7.64±0.03 | 26.41±0.38 |
| 8 | 50 | 5.5 | 50 | 35.51±0.12 | 30.05±0.38 | 8.03±0.10 | 27.22±0.15 |
| 9 | 30 | 3 | 5 | 31.20±0.26 | 24.94±0.23 | 6.84±0.09 | 23.46±0.09 |
| 10 | 30 | 8 | 5 | 34.41±0.10 | 19.41±6.47 | 7.04±0.04 | 24.53±0.09 |
| 11 | 30 | 3 | 50 | 31.01±0.19 | 26.85±0.11 | 7.12±0.07 | 25.13±0.14 |
| 12 | 30 | 8 | 50 | 34.20±0.08 | 27.74±0.27 | 7.44±0.05 | 25.20±0.21 |
| 13 | 30 | 5.5 | 27.5 | 34.49±0.25 | 28.52±0.28 | 7.65±0.04 | 25.92±0.27 |
| 14 | 30 | 5.5 | 27.5 | 33.72±0.19 | 28.66±0.03 | 7.76±0.03 | 26.30±0.14 |
| 15 | 30 | 5.5 | 27.5 | 33.60±0.30 | 29.15±0.31 | 7.68±0.01 | 26.77±0.34 |

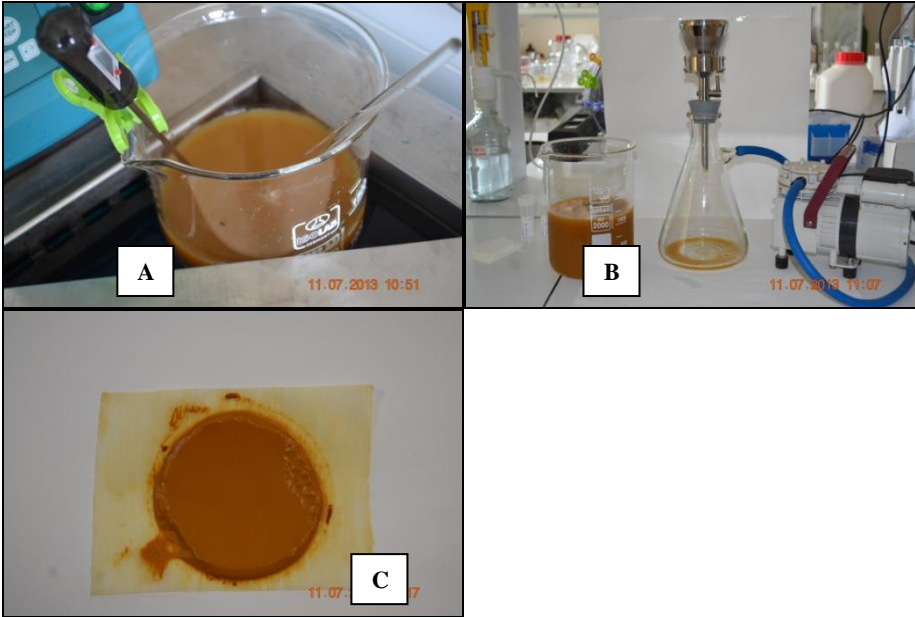
Bu amaçla dört değişken aynı anda kullanılmış olup sadece hedef bileşik olan D-pinitolün konsantrasyonu maksimum olarak seçilmiştir. Bu işlem sonucunda ise modelin optimum ultrafiltrasyon koşulları 10 kDa membran ayırma sınırı, 3.89 besleme pH değeri ve 6.7 °C besleme sıcaklığı olarak belirlenmiş ve bu parametreler kullanılarak ultrafiltrasyon işlemi yapılırsa elde edilecek ekstraktın 33.85 g/L düzeyinde sakkaroz, 27.02 g/L düzeyinde glukoz, 7.47 g/L düzeyinde D-pinitol ve 25.07 g/L düzeyinde fruktoz içeriğine sahip olacağı öngörülmüştür (Composite Desirability: 0.999996).

Modelin doğrulanması amacıyla saptana optimum koşullarda ultrafiltrasyon işlemleri yapılmış ve elde edilen ekstraktların şeker ve D-pinitol konsantrasyonları belirlenmiştir. Analizler sonucunda elde edilen bulgularla (36.44 g/ sakkaroz, 29.04 glukoz, 8.08 g/L D-pinitol ve 26.92 g/L fruktoz) eşitliklerden elde edilen değerler arasında yüksek oranda bir korelasyon olması ($R^2=1.00$) model tahminlerinin deneysel bulgularla uyumlu olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak; Box-Behnken CYM metodu ile yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda ultrafiltrasyon işleminde 10 kDa membran ayırma sınırı, 3.89 besleme pH değeri ve 6.7 °C besleme sıcaklığı koşullarının kullanılmasına karar verilmiştir. Literatürde keçiboynuzu ekstraktının içerdiği şekerlerin ve D-pinitolün konsantrasyonuna ultrafiltrasyon işleminin etkisiyle alakalı herhangi bir bilgiye rastlanmadığı için bu çalışmadan elde edilen bulgular literatür bilgileriyle kıyaslanamamıştır.

4.1.4. CaO uygulama işleminin optimizasyonu

CaO uygulama işleminin optimizasyonunda kullanılacak olan parametreler farklı seviyelerde uygulanmış (CaO miktarı (%): 1, 2, 3 ve 5; CaO ile temas süresi (dak.): 5, 10, 15 ve 20; ısıtma ve soğutma aşamalarında bekleme süresi (dak.): 15 ve 30) ve her bir parametre kendi içinde optimize edilmiştir (Şekil 4.2). Bu optimizasyon denemelerinde hedef parametrenin etkinliğini belirleyebilmek için diğer iki parametre rastgele seçilen birer seviyede sabit tutulmuştur.

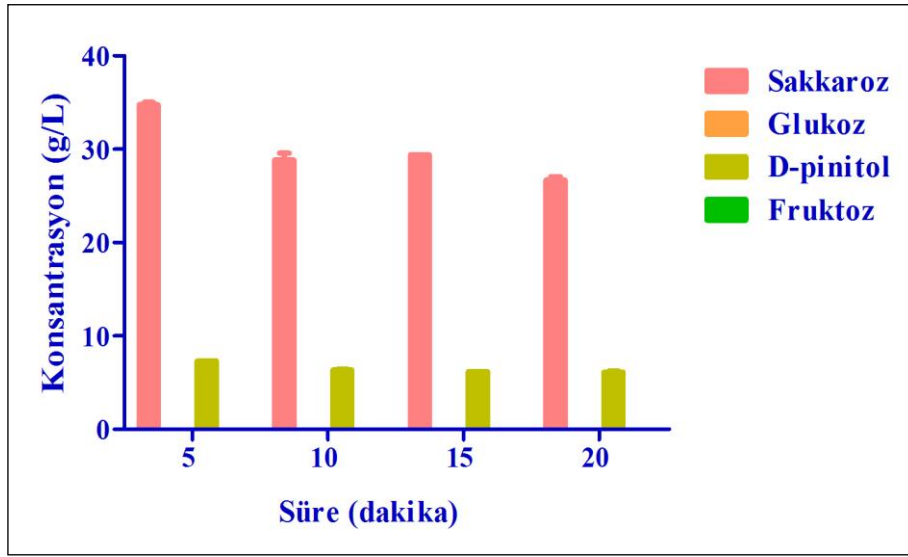


Şekil 4.2. CaO uygulama işleminin görüntüleri (A: Soğutma aşaması, B: Filtrasyon aşaması, C: Filtre keki)

Optimizasyon denemelerinde ilk olarak CaO (Sabit tutulan parametreler: % 2 CaO miktarı; 15'er dakika soğutma ve ısıtma aşamalarında bekleme süresi) ile optimum temas süresi belirlenmiştir. Tez çalışmasının birinci denemesi tasarlanırken ana hedef bileşik

olan D-pinitolün zenginleştirilmesinin yanı sıra sakkaroz içeriği yüksek olan keçiyoynuzu ekstraktından bu molekülün kristal formda elde edilebilirliği de araştırılmak istenmiştir. Bu nedenle birinci deneme planına şeker endüstrisinde kullanılan CaO uygulaması ilave edilmiştir. Dolayısıyla CaO uygulama aşamasının optimizasyonunda incelenen parametrelerin ekstraktta maksimum konsantrasyonda sakkaroz ve D-pinitol kalmasına olanak sağlayacak verilerin elde edilmesine çalışılmıştır.

Elde edilen bulgularda CaO uygulama işlemi sonunda alınan örneklerde glukoz ve fruktoz bileşiklerinin tespit edilemediği görülmektedir. Bunun sebebinin keçiyoynuzu ekstraktını CaO ile muamele etmenin ilgili bileşiklerin yapısında değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir. Nitekim literatür araştırmaları CaO uygulamasının şeker içeren sıvılarda bulunan invert şekerlerin organik asitlere ve renk maddelerine dönüşmesine neden olduğunu göstermektedir (Asadi 2007).

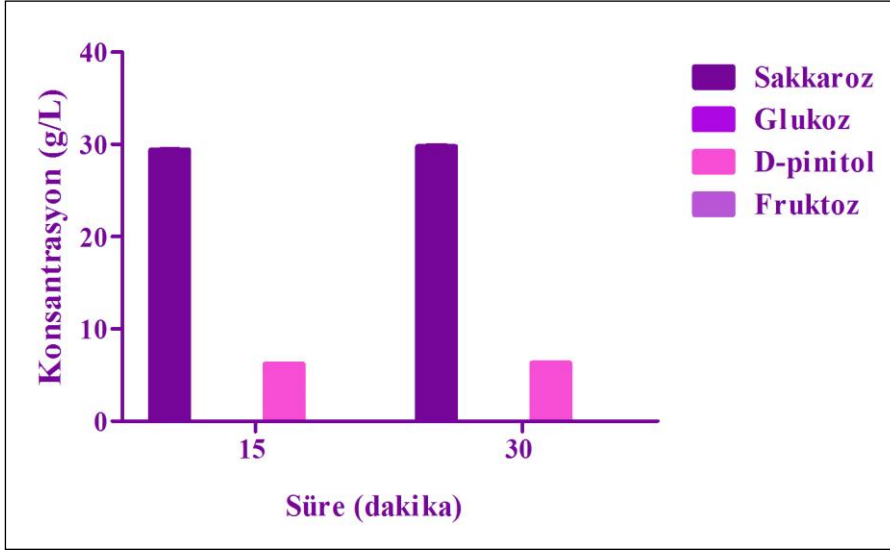


Şekil 4.3. CaO ile temas süresinin optimizasyonu

CaO uygulama işleminde optimize edilen parametrelerin kullanımıyla elde edilecek ve etil alkol fermentasyonunun girdisini oluşturacak kısım CaO uygulama işleminin 2. filtrat kısmından elde edilecek ekstrakt olduğu için 1. filtrasyon ve filtre keki kısımlarının şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişimlerin “4. Bulgular ve Tartışma” bölümünde verilmesinin çok fazla gerekli olmadığı görüşü nedeniyle bu veriler EK-8’de yer alan Şekil 7.7, 7.8 ve 7.9’da gösterilmiştir. Bu bulgulara göre her üç denemede de D-pinitol konsantrasyonu açısından bir miktar kayıp olduğu, 2. filtrat kısmında CaO ile muamele edilmeyen keçiyoynuzu ekstraktına göre belirli bir kısmın kaldığı görülmektedir.

CaO uygulama işleminin son basamağı olan 2. filtrasyondan alınan örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonları analiz edildiğinde soğutma işlemi öncesinde CaO ile temas süresi 5 dakikadan daha fazla sürdüğünde bu işlemde sonra ekstraktta kalan D-pinitol ve sakkaroz konsantrasyonlarında azalma olduğu görülmüştür (Şekil 4.3). Bu nedenle CaO ile ekstraktın en fazla 5 dakika temas ettirilmesi ve ardından hemen soğutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

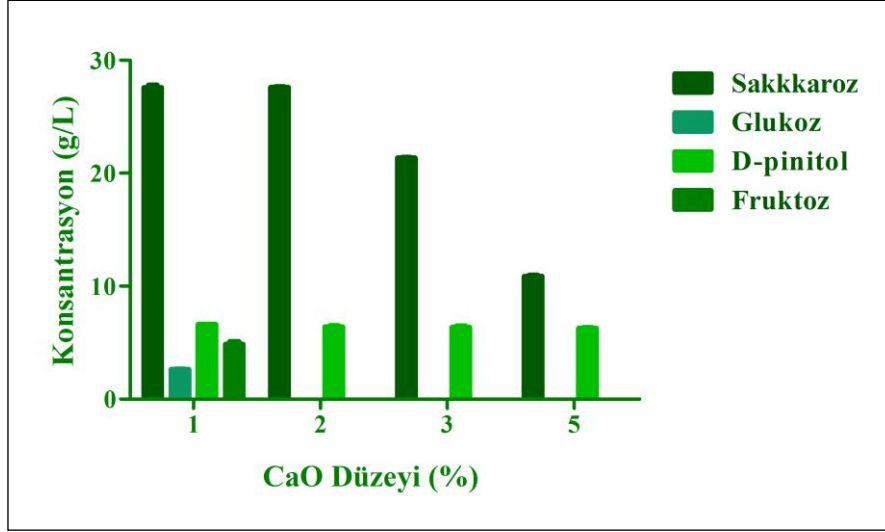
CaO uygulama aşamasının optimizasyonunda ikinci olarak soğutma ve ısıtma aşamalarında beklenilmesi gereken süre (Sabit tutulan parametreler: % 2 CaO miktarı; 15 dakika CaO ile temas süresi) için ön denemeler yapılmış ve CaO uygulama işleminin son basamağı olan 2. filtrasyondan elde edilen örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen bulgular soğutma ve ısıtma aşamalarında 15 dakikadan daha fazla beklenilmesinin sakkaroz ve D-pinitol konsantrasyonlarında herhangi bir artış meydana getirmediğini ($P>0.05$), dolayısıyla da bu aşamalarda işlem süresinin 15 dakika olmasının yeterli olacağını ortaya koymuştur.



Şekil 4.4. Soğutma-ısıtma aşamalarında beklenecek sürenin optimizasyonu

CaO uygulama aşamasının son parametresi olan ilave edilmesi gereken CaO miktarı (Sabit tutulan parametreler: 5 dakika temas süresi; 15'er dakika soğutma ve ısıtma aşamalarında bekleme süresi) için de ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla işlemin son basamağı olan 2. filtrasyondan elde edilen örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonları analiz edilmiştir (Şekil 4.5).

Bulgular keçiyoynuzu ekstraktına ilave edilen % 1 oranındaki CaO'in ekstraktta bulunan glukoz ve fruktoz bileşiklerinin tamamı ile reaksiyona girmeye yeterli olmadığını dolayısıyla istenen etkinin görülebilmesi için minimum % 2 CaO ilave edilmesi gerektiğini göstermiştir. Ayrıca bu miktardan daha fazla CaO ilave edildiğinde de D-pinitol konsantrasyonunda önemli bir farklılık olmazken ($P>0.05$), sakkaroz konsantrasyonunda ise tam tersi bir etki görülmüştür ($P<0.05$). Dolayısıyla % 2 CaO miktarının keçiyoynuzu ekstraktına katılması gereken minimum konsantrasyon olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 4.5. CaO miktarının optimizasyonu

Yapılan tüm ön denemelerin sonuçları doğrultusunda en uygun parametre kombinasyonu olarak % 2 CaO miktarı, 15 dakika CaO ile temas süresi ve 15'er dakika soğutma ve ısıtma aşamalarında bekleme süresinin uygulanmasına karar verilmiştir. Literatürde CaO uygulama sadece kristal şeker endüstrisinde sakkarozun ayrıştırılmasında kullanılan eski bir metot olarak yer aldığı için bu işlemde kullanılması gereken CaO miktarı, CaO'in şeker içeren sıvı ile temas süresi ve ısıtma ve soğutma aşamalarında beklenilmesi gereken süreler hakkında herhangi bir bulguya rastlanamamıştır. Ayrıca keçiyoynuzu ekstraktına CaO uygulanması ile ilgili de yapılan herhangi bir çalışma yoktur. Dolayısıyla çalışmanın bu aşamasından elde edilen değerlerin etkinliği hakkında herhangi bir literatür kıyaslaması yapılamamıştır.

4.1.5. Etanol fermentasyonunun optimizasyonu

Araştırmada, etanol fermentasyonunun gerçekleştirilmesinde mayanın başlangıç inokülasyon miktarı, optimal gelişme sıcaklığı ve reaktördeki karıştırma hızı gibi genel parametrelerin Turhan vd (2010b)'nin çalışması referans alınarak kullanılmasına ancak fermentasyon bitiş süresinin ön denemeye belirlenmesine karar verilmiştir. Çünkü maya genel olarak ortamda karbon kaynağı olarak başka bileşikler bulunduğu önce bu bileşikleri metabolize etmeyi tercih etmekte, yeterli düzeyde karbon kaynağı kalmadığı zaman ise D-pinitolü kullanmaya başlamaktadır. Tasarlanan bu deneme ile de mayanın ortamdaki şekerleri metabolize etmesi; böylece de ekstrakttaki D-pinitol konsantrasyonunun oransal olarak artırılması amaçlanmıştır. Ayrıca fermentasyonda tercih edilen *Saccharomyces cerevisiae* mayası D-pinitol molekülünün bağlı formlarını serbest D-pinitol formuna dönüştürme yeteneğine de sahip olduğu için (Shin vd 2003) ekstrakttaki serbest D-pinitol konsantrasyonunda artış da olabileceği düşünülmüştür.

Ön denemede ilk olarak keçiyoynuzu ekstraktı sterilize edilmiş ve daha sonra da optimize edilen dozda invertaz enzimi ile muamele edilerek ekstraktta bulunan sakkaroz molekülünün inversiyona uğraması sağlanmıştır (Bkz. 4.1.1.1. Enzim uygulaması işleminin optimizasyonu). Bu aşamadan sonra ise reaktöre *S.cerevisiae* mayasının stok

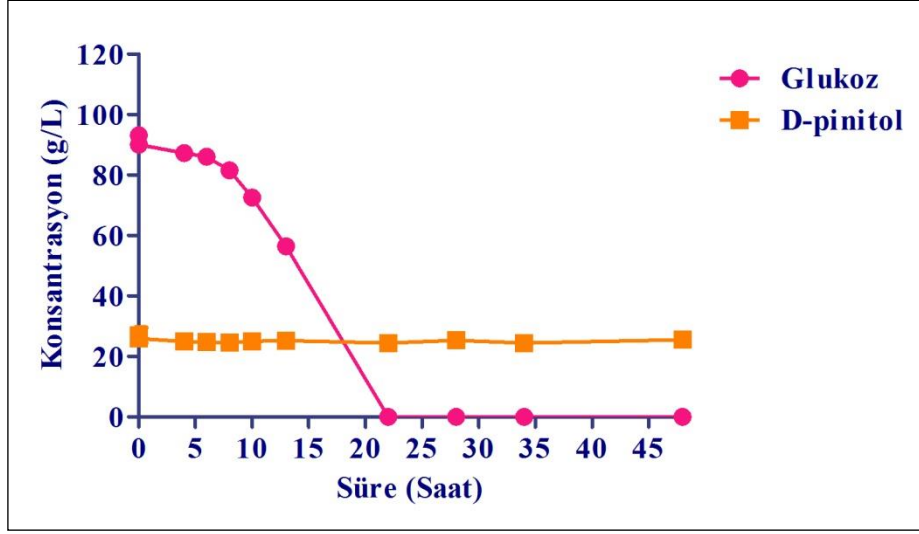
kültüründen zenginleştirilen ön kültür formunun inoküle edilmesiyle de fermentasyon işlemi başlatılmıştır (Bkz. 3.2.2.7. Etanol fermentasyonu).



Şekil 4.6. Reaktörde etanol fermentasyonu

Fermentasyon süresi boyunca (0 – 48. saat) farklı sürelerde reaktörden örnek alınarak şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim gözlenmiştir (Şekil 4.6, Şekil 4.7). Araştırmada HPLC analizlerinde kullanılan Transgenomic Nucleogel 87 P kolonunda fruktoz ile etanol bileşikleri kolonu aynı zamanda terk ettiği yani örneklere ait kromatogramda iki bileşene ait pikler üst üste çakıştığı için optimizasyonun doğru bir şekilde yapılabilmesi için değişimi gözlemlemede glukoz ve D-pinitol bileşiklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde fermentasyon boyunca D-pinitol konsantrasyonunda önemli düzeyde bir değişiklik olmaması bu mikroorganizmanın keçiyoynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün saflaştırılması amacıyla güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermektedir.

S. cerevisiae mayasının fermentasyon süresi boyunca karbon kaynağı olarak glukozu tercih ettiği Şekil 4.7'den görülmektedir. Ancak mikroorganizma bir müddet sonra ortamda bulunan D-pinitolü de kullanmaya başlamıştır (Şekil 4.7, 28.- 34. saatler arası). Dolayısıyla D-pinitol konsantrasyonları üzerinden değerlendirme yapıldığında etanol fermentasyonunun 32. saatte sonlandırılmasının istenilen amaç için uygun olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.7. Etanol fermentasyonunun süresinin optimizasyonu

4.2. Araştırma Kapsamında Yapılan Denemeler

4.2.1. Birinci deneme

Birinci denemede keçiboynuzu ekstraktında D-pinitolün zenginleştirilebilirliğinin yanı sıra sakkarozun da kristal formda ayrıştırılabilirliği araştırılmak istendiği için ekstrakta enzim uygulama aşamasında sadece pektolitik enzim uygulanmış, ilerleyen aşamalarda da ekstrakt CaO ile muamele edilmiş ve bu işlemten sonra kristalizasyon aşamasına geçilmiştir (Bkz. Şekil 3.2). Birinci denemenin kristalizasyon aşamasında evapore edilen keçiboynuzu ekstraktında kristal bir yapı oluşup oluşmadığı incelenmiş (Bkz. 4.2.1.1), etanol fermentasyonu aşamasında ise belirli aralıklarla örnek alınarak fermente edilen ekstrattaki biyokitle ve etanol değişimi gözlenmiştir (Bkz. 4.2.1.2).

Birinci denemenin keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitol bileşiğinin zenginleştirilmesi üzerine etkisini belirlemek için ise denemenin her aşamasında alınan örneklerde D-pinitol ve şeker konsantrasyonlarındaki değişim izlenmiştir (Bkz. 4.2.1.3. Birinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim). Ayrıca birinci denemenin son aşamasında elde edilen ürün ile kontrol örneğinin yani herhangi bir işleme tabi tutulmamış keçiboynuzu ekstraktının bileşimi de kıyaslanmıştır (Bkz. 4.2.3. Başlangıç ekstraktının ve denemelerin son aşamalarından elde edilen ekstraktların bazı tanımlayıcı değerlerinin kıyaslanması).

4.2.1.1. Birinci denemenin kristalizasyon aşamasının değerlendirilmesi

Birinci denemede keçiboynuzu ekstraktında bulunan sakkaroz molekülü CaO ile reaksiyona girerek daha stabil bir form olan trikalsiyum sakkarata dönüşmüştür. Bu haliyle ekstraktın konsantrasyonu esnasında bu yeni formdaki sakkaroz moleküllerinin daha kolay kristalize olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla “3.2.2.8. Evaporasyon” bölümünde belirtilen ekstraksiyon parametreleri kullanılarak kristalizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.8. Keçiboynuzu ekstraktının evaporasyonu

Buna göre yaklaşık 10 °Bx SÇKM değeri ile döner buharlaştırıcıya konulan keçiboynuzu ekstraktı 65 °Bx SÇKM değerine kadar kademeli olarak buharlaştırılmış ve bu esnada da olası kristal yapı oluşumunu teşvik etmek amacıyla ekstraksiyon sıcaklığı yavaş yavaş düşürülmüştür (Şekil 4.8). Ancak belirtilen SÇKM değerine kadar konsantre edilen keçiboynuzu ekstraktında (Şekil 4.8, Evaporasyon sonrası) hiçbir şekilde kristal bir yapı oluşmamıştır. Bu durum da keçiboynuzu ekstraktından sakkarozun kristal formda elde edilebilmesinde başarılı olacağı düşünülen CaO işleminin bu amaca ulaşmada etkisiz olmasından kaynaklanmıştır.

Keçiboynuzu ekstraktından kristal formda sakkaroz elde edilememesinin nedeni, meyveden ekstrakta geçen diğer olası safsızlıkların (Bkz. 2.8.5. Kristalizasyon) ekstrakttan yeterince uzaklaştırılamaması olarak düşünülmüştür. Ancak sakkarozun

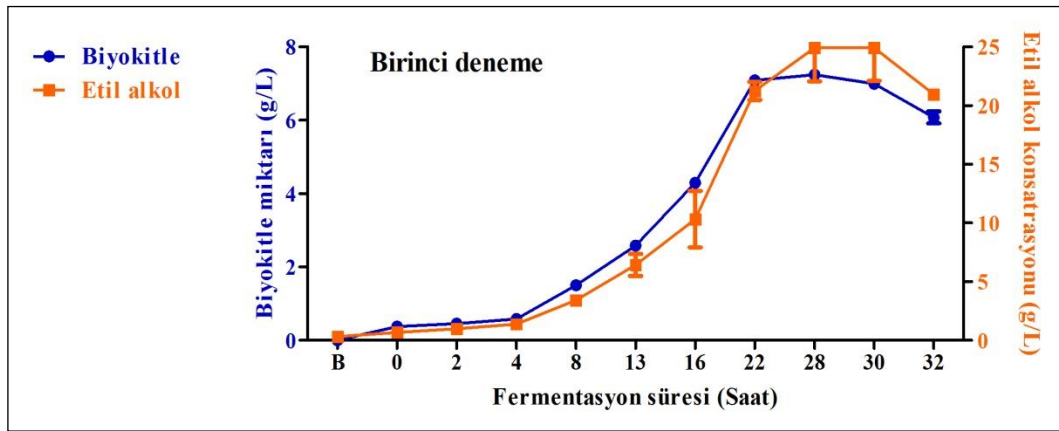
kristal formda elde edilebilirliği bu araştırmanın esas amacı olmayıp, sadece keçiyoynuzu ekstraktının D-pinitol açısından zenginleştirilmesinde uygulanacak işlem basamaklarının böyle bir yan ürün elde edilmesine katkı sağlayıp sağlamayacağı görülmek istenmiştir.

4.2.1.2. Birinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol değişimi

Birinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasında belirli aralıklarla reaktörden örnek alınmış ve bu örneklerde biyokitle miktarı ve etanol konsantrasyonu analizleri yapılmıştır (Şekil 4.9). Elde edilen bulgulara göre; inokülasyonda 10.72 g/L'lik bir ön kültürün kullanıldığı fermentasyonda hem biyokitle miktarındaki hem de etanol konsantrasyonundaki artışın birbirine paralel olduğu, özellikle 22. saatten sonra fermentasyon ortamında artan etanol konsantrasyonuna bağlı olarak mikroorganizma popülasyonunda azalma meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.9). Bu duruma mikroorganizmanın metabolik faaliyeti sonucu oluşturduğu etanolün inhibisyon özelliğine ve kesikli olarak gerçekleştirilen fermentasyon nedeniyle ortamda mikroorganizmanın kullanabileceği substrat kalmamasının sebep olabileceği düşünülmüştür.

Fermentasyon sonunda (32. saat) kalan biyokitle miktarı 6.08 ± 0.16 g/L iken oluşan etanol konsantrasyonu ise 20.96 ± 0.38 g/L düzeyinde kalmıştır. Çalışmanın pH kontrolsüz olarak gerçekleştirilen etanol fermentasyonu aşamasında mikroorganizmanın ekstrakt içinde çoğalmasıyla ulaşabildiği maksimum biyokitle miktarı 7.09 g/L (22. saat) olmuştur (Şekil 4.9). Bulunan bu değer Turhan vd (2010b)'nin çalışmalarında belirttiği değerin çok üzerindedir.

Nitekim Turhan vd (2010b) pH'nın etanol verimi üzerine de etkisini araştırmışlar ve pH kontrollü fermentasyonda maksimum 7.35 g/L düzeyinde biyokitle miktarına ulaşırken, pH kontrolsüz fermentasyonda bu değer 3.26 g/L olduğunu bildirmişlerdir. Ancak yine Turhan vd (2010b)'nin bildirdiklerine göre bu düşük biyokitle miktarına karşılık herhangi bir besiyeri bileşimi ilave edilmeyen keçiyoynuzu ekstraktı *S. cerevisiae* mayası kullanılarak fermentasyona tabi tutulduğunda 34.24 g/L düzeyinde etanol üretilmiştir. Bu değer de bu çalışmada bulunan değer (20.96 g/L) çok üzerindedir.



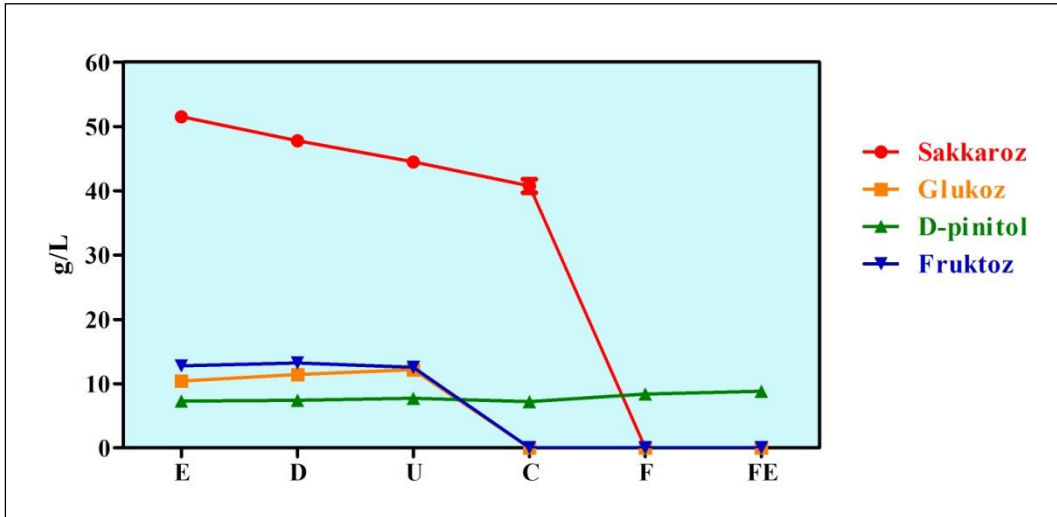
Şekil 4.9. Birinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol miktarlarındaki değişim

Literatürde etanol üretimi için kullanılan optimum pH değerinin 5.0-5.5 aralığında olduğu, pH 4.0'ın altına düştüğünde ise etanol üretiminin tamamen inhibe olduğu bildirilmektedir (Graves vd 2006). Ayrıca pH kontrolsüz gerçekleştirilen fermentasyonlarda etanol üretiminin oluşan organik asitler nedeniyle etanol üretimi için gerekli olan minimum pH değerinin de altına düştüğü, dolayısıyla da etanol üretiminin minimum düzeyde gerçekleştiği bildirilmektedir (Turhan vd 2010b).

4.2.1.3. Birinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim

Birinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerde şeker ve D-pinitol analizleri yapılmış ve uygulanan işlemlerin keçiyoynuzu ekstraktında bulunan bu bileşikler üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.8). Elde edilen bulgulara göre; sakkaroz molekülü ekstraksiyon aşamasından (51.50 ± 0.21 g/L) CaO uygulama aşamasına kadar (40.75 ± 1.05 g/L) önemli derecede azalma göstermiş, fermentasyon aşamasında ise maya tarafından tamamen metabolize edilmiştir.

Glukoz ve fruktoz bileşiklerinin konsantrasyonları ise CaO uygulama işlemine kadar önceki işlemlerden önemli düzeyde etkilenmemiş ($P > 0.05$) ancak CaO ile gerçekleşen tepkime sonucunda yapısal bozunmaya uğradıkları için HPLC ile analiz sonucunda geri kalan işlemlerin örneklerinde tespit edilememişlerdir. D-pinitol konsantrasyonunda ise azalma olmamakla birlikte (E: 7.31 ± 0.12 g/L ve FE: 8.81 ± 0.12 g/L) meydana gelen artış da ilk bakışta çok önemli görünmemektedir. Ancak ekstraksiyondan sonra alınan örneğin (E) suda çözünür kuru madde düzeyinin (SÇKM) 10.20 °Bx ve evaporasyon sonrası alınan örneğin (FE) SÇKM değerinin ise 5.5 °Bx olduğu göz önünde bulundurulacak olursa bütün işlemlerden sonra D-pinitol konsantrasyonunun başlangıç ekstraktına göre yaklaşık 2 kat daha konsantre hale geldiği görülmektedir.



Şekil 4.10. Birinci denemenin farklı aşamalarındaki şeker ve D-pinitol değişimleri (E: Ekstraksiyon sonrası, D: Durultma sonrası, U: Ultrafiltrasyon sonrası, C: CaO ile muamele sonrası, F: Fermentasyon sonrası, FE: Evaporasyon sonrası)

4.2.2. İkinci deneme

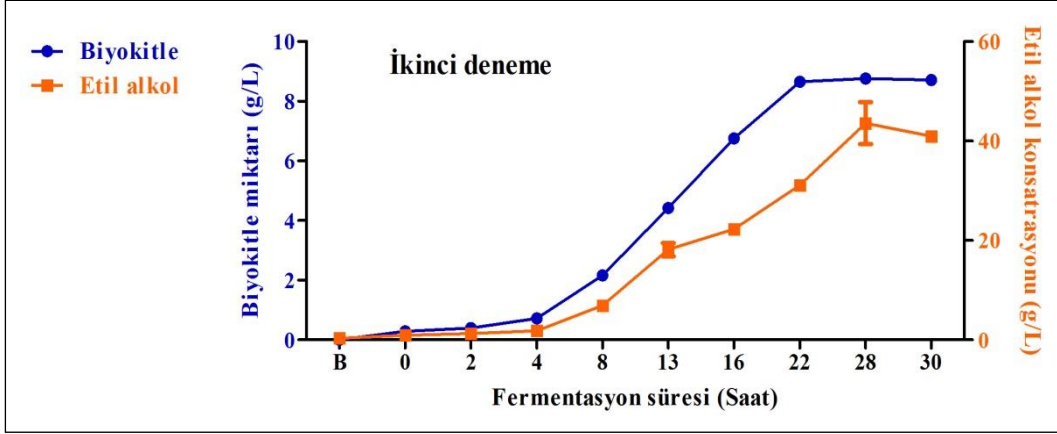
İkinci denemede birinci denemeden farklı olarak enzim uygulama aşamasında pektolitik enzim ile birlikte invertaz enzimi de uygulanmış ve CaO uygulama ve kristalizasyon aşamaların denemeden tamamen çıkartılmıştır (Bkz. Şekil 3.2). İkinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasında belirli aralıklarla örnek alınarak fermente edilen ekstrattaki biyokitle ve etanol değişimi gözlenmiştir (Bkz. 4.2.2.1). İkinci denemenin D-pinitolün zenginleştirilmesi üzerine etkisini belirleyebilmek için ise denemenin her aşamasında alınan örneklerde D-pinitol ve şeker konsantrasyonlarındaki değişim izlenmiştir (Bkz. 4.2.2.2). Ayrıca ikinci denemenin son aşamasında elde edilen ürün ile kontrol örneğinin yani herhangi bir işleme tabi tutulmamış keçiyoynuzu ekstraktının bileşimi de kıyaslanmıştır (Bkz. 4.2.3).

4.2.2.1. İkinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol değişimi

İkinci denemede de birinci denemede olduğu gibi etanol fermentasyonu aşamasının fermentasyon süresi boyunca belirli aralıklarla reaktörden örnek alınmış ve bu örneklerde yapılan biyokitle miktarı ve etanol konsantrasyonu analizleri ile fermentasyonun seyri izlenmiştir (Şekil 4.11). İkinci denemede gerçekleştirilen etanol fermentasyonu aşamasında 8.52 g/L düzeyinde canlı biyokitle içeren ön kültürden % 1 oranında inokülasyon yapılarak fermentasyon başlatılmıştır. İkinci deneme sonunda (30. saat) mikroorganizmanın fermentasyon süresince ulaştığı maksimum biyokitle miktarı 8.71 ± 0.05 g/L iken ve oluşan etanol konsantrasyonu ise 40.95 ± 1.07 g/L olmuştur. İkinci denemeden elde edilen bu değerlerin birinci denemeden elde edilen değerlere (6.08 g/L biyokitle miktarı ve 20.96 g/L etanol konsantrasyonu) göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

Elde edilen bulgular ortamda bulunan sakkaroz molekülü fermentasyon öncesinde inversiyona uğratıldığında mayanın böyle bir faaliyet uygulamak durumunda kalmadığı dolayısıyla hem kendi biyokitesini hem de etanol miktarını invertaz kullanılmayan denemeye göre daha çok artırabildiğini göstermiştir. Nitekim ikinci deneme ile birinci denemeye göre iki kat daha fazla konsantrasyonda etanol üretilmiştir.

Takeshige ve Ouchi (1995) mayanın gelişeceği besiyerinde güçsüz bir invertaz aktivitesi olmasının fermentasyon için yeterli düzeyde hidrolizat oluşumunun sağlanamamasına yol açacağını bu nedenle de besiyerine dışarıdan invertaz enzimi ilave edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Çünkü maya ortamda serbest halde bulunan monosakkaritler belli bir konsantrasyona ulaşana kadar ortamda bulunan sakkarozu inversiyona uğratmamakta yani seçici olarak önce monosakkaritleri (bunlardan da özellikle glukozu) hızlı bir şekilde tüketmekte daha sonra sakkaroz molekülünü inversiyona uğratmaktadır (Lima-Costa vd 2012).



Şekil 4.11. İkinci denemenin etanol fermentasyonu aşamasındaki biyokitle ve etanol miktarlarındaki değişim

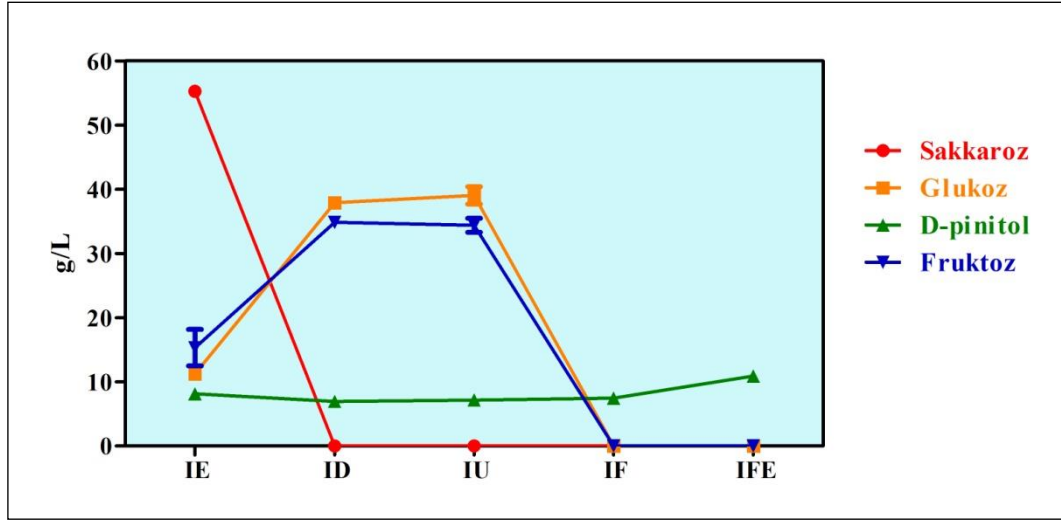
4.2.2.2. İkinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim

İkinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerde şeker ve D-pinitol analizleri yapılmış ve uygulanan işlemlerin keçiboynuzu ekstraktında bulunan bu bileşikler üzerine etkisi incelenmiştir (Şekil 4.12). Elde edilen bulgulara göre; ekstraksiyon işlemi ile keçiboynuzu meyvesinden ekstrakta 55.26 ± 0.08 g/L düzeyinde sakkaroz geçişi olduğu daha sonraki enzim uygulaması ve durultma aşamasında uygulanan invertaz enzimi ile de bu molekülün tamamının glukoz + fruktoz formuna dönüştüğü görülmüştür. Dolayısıyla başlangıç konsantrasyonlarına göre (IE örneğindeki Glukoz: 11.26 ± 0.19 g/L ve Fruktoz: 15.33 ± 2.86 g/L) bu bileşiklerin konsantrasyonunda inversiyonun etkisiyle önemli bir artış (ID örneğindeki Glukoz: 37.92 ± 0.58 g/L ve Fruktoz: 34.86 ± 0.73 g/L) meydana gelmiştir. Etanol fermentasyonu aşamasında ise bu bileşiklerin tamamı mikroorganizma tarafından metabolize edilmiştir.

İkinci denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerde D-pinitol bileşiğinin konsantrasyonunda meydana gelen değişim de gözlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre; başlangıçta elde edilen keçiboynuzu ekstraktı (IE) 8.11 ± 0.03 g/L düzeyinde D-pinitol içerirken bu oran fermentasyondan elde edilen örnek evapore edildiğinde (IFE) 10.91 ± 0.23 g/L düzeyine yükselmiştir. Ekstraktların suda çözünür kuru madde değerleri göz önünde bulundurulduğunda ise (IE: 11.38 °Bx ve IFE: 6.08 °Bx) başlangıç konsantrasyonuna göre ikinci denemede uygulanan bütün işlemlerin etkisiyle keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün yaklaşık 2.5 kat konsantre hale geldiği görülmüştür.

Elde edilen bulgular her iki denemenin de keçiboynuzu ekstraktından yüksek saflıkta D-pinitol elde edilmesine olanak sağlayamadığını, uygulanan tüm işlemlerin etkisiyle her iki denemede de bu bileşiğin konsantrasyonunda belirli bir düzeyde artış sağlanabildiği görülmüştür. Bu tez çalışmasının esas amacı özellikle bu fonksiyonel bileşiğin keçiboynuzu ekstraktında yüksek oranda zenginleştirilmesi olduğu için araştırmada başarıya ulaşılabileceği düşünülen denemelerinin yetersiz olduğuna, bu nedenle

de yeni bir deneme yapılması gerektiğine karar verilmiştir. Bu amaçla üçüncü bir deneme tasarlanmıştır.



Şekil 4.12. İkinci denemenin farklı aşamalarındaki şeker ve D-pinitol değişimleri (IE: İnvertaz uygulanan-ekstraksiyon sonrası, ID: İnvertaz uygulanan-durultma sonrası, IU: İnvertaz uygulanan-Ultrafiltrasyon uygulaması, IF: İnvertaz uygulanan-Fermentasyon sonrası, IFE: İnvertaz uygulanan-Evaporasyon sonrası)

4.2.3. Başlangıç ekstraktının ve denemelerin son aşamalarından elde edilen ekstraktların bazı tanımlayıcı değerlerinin kıyaslanması

Tez çalışmasında tanımlandığı üzere keçiyoynuzu ekstraktında ve her iki denemenin son aşamasından elde edilen ekstraktlarda pH, titrasyon asitliği (TA), suda çözünür kuru madde (SÇKM), toplam kuru madde (TKM) ve kül analizleri yapılmış olup elde edilen bulgular Çizelge 4.6'da gösterilmiştir. Çalışmanın ekstraksiyon aşamasında 80 °C sıcaklık, 1:4 meyve:su oranı ve 2 saat ekstraksiyon süresi parametreleri kullanılmış (Turhan vd 2010b) ve Çizelge 4.6'da gösterilen tanımlayıcı değerlere sahip bir keçiyoynuzu ekstraktı elde edilmiştir. Buna göre belirtilen koşullarda yapılan ekstraksiyon işleminden elde edilen ekstraktta % 11.03 düzeyinde SÇKM bulunduğu görülmektedir. Karkacier ve Artık (1995) da keçiyoynuzu meyvesini farklı ekstraksiyon koşullarında kullanarak elde ettikleri ekstraktların kimyasal özelliklerini incelemişlerdir. Karkacier ve Artık (1995)'nin 85 °C ve 1:4 meyve:su oranında gerçekleştirdikleri ekstraksiyon denemesinden elde ettikleri keçiyoynuzu ekstraktının da % 12.7 düzeyinde SÇKM içerdiği bildirilmiştir. Buna göre benzer koşullarda uygulanan ekstraksiyon işlemiyle meyveden ekstrakta birbirine yakın düzeyde suda çözünür kuru madde değeri geçişi olduğu görülmektedir.

Başlangıçta elde edilen keçiyoynuzu ekstraktı ile kıyaslandığında her iki denemenin özellikle SÇKM ve TKM değerlerinin başlangıç ekstraktına göre oldukça düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun etanol aşamasında ekstraktlarda bulunan şekerlerin maya tarafından substrat olarak kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çizelge 4.6. Keçiboynuzu ekstraktının başlangıç örneğinde ve denemelerin son aşamalarından elde edilen örneklerde yapılan bazı tanımlayıcı değerlerin bulguları**

| Örnek | pH | TA (%)* | SÇKM (%) | TKM (%) | Kül (%) |
|-----------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Başlangıç | 4.86 ^b ±0.01 | 0.18 ^b ±0.01 | 11.03 ^a ±0.68 | 11.95 ^a ±0.25 | 0.996 ^a ±0.00 |
| FE | 5.64 ^a ±0.07 | 0.07 ^c ±0.01 | 5.50 ^b ±0.00 | 5.35 ^b ±0.02 | 0.987 ^b ±0.00 |
| IFE | 4.98 ^b ±0.08 | 0.55 ^a ±0.03 | 6.08 ^b ±0.28 | 5.71 ^b ±0.24 | 0.992 ^a ±0.00 |

*: Susuz sitrik asit cinsinden, **: Aynı sütun içinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05).

Örneklerde en düşük asitlik değeri birinci denemeden elde edilen ekstraktta (FE) bulunmuştur. Bu durumun da birinci denemede keçiboynuzu ekstraktının bazik özellikli CaO ile muamele edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Denemelerden elde edilen ekstraktların kül içerikleri kıyaslandığında ise; birinci denemeden elde edilen ekstraktın (FE) başlangıç ekstraktına ve ikinci denemeden elde edilen ekstraktta (IFE) göre daha düşük kül içeriğine sahip olduğu görülmüştür.

4.2.4. Araştırma haricinde tasarlanan üçüncü deneme

Tez çalışmasında keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün zenginleştirilmesine yönelik iki farklı deneme tasarlanıp uygulanmıştır. Ancak denemeler sonunda keçiboynuzu ekstraktının başlangıç D-pinitol içeriği son ekstraktlarda sadece 2-2.5 kat kadar konsantrasyon hale getirilebildiği için bu denemelerin haricinde üçüncü bir denemenin tasarlanmasına ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla üçüncü denemede daha önceki denemelerde kullanılan işlemlerin bir kısmının hiç kullanılmamasına, bir kısmının da tekrar düzenlenerek kullanılmasına veya zenginleştirme aşamalarındaki yerinin değiştirilmesine karar verilmiştir. Ayrıca her işlem için optimize edilen parametrelerin de D-pinitolün konsantrasyon artışında önemli bir etkisi olmadığı elde edilen bulgulardan anlaşılmaktadır. Bu nedenle üçüncü denemede seçilen işlemlerde herhangi bir parametre optimizasyonu yapılmamıştır.

Önceki denemelerde kullanılan işlemler incelendiğinde, D-pinitol konsantrasyonundaki artışın etanol fermentasyonu aşamasından itibaren başladığı görülmüştür (Şekil 4.10 ve 4.12). Bu artışın keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün glikozit, fosfolipit gibi bağlı formlarının *S. cerevisiae* mayası tarafından serbest formda D-pinitole dönüştürülmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Nitekim Shin vd (2003) soya fasulyesi fraksiyonlarından D-pinitol ve türevlerinin saflaştırılmasına yönelik gerçekleştirdikleri çalışmada farklı mikroorganizmaların bu şekilde D-pinitolün türevlerini serbest forma geçirdiklerini dolayısıyla son ürünün D-pinitol konsantrasyonunda bir miktar da olsa artış meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Shin vd (2003) mikroorganizma faaliyeti sonucu D-pinitol konsantrasyonunda başlangıç içeriğine göre 1.5-2.5 kat oranında artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuç da bu tez çalışmasında D-pinitol konsantrasyonundaki artışın fermentasyon aşamasından itibaren başladığını vurgular niteliktedir.

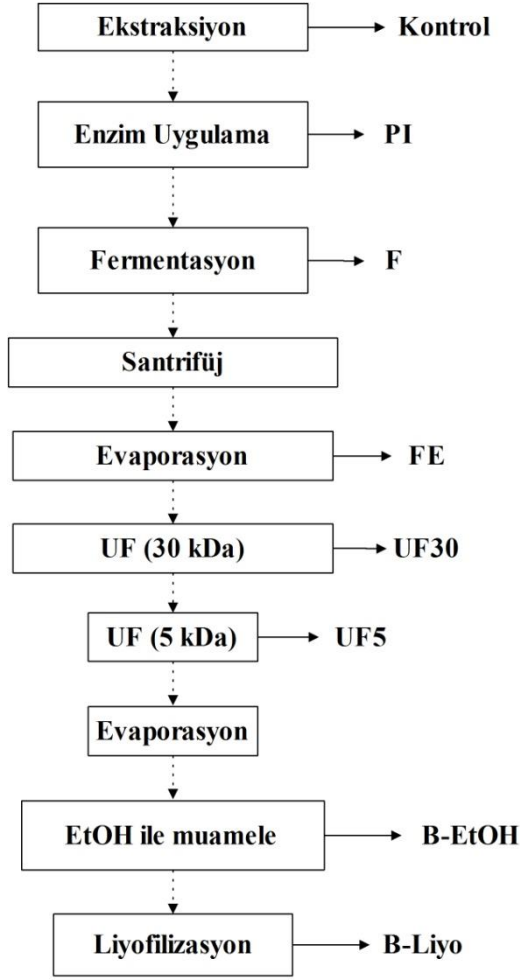
Ayrıca üçüncü denemenin tasarlanmasında keçiboynuzu ekstraktında bulunabilecek proteinler, polifenoller gibi koloidal maddelerin konsantrasyonunu azaltmak için uygulanan sıcak durultma aşaması bu aşamada kullanılan çözeltilerin (bentonit, jelatin ve kizelzol) ayrı bir safsızlık unsuru olma olasılığından dolayı denemeden tamamen çıkartılmıştır. Üçüncü denemeye, önceki denemelerden elde edilen tecrübeler ışığında kademeli ultrafiltrasyon ve aktif etil alkol ile solvent ekstraksiyonu işlemleri dâhil edilerek yeni bir iş akış şeması oluşturulmuştur. İş akış şeması ve aşamalardan alınan örneklerin kodları Şekil 4.13'te görülmektedir.

Bu denemede ekstraksiyon, enzim uygulama ve etanol fermentasyonu aşamaları için birinci ve ikinci denemede uygulanan parametreler aynen tekrar edilmiştir (Bkz. 3.2.2.1. Ekstraksiyon, 3.2.2.2. Enzim uygulama ve 3.2.2.7. Etanol fermentasyonu).

Etanol fermentasyonundan elde edilen fermente ekstrakt maya hücrelerini ayırabilmek için santrifüj edilmiş, santrifüjleme sonrası elde edilen berrak kısımlarda fermentasyonda oluşan etanolün ayrıştırılması için evapore edilmiştir (Bkz. 3.2.2.8. Evaporasyon).

Etanolü ayrıştırılan keçiboynuzu ekstratı daha sonra kademeli ultrafiltrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Yani ilk olarak 30 kDa'luk membran filtre kullanımıyla elde edilen filtrat yani permeat kısmı daha sonra 5 kDa'luk membran filtre kullanımıyla tekrar filtre edilmiş ve elde edilen permeat kısmıyla zenginleştirme işlemlerine devam edilmiştir. Bu aşamadan sonra solvent ekstraksiyonu işleminden önce ekstraktın bir miktar konsantre hale getirilmesi istendiği için döner buharlaştırıcı kullanılarak SÇKM değeri 8.6 °Bx'ten 50 °Bx'e yükseltilmiştir.

Solvent ekstraksiyonu (EtOH ile muamele) aşamasında D-pinitolün zenginleştirilmesi/saflaştırılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda yaygın olarak kullanılan etanol solventinden yararlanıldığı ve genellikle bu çalışmalarda solvent ekstraksiyonunun kademeli olarak yapıldığı görülmüştür (Streeter 2001; Shin vd 2003). Ancak bu çalışmada solvent ekstraksiyonu kullanımının amacı D-pinitolün zenginleştirilmesi üzerine bu işlemin etkisini belirlemek olduğu için etanol solventi seyreltilmeden (% 96'luk çözeltisi halinde) keçiboynuzu ekstraktına ilave edilmiştir.



Şekil 4.13. Üçüncü deneme için tasarlanan iş akış şeması

Solvent ekstraksiyonu işlemi için Shin vd (2003)'nin D-pinitol ve türevlerini yüksek saflıkta soya fraksiyonlarından elde etmek için gerçekleştirdikleri patent çalışması referans alınmış ve biraz modifiye edilerek uygulanmıştır. Buna göre; 5 kDa'luk ultrafiltasyon membranı ile filtre edilen örnek 50 °Bx düzeyine kadar konsantre edildikten sonra hacminin üç katı olacak şekilde etanol çözeltisi (% 96'lık) ile karıştırılmıştır. Vortex ile homojen hale getirilen ekstrakt daha sonra 3000 d/dak'da 5 dakika santrifüj edilmiş ve bu işlemde elde edilen berrak kısım dondurarak kurutucuya verilmek üzere bir miktar sulandırılmıştır.

SÇKM değeri 22 °Bx'e getirilen ekstrakt daha sonra dondurarak kurutucuya (Labconco FreeZone 2.5 Freeze Dryer, Missouri, USA) verilerek – 85 °'de vakum altında 48 saat boyunca kurutulmuş ve böylece ekstrakttaki serbest suyun tamamının uzaklaşması sağlanmıştır. Bu işlem uygulanan işlemlerle zenginleştirildiği düşünülen D-pinitolün gerçek konsantrasyonunu hesaplayabilmek için uygulanmıştır (Şekil 4.14).

Üçüncü denemenin etkinliğini belirleyebilmek için temel işlem basamaklarından alınan örneklerde D-pinitol ve şeker analizleri yapılarak bu bileşiklerin konsantrasyonunda meydana gelen değişim gözlenmiştir. Buna göre; üçüncü denemenin

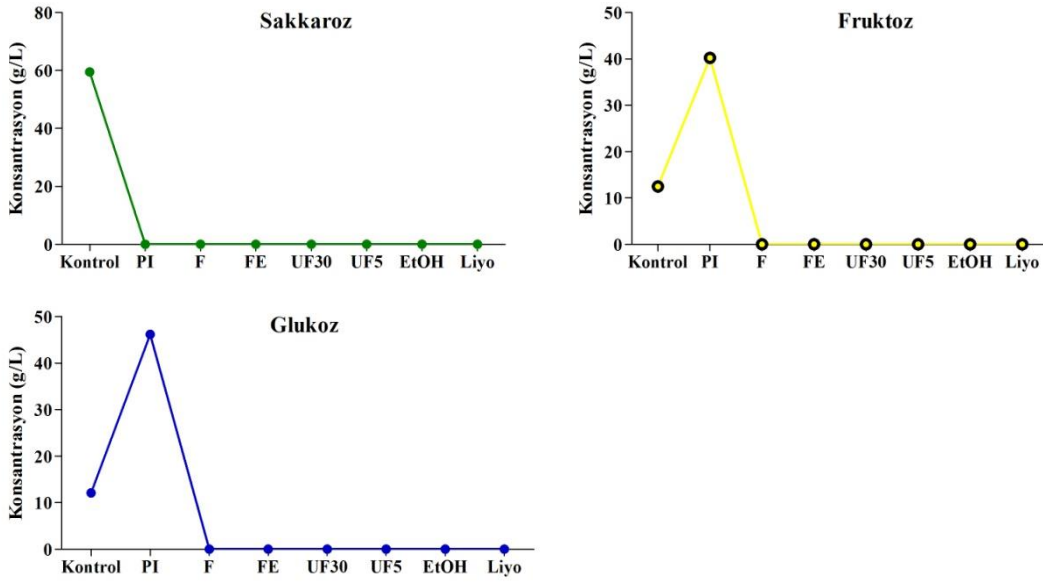
ilk aşaması olan ekstraksiyon işleminden elde edilen keçiboynuzu ekstraktının (Kontrol) 59.52 g/L düzeyinde sakkaroz, 12.10 g/L düzeyinde glukoz ve 12.48 g/L düzeyinde fruktoz içerdiği görülmektedir.



Şekil 4.14. Dondurarak kurutucudan elde edilen keçiboynuzu ekstraktı (Liyo)

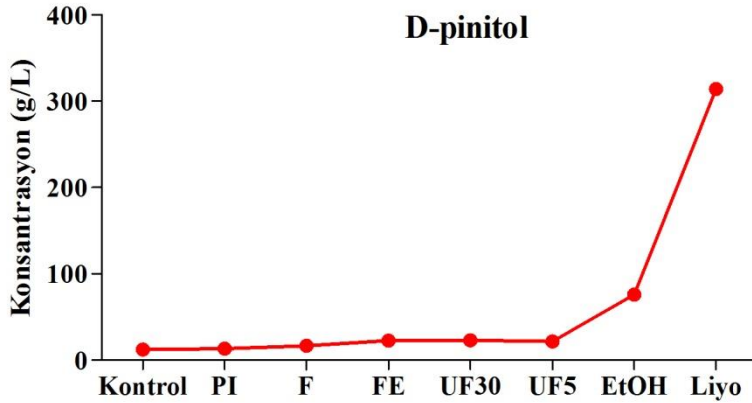
Etanol fermentasyonu öncesinde enzim uygulama (pektolitik ve invertaz) işlemine tabi tutulan ekstraktta bulunan sakkarozun tamamının bu işlem aşamasından sonra glukoz + fruktoz formuna dönüştüğü ve bu nedenle de sonraki aşamalarda tespit edilemediği Şekil 4.15'te görülmektedir. İnversiyonun etkisi ile de glukoz ve fruktoz şekerlerinin konsantrasyonlarında başlangıçtaki değerlerine göre yaklaşık dört katlık bir artış meydana gelmiştir. Nitekim ekstraksiyon aşamasından elde edilen keçiboynuzu ekstraktı 12.10 g/L düzeyinde glukoz ve 12.48 g/L düzeyinde fruktoz içerirken, inversiyon işleminin etkisiyle bu değerlerin sırasıyla 46.18 g/L ve 40.24 g/L'ye yükseldiği görülmüştür. Glukoz ve fruktoz monosakkaritleri de etanol fermentasyonu (F) esnasında maya tarafından metabolize edilerek ortamdaki uzaklaştırılmıştır (Şekil 4.15).

Üçüncü denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim de incelenmiştir. Buna göre; başlangıç D-pinitol konsantrasyonu 12.15 g/L olan keçiboynuzu ekstraktının bu içeriği kademeli ultrafiltrasyon işlemlerinden sonra 21.34 g/L'ye (UF5) yükselmiştir. Her iki aşamanın SÇKM değerleri göz önünde bulundurulduğunda (Kontrol: 12.9 °Bx, UF5: 8.6 °Bx) ise enzim uygulama, fermentasyon ve ultrafiltrasyon işlemleri ile D-pinitol konsantrasyonunda yaklaşık % 15'lik bir artış olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. Üçüncü denemenin farklı aşamalarında alınan örneklerin şeker konsantrasyonlarındaki değişim

Üçüncü denemenin keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitol bileşiğinin zenginleştirilmesi üzerine etkisini incelemek amacıyla başlangıç ekstraktı ile solvent ekstraksiyonu işleminden elde edilen ekstraktların D-pinitol konsantrasyonları kıyaslanmıştır. Buna göre; üçüncü denemede D-pinitolün zenginleştirilmesi için uygulanan işlemlerin etkisiyle (Kontrol: 12.15 g/L ve EtOH: 75.84 g/L) ve SÇKM (Kontrol: 12.9 °Bx ve EtOH: 22 °Bx) D-pinitol konsantrasyonunda başlangıç seviyesine göre yaklaşık olarak 3.5 katlık artış meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Üçüncü denemenin farklı aşamalarından alınan örneklerin D-pinitol konsantrasyonundaki değişim

Zenginleştirme amacıyla uygulanan son işlem olan solvent ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktta bulunan D-pinitol konsantrasyonunda başlangıç ekstraktına göre meydana gelen artışı tam olarak ifade etmek için son işlemde elde edilen ekstrakt dondurarak kurutulmuştur. Ayrıca tüm denemelerde SÇKM değerleri üzerinden yapılan

kıyaslamalar konsantrasyon artışı üzerine yaklaşık olarak bir fikir elde edilebilmesi için kullanılmış olup bu artışı açıklamak için toplam kuru madde değeri üzerinden hesap yapılmasının daha doğru olacağı düşünülmüştür. Dolayısıyla birinci ve ikinci deneme ile kıyaslandığında başlangıç D-pinitol konsantrasyonuna göre daha yüksek bir artış görülen üçüncü denemede kontrol örneği ile dondurularak kurutulan örneğin D-pinitol konsantrasyonları toplam kuru madde değerleri dikkate alınarak tekrar kıyaslanmıştır. Ayrıca her iki örneğin toplam asitlik ve kül değerleri de belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre (Çizelge 4.7), TKM ve D-pinitol konsantrasyonları birlikte değerlendirildiğinde liyofilizasyon işleminden elde edilen ekstraktın herhangi bir işlem görmemiş başlangıç ekstraktına göre yaklaşık % 350 oranında daha fazla miktarda D-pinitol içerdiği görülmüştür. Bu sonuç da önceki kıyaslamada SÇKM verilerinin dikkate alınmasıyla elde edilen artış oranıyla aynıdır.

Çizelge 4.7. Üçüncü denemeden elde edilen başlangıç ve son ekstraktlara ait bazı kimyasal değerler

| | D-pinitol (g/L) | TKM % | T.A* % | Toplam Kül % |
|----------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Kontrol | 12.15 ^b ±0.15 | 12.95 ^b ±0.03 | 0.24 ^b ±0.00 | 1.08 ^a ±0.11 |
| Liyo | 315.18 ^a ±3.82 | 97.56 ^a ±0.78 | 2.10 ^a ±0.06 | 0.95 ^a ±0.00 |

Aynı sütun içerisinde farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark önemlidir (P<0.05),

*: Susuz sitrik asit cinsinden

Dolayısıyla ekstraktların D-pinitol konsantrasyonlarının kıyaslanmasında SÇKM veya TKM verilerinin kullanılmasının herhangi bir farklılığa yol açmadığı görülmüştür. Toplam kül açısından her iki ekstrakt arasında herhangi bir farklılık olmaması (P>0.05), uygulanan işlemlerin mineral madde miktarını azaltıcı yönde bir etkileri olmadığını göstermiştir. Ayrıca üçüncü denemenin son aşamasından elde edilen ekstraktın (Liyo) yüksek asitlik içeriğine sahip olmasının da etanol fermentasyonu aşamasında mayanın şekerleri fermente etmesiyle açığa çıkan organik asitlerden kaynaklandığı düşünülmüştür.

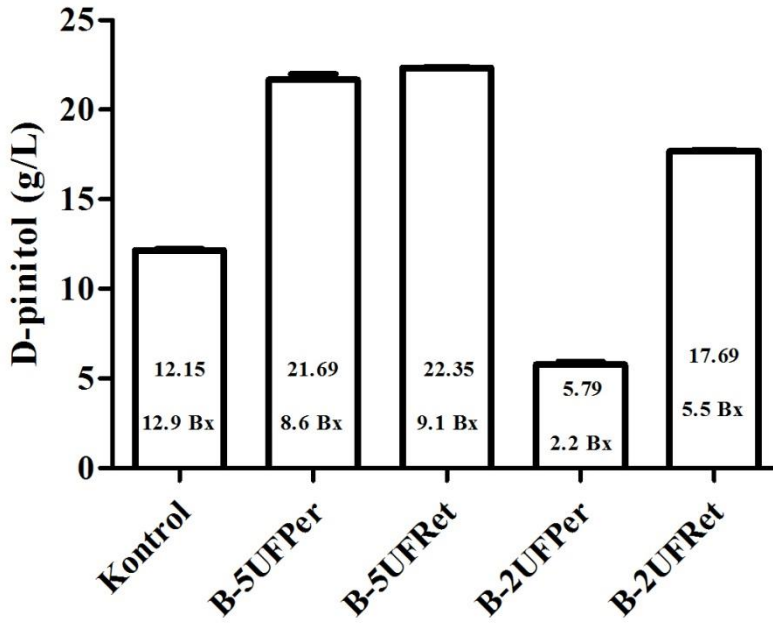
Üçüncü denemede tez çalışması kapsamında uygulanan birinci ve ikinci denemelerle kıyaslandığında D-pinitolün daha yüksek oranda elde edilebilmesinin etanol fermentasyonu öncesinde D-pinitolün zenginleştirilmesine çok fazla katkısı olmayan sıcak durultma, ultrafiltrasyon gibi aşamaların çıkarılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca etanol ile yapılan solvent ekstraksiyonu da D-pinitol haricindeki safsızlıkların ayrıştırılmasına katkı sağlamıştır.

4.2.5. Düşük gözenek çapına sahip membran filtrelerle yapılan membran filtrasyonun D-pinitolün zenginleştirilmesine etkisi

Bu tez çalışmasının esas hedefi D-pinitolün saflaştırılmasında yaygın olarak kullanılan pahalı solvent ekstraksiyonu, kromatografik ayırma gibi tekniklere alternatif oluşturabilecek bir zenginleştirme işleminin tanımlanması olmuştur. Bu amaçla da tez çalışması gerçekleştirilmeden önce özellikle membran separasyonunun ekstraktta bulunan D-pinitolün zenginleştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Ancak yapılan her üç denemede de ultrafiltrasyon işleminin belirtilen membran ayırma sınırlarında kullanımının beklenen farklılığı sağlamadığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.10,

4.12 ve 4.15). Dolayısıyla D-pinitolün zenginleştirilmesinde membran separasyon tekniği uygulanacaksa bunun ultrafiltrasyondan ziyade nanofiltrasyon ile yapılmasının düşük molekül ağırlıklı bir karbonhidrat olan D-pinitolün saflaştırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Bu sebeple proje ekibi aynı sistemde kullanılan 2 kDa membran gözenek çapına sahip bir membran temin ederek üçüncü denemeden en son elde edilen örneği (Liyo) belli bir oranda sulandırmış ve bu membrandan geçirmiştir. Bulguları anlamlandırabilmek için üçüncü denemenin kademeli ultrafiltrasyon aşamalarından olan 5 kDa'luk membranın kullanılmasıyla elde edilen ekstraktın permeat ve retentat kısımlarının değerleri bu denemeden elde edilen permeat ve retentat kısımlarının değerleriyle kıyaslanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Farklı gözenek çapına sahip membran filtrelerden geçirilen keçiboynuzu ekstraktının D-pinitol konsantrasyonu

Elde edilen bulgulara göre; 5 kDa'luk membran filtre kullanıldığında filtre edildiğinde permeat (21.69 g/L) ve retentat (22.35 g/L) kısımlarının neredeyse aynı konsantrasyonda D-pinitol içerdiği ancak membran filtrasyon işlemi 2 kDa'luk membran filtre ile gerçekleştirildiğinde ise permeat (5.79 g/L) ve retentat (17.69 g/L) kısımlarında önemli derecede bir konsantrasyon farkı olduğu ve ekstraktta bulunan D-pinitolün büyük bir kısmının membrandan geçemeyerek retentat kısmında kaldığı görülmüştür. Dolayısıyla tez kapsamında 5 kDa'dan daha düşük gözenek çapına sahip membran filtreler kullanılmamışsa da membran filtrasyon aşamasında filtreden geçirilen ekstraktın belli bir kısmında D-pinitolün daha fazla konsantre hale getirilebilmesi için daha düşük gözenek çapına sahip filtrelerin kullanılması gerektiği görülmüştür.

Literatürde yer alan bilgiler incelendiğinde başarılı bulunan yöntemlerde genellikle iyon değiştirici reçine kullanımı, aktif kömür kromatografisi, solvent ekstraksiyonu gibi pahalı tekniklerin kombine edilmesiyle yüksek saflıkta D-pinitol elde

etmenin mümkün olduğu gör÷lmektedir (Streeter 2001; Shin vd 2003; Camero ve Merino 2004). Ayrıca yüksek saflıkta D-pinitol ticaretini yapan firmaların da buna D-pinitolün saflaştırılmasında bu tekniklere benzer teknikler kullandıkları bilinmektedir (Anonymous 2014d, 2014b). Bu tez çalışmasında D-pinitol içeriği bakımından zengin olan keçiboynuzu meyvesinden elde edilecek ekstrakta farklı teknikler uygulanarak içindeki bu fonksiyonel bileşimin zenginleştirilmesi hedeflenmiştir. Uygulanan teknikler kapsamında D-pinitol konsantrasyonunda yaklaşık olarak 2-3.5 kat aralığında bir artışa ulaşılabilmektedir.

5. SONUÇLAR

Bu projede keçiyoynuzu meyvesinde bulunan D-pinitol adlı fonksiyonel şeker alkolünün elde edilmesi üzerine ekstraksiyon, sıcak durultma, ultrafiltrasyon, CaO uygulama, etanol fermentasyonu, kristalizasyon ve etanolik solvent ekstraksiyonu tekniklerinin etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla tez kapsamında tanımlanan iki farklı deneme uygulanmıştır. Denemelerin tamamında uygulanan işlemlerin etkinliğini değerlendirmede D-pinitol ve baskın şekerler (sakkaroz, glukoz ve fruktoz) indikatör olarak kullanılmıştır. Denemelerde şekerlerin de indikatör olarak kullanılmak istenmesinin sebebi D-pinitolün saflaştırmasında materyal olarak keçiyoynuzu kullanıldığında bu meyvenin zengin şeker içeriğinin bu durumu inhibe edici bir etki göstermesidir. Dolayısıyla uygulanan her işlemle bu zengin şeker içeriğinin azaltılması/ortadan kaldırılması hedeflenmiştir.

Denemelerin uygulamasına geçilmeden önce denemelerde yer alan temel aşamalar olan enzim uygulama, sıcak durultma, CaO uygulama, ultrafiltrasyon ve etanol fermentasyonu aşamalarında uygulanacak parametreler ön denemeler yapılarak belirlenmiştir. Enzim uygulama aşamasında pektik maddelere ve sakkarozu etki edecek enzim miktarları ön denemelerle belirlenmiştir. Buna göre farklı etkiye sahip pektolitik enzim preparatlarının (Pectinex Ultra Clear ve Pectinex Smash XXL) her birinden 50 µL/L düzeyinde kullanılmasının istenen enzimatik aktiviteye ulaşılabilmesi için yeterli olacağı; ekstrakta bulunan sakkarozun tamamının inversiyona uğratılabilmesi için ise ekstrakta % 1'i oranında invertaz enzimi eklenmesinin yeterli olacağı görülmüştür. Bu miktardaki enzimin inversiyon aktivitesi için gerekli olan süre ise 2 saat olarak belirlenmiştir.

Enzim uygulamasından sonra ekstraktın berraklaştırılması için gerekli diğer aşama olan sıcak durultma işleminin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön deneme sonuçlarına göre bentonit (% 5), jelatin (% 5) ve kizelzol (% 1.5) çözeltilerinin optimal dozları sırasıyla 6 g/L, 3 g/L ve 4.5 mL/L olarak bulunmuştur. Bu kombinasyonlarla durultulan keçiyoynuzu ekstraktının yeterli düzeyde berrak olduğu görülmüştür. Dolayısıyla berraklaştırma işlemiyle ekstrakta D-pinitol haricinde bulunan safsızlıkların bir kısmının uzaklaştırıldığı düşünülmüştür.

Keçiyoynuzu meyvesinde bulunan D-pinitolün ekstraksiyonunu artırmak amacıyla uygulanan bir diğer teknik ise ultrafiltrasyon olmuştur. Bu teknikte farklı membran ayırma sınırları, besleme sıcaklığı ve pH değerleri Cevap Yüzey Metodu ile optimize edilerek keçiyoynuzunda bulunan D-pinitol ve baskın şekerlerin ekstrakta kalma oranları değiştirilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonunda elde edilen en uygun kombinasyon 10 kDa membran ayırma sınırı, 3.89 besleme pH değeri ve 6.7 °C besleme sıcaklığı olarak bulunmuştur.

Ön denemelerle parametreleri optimize edilmeye çalışılan diğer bir işlem basamağı da CaO uygulama olmuştur. Bu aşamada da ekstrakta ilave edilecek CaO miktarı, ekstraktın bu kimyasal ile temas süresi ve soğutma ve ısıtma aşamalarında beklenilmesi gereken süre parametreleri optimize edilmiştir. Buna göre; keçiyoynuzu ekstraktına % 2 oranında CaO ilave edilmesi ve bu kimyasal ile ekstraktın karıştırılma süresinin 15 dakika

olması, bu süreden sonra uygulanacak olan soğutma ve ısıtma aşamalarında da 15'er dakika beklenilmesi yeterlidir.

Tez kapsamında ön denemeler yapılan bir diğer aşama ise etanol fermentasyonu olmuştur. Bu aşamada *Saccharomyces cerevisiae* mayasının inokülasyon miktarı, optimum inkübasyon sıcaklığı ve inkübasyon esnasında reaktörün karıştırılma hızı üzerine ön deneme yapılmazken mayanın sadece ekstrakttaki şekerleri metabolize etmesi ancak D-pinitolü karbon kaynağı olarak kullanmasını engellemek amacıyla fermentasyon süresi için ön denemeler yapılmıştır. Elde edilen bulgulardan fermentasyonun yaklaşık olarak 30-32 saatlik bir süre sonunda bitirilmesinin istenen amaç için uygun olduğu görülmüştür.

Her ne kadar birinci denemenin uygulanmasındaki esas amaç D-pinitolün zenginleştirilmesi olsa da keçiyoynuzu ekstraktının zengin sakkaroz içeriğinin de kristal formda elde edilip edilemeyeceği bu denemeye ilave edilen CaO uygulama ve kristalizasyon aşamaları ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla enzim uygulanan ve sıcak durultma işlemine tabi tutulan berrak keçiyoynuzu ekstraktı ultrafiltre edildikten sonra CaO ile muamele edilmiştir. Daha sonra döner buharlaştırıcıda soğutulup konsantre hale getirilen keçiyoynuzu ekstraktında kristal yapı oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Ancak bu amaçla kullanılan tekniklerle herhangi bir kristal yapı gözlemlenemediği için ekstraktta bulunan ve sakkarozun kristalleşip ayrışmasını engelleyen safsızlıkların ekstraktan yeterince uzaklaştırılmadığı kanaatine varılmıştır. Keçiyoynuzu ekstraktında şekerlerin kristalizasyon yoluyla ayrılması üzerine kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu aşamadan sonra ekstrakt etanol fermentasyonuna tabi tutularak içeriğindeki şekerlerin ve mayanın metabolize edebileceği diğer olası karbon kaynaklarının (D-pinitol haricindeki) maya tarafından kullanılması sağlanmıştır. Etanol fermentasyon aynı zamanda ekstratta bulunan D-pinitol türevlerini serbest D-pinitol formuna dönüştürmek için de kullanılmıştır. Nitekim *S. cerevisiae* mayasının da böyle bir özelliğe sahip olduğu yapılan literatür araştırmalarında görülmüştür.

Fermente edilen ekstrakt evapore edilerek içeriğindeki etanolün ayrıştırılması sağlanmıştır. Elde edilen son ürünün D-pinitol içeriği kontrol örneğinin D-pinitol içeriği ile kıyaslanmıştır. Buna göre uygulanan bütün bu işlemler sonucunda keçiyoynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün (Ekstraksiyon sonrası: 7.31 g/L, 10.20 °Bx; Fermentasyon sonrası uygulanan evaporasyon sonrası: 8.81 g/L, 5.5 °Bx) iki kat konsantre hale getirilebildiği görülmüştür.

Tez çalışmasında tasarlanan ikinci denemede ise birinci denemeden farklı olarak enzim uygulama aşamasında pektolitik enzim aktivitesinin yanı sıra invertaz enzimi aktivitesinden de yararlanılarak keçiyoynuzu ekstraktında bulunan sakkarozun tamamı inversiyona uğratılmıştır. Bunun haricinde birinci denemeden farklı olarak CaO uygulaması ve kristalizasyon aşamaları bu denemeden tamamen çıkarılmıştır. Durultulan ekstrakt aynı şekilde etanol fermentasyonu ve evaporasyon işlemlerine tabi tutulup analiz edilmiştir. Elde edilen son ürünün D-pinitol içeriği birinci denemede olduğu gibi yine kontrol içeriğinin D-pinitol içeriği ile kıyaslanmıştır. Buna göre uygulanan tüm işlemler sonucunda keçiyoynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün (Ekstraksiyon sonrası: 8.11 g/L, 11.38 °Bx; Fermentasyon sonrası uygulanan evaporasyon sonrası: 10.91 g/L, 6.08 °Bx) 2.5 kat konsantre hale getirilebildiği görülmüştür. Her iki denemeden elde edilen

bulgular birbirleriyle kıyaslandığında ise işlem basamaklarında invertaz enzimi kullanılmasının son üründe bulunan D-pinitol içeriğinin biraz daha konsantre hale getirilmesinde etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Tez kapsamında yapılan işlemler sonucunda hedef bileşik olan D-pinitolün ekstraksiyonunda başlangıç ekstraktına göre sadece 2-2.5 katlık bir konsantrasyon artışı meydana gelmiş olması yeni bir deneme daha yapılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla tasarlanan üçüncü denemede ilk iki denemede kullanılan ancak amaca ulaşmada etkisiz olduğu düşünülen bazı işlemler çıkarılmış veya bu işlemlerin zenginleştirme aşamalarındaki yeri değiştirilmiştir. Ayrıca bu denemede kademeli ultrafiltrasyon ve etanolik solvent ekstraksiyonu da uygulanmış ve bu işlemlerin de etkisi incelenmiştir. Üçüncü denemede uygulanan işlemlerde önceki aşamalarda optimize edilen parametrelerin de kullanılmamasına karar verilmiştir. Bu aşamalardan sadece bazıları optimize edildikleri parametreler kullanılarak uygulanmıştır.

Üçüncü denemede sıcak durultma aşaması hiç uygulanmazken pektik maddelerde degradasyon meydana getirme ve sakkarozun inversiyona uğratılması için enzim uygulaması aşaması aynen tekrar edilmiştir. Daha sonra etanol fermentasyonuna tabi tutulan ekstrakt bu işlemde sonra içerdiği etanolün ekstraktan ayrıştırılması için evapore edilmiştir. Bu aşamadan sonra da kademeli ultrafiltrasyon işlemi uygulanmış (önce 30 kDa'luk membran, sonra da 5 kDa'luk membran kullanılmıştır) ve en son elde edilen ekstrakt da döner buharlaştırıcıda belli bir düzeye kadar konsantre edilip etanolik solvent ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Üçüncü denemenin etkinliğini belirleyebilmek için son ürün dondurarak kurutucuda kurutulmuştur. Elde edilen bulgulara göre araştırma haricinde tasarlanan bu deneme ile de keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün (Ekstraksiyon sonrası: 12.15 g/L, % 12.95 TKM; Liyofilizasyon sonrası: 315.18 g/L, % 97.56 TKM) başlangıç seviyesine göre 3.5 kat daha fazla konsantre hale getirilebildiği görülmüştür.

Tez dahilinde ve haricinde yapılan tüm denemeler karşılaştırıldığında keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün zenginleştirilmesi için en etkili olan aşamanın etanol fermentasyonu olduğu, fermentasyon öncesi invertaz enzimi uygulanmasının bu aşamanın etkinliğini artırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca etanolik solvent ekstraksiyonunun da ekstraktta D-pinitol haricinde bulunan diğer safsızlıkların ayrıştırılmasında oldukça etkili olduğu da görülmüştür. Bu denemelerin haricinde esasen membran filtrasyon tekniğinin D-pinitolün yüksek oranda zenginleştirilmesine önemli ölçüde katkı sağlayacağına inanıldığı için tez kapsamında yer almayan başka bir deneme daha tasarlanıp uygulanan en küçük membran ayırma sınırı olan 5 kDa'un altında bir membran ayırma sınırı olan 2 kDa da denenmiştir. Elde edilen sonuçlar ise membran filtrasyon sisteminin bu tezde amaçlanan hedefe ulaşılmasında etkili bir şekilde kullanılabilmesi için daha küçük membran gözenek çapları ile denenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Nitekim düşük molekül ağırlıklı D-pinitol molekülü 2 kDa'luk membran filtre kullanıldığında önemli ölçüde retentat kısmında konsantre olmuştur.

Tez kapsamında yapılan tüm denemelerin ışığında keçiboynuzu ekstraktında bulunan D-pinitolün başlangıç seviyesine göre 2-3.5 kat aralığında konsantre hale getirilebildiği görülmüştür. Çalışmadan elde edilen bulgular ışığında keçiboynuzu meyvesinden D-pinitol ekstraksiyonu üzerine zenginleştirilme aşamalarında özellikle

nanofiltrasyon sisteminin de yer aldığı yeni işlem kombinasyonlarının tasarlanıp denenmesi gerektiği görülmektedir. Bu sayede patent altına alınmış pahalı zenginleştirme/saflaştırma tekniklerine alternatif daha etkili bir tekniğin elde edilmesi mümkündür. Çalışmanın bu yönüyle daha sonraki çalışmalara da ışık tutacak nitelikte olduğu düşünülmektedir.

D-pinitolün keçiyoynuzu ekstraktlarında zenginleştirilmesi üzerine etkili olabilecek birçok uygulama bu tez çalışmasında optimize edilmiştir. Elde edilen ara ürünlerde ve son üründe ulaşılan D-pinitol konsantrasyonu saf D-pinitol konsantrasyonundan çok uzak gibi görünse de, tek kademeli bir proses için önemli düzeydedir. Nitekim birçok zenginleştirme ve saflaştırma prosesi, çok kademeli proses aşamalarından elde edilen ara ürünlerin daha önemli proses aşamalarına geri beslenmesi yoluyla konsantrasyon artışını sağlayan uygulamaları içermektedir. Bu tez çalışmasında da, belirli ara ürünlerin kısmen daha önceki aşamalara beslenmesi durumunda D-pinitol konsantrasyonunda ulaşılan yaklaşık 3.5 katlık bir artışın çok üzerine çıkılacağı düşünülmektedir. Ultrafiltrasyonda elde edilen permeatın fermentasyon aşamasına geri beslenmesi ve etanol ekstraksiyonunda elde edilen zengin içeriğin ultrafiltrasyon aşamasına yeni ürünle birlikte geri beslenmesi gibi uygulamaların kuşkusuz faydalı olacağı açıktır. Araştırma sonuçları bu yönüyle yeni çalışmaların gerekliliğini de ortaya koymaktadır.

6. KAYNAKLAR

- ABREU, P. and RELVA, A. 2002. Carbohydrates from *Detarium microcarpum* bark extract. *Carbohydrate research*, 337(18): 1663-1666.
- AGRAWAL, P. and RABINOWITZ, I. 1997. Method of purifying cyclitols. US Patent No. 5,626,847.
- AL-GHIZAWI, H.M.A. 1996. Utilization of carob powder as a substitute for cocoa powder in some food products. M.Sc. Thesis, University of Jordan, p.
- ALBIACH, R., CANET, R., POMARES, F. and INGELMO, F. 2001. Organic matter components, aggregate stability and biological activity in a horticultural soil fertilized with different rates of two sewage sludges during ten years. *Bioresource technology*, 77(2): 109-114.
- ALKORTA, I., GARBISU, C., LLAMA, M.J. and SERRA, J.L. 1998. Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 33(1): 21-28.
- ALPER, J. 2005. Nanotechnology aims to improve drug synthesis. *NCI Alliance for Nanotechnology in Cancer*, 1-3.
- ANONIM 2012. 2012 Yılı Orman Yangınlarını Değerlendirme Raporu. <http://web.ogm.gov.tr/diger/yanginhareket/Sunular/Forms/AllItems.aspx> (Erişim tarihi: 17 Mart 2014).
- ANONYMOUS, 2002. SAS Institute Inc., Version. 9.00, Cary, NC, USA.
- ANONYMOUS 2013a. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E> (Erişim tarihi: 19 Kasım 2013).
- ANONYMOUS 2013b. Non-native, Non-invasive and Fire Resistant Landscaping Plants for Around Homes. http://www.rcdsantacruz.org/modules/tabular_download_gallery/dlc.php?file=169 (Erişim tarihi: 11 June 2013).
- ANONYMOUS 2014a. Carobs, production quantity (tons) - for all countries. <http://www.factfish.com/statistic/carobs%2C%20production%20quantity/bar-chart> (Erişim tarihi: 16.02.14).
- ANONYMOUS 2014b. D-pinitol. http://amicogen.en.ec21.com/Pinitol--248450_248460.html (Erişim tarihi: 03.02.2014).
- ANONYMOUS 2014c. Enzymes in fruit juice production. <http://www.ncbe.reading.ac.uk/ncbe/protocols/inajam/pdf/jam01.pdf> (Erişim tarihi: 04.02.2014).

- ANONYMOUS 2014d. Euronutra D-pinitol, isolated from carob fruits. <http://www.euronutra.com/d-pinitol/> (Erişim tarihi: 03.02.2014).
- ARANDA, C., ROBLEDO, A., LOERA, O., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., RODRÍGUEZ, R. and AGUILAR, C.N. 2006. Fungal invertase expression in solid-state fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2): 229-233.
- ASADI, M. 2007. Beet-Sugar Handbook. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 866 p.
- AVALLONE, R., PLESSI, M., BARALDI, M. and MONZANI, A. 1997. Determination of chemical composition of carob (*Ceratonia siliqua*): Protein, fat, carbohydrates, and tannins. *Journal of food composition and analysis*, 10(2): 166-172.
- BAI, F., ANDERSON, W. and MOO-YOUNG, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology advances*, 26(1): 89-105.
- BAKER, R.W. 2000. Membrane separation. In: Encyclopedia of Separation Science, Academic Press, pp. 189-210, London, UK.
- BAKER, R.W. 2004. Membrane Technology and Applications. John Wiley & Sons Ltd, England, 538 p.
- BATES, S.H., JONES, R.B. and BAILEY, C.J. 2000. Insulin-like effect of pinitol. *British Journal of Pharmacology*, 130(8): 1944-1948.
- BATLLE, I. and TOUS, J. 1997. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. Carob tree: *Ceratonia siliqua* L. 17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 91 p.
- BAUMGARTNER, S., GENNER-RITZMANN, R., HAAS, J., AMADO, R. and NEUKOM, H. 1986. Isolation and identification of cyclitols in carob pods (*Ceratonia siliqua* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(5): 827-829.
- BAYINDIRLI, L., ŞAHİN, S. and ARTIK, N. 1994. The effects of clarification methods on pomegranate juice quality. *Flüssiges Obst*, 61(9): 267-270.
- BELCOURT, L.A. and LABUZA, T.P. 2007. Effect of raffinose on sucrose recrystallization and textural changes in soft cookies. *Journal of Food Science*, 72(1): C065-C071.
- BHANDARI, B.R. and HARTEL, R.W. 2002. Co-crystallization of sucrose at high concentration in the presence of glucose and fructose. *Journal of Food Science*, 67(5): 1797-1802.

- BINER, B., GUBBUK, H., KARHAN, M., AKSU, M. and PEKMEZCI, M. 2007. Sugar profiles of the pods of cultivated and wild types of carob bean (*Ceratonia siliqua* L.) in Turkey. *Food Chemistry*, 100(4): 1453-1455.
- BOHNERT, H.J., NELSON, D.E. and JENSEN, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *The plant cell*, 7(7): 1099.
- BORREGO, F., TARI, M., MANJON, A. and IBORRA, J.L. 1989. Properties of pectinesterase immobilized on glycochase-coated controlled-pore glass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 22(2): 129-140.
- BRAND, E. 1984. Carob. *Nutrition and Food Science*, 91(6): 22-24.
- BULUT, S., ELIBOL, M. and OZER, D. 2004. Effect of different carbon sources on L (+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1): 33-37.
- CAMERO, B.M. and MERINO, C.S. 2004. Method of obtaining pinitol from carob extracts. US Patent No. 6,699,511 B2.
- CARVALHEIRO, F., MONIZ, P., DUARTE, L.C., ESTEVES, M.P. and GÍRIO, F.M. 2011. Mannitol production by lactic acid bacteria grown in supplemented carob syrup. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(1): 221-227.
- CEMEROĞLU, B. 2007. Gıda Analizlerinde Genel Yöntemler. In: Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:34, pp. 535 ss, Ankara.
- CEMEROĞLU, B. and KARADENİZ, F. 2004. Meyve suyu üretim teknolojisi. In: Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi 1, Başkent Klişe Matbaacılık, pp. 355-396, Ankara.
- CHÁVEZ, F.P., RODRIGUEZ, L., DÍAZ, J.N., DELGADO, J.M. and CREMATA, J.A. 1997. Purification and characterization of an invertase from *Candida utilis*: comparison with natural and recombinant yeast invertases. *Journal of biotechnology*, 53(1): 67-74.
- CHERYAN, M. 1998. Membrane chemistry, structure and function. In: Ultrafiltration and Microfiltration Handbook, Technomic Publishing Company, Inc., pp. 31-69, Basel, Switzerland.
- CHIERA, J.M., STREETER, J.G. and FINER, J.J. 2006. Ononitol and pinitol production in transgenic soybean containing the *inositol methyl transferase* gene from *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Science*, 171(6): 647-654.
- CHOI, M.S., LEE, M.K., JUNG, U.J., KIM, H.J., DO, G.M., PARK, Y.B. and JEON, S.M. 2009. Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high fat and high cholesterol diet. *Molecular nutrition & food research*, 53(6): 751-759.

- CORREIA, P. and MARTINS-LOUÇÃO, M. 1997. Leaf nutrient variation in mature carob (*Ceratonia siliqua*) trees in response to irrigation and fertilization. *Tree physiology*, 17(12): 813-819.
- COSTAGLIOLI, P., MEILHOC, E., JANATOVA, I., KLEIN, R.D. and MASSON, J.M. 1997. Secretion of invertase from *Schwanniomyces occidentalis*. *Biotechnology letters*, 19(7): 623-627.
- COVIELLO, T., ALHAIQUE, F., DORIGO, A., MATRICARDI, P. and GRASSI, M. 2007. Two galactomannans and scleroglucan as matrices for drug delivery: Preparation and release studies. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 66(2): 200-209.
- CRAIG, W.J. and NGUYEN, T.T. 1984. Caffeine and theobromine levels in cocoa and carob products. *Journal of Food Science*, 49(1): 302-303.
- CRUZ, C., LIPS, S.H. and MARTINS-LOUCAO, M.A. 1993. Effect of root temperature on carob growth: Nitrate versus ammonium nutrition. *Journal of plant nutrition*, 16(8): 1517-1530.
- DAKIA, P.A., BLECKER, C., ROBERT, C., WATHELET, B. and PAQUOT, M. 2008. Composition and physicochemical properties of locust bean gum extracted from whole seeds by acid or water dehulling pre-treatment. *Food hydrocolloids*, 22(5): 807-818.
- DE NEVE, S. and HOFMAN, G. 2000. Influence of soil compaction on carbon and nitrogen mineralization of soil organic matter and crop residues. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6): 544-549.
- DECHOW, F.J. 1989. Separation and Purification Techniques in Biotechnology. Noyes Publications New Jersey, USA, pp. 498 p.
- DEMİRTAŞ, Ö. 2007. Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua*) çekirdeklerinden gam üretim yollarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 48 p.
- DEWANGAN, P., VERMA, A. and KESHARWANI, D. 2014. Isolation of D-Pinitol: A bioactive carbohydrate from the leaves of *Bauhinia variegata* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 24(1): 43-45.
- DIAZ, C.S. 1997. Syrup of natural carob sugars and a process for its production. U.S. Patent No. 5,624,500.
- DITTRICH, P. and BRANDL, A. 1987. Revision of the pathway of D-pinitol formation in leguminosae. *Phytochemistry*, 26(7): 1925-1926.

- DOBBS, A. and SMART, L. 2002. Separating and purifying the product. In: *The Molecular World: Separation, Purification and Identification*, Royal Society of Chemistry, pp. 124, Cambridge, UK.
- EKŞİ, A. 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. San Matbaası, Gıda Teknolojisi Dergisi Yayın No.9, Ankara, 127 p.
- EL-DENGAWY, E.-R.F., HUSSEIN, A.A. and ALAMRI, S.A. 2011. Improving growth and salinity tolerance of carob seedlings (*Ceratonia siliqua* L.) by *Azospirillum* inoculation. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 11: 371-384.
- FADEL, H.H., MAGEED, M.A.A., SAMAD, A.K.M.A. and LOTFY, S.N. 2006. Cocoa substitute: Evaluation of sensory qualities and flavour stability. *European Food Research and Technology*, 223(1): 125-131.
- FELLOWS, P.J. 2009. Separation and concentration of food components. In: *Food Processing Technology: Principles and Practice*, CRC Press, pp. 140-169, Washington DC.
- GAISFORD, S., HARDING, S., MITCHELL, J. and BRADLEY, T. 1986. A comparison between the hot and cold water soluble fractions of two locust bean gum samples. *Carbohydrate Polymers*, 6(6): 423-442.
- GEETHAN, P. and PRINCE, P. 2008. Antihyperlipidemic effect of D-pinitol on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 22(4): 220-224.
- GERALDO, D., CORREIA, P.J., FILIPE, J. and NUNES, L. 2014. Carob-tree as CO₂ sink in the carbon market. In: *Advances in Climate Changes, Global Warming, Biological Problems and Natural Hazards*, WSEAS Press, pp. 119-123, Fano, Portugal.
- GIDLEY, M.J. and GRAND REID, J.S. 2006. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. In: *Food Polysaccharides and Their Applications*, CRC Press, pp. 181-209, Boca Raton, USA.
- GÓMEZ-PLAZA, E., GIL-MUÑOZ, R., LÓPEZ-ROCA, J., DE LA HERA-ORTS, M. and MARTÍNEZ-CULTÍLLAS, A. 2000. Effect of the addition of bentonite and polyvinylpyrrolidone on the colour and long-term stability of red wines. *Journal of Wine Research*, 11(3): 223-231.
- GÓRECKI, R.J., FORDOŃSKI, G., HALMAJAN, H., HORBOWICZ, M., JONES, R.G. and LAHUTA, L.B. 2001. Seed physiology and biochemistry. In: *Carbohydrates in Grain Legume Seeds: Improving Nutritional Quality and Agronomic Characteristics*, CAB Publishing, pp. 117-143, Oxon, UK.

- GRADOS, N. and CRUZ, G. 1996. New approaches to industrialization of Algarrobo (*Prosopis pallida*) pods in Peru. In: *Prosopis. Semiarid Fuelwood and Forage Tree; Building Consensus for the Disenfranchised Center for Semi-Arid Forest Resources* Kingsville, pp. 325-342, Texas, USA.
- GRANDISON, A.S. 1996. Ion-exchange and electro dialysis. In: *Separation Processes in the Food and Biotechnology Industries: Principles and Applications*, Woodhead Publishing, pp. 155-177, Cambridge, England.
- GRAVES, T., NARENDRANATH, N.V., DAWSON, K. and POWER, R. 2006. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(6): 469-474.
- GREENWOOD, M., KREIDER, R., RASMUSSEN, C., ALMADA, A. and EARNEST, C. 2001. D-Pinitol augments whole body creatine retention in man. *Journal of Exercise Physiology Online*, 4(4): 41-47.
- GRIFFIN, J.J., RANNEY, T.G. and PHARR, D.M. 2004. Heat and drought influence photosynthesis, water relations, and soluble carbohydrates of two ecotypes of redbud (*Cercis canadensis*). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(4): 497-502.
- GULLO, M. and SALLEO, S. 1988. Different strategies of drought resistance in three Mediterranean sclerophyllous trees growing in the same environmental conditions. *New Phytologist*, 108(3): 267-276.
- GÜNAL, N. 1998. Keçiboynuzu (*Ceratonia Siliqua* L.) nun Türkiye'deki coğrafi dağılışı, ekolojik ve floristik özellikleri. *Marmara Coğrafya Dergisi*, (2): 60-74.
- HAMMOND, D. 2005a. AOAC Official Method 920.151 Solids (Total) in Fruits and Fruit Products. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, pp. Maryland, USA.
- HAMMOND, D. 2005b. AOAC Official Method 940.26 Ash of Fruits and Fruit Products. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, AOAC International, pp. Maryland, USA.
- HARPER, R.G.P.M. and HOSTRUP, M. 2000. Solvent based separation. In: *Encyclopedia of Separation Science*, Academic Press, pp. 1424-1434, London, UK.
- HARTEL, R.W. 2001. *Crystallization in Foods*. Aspen Publication, Maryland, USA, 336 p.
- HASSAN, A.M. and PRICE, K. 2014. Common fundamentals and unit operations in desalination systems: Microfiltration and ultrafiltration.

- <http://www.desware.net/Desware-SampleAllChapter.aspx> (Erişim tarihi: 11.02.2014).
- KARABULUT, A., CANBOLAT, O. and KAMALAK, A. 2006. Evaluation of carob, *Ceratonia siliqua* pods as a feed for sheep. *Livestock Research for Rural Develop*, 18(7).
- KARHAN, M., GÜBBÜK, H., TURHAN, İ., TETİK, N., ÖZİYCI, H.R., AKGÜL, H. and UÇGUN, K. 2010. Türkiye’de yetişen keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) tiplerinin biyoaktif bir molekül olan D-pinitol içeriği üzerine çevre koşulları ve bileşim unsurlarının etkisi. TÜBİTAK COST FA0602 (Proje No. 107O650), 54 ss.
- KARKACIER, M. and ARTIK, N. 1995. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) fiziksel özellikleri, kimyasal bileşimi ve ekstraksiyon koşulları. *Gıda*, 20(3): 131-136.
- KARKACIER, M., ARTIK, N. and CERTEL, M. 1995. The conditions for carob (*Ceratonia siliqua* L.) extraction and the clarification of the extract. *Fruit Processing*, 5(12): 394-397.
- KASHYAP, D., VOHRA, P., CHOPRA, S. and TEWARI, R. 2001. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource technology*, 77(3): 215-227.
- KAWAMURA, Y. 2008. Carob bean gum. Chemical and Technical Assessment (CTA), 69th JECFA, 1-6, http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/69/Carob_bean_gum.pdf (Erişim Tarihi: 22 Kasım 2013).
- KELLER, G.E., ANDERSON, R.A. and YON, C.M. 1987. Adsorption. In: Handbook of Separation Process Technology, Wiley-Interscience, pp. 644-691.
- KENNINGTON, A., LARNER, J., HILL, C., STRINGFIELD, B., CARTA, G. and KIRWAN, D.J. 1992. Method for producing *chiro*-inositol. US Patent No. 5,091,596.
- KHLIFA, M., BAHLOUL, A. and KITANE, S. 2013. Determination of chemical composition of carob pod (*Ceratonia siliqua* L.) and its morphological study. *Journal of Materials and Environmental Science*, 4(3): 348-353.
- KIM, J.-I., KIM, J., KANG, M.-J., LEE, M.-S., KIM, J.-J. and CHA, I.-J. 2004. Effects of pinitol isolated from soybeans on glycaemic control and cardiovascular risk factors in Korean patients with type II diabetes mellitus: a randomized controlled study. *European journal of clinical nutrition*, 59(3): 456-458.
- KOTROTSIOS, N., CHRISTAKI, E., BONOS, E. and FLOROU-PANERI, P. 2012. Dietary Carob Pods on Growth Performance and Meat Quality of Fattening Pigs. *ASIAN-AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, 25(6): 880-885.

- KOYUNCU, H., KUL, A.R., ÇALIMLI, A., YILDIZ, N. and CEYLAN, H. 2007. Adsorption of dark compounds with bentonites in apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 40(3): 489-497.
- KROP, J. and PILNIK, W. 1974. Effect of pectic acid and bivalent cations on cloud loss of citrus juice. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 7: 62-63.
- KULP, K. 1975. Carbohydrases. In: *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, pp. 53-122, New York, USA.
- KUMAZAWA, S., TANIGUCHI, M., SUZUKI, Y., SHIMURA, M., KWON, M.-S. and NAKAYAMA, T. 2001. Antioxidant activity of polyphenols in carob pods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(2): 373-377.
- LAOS, A.K., KIRS, B.E., KIKKAS, C.A. and PAALME, D.T. 2007. Crystallization of the supersaturated sucrose solutions in the presence of fructose, glucose and corn syrup. Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), 16-20 September, Copenhagen.
- LAZARIDOU, A., BILIADERIS, C.G. and IZYDORCZYK, M.S. 2001. Structural characteristics and rheological properties of locust bean galactomannans: a comparison of samples from different carob tree populations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(1): 68-75.
- LEY, S.V., STERNFELD, F. and TAYLOR, S. 1987. Microbial oxidation in synthesis: A six step preparation of (+)-pinitol from benzene. *Tetrahedron Letters*, 28(2): 225-226.
- LIMA-COSTA, M.E., TAVARES, C., RAPOSO, S., RODRIGUES, B. and PEINADO, J.M. 2012. Kinetics of sugars consumption and ethanol inhibition in carob pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultures. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(5): 789-797.
- LIN, T.-H., TAN, T.-W., TSAI, T.-H., CHEN, C.-C., HSIEH, T.-F., LEE, S.-S., LIU, H.-H., CHEN, W.-C. and TANG, C.-H. 2013. D-pinitol inhibits prostate cancer metastasis through inhibition of $\alpha V\beta 3$ integrin by modulating FAK, c-*Src* and NF- κB pathways. *International journal of molecular sciences*, 14(5): 9790-9802.
- LIN, X., MA, L., GOPALAN, C. and OSTLUND, R.E. 2009. D-chiro-Inositol is absorbed but not synthesised in rodents. *British Journal of Nutrition*, 102(10): 1426-1434.
- LIN, Y. and TANAKA, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(6): 627-642.

- MAJUMDER, A.L., CHATTERJEE, A., GHOSH DASTIDAR, K. and MAJEE, M. 2003. Diversification and evolution of L- myo-inositol 1-phosphate synthase. *FEBS Letters*, 553(1): 3-10.
- MATHUR, N.K. 2011. Locust bean gum or carob gum. In: Industrial Galactomannan Polysaccharides, CRC Press, pp. 93-114, Boca Raton, USA.
- MAZAHERI, D., SHOJAOSADATI, S.A., MOUSAVI, S.M., HEJAZI, P. and SAHARKHIZ, S. 2012. Bioethanol production from carob pods by solid-state fermentation with *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy*, 99: 372-378.
- MULLIN, J.W. 2001. Crystallization. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, 610 p.
- NAGHMOUCHI, S., KHOUJA, M., ROMERO, A., TOUS, J. and BOUSSAID, M. 2009. Tunisian carob (*Ceratonia siliqua* L.) populations: Morphological variability of pods and kernel. *Scientia Horticulturae*, 121(2): 125-130.
- NUNES, M.A., RAMALHO, C., DOMINGOS, J. and SILVA RIJO, P.D. 1992. Seasonal changes in some photosynthetic properties of *Ceratonia siliqua* (carob tree) leaves under natural conditions. *Physiologia Plantarum*, 86(3): 381-387.
- OSTLUND, R.E. and SHERMAN, W.R. 1998. Pinitol and derivatives thereof for the treatment of metabolic disorders. US Patent No. 5,827,896.
- OSZMIAŃSKI, J. and WOJDYŁO, A. 2007. Effects of various clarification treatments on phenolic compounds and color of apple juice. *European Food Research and Technology*, 224(6): 755-762.
- OZİYCI, H.R., TETİK, N., TURHAN, I., YATMAZ, E., UCGUN, K., AKGUL, H., GUBBUK, H. and KARHAN, M. 2014. Mineral composition of pods and seeds of wild and grafted carob (*Ceratonia siliqua* L.) fruits. *Scientia Horticulturae*, 167(0): 149-152.
- ÖZCAN, M.M., ARSLAN, D. and GÖKÇALIK, H. 2007. Some compositional properties and mineral contents of carob (*Ceratonia siliqua*) fruit, flour and syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 58(8): 652-658.
- PAPAGIANNPOULOS, M., WOLLSEIFEN, H.R., MELLENTHIN, A., HABER, B. and GALENSA, R. 2004. Identification and quantification of polyphenols in carob fruits (*Ceratonia siliqua* L.) and derived products by HPLC-UV-ESI/MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12): 3784-3791.
- PARK, J., LEE, Y., KIM, J., SHIN, Y. and KIM, J. 2004. The Effect of Pinitol on Cataractogenesis in Streptozotocin Induced Diabetic Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(5): E-Abstract: 1705.

- PARRADO, J., BAUTISTA, J., ROMERO, E., GARCÍA-MARTÍNEZ, A., FRIAZA, V. and TEJADA, M. 2008. Production of a carob enzymatic extract: Potential use as a biofertilizer. *Bioresource technology*, 99(7): 2312-2318.
- PAUL, M. and COCKBURN, W. 1989. Pinitol, a compatible solute in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Journal of experimental botany*, 40(10): 1093-1098.
- PETIT, M.D. and PINILLA, J.M. 1995. Production and purification of a sugar syrup from carob pods. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1): 145-152.
- PHILLIPS, D.V., DOUGHERTY, D.E. and SMITH, A.E. 1982. Cyclitols in soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3): 456-458.
- PILNIK, W. and VORAGEN, A.G.J. 1993. Pectic Enzymes in Fruit Juice and Vegetable Juice Manufacture. In: *Food Science and Technology, Enzymes in Food Engineering*, Academic Press, pp. 363-399, New York.
- POONGOTHAI, G. and SRIPATHI, S.K. 2013. A review on insulinomimetic pinitol from plants *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): 992-1009.
- PRAJAPATI, V.D., JANI, G.K., MORADIYA, N.G., RANDEIRA, N.P. and NAGAR, B.J. 2013. Locust bean gum: A versatile biopolymer. *Carbohydrate Polymers*, 94(2): 814-821.
- PRINSEN GEERLINGS, H.C. 1924. *Cane Sugar and Its Manufacture* Gardens Point, Norman Rodger 2st. Dunstanv Hill E.C. 3, London, 384 p.
- PRIOLO, A., LANZA, M., BIONDI, L., PAPPALARDO, P. and YOUNG, O. 1998. Effect of partially replacing dietary barley with 20% carob pulp on post-weaning growth, and carcass and meat characteristics of Comisana lambs. *Meat science*, 50(3): 355-363.
- RACHIE, K.O. 1979. *Tropical legumes: Resources for the future*. National Academy of Sciences, USA, 331 p.
- RATHINASABAPATHI, B. 2000. Metabolic engineering for stress tolerance: installing osmoprotectant synthesis pathways. *Annals of Botany*, 86(4): 709-716.
- RILEY, D.A., CHAMBERLIN, S.A. and BHATIA, A.V. 1995. Method for the preparation of D-chiro-inositol. US Patent No. 5,463,142.
- ROMBOUTS, F.M. and PILNIK, W. 1980. Pectic enzymes. In: *Microbial Enzymes and Bioconversions*, Academic Press, pp. 227-282, London, UK.
- ROMERO-GOMEZ, S., AUGUR, C. and VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. 2000. Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology letters*, 22(15): 1255-1258.

- ROUKAS, T. 1993. Ethanol production from carob pods by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Biotechnology*, 7(2): 159-176.
- ROUKAS, T. 1994a. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 59(4): 387-393.
- ROUKAS, T. 1994b. Solid-state fermentation of carob pods for ethanol production. *Applied microbiology and biotechnology*, 41(3): 296-301.
- ROUKAS, T. 1998. Citric acid production from carob pod extract by cell recycle of *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Food Biotechnology*, 12(1-2): 91-104.
- ROUKAS, T. 1999. Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation. *Enzyme and microbial technology*, 24(1): 54-59.
- ROUKAS, T. and BILIADERIS, C.G. 1995. Evaluation of carob pod as a substrate for pullulan production by *Aureobasidium pullulans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 55(1): 27-44.
- ROUSSEAU, R.W. 1987. Handbook of Separation Process Technology. Wiley-Interscience, 1024 p.
- RUBIO, M.A.C., RUNCO, R. and NAVARRO, A.R. 2002. Invertase from a strain of *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry*, 61(6): 605-609.
- RUSSELL, I. 2003. understanding yeast fundamentals. In: The Alcohol Textbook: A Reference for the Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Industries, Nottingham University Press, pp. 85-119, Nottingham, UK.
- SAHARKHIZ, S., MAZAHERI, D. and SHOJAOSADATI, S.A. 2013. Evaluation of bioethanol production from carob pods by *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* in solid submerged fermentation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(5): 415-430.
- SAHLE, M., COLEOU, J. and HAAS, C. 1992. Carob pod (*Ceratonia siliqua*) meal in geese diets. *British poultry science*, 33(3): 531-541.
- SAKAI, T., SAKAMOTO, T., HALLAERT, J. and VANDAMME, E.J. 1993. Pectin, pectinase and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in applied microbiology*, 39: 213-294.
- SALEM, E. and FAHAD, A. 2012. Substituting of cocoa by carob pod powder in milk chocolate manufacturing. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(3): 572-578.

- SÁNCHEZ-SEGADO, S., DE JUAN GARCÍA, D., LOZANO, L.J., GODÍNEZ, C., DE LOS RÍOS, A.P. and HERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, F.J. 2010. Fuel ethanol production from carob pod. *Chemical Engineering Transactions*, 21: 1255-1260.
- SASKA, M. and DIACK, M. 1996. Separation of inositols from sugars and sugar alcohols. US Patent No. 5,482,631.
- SCHWARTZ, A.M. and MYERSON, A.S. 2002. Solutions and solution properties. In: Handbook of Industrial crystallization, Butterworth-Heinemann, pp. 1-28, USA.
- SENGUPTA, S., PATRA, B., RAY, S. and MAJUMDER, A.L. 2008. Inositol methyl tranferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb.(*Tateoka*): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, 31(10): 1442-1459.
- SHIN, Y.-C., JEON, Y.-J., KIM, J.-J. and CHOI, C.-M. 2003. Method of recovering pinitol or chiro-inositol in high yield from soy fractions. US Patent No. 2003/0186401 A1.
- SIVAKUMAR, S., PALSAMY, P. and SUBRAMANIAN, S.P. 2010. Impact of D-pinitol on the attenuation of proinflammatory cytokines, hyperglycemia-mediated oxidative stress and protection of kidney tissue ultrastructure in streptozotocin-induced diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions*, 188(1): 237-245.
- STREAT, M. and CLOETE, F.L.D. 1987. Ion-exchange. In: Handbook of Separation Process Technology, Wiley-Interscience, pp. 697-732.
- STREETER, J., LOHNES, D. and FIORITTO, R. 2001. Patterns of pinitol accumulation in soybean plants and relationships to drought tolerance. *Plant, Cell & Environment*, 24(4): 429-438.
- STREETER, J.G. 2001. Simple partial purification of D-pinitol from soybean leaves. *Crop science*, 41(6): 1985-1987.
- SUN, W.Q., LI, X.P. and ONG, B.L. 1999. Preferential accumulation of D-pinitol in *Acrostichum aureum* gametophytes in response to salt stress. *Physiologia Plantarum*, 105(1): 51-57.
- SUTHERLAND, K. 2008. Filters and Filtration Handbook. Elsevier, Oxford, UK, 536 p.
- TAKESHIGE, K. and OUCHI, K. 1995. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of fermentation and bioengineering*, 79(5): 449-452.
- TAŞLIGİL, N. 2011. Keçiboynuzunun (*Ceratonia siliqua* L.) coğrafi yayılışı ve ekonomik özellikleri *ODÜ Sosyal Bilimler Enstitüsü, Sosyal Bilimler Araştırmaları Dergisi*, 2(3): 252-265.
- TEJADA, M. and GONZALEZ, J. 2003. Application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *Agrochimica*, 47(3-4): 94-102.

- TETİK, N., TURHAN, I., OZİYCI, H.R., GUBBUK, H., KARHAN, M. and ERCİSLİ, S. 2011a. Physical and chemical characterization of *Ceratonia siliqua* L. germplasm in Turkey. *Scientia Horticulturae*, 129(4): 583-589.
- TETİK, N., TURHAN, I., OZİYCI, H.R. and KARHAN, M. 2011b. Determination of D-pinitol in carob syrup. *Int J Food Sci Nutr*, 62(6): 572-576.
- TURHAN, I. 2009a. Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyon yoluyla etanol ve laktik asit üretimi. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 200 p.
- TURHAN, I. 2009b. Keçiboynuzu meyvesinden fermentasyon yoluyla etanol ve laktik asit üretimi. Akdeniz Üniversitesi 200 s.
- TURHAN, I. 2014. Relationship Between Sugar Profile and D-Pinitol Content of Pods of Wild and Cultivated Types of Carob Bean (*Ceratonia siliqua* L.). *International Journal of Food Properties*, 17(2): 363-370.
- TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMİRÇİ, A. and KARHAN, M. 2010a. Enhanced lactic acid production from carob extract by *Lactobacillus casei* using Invertase pretreatment. *Food Biotechnology*, 24(4): 364-374.
- TURHAN, I., BIALKA, K.L., DEMİRÇİ, A. and KARHAN, M. 2010b. Ethanol production from carob extract by using *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource technology*, 101(14): 5290-5296.
- VAHEED, H., SHOJAOSADATI, S.A. and GALIP, H. 2011. Evaluation and optimization of ethanol production from carob pod extract by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(1): 101-111.
- VAN DER POEL, P.W., SCHIWECK, H. and SCHWARTZ, T. 1998. Sugar Technology Beet and Cane Sugar Manufacture Verlag Dr. Bartens KG, Berlin, 1005 p.
- VENESH KUMAR, R., VIJAYAKUMAR, R., JAGANNATHAN, S., SRINIVASAN, P., ASSALAM KHAN, K. and SUGANYA, K. 2011. Comparative analysis of the invertase activity by *Saccharomyces cerevisiae* isolated from cane juice with standard industrial strain. *Annals Food Science and Technology*, 12(2): 174-178.
- VERNON, D.M. and BOHNERT, H.J. 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The EMBO journal*, 11(6): 2077.
- WALSTRA, P. 2003. Physical Chemistry of Foods. Marcel Dekker Publishing, USA, 783 p.
- WHITAKER, J.R. 1990. New and future uses of enzymes in food processing. *Food Biotechnology*, 4(2): 669-697.

- WINER, N. 1980. The potential of the carob (*Ceratonia siliqua*). *International Tree Crops Journal*, 1(1): 15-26.
- YÁÑEZ, R., MARQUES, S., GÍRIO, F. and ROSEIRO, J. 2007. Lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* using carob pulp. The 29th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 29 April-2 May, Denver, Colorado, USA.
- YATMAZ, E., TURHAN, I. and KARHAN, M. 2013. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. *Bioresource technology*, 135(0): 365-371.
- YOSHIDA, K.-I., YAMAGUCHI, M., MORINAGA, T., IKEUCHI, M., KINEHARA, M. and ASHIDA, H. 2006. Genetic modification of *Bacillus subtilis* for production of D-*chiro*-inositol, an investigational drug candidate for treatment of type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome. *Applied and environmental microbiology*, 72(2): 1310-1315.
- YOUSIF, A.K. and ALGHZAWI, H. 2000. Processing and characterization of carob powder. *Food Chemistry*, 69(3): 283-287.
- YOUSSEF, A.S., EL NAGGAR, M., EL ASSAR, S. and BELTAGY, E.A. 2006. Optimisation of cultural conditions for β -mannanase production by a local *Aspergillus niger* isolate. *International Journal of Agriculture and Biology*, 8: 539-545.
- YOUSSEF, M.K.E., EL-MANFALOTY, M.M. and ALI, H.M. 2013. Assessment of proximate chemical composition, nutritional status, fatty acid composition and phenolic compounds of carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Food and Public Health*, 3(6): 304-308.
- ZOGRAFAKIS, N. and DASENAKIS, D. 2000. Biomass in Mediterranean: "Studies on the exploitation of carob for bioethanol production". Commission of the European Communities, Directorate General for Energy and Transport, Regional Energy Agency, Project No.238, Region of Crete.

7. EKLER

EK- 1. Dünyada keçiboyunzunun yetiştiği yerlere ait sıcaklık (°C) ve yağış (mm) göstergeleri

| Aylar | İtalya (Palermo) | İspanya (Malaga) | Tunus (Sfaks) | Malta | A.B.D. (St. Diego) | Şili (Santiago) | Avustralya (Perth) | Hırvatistan (Split) | Türkiye (Antalya) |
|---------------------------|---------------------|---------------------|------------------|-------|-----------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| Ocak | 15.1 | 16.7 | 15.7 | 15.4 | 18.2 | 29.6 | 30.6 | 10.4 | 15.3 |
| Şubat | 15.3 | 17.7 | 16.7 | 15.5 | 18.2 | 29.1 | 30.8 | 11.3 | 15.9 |
| Mart | 16.9 | 19.5 | 19.0 | 17.0 | 18.6 | 27.1 | 29.1 | 14.2 | 18.6 |
| Nisan | 19.1 | 21.3 | 21.7 | 19.5 | 19.7 | 22.7 | 25.0 | 18.4 | 21.7 |
| Mayıs | 23.0 | 24.3 | 25.9 | 23.7 | 20.2 | 18.2 | 21.4 | 24.1 | 27.0 |
| Haziran | 26.7 | 27.9 | 30.3 | 28.2 | 21.5 | 15.4 | 18.6 | 28.6 | 32.4 |
| Temmuz | 29.6 | 30.3 | 33.3 | 31.0 | 23.5 | 14.7 | 17.7 | 31.2 | 35.4 |
| Ağustos | 30.1 | 30.9 | 33.9 | 31.4 | 24.4 | 16.4 | 18.0 | 30.4 | 34.5 |
| Eylül | 24.4 | 27.9 | 30.3 | 28.2 | 24.0 | 18.5 | 19.6 | 24.8 | 31.3 |
| Ekim | 24.1 | 23.7 | 26.6 | 24.8 | 22.6 | 22.3 | 21.7 | 20.4 | 27.0 |
| Kasım | 19.8 | 19.9 | 20.9 | 20.9 | 20.6 | 25.8 | 25.4 | 15.2 | 21.6 |
| Aralık | 16.4 | 17.3 | 17.0 | 16.9 | 18.3 | 28.1 | 28.0 | 11.7 | 16.9 |
| Yıllık Ort. Sıcaklık (°C) | 22.0 | 23.1 | 24.3 | 22.7 | 20.8 | 22.3 | 23.8 | 20.1 | 24.8 |
| Yıllık Ort. Yağış (mm) | 588.3 | 471.1 | 210.2 | 595.2 | 147.2 | 269.5 | - | 685.0 | 1103.2 |

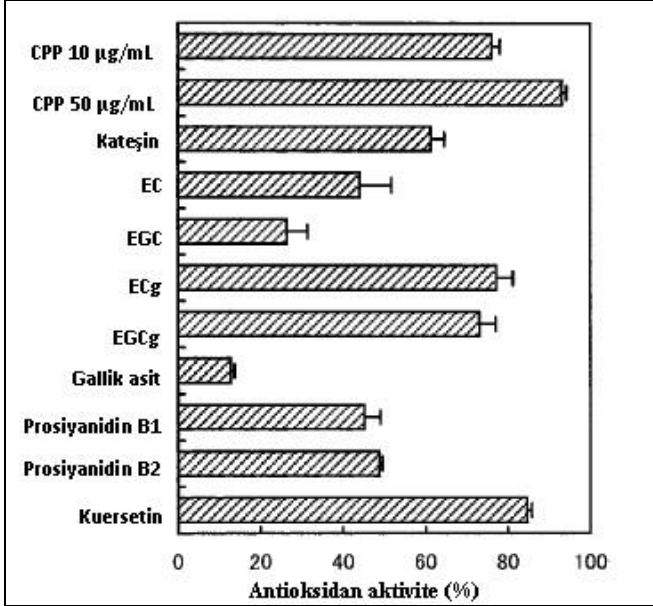
KAYNAK: (TAŞLIGİL 2011)

EK- 2. Keçiboynuzu meyve eti, gamı ve şurubunda HPLC-UV-ESI/MS metodu ile tanımlanan ve miktarları belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg)

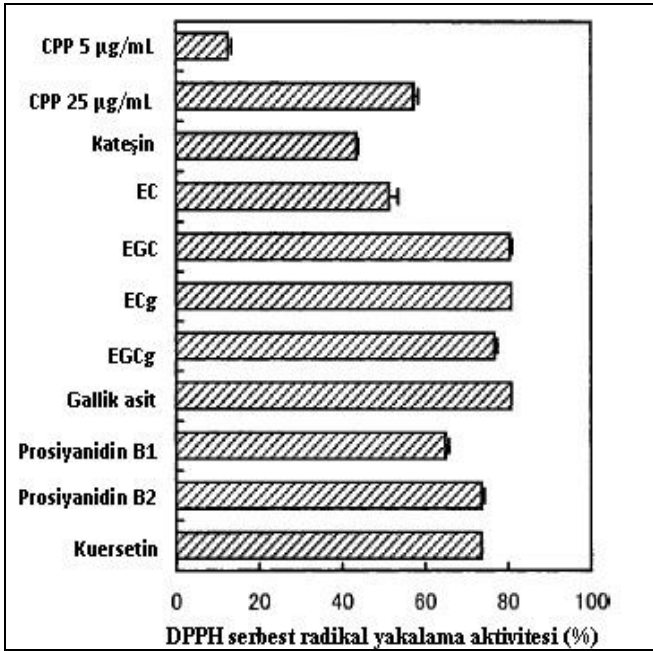
| Bileşik | Meyve eti | Keçiboynuzu gamı | Şurup |
|---------------------------------|-----------|------------------|--------|
| Gallik asit | 174.1 | * | 1012.6 |
| Kateşin | 14.8 | 23.8 | 9.0 |
| Kafeik asit | * | * | 2.5 |
| Kumarik asit | * | * | 9.9 |
| Ferulik asit | * | * | 14.6 |
| Mirisetin-hekzosid | 22.3 | * | * |
| Kaempferol-dihekzosid | * | 7.0 | * |
| Mirisetin-desoksihekzosid | 148.8 | * | 11.2 |
| Kuersetin-hekzosid | 24.6 | 4.8 | * |
| Kuersetin-desoksihekzosid | ** | 44.7 | 0.9 |
| Kuersetin-desoksihekzosid+su | 24.0 | * | * |
| Kuersetin | 4.7 | * | * |
| Kaempferol türevi | * | 1.9 | * |
| Kaempferol-desoksihekzosid | 8.6 | 1.2 | * |
| Heksoz+3 gallik asit ünitesi+su | 26.3 | * | * |
| Sinamik asit | * | * | 24.2 |
| Toplam miktar | 448.2 | 83.4 | 1084.9 |

KAYNAK: Papagiannopoulos vd (2004)'nin makalesinden uyarlanmıştır, *: Algılanmadı, **: Miktarı belirlenmedi.

EK- 3. Keçiboynuzundan elde edilen ham polifenolik fraksiyonun antioksidan aktivitesinin diğer polifenolik bileşenlerin antioksidan aktiviteleri β -karoten-linoleik asit ve DPPH sistemlerinde kıyaslanması

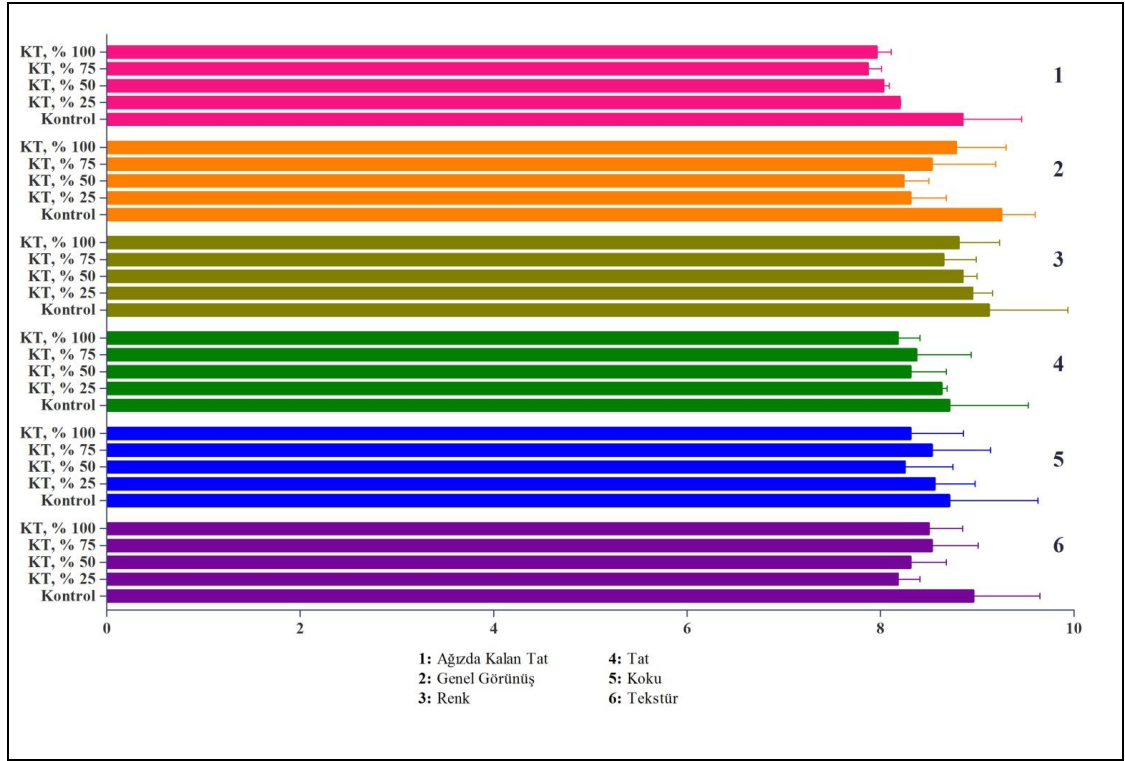


Şekil 7.1. Keçiboynuzundan elde edilen ham polifenolik fraksiyonu ve diğer polifenolik bileşenlerin β -karoten-linoleik asit sistemindeki antioksidan aktivitesi (Kumazawa vd 2001)



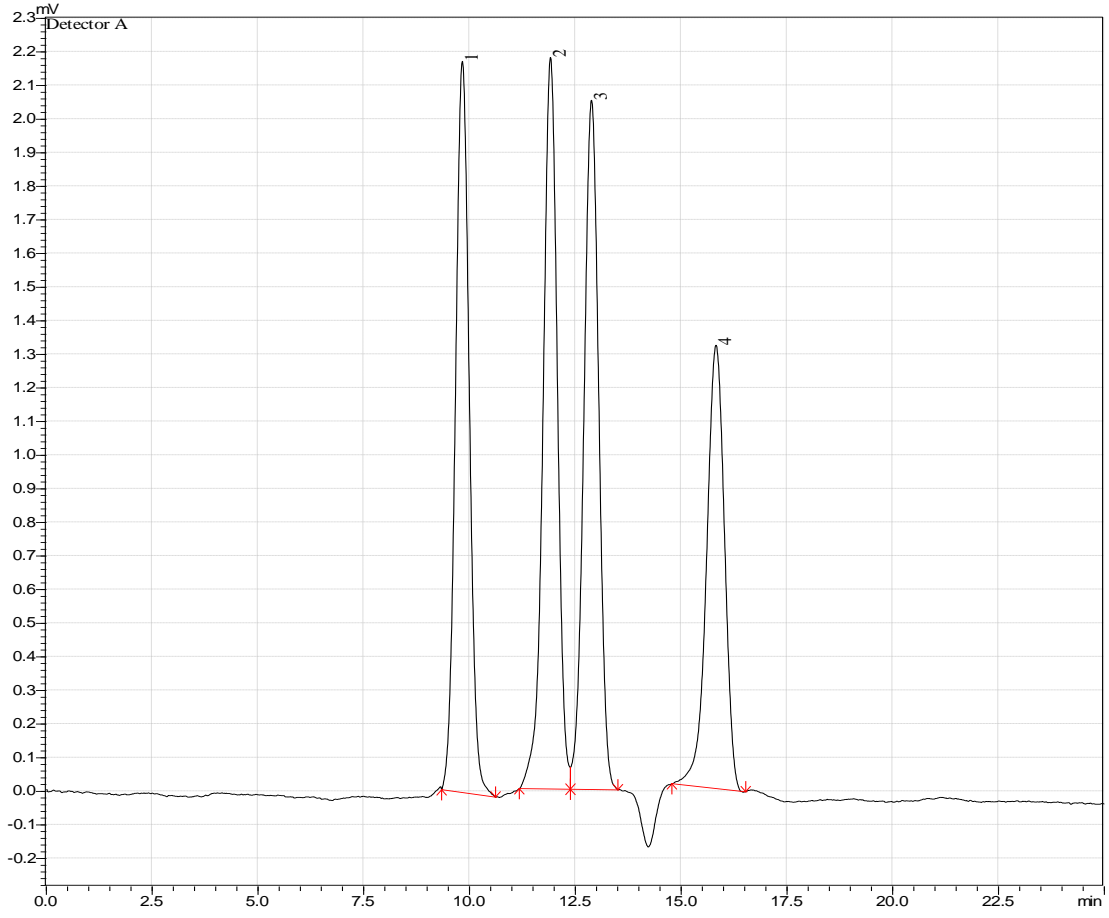
Şekil 7.2. Keçiboynuzundan elde edilen ham polifenolik fraksiyonu ve diğer polifenolik bileşenlerin DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi (Kumazawa vd 2001)

EK- 4. Kakaolu sütlü çikolata ve farklı oranlarda keçiyoynuzu tozu ile karıştırılarak hazırlanan sütlü çikolataların duyu özelliklerinin karşılaştırılması*



KAYNAK: Salem ve Fahad (2012)'in makalesinden uyarlanmıştır, * KT: Keçiyoynuzu tozu.

EK- 5. Keçiboynuzunda bulunan hâkim şekerlerin ve D-pinitolün standartlarına ait HPLC kromatogramı (1: Sakkaroz, 2: Glukoz, 3: D-pinitol, 4: Fruktoz)



EK- 6. Ultrafiltre edilen örneklerin Box-Behnken CYM ile elde edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri

Çizelge 7.1. Ultrafiltre edilen örneklerin sakkaroz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri

| Terim | Katsayılar | SH Kat. | T | P |
|--------------|------------|---------|--------|---------|
| Sabit | 32.5467 | 2.51690 | 12.931 | 0.000** |
| Membran (M) | -0.2760 | 0.07071 | -3.904 | 0.011* |
| pH (P) | 0.8107 | 0.69760 | 1.162 | 0.298 |
| Sıcaklık (S) | 0.0933 | 0.05788 | 1.612 | 0.168 |
| M*M | 0.0063 | 0.00090 | 7.018 | 0.001** |
| P*P | 0.0147 | 0.05784 | 0.255 | 0.809 |
| S*S | -0.0026 | 0.00071 | -3.700 | 0.014* |
| M*P | -0.0134 | 0.00695 | -1.934 | 0.111 |
| M*S | 0.0008 | 0.00077 | 1.019 | 0.355 |
| P*S | 0.0008 | 0.00617 | 0.137 | 0.896 |

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|----|---------|---------|---------|-------|---------|
| Regresyon | 9 | 63.4125 | 63.4125 | 7.0458 | 14.60 | 0.004** |
| Lineer | 3 | 28.6066 | 11.2330 | 3.7443 | 7.76 | 0.025* |
| İkinci derece | 3 | 32.4911 | 32.4911 | 10.8304 | 22.45 | 0.002** |
| Etkileşim | 3 | 2.3148 | 2.3148 | 0.7716 | 1.60 | 0.301 |
| Artık hata | 5 | 2.4123 | 2.4123 | 0.4825 | | |
| Uyum eksikliği | 3 | 2.1642 | 2.1642 | 0.7214 | 5.82 | 0.150 |
| Saf hata | 2 | 0.2480 | 0.2480 | 0.1240 | | |
| Toplam | 14 | 65.8248 | | | | |

SH Kat.: Standart hata katsayısı, SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

*: Önemli (P=0.05) **: Önemli (P=0.01)

Çizelge 7.2. Ultrafiltre edilen örneklerin glukoz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri

| Terim | Katsayılar | SH Kat. | T | P |
|--------------|------------|---------|--------|---------|
| Sabit | 18.1959 | 2.41815 | 7.525 | 0.001** |
| Membran (M) | -0.1709 | 0.06794 | -2.515 | 0.054 |
| pH (P) | 3.4072 | 0.67023 | 5.084 | 0.004** |
| Sıcaklık (S) | 0.1971 | 0.05561 | 3.545 | 0.016* |
| M*M | 0.0038 | 0.00087 | 4.359 | 0.007** |
| P*P | -0.2499 | 0.05557 | -4.497 | 0.006** |
| S*S | -0.0027 | 0.00069 | -3.923 | 0.011* |
| M*P | -0.0080 | 0.00667 | -1.199 | 0.284 |
| M*S | 0.0005 | 0.00074 | 0.696 | 0.517 |
| P*S | -0.0091 | 0.00593 | -1.529 | 0.187 |

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|----|---------|---------|---------|-------|---------|
| Regresyon | 9 | 32.2581 | 32.2581 | 3.5842 | 8.50 | 0.017* |
| Lineer | 3 | 4.5459 | 21.8933 | 7.2978 | 16.39 | 0.005** |
| İkinci derece | 3 | 25.8156 | 25.8156 | 8.6052 | 19.32 | 0.004** |
| Etkileşim | 3 | 1.8966 | 1.8966 | 0.6322 | 1.42 | 0.341 |
| Artık hata | 5 | 2.2267 | 2.2267 | 0.4453 | | |
| Uyum eksikliği | 3 | 2.0094 | 2.0094 | 0.6698 | 6.17 | 0.143 |
| Saf hata | 2 | 0.2173 | 0.2173 | 0.1086 | | |
| Toplam | 14 | 34.4848 | | | | |

SH Kat.: Standart hata katsayısı, SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

*: Önemli (P=0.05) **: Önemli (P=0.01)

Çizelge 7.3. Ultrafiltre edilen örneklerin D-pinitol içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri

| Terim | Katsayılar | SH Kat. | T | P |
|--------------|------------|---------|--------|-------|
| Sabit | 5.70010 | 0.72469 | 7.866 | 0.001 |
| Membran (M) | -0.06425 | 0.02036 | -3.155 | 0.025 |
| pH (P) | 0.76334 | 0.20086 | 3.800 | 0.013 |
| Sıcaklık (S) | 0.04148 | 0.01667 | 2.489 | 0.055 |
| M*M | 0.00134 | 0.00026 | 5.162 | 0.004 |
| P*P | -0.05512 | 0.01665 | -3.310 | 0.021 |
| S*S | -0.00064 | 0.00021 | -3.113 | 0.026 |
| M*P | -0.00196 | 0.00200 | -0.979 | 0.373 |
| M*S | 0.00003 | 0.00022 | 0.137 | 0.896 |
| P*S | -0.00126 | 0.00178 | -0.709 | 0.510 |

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|----|---------|---------|---------|-------|---------|
| Regresyon | 9 | 2.43826 | 2.43826 | 0.27092 | 6.77 | 0.024* |
| Lineer | 3 | 0.33436 | 1.45527 | 0.48509 | 12.13 | 0.010* |
| İkinci derece | 3 | 2.04474 | 2.04474 | 0.68158 | 17.04 | 0.005** |
| Etkileşim | 3 | 0.05916 | 0.05916 | 0.01972 | 0.49 | 0.703 |
| Artık hata | 5 | 0.19999 | 0.19999 | 0.04000 | | |
| Uyum eksikliği | 3 | 0.18702 | 0.68158 | 0.06234 | 9.62 | 0.096 |
| Saf hata | 2 | 0.01297 | 0.01297 | 0.00648 | | |
| Toplam | 14 | 2.63824 | | | | |

SH Kat.: Standart hata katsayısı, SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

*: Önemli (P=0.05) **: Önemli (P=0.01)

Çizelge 7.4. Ultrafiltre edilen örneklerin fruktoz içeriği için tahmin edilen regresyon katsayıları ve varyans analizi değerleri

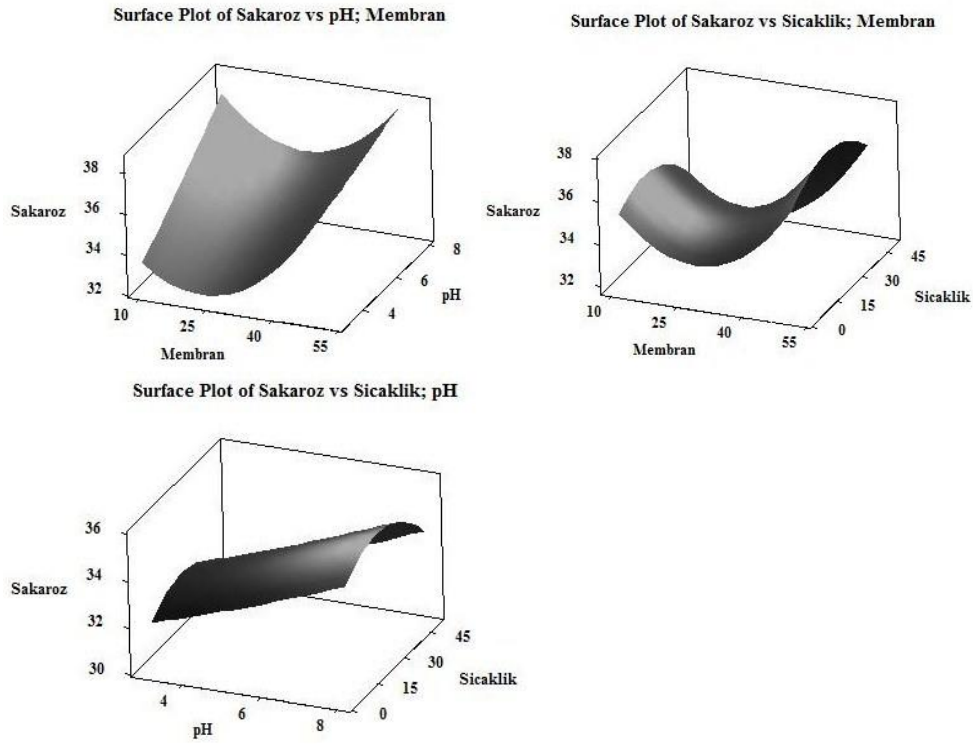
| Terim | Katsayılar | SH Kat. | T | P |
|--------------|------------|----------|--------|-------|
| Sabit | 19.5781 | 1.53290 | 12.772 | 0.000 |
| Membran (M) | -0.1397 | 0.043307 | -3.243 | 0.023 |
| pH (P) | 2.1398 | 0.42487 | 5.036 | 0.004 |
| Sıcaklık (S) | 0.1541 | 0.03525 | 4.372 | 0.007 |
| M*M | 0.0027 | 0.00055 | 4.969 | 0.004 |
| P*P | -0.1597 | 0.03522 | -4.535 | 0.006 |
| S*S | -0.0018 | 0.00043 | -4.123 | 0.009 |
| M*P | -0.0015 | 0.00423 | -0.347 | 0.743 |
| M*S | 0.0000 | 0.00047 | 0.005 | 0.996 |
| P*S | -0.0073 | 0.00376 | -1.931 | 0.111 |

| Kaynak | SD | KT | Düz. KT | Düz. KO | F | P |
|----------------|----|---------|---------|---------|-------|-------|
| Regresyon | 9 | 15.4037 | 15.4037 | 1.71152 | 9.56 | 0.011 |
| Lineer | 3 | 2.8231 | 10.9988 | 3.66625 | 20.49 | 0.003 |
| İkinci derece | 3 | 11.8921 | 11.8921 | 3.96403 | 22.15 | 0.003 |
| Etkileşim | 3 | 0.6886 | 0.6886 | 0.22952 | 1.28 | 0.376 |
| Artık hata | 5 | 0.8948 | 0.8948 | 0.17896 | | |
| Uyum eksikliği | 3 | 0.5298 | 0.5298 | 0.17661 | 0.97 | 0.544 |
| Saf hata | 2 | 0.3650 | 0.3650 | 0.18248 | | |
| Toplam | 14 | | | | | |

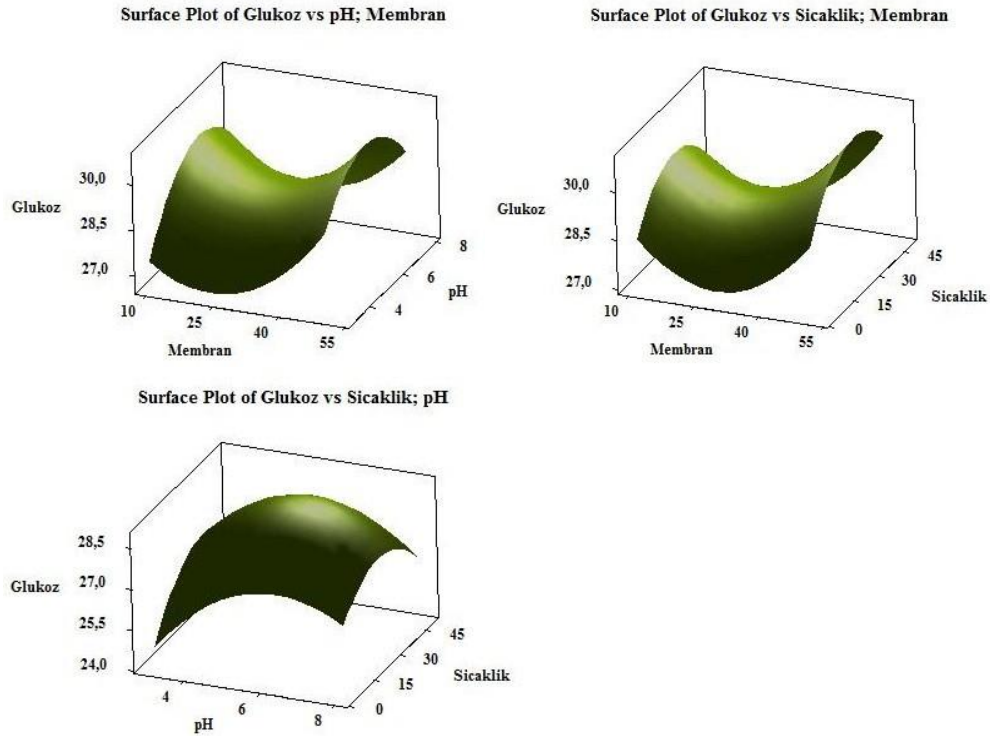
SH Kat.: Standart hata katsayısı, SD: Serbestlik derecesi, KT: kareler toplamı, Düz. KT: düzeltilmiş kareler toplamı, Düz. KO: düzeltilmiş kareler ortalaması

*: Önemli (P=0.05) **: Önemli (P=0.01)

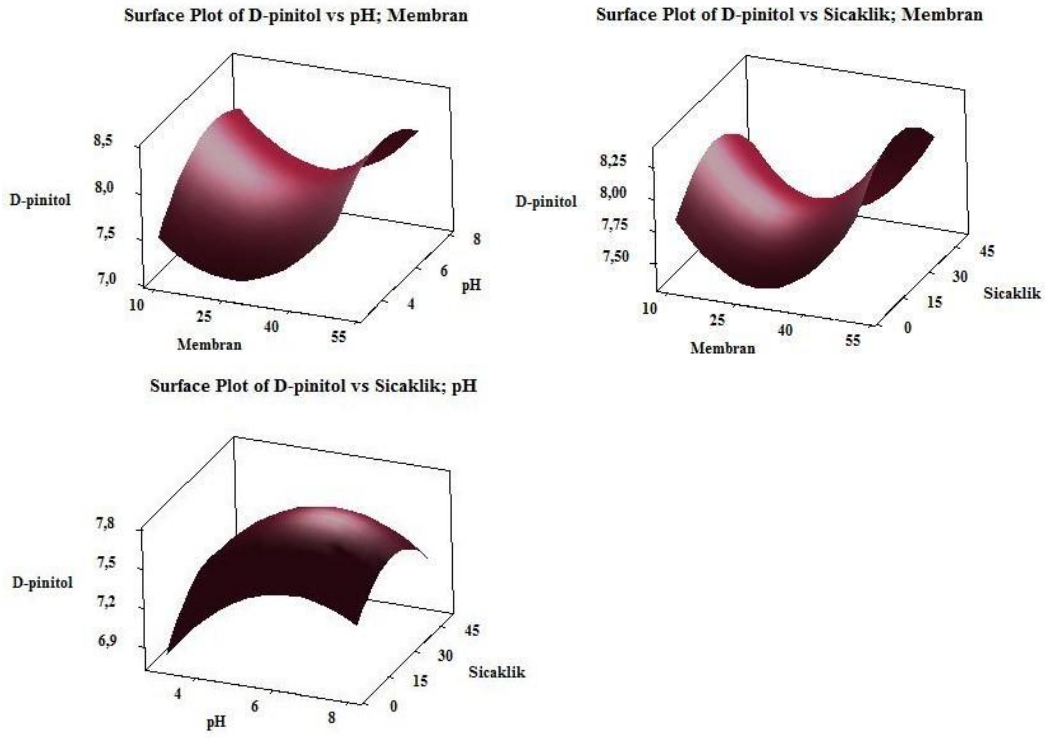
EK- 7. Ultrafiltre edilen örneklerin sakkaroz, glukoz, D-pinitol ve fruktoz içeriklerine ait cevap yüzey grafikleri



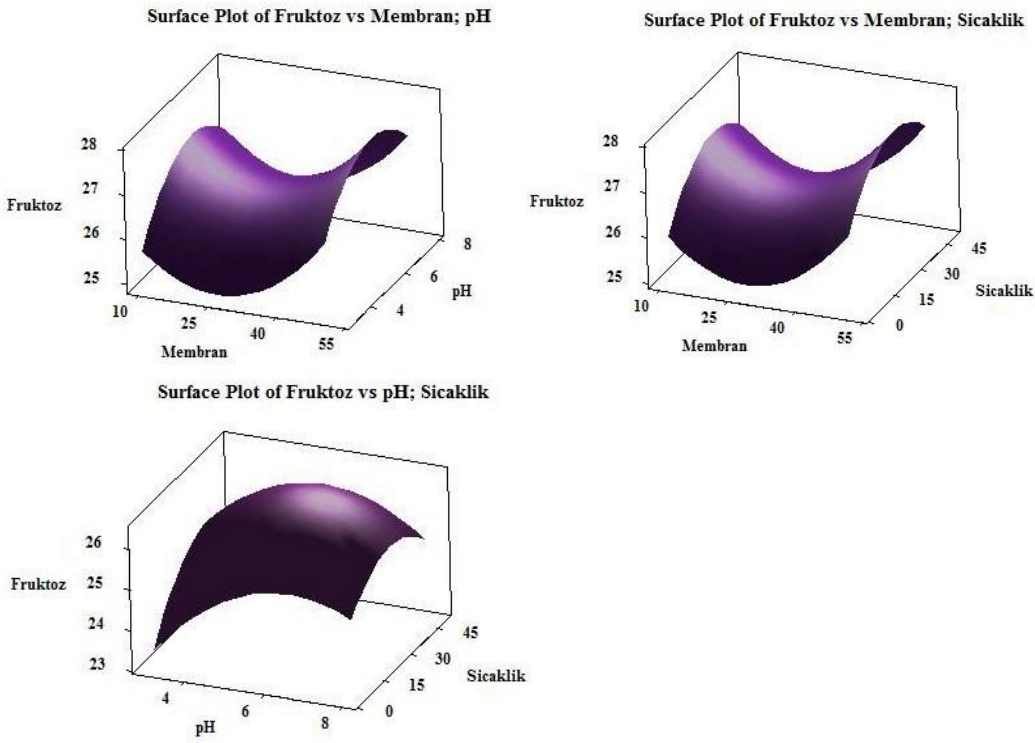
Şekil 7.3. Ultrafiltre edilen örneklerin sakkaroz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği



Şekil 7.4. Ultrafiltre edilen örneklerin glukoz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği

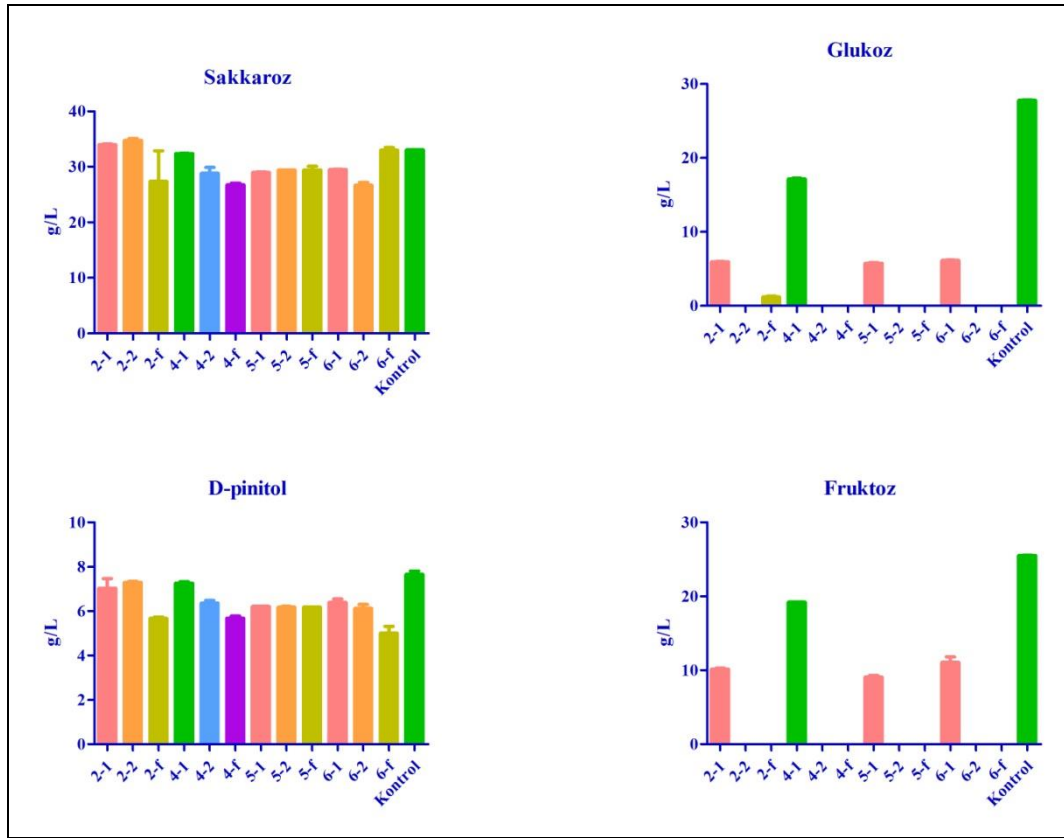


Şekil 7.5. Ultrafiltre edilen örneklerin D-pinitol içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği

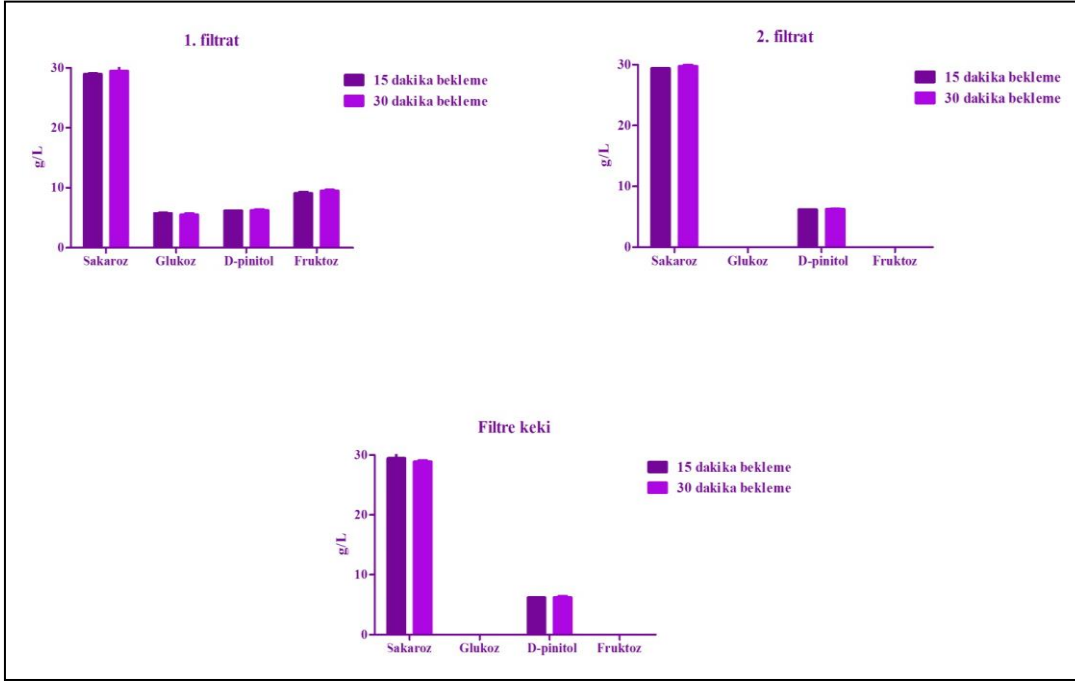


Şekil 7.6. Ultrafiltre edilen örneklerin fruktoz içeriği değerini veren cevap yüzey grafiği

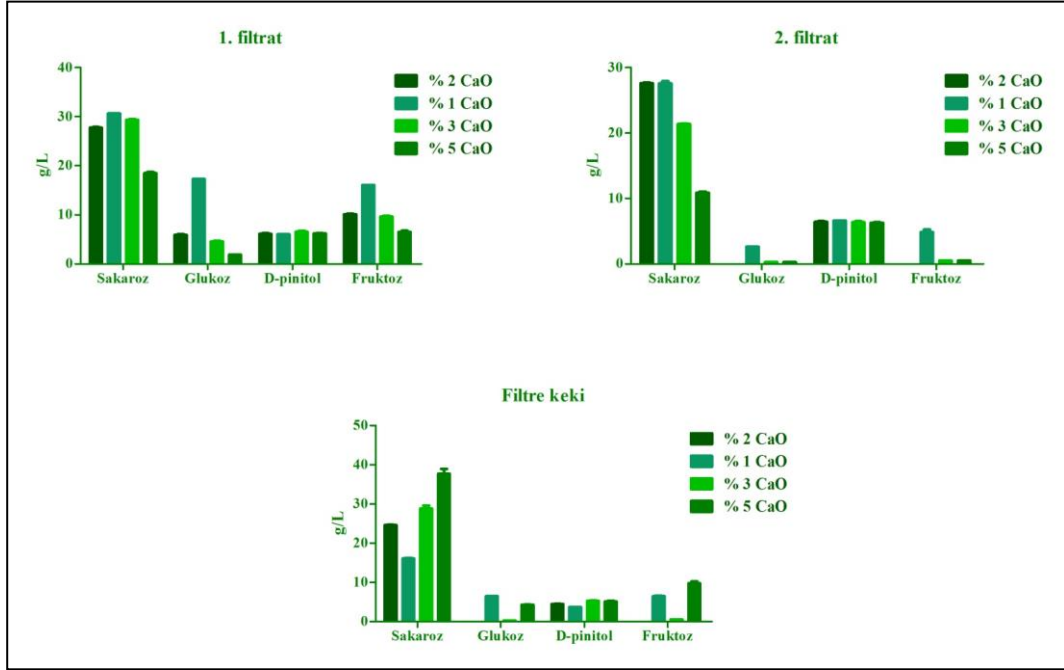
EK- 8. CaO uygulama işleminin optimizasyonunda 1. filtrat, 2. filtrat ve filtre keki kısımlarının şeker ve D-pinitol içeriklerindeki değişim



Şekil 7.7. CaO ile temas süresinin optimizasyonunda farklı işlem aşamalarında şeker ve D-pinitol konsantrasyonlarındaki değişim (2: 5 dakika temas, 4: 10 dakika temas, 5: 15 dakika temas, 6: 20 dakika temas, -1: 1. filtrat, -2: 2. filtrat, -f: Filtre keki)



Şekil 7.8. CaO işleminin soğutma ve ısıtma aşamalarında beklenilmesi gereken süre için yapılan deneme (Sabit tutulan parametreler: % 2 CaO Miktarı, 15 dakika temas süresi)



Şekil 7.9. CaO işleminde ilave edilecek CaO miktarının belirlenmesi için yapılan deneme (Sabit tutulan parametreler: 5 dakika temas süresi, 15'er dakika ısıtma ve soğutma aşamalarında bekleme süresi)

ÖZGEÇMİŞ



Hatice Reyhan ÖZİYCI 1983 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2001 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden 2005 yılında Gıda Mühendisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Eylül ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2008 yılının Haziran ayında yüksek lisanstan mezun oldu. Aynı yıl Eylül ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. 2007-2014 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü kadrosunda araştırma görevlisi olarak görev yapmıştır. 2014 yılından itibaren Alanya Hamdullah Emin Paşa Üniversitesi,

Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü'nde yardımcı doçent olarak çalışmaya başlayan Hatice Reyhan ÖZİYCI, akademik faaliyetlerini bu kurumda sürdürmektedir. Evli ve bir kız çocuk annesidir.