

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**GLİKOZİTLERİN SÜPERKRİTİK CO₂
EKSTRAKSİYONU İLE *S. REBAUDIANA REBAUDIANA*
YAPRAKLARINDAN ELDESİ VE OPTİMİZASYONU**

Ayşen ERKÜÇÜK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 614.02.07

Sunuş Tarihi: 29.07.2009

Tez Danışmanı: Yar. Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Bornova-İzmir

III

Ayşen ERKÜÇÜK tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak sunulan “Glikozitlerin Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu ile *S. rebaudiana rebaudiana* Yapraklarından Eldesi ve Optimizasyonu” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/07/2009 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Yar. Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ

Raportör : Prof. Dr. Erdal BEDİR

Üye : Prof. Dr. Şerife HELVACI

ÖZET**GLİKOZİDLERİN SÜPERKRİTİK CO₂ EKSTRAKSİYONU İLE
S. rebaudiana YAPRAKLARINDAN ELDESİ VE
OPTİMİZASYONU****ERKÜÇÜK, Ayşen****Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü****Tez Yöneticisi: Yar. Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ****Temmuz 2009, 119 sayfa**

Bu çalışmada, Akdeniz Bölgesinde ilk kez yetiştirilen *S. rebaudiana* yapraklarının süperkritik akışkan teknolojisi (SCFE) ile ekstraksiyonunun optimizasyonu ve yapısında en çok bulunan steviozit ve rebaudiozit A miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. SCFE yöntemiyle elde edilen ekstraktlar, çözgen ekstraksiyonu ile elde edilen su ve etanol ekstraktları ile kıyaslanmıştır. Bu ekstraktlar ve posalar HPLC ile analizlenerek miktar tayini yapılmıştır. Box-Bhenken deneysel tasarım programı kullanılarak optimizasyon yapılmıştır. Optimum koşullar 211 bar, 80°C, %17.4 yardımcı çözgen oranı olarak belirlenmiştir. Toplam glikozit miktarı 54.45 mg/g değerinde olup, steviozit 36.66 mg/g ve rebaudiozit A 17.79 mg/g olarak bulunmuştur. Toplam glikozit miktarı, su ekstraksiyonunun da 64.49 mg/g iken etanol de 48.60 mg/g'la SCFE'den daha düşük bir değer elde edilmiştir. SCFE ile elde edilen glikozit miktarları su ekstresindeki oranlara yakın olup, suyun buharlaştırılması

VI

için gerekli enerji maliyetlerinin endüstriyel ölçekte yüksek olması nedeniyle SCFE alternatif bir yöntem olarak sunulmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu, *Stevia rebaudiana*, optimizasyon, steviozit, rebaudiozit A, Box-Behnken

ABSTRACT

**SUPERCRITICAL CO₂ EXTRACTION OF GLYCOSIDES FROM
S. rebaudiana LEAVES: IDENTIFICATION AND
OPTIMIZATION**

ERKUCUK, Aysen

MSc Thesis in Biotechnology Department

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Ozlem YESIL CELIKTAS

July. 2009, 119 pages

The aim of this work was to optimize the glycoside composition of *S. rebaudiana* leaves grown for the first time in mediterranean region using supercritical fluid technology (SCFE). These glycosides; stevioside and rebaudioside A were identified by HPLC analyses of the leaves, extracts and residues. Box-Bhenken design method was used for optimization of the process. Optimum conditions were elicited as 211 bar, 80°C and 17.4 % cosolvent ratio. Yields were 36.66 mg/g stevioside, 17.79 mg/g rebaudioside A. Total glycosides value were 54.45mg/g close to those obtained using conventional water extraction (64.49 mg/g) and higher than ethanol extraction (48.60 mg/g) for one hour process. Energy consumption of water evaporation is very high at large scale plant therefore SCFE come out as an alternative method.

VIII

Keywords: Supercritical fluid extraction, *Stevia rebaudiana*, optimization, stevioside, rebaudioside A, Box-Behnken Design

IX

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam boyunca bana her konuda destek olan, guvenen hocam Yar. Doç. Dr. Özlem YEŞİL ÇELİKTAŞ'a ve değerli katkılarından Őturu Prof. Dr. Erdal BEDİR'e; çalıőmamın bazı bŐlumlernln doğal urunler laboratuvarında gerçekleőtirirken yardımcı olan tım arkadaőlara; HPLC analiz yŐntemlnln geleiőtiren çalışma arkadaőım İsmail Hakkı AKGÜN'e ve istatistik yŐntemlnln anlatan arkadaőım Tuğba KESKİN'e, tabletleri hazırlayan Eczacılık Fakultesinden Őykü ÇETİN'e desteklerinden Őturu teşekkür ederim. Bana guvenen sayın hocam Arif Uslan'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmanın gerçekleőtirilmesi için gerekli maddi imkanları BAP projesiyle sağlayan Ege Unversitesine, ayrıca laboratuvar imkanlarından faydalandığım Biyomuhendislik BÖlümü Başkanı Sayın Prof. Dr. Fazilet Vardar SUKAN'a teşekkür ederim. Hayatımın her aőamasında olduğu gibi bu dönemde de maddi ve manevi destekleri ile hep yanımda olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	V
ABSTRACT	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
ÇİZELGELER DİZİNİ	XVIII
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	4
2.1. Tatlandırıcılar	4
2.2. Doğal Tatlandırıcı Olarak Kullanılan bir Bitki:	
<i>S. rebaudiana</i> Bertoni	187
2.2.1. <i>S. rebaudiana</i> 'nın Botanik Özellikleri	187
2.2.2. Yaprak Ekstresinin Kimyasal Bileşimi	19
2.2.3. <i>S. rebaudiana</i> 'dan Elde Edilen Glikozitler ve Biyolojik	
Aktiviteleri	26
2.3. Tatlandırıcılar Yönetmelikleri.....	31
2.4. Geleneksel ve Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri.....	343
2.4.1. Çözgen Ekstraksiyonu	343
2.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SCFE)	38
2.4.2.1 Süperkritik Akışkanlar	38
2.4.2.2 Yardımcı Çözgen Kullanımı	44
2.4.2.3 Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	46
2.4.2.4 <i>S. rebaudiana</i> 'nın SCFE	49
2.5. Optimizasyon	54

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
2.6. Ekstre Analiz Yöntemleri	57
3. MATERYAL VE METOTLAR	60
3.1. Materyaller	60
3.1.1. Hammadde Temini	60
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	61
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	61
3.2. Yöntemler	62
3.2.1. Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri	62
3.2.1.1. Çözgen Ekstraksiyonu	62
3.2.1.2. Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu	65
3.2.2. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri	70
3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması	70
3.2.2.2. HPLC-UV İşlemi	70
3.2.2.3. Kalibrasyon ve Validasyon	72
3.2.3. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon	74
3.2.4. Ekstrelerden Efervesan Tablet Yapımı	74
4. BULGULAR	78
4.1. <i>S. rebaudiana</i> Yapraklarının HPLC Analiz Sonuçları	78
4.2. Çözgen Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları	79

İÇİNDEKİLER (Devamı)

	<u>Sayfa</u>
4.3. Süperkritik CO ₂ Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde	
HPLC Analiz Sonuçları.....	81
4.4. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon.....	84
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	97
6. KAYNAKLAR.....	102
7. EKLER.....	115
EK-1 <i>Stevia</i> Ekstresi Malzeme Güvenlik Veri Listesi	115
ÖZGEÇMİŞ.....	118

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. <i>S. rebaudiana</i> bitkisi	198
2.2. Paraguay’da büyük ölçekli plantasyonu yapılan <i>S. rebaudiana</i> ’nın ticari üretimi	19
2.3. <i>S. rebaudiana</i> ’nın önemli glikozitlerinin kimyasal yapısı.....	221
2.4. <i>S. rebaudiana</i> yapraklarının yapısındaki lipofilik bileşenler için izolasyon ve analiz şeması	26
2.5. İnsan ve sıçanlarda emilim, metabolizma ve salgılanması; kalınbağırsakta rebaudiozit A’nın steviole parçalanması (G; Glikoz).....	30
2.6. İnsan ve sıçanlarda rebaudiozit A’nın karaciğerdeki metabolizması	31
2.7. CO ₂ ve Suyun Basınç-Sıcaklık diyagramı ve fonksiyonel bölgeler	39
2.8. CO ₂ ’in viskozitesinin sıcaklıkla değişimi, farklı basınçlardaki eğrileri,.....	40
2.9. SC-CO ₂ ’nin basınçla yoğunluğunun değişimi, farklı sıcaklıklardaki eğrileri	41
2.10. Katı matriste ekstrakte edilecek maddenin tanecik şeklindeki dağılımı.....	487
2.11. Ekstraksiyon eğrisi.....	498
2.12. Ekstraksiyon işlemi sıcaklık ile entalpi diagramı.	49
2.13. Pasquel ve arkadaşlarının deney ünitesinin akış şeması.	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.14. Üç faktörün grafiksel gösterimi iki şekilde oluşmaktadır: a) Kübün merkez noktası ve kenarların orta noktalarından oluşan, b) Üç tane birbirine kenetlenmiş ve 2 ² faktoriyalli tasarım	55
2.15. <i>S. rebaudiana</i> ekstresinin HPLC kromatogramı. İzokratik mobil faz, 210 nm tayında (a) steviozit, (b) rebaudiozit C, ve (c) rebaudiozit A.....	59
3.1. Ekstraksiyonda kullanılmadan önce toz haldeki <i>S. rebaudiana</i> bitkisi	60
3.2. Soxhlet ekstraktörü ile gerçekleştirilen <i>S. rebaudiana</i> çözen ekstraksiyonu	63
3.3. Vakumlu evaporatörde <i>S. rebaudiana</i> çözen ekstresi	64
3.4. Liyofilize edilmiş su ekstresi	64
3.5. Su ekstraksiyonu sonrası kurutulmuş posa	65
3.6. SFE 100, denemelerin gerçekleştirildiği sistem.....	66
3.7. Süperkritik CO ₂ cihazının kontrol ünitesi (2).	68
3.8. Maksimum glikozit veriminin alındığı 250 bar, 60 °C, %20 yardımcı çözen çalışma koşullarında elde edilen posa.	69
3.9. Ekstrelerin ve posaların analiz edildiği Shimadzu LC-10 HPLC Sistemi.....	72
3.10. BBD programı tarafından 15 denemenin seçilen değişkenler sayfası.	75
3.11. Mikron manuel tablet makinası.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.12. Basılmış tabletler (a) SC-CO ₂ ekstresi, (b) su ekstresi.	76
4.1. <i>S. rebaudiana</i> HPLC kromatogramı	778
4.2. Su ekstresinin HPLC kromatogramı	79
4.3. Etanol ekstresinin HPLC kromatogramı.....	79
4.4. Su ekstresinin, tablet ilk atıldığında (a) ve eridiğindeki (b) görüntüleri.....	81
4.5. En yüksek verimli deneme ekstresinin HPLC kromatogramı.....	821
4.6. En yüksek verimli deneme posasının HPLC kromatogramı.....	81
4.7. SCFE ekstresi tablet ilk atıldığında (a), erirken (b), tamamen eridikten sonraki görüntüleri (c).....	84
4.8. Steviozit ekstraksiyon verimine sıcaklık ve basıncın farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Yardımcı çözügen oranı optimum değerinde (%17.4) sabit tutulmuştur.....	889
4.9. Steviozit ekstraksiyon verimine yardımcı çözügen ve basıncın farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 80°C 'de sabit tutulmuştur.	90

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devamı)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.10. Steviozit ekstraksiyon verimine yardımcı çözen ve sıcaklığın farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Basınç optimum değerinde 211 bar'da sabit tutulmuştur.....	91
4.11. Rebaudiozit A ekstraksiyon verimine sıcaklık ve basıncın farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Yardımcı çözen oranı optimum (%17.4) sabit tutulmuştur.....	93
4.12. Rebaudiozit A ekstraksiyon verimine yardımcı çözen oranı ve basıncın farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 80°C'de sabit tutulmuştur.....	94
4.13. Rebaudiozit A ekstraksiyon verimine yardımcı çözen oranı ve sıcaklık farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Basınç optimum değerinde (211 bar) sabitlenmiştir.	95
5.1. Sakkarin tablet ilk atıldığında (a), erirken (b), tamamen eridikten sonraki (c) görüntüleri.....	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No</u>
2.1. <i>S. rebaudiana</i> yaprağındaki 8 tatlı <i>ent</i> -kaurene glikozit'in fiziksel ve çözünürlük verileri	243
2.2. Ekstraksiyon yöntemine göre steviozit ve rebaudiozit A miktarının kıyaslanması.....	36
2.3. Gaz, sıvı ve süperkritik akışkanın termodinamik özellikleri.	41
2.4. Bazı süperkritik çözücülerin kritik sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri	42
2.5. Farklı bileşiklerin süperkritik CO ₂ içinde çözünürlükleri.....	45
2.6. CO ₂ -etanol karışımındaki etanol oranının kritik sıcaklık ve basınç değerleri üzerine etkisi.....	46
3.1. Steviozit ve rebaudiozit A için validasyon tablosu.....	73
4.1. <i>S. rebaudiana</i> yapraklarının yetiştiği ülkeye göre steviozit ve rebaudiozit A içerikleri	798
4.2. Kodlanmış ve kodlanmamış bağımsız değişkenlerin değerleri, bağımlı değişkenler steviozit ve rebaudiozit A verimleri mg/g <i>S. rebaudiana</i>	855
4.3. Y_1 , Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi.....	86
5.1. En yüksek sonuçların elde edildiği deneme (250 bar, 80°C, %20 yardımcı çözügen oranı), su ve etanol ekstraksiyon verimleri.....	98

1. GİRİŞ

Endüstride tıbbi ve aromatik bitkilere ilgi artmaktadır. Bitkinin hammaddesi, kökleri, yaprakları, çiçekleri, meyvesi, çekirdeği, gövdesi, sapı, embriyosu vb. olmaktadır. *S. rebaudiana* Bertoni, 1899'da botanik bilimci Bertoni tarafından Güney Amerika'nın kuzey bölümünde (Paraguay, Brezilya) Amambay tepelerinde bilimsel olarak incelenmiştir. Kalorisiz olup, karbonhidrat içermemektedir. Bölgede yaşayanlar yapraklarını yüzlerce yıldır ve günümüzde yöresel çaylarında, tatlılarda, ısıya dayanıklı olduğundan pişen yemeklerde ve hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanmaktadırlar (Taylor, 2005).

Bitki bilimciler bu bitkinin yaprak ve köklerinin steviol-glikozit sentezleyebildiği sonucuna varmışlardır. Ayrıca çiçeklerinde ve sapslarında da steviozit miktarının yapraklara göre düşük oranlarda olduğu belirtilmiştir (Bondarev ve ark., 2001). Paraguay'lı kimyacı Ovidio Rebaudi 1900'lü yıllarda bu bitki yapraklarından, düşük kalorili iki çeşit doğal kimyasal madde olan steviozit ve rebaudiozit A'yı izole etmiştir (Pasquel ve ark., 2000). Steviozit ve rebaudiozit A gibi steviol glikozitler çok yüksek konsantrasyonlarda *S. rebaudiana* yapraklarında birirmektedir. Rafine edilmiş yaprak ekstraları ya da saf olarak elde edilmiş diterpen glikozit steviozit'ten elde edilmiş ürünler Japonya ve Kore gibi ülkelerde sükröz (çay şekeri) yerine kullanılmaktadır. 1995 yılından beri, Birleşmiş Milletler ve İngiltere gibi bazı ülkelerde tatlandırıcı olarak kullanımına yasal bazı kısıtlamalar getirilmiş olup, diyet katkı maddesi olarak kabul edilmekte ve tüketilmektedir (Greenly,

2003; Guens, 2003). Amerika’da Giant bitkisi ulusal tatlandırıcı olarak tercih edilmiş, o bölgede yetiştirildiği için daha ucuz bulunmuştur (Taylor, 2005). *S. rebaudiana* ve glikozitleri konusunda son yüzyılda 1000’in üstünde bilimsel makale ve patentler yayınlanmıştır (Kinghorn, 2002).

En çok tüketen ülke Japonya’da ise *S. rebaudiana* ekstraları 1968 yılından beri gıdaların tatlandırılmasında düşük kalorili tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Tadhani ve ark., 2007; Carakostas ve ark., 2008; Shar ve ark., 2008). Bu ülkede son yıllarda 2000 metrik ton kuru yapraktan, 200 metrik ton saflaştırılmış steviozid ve diğer *S. rebaudiana* tatlandırıcı ürünleri üretilmiştir. Günümüzde, ülkedeki düşük kalorili veya kalorisiz tatlandırıcı pazarının %40’ını yakalamıştır (Voith, 2008). Korede tatlandırıcı pazarının %40’ını oluşturan steviozid genellikle alkollü içecek ve soju’da tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Yıllık *S. rebaudiana* yaprağı üretimi 50.000 ton olup, yaklaşık 93.000.000 insan günlük *S. rebaudiana* yaprağı, ekstresi veya saflaştırılmış steviol glikozitleri tüketmektedir (<http://www.eustas.org>, 2006). Son yıllarda Paraguay tarım alanlarını hızla arttırarak 3000 dönüm’den 120.000 dönüme çıkarmayı hedeflemiştir (Camila, 2007).

Diyarbakır’ın Bismil ilçesine bağlı Yukarısalat Belde Belediyesi’nce hazırlanan ve Türkiye’nin ekolojik şeker üretiminin planlandığı proje, AB tarafından onaylanarak 233 bin Euro’luk destek almaya hak kazanmıştır. Proje şeker üretiminin, şekerpancarının yanı sıra alternatif şeker bitkisi ‘*S. rebaudiana*’ yapraklarından yapılmasını

amaçlamaktadır. Bitkinin en önemli özelliği şekerpancarında olduğu gibi yoğun kimyasal girdi kullanılmasına sebep olmamasıdır (<http://www.stevia.com.tr>, 2009).

Bu çalışmanın amacı, Türkiye’de ilk kez Akdeniz Bölgesinde (Antalya) plantasyonu yapılan *S. rebaudiana* yapraklarının başarısının saptanmasıdır. Süperkritik ekstraksiyon yöntemi uygulanarak optimum çalışma koşullarının Box-Bhenken deneysel tasarım yöntemiyle elde edilmesidir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden olan çözgen ekstraksiyonu su ve etanol kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve glikozit miktarları karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, Türkiyede bulunan endüstriyel ölçekli süperkritik ekstraksiyon tesislerinde ölçek büyütme çalışmalarının yürütülmesi için elverişlidir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1. Tatlandırıcılar

Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozunmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özellikleri düzenlemek gibi pek çok amaçla ilave edilen maddelerdir ([http://www.ansiklopedi.turkcebilgi.com /tatlandiricilar](http://www.ansiklopedi.turkcebilgi.com/tatlandiricilar), 2009).

Ancak günümüzde birçok ülkede önemli yeri olan şeker ve tatlıların aşırı kalori içermeleri, porsiyon miktarlarındaki artış, hareketsiz yaşamın artması, sağlıklı beslenme bilgisindeki eksiklikler ve ailelerin sağlıklı besinlere ayırdığı düşük bütçe; obezite, şeker hastalığı, hipertansiyon, kalp-damar hastalıklarında hızlı bir artışa neden olmuştur. Böylece çok şeker içeren besinler, obezite ve şeker hastalarının tedavilerinde sınırlandırılmıştır. Ancak teknolojinin gelişimi ile besin sanayinde kalorisiz veya olmayan yapay tatlandırıcılar 19. yüzyılın sonlarında gündeme gelmeye başlamıştır. Aynı miktardaki şekerden daha tatlı olan ve daha az enerji içeren kimyasal maddeler tatlandırıcı olarak sınıflandırılmaktadır. Tatlandırıcılar, başlangıçta şeker hastalarının tatlandırma gereksiniminin giderilmesi için kullanılmış olmakla birlikte, günümüzde fazla kilolular, vücut şeklini korumaya çalışanlar ve şekerin diş sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmak isteyenler tarafından da yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Nabors, 2001).

Doğal tatlandırıcılar genellikle bitkilerden ayrıştırılan kimyasal maddelerdir. Önemli bazı doğal tatlandırıcıların ağırlıkça aynı miktardaki sofraya şekerine oranla tatlılıkları; Brazzein, 2000 kat, Curculin, 550, Eritrol, 0.7, Glisirizin, 50, Gliserol, 0.6, Hidrojene nişasta hidrolizatları, 0.4-0.9, İzomalt, 0.45-0.65, Laktitol, 0.4, Mabinlin, 100, Maltitol, 0.9, Mannitol, 0.5, Monellin, 300, Pentadin, 500, Sorbitol, 0.6, *stevia* (*S. rebaudiana*), 250-300, Tagatose, 0.92, Tamatin, 2000-3000, ksilitol, 1, Sellügin, 35 kattır. Yapay tatlandırıcılar, doğal tatlandırıcı moleküllerinin benzerlerinin laboratuvarlarda yapay olarak sentezlenmesi ile elde edilen maddelerdir. Genellikle sıfır ya da sıfıra yakın miktarda kalori içermektedir. İnsan yapısının, evrimi boyunca karşılaşmadığı bu tür kimyasal maddelere uzun dönemde nasıl tepki vereceğini her zaman doğru biçimde belirlemek mümkün olmadığından, bu türden yeni bir ürünün kullanıma sunulması için gerekli yasal izinlerin alınması çok zordur. Gıda üretiminde kullanılan listedeki yapay tatlandırıcılardan bazıları; Acesulfame potasyum, 200, Alitame, 2000, Aspartam, 160-200, Siklamat, 30, Dulcin, 250, Neohesperidin, 1500, Neotam, 8000, P4000, 4000 (1950'de Amerika'da yasaklanmıştır), Sakkarin (Saccharin-benzosulfamit), 300, Sucraloz, 600 (<http://www.ansiklopedi.turkcebilgi.com/tatlandiricilar>, 2009).

İdeal bir tatlandırıcı, şekerin duyuşsal özelliklerini içermesinin yanısıra, kullanırken ve kullandıktan sonra ağızda acı-metalik tat bırakmamalı, kolay çözünmeli çözüldükten sonra renksiz ve kokusuz olmalı, ısıya dayanıklı, kalorisi düşük ve ekonomik olmalıdır. Toksik, teratojenik, kanserojenik açıdan güvenli olması da en önemli özelliklerinden biri olarak değerlendirilmektedir (Dönmez, 2008).

Tatlandırıcılar, kalorili (şekerler) ve kalorisiz tatlandırıcılar olarak iki grupta incelenmektedir. Şekerler, monosakkaritler (fruktoz, galaktoz, glukoz) veya iki monosakkaritin birleşiminden oluşan disakkaritlerdir (sukroz, laktoz, maltoz). Tuzlu gıda üreticileri ürünleri çok tuzlu olunca bal ilave etmektedirler. Jambon üretimi buna örnek olarak verilebilir. Glukoz, vücut dokuları tarafından en iyi kullanılabilen karbonhidrat türüdür. Kan ve vücut sıvıları içinde serbest halde bulunup, beyin tarafından tüketilmektedir. Balda, çeşitli meyvelerde ve mısır şurubunda bulunur (Greenly, 2003).

Fruktoz tüm şekerler içinde en tatlısı olup, balda, meyvelerde ve mısır şurubunda bulunmaktadır. Yakın bir geçmişte "diyet şekeri" olarak ya da bazı diyet ürünlerinin hazırlanmasında kullanıma girmiştir. Fruktozun diyet için sunduğu üstünlükler az kalorili olması, insüline bağımlı olmaması ve diş çürümesine yol açmaması olarak sıralanabilir. Laktoz süt şekeridir. Sukroz, şeker pancarı ya da şeker kamışından üretilen ve çay/sofra şekeri olarak bilinen bir madde olup, invert şekerine dönüşebilmektedir. Gıda ve eczacılık sektöründe kullanılmaktadır. Aromalı sütlere eklenen sukrozun hiperaktivite, öğrenme problemleri, antisosyal davranışlar, obezite, diabet ve diş çürüğüne daha çok neden olduğu tartışılrsa da bunlardan sadece diş çürüğünü arttırdığı bulgusu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Nabors, 2001).

Doğal tatlandırıcı olan şekerler dışında tatlandırıcı etkisi bulunan bitkilerin gıda ve içeceklerde kullanımı özellikle tropikal ülkelerde asırlar öncesine dayanmaktadır. Örneğin, *Thaumatococcus daniellii* bitkisinin su

ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen tomatın seyreltik sukroz çözeltilisinden 3500 kez daha fazla tatlıdır ve Batı Afrika'lılar tarafından asırlardır kullanılmaktadır (Canımoğlu, 2005).

S. rebaudiana yaprakları 1900'lerin başında İngiliz ve Fransızlar tarafından şekere alternatif olarak incelenmiştir. Geçtiğimiz yüzyılın ortalarından itibaren Japonya'da yetiştirilmeye başlanmıştır. Yıllardır 10 ülkede kullanılmakta, herhangi bir hastalık etkisi görülmemektedir. Diyet kolanın, kurutulmuş deniz ürünlerinin, yoğurdun, şekerlemelerin, turşuların, soya sosunun, meyve sularının, alkolsüz içeceklerin, sakızların, dondurma ve çayın tatlandırılmasında, diş macunu ve ağız gargarasında kullanılmaktadır. Özellikle diyabetiklerde güvenle kullanılabilir. Dayanıklısıdır ve uzun süren tatlı tada sahiptir. Kan şekerini sabit düzeyde tutmayı sağlamaktadır. Hipertansiyon tedavisinde de etkin olduğu ifade edilmektedir. Histolojik çalışmalarda herhangi bir anormalliğe rastlanmadığı bildirilmektedir. Çocuklarda bilinen bir yan etkisi yoktur. Miktarı ne kadar olursa olsun toksik değildir (Tadhani ve ark., 2007; Carakostas ve ark., 2008).

Eski zamanlardan beri bilinen glisirizin, *Glycyrrhiza glabra* bitkisinde; meyan kökünde bulunmaktadır. Bazı ilaç ve tütün ürünlerinde aroma verici olarak, alkolsüz içeceklerde köpürtücü madde olarak da kullanılabilir. Glisirizinin en önemli biyolojik etkisi potasyumun idrarla atılımını önemli ölçüde artırarak, kandaki potasyum düzeyini düşürmesi olarak ifade edilmektedir. Alınması uygun olan en yüksek günlük miktarı olan 200 mg, glisirizin içeren maddeler alındığında

kolaylıkla aşılabilmektedir. Gene de glisirizinin kanser yapıcı etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Tagatoz, (1.5 kalori/g) sukroz kadar tatlıdır. Fruktozun izomeri olup günlük ürünlerde doğal olarak bulunur. Diğer düşük kalorili tatlandırıcılarla kullanıldığında aroma ve ağızda kalan tatlılık hissini arttırmaktadır. Örneğin hammadde olarak laktoz kullanılan sanayi üretimlerinde kullanılmaktadır. Metabolizması fruktoza benzeyip, tamamen emilimi gerçekleşmemektedir. Kalorisi çok düşük ve az glisemik etkisi vardır. Kimyasal yapısı şeker olduğu halde diş çürümesi yapmaz (Nabors, 2001).

Trehaloz ticari olarak enzimatik işlemlerle nişastadan üretilmektedir. Ancak, doğal olarak ta bulunmaktadır. İnsüline çok az tepki göstermektedir. Tatlandırıcı amaçlı kullanılmayıp (sukrozla aynı kaloridedir; 4 kal), düşük glisemik etkili, ısıya dayanıklı, donma ve buzun çözünme döngüsünde ve dehidrasyon (suyunu alma) işleminde kullanılmıştır. Gıda ürünlerinin hücre yapısını korumasına yardımcı olmaktadır. Doğal olarak böceklerde, bitkilerde, mantar ve bakterilerde bulunmaktadır. Diyet yapanların en çok kullandığı kaynak mantardır. İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalar güvenli olduğunu göstermiştir (Richards ve ark., 2002). FDA'in (Food and Drug Administration of USA) 2000 yılındaki duyurusu ile GRAS (Generally Regarded as Safe) statüsüne girmesiyle Amerika marketlerinde satışına başlanmıştır. Ayrıca, JECFA'da (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) 2000 yılında çok düşük toksik etkili olarak kabul etmiş,

sağlığa zararının olmadığını bildirmiş ve diyet maddesi olarak kullanımında gıdalarda ki tüketim miktarlarını kabul etmiştir. Japonya, Kore, Tayvan ve İngiltere’de onaylanmıştır (Greenly, 2003).

Alitam (ticari adı; aclame) 2 aminoasit, L-aspartik asit, D-alanin ve bir aminin birleşmesiyle oluşmaktadır. Aspartik asit bileşeni normal olarak metabolize olurken yapısındaki alanin amidler değişmeden atılmaktadır. Gıda ve içeceklerde az miktar kullanılması yeterli olmaktadır. İyi bir raf ömrü, yüksek sıcaklıklara dayanıklı olmakla birlikte, depolama uzatılırsa asidik koşullar altında kötü aroma oluşturabilmektedir. JECFA 2002 yılında şeker hastaları üzerinde yapılan bir araştırmanın ardından güvenli olduğunu yayınlamıştır. Çok tüketildiği Avusturalya ve Yeni Zellanda’yı dikkate alarak kabul edilen günlük tüketim miktarını (Acceptable Daily Intake; ADI) 1 mg/kg vücut ağırlığı/gün olarak belirlemiştir. Diğer onaylandığı ülkeler Meksika, Kolombiya ve Çin’dir (Kroger ve ark., 2006).

Dihidrokalton (DHCs) kalorisiz, sukrozdan 300-2000 kat tatlıdır ve narenciye meyvelerinden elde edilmektedir. Tadı yavaş gelişmekte ve ağızda meyankökü tadı bırakmaktadır. Sakkarin, acesulfam ve steviozit ile sinerjik etki göstermektedir. Isıya dayanıklı olmakla birlikte kaynayan ve pişen ürünlere eklenmemektedir.

Trutin Dulkem, FDA tarafından fonksiyonel bir gıda olarak onaylanmış doğal bir meyve konsantresidir. Kivi meyvesi kullanılarak yapılmaktadır ve sukrozdan 15 kat tatlıdır. Isıya dayanıklı, higroskopik

ve vücut tarafından parçalanabilir özellikleri vardır. Kandaki glukoz miktarını yükseltmez, çok düşük glisemik indekse sahiptir.

Lo Han, Çin'de uzun ömürlü üzüm (*Lo Han Guo Siraitia grosvenorii*) meyvesinden çıkarılmıştır. Çok hoş bir lezzeti olmakla birlikte değişken bir formülasyona sahiptir; sukroz'dan 12 ile 500 kat arası tatlıdır. Düşük glisemik indeksi olup, ısıya ve soğuğa dayanıklıdır (Greenly, 2003).

Şeker alkolleri (polioller), şekerden daha az kalorilidir. Yavaş veya kısmi emilimi olduğundan, kandaki glikoz seviyesinde ani yükselmeye neden olmaz. İnce bağırsaklarda insüliniz ya da az kullanılarak enerjiye çevrilmektedir. Emilemeyen kısmı ise kalın bağırsaklarda parçalanmaktadır. Bazı insanlarda, aşırı tüketimi mide, bağırsak semptomlarına örneğin ishal ve gaza neden olabilmektedir. Isıya dayanıklı olduğundan sıcak içeceklerde, pişmiş gıdalarda kullanılabilse de karamelize edilmemelidir. Sorbitol, yapay olarak glukozun yüksek basınç altında hidrojenlendirilmesi ya da elektroliziyle elde edilmektedir. Doğal olarak bir çok bitkide, kiraz, erik, armut, elma, böğürtlen ve yosunda bulunmaktadır. Tatlandırma gücü sukrozun yarısı kadar ve kalorisi ona eşittir (2.6 kalori/g). Diabetik ürünlerin, şekeriz olarak adlandırılan sakız ve şekerlemelerin tatlandırılmasında, çeşitli ilaçlarda ve boğaz pastillerinde kullanılmaktadır. Bağırsaklardan emilimi oldukça yavaş olduğundan, kan şekerini yükseltici etkisi çok azdır. Ağdalı ve nemlendirici özelliğinden dolayı B₁₂, B₁ ve C vitaminlerinin emilimini arttırdığından, özellikle şekerlilikte kullanılmaktadır. Ancak sadece

sorbitol içeren şekerlerin raf ömrü çok uzun olmamaktadır. Günde 30 gramdan fazla alımı hazımsızlık, gaz ve ishale neden olabilmektedir. Kontrolü iyi olmayan şeker hastalarında kan şekerinin hızla yükselmesine neden olur. Sorbitol Çin Hamster Ovaryum hücrelerini 0.9 M sorbitol varlığında restriksiyon endonükleaz enzimi olan AluI ile muamele etmişler, muamele edilen hücrelerde kromozomal anormalliklerin arttığını bildirmişlerdir. Düşük dozlarda şekerlemeler, sakız, reçel ve jöle yapımında kullanılmaktadır (Kroger ve ark., 2006).

Ksilitol, (2.4 kalori/g) çeşitli selülozlu ürünlerden 1891'de Alman kimyacı tarafından elde edilen bir şeker alkolüdür. Huş ağacı, böğürtlen, çilek, yeşil salata, karnabahar, erik, fıstık, muz ve mantarda da bulunmaktadır. Japonya, Finlandiya, İskandinav ülkeleri ve Rusya'da diyabetik ürünlerde, Almanya'da ise damar içi beslenme ürünlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Sukrozla benzer derecede tatlılığa sahip olmakla beraber ağızda ferahlık hissine de neden olmaktadır. Görünüşü ve tadı şekere benzerken fazla miktarda alınması diareye neden olmaktadır. Yavaş adsorbe oluşu, sukroz yerine tatlandırıcı olarak kullanıldığında kandaki glukoz miktarını insulinle bağlantılı olarak azaltması ve düşük kalori değeri nedeniyle diyabetiklerin beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca, B vitaminlerinin ve kalsiyumun emilimini arttırmaktadır. Bebek ve hamilelerde güvenle kullanılabilir. Hayvan ve insan deneylerinde çürük önleyici olduğu görülmüştür. Şekerlemelerde, sakızlarda, alkolsüz içeceklerde, çeşitli ilaçlarda, pastillerde sukrozun yerine ksilitol kullanılmasının çürük

riskini azaltıcı etkisinin diğer şeker alkollerinden olan sorbitole göre daha etkili olduğu ifade edilmektedir (Nabors, 2001).

Maltitol, kristal yapıda bir şeker alkolü olup, bir disakkarit olan maltozun hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili (2.1 kalori/g) yapay bir tatlandırıcıdır. Maltitol hacim verici olmasından yani su tutma özelliğinden dolayı gıdaların kalitesinin artırılmasında özellikle fırınlanmış ürünlerde, reçellerde ve marmelatların yapımında, ayrıca diyet türü tatlılarda, sakızlarda ve dondurma yapımında kullanılmaktadır. Gıdalarda krema tadı verdiği için şekerli ya da az kalorili çikolata şekerlemelerde son derece kullanışlıdır. Tarım Bakanlığı tarafından maltitol'un gıdalardaki kullanım miktarına herhangi bir sınırlama getirilmemiş ve gıdalarda ihtiyaç duyulan miktarlarda kullanılabileceği bildirilmiştir. Çikolataya 40 g olarak enjekte edilen maltitol'un insanlarda sancı ve gaz oluşumuna sebep olduğu saptanmıştır. Midede hidrolize olarak sorbitol ve glukozaya dönüşmektedir. Kristal maltitolün hiçbir yan etkisi bildirilmemiştir. %1 ve %5 Dozlarında 27 hafta boyunca maltitol ile beslenen sıçanlarda maltitol'un sıçan çekum ve kalın bağırsağında kanser oluşturan 1.2 dimetilhidrazin'in kanser oluşturma etkisini azalttığını, yani oral olarak alınan maltitol'un anti-kanserojenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, yüksek dozlarda kullanılması durumunda özellikle metabolitlerinin mutajenik etki yaratabileceği belirtilmektedir (Canımoğlu, 2005).

Eritritol, (0.2 kalori/g), hacim oluşturan bir tatlandırıcıdır. Fermente bir madde olup, ishal ve gazı sebep olduğu kalın bağırsaklara

ulaştığında sadece %5'i kalmaktadır. 1990 yılından beri kullanılmaktadır. Pek çok gıdada, meyvelerde (armut, karpuz, kavun vb.), mantarda, şarapta, soya sosunda ve peynirde, fermente gıdalarda doğal olarak oluşmaktadır. Eritritol ile yapılan hayvan çalışmalarında kesinlikle sağlıkla ilgili bir sorun olmadığı bildirilmiştir. Diğer şeker alkollerinin aksine mide bağırsak sisteminde tamamen emilmekte ve fazlası idrarla değişmeden atılmaktadır. Diğer tatlandırıcılarla, örneğin aspartam ve asesulfam-K ile sinerjik etki oluşturarak acı tatları maskeleymektedir.

Laktitol, 1920'de keşfedilmiştir. Laktoz'un yüksek sıcaklık ve basınçta katalitik hidrojenasyonu ile elde edilen düşük kalorili bir tatlandırıcıdır. İnce bağırsaklarda hidrolizlenmeyip, emilmemektedir. Kalın bağırsakta parçalanarak biyokütle, organik asitler, karbondioksit, hidrojen oluşturmaktadır. Kan şekerini ve insülin seviyesini artırmamakta ve diş çürümelerine yol açmamaktadır. Gıda endüstrisinde sakız yapımında kullanılmaktadır. Laktitol'un hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda mutajenik ve genotoksik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır (Kroger ve ark., 2006).

Mannitol (1.6 kalori/g) sorbitolün izomeri olup, glukoz şurubun hidrojenasyonu ile üretilmektedir. Mayhoş tadı bazı gıdaların acı tadını maskelemekte kullanılmaktadır. Sadece bir kısmı sindirilmekte geri kalanı kalın bağırsaktaki bakteriler tarafından parçalanmaktadır. Bu da bazı insanlarda ishal ve gaza neden olabilmektedir. Yavaş emildiğinden, kandaki glukozun yükselmesi ve insülin ihtiyacı sukrozdan çok daha düşüktür. Su tutmayışı onu kullanışlı yapmaktadır. Sakızlarda toz pudra

olarak kullanılarak, ambalaja yapışması önlenmektedir. Yüksek sıcaklıklarda renginin bozulmaması ilaçlarda kullanılmasını sağlamaktadır. Ayrıca diş çürümesine neden olmamaktadır.

İsomalt (2 kalori/g) sukrozdan yapılan, 1960 yılında keşfedilmiş bir doğal tatlandırıcıdır. Beyaz kristal bir madde olup, sofr şekerıyla aynı tatta ve görünümündedir. Kandaki glukoz miktarını ve insülin seviyesini arttırmayıp, diş çürümesi yapmamaktadır.

Thaumatın marketlerde Talin ismiyle satılan ve batı Afrika bitkisinin meyvesinde doğal olarak oluşan bir proteindir. Ağırlık bazında 1600 kez şekerden tatlı olmakla birlikte molar olarak 100000 kat tatlıdır. Tadı glisirizinle aynıdır (Canımoğlu, 2005).

1879 yılında sakkarinin keşfi ile kuvvetli tatlandırma özelliği bulunan yapay tatlandırıcıların kullanılma devri başlatmıştır. Bu tarihten sonra tatlandırıcı özelliği bulunan bir çok madde bulunmuş, fakat toksikolojik özellikleri nedeniyle ancak bazılarının kullanımına izin verilmiştir. Sakkarin Birleşmiş Milletlerde 70'li yıllarda eldeki düşük kalorili tek tatlandırıcı olmuştur. Sakkarin kullanımı I. ve II. Dünya savaşları sırasında oluşan şeker kıtlığı ve şekerden daha ucuz olması nedeni ile yaygınlaşmıştır (Canımoğlu, 2005). Yiyecek ve alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra, kozmetik ürünlerinde de (ruj, diş macunu, ağız gargaraları ve hayvan yemi) bulunmaktadır. Takribi %0.1'den yüksek konsantrasyonda kullanıldığında ağızda metalik bir tat bırakır. Yıkıma uğramadan, %80-90 oranında sindirim kanalından emilerek organizmaya geçmektedir.

Emildikten sonra kana geçen sakkarin çeşitli dokulara dağılmaktadır. Fazla kanlanan organlarda (böbrek, karaciğer, akciğer) ve özellikle idrar kesesinde birikmektedir. Plasentadan da geçerek fetüs karaciğerinde birikebilmektedir. Pek çok epidemiyolojik çalışmada sakkarinle mesane tümörleri arasında bir bağ kurulamazken, Kanada'da yapılan bir çalışmada uzun dönem kullanımlarda düşük düzeyde de olsa mesane tümörlerine neden olabileceğine işaret edilmiştir (Nabors, 2001) .

1939 yılında sentezlenen yapay tatlandırıcılardan siklamat, içeceklerde ve diyet ürünlerinde kullanılmaktadır. İlk defa 50'li yılların başında Amerika'da kullanılmıştır. Sıcak ve soğuğa karşı ısıl işlemede stabilitesi değişmediği gibi, ağızda bıraktığı tatta da bir değişiklik olmamaktadır. Ayrıca sıvılarda kolay çözünmekte ve diğer tatlandırıcılarla sinerjik tatlandırma etkisi yaratmaktadır. İnsan vücudunda sindirilememektedir. Bütün dünyada 50'nin üzerinde ülkede hala kabul edilen, beğenilen bir madde olarak kullanılmaktadır. İki yıllık genel bir toksisite çalışmasının ardından, siklamatin bir metaboliti olan sikloheksaminin yüksek dozda alındığında hayvanlarda mesane kanserine neden olduğu tespit edilmiştir (Curry ve ark., 2008). Aşırı doz kullanımı, dışkı yumuşaması veya ishale neden olmaktadır. Kariyojenik değildir (Greenly, 2003).

Aspartam, aspartik asit ve fenil alaninden oluşan bir dipeptittir. Doğal olarak ette, sütte, meyve ve sebzelerde bulunmaktadır. İlk defa 1965 yılında ABD'de sentezlenmiştir. 200'den fazla insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmadan sonra 1981 yılında FDA tarafından

onaylanmıştır. İnsan vücudu sindirilen aspartamı herhangi diğer bir amino asit gibi algılamaktadır (Greenly, 2003). Şekerden tatlı olmakla birlikte, 1/200 kaloriye sahiptir. Çay, kahve, tatlı yapımı, pişmiş ürünlerde, kuru gıdalarda, kuru karışımlarda, kahvaltılık tahıllarda, sakızlarda, ayrıca kolalı içeceklerde, teneke kutulardaki meyve kokteyllerinde, donmuş günlük ürünlerde, şekerleme, nane şekeri, öksürük şurubu, süt ve aromalı yoğurtlarda ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Meyve kokularını arttırmakta ve sakızların tadının daha uzun süre ağızda kalmasını sağlamaktadır. Isıtıldığında tatlandırma özelliği bozulmaktadır. Raf ömrü altı ay olarak belirtilmektedir. Yüksek dozda glutamik asit içeriğiyle beslenen yeni doğan farelerde ciddi beyin hasarları oluşmuştur. Aspartik asit ile benzer kimyasal yapıda olduğundan yola çıkılarak, aspartamın güvenilirliği sorgulanmaya başlanmıştır. Ancak çok yüksek düzeyde kan konsantrasyonu gerektirdiği için, güvenlik aralığı hayli geniştir. Hayvanlar üzerinde yapılan toksikolojik çalışmalar günlük 4 gr/kg'a kadar ki dozlarda aspartamın zararlı etkisinin olmadığını göstermiştir (Canımoğlu, 2005; Kroger ve ark., 2006).

Yapay bir tatlandırıcı olan asesulfam, Potasyum (Ace-K) 1967'lerde bulunmuştur. Doksandan fazla klinik çalışma, sağlık üzerine olumsuz bir etkisi olmadığı ve güvenilir olduğu sonucuna vardığından, FDA kullanımına 1998 yılında onay vermiştir. Raf ömrü 3-4 yıl olup, özellikle kuru gıdalarda, örneğin; hazır kahve, sakız, hazır çaylarda, tatlılarda, pişmiş gıdalarda, şekerlemelerde, öksürük şuruplarında, sakızlarda, günlük ürünlerde kullanılmaktadır. Aynı zamanda alkolsüz

içeceklerde, Şekerlemelerde, diş macunlarında, ağız gargaralarında ve çeşitli farmakolojik preparatlarda da kullanılmaktadırlar (Dönmez, 2008).

Sukrolaz kalorisiz, kuvvetli, 1976'da bulunmuş bir yapay tatlandırıcıdır. Avrupa ölkelerinde kullanılmasına izin verilmemektedir. Kullanımına, FDA tarafından 1998 yılında izin verilmiştir. Şekerden elde edilen tek suni tatlandırıcıdır ve 3 hidroksil gurubu yerine 3 klor atomu konarak elde edilmektedir. 20 yıldır 100 ün üstünde çalışma gerçekleŐtirilerek kanser, genetik bozunma, gebelik ve üreme, bağışıklık sistemi, merkez sinir sistemin veya metabolizma ile iliŐkili herhangi bir güvenlik riski oluŐturmadıđı kanıtlanmıştır. Vücutta birikmeyip, metabolize olmayıp, değişmeden çıkmaktadır. Tip 1 ve 2 diyabetlerde glukoz seviyesini etkilememesinin nedeni vücut tarafından karbonhidrat veya Şeker olarak fark edilmemesi ya da tanınmamasıdır. Alkolsüz içecek, sıcak çikolata, meyveli içecek, Akçaağaç Şurubu ve elma sosunda kullanılmaktadır (Kroger ve ark., 2006).

NutraSweet firmasının ürettiği Neotam FDA tarafından pek çok hayvan ve insan denemelerinin ardından Haziran 2002 tarihinde onaylanmıştır. Neotam, 2 amino asit, L-aspartik asit, L-fenilalaninin neoheptyl grupları ile metil ester gruplarının birleşmesiyle oluşmuştur. Isıya dayanıklı, beyaz kristal toz yapıda, çok kuvvetli tatlandırma etkisi vardır. Vücutta hızlı metabolize olup, diŐkı ve üreyle tamamen atılır. Neotam ile tatlandırılmıŐ bir iekte oluşan metanol miktarı, domates suyunun ürettiğiyle kıyaslanırsa 200 kat daha az olmaktadır (Nabors, 2001).

Lycasin, (3 kalori/g) hidrojenlenmiş nişasta hidrolizati, renksiz, kokusuz ve sıvı halde bir tatlandırıcıdır. Sert şekerlemelerde, lolipop ve pastillerde kullanılmaktadır. Sukrozdan daha tatlı olsada çürük önleyici olduğu bildirilmektedir. Hidrojenize nişasta hidrolizatları (HSH) hidrojene glukoz, sorbitol, maltitol şuruplarını içermektedir. Uzun yıllardır gıda endüstrisinde besleyici bir tatlandırıcı olarak kullanılmakta olup, mısır, buğday veya patates nişastasının kısmi hidrolizi ve hidrojenasyonundan üretilmektedir. Glukoza göre düşük glisemik potansiyele sahiptir. Kolay karışır, kötü tatları maskelemede kullanılmaktadır (Kroger ve ark., 2006).

2.2. Doğal Tatlandırıcı Olarak Kullanılan bir Bitki: *S. rebaudiana* Bertoni

2.2.1. *S. rebaudiana*'nın Botanik Özellikleri

Eupatorieae sınıfının Asteraceae (Compositae) familyasından olan *S. rebaudiana*, doğada deniz seviyesinden 500-3500 m yüksekte bulunur ve uzun ömürlü bir çalı bitkisidir. Bu ailenin içerdiği bilinen bitkiler arasında karahindiba, ayçiçeği, radika yer almaktadır. 220-230'a yakın türü vardır. Bunlardan sadece %50'si ent-kaurenoid diterpen glikozit biriktirebilmektedir. Tadı en yoğun olan *S. rebaudiana* türüdür. Tatlı yaprakları 2-3 cm'ye kadar uzayabilmektedir. Nemli ortamda ve 25°C 'de, tohumdan (%85 verimle) veya fidandan yetiştirilmektedir (<http://www.stevya.com.tr>, 2007). Sadece batı Hindistan ve Amazonlarda yetişmediği bildirilmiştir (Kinghorn, 2002). Bitkinin boyu 1m'ye kadar

çıkabilmektedir (Sivaram ve Mukundan, 2003). Yaprakların tadı hasat zamanına, büyüme koşullarına, ekstraksiyon ve değerlendirilme koşullarına bağlıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *S. rebaudiana* bitkisi (<http://www.stevia.com.tr>, 2009)

Taksonomik sınıflandırması ilk olarak 1905 yılında botanikçi Bertoni tarafından yapılmış, onun adını almıştır. *S. rebaudiana* Bertoni bitkisinin ana vatanı Güney Amerika'nın Paraguay civarındaki Amambey tepeleri olup, Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Brezilya, Meksika, Singapur, Endonezya ve Malezya'da yıllardır yetiştirilmektedir. Günümüzde ise Rusya, Çek Cumhuriyeti, Hindistan, İsrail, Ukrayna, İngiltere, Filipinler, Kanada, Havaii, Kaliforniya ve Güney Amerika'nın tüm yörelerinde plantasyonu yapılmaktadır (Guens, 2003; Sivaram ve Mukundan, 2003). Oldukça verimsiz topraklarda bile yetişebilmektedir. Bitkinin ticari amaçlı üretimi 6 yıldır yapılmaktadır (Şekil 2.2). Yılda 5 kez hasadı yapılabilmektedir. Kökleri yerinde bırakılarak, bitkinin tekrar yenilenmesi sağlanmaktadır. Bir metre yüksekliğindeki bitkinin kuru

ağırlığı ortalama 70 g , yaprakların kuru ağırlığı 15 ile 35 g arasında değişmektedir (<http://www.eustas.org>, 2006). Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın pozitif bitkiler listesinde 2004 yılından beri yer almaktadır (<http://www.stevia.com.tr>, 2009).



Şekil 2.2. Paraguay'da büyük ölçekli plantasyonu yapılan *S. rebaudiana*'nın ticari üretimi (Camila, 2007).

S. rebaudiana yapraklarıyla ilgili çok ilginç bir çalışmada, Soejarto ve arkadaşları (1982) 62 yaşındaki yaprakların tatlılık potansiyelini ve hissini sürdürdüğünü göstermişlerdir. Buda kuru halde muhafaza edilip, depolanmış *S. rebaudiana* yapraklarının tatlı glikozit içeriğinin dayanıklılığını göstermektedir (Soejarto ve ark., 1982).

2.2.2. Yaprak Ekstresinin Kimyasal Bileşimi

S. rebaudiana'nın yaprak ekstresinde 100'ün üzerinde bileşen tanımlanmıştır. Toplam steviol glikozid miktarının yaprakta 5900 µg/g kuru ağırlık, gövdede ise 1500 µg/g kuru ağırlık olduğu tespit edilmiştir (Bondarev ve ark., 2001). *S. rebaudiana* yapraklarındaki en önemli diterpen glikozidler steviozit (%5-18), rebaudiozit A (%2-4), rebaudiozit C (%1-2), dulkosid A (%0.4-0.7) olmaktadır (Kinghorn, 2002). Bondarev ve arkadaşları (2001) *in vitro* kültürde ürettikleri bitkinin sap ve gövdesindeki steviol glikozid miktarının, yapraktan az olduğunu belirtmişlerdir. Steviol glikozitlerin kimyasal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmektedir. Yaprakları %16 protein ve %2.6 yağ içermektedir.

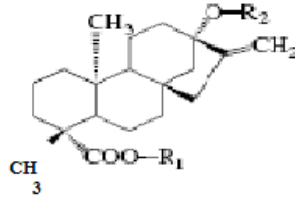
Steviol glikozitlerin avantajlarından bazıları:

- *toksik olmaması,
- *kalorisiz olması,
- *ısıya dayanıklı,
- *fermente olmayan ,
- *aroma arttırıcı,
- *%100 doğal,
- *ağızda acı tad bırakmaması,
- *kariyojenik (çürük yapma) etkisi olmaması,
- *çocuklara bağımlılık yapan bir tatlandırıcı olmaması,
- *yapraklar ve steviol glikozitlerin pişirilebilmesi,

*sadece az miktarda kullanılmasının yeterli olmaması,

*çoğu Japon gıda ürünlerine eklenen sodyum klorürün acılığını bastırmasıdır.

Steviozid ilk olarak Japonya’da turşularda, salamura ve tuzlu gıdalarda, rebaudiozid A ise içecek formülasyonlarının içine katılmıştır (İkan, 1999).



Adı	R ₁	R ₂
1. Steviol	H	H
2. Steviobiozid	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
3. Steviozid	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
4. Rebaudiozid A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
5. Rebaudiozid B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
6. Rebaudiozid C (dulcoside)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
7. Rebaudiozid D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
8. Rebaudiozid E	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
9. Rebaudiozid F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
10. Dulkozid A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)

Şekil 2.3. *S. rebaudiana*'nın önemli glikozitlerinin kimyasal yapısı;Glc=Glikoz (Guens, 2003).

Rebaudiozit A, B, C, D, E ve F guruplarındaki R₂'de ilk β -Glikoz'un 3. karbonuna ilave bir şeker parçası eklenmiştir (Şekil 2.3). Rebaudiozit F'de bir β -Glikoz β -Xyl (Ksilen) ile yer değiştirmiştir. Tatlılık derecesi, türe ve büyüme koşullarına göre kuru yaprak ağırlığının % 4-20 arasında değişmektedir. Steviozit, %0.4'lük sukroz çözeltisinden yaklaşık 300 kat daha tatlıdır. Steviol biyosentezinde, önce 2-C-Metil-D-eritritol-4-fosfat yolu ile aglikon steviol oluşmaktadır. Tüm terpenoidlerin oluşumu bitki plastidlerinde gerçekleşmektedir. Steviol biyosentezi, *ent*-kaurenate oluşumuna kadar giberellinlerin (bitki hormonu) biyosenteziyle benzerdir. *S. rebaudiana*'daki 13-hidroksilaz varlığında gerçekleşen reaksiyon ile *ent*-kaurenate 13-pozisyonuna gelerek steviol oluşmaktadır. Ardından, hemen steviol transglikolasyonu ile steviolmonosid, steviolbiosid, steviozit ve rebaudiozit A oluşmaktadır (Bondarev ve ark., 2001; Guens, 2003).

Rebaudiozit A'nın yapısında ilave bir glikoz birimi bulunduğu için, sudaki çözünürlüğü steviozit'den daha iyidir. Çizelge 2.1'de tüm glikozitlerin suda çözünürlüğü verilmiştir. Steviozit 100°C 'ye kadar dayanıklı olup erime sıcaklığı (Mp) çizelgede belirtilmiştir. Güçlü bazik şartlarda (pH 10'un üstünde) yapısında çözülme başlamaktadır. Buna rağmen güçlü asidik şartlardaki (pH 1) konsantrasyonunda önemli bir düşüş saptanmıştır. Ayrıca, askorbik asitli ortam konsantrasyonunda azalmaya neden olmuştur. Her iki glikozitin bulunduğu 37°C'de asitlendirilmiş içeceklerde dayanıklılığın en az 3 ay kadar korunduğu belirtilmiştir. Katı steviozitte ise 140°C'yi geçince bozunma tespit

edilmiştir. Suda çözünen vitaminlerle 80°C 'de ve 4 saat inkübasyon sonrasında önemli bir değişiklik olmamıştır. Diğer düşük kalorili şekerlerle oda sıcaklığında ve 4 ay sulu çözeltide bekletildiğinde, herhangi bir etkileşim gözlenmemiştir. Düşük asidik değerlerde organik asit çözeltisinde dayanıklılık gözlenirken, kahve ve çay içinde çok küçük bir değişim saptanmıştır (Kroyer, 1999) .

Çizelge 2.1. *S. rebaudiana* yaprağındaki 8 tatlı *ent*-kaurene glikozit'in fiziksel ve çözünürlük verileri (Kinghorn, 2002).

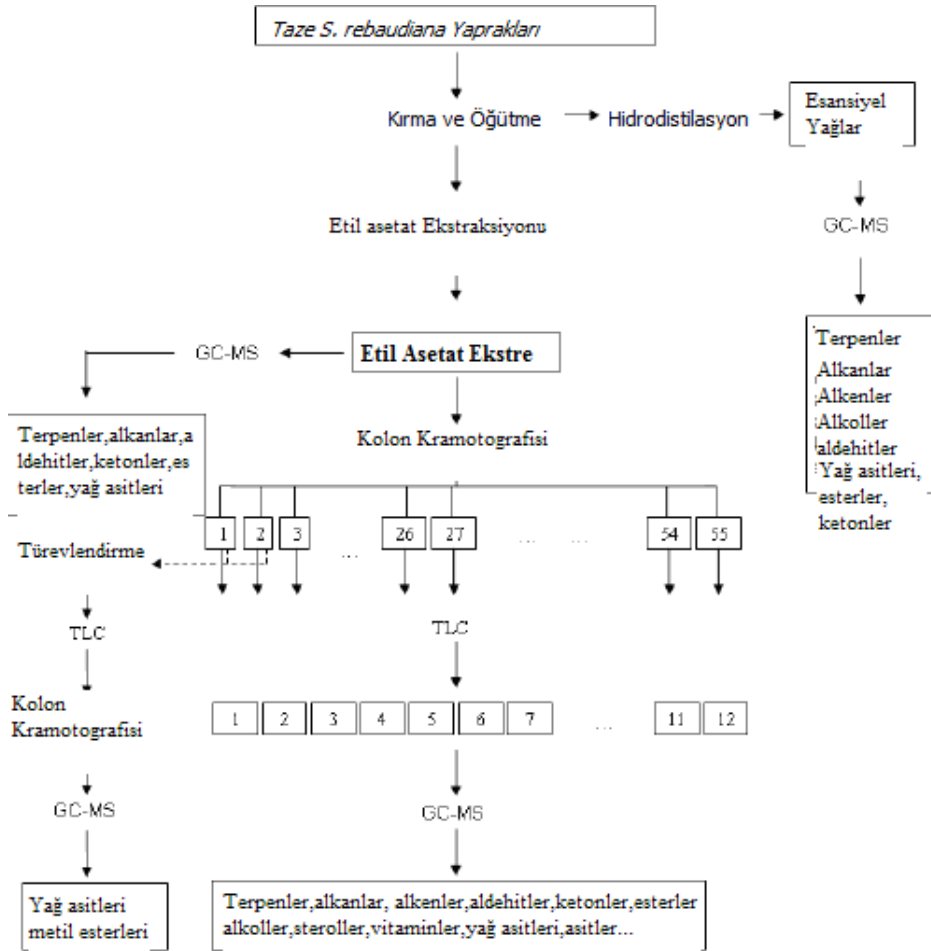
Bileşik	Mp(°C)	Spesifik devir D 25 (derece)	Moleküler Kütle	Suda Çözünürlük (%)
Steviozit	196-198	-39.3	804	0.13
Rebaudiozit A	242-244	-20.8	966	0.8
Rebaudiozit B	193-195	-45.4	804	0.1
Rebaudiozit C	215-217	-29.9	958	0.21
Rebaudiozit D	283-286	-22.7	1128	1
Rebaudiozit E	205-207	-34.2	966	1.7
Steviolbiozit	188-192	-34.5	642	0.03
Dulkozit A	193-195	-50.2	788	0.58

S. rebaudiana'nın içerdiği ana bitkisel kimyasallar: apigenin, austroinulin, avicularin, beta-sitosterol, kaffeik asit, kompesterol, karyofilen, kentaureidin, klorojenik asit, klorofil, kosmosin, kynarosid, daukosterol, diterpen glikozitler, dolkosid A-B, foeniculin, formik asit, gibberellik asit, gibberelin, indol 3 aseto nitril, isoquercitrin isosteviol, jhanol, kaempferol, kauren, lupeol, luterolin, polystackhosid, quercetin, quercitrin, rebaudiozit A-F, skopoletin, sterebin A-H, steviol, steviobiosid,

steviol monosid, steviozit, steviozit a-3, stigmasterol, umbelliferan ve ksanthophylllerdir. Yapısındaki besinler niacin, kromyum, çinko, mağnezyum, manganez, potasyum ve selenyum metabolizmayı düzenlemeye yardımcıdırlar (Taylor, 2005).

Kimyasal yapısıyla ilgili son yıllarda yapılan çalışmaların ilkinde Yoda ve arkadaşları (2003) SCFE teknolojisiyle elde ettikleri ekstrede 6 sınıf bileşen belirlemiştirlerdir. Bunlar esküterpenler, alkoller, labdanik diterpenler, alifatik hidrokarbonlar, steroller ve triterpenlerden oluşmaktadır. Bunlardan ana bileşen diterpenler olup, en bol olanı austrinulin'dir. Diğer yüksek düzeydeki bileşen labdanik grubu diterpenlerden jhanol olduğu saptanmıştır. Apolar bileşenlerin önemli oranında *n*-tetrakosan ve *n*-pentakosan hidrokarbonlarını içermektedir.

Diğer bir çalışmada, Markovic ve arkadaşları (2008) hidrodistilasyonla elde ettikleri essansiyal yağı GC-MS ile içerik analizi yaparak, 88 adet bileşen saptamışlardır. Bu çalışmada yağ asitleri (serbest yada estere bağlı olarak), *n*-alkanlar, *n*-alkenler, siklik alkanlar, alkoller, aldehytler, ketonlar vb. varlığı belirlenmiştir ve 50 tanesini seskiterpenler oluşturmaktadır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *S. rebaudiana* yapraklarının yapısındaki lipofilik bileşenler için izolasyon ve analiz şeması (Markovic ve ark., 2008) .

2.2.3. *S. rebaudiana*'dan Elde Edilen Glikozidler ve Biyolojik Aktiviteleri

Yapılan bir araştırmada ağızdan alınan steviozitin insan vücudunda bulunmadığı ya da oldukça az miktarda bulunduğu gözlenmiştir

(Wheeler ve ark., 2008; Mahidol ve ark., 1997). İnsan ve farklı hayvanların bağırsak sistemlerindeki sindirim enzimleri, stevioziti onun aglikonu olan steviole parçalamaktadır. Kanser yapıcı aktivite açısından, oral yolla alınan steviozitin güvenilirliği ispatlanmıştır. Albino sprague-dawley sıçanlarında yapılan çalışmalarda steviozit veya rebaudiozit A'nın dış çürüğüne yol açmadığı gözlenmiştir. Buna rağmen, tatlandırıcı amacıyla kullanılan, konsantrasyonun oldukça düşük olduğu durumda eğer çok yüksek konsantrasyonda *S. rebaudiana* ekstresi kullanılırsa bakteri gelişimini azalttığı belirtilmiştir. Gebelik üzerine, üreme performansına, fetüslerin sayısına, bebek gelişimine zararlı bir etkisi yoktur.

Steviozit'in kabul edilen günlük tüketim miktarı (acceptable daily intake; ADI) 7.9 mg steviozit/kg vücut ağırlığı olarak hesaplanmıştır. Belçika'da tüm gıdalarda kullanımı kişi başına düşen toplam şeker tüketimini yaklaşık 135 g/gün olarak belirlenmiştir. Örneğin, 65 kg olan bir insanın 513 mg/gün steviozit'e ihtiyacı vardır. Fakat bu en az miktardır ve 793 mg/kg vücut ağırlığına kadar konsantrasyonlarda araştırmalar yapılmıştır (Guens, 2003; eustas.org, 2006). Guens, (2003) *S. rebaudiana* ve steviozit'in tatlandırıcı olarak güvenli olduğunu, hem diyabet hastaları hemde fenil ketonüri hastaları için uygun olduğunu belirtmiştir. Ayrıca kilo vermek amacıyla obez kişilerde diyetle şeker ilavesi olarak kullanımı uygun bulunmuştur. Herhangi bir alerjik reaksiyona yol açmamıştır. Steviozit aspartam, siklamat ve asesulfam K'ya eklendiğinde sinerjik etki gösterir. Fakat, sakkarine sinerjik değildir (Nabors, 2001).

Kimyasalların özelliklerini anlatırken değindiğimiz rebaudiozit A tadı yoğun ve en dayanıklı bileşendir. Yüksek miktarda rebaudiozit A içeren ürünler “ *rebiana* ” olarak bilinmektedir. Steviozit’in acı tadı *rebiana*’da olmadığından içecek sektöründe tercih edilmektedir. Örneğin, günümüzde Coca Cola, Beatrice Gıda, Cargill, Pepsi Co gibi uluslararası firmalar da gıda tatlandırıcısı olarak *rebiana* kullanmaktadırlar (Voith, 2008).

Curry ve Robert’ın (2008) sonuçlarında, insanlar *rebiana*’yı zamanla vücut ağırlığının düşmesinin ve düşük kalorili diyetin yapılmasına imkan verdiği için yüksek dozlarda tüketmeye yönelmiştir. Bunun nedeni, serum safra asidinin ve kolesterolün düşmesi, karaciğer yoluyla rebaudiozit A’nın yüksek düzeyde atılımından dolayı safra asidi metabolizmasında fizyolojik değişiklikler olmasıdır. Diğer tüm karaciğere ait (hepatik) fonksiyonel test sonuçları ve karaciğer histopatolojisi normal limitlerde çıkmıştır.

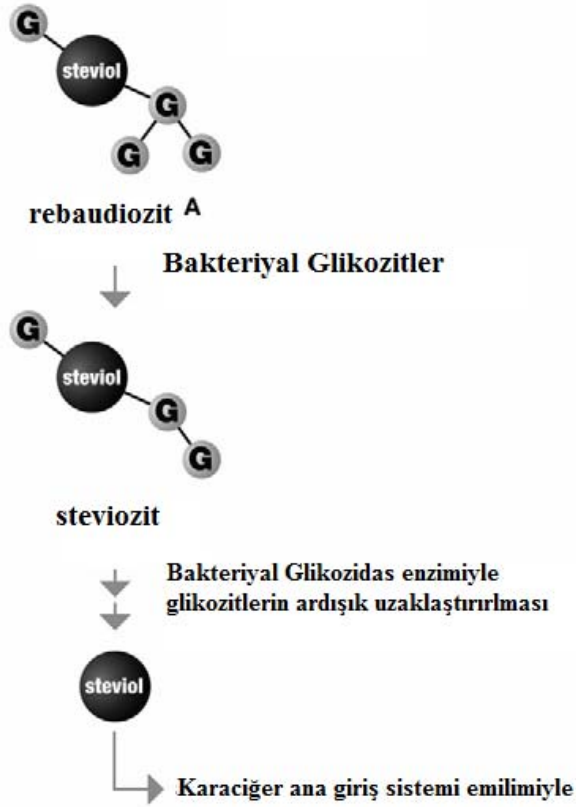
Son yıllarda, dünyada insan ölüm sebeplerinin ilki kanser, ikincisi kalp hastalıkları ve 3. olarakta şeker hastalığı gelmektedir. Şeker hastalığı (Diyabet) iki türlü olup, Tip 1 ve 2 ‘dir. Tip 1 diyabetlilerin %5-10 ‘unu oluşturur, gerisi Tip 2’dir. Vücut insülin üretmez, sıklıkla çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülmektedir. Hayatta kalmak için günlük insülin enjeksiyonu yapılmak zorundadır. Tip 2 ise ileri yaşlarda oluşup, obezlerde ve egzersiz yapmayan, genelde hareketsiz yaşam tarzına sahip kişilerde yaygın görülür. İnsüline bağımlı değildirler, vücutları yeterli kadar insülin üretmez yada emiliminde bir sorun yaşarlar. *S. rebaudiana*

ekstrelerini diyabet hastaları kadar, sağlıklı insanlar da kullanmaktadır (Li ve ark., 2004). Ayrıca, *S. rebaudiana*'nın diyet yaparken antioksidan alınımında destekleyicidir. Obez kişilerde kilo kaybına yardımcı olmaktadır (Tadhani ve ark., 2007). Çünkü, gıdalarla alınan aşırı şeker *S. rebaudiana* ekstresi veya steviozitle yer değiştirmektedir. Bu maddelerin düzenli tüketimi kandaki şeker içeriğini, radyonükleidleri ve kolesterolü düşürmektedir (Atteh ve ark., 2008). Ayrıca hücre yenilenmesini, kan pıhtılaşmasını geliştirmekte, neoplastik gelişimini bastırmakta, kan damarlarını güçlendirmekte, kan basıncını düşürmede etkisi olmaktadır (Jeppesen ve ark., 2003; Maki ve ark., 2008; Barriocanal ve ark., 2008).

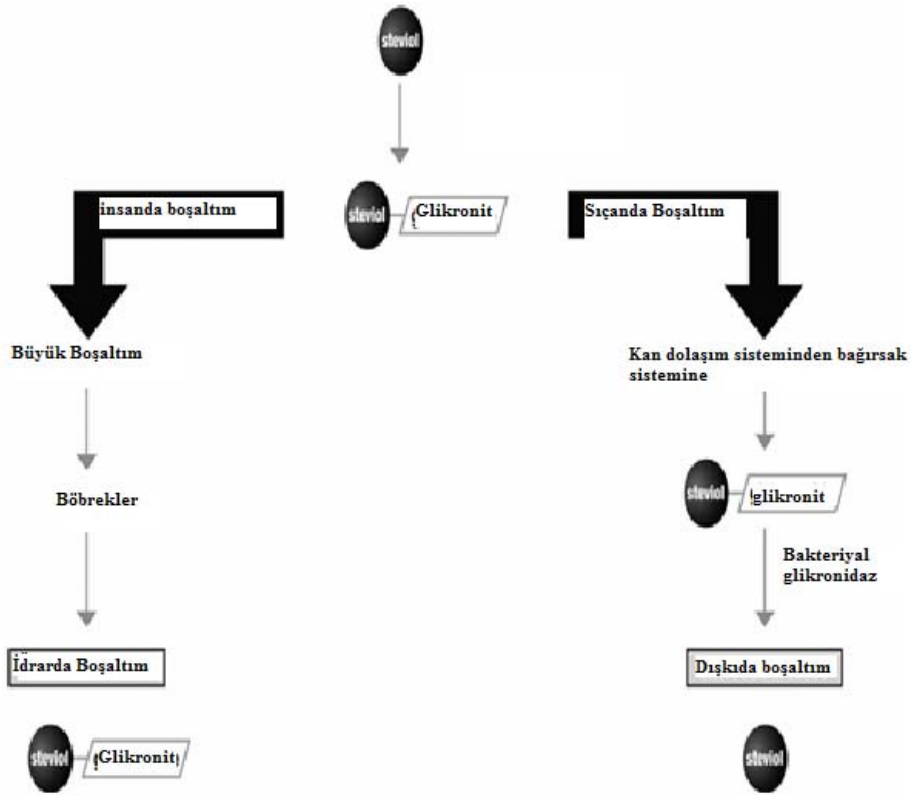
Steviozitle ve rebaudiozitle A karaciğerden safra salgılanmasını uyarır, iltihap önleyici ve idrar söktürücüdür (Toyoda ve ark., 1997). Mide ve bağırsak sisteminde ülser oluşumunu engeller (Wingard ve ark., 1980; Guens ve ark., 2003; Kochikyan ve ark., 2006). Ayrıca, Tip 2 diyabet hastalarında yüksek glisemik değeri oluşumunu engelleme (Gregersen ve ark., 2004), yüksek tansiyonu önleme (Hsieh ve ark., 2003; Feri ve ark., 2006), tümör oluşumunu baskılama, ishal önleyici ve bağışıklık sistemini güçlendirici etkisi vardır (Shar ve ark., 2008; Chatsudthipong ve ark., 2009). Kimyasal kanserojenlere karşı engelleyici ajan yapısındadır (Takasaki ve ark., 2009).

Steviozitle ve rebaudiozitle A'nın metabolizmaları farklı değildir ve steviol glikozitlere dönüşebilir. Sıçanların steviol glikozit metabolizmalarının insan metabolizmasına benzer olduğu doğrulanmıştır

(Şekil 2.5, 2.6). Toksikite çalışmalarında, dokuları tahrip etme, risk değerlerine izin verip vermemesi sonuçları temel alınmaktadır. Steviozite mutajenik bulunmamıştır. Toksikite, kanser yapıcı ve genetik toksisite konularında kısa yada uzun vadeli araştırma sonuçlarında, memeli türlerinde önemli bir toksik etki görülmemiştir (Koyama ve ark., 2003; Brusick, 2008).



Şekil 2.5. İnsan ve sıçanlarda emilimi, metabolizma ve salgılanması; kalınbağırsakta rebaudiozite A'nın steviole parçalanması (G; Glikoz) (Carakostas ve ark., 2008).



Şekil 2.6. İnsan ve sıçanlarda rebaudiozid A'nın karaciğerdeki metabolizması (Caracostas ve ark., 2008).

2.3. Tatlandırıcı Yönetmelikleri

Türk Gıda kodeksine göre, 0-3 yaş arası çocuk gıdalarında tatlandırıcı kullanılamaz. İçinde aspartam bulunan gıdalarda ise “fenilalanin ihtiva eder” ibaresinin yer alması gerekmektedir. Gelişen dünyada çürük önleyici çalışmalar ne kadar arttırılırsa arttırılsın yine de beslenmede sukrozdan yararlandığı için, tamamıyla önlenememektedir (Nabors, 2001).

Tebliğdeki tatlandırıcılar sorbitol, mannitol, izomalt, maltitol, laktitol, ksilitom, eritritol, asesulfam K, aspartam, siklamik asit, sakkarin, sukraloz, tuamatin, neohesperidin DC olmaktadır. Örneğin alkolsüz içeceklerdeki sakkarin maksimum miktarı 80 mg/l iken aspartam 600 mg/l verilmiştir. Sakkarin ile *S. rebaudiana*, sukrozdan 300 kat tatlıdır. Bu duruma göre tebliğde geçen sakkarin kullanılan ürünlerde, *S. rebaudiana*'da kullanılabilir. Sakkarin kullanılan ürünler;

a) Alkolsüz içecekler: enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz su bazlı aromalandırılmış içecekler, süt ve süt türevleri veya meyve suyu bazlı içecekler,

b) Tatlı ve benzeri ürünler: enerjisi azaltılmış veya şeker ilavesiz su bazlı aromalandırılmış tatlılar, süt ve süt türevi bazlı karışımlar, meyve ve sebze bazlı tatlılar, yumurta bazlı tatlılar, tahıl bazlı tatlılar, yağ bazlı tatlılar,

c) Şekerlemeler ve diğerleri: Şeker ilavesiz şekerler, nefes ferahlatıcı şekerlemeler, kakao veya kuru meyve bazlı şekerlemeler, nişasta bazlı şekerlemeler, kakao, kuru meyve, yağ bazlı sürülebilir ürünler, sakız, yenilebilir buzlar, dondurma, reçel, jöle, marmelat, meyve konserveleri, meyve sebze karışımları, özel beslenme amaçlı hafif fırıncılık ürünleri, TGK kilo verme amaçlı enerjisi kısıtlanmış gıdalar tebliği kapsamındaki gıdalar (400 mg/kg), TGK özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar tebliği kapsamındaki gıdalar (400 mg/kg), sıvı formatındaki gıda takviyeleri, katı formdaki gıda takviyeleri, vitamin veya mineral bazlı

şurup şeklinde veya çiğnenen gıda takviyeleri, bira, elma veya armut şarabı, distile alkollü içecekler veya şarap karışımı içecekler.

Türk Gıda Kodeksinin gıda maddelerinde kullanılan tatlandırıcılar safsızlık kriterleri tebliği’de (Tebliğ No: 2001/40) mevcut olup, tüm yapay tatlandırıcılar için değerlendirme yapılmıştır, *S. rebaudiana* ve glikozitleri bu listede yoktur. Bu tezin ekinde bir *S. rebaudiana* ürününün malzeme güvenlik verileri listesi bulunmaktadır.

Codex Alimentarius ve JECFA Avrupa birliği tarafında tatlandırıcıların özelliklerini ve analiz yöntemlerini araştıran iki kurumdur. 1995 yılındaki komisyon direktiflerinde (95/31/EC) Türk gıda kodeksindeki yapay tatlandırıcılar da mevcut olup, *S. rebaudiana* ve ekstrilerine yer verilmemiştir. Gıda katkı maddeleri, üretim yöntemleri veya yabancı hammaddeler, gıda komitesinin bilimsel değerlendirme kapsamına girmektedir. Ayrıca, malzemelerin saflık kriterlerine de bakılmaktadır.

Komite steviozit’in ve rebaudiozit A’nın *in vitro* ve *in vivo* genotoksik olmadığı sonucuna varmıştır. Ayrıca, canlı dışındaki çalışmalarda steviolün ve bazı oksidatif türevlerinin genotoksik olduğu, *in vivo* yapılan araştırmalarda kesinleşmemiştir. Komitenin 51. toplantısında, uzun süredir yapılan çalışmalar değerlendirerek steviozitin gözlenmeyen etki seviyesini (NOEL) 970 mg/kg vücut ağırlığı/ gün olarak belirlemiştir (JECFA, 2004). FAO/WHO gıda katkı maddeleri uzman komitesi (JECFA) kabul edilir günlük yeterli tüketim miktarını (ADI) 0–2 mg/kg vücut ağırlığı (bw)/gün steviol eşleniği olarak

belirlemiştir. Moleküler kütlelerini göz önüne alarak yapılan dönüşüm sonucu günde 0–6 mg rebaudiozit A/kg bw/gün tüketile bilmektedir. Planlanan sürekli kullanım miktarı ADI 0–12 mg/kg bw/gün rebaudiozit A ve 0–4 mg/kg bw/gün steviol değeri belirlenmiştir (Carakostas ve ark., 2008).

2.4. Geleneksel ve Gelişmiş Ekstraksiyon Yöntemleri

2.4.1. Çözgen Ekstraksiyonu

Çözgen ekstraksiyonunda kullanılacak çözgenin seçimi çalışılacak bitkisel materyalin fiziksel yapısına ve oksidasyona olan duyarlılığına bağlı olarak değişmektedir; *S. rebaudiana* yapısındaki glikozitler polar yapıdadır. Bazı durumlarda, yapraklar polar olmayan çözgenlerle örneğin kloroform veya hekzan ile yapraktaki esansiyel yağlar, lipidler, klorofil ve diğer polar olmayan maddelerin çözündüğü ön işleme tabi tutulmuştur. Düşük kaynama noktalı polar çözgenler (kaynar su veya alkoller; aseton, metanol, etanol, gibi) ise polar maddeler için kullanılmıştır. Ardından, ekstreye tuz veya alkali çözeltisi ilave edilerek çöktürme ile berraklaştırılmıştır. Son olarak ekstrenin konsantre edilmesi ve glikozitlerin kristalleşmesi için metanolde tekrar çözünmüştür. Kristaller nerdeyse saf steviozit olarak oluşmuştur.

Bir başka yöntemde kaynar suyla bir çok kez karıştırarak (örn: soxhlet veya sonikatörde) yıkama uygulanmıştır. Sonra filtrasyon ve temizlemenin ardından sıvı kromatografi analizi yapılmıştır. Bu

uygulamada su yerine etanol kullanıldığında aynı ekstraksiyon verimi daha kısa sürede elde edilmiştir (Pol ve ark., 2007).

Geleneksel metotlardan biri olan çözen ekstraksiyonu (diğeri distilasyondur), düşük ilk yatırım ve işletme maliyetleri nedeni ile yaygın olarak kullanılmaktadır. Çözen ekstraksiyonunun diğeri dezavantajları, fazla miktarlarda çözen sarfiyatı, daha düşük verim, ürün saflığı; son üründe iz miktarda çözen kalıntısı bulunabilmektedir. Buna rağmen, ürün saflaştırılabilir ve bu maliyeti artırmaktadır. Ayrıca, proses süresinde 2/3 artış, yüksek işçilik maliyeti gerektirir. Bu yöntemle elde edilen ürünlerin ilaç ve gıda sanayilerinde kullanılabilmesi için ilave saflaştırma işlemlerine gerek duyulmaktadır. Ekstraksiyonun ardından filtrasyon ve temizleme işlemleri; adsorpsiyon kromatografisi, koagülasyon, renk giderme, elektroliz, iyon değişimi, çöktürme, ve/ veya çözen ayırmanın biri veya bir kaçıyla ayırma gerçekleştirilir.

Dezavantajı, katı/sıvı ekstraksiyonunun ardından gelen basamakla sıvı/sıvı saflaştırma sonucu elde edilen ekstrenin tadımından sonra ağızda kalan acımsı tattan dolayı, ticari olarak kullanım alanlarına kısıtlama getirilmiştir ve içeceklerde kullanılamamıştır. Nedenleri araştırılmış, alternatif yöntemler aranırken Tan ve arkadaşları (1988) Japon patenti olarak, SCFE ile üretimi gerçekleştirmiştir. Elde edilen üründe steviozitol/rebaudiozitol A oluşumu 3/1 olarak bulunmuş (Çizelge 2.2). Diğeri bir deyişle, bu yöntemle elde edilen ekstrede geleneksel çözen ekstraksiyonu suyla veya alkollerle yapıldığında oluşan ekstredeki rebaudiozitol A miktarından çok fazla miktarda rebaudiozitol A oluşmuştur.

Rebaudiozit A steviozit'den %50 oranında daha tatlı olduğu dikkate alındığında ağızda daha hoş bir tad bırakmıştır. Bu yöntemle elde edilen ekstrelerin tadları daha iyi olduğundan rahatlıkla içeceklerde kullanılmıştır.

Çizelge 2.2. Ekstraksiyon yöntemine göre Steviozit ve rebaudiozit A miktarının kıyaslaması (Pasquel, 2000).

Deney Koşulları	Oransal Miktar	
	Steviozit	Rebaudiozit A
SCFE, 120 bar, 16°C, 4, 97.10 ⁻⁵ kg solvent/s	3	1
Geleneksel Ekstraksiyon		
Ön işlemlenmiş Yapraklar	10	1
İşlenmemiş Yapraklar	11	1

Diğer alternatif ekstraksiyonlar katı faz (adsorbant) ekstraksiyonu, mikrodalgayla desteklenmiş ekstraksiyon, ultrasonikle desteklenmiş ekstraksiyon, süperkritik ekstraksiyon ve yüksek basınç ekstraksiyonudur (Adil, 2006).

Bunlardan yüksek basınç ekstraksiyonuna örnek bir çalışmayı, Pol ve arkadaşları (2007) gerçekleştirmiştir. Steviozit miktarının sıcaklıkla değişimine dikkat çeken bir çalışma olmuştur. Daha önce yayınlanmış makalelerin çoğunda, en yüksek ekstraksiyon verimi 200 bar, 30°C 'de kritik sıcaklığın altında elde edildiği göz önüne alınmıştır. Sonuçta 110°C su ve metanol kullanarak steviozit ekstraksiyonunda optimum sıcaklık

olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyon basınçlandırılmış akışkan ekstraksiyonu olarak adlandırılıp, 100 mg *S. rebaudiana*, 50 dakika sürmüştür. Hem metanol hemde su çözen olarak 8 ml/dak akış hızıyla kullanılmıştır. Ekstraktöre nitrojen verilerek hava ortamdan uzaklaştırılmış ve basınç 50 bar'a çıkarılmıştır. Ardından, sıcaklık 110°C'ye yükselirken ekstraksiyon verimi de yükselmiş ve 110 mg/g'a ulaşmıştır. Sıcaklık artmaya devam ettikçe, 160°C'ye gelindiğinde ekstraksiyon verimi 80 mg/g'lara düşmüştür.

US 2006/0142555A1 nolu patent'te yapraklar 20°C'den 50°C'ye ısıtılıp, 20 ile 400 elek numaralarında pulvarizatörde öğütülmektedir. Minerallerinden arınmış su, çözen olarak kullanılmış, ekstraktöre verilerek ekstraksiyon yapılmış ve 50°C'den 120°C'ye direk veya indirek buharla ortam ısıtılmıştır. Ekstraksiyonun başladığı 0.25 saatten 4 saat'e kadar buhar basıncı 1 ile 8 kg/cm² arasında tutulmuştur. Bitki materyali filtrelenmiş, sıvı ekstraktan ayrılmıştır. Tuzlar kullanılarak çöktürme gerçekleştirilip, iyon değişim reçineleriyle berrak ekstrakt elde edilmiştir. Son olarak işlemde geçirilmiş filtrat kurutulup, %40-%70 steviozid içeren ürün elde edilmiştir (Jonhala ve ark., 2006).

Günümüzde, yeni yönetmelikler kapsamında, güvenli kabul edilen çözenlerin sayısının ve tolerans kalıntı düzeylerinin gittikçe daralması, artan enerji maliyeti ve pek çok bileşenin ısısal işlemlere karşı dayanıksız olması sebebiyle temiz, etkin ve üründe ısısal bozunmaya sebep olmayacak ayırma teknikleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bunun sonucunda, bitkisel materyallerin ayırımında **“Süperkritik Akışkan**

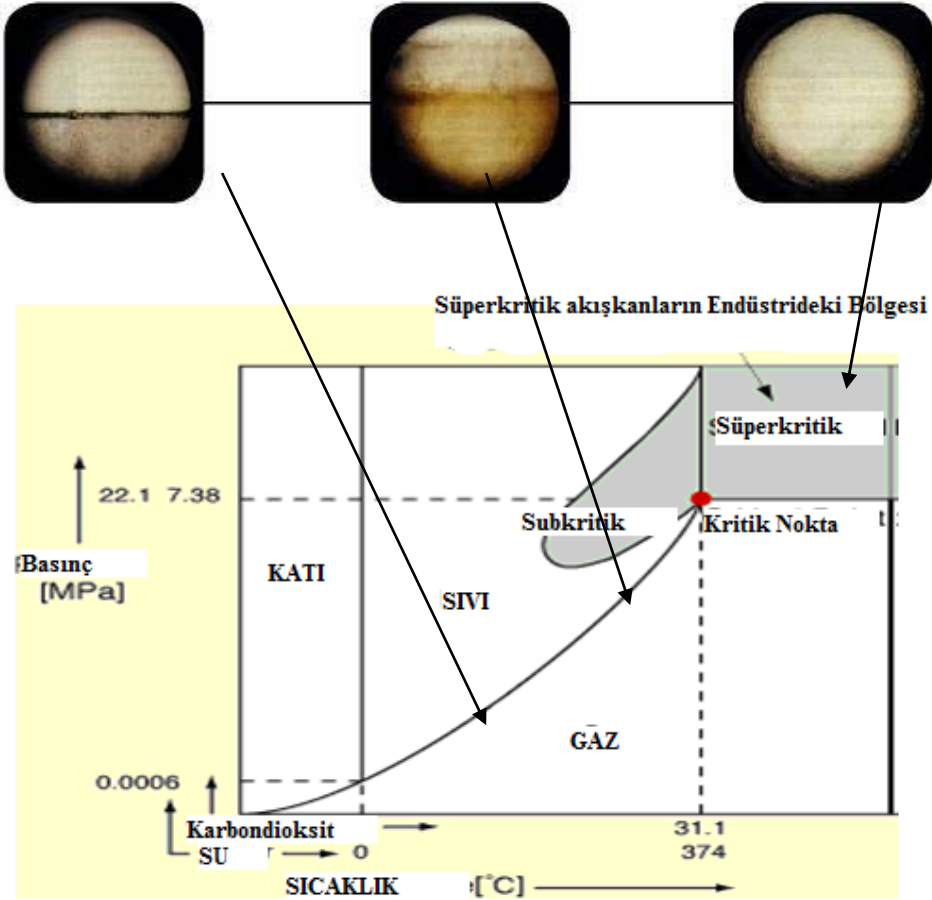
Ekstraksiyonu” teknolojisi çekici bir alternatif olmaktadır (Çeliktaş, 2005).

2.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu (SCFE)

2.4.2.1. Süperkritik Akışkanlar

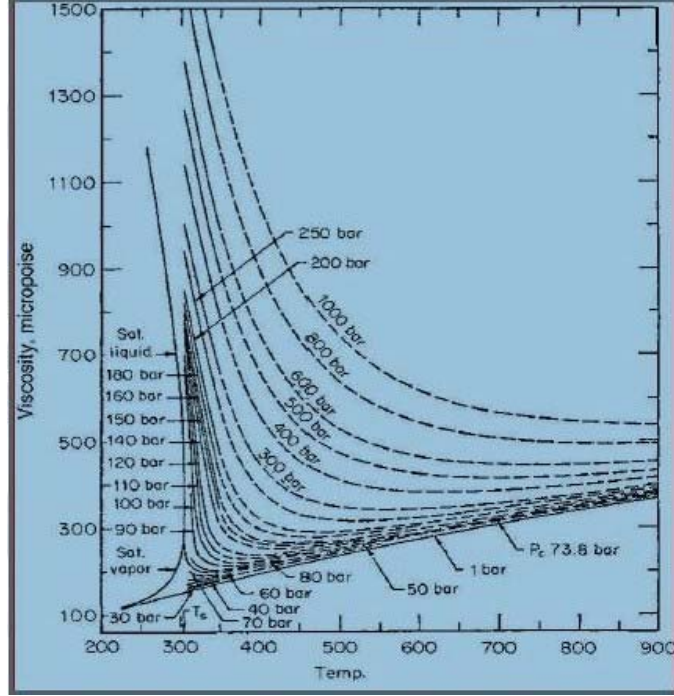
Süperkritik akışkanlar (SCF) 21. yüzyıl için yeşil çözen olarak gelişmesini sürdürmektedir. Her bir akışkanın bir kritik sıcaklık (T_c) ve basınç (P_c) değeri bulunmaktadır. Bir akışkanın sıcaklık ve basınç değeri bu değerlerin üzerine çıkarılırsa, elde edilen akışkana süperkritik akışkan, içinde bulunduğu bölgeye ise süperkritik bölge denmektedir (Şekil 2.7). Süperkritik akışkanlar taşıdıkları özellikler bakımından sıvılar ve gazlar arasında bulunmaktadır. Yoğunlukları sıvılara, viskoziteleri ise gazlara yakın özellik göstermektedir. Sıcaklık ve basınçtaki küçük değişimler süperkritik akışkan özelliklerin büyük oranda değişmesine neden olmaktadır.

Kritik nokta akışkanın gaz sıvı dengesindeki yüksek sıcaklık ve basıncı göstermektedir. Süperkritik akışkanların en büyük üstünlüğü faz dengesi ve transport özelliklerinin basınç, sıcaklık veya her ikisinde çok az bir değişiklik ile ayarlanabilmesidir. Fiziksel özelliklerin kolayca kontrol altında tutulabilmesi ve değiştirilebilmesi nedeniyle süperkritik akışkanlar ekstraksiyon, sentez, mikrokapsülleme ve mikronizasyon süreçleri gibi pek çok uygulamada kullanılmaktadır.



Şekil 2.7. CO₂ ve Suyun Basınç-Sıcaklık diyagramı ve fonksiyonel bölgeler
(Döker, 2007).

Düşük viskozite ve yüksek difüzyon katsayıları kütle transferini artırmakta ve ekstraksiyon prosesine ivme kazandırmaktadır. Viskozitenin sıcaklık ve basınçla ilişkisi Şekil 2.8'de verilmiştir.

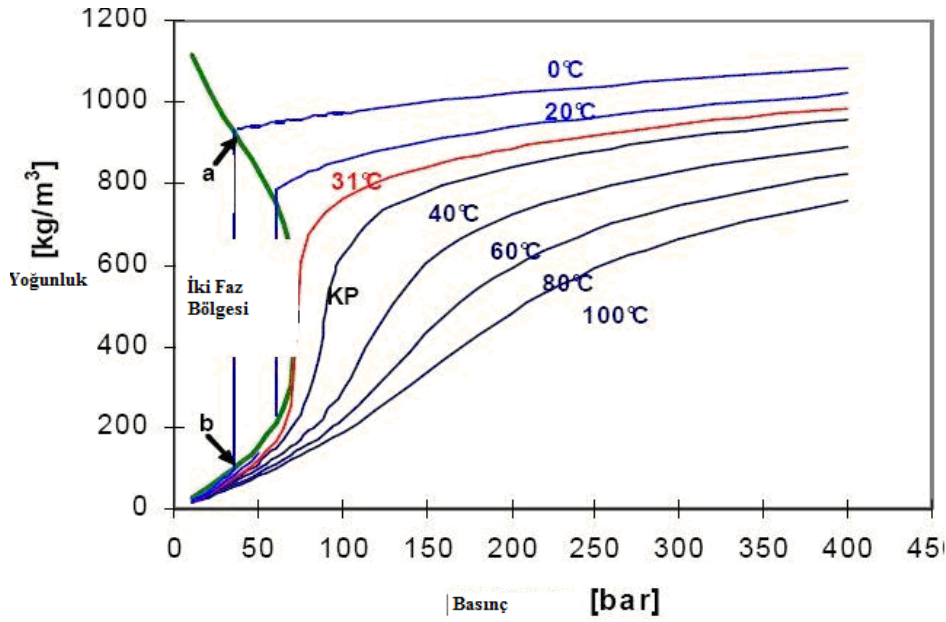


Şekil 2.8. CO₂'in viskozitesinin sıcaklıkla(K) değişimi, farklı basınçlardaki (bar) eğrileri (Gamse, 2009).

Süperkritik akışkanlar organik çözenlerle kıyaslandığında ayarlanabilir yoğunluğu olması iyi bir çözen kapasitesi yanında yüksek difüzyon içinde, yeterince düşük değere sahiptir. Gaz, sıvı ve süperkritik akışkanın (SCF) termodinamik özellikleri Çizelge 2.3'de kıyaslanmaktadır. Yüzey geriliminin sıfır olması, kompleks maddelerin tamamen ıslatılmasına izin vermektedir. Bir süperkritik akışkanın çözen kapasitesi yoğunluğuna göre tanımlanmaktadır. Bu da sıcaklık ve basıncın değiştirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Akışkan, basınçta yapılan artışla kritik nokta civarında yer almaktadır.

Çizelge 2.3. Gaz, sıvı ve süperkritik akışkanın (SCF) termodinamik özellikleri.

Faz	Yoğunluk kg/m^3	Viskozite mPas	Düfilyon katsayısı $(\text{m}^2/\text{s}) * 10^4$	Yüzey Gerilimi dynes/cm
GAZ	1	0.1	0.1	45-60
SCF	~500	0.003-0.1	0.0001	0
SIVI	1000	1	0.00001	n/a



Şekil 2.9. SC-CO₂'nin basınçla yoğunluğunun değişimi, farklı sıcaklıklardaki eğrileri (Gamse, 2009).

Sıcaklık ve basınçta küçük bir değişiklik yoğunlukta büyük bir değişime neden olur. Yoğunluk ise artan basınç ve azalan sıcaklıkla artış göstermektedir (Şekil 2.9). Bir gaz, kritik sıcaklığın üzerine çıktığında basınç artırılarak sıvılaştırılamamaktadır. Bir bileşenin yoğunluk, dielektrik sabiti gibi fiziksel özellikleri gaz veya sıvı fazdan süperkritik faza geçerken değişmekte olup fazlara ait kesin sınırlar gözlenmemektedir. SCF 'un yüksek yoğunlukta olması ekstraksiyonda içinden geçeceği katı maddenin daha fazla çözünmesiyle sonuçlanmaktadır. Normalde bu katı madde, akışkanın sıvı ve gaz fazında daha az çözünmektedir (Adil, 2006) .

Saf çözücü olarak süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılabilen bazı çözücüler Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Bazı süperkritik çözücülerin kritik sıcaklık, basınç ve yoğunluk değerleri (Çelikaş, 2005).

Madde	Kritik sıcaklık T_c (°C)	Kritik basınç P_c (atm)	Kritik yoğunluk ρ_c (g/ml)
Metan	-83.2	45.40	0.162
Etilen	9.3	49.64	0.218
Kloroflorometan	28.9	38.68	0.579
Karbondioksit	31.06	72.83	0.468
Etan	32.3	48.16	0.203
Propilen	91.9	45.59	0.233
Propan	96.7	41.84	0.217
Amonyak	132.5	111.52	0.235
Dietileter	194.6	35.92	0.265
n-pentan	196.5	33.26	0.237

Aseton	235.0	46.40	0.278
Metanol	239.5	79.84	0.272
Benzen	289.0	48.26	0.302
Toluen	318.6	40.56	0.292
Piridin	346.9	55.56	0.312
Su	374.2	217.11	0.322
Ksenon	16.6	57.63	1.113

Sürekli yayınlar incelendiğinde çeşitli akışkanların kullanıldığı bilinmektedir. Çalışmalarda sıklıkla CO₂ kullanılmaktadır. Bunun belli başlı nedenlerinin başında inert olması, zehirli olmaması, yüksek saflıkta elde edilmesi, kokusuz olması, yanıcı ve patlayıcı olmaması, kritik sıcaklık ve basınç değerlerinin diğer akışkanlara göre düşük olması sayılabilir. CO₂ molekülü tamamıyla simetrik olup, dipol momenti mevcut değildir. Bu da özellikle apolar ve zayıf polarite gösteren bileşenleri ayırmadaki gücünün kaynağını oluşturmaktadır.

Diğer avantajları ise şöyle sıralanabilmektedir;

- düşük molekül ağırlıklı hidrokarbon ve organik bileşiklerle kolay karışabildiği için iyi bir çözücüdür.
- diğer organik çözücülerle karşılaştırıldığında uçuculuğu yüksektir (kolay geri kazanım).
- enerji sarfiyatında avantajlıdır.
- toksik, yanıcı ve korozyif değildir.
- maliyeti düşük olup, kolaylıkla ve saf eldesi mümkündür.

- bakteriostatik etki göstermektedir.
- yüksek kompressibilite (sıkıştırılabilirlik) gösterir.
- oksijensiz ortam sağladığından korozif değildir.

SC-CO₂'in küçük molekülleri çözme yeteneği vardır ve monomerlerde de yüksek çözünürlük sergiler. Ayrıca, homojen, heterojen ve polimerizasyon için çok amaçlı bir çözücü olduğu gösterilmiştir. CO₂, su gibi polar ve kuvvetli van der Waals (lipofilik faza benzemez) güçleri olmadığından, polar ve uçucu olmayan polar bileşikler çözemez. Buna rağmen, pek çok lipofilik ve hidrofilik maddeler sürekli fazda CO₂ 'de dağılmaktadır (Adil, 2006).

Çözücü niteliği ve çözme verimi açılarından ancak gerekli ve ekonomik olduğunda süperkritik gazlarla çalışılır. Bu durum için söz konusu olabilecek basınç değerleri $200 < P < 1000$ bar gibi yüksek değerlerdir. Bu basınç seviyesine ulaşabilmek için kullanılacak kompresörler çok güçlü, harcanan enerji çok fazla ve kullanılacak ekipmanların (kazan, boru vb) çok yüksek basınçlara dayanıklı olma gerekliliği, bu tür tesislerin hem imalatının, hem de işletme giderlerinin çok yüksek olmasına yol açar. Bu yüzden ancak elde edilecek ürünün bu maliyetleri karşılayabilecek kadar değerli olması durumunda ekonomik olarak uygulanabilecek bir yöntemdir (Çelikaş, 2005).

2.4.2.2. Yardımcı Çözgen Kullanımı

Karbondioksit, süperkritik akışkan ekstraksiyonunda en çok kullanılan çözgenlerden biridir. Kritik sıcaklığı (31°C) düşük olup kritik basınç (73.8 bar) değerine ulaşmak kolaydır. Saf CO₂ apolar karakterli olup, düşük molekül ağırlıklı bileşiklerle (< 250); lipidler, kolestrol, aldehytlar, eterler ve ketonlar gibi zayıf polar grupların, ekstraksiyonunda daha seçicidir ve bu bileşiklerin çözünürlükleri yüksektir. Yüksek molekül ağırlıklı (> 400) veya hidroksil, karboksil, şekerler, polisakkaritler, aminoasitler, proteinler, glikozidler ve inorganik tuzlar gibi polar grupların ise CO₂'de çözünürlükleri çok düşüktür (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Farklı bileşiklerin süperkritik CO₂ içinde çözünürlükleri (Çelikaş., 2005)

Yüksek Çözünürlük	Orta Derecede Çözünürlük	Çok Düşük Çözünürlük
Molekül ağırlıkları 250'den küçük olan ve apolar karakterli organik bileşikler	Molekül ağırlıkları 400'den küçük olan polar karakterli organik bileşikler	Molekül ağırlıkları 400'den büyük olan, son derece polar karakterli bileşenler
Uçucu bileşenler	Uçuculuğu düşük bileşenler	Uçucu olmayan bileşenler
Tiyoller, pirazinler, tiazoller, asetik asit, benzaldehit, hekzanol, gliserol ve asetatlar.	Su, terpenler, oleik asit, gliserol ve doymuş lipitler	Proteinler, şekerler, polisakkaritler, aminoasitler, inorganik tuzlar, nitratlar, vakslar

CO₂ polar bileşenlerin ekstre edilmesinde bu özelliği göz önünde alınarak proses tasarlanır ve bu özellik avantaja dönüştürülebilir. Lipofilik bir çözügen olan CO₂ içinde polar karakterli (fenolik) bileşenlerin çözünürlüğünü artırmak için, polaritesi yüksek ilave maddeler kullanılmaktadır. Daha polar karakterde olan bu çözügenlere Yardımcı çözügen denmektedir. Süperkritik gazın çözügen gücünü artırmak veya çözünürlük artışı sağlayarak ekstraksiyon basıncını düşürmek amacıyla ilave edilmektedirler. Sık kullanılan yardımcı çözügenler arasında, özellikle etanol, metanol gibi alkoller, klorlanmış hidrokarbonlar, hekzan, su, aseton, asetonitril ve formik asit yer almaktadır. İlaç ve gıda endüstrisinde yardımcı çözügenin GRAS statüsünde olması şartı aranır. Bu nedenle çoğunlukla etanol ve su tercih edilmektedir. Etanolün süperkritik akışkan CO₂ besleme debisindeki oranının kritik sıcaklık ve basınç üzerine etkisi Çizelge 2.6'da verilmiştir (Adil, 2006).

Çizelge 2.6. CO₂-etanol karışımındaki etanol oranının kritik sıcaklık ve basınç değerleri üzerine etkisi (SF-Solver Software, ISCO Inc., Lincoln, NE, USA kullanılarak hesaplanmıştır) (Adil., 2006).

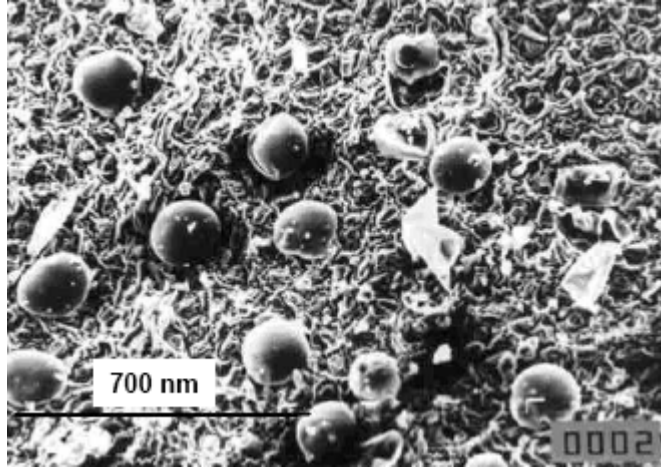
Etanol Konsantrasyonu (%wt)	Tc(°C)	Pc(bar)
0	31.1	73.8
5	42.5	73.2
10	53.7	72.7
14	62.8	72.2
17	69.5	71.9
20	76.1	71.5
100	243.3	61.3

2.4.2.3. Süper Kritik Akışkan Ekstraksiyonu

Saf bir çözücünün kritik basınç ve sıcaklık değerleri üzerindeki basınç ve sıcaklık değerlerinde yürütülen ekstraksiyon işlemi “süperkritik akışkan ekstraksiyonu” olarak adlandırılmaktadır. 100-200 ml’lik ekstraktörler laboratuvar ölçekli, $V > 200$ ml ise pilot tesis olarak adlandırılmaktadır. $V < 100$ ml ise analiz amaçlı cihazlardır. Fraksiyonel ayırma yöntemiyle, çözünürlüğü en fazla olan bileşenden başlamak üzere, bileşenler çözünürlüklerine göre sırasıyla ekstre edilen maddeden uzaklaştırılmaktadırlar. Fraksiyonlarına ayırma, kritik nokta yakınındaki bölgeden başlayıp, sistemde ekstre edilecek maddedeki en düşük çözünürlüğe sahip bileşenin çözünürlüğünün sağlandığı sıcaklık ve basınç değerlerine ulaşılması işlemi olarak tanımlanmaktadır. İşlem sonunda fraksiyonlar ayrı ayrı ayırma tanklarından alınmaktadır.

Toplam ekstraksiyon bölgesinde süperkritik akışkanın çözünürlüğü yüksek, seçiciliği ise düşük olmaktadır. Yani en yüksek sıcaklık ve basınç değerlerinde çalışılmaktadır. CO_2 ile böyle bir çalışmada elde edilen ürünler genellikle koyu renklidir. Üründe koyu rengi oluşturan pigmentler istenmiyor ise biraz daha düşük basınçlarda yani toplam renksiz ekstre bölgesinde çalışılmaktadır. Deodorizasyon bölgesinde ise sıcaklık ve basınç kritik olan bölgeye yakındır ve CO_2 ’in seçiciliği yüksek, çözünürlüğü ise düşük olmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonununun pahalı olması nedeniyle, su buharı kullanımının yeterli olduğu işlemlerde onun yerine kullanılmaları ekonomik olmamaktadır (Çeliksaş, 2005).

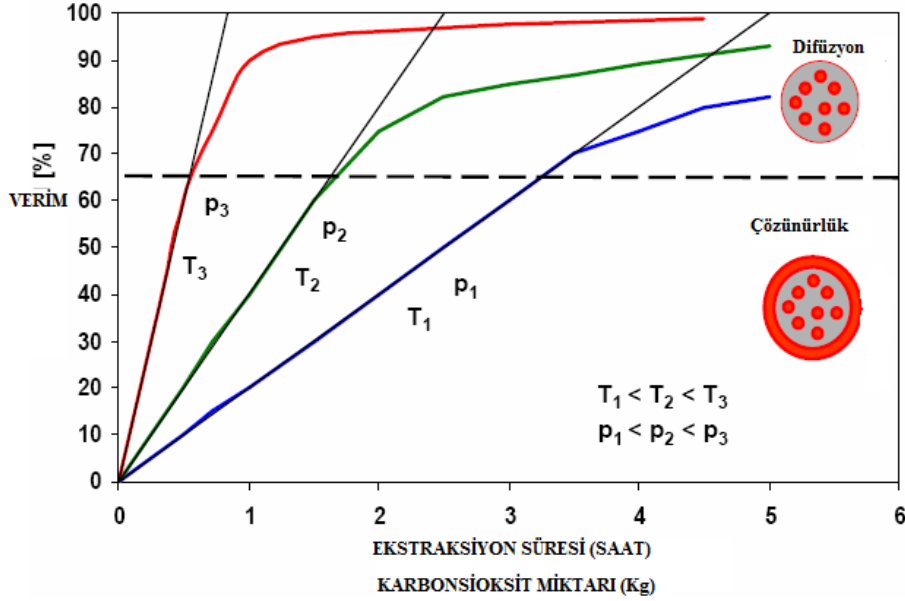
Günümüzde, temelde tıbbi ve aromatik bitkilerden elde edilen, nütresötikler, fonksiyonel gıda bileşenleri ve yenilikçi ürünlerin oluşturulmasında kullanılabilen etkin bir teknolojidir. Bitkisel materyal genellikle kuru toz haldedir. Optimum partikül boyutu 0.4-0.8 mm arasındadır. Katı matrisinde ekstrakte edilecek madde tanecik şeklinde dağılımı Şekil 2.10'da görülmektedir.



Şekil 2.10. Katı matriste ekstrakte edilecek maddenin tanecik şeklindeki dağılımı (Gamse, 2009).

Yüksek ekstraksiyon basıncı genellikle süperkritik akışkanın yoğunluğunu yükseltir ve bu da ekstrakte edilecek maddenin çözünürlüğü artırıcıdır. Sıcaklığın artması buhar basıncını artırır ve bu akışkan yoğunluğundaki düşüştten daha etkili olup, ekstraksiyon verimini artırır. Yığınsal yoğunluk 250 kg/m^3 'den büyük olmalıdır. Süperkritik akışkan akış hızı artırılınca ekstraksiyon süresi kısılalırken, ekstraksiyon

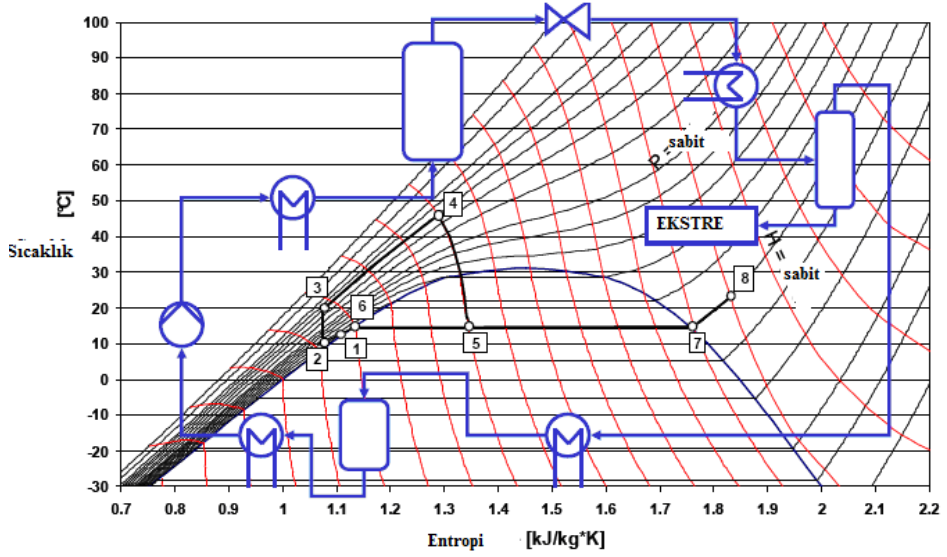
ekipmanlarının (ısıtıcı, pompa veya kompresör, borular, vanalar..) boyutları büyümektedir (Şekil 2.11) (Gamse, 2009).



Şekil 2.11. Ekstraksiyon eğrisi (Gamse, 2009)

Çoğu ekstraksiyon uygulamasında basınç 200 atm'den fazla, sıcaklık ise 40-80°C arasındadır. Metanol ve etanol yardımcı çözen oranları %3~20 arasındadır. Ekstraksiyon süresi genellikle statik ekstraksiyonda 15 dakika , dinamik ekstraksiyonda 40 dakikadır. Polar bileşenler yapısında fonksiyonel gurupları bulundurlar. Örneğin, hidroksiller, karboksiller veya aminlerdir. Yardımcı çözen miktarı polaritenin şiddetine göre değişir (Chen ve Yong, 2000).

Ölçek büyütme yapılırken ısıtıcıların kapasiteleri entalpi sıcaklık diagramından okunarak hesaplanır (Şekil 2.12).



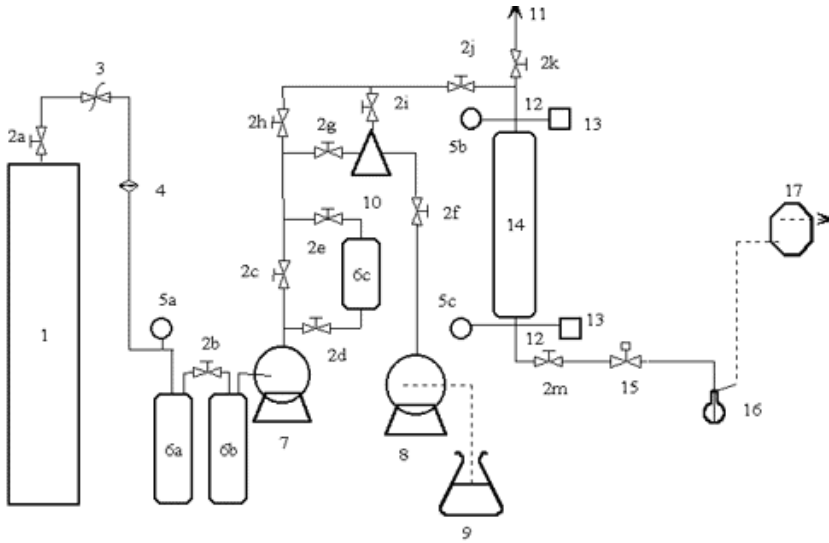
Şekil 2.12. Ekstraksiyon işlemi sıcaklık (°C) Entalpi diagramı; 1) CO₂ deposu, 2) soğutucu, 3) pompa, 4) ekstraktör, 5),6), 7) ısıtıcı, 8) ayırma kolonu (Gamse, 2009).

2.4.2.4. *S. rebaudiana*'nın SC-CO₂ Ekstraksiyonu

İlk olarak Tan ve arkadaşları (1988) Japon patenti olarak, *S. rebaudiana*'yı SC-CO₂ ekstraksiyonu ve yardımcı çözügen uygulamıştır. Yardımcı çözügen olarak metanol, etanol, aseton kullanıldığı belirtilmiştir. Saflaştırma aşaması adsorpsiyonla başarılmıştır. Pasquel (1999) çalışmasında (Şekil 2.13.) glikozit dışındaki fraksiyonları araştırmıştır. Ekstrede bulunduğu maddeler spathulenol, dekonik asit, 8, 11, 14-ekosatrienoik asit, 2-metil oktadekan, pentakozan, oktakoza, stigmesterol, β -sitosterol, α - ve β -amirin, lupeol, β -amirin asetat, ve pentasiklik triterpen olmuştur. Bu maddeler ekstrenin %56'sını

oluşturmaktadır. Ancak, geriye kalan bileşenler tespit edilmemiştir (Pasquel ve ark., 2000) .

Liu ve arkadaşlarının (1997), çalışmalarında yardımcı çözen olarak %20 oranında metanol kullanmıştır. 368 atm basınç ve 40°C sıcaklık uygulaması ile 2 saatlik üretimin ardından ekstraksiyon verimi olarak 13.7 ± 5.8 mg/g ve 13.1 ± 9.3 mg/g değerlerini sırası ile süperkritik ve sıvı ekstraksiyonunda bulmuşlardır. Analizleri kapiller elektroforez ile gerçekleştirmişlerdir.



Şekil 2.13. Pasquel ve arkadaşlarının deney ünitesinin akış şeması; 1) Çözgen deposu, 2) Vanalar, 3) Durdurma vanaları, 4) Filtreler, 5) Manometre, 6) Taşma tankı, 7) Çözgen pompası, 8) Yardımcı çözgen pompası, 9) Yardımcı çözgen deposu, 10) Karıştırıcı, 11) Tahliye vanası, 12) Termocouple, 13) Sıcaklık indikatörü, 14) Sabit yataklı ekstraktör, 15) Mikrometrik ayarlı vana, 16) Toplama erleni, 17) Akış toplayıcı.

Pasquel ve arkadaşları (2000) pilot ölçekli SC-CO₂ ekstraksiyonu yöntemini kullanırken yardımcı çözügen olarak su, etanol ve %50 su + %50 etanol kullanarak polariteyi arttırarak polar madde olan *S. rebaudiana* bitkisinin çözünürlüğü üzerine bir araştırma yapmışlardır. Katı yaprak kütlesini 69 ile 82 g arasında kullanarak 0.048 g/s ortalama akış hızında çalışmışlardır. Bu çalışmanın amacı kütle transfer denklemlerini çözerek, kütle transfer katsayısını tahmin etmek olmuştur. Bunun için 12 saat ön işlem ile CO₂'de çözünen apolar bileşikler alkoller, alifatik hidrokarbonlar, sesquiterpenler, ve triterpenler yapraktan ayrılmış ve ardından 12 saat glikozit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yardımcı çözügen olarak su kullanıldığında etanol'den daha yüksek ekstraksiyon verimi elde edilmiştir. Ön işlemde en iyi sonucu sadece CO₂'in çözügen olarak kullanıldığı 200 bar ve 30°C'de elde edilmiştir. İkinci işlemde ise en iyi sonucu 120 bar, 16°C ve %9.5 (molar) su ile elde edilmiş olup, toplam verim %3.4 bulunmuştur.

Yoda ve arkadaşları (2003), Pasquel ve ark. (2000) yaptığı çalışmadaki genel ekstraksiyon eğrisini Sovova pseudo sabit hal modeliyle açıklamış ve ekstraksiyonun kinetiğini başarıyla oluşturarak çalışmayı geliştirmişlerdir.

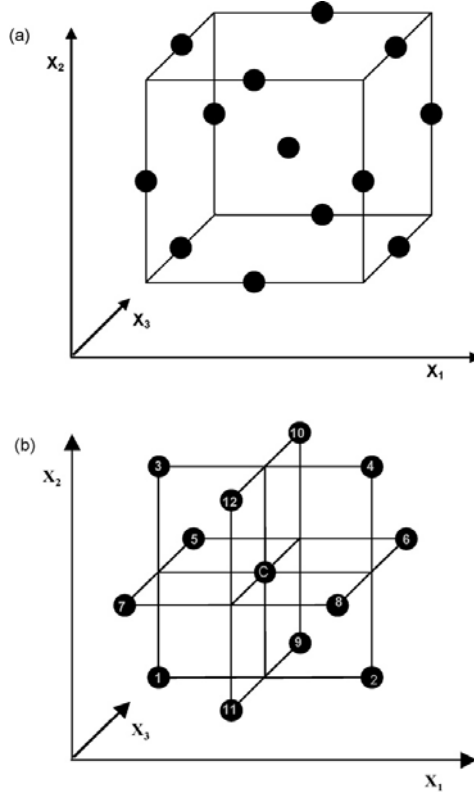
Choi ve arkadaşları (2002) ekstraksiyon sonrası elde edilen steviozit'in sıvı kromatografisi (HPLC-ESI-MS) analizini çalışmışlardır. Glikozitler UV'ye düşük hassasiyettedir. HPLC-MS analiz tekniğinde bir elektrospay iyonlaşma (ESI) arayüzeyine doğal ürünlerin analizi için yüksek hassasiyette yavaş iyonizasyon tekniği uygulanmıştır. 40°C, 60°C

ve 80°C sıcaklıklarda 204 ve 340 bar basınçlar ile %5 metanol, %10 ethanol ve %20 metanol-su karışımı (8:2) yardımcı çözen oranları üretim parametreleri olarak seçilmiştir. 200 mg yaprak ekstraksiyonu için 1 ml/dak çözen akış hızı ile toplam 50 ml CO₂ tüketilmiştir. Diğer bir değişle ekstraksiyon süresi 50 dakikadır. En yüksek ekstraksiyon verimi metanol-su karışımı ile 3.56 mg/g bulunmuştur.

Kienle (1992) USA'de bir SCFE patenti almıştır. *S. rebaudiana*'nın bileşenlerini ayırmak için etan, eten, azot oksit, propan, propen, karbondioksit ve çeşitli hidrojen florürler çözen olarak kullanılabilir. Azot oksit yanmayı desteklediğinden o kullanılırken çok dikkatli olunmalıdır. CO₂ 'in avantajları bilinmektedir ve onunla ilgili çalışmaların çok dokümanı bulunmaktadır. Relatif kütle transfer oranı 5 ile 310 kg CO₂/kg başlangıç materyali arasında değişebilmektedir. Genellikle bu değer 8-100 kg CO₂/kg başlangıç materyali arasındadır ve optimum koşulların 60°C ve 300 bar olmaktadır. Kütle oranı 5 kg CO₂/kg başlangıç materyali değerinin altında, elde edilen ürünün Marketlerde satılamayacak bir ürün aroması oluşmaktadır. Kurutulan yapraklar ekstraktöre doldurulmuştur. Ekstraktör haznesinin sızdırmaz kapağı kapatıldıktan sonra, CO₂ ekstraktöre beslenerek vakslar, klorofiller, diğer pigmentler, özellikle tadı bozan bileşenler uzaklaştırılmıştır. Ekstraktörden çıkan CO₂ uygun kompresör kullanılarak sıvılaştırılıp sisteme geri dönmektedir. 8 saat sonra üretim durdurulmakta, yapraklar arzu edimeyen aromadan ayrılmış olarak tatlı glikozitleriyle kullanıma hazır olmakta, ambalajlanıp satılmaktadır.

2.5. Optimizasyon

Yüzey Yanıt Metodolojisi (Response surface methodology; **RSM**) teorik optimizasyonun deneysel çalışma alanıyla matematik olarak uyduğu bir optimizasyon yaklaşımıdır. SCFE verimini arttırmak için yanıt veren bir fonksiyondur ve az sayıda denemeden yola çıkarak pek çok bilgiye ulaşılabilir. Bu deneysel metodolojiyle matematik modelleme bile oluşturulabilmektedir (Wang ve ark., 2008). Bir uygulaması olan 3 seviyeli Box-Behnken Design (**BBD**)'ın SC-CO₂ ekstraksiyonu optimizasyonunda seçilmesinin nedeni mükemmel sonuçları ve akıl yürüten tasarımından dolayı kimyasal ve fiziksel optimizasyonda uygulanabilirliğidir (Şekil 2.14) (Dong ve ark., 2008).



Şekil 2.14. Üç faktörün grafiksel gösterimi iki şekilde oluşmaktadır: a) Kübün merkez noktası ve kenarların orta noktalarından oluşan, b) Üç tane birbirine kenetlenmiş ve 2^2 faktoriyelli tasarım (Stalikas ve ark. 2009).

RSM'nin 5 seviyeli Merkezi Bileşim Tasarımı (Central Composite Design) yöntemiyle kıyaslandığında orthogonal (dikey) bloklama için kapasitesi sınırlı olmasına rağmen 3 faktör için çok az denemeye ihtiyaç duyulması üstün yanı olmaktadır (Yu ve ark., 2007).

Deneme sayısı formülü;

$$N = 2 * k * (k-1) + C_0$$

(k; değişken sayısı, C₀ Merkez nokta sayısıdır.)

RSM'nin diğer optimizasyon yöntemleri Stalikas ve arkadaşları (2009) alışmasında vardır. Ferreira ve ark. (2007) analitik metodların optimizasyonuna alternatif bir yöntem olarak BBD derlemesinde daha detaylı bilgi bulmaktadır. Aynı çalışmada kromatografik yöntemlerde metodun kullanılmasına örnek olarak Turner ve McKenon (2004) SCFE 'da kaster çekirdeğinin doymuş yağ içeriğinin saptanması çalışmasını örnek göstermişlerdir. Bu optimizasyon yöntemi 4 değişkenli olarak uygulanmıştır. Araştırma için gerekli deney sayısı önceden 3 seviyeli olarak tanımlanmış yöntemle $3^4 = 81$ iken bu yöntemi kullanılarak 27 'ye düşürülmüştür (Turner ve ark., 2004).

Wang ve arkadaşları (2008) yaptıkları bir çalışmada SC-CO₂ ekstraksiyonunda optimizasyonu yaparken 3 değişkenli (basınç, sıcaklık, yardımcı çözgen-ethanol oranı), 5 merkez noktalı, 17 deneme metodu kullanmışlardır. Flovanoid verimini gösteren ikinci derece denklemi elde edip, R^2 değerini 0.954 bulmuşlardır.

Yapılan bir başka çalışmada likopen'in SC-CO₂ ekstraksiyonunda optimizasyon yapıp, basınç, sıcaklık, ve zamanı değişken olarak seçerek, yardımcı çözgen (etanol) oranı ve çözgen debisi sabit tutulmuştur. HPLC analiziyle likopen miktarı bulunurken, R^2 değeri 0.97 çıkmıştır (Huang ve ark., 2008).

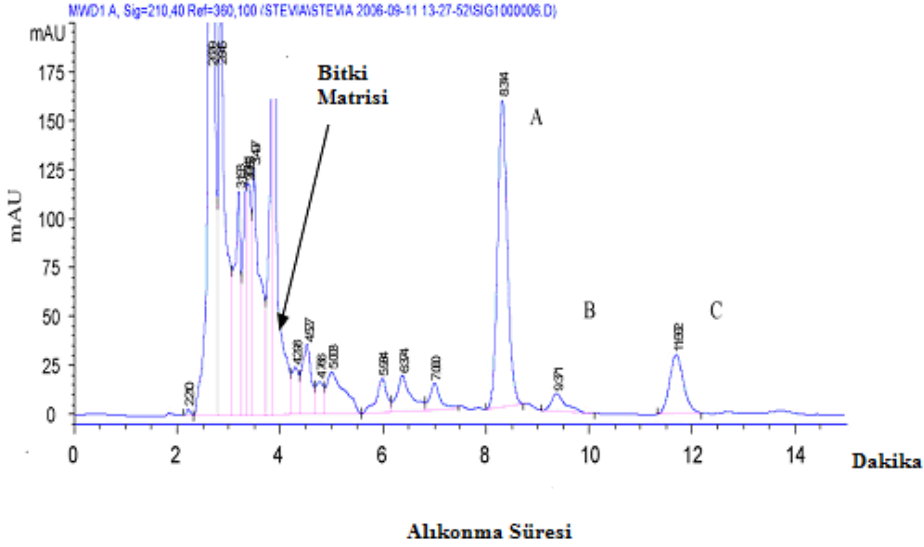
2.6. Ekstre Analiz Yöntemleri

Steviozid ve rebaudiozid A'nın saflık ve dayanıklılığını belirlemede uygun olan pek çok analiz yöntemi mevcuttur. Kan'da, üre'de ve gaita'da (dışkı) steviozid ve onun metabolitleri olan steviol ve isosteviol miktarlarını belirlemek de mümkündür. İlk yöntem kolorimetrik belirleme kullanılmıştır. Ardından hesparadinaz enzimiyle yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Gaz sıvı kromatografisi (GLC), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC)/ densimetri kullanılmaktadır. Ticari ekstreler için son yıllarda geliştirilen yeni bir yöntemle, kapiller elektroforez (MEKC) kullanarak analizlenmiştir. Diğer yeni bir yaklaşımda yakın infrared reflektans spektroskopisi kullanarak yapraktaki steviozid analiziyle miktar saptanmasıdır. Bu analiz yöntemleri uygulanırken kimyasal bir ayırma işlemi kullanılmamıştır. Örneğin, HPLC analiz yönteminde genellikle karbonhidratların analizinde kullanılan Amino (NH₂) kolonları ile *S. rebaudiana* tatlı glikozit'lerinin analizi başarı ile elde edilmiştir (Kinghorn, 2002).

İki tane kromatografik yöntem sık kullanılmış ve her ikisinde ters faz sistemleridir. Bu yöntemlerde mobil faz olarak asetonytril-su karışımı kullanılmıştır. İlk yöntemde sabit faz yerine amino geçirilmişken, diğerinde oktadesil silika kullanılmıştır. Ayrıca, tayin için sıklıkla UV fotometre kullanılmıştır. Steviozid'in UV spektrumları en çok 200 nm civarında oldukça yalın oluşmuştur. Ne yazıkki 200 nm'ye yaklaştıkça asetonytril-su karışımının gradient elüsyonu esnasında bazı problemler oluşmuştur. Amperometrik titreşimli tayin daha hassasiyetli olduğu için

önerilmişse de, sütun kolonuna acetonitril-su elüsyonu ile 0,1 M NaOH çözeltisi eklenmesi gerekmiştir. Kütle spektrometrik tayin UV ile kıyaslandığında daha başarılı bir seçicilik ve daha iyi bir hassasiyet gösterdiğinden tavsiye edilmiştir. Elektrospray iyonizasyon ve negatif iyon dedektörde sıklıkla uygulanmıştır. Günümüzde, süre ayarlamalı kütle spektrometrelili iki boyutlu sıvı kromatografisi sıvı *S. rebaudiana* ekstresine uygulanmaktadır. Bu yöntemle, tek kromatografik denemede bitki matrisinden steviozitle diğer tatlı glikozitler ayrılabilir (Pol ve ark., 2007).

Vanek ve arkadaşları (2001) steviozid analizini yaparken HPLC’de çalışma lineer gradyanti elüsyon profilini, (A) su-asetonitril oranı (75:15) ile başlayıp, 30 dakika süre ile de (B) su-asetonitril oranı (50:50) ile bitirmişlerdir. Paslanmaz çelik kolonla, 205 nm dalgaboyunda, UV dedektörle, akış hızı olarak 1ml/dakika’da çalışmışlardır. Diğer bir çalışma Jaitak ve arkadaşları (2008), Yüksek Performans İnce Tabaka Kromatografi yöntemini (HPTLC) mobil faz olarak etil asetat-etanol-su oranları (80: 20: 12, v/v/v) olan karışımı silika jel üzerine kaplayarak uygulamışlardır.



Şekil 2.15. *S. rebaudiana* ekstresinin HPLC kromatogramı; izokratik mobil faz, 210 nm tayında (A) steviozite, (B) rebaudiozit C, ve (C) rebaudiozit A (Hearn ve Subedi, 2009)

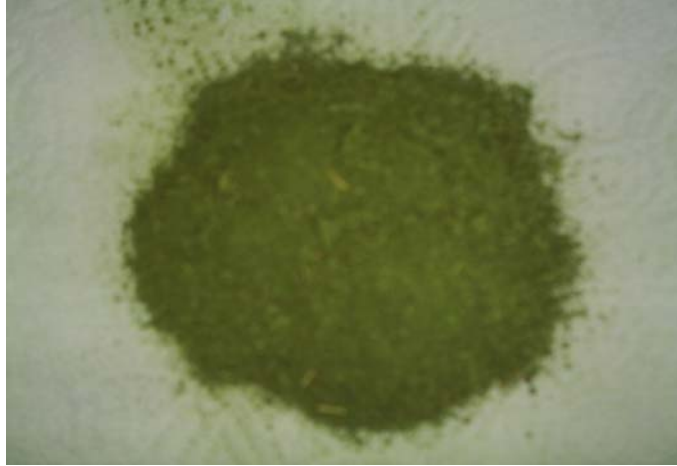
Hearn ve Subedi (2009) yaptığı çalışmada Yakın İnfrared Yansıma Spektroskopu (NIRS) ile yapraktaki steviol glikozitlerin konsantrasyonlarını araştırmışlardır. Referans metod olarak HPLC kullanılmıştır. HPLC analizinde NH_2 kolonu, UV dedektör, 1.0 ml/dakika akış hızı, 10 dakika enjeksiyon uygulaması, 15 dakika deneme süresi ile 210 nm dalga boyunda, saf steviozit ve rebaudiozit standartlarıyla çalışmışlardır. NIRS'da 1 g örnekteki konsantrasyonlar; steviozit için %64, rebaudiozit A için % 26 ve rebaudiozit C için %10 olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOTLAR

3.1. Materyaller

3.1.1. Hammadde Temini

S. rebaudiana yaprakları Türkiye’de ilk kez Antalya yöresinde yetiştirilip toplatılmıştır. Oda sıcaklığında kurutulup gönderilmiş yapraklar , +4°C de soğuk odada uygulama anına kadar bekletilmiştir. Warring laboratuvar ölçekli öğütücüyle toz hale getirilmiştir (Şekil 3.1). Çalışma süresince, plastik kilitli torbalarda +4°C’de tutulmuştur. Öğütme sonucu partikül boyutu 500 µm olmuştur.



Şekil 3.1. Ekstraksiyonda kullanılmadan önce toz haldeki *S. rebaudiana* bitkisi

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Habaş firmasından %99 saflıkta CO₂ temin edilmiştir. HPLC standartları steviozid ve rebaudiozid A %95 saflıkta olup, Herbal Wise Ltd., Malezya firmasından temin edilmiştir. HPLC saflıkta etanol, asetonitril ve metanol Merck (Almanya) markalı kullanılmıştır. Analizlerde ve yardımcı çözügen içerisinde kullanılan ultra saf su Sartorius Arium 611 (Almanya) ünitesinden elde edilmiştir. Tablet yapımı için sitrik asit Drogas, sodyum bikarbonat ve sodyum benzoat Horasan Kimya laboratuvarı ürünleri kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

<u>Süperkritik Ekstraksiyon Ünitesi :</u>	Thar SFE 100 sistemi, İngiltere.
<u>Rotavapor:</u>	Heidolph Laborota 4001
<u>Vakum Pompası:</u>	Welch 2511
<u>Çözügen ekstraksiyonu mantolu ısıtıcı:</u>	Labor Alliance
<u>Ultrasonik Banyo:</u>	Ultrasonic LC30
<u>Liyofilizatör:</u>	Christ-ALPHA 1- 4 LD
<u>Tablet Yapma Cihazı:</u>	Mikron (manuel)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri

3.2.1.1. Cözgen Ekstraksiyonu

Çözgen ekstraksiyonu, Şekil 3.2’de görülen 500 ml hacimli soxhlet ekstraktöründe gerçekleştirilmiştir. Öğütülmüş *S. rebaudiana* yapraklarından 100 g alınarak, kartuşlara yerleştirilip soxhlet’ in içine yerleştirilmiştir. Mevcut sistem 1000 ml çözgen ilavesi ile çalıştırılıp, 2 sifon (yaklaşık 100 dakika) yaptıktan sonra durdurulmuştur (Markovic ve ark., 2008). Steviozit ve rebaudiozit A polar yapıda bileşenlerdir. Mantolu ısıtıcı 100°C’ye ayarlanarak geri soğutucu altında çalışılmıştır. Bu glikoziterin ekstre edilmesi amaçlandığından, GRAS (Generally Regarded as Safe) statüde yer alan etanol ve su çözgen olarak kullanılmıştır (Hearn ve Subedi, 2008).



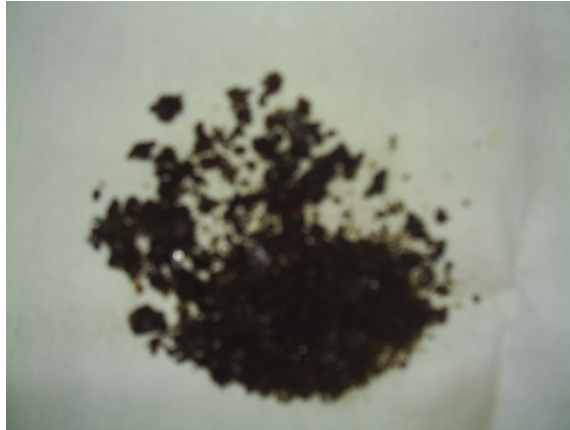
Şekil 3.2. Soxhlet ekstraktörü ile gerçekleştirilen *S. rebaudiana* çözen ekstraksiyonu

Şekil 3.3’de vakumlu evaporatörde (70°C) çözen uçurularak glikozit içeriği zengin ekstreler elde edilmiştir. 140°C’ye kadar olan sıcaklıklarda glikozit yapısı değişmemektedir (Kroyer, 1999).



Şekil 3.3. Vakumlu evaporatörde *S. rebaudiana* çözgen ekstresi

Ekstreler -80°C 'de dondurulup, liyofilize edilmişlerdir (Şekil 3.4). Ayrıca, ekstraksiyon sonrası posalar da oda sıcaklığında kurutularak (Şekil 3.5) HPLC analizleri için saklanmışlardır.



Şekil 3.4. Liyofilize edilmiş su ekstresi



Şekil 3.5. Su ekstraksiyonu sonrası kurutulmuş posa

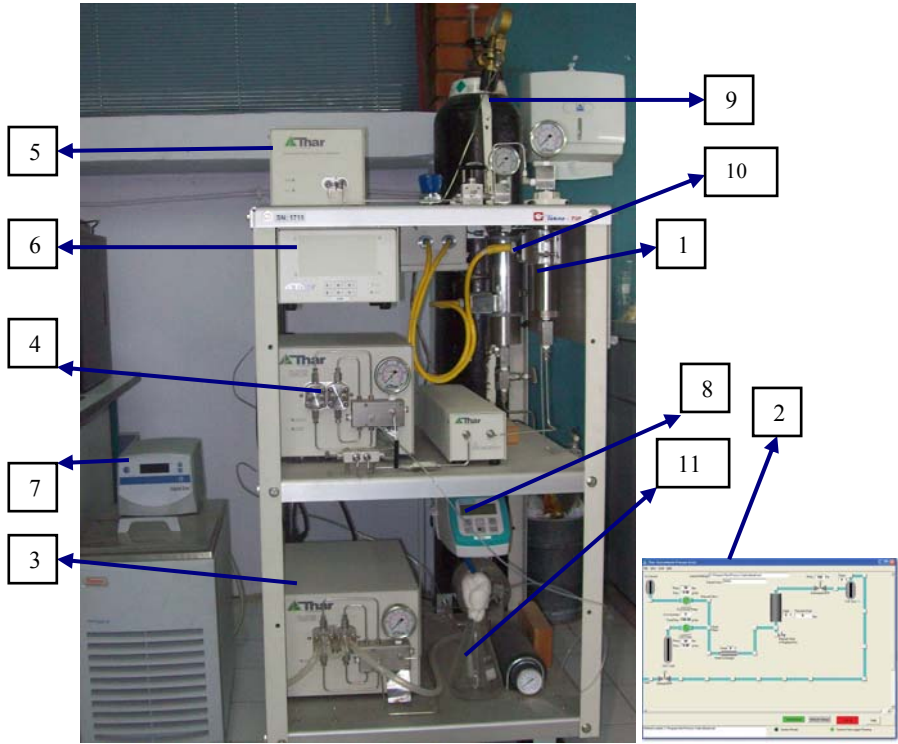
3.2.1.2. Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon cihazı aşağıdaki parçalardan oluşmaktadır ;

- 1- Thar SFE100 ekstraksiyon ünitesi
- 2- Thar SFE100 kontrol ünitesi (programlama)
- 3- P-50 Model yüksek basınç pompası
- 4- P-50 Model yüksek basınç yardımcı çözgen pompası
- 5- Thar geri basınç regülatörü
- 6- CN6 Sıcaklık kontrol ünitesi
- 7- Thermo-Neslab-RTE-10 soğutucu
- 8- Siemens, Mass 2100-DI 1.5 CO₂(g) kütle akış ölçer
- 9- CO₂ tüpü
- 10- Seperatör (ayırma haznesi)

11- Yardımcı çözen haznesi

Tüm bu parçalardan oluşan, süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu denemelerinin gerçekleştirildiği sistem Şekil 3.6'da verilmektedir.



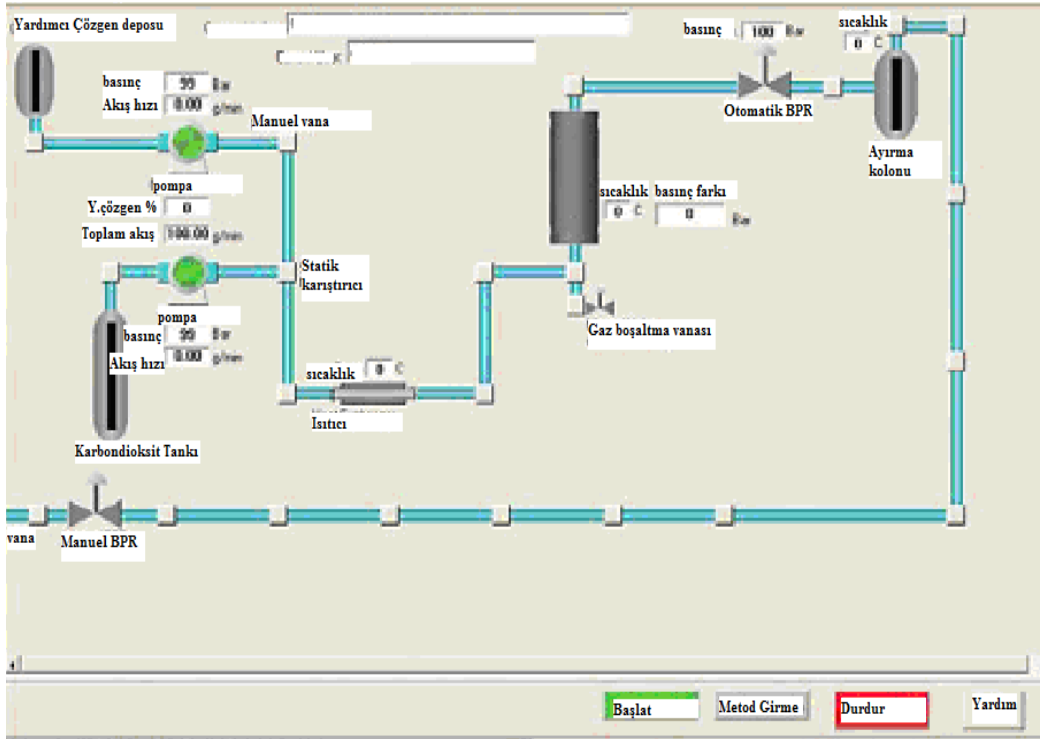
Şekil 3.6. SFE 100, denemelerin gerçekleştirildiği sistem.

Ekstraksiyona başlamadan önce, soğutucu açılarak sıcaklığının 4°C'ye düşmesi beklenmektedir. Bu sırada ekstraktörün 100 ml 'lik haznesi 30 g öğütülmüş *S. rebaudiana* yaprakları ile tamamen doldurulmuştur. Üstü kapatılarak vidaları sıkıştırılmıştır. Ekstraktör ve ayırma haznesinin boşaltma vanalarının kapalı konumda olduğu kontrol

edilmiştir. Sistemin fişi takılarak (3), (4), (5) ve (6) nolu ekipmanların düğmeleri -1- konumunda açık hale getirilmiştir. Kontrol ünitesinin (2) devreye girmesi için bilgisayar ekranı açılıp, yazılım programı çalıştırılmaktadır (Şekil 3.7). Tez çalışması kapsamında, sıcaklık (40, 60, 80°C), basınç (150, 250, 350 bar) ve yardımcı çözgen oranı (0, %10, %20) optimize edilmiştir. Endüstriyel ölçekte çözgen oranı %30'un altında olduğunda çözgen sarfiyatı ekonomik olmaktadır. Bu nedenle, Choi ve arkadaşlarını (2002) çalışmasındaki değerler göz önüne alınarak, maksimum değer %20 seçilmiştir. Box-Bhenken Deneysel Tasarım programına, her bir parametreye ait, minimum ve maksimum değerler girildikten sonra programın eşleştirilmiş olduğu deneysel koşullar kullanılarak çalışılmıştır. Kontrol panosu ekranındaki **“Method setting”** düğmesine basılarak seçilen bu parametreler girildikten sonra, **“View”** düğmesiyle girilen değerlerin kontrolü yapılmıştır.

Sistemi çalıştırmadan önce ilk olarak CO₂ tüpü (9) açılmaktadır. Akış ölçer'de (8) önce yüksek değer olan gazın basıncı okunup, tüm sistem gazla dolunca bu değer sıfırı göstermektedir. Ardından, kontrol ünitesindeki (Şekil 3.7) **“Start All “** tuşuna basılarak sistem çalıştırılmaktadır. CO₂ debisi set edilen akış hızı (15 g/dak) değerine ulaşınca, ekstraktördeki ve pompaların çıkışındaki basınçlar yavaş yavaş artmaktadır. Kısa bir süre sonra sistemdeki fazla gaz, ayırma haznesinden sonra yer alan MBPR (5)'nin basınca göre regülasyon işlevi olan boşaltma vanasından, kendiliğinden periyodik olarak dışarıya verilmektedir. Yardımcı çözgen kullanılan denemelerde etanol-su karışımı (70/30) hazırlanarak yardımcı çözgen haznesinden (11) belirlenen yüzdelerde sisteme basılmıştır.

Set edilen sıcaklık değerlerine, kontrol ünitesinde kısa bir süre sonra ulaşılmaktadır. Ekstraksiyon esnasında ya zaman (t) ya da CO₂ miktarı sınırlayıcı faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Denemelerde ekstraksiyon süresi 60 dak'ya set edilmiştir (Choi ve ark., 2002). Sistem dengeye ulaştıktan sonra ekstraksiyon süresi başlatılmaktadır. Tüketilen CO₂ miktarı 900 g'da sabit tutularak akış hızının yaklaşık 15 g/dak olması sağlanmıştır.



Şekil 3.7. Süperkritik CO₂ cihazının kontrol ünitesi (2)

Ekstraksiyon süresi dolduğunda kontrol ünitesindeki “stop all” düğmesiyle sistem durdurulur. Akabinde CO₂ tüpü ve bilgisayar ekranı kapatılmaktadır. Sistemdeki gaz ekstraktörün altındaki boşaltma

vanasından tahliye edilir. Basınç göstergeleri sıfır okuduğunda, örnek alma vanası açılarak, ekstre ayırma haznesinden (10) alınmaktadır. Pompaların elektrik düğmeleri ve soğutucu kapatıldıktan sonra, ekstraktörün üstü açılarak posa örneği dışarıya alınmaktadır. Her denemeden sonra sistem temizlenerek, bir sonraki set değerleriyle yeni denemeye geçilmektedir. Ekstreler 4°C’de saklanırken, posalar oda sıcaklığında kurutulmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Maksimum glikozit veriminin alındığı 250 bar, 60°C, %20 yardımcı çözügen oranı çalışma koşullarında elde edilen posa.

3.2.2. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

3.2.2.1. Örneklerin Hazırlanması

Hammaddenin analizlenmesi amacıyla 100 mg öğütülmüş yaprak üzerine 10 ml metanol eklenerek, sonikatörde 15 dakika çözünmüştür. Bu işlem 4 kez tekrarlanarak, filtrelenmiş ve 100 ml lik cam balonlara aktarılmıştır. Ardından, vakumlu evaporatörde kurutulmuştur. Üzerine 5 ml metanol eklenip, sonikatörde çözüldükten sonra HPLC viallerine alınmıştır. Çözgen ya da SC-CO₂ ekstraksiyonu sonrası posalara da bu işlemler uygulanmıştır.

Çözgen ya da SC-CO₂ ekstraktları ise 5 mg'ı 5 ml metanolde çözülerek, 0.45 µm naylon membrandan (SRP 15, Machery, Almanya) süzülmüştür. Böylece çözünmeyen partiküller filtrelenerek uzaklaştırılmıştır.

3.2.2.2. HPLC-UV İşlemi

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlar ve posaları HPLC-UV'de aşağıdaki koşullarda 3 tekrar olarak analizlenmiş, kullanılan sistem Şekil 3.9'da görülmektedir.

Cihaz : Shimadzu Cihazı (Japonya), SCL- 10 A
VP Kontrol ünitesi, SPD-10 Avp UV
dedektör, DGU- 14A Degasser.

Pompa : LC-10 AT VP pompa

Kolon : COSMOSIL 5NH₂-MS 4.6 mmI.
. *150mm*5µm (Nacalai Tesque,
Japonya)

Mobil faz : Çözgen A; ultra saf su ve Çözgen B;
asetonitril

Sıcaklık : Ortam sıcaklığı (25- 27°C)

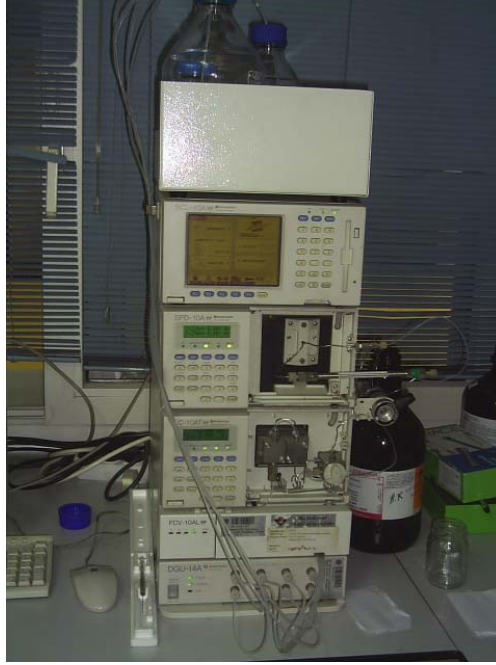
Akış hızı : 1 ml/dak

Enjeksiyon miktarı : 20 µl; Rhynodyne manuel enjektör

Tayin dalgaboyu : 210 nm

Şartlanma süresi : 10 dak.

Zaman (dak.)	A (%)	B (%)
0	20	20
20	80	80



Şekil 3.9.Ekstrelerin ve posaların analiz edildiği Shimadzu LC-10 HPLC sistemi

3.2.2.3. Kalibrasyon ve Validasyon

Kalibrasyon grafiğinin oluşturulmasında standart stok çözeltiler metanol'de (3000 µg/ml) hazırlanmıştır. Ardından bu stok çözeltinin metanolla seyreltilmesiyle 5 farklı derişim olarak hazırlanmıştır: 1500 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 205 µg/ml, 125 µg/ml. Üçer kez analiz yapılmıştır. Elde edilen değerlerin ortalaması alınarak lineer bir kalibrasyon grafiği çizilmiş ve miktarlar bu grafik kullanılarak Shimadzu Class VP 6.10 yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Tayin limiti (LOD) ve kuantifikasyon limiti (LOQ) belirlenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Steviozıt ve rebaudiozıt A için validasyon tablosu.

Bekleme süresi (dak.)	Steviozıt		Rebaudiozıt A	
	7.10		11.39	
	Ortalama (µg/ml)	% RSD	Ortalama (µg/ml)	% RSD
1. Gün (n=4)	2891.29	2.84	1007.42	4.60
2. Gün (n=4)	2984.61	2.07	1089.76	2.30
3. Gün (n=38)	2959.79	2.65	1067.85	2.53
Kesinlik (%)	-		103.7	
Kalibrasyon Formülünün; a (y= ax)	0.000139367		0.000131131	
LOQ (µg/ml)	3.98		3.98	
LOD (µg/ml)	1.19		1.19	
Doğruluk aralığı (µg/ml)	3000 -50		3000- 50	
Tek -Yönlü ANOVA (α=0.05)	0.505		0.618	

Bu örnek hazırlama metodunun güvenilirliğinin test edilmesi için bir seri deneme yapılmıştır. Metodun farklı günlerde aynı sonucu verip vermediğini tespit etmek için üç ayrı günde: 1. gün 4 , 2. gün 3 ve 3. gün 4 parça olarak 11 örnek değerlendirilmiştir. Tekrarlanabilirlik denemeleri tek yönlü ANOVA testi ile steviozıt ve rebaudiozıt A üzerinde SPSS 15.0 programı kullanılarak sınanmıştır. Steviozıt için $F= 0.505$, rebaudiozıt A için $F= 0.618$ olarak belirlenmiştir. %99.5 doğruluk için ilgili F tablosu

sınır değerleri 4.46 olduğundan ve bulunan değerler bu değerin altında olduğundan metodun farklı günlerde aynı sonucu verdiği belirlenmiştir.

HPLC metodunun yaprak örneklere içindeki tüm maddeleri ekstre ettiğini doğrulamak (kesinlik) için 100 mg kurutulmuş yaprak üzerine 6 mg rebaudiozit A standardı eklenmiştir. Yapılan analiz sonunda eklenen maddenin %103.7 oranında ekstre edildiği saptanmıştır. HPLC metoduyla, bu değerde tüm maddeleri yeteri kadar ekstre ettiğini göstermiştir. Tekrarlanabilirlik denemeleri farklı günlerde yapıldığı ve tek yönlü ANOVA testi sonuçlarında farklılık olmaması metodun güvenilirliğini göstermiştir.

3.2.3. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon

Design Expert yazılımının Yüzey Yanıt Metodolojisi (RSM) deneysel tasarım yönteminin uygulamalarından biri olan Box-Bhenken deneysel tasarımı (BBD) kullanılarak ekstraksiyon verimleri üzerine bağımsız değişkenlerin birbirleriyle etkileşiminin gözlenmesi mümkün olmaktadır. Bu çalışmada üç bağımsız değişkenli, BBD kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler, sıcaklık, basınç, yardımcı çözgen (etanol-su) oranı olarak belirlenmiştir. Ekstraksiyondaki diğer değişkenler seçilen değerlerde sabit tutulmuştur. Bunlar kurutulmuş yaprak miktarı (g), zgen (CO₂) debisi, ekstraksiyon süresi, etanolün içindeki su yüzdesi'dir. Kodlanmış ve kodlanmamış bağımsız değişkenlerin değerleri izelge 3.3 'de verilmiştir. Üç bağımsız değişkenli çalışılarak, 3 merkez nokta seçildiğinde, BBD matrix programı ile 15 deneyden oluşan deneme deseni elde edilmiştir (şekil 3.10). Hammadde kısıtlı yada pahalı

olduğunda merkez nokta sayısı en az 1 seçilmekte, genelde 5 seçilerek daha fazla deneme yapılmaktadır. Bu seçimi yaparken elimizdeki *S. rebaudiana* miktarı gözönüne alınmıştır ve 3 denemede karar kılınmıştır. Merkez noktalarının eklenmesi işlemin tutarlılığını arttırmıştır. Steviozid ve rebaudiozid A verimleri bağımlı (response 1, 2) değişkenlerimiz olmuştur. HPLC sonuçları hesaplanıp, bu sütunlara yazılmıştır (Şekil 3.10).

Std	deneme blok	A:basınc	B:sıcaklık	Y. çözgen	S. verimi	R.A.verimi
11	1	Block 1	250.00	40.00	20.00	
6	2	Block 1	350.00	60.00	0.00	
4	3	Block 1	350.00	80.00	10.00	
7	4	Block 1	150.00	60.00	20.00	
15	5	Block 1	250.00	60.00	10.00	
13	6	Block 1	250.00	60.00	10.00	
10	7	Block 1	250.00	80.00	0.00	
1	8	Block 1	150.00	40.00	10.00	
8	9	Block 1	350.00	60.00	20.00	
5	10	Block 1	150.00	60.00	0.00	
12	11	Block 1	250.00	80.00	20.00	
3	12	Block 1	150.00	80.00	10.00	
2	13	Block 1	350.00	40.00	10.00	
9	14	Block 1	250.00	40.00	0.00	
14	15	Block 1	250.00	60.00	10.00	

Şekil 3.10. BBD programı tarafından 15 denemenin seçilen değişkenler sayfası.

3.2.4. Ekstrelerden Efervesan Tablet Yapımı

Efervesan özellik için 15 mg sitrik asit ve baz olarak 40 mg sodyumbikarbonat 105°C etüvde eritilerek karıştırılmıştır. 50- 60°C 'de kurutulup, 3 no'lu elekten elenmiştir. Bu karışıma, 30 mg *S. rebaudiana* ekstresi (www.wisdomnaturalbrands.com, 2009), dağıtıcı ve kaydırıcı maddelerde eklenip, iyice karıştırılmıştır. 10 mg sodyumbikarbonat dağıtıcı, tablet sıvıya eklendiğinde şeklin dağılmasını sağlamıştır. Kaydırıcı (5 mg) Şekil 3.11'deki tablet basma cihazına tabletin yapışmaması için eklenmektedir. Toplamda tablet ağırlığı 100 mg olarak ayarlanmıştır. SC-CO₂ ekstresi, su ekstresi ile hazırlanmış tabletler ve kıyaslamak için piyasadan elde edilmiş olan Huxol Zum Süssen (Nutrisun GmbH & Co KG, Almanya) tabletler kullanılmıştır. Sakkarin tabletin ağırlığı 59 mg ölçülmüştür. Tabletlerin 50 ml çeşme suyunda, oda sıcaklığında çözünmesi beklenip, üçer tablet ile deneme yapılmıştır. Hazırlanmış efervesan tabletler Şekil 3.12 'de verilmektedir.



Şekil 3.11. Mikron manuel tablet makinası



(a)

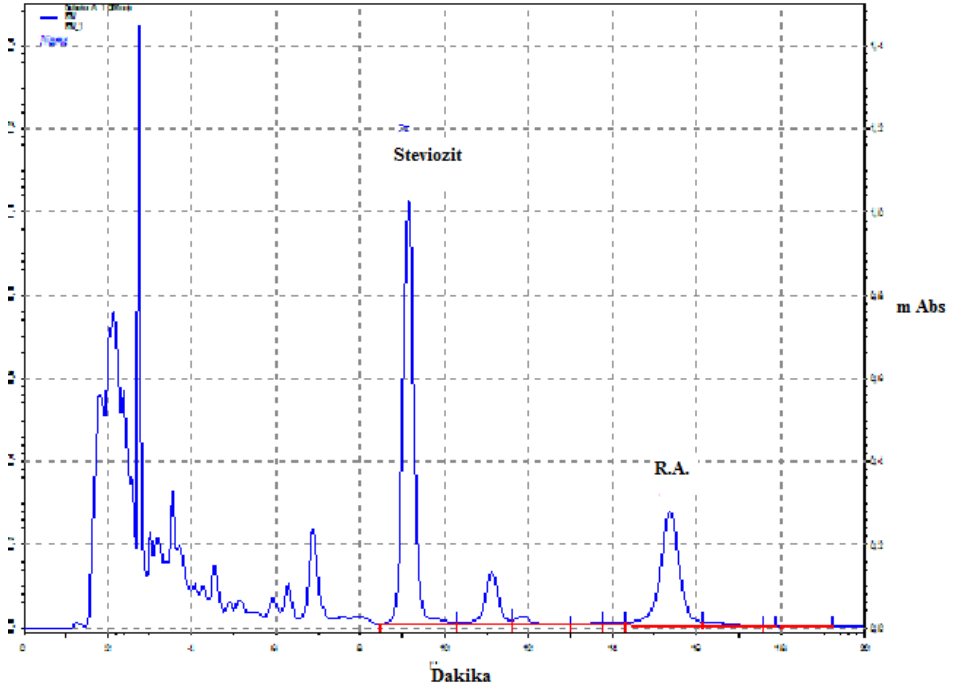
(b)

Şekil 3.12. Basılmış tabletler (a) SC-CO₂ ekstresi, (b) su ekstresi.

4. BULGULAR

4.1. *S. rebaudiana* Yapraklarının HPLC Analiz Sonuçları

Türkiye’de Antalya’da plantasyonu yapılan *S. rebaudiana* yapraklarının HPLC analizi sonuçlarına göre, bitki %13 steviozit ve %5.6 rebaudiozit A içermektedir. Bitkiye ait kromatogram Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. *S. rebaudiana* HPLC kromatogramı

Ülkemizde yetişen bitki yapraklarının, steviozit ve rebaudiozit A içeriğinin Kanada, Japonya, Paraguay, Çin, Güney Kore, Ukrayna ve

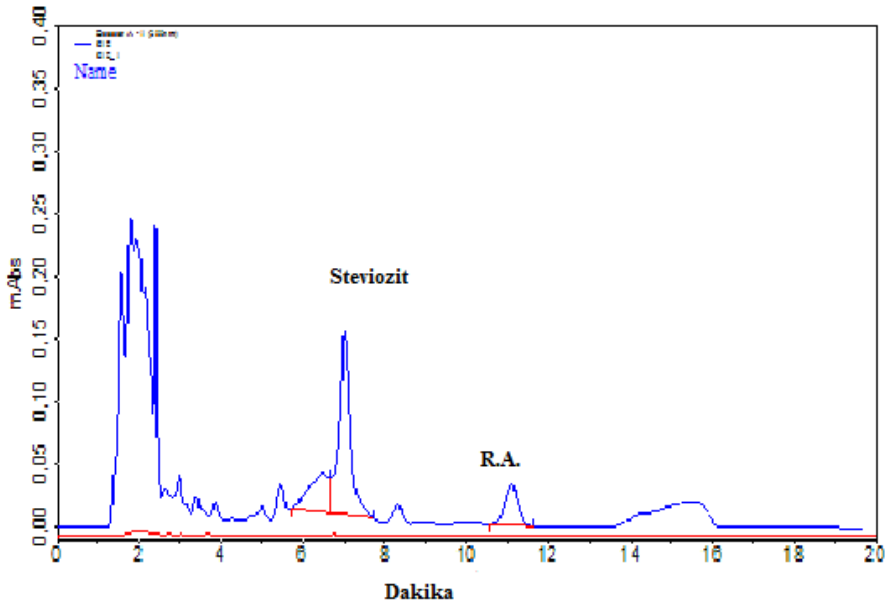
Rusya'da yetişen yapraklardan yüksek olduğu tespit edilmiştir. En yüksek steviozite içeriği ise %15.5 ile Vietnam'da yetişen yapraklardan elde edilmiştir (Çizelge 4.1) (Kovylyayeva ve ark., 2007).

Çizelge 4.1. *S. rebaudiana* yapraklarının yetiştiği ülkeye göre steviozite ve rebaudiozite A içerikleri (Kovylyayeva ve ark., 2007)

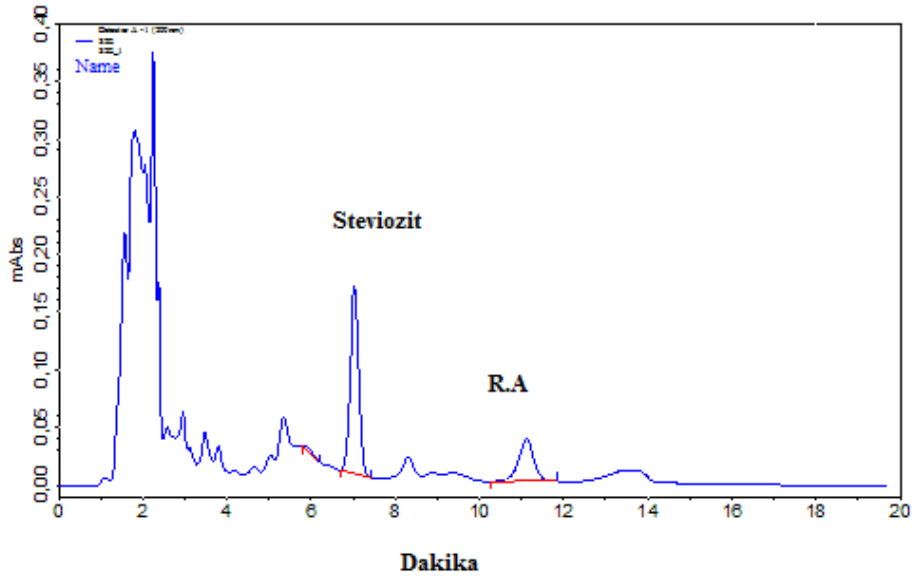
Yetiştirildiği Ülke	steviosit% (100 g kuru yaprakta)	rebaudiozite A% (100 g kuru yaprakta)
Rusya	5.8	1.2
Ukrayna	4.8	1.3
Güney Kore	5.5	2.5
Çin	6.6	3.7
Paraguay	4.6-9.1	1.9-3.8
Japonya	7.7	1.9
Kanada	5	0.3
Vietnam	15.5	3.8
Türkiye	13	5.6

4.2. Çözgen Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları

Su ekstresinin 41.96 mg/g steviozite ve 22.53 mg/g rebaudiozite A içerdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Diğer yandan etanol ekstraksiyonunda bu glikozidler sırasıyla 33.76 mg/g ve 14.84 mg/g olarak bulunmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.2. Su ekstresinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.3. Etanol ekstresinin HPLC kromatogramı

Elde edilen ekstreler Efervesan tablet haline getirildikten sonra ne kadar sürede suda çözüldükleri tespit edilmiştir. Çözünme süresi 4 dakika olup, Şekil 4.4.'de gösterilmektedir.



(a)



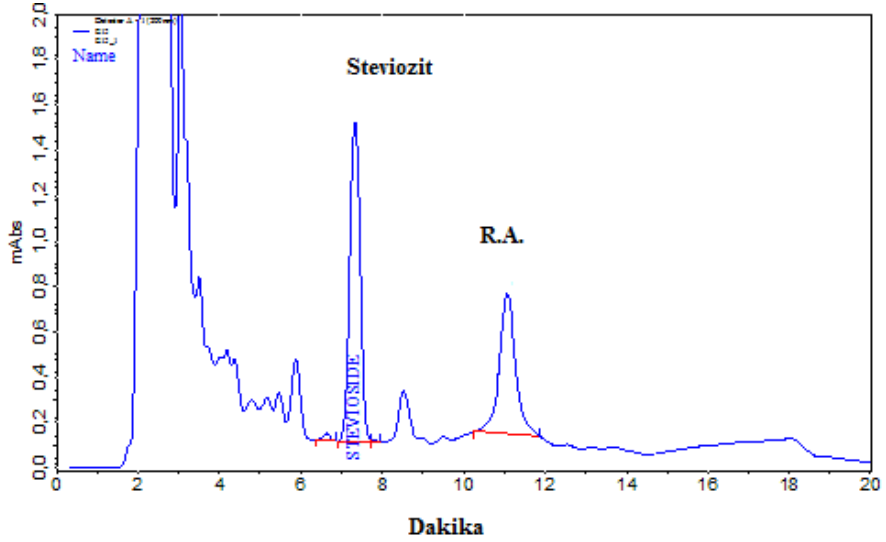
(b)

Şekil 4.4. Su ekstresinin, tablet ilk atıldığında (a) ve eridiğindeki (b) görüntüleri

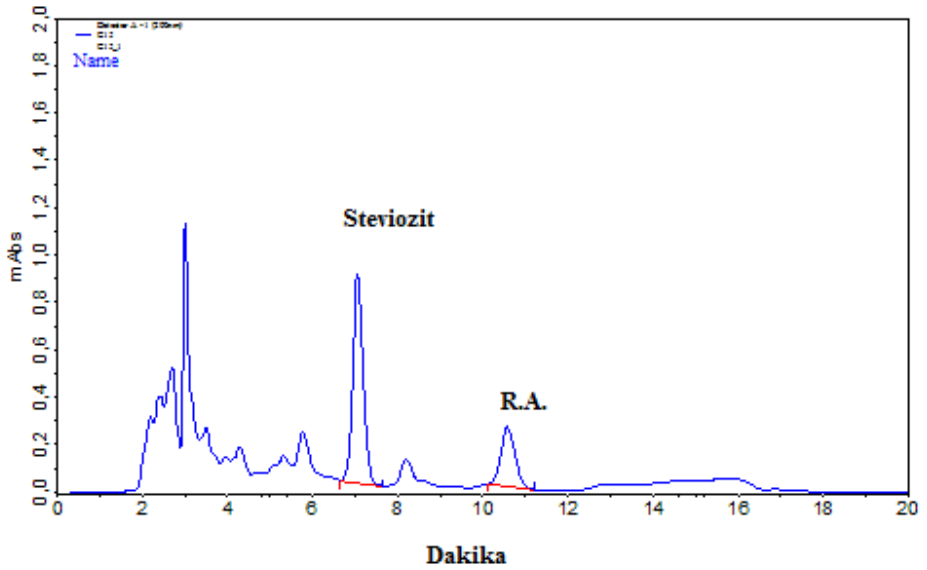
4.3. Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu ile Elde Edilen Ekstrelerde HPLC Analiz Sonuçları

SC-CO₂ ekstraksiyonu denemelerinin HPLC sonuçları Çizelge 4.2'de verilmektedir. En yüksek verim 250 bar, 80°C, %20 yardımcı çözügen oranı çalışma koşullarında 41.1 mg/g steviozid ve 18.8 mg/g

rebaudiozit A olarak bulunmuştur. Bu denemenin ekstre ve posa'sının HPLC kromatogramları Şekil 4.5 ve 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.5. En yüksek verimli deneme ekstresinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.6. En yüksek verimli deneme posasının HPLC kromatogramı

Ekstreden çıkan sonuçlar, posada bulunan ve *S. rebaudiana*'nın kromatogram sonuçlarından çıkarılarak elde edilmiş değerlerle birbirine yakın bulunmuştur. BBD sonuçlarına göre, optimum ekstraksiyon koşulları 211 bar, 80°C, %17.4 yardımcı çözen oranı olarak belirlenmiş ve bu koşullar altında 36.66 mg/g steviozid ve 17.79 mg/g rebaudiozid A elde edilmesi öngörülmüştür.

İlk olarak Liu ve arkadaşları (1997) *S. rebaudiana* yapraklarının süperkritik ekstraksiyonunu çalışırken, metanolü yardımcı çözen olarak kullanmışlardır. Yüksek ekstraksiyon verimi elde ettikleri belirtilmişse de bu tez çalışmasında, yardımcı çözen olarak etanol seçilmiştir. GRAS statüsünde güvenli olarak yer alan etanol suyla (70:30) karıştırılarak kullanılmıştır. *S. rebaudiana* glikozitleri polar bir yapıdayken, CO₂'in apolar yapısına yardımcı çözen eklenmesi verimi arttırmıştır. Yardımcı çözensiz yapılan denemelerde en çok 8 mg/g steviozid ve 5mg/g rebaudiozid A elde edilmiştir.

SC-CO₂ ekstrelerinden elde edilen efervesan tabletlerin erimesi esnasındaki görüntüsü Şekil 4.7. 'de verilmiş olup, erime süresi 4 dakika olarak kaydedilmiştir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.7. SCFE ekstresi tablet ilk atıldığında (a), erirken (b) tamamen eridikten sonraki görüntüleri (c).

4.4. Box-Behnken Metodu ile Optimizasyon

Çizelge 3.3 oluştuktan sonra, kodlanmış bağımsız değişkenlerin bir fonksiyonu elde edilmiştir. Steviozit'in (Y_1) ve rebaudiozit A'nın, (Y_2) ekstraksiyon verimini (mg/g kuru *S. rebaudiana* yaprakları) açıklamak

için program tarafından oluşturulan ikinci dereceden çok terimli denklem değişkenlerinin önündeki katsayılar Şekil 3.10'da görülen "Analysis" sekmesinde ANOVA bölümünde yer almaktadır. Aynı yerde bulunan "Diagnostics" bölümünde deney sonuçlarıyla elde edilmiş eğri görülmektedir.

Çizelge 4.2. Kodlanmış ve kodlanmamış bağımsız değişkenlerin değerleri, bağımlı değişkenler steviozıt ve rebaudiozıt A verimleri mg/g *S. rebaudiana* (Box-Bhenken/Design/Actual).

Deney no.	A (Basınç)	B (Sıcaklık)	C (Y.çöz. Kons.)	Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Y.çözgen Kons. (%)	Steviozıt verim (mg/g)	Rebaudiozıt A verim (mg/g)
1	0	-1	1	250	40	20	15.61	10.40
2	1	0	-1	350	60	0	0.73	4.82
3	1	1	0	350	80	10	17.89	10.74
4	-1	0	1	150	60	20	13.86	7.39
5	0	0	0	250	60	10	21.96	15.02
6	0	0	0	250	60	10	20.22	14.14
7	0	1	-1	250	80	0	8.3	5.13
8	-1	-1	0	150	40	10	19.78	13.81
9	1	0	1	350	60	20	15.50	9.15
10	-1	0	-1	150	60	0	0.32	2.11
11	0	1	1	250	80	20	41.1	18.8
12	-1	1	0	150	80	10	27.68	15.16
13	1	-1	0	350	40	10	19.24	11.28
14	0	-1	-1	250	40	0	2.52	3.19
15	0	0	0	250	60	10	21.35	13.78

Her iki glikozit'in de denklemleri aşağıda olup, A, B, C kodlanmış değişkenleri sırasıyla basınç, sıcaklık ve yardımcı çözügen oranını göstermektedir:

$$Y_1 \left(\frac{mg}{g} \right) = 2.13219 + 0.28868 * A - 1.10856 * B + 1.15629 * C - 0.000466 * A^2 + 0.011564 * B^2 - 0.089196 * C^2 - 0.001156 * A * B + 0.00031 * A * C + 0.02464 * B * C$$

$$Y_2 \left(\frac{mg}{g} \right) = -6.55813 + 0.13013 * A - 0.16700 * B + 1.23958 * C - 0.000228 * A^2 \\ + 0.00179 * B^2 - 0.056492 * C^2 - 0.00024 * A * B - 0.00075 * A * C \\ + 0.00808 * B * C$$

Çizelge 4.3. Y_1 , Y_2 ikinci derece denklem modelleri için varyans analizi (Box-Bhenken/Analyses/ANOVA)

Kaynak	Kareler Toplamı	d.f.*	Ortalama Kareleri	F- değeri	Olasılık (P) > F
a) Steviosid için					
Model	1463.58	9	162.62	5.99	0.0315
Artık değer	135.73	5	27.15		
Uygunsuzluk	134.17	3	44.72	57.38	0.0172
Saf hata	1.56	2	0.78		
Genel toplam	1599.31	14			
R^2	0.915				
$R^2 adj$	0.762				
b) Rebaudiosid A					
Model	300.75	9	33.42	4.95	0.0465
Artık değer	33.77	5	6.75		
Uygunsuzluk	32.95	3	10.98	26.99	0.0359
Saf hata	0.81	2	0.41		
Genel Toplam	334.51	14			
R^2	0.899				
$R^2 adj$	0.717				

*d.f: degrees of freedom

Varyans analizi (ANOVA) (Çizelge 4.3) modeldeki F ve olasılık (probabilite) değerlerinin tamamen önemlilik düzeyi (significant) olduğunu göstermiştir. Denklem olarak oluşturulan modelin HPLC sonuçlarına uyduğu, R^2 olarak belirtilen katsayı değerlerine (0.9151 ve

0.899'a) göre kontrol edilmiştir. Bu sonuçlar ekstraksiyon verimlerinin model ve deneysel değerleri arasında iyi bir uyum olduğunu göstermiştir. R değeri (0.95), 1'e ne kadar yakınsa deneysel ve tahmin edilmiş değerler arasında korelasyon o kadar iyi olmaktadır. Y_1 modelinin $p= 0.0315 < 0.05$ ve Y_2 modelinin $p= 0.0465 < 0.05$ değerleri önemlilik düzeyi yeterli bulunmuştur. Bu da bize, değişkenlerin herhangi bir kombinasyonuna göre deneme yapılırsa tahmini verimi bulmak için yeterli bir model denklemi oluşturulduğunu göstermiştir.

Sıcaklık ve etanol konsantrasyonu olasılık değerleri < 0.1 olması, bu değişkenlerin önemlilik düzeyinin anlamlı olduğunu göstermiştir. Buna karşın basınç olasılık değeri $0.5985 > 0.1$ Design expert yazılımına göre önemlilik düzeyi yeterli bulunmamıştır. Bunun sonucunda steviozit'in ekstraksiyon verimi sıcaklık ve etanol konsantrasyonundaki küçük değişimlerden dahi etkilenmiştir. Şekil 4.8 (a) sıcaklık ve basıncın farklı kombinasyonlardaki üç boyutlu (3D) (b) yatay etkilerini göstermektedir. Basıncın 200-300 bar arasında, 80°C sıcaklıklara çıktığında ekstraksiyon veriminin maksimum noktaya ulaştığı görülmüştür.

Her iki şekilden de verim üzerine sıcaklık artışının daha fazla etkisi, kırmızı bölgelerin genişlemesiyle görülmüştür. Katı madde çözünürlüğüne sıcaklığın bu etkisinin iki sonucu vardır. Katı buharlaşmasının artması ve çözücü yoğunluğunun düşmesidir (Martinez, 2007). Yoğunluk etkisinin en etkili olduğu literatürde belirtilmiş, glikozit'lerin süperkritik fazdaki çözünürlüğü daha yüksek sıcaklıklarda düşmektedir. Sıcaklık artışıyla buhar basıncı artmış ve buna paralel olarak glikozit ekstraksiyon verimi de artmıştır. CO_2 'yi tamamlayan etanol'ün çözünme gücü yoğunluğun düşmesiyle düşmektedir. Yoğunluk

etkisi üzerine buhar basıncının kuvvetli etkisi nedeniyle, sıcaklığın yükseltilmesi ekstraksiyon hızını arttırmaktadır. Şekil 4.8 (b)'de basıncın kavis yaptığı değer 250 bar civarında yer alması, optimum basıncın bu bölgede olduğu şeklinde yorumlanmaktadır.

(a)

Design-Expert® Software

Steviozıt verimi (mg/g)

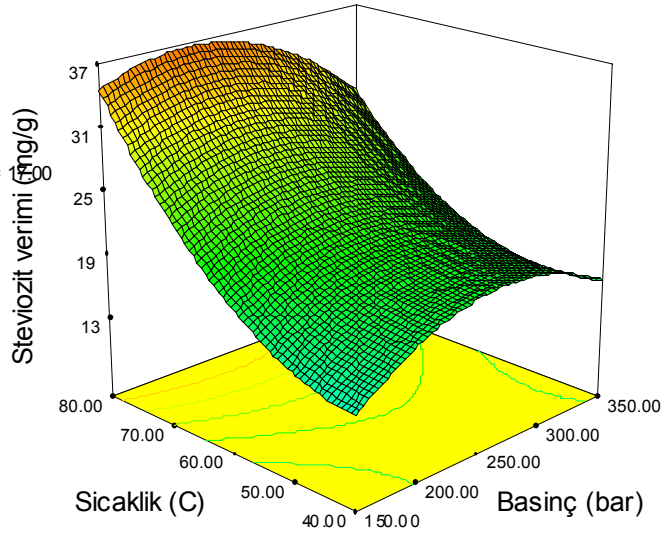
41.1
0.32

X1 = A: Basınc (bar)

X2 = B: Sıcaklık (C)

Actual Factor

C: Y. Çözgen Oranı (%) = 100



(b)

Design-Expert® Software

Steviozıt verımı (mg/g)

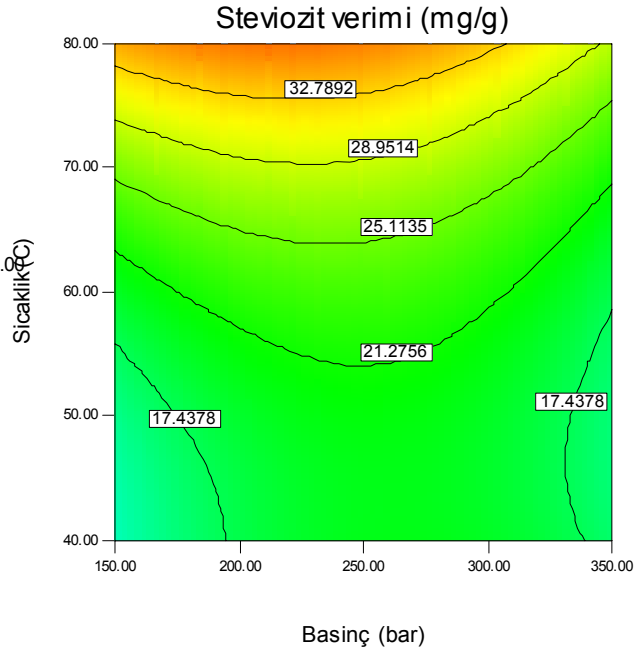


X1 = A: Basınç (bar)

X2 = B: Sıcaklık (C)

Actual Factor

C: Y. Çözgen Oranı (%) = 17.00



Şekil 4.8. Steviozıt verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (°C) ve basıncın (bar) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Yardımcı çözgen oranı optimum değerinde (%17.4) sabit tutulmuştur.

Yardımcı çözgen ve basıncın etkileşimine (Şekil 4.9) baktığımızda %15'in üstünde yardımcı çözgen oranında yüksek ekstraksiyon verimlerine ulaşıldığı görülmektedir. En yüksek verim yardımcı çözgen oranı %20'de, 300 bar'ın altında tüm basınçlarda kırmızı bölge elde edilmiştir. Ozmatik genişleme ve iç kristallenme yoluyla polar yardımcı çözgenler bitkinin hücresel matrisinin yapısındaki değişimi desteklemektedir. Ekstrakte edilen bileşenler ile matris arasındaki polar etkileşimi bozarak matrisin bağları koparılır. Ekstrakte edilen bileşenler serbest hale gelir, kütle transferiyle süperkritik çözüme geçer ve

ekstraktörden uzaklaşır (Bijorklund ve ark., 1998). Bu çalışmada maksimum ekstraksiyon verimi %20 yardımcı çözügen oranında elde edilmiştir.

Yardımcı çözügen oranı sıcaklık ilişkisinin gösterildiği Şekil 4.10 iki boyutlu resimde daha net anlaşılmaktadır. 31 mg/g verimin üstüne çıkılan yüksek verim kuşağı sıcaklığın 75-80°C aralığına ve %10 yardımcı çözügen oranının geçildiği bölgede yer almaktadır. Sıcaklık sağ tarafta yüksek olduğundan kırmızı bölge şeklin sağında çıkmıştır.

a)

Design-Expert® Software

Steviozitol verimi (mg/g)

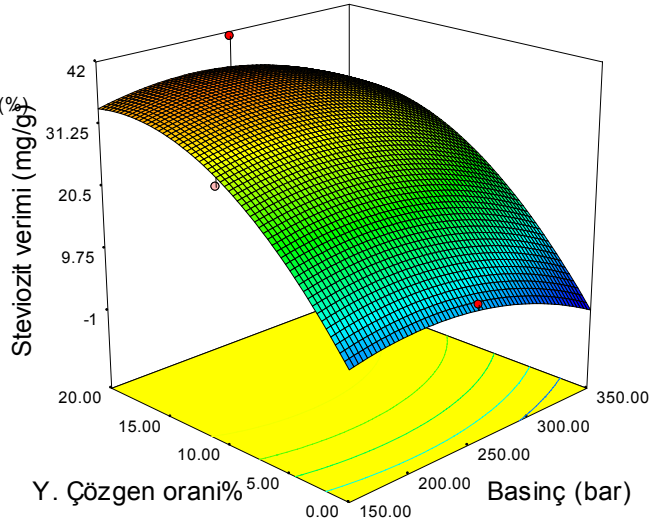


X1 = A: Basınç (bar)

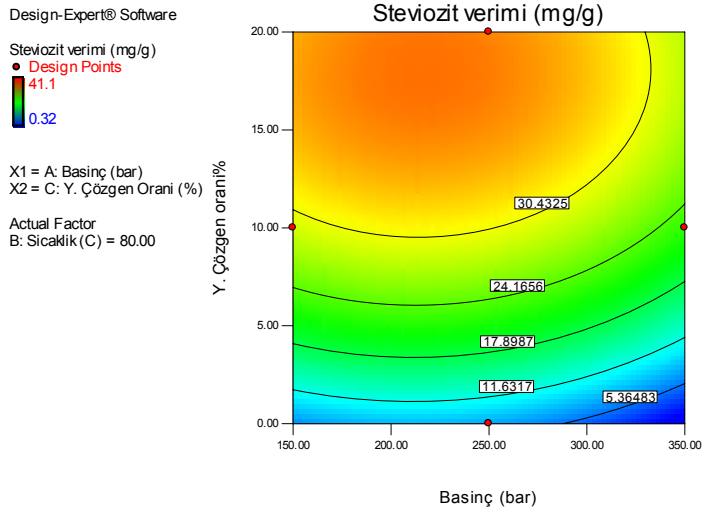
X2 = C: Y. Çözügen Oranı (%)

Actual Factor

B: Sıcaklık (C) = 80.00

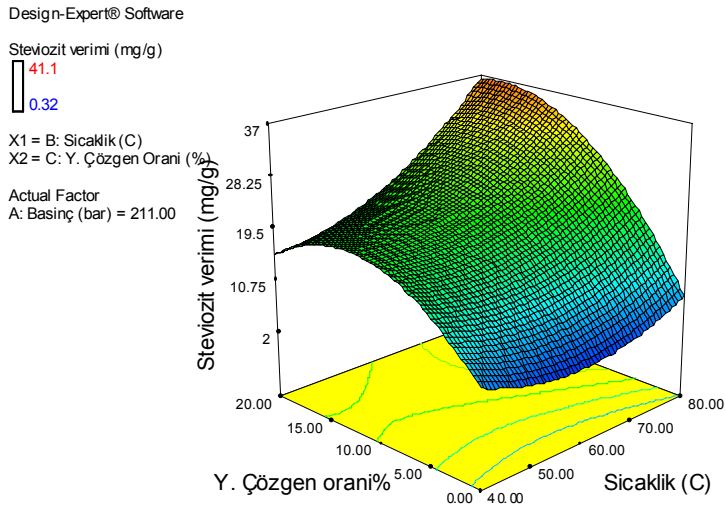


b)

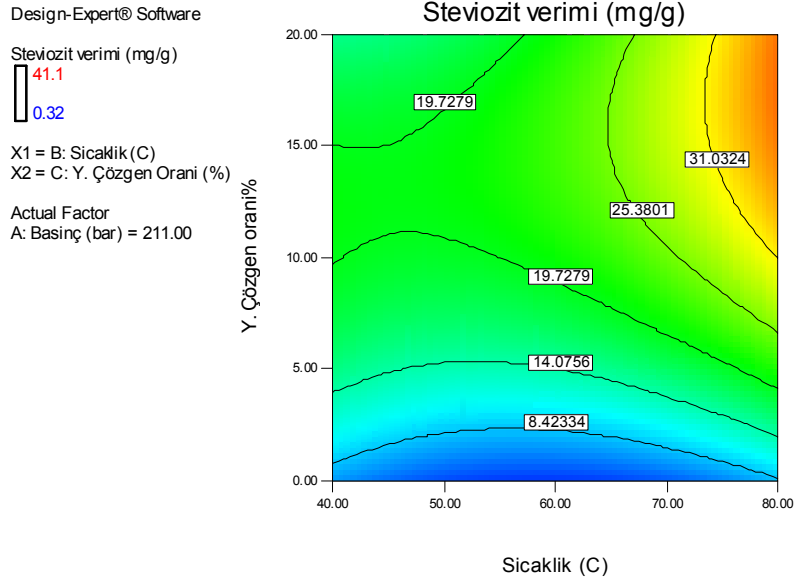


Şekil 4.9. Steviozıt verımına (mg/g *S. rebaudiana*) yardımcı çözgen oranı ve basıncın (bar) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Sıcaklık optimum değeri olan 80 °C’de sabit tutulmuştur.

a)



b)



Şekil 4.10. Steviozıt verımına (mg/g *S. rebaudiana*) yardımcı çözgen oranı ve sıcaklığın (°C) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir.

Basınç optimum değerde 211 bar'da sabit tutulmuştur.

Rebaudiozıt A verımı sonuçlarına baktığımızda elde edilen şekillerin banzerliği görülmektedir. Sıcaklık ve basınç olasılık değerleri > 0.1 bulunup, önemlilik düzeyi yeterli çıkmamıştır. Buna karşın yardımcı çözgen oranı olasılık değeri 0.0068 ($p < 0.05$) kayda değer görülmektedir. Buda ekstraksiyon verımının yardımcı çözgen oranından çok etkilendiğini ya da bu oranın en etkili parametre olduğunu ifade etmektedir. Şekil 4.11'de 200-250 bar basınç aralığında 70°C'nin üstünde verim yükselmektedir. Tüm basınçlarda birbirine yakın verimler gözlenmesi basınç etkisinin azlığını ifade etmektedir.

Yardımcı çözen basınç ilişkisinde ise en yüksek peak noktası 250 bar civarında ve %10 yardımcı çözen oranında görülmektedir. Bu oranın steviozit için elde edilmiş orandan (Şekil 4.12) daha düşük olması, rebaudiozit A'nın daha önce ekstraksiyonunun tamamlanacağını göstermektedir. Bu oran arttırıldıkça ürünün steviozit miktarında artış sağlanmaktadır.

a)

Design-Expert® Software

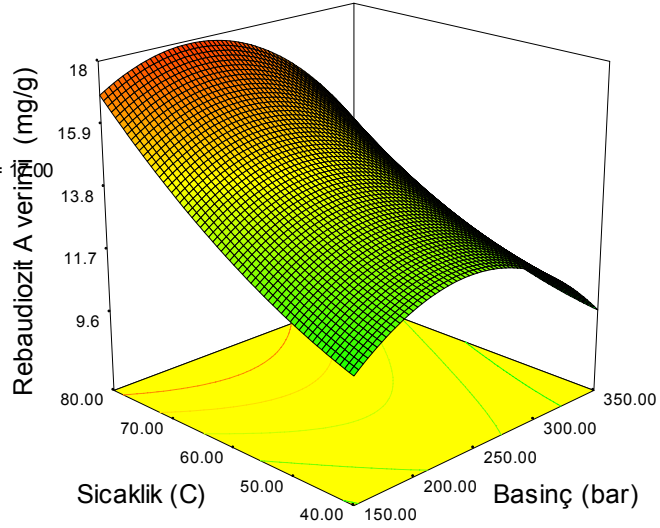
Rebaudiozit A verimi (mg/g)



X1 = A: Basınç (bar)
X2 = B: Sıcaklık (C)

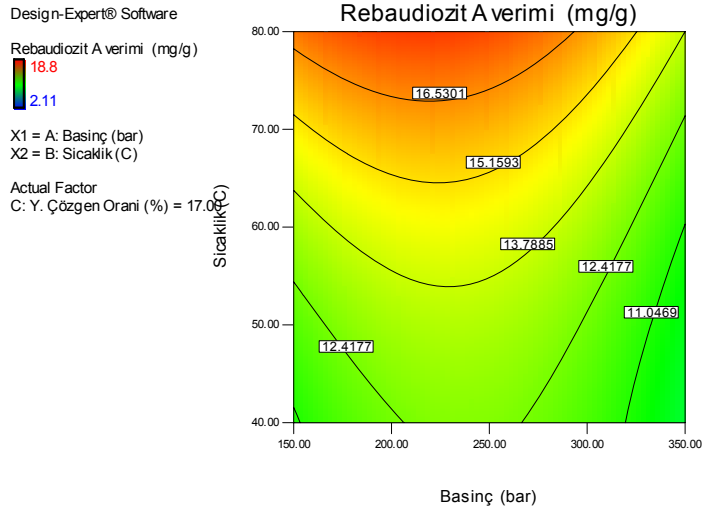
Actual Factor

C: Y. Çözgen Oranı (%) = 10.00



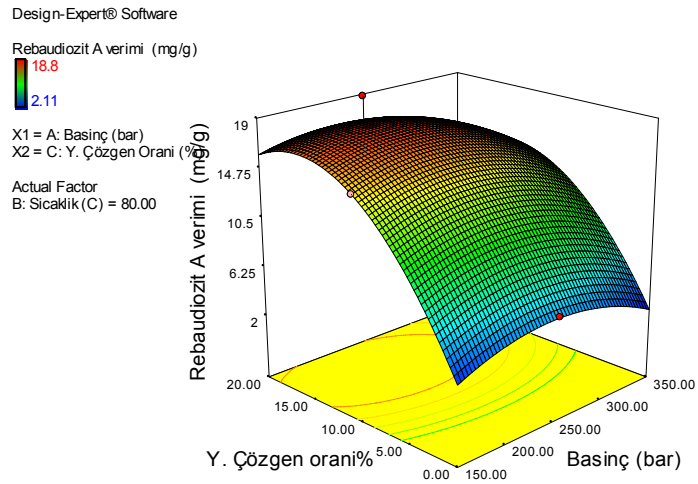
94

b)

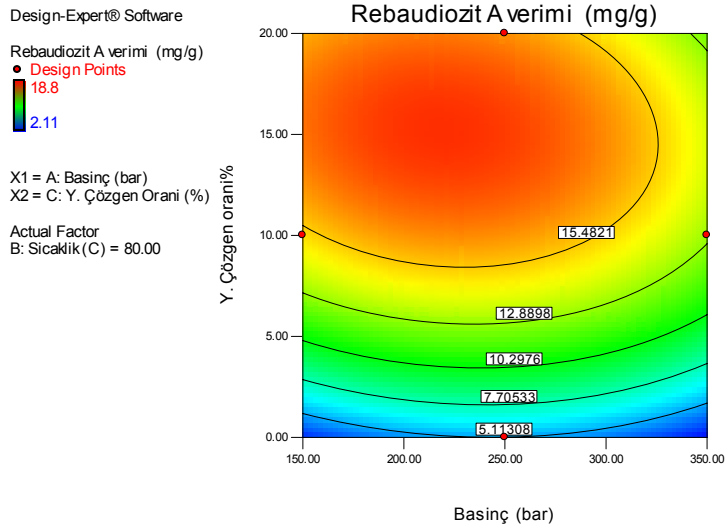


Şekil 4.11. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) sıcaklık (°C) ve basıncın (bar) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Yardımcı çözügen oranı optimum (%17.4) sabit tutulmuştur.

a)



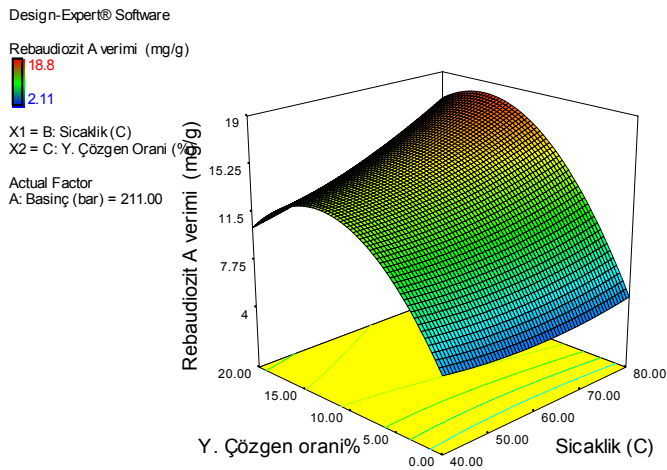
b)



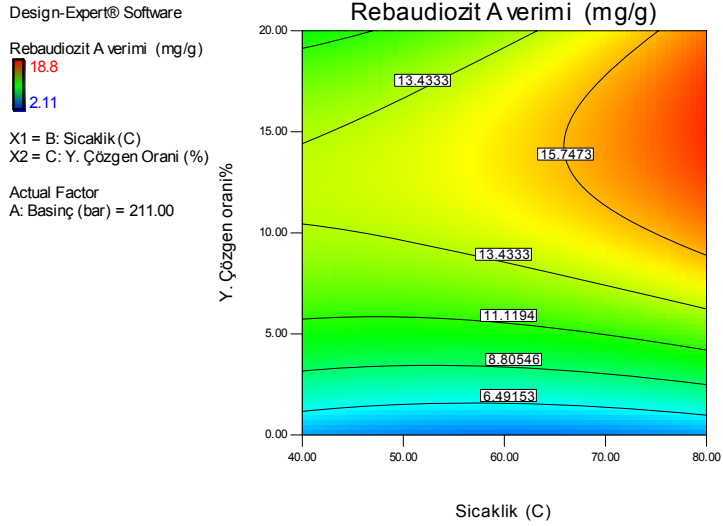
Şekil 4.12. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) yardımcı çözügen oranı ve basıncın (bar) farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir.

Sıcaklık optimum değeri olan 80°C'de sabit tutulmuştur.

a)



b)



Şekil4.13. Rebaudiozit A verimine (mg/g *S. rebaudiana*) yardımcı çözügen oranı ve sıcaklık farklı kombinasyonlardaki (a) 3D, (b) yatay etkilerini göstermektedir. Basınç optimum değerinde (211 bar) sabitlenmiştir.

Şekil 4.13’de yardımcı çözügen ve sıcaklık etkileşimi görülmekte olup, yardımcı çözügen oranını %10-20 arasında tuttuğumuzda 70°C’nin üstünde çalışılırsa, verimin 15.75 mg/g’ın üzerinde bir değer olacağı görülmektedir. En yüksek verimler (31 mg/g) 75-80°C’arasında elde edilmiştir. CO₂ polar olmayan yapıda olduğundan, ayırma işleminde sıcaklık etkisiyle herhangi bir seçicilik göstermemektedir. Glikozit çözünebilirliğini arttırmak için polar yardımcı çözügen karışımı olan etanol-su karışımının %10 oranının üstünde eklenmesi gerekmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, optimize edilmiş bir SC-CO₂ ekstraksiyon metodu geliştirmek için basınç, sıcaklık ve yardımcı çözen oranı etkileri değerlendirilmiştir. Sonuçlar sıcaklık ve yardımcı çözen oranının *S. rebaudiana* bitkisinin yapraklarında en çok bulunan glikozid bileşenlerinin ekstraksiyon verimi üzerinde daha etkili olduğunu, buna karşın basıncın nispeten daha az bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Su ekstraksiyonu ve SC-CO₂ ekstraksiyonuyla elde edilen steviozit ve rebaudiozit A miktarları benzer değerlerde bulunmuştur. Etanol ekstraksiyonu ile elde edilen verimlerin ise bu değerlerin altında kaldığı gözlemlenmiştir. Endüstriyel ölçekte suyu uçurmanın yüksek enerji maliyetleri düşünüldüğünde SC-CO₂ ekstraksiyonu alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

Yoda ve arkadaşları (2003) bu konuda yaptıkları çalışmada %5.5 su'yu yardımcı çözen olarak kullanırken, 250 bar, 16°C'de 4 saatlik ekstraksiyonun sonucunda %17.9 steviozit ve %13.2 rebaudiozit A verimi elde etmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında ise 1 saatte % 28.2 steviozit ve %32 rebaudiozit A verimlerine ulaşılarak literatür değerlerinin üzerinde sonuçlar elde edilmiştir. Suyun polaritesi en yüksek yardımcı çözen oluşumunda göz önüne aldığımızda Yoda ve arkadaşlarının (2003) bulunduğu sonuçların düşük olmasının nedeni, basınç ve yardımcı çözen oranları benzer iken, sıcaklığın düşük olmasıyla açıklanmıştır.

Diğer bir çalışmada Choi ve arkadaşları (2002) SCFE ve metanol ekstraksiyonu uygulamasında sıcaklık ve basınçtaki artışın steviozid verimi üzerine etkisinin düşük olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan bu tez çalışmasında, sıcaklık ve yardımcı çözügen oranının etkili olduğu açıkça ispatlanmıştır. Buna karşın, basıncın etkisinin düşük olduğu saptanmıştır. Steviozid değerlerini 3.56 mg/g ve 2.36 mg/g buldukları belirtilmiştir.

Bu tezde SCF ve soxhlet ekstraksiyonuyla bulunan değerler Çizelge 5.1’de verilmiştir.

Çizelge 5.1. En yüksek sonuçların elde edildiği deneme (250 bar, 80 °C, %20 yardımcı çözügen oranı), su ve etanol ekstraksiyonu verimleri

DENEME	Ekstredeki Steviosit (mg/g)	Steviosit Ekst. yüzdesi (%)	Ekstredeki Rebaudiosit A (mg/g)	Rebaudiosit A Ekst. yüzdesi (%)
SCFE	41.10	31.65	18.80	33.80
Su ekstraksiyonu.	41.96	32.31	22.53	40.52
Etanol ekstraksiyonu.	33.76	26	14.84	26.68

Pol ve ark. (2007) yayınlamış oldukları araştırmada katıdan özütleme işleminde su yerine etanol kullanıldığında, çözügen ekstraksiyon basamağının daha hızlı yapılabildiği vurgulanmıştır. Çalışmamızda çözügen ekstraksiyonu öncesi bir işlem uygulanmamış, su ile ekstraksiyon sonucunda %32.2 steviozid, %40.5 rebaudiozid A elde edilmiştir. Buna karşın, etanolle ekstraksiyonda sadece %26.0 steviozid ve %26.7 rebaudiozid A elde edilmiştir. Ekstrelerin 1 L’lik sıvı karışım halinden katı hale gelmesi için bir seri işlem uygulanmıştır. Tablet haline

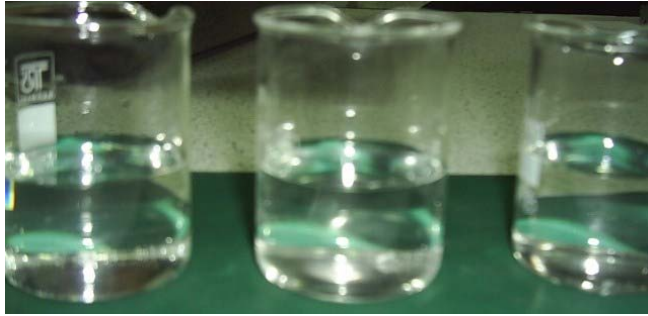
gelmeden önce vakumda buharlaştırma ve ardından ekstrede hiç çözügen kalıntısı kalmaması için liyofilizasyonla kurutma son basamak olmuştur.



(a)



(b)



(c)

Şekil 5.1. Sakkarin tablet ilk atıldığında (a), erirken (b), tamamen eridikten sonraki (c) görüntüleri

Tablet haline getirilen ürünlerin suda çözünme süresi 4 dakika iken piyasada satılan Huxol Zum Süssen markalı sakkarin diyabet ve diyet

şekeri ürününün suda çözünmesi 7 dakika sürmüştür ve Şekil 5.1’de *S. rebaudiana* ekstresinden hazırlanan tabletlerle benzer şekilde eridiği gösterilmektedir.

Pasquel ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada çözgen ekstraksiyonundaki üründe steviozit miktarı rebaudiozit A’dan fazla olduğunda ürünün tadının acımsı olduğu, bu nedenle alkolsüz içeceklerde kullanılmadığı belirtilmiştir. Bu acımsı tadın giderilmesi amacıyla SCFE teknolojisi denenmiş ve üründe rebaudiozit A miktarı daha fazla bulunup, tadda düzelme olduğu görülmüştür. Bunun ardından Yoda ve arkadaşlar (2003) SCFE uygulamasını kütle transferi açısından incelemişler, ve de Choi ve arkadaşları da (2002) kromatografik analiz yapmışlardır. Sistemik bir optimizasyon çalışmasına literatürde rastlanamamıştır.

Bu tez çalışmasında 300 bar’ın üstünde basıncın etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bulgularımızdan yola çıkarak, diğer iki değişken optimumda tutularak değişik basınçlarda glikozit konsantrasyonlarını tahmin etmek elde edilen matematik modeliyle mümkündür. Ayrıca, basıncın 100 bar’dan 200 bar’a yükseltildiğinde, toplam glikozit miktarı 45.13’den 54.26 mg/g’a çıkmaktadır. Üstelik bu ekstre edilebilen toplam glikozit miktarının, 250 bar’daki miktarına (53.61 mg/g) benzer bir değer elde edilmektedir. Fakat bunun aksine, diğer bileşenlerin seyrelme etkisindeki değişim nedeniyle 350 bar’da (41.92 mg/g) düşüş olmaktadır.

Bu çalışmada, üretim parametreleri optimize edilerek, *S. rebaudiana* bitkisinden kalorisiz, çözgen kalıntısı içermeyen diyet ya da

diyabet şekeri üretiminin laboratuvar ölçeğinde mümkün olduğu gösterilmiştir. Sıcaklık ve yardımcı çözen oranının ekstraksiyon verimi üzerine çok etkisi olduğu saptanmıştır. Basıncın ise 300 bar'dan sonra bir etkisi olmamıştır. Basıncın etkisinin az olduğu, steviozite ve rebaudiozit A ekstraksiyon verimi 150 bar, 60 °C ve %20 yardımcı çözen oranında 13.86 ve 7.39 mg/g bulunurken, 350 bar'da diğer değişkenler sabit tutulduğunda 15.50 ve 9.15 mg/g bulunmasıyla görülmektedir.

Arzu edilmeyen ve tada zarar verici bileşenler içermeyen bu yöntemle ürün tablet haline getirilmiş, piyasadaki sakkarin tabletten daha hızlı çözülmüş, ağızda güzel bir tad bırakmıştır. Sonuç olarak, gıda maddeleri ve içeceklerde kabul edilir bir kalitede ticari bir uygulama potansiyeli mevcuttur. Ölçek büyütmeye gidilmesi durumunda kısa bir adaptasyon süreci sonunda istenilen sonuca ulaşılabilecektir. SCFE'un tesis maliyeti çözen ekstraksiyonundan fazla olmakla birlikte işletme maliyeti düşüktür. Çözen ekstraksiyonunda en yüksek verimi veren kuvvetli bir polar çözücü olan sudur. Suyun ekstreden uzaklaştırılması için buharlaştırıcılar kullanılan sanayi ölçekli tesislerde enerji maliyeti çok yüksektir. Maliyeti yüksek ve saflılık değeri önemli olan ürünlerde SCFE yönteminin uygulanması çözen kalıntısı içermediğinden daha sağlıklıdır.

KAYNAKLAR

- Adil, İ.H.**, 2006, Pressurized liquid extraction of phenolic compound from fruit pomaces, Doktora, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 122s.
- Atteh, J.O., Onagbesan, O.M., Tona, K., Decuypere, E., Geuns, J.M.C, Buyse, J.**, 2008, Evaluation of supplementary *stevia* (*S. rebaudiana* Bertoni) leaves and stevioside in boiler diets: effect on feed intake, nutrient metabolism blood parameters and growth performance, *J. of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92: 640-649.
- Barriocanal, L.A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Benitez, S., Jimenez, J.T., Jimenez, N., Rojas, V.**, 2008, Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans, A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in type 1 and type 2 diabetics, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51: 37–41.
- Bjorklund, E., Jaremo, M., Mathiasson, L., Jonsson, J.A., Karlsson, L.**, 1998, Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction, *Analytica Chimica Acta* 368: 117-128.

KAYNAKLAR (devam)

- Bondarev, N., Reshetnyak, O., Nosov, A.,** 2001, Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in in vitro cultures of *S. rebaudiana* Bertoni, Plant Science 161: 155–163.
- Brusick, D.J.,** 2008, A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides, Food and Chemical Toxicology 46: 83-91.
- Camila, A.,** 2007, Sweeteners, *stevia* hits the sweet spot naturally, Food Engineering and Ingredients 32, issue 3: 6-8.
- Canımoğlu, S.,** 2005, Gıda Tatlandırıcısı Olarak Kullanılan Maltitol'un İnsan Lenfositlerinde Sitogenetik Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 87s.
- Carakostas, M.C. , Curry, L.L., Boileau, A.C., Brusick, D.J.,** 2008, Overview, The history, technical function and safety of *rebaudiosid A*-a naturally occurring steviol glycoside for use in food and beverages, Food and Chemical Toxicology 46: 1–10.
- Chatsudhipong, V., Muanprasat, C.,** 2009, Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness, Pharmacology and Therapeutics 121: 41-54.
- Chen, Y.T., Yong, C.L.,** 2000, An overview of supercritical fluid extraction in Chinese herbal medicine from preparation analysis, Journal of food and drug analysis 8, no:4: 235-247.

KAYNAKLAR (devam)

- Choi, Y.Hae, Kim, I., Yoon, K.D., Lee, S.J., Kim, C.Y. , Yoo, K.P., Choi, Y. Hee, Kim, J.,** 2002, Supercritical fluid extraction and liquid chromatographic-electrospray mass spectrometric analysis of stevioside from *S. rebaudiana* leaves, *Chromatographia* 55: 617- 620.
- Curry, L.L., Roberts, A.,** 2008, Subchronic toxicity of rebaudiozit A. *Food and Chemical Toxicology* 46: 11- 20.
- Çelikleş, Ö.Y.,** 2005, Antioksidan ekstraktlerin biberiye (*Rosmarinus officinalis L.*) bitkisinden ve kallus kültüründen eldesi ve karşılaştırılması, Doktora Tezi, EGE Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 184s.
- Dong, C.H., Xie, X. Q., Wang, X. L.,** 2008, Application of Box-Bhenken design in optimization for polysaccharides extraction from cultured mycelium of *Cerdyceps sinensis*, *Food and Bioproducts Processing* 53: 1-6.
- Döker, O.,** 200, Ress süreci ile eritromisin tanecikler oluşumu, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 78s.
- Dönmez, S.,** 2008, Tatlı bir konu yapay tatlandırıcılar, Bulunduğu yer: http://www.sdonmez.com/sf-index-of-Yapay_tatlandırıcılar-cp-2_23.htm.html.

KAYNAKLAR (devam)

- Feri, L.A.F., Alves-Do-Prado, W., Yamada, S.S., Gazola, S., Batista, M.R., Bazotte, R.B.,** 2006, Inverstigation of Antihypertensive effect of oral crude stevioside in patients with mild essential hypertension, *Phytotherapy Research* 20: 732–736.
- Ferreira, S.L.C., Bruns, R.E., Ferreira, H.S., Matos, G.D., David, J.M., Brandao, G.C., da Silva, E.G.P., Portugal, L.A., dos Reis, P.S., Souza, A.S., dos Santos, W.N.L,** 2007, Box-Bhenken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta* 597: 179-186.
- Gamse, T.,** 2009, Supercritical extraction of solid material: from lab scale to industrial application, *Life Long Learnin Intensive Course*, 37p.
- Greenly, L.W.,** 2003, A Doctor' s Guide to sweeteners, *Journal of Chiropractic Medicine*, 2: 80- 86.
- Gregersen, S., Jeppesen, P.B., Holst, J.J., Hermansen , K.,** 2004, Antihyperglycemic effects of stevioside in type 2 diabetic subjects, *Metabolism* 53: 73-76.
- Guens, Jan M.C.,** 2003, Molecules of interest stevioside, *Phytochemistry* 64: 913–921.

KAYNAKLAR (devam)

Guens, Jan M.C., Augustijns, P, Mols, R., Buyse, J., .Driessen , B ., 2003, Metabolism of stevioside in pigs and intestinal absorption characteristics of stevioside, rebaudioside A and steviol, Food and Chemical Toxicology 41: 1599-1607.

Hsieh, M.H., Chan, P., Sue, Y.M., Liu, Ju-Chi, Liang, T.H., Huang T.Y., Tomlinson, B., Chow, M.S.S., Kao, P.F., Chen, Y.J., 2003, Efficacy and Tolerability of oral stevioside in plants with mild essential hypertension: A two year, randomized, placebo-controlled study, Clinical therapeutics 25: 2797-2808.

Hearn, L.K., Subedi, P.P., 2009, Determining levels of steviol glycosides in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy, Journal of food comp. and analysis, 22: 165- 168.

<http://www.ansiklopedi.turkcebilgi.com/tatlandiricilar>, Haziran 2009 .

[http://www.eustas.org/what is S. rebaudiana](http://www.eustas.org/what%20is%20S.%20rebaudiana), 2006

<http://www.sciencelab.com>, Haziran 2009

<http://www.stevia.com.tr>, Haziran 2009.

<http://www.stevya.com.tr>, Haziran 2007.

<http://www.tharsfc.com>, Haziran 2009.

<http://www.wisdomnaturalbrands.com>, Haziran 2009.

KAYNAKLAR (devam)

- Huang, W., Li, Z., Niu, H., Li, D., Zhang, J.,** 2008, Optimization of operating parameters for supercritical carbon dioxide extraction of lycopene by response surface methodology, *Journal of Food Engineering* 89: 298–302.
- Ikan, R.,** 1999, *Naturally Occuring Glycosides*, 401-420, John Wiley and Sons press, USA.
- Jaitak, V., Gupta, A.P., Kaul, V.K., Ahuja, P.S.,** 2008, Validated high-performance thin-layer chromatography method for steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*, *Journal of pharmaceut. and Biomed. Anal.* 47: 790–794.
- Jeppesen, P.B., Gregersen, S., Rolfsen, S.E.D., Jepsen, M., Colombo, M., Agger, A., Xiao, J., KruhÓffer, M., Órntoft, T., Hermansen, K.,** 2003, Antihyperglycemic and blood pressure - reducing effects of steviolzite in the diabetic Goto-Kakizaki Rat, *Metaolism* 52: 372–378.
- JECFA; Joint** FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2004, Geneva, Switzerland), Evaluation of certain food additives, sixty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee, WHO technical report series, 928. Available at: <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/en/Summary63final.pdf>. Accessed 2006 Jan 3.

KAYNAKLAR (devam)

- Jonnala, K.K., Garikapati, K.B.A., Kaul, V.K., Ahuja, P.S., 29 June 2006**, Process for production of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* bertonii, Patent Application no. US20060142555 Kind Code: A 1, Available at: <http://www.freepatentsonline.com/y2006/0142555.html?query=US20060142555&stemming=on>
- Kienle, Udo**, 1992, Method of making a natural sweetener based on *Stevia rebaudiana*, and use thereof, Patent application no. US 005112610A.
- Kinghorn, D.A.**, 2002, *Stevia*, Medical and aromatic plants/industrial profiles, overview 2, CRC press, USA.
- Kochikyan, V.T., Markosyan, A.A., Abelyan, L.A., Balayan, A.M., Abelyan, V.A.**, 2006, Combined Enzymatic Modification of steviol glycoside and rebaudioside A, Applied Biochemistry and Microbiology 42: 31-37.
- Kovylyayeva, G.A., Strobykina, Yu., I., Gubskaya, V.I., Shoripova, R.R., Alfonsov, V.A., Kataev, V.E., Tolstikov, A.G.** , 2007, Glycosides from *Stevia rebaudiana*, Chemistry of Natural Compounds 43: 81-85.

KAYNAKLAR (devam)

- Koyama, E., Sakai, N., Otori, Y., Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujina, A., Ui, M.,** 2003, Absorbtion and metabolism of glycosidic sweeteners of *S. rebaudiana* mixture and their aglycone , steviol in rats and humans, Food and Chemical toxicology 41: 875- 883.
- Kroger, M., Meister, K., Kava, R.,** 2006, Low calorie sweeteners and other sugar substitutes: a review of the safety issues, Comprehensive reviews in food science and food safety 5: 35-47.
- Kroyer, G. T.,** 1999, The low calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients, Lebensm-wiss, u- Technol. 32: 509-512.
- Li, W.L., Zheng, H.C., Bukuru, J.N., De Kimpe,N.,** 2004, Natural medicines used in the traditional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus, Journal of Ethnopharmacology 92: 1–21.
- Liu, J., Ong, C.P., Li, S.F.Y.,** 1997, Subcritical fluid extraction of *Stevia* sweeteners from *S. rebaudiana*, Journal of Chromatographic Science 35: 446–450.
- Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S.,** 1997, Natural products fort he improvement of the quality of life, Pure and Applied Chem. 69: 655-657.

KAYNAKLAR (devam)

- Maki, K.C., Curry, L.L., Reeves, M.S., Toth, P.D., Mckenney J.M., Farmer, M.V., Schwartz, S.L., Lubin, B.C., Boileau, A.C., Dicklin, M.R, Carakostas, M.C., Tarka, S.M,** 2008, Chronic consumption of rebaudioside A, a steviol glycoside, in men and women with type 2 diabetes mellitus, *Food and Chemical Toxicology* 46: 47–53.
- Markovic, I.S., Darmati, Z.A., Abramovic, B.F.,** 2008, Chemical composition of leaf extracts of *Stevia rebaudiana* Bertoni grown experimentally in Vojvodina, *J. Serb. Chem. Soc.* 73: 283–297.
- Martinez, J. L.,** 2007, *Supercritical fluid extraction of nutraceuticals and bioactive compounds*, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Nabors, Lyn O'Brien.,** 2001, *Alternative sweeteners*, revised and expanded, 3rd edition , 572 sayfa, Marcel Dekker,USA.
- Pasquel, M.A.A. Meireles, M.O.M. Marques, A.J. Petenate,** 2000, Extraction of *stevia* glycosides with CO₂ +water, CO₂+ethanol,and CO₂+ water+ ethanol, *Brazillian journal of Chemical Engineering* 17(3): 1-16.

KAYNAKLAR (devam)

- Pol, J., Ostra, E.V., Karasek, P., Roth, M., Benesova, K., Kotlarikova, P., Caslausky, J.,** 2007, Comparison of two different çözgens employed for pressurised fluid extraction of stevioside from *S. rebaudiana*: methanol versus water, Anal Bioanal Chem 388: 1847-1857.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek AP, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M.,** 2002, Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies, Food Chem. Toxicol 40: 871–98.
- Shar, I., Kaul, A., Bani, S., Pal, H.C., Saxena, A.K.,** 2008, Immune up regulatory response of a non-caloric natural sweetener stevioside, Chemico Biological interreactions 173: 115- 121.
- Sivaram, L., Mukundan, U.,** 2003, In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*, In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant 39: 520- 523.
- Soejarto, D.D., Kinghorn, A.D., Fransworth, N.R.,** 1982, Potential sweetening agents of plant origin. J. Nat. Prod. 45: 590-599.
- Stalikas, C., Framegos, Y., Sakkas, V., Albanis, T.,** 2009, Review, Developments on chemometric approaches to optimise and evaluate microextraction, Journal of Chromatography A, 1216: 175-189.

KAYNAKLAR (devam)

- Tadhani, M.B., Patel, V.H., Subhash, R.,** 2007, *In vitro* antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and cellus, Journal of food composition and analysis 20: 323-329.
- Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M., Tokuda, H., Takayasu, J., Nishino, H., Miyakoshi, M., Mizutani, K., Lee, K.H.,** 2009, Cancer preventive agents, part 8: Chemopreventive effects of stevioside and related compounds, Bioorganic and Medical Chemistry 17: 600-605.
- Tan, S., Shibuta, Y., Tanaka, O.,** 1988, Isolation of sweetener from *Stevia rebaudiana*, Jpn. Kokai 63,177,764.
- Taylor, L.,** 2005, *Stevia Rebaudiana*, Available at: <http://www.raintree.com/stevia.htm>.
- Toyoda, K., Matsui, H., Shoda, T., Uneyama, C., Takada, K., Takahashi, M.,** 1997, Assesment of the carcinogenicity of stevioside in F344 Rats, Food and Chemical Toxicology 35: 597–603.

KAYNAKLAR (devam)

- Turner, C., Whitehand, L.C., Nguyen, T., Mckeon, T.,** 2004, Optimisation of a supercritical fluid Extraction/Reaction Methodology for the analysis of castor oil using Experimental Design, *J. Agric. Food. Chem.* 52: 26–32.
- Türk Gıda Kodeksinin,** Gıda maddelerinde kullanılan tatlandırıcılar tebliğinde değişiklik yapılması hakkında tebliğ no: 2007/37.
- Vanek, T., Nepovim, A., Valicek, P.,** 2001, Determination of stevioside in plant material and fruit teas, *Journal of food Comp. and Anal.* 14: 383–388.
- Voith, M., Sweet natura,** July 28, 2008, vol:86, N:30, 32, Available at: <http://www.pubs.acs.org/cen/business/86/8630bus1a.html>.
- Wang, L., Yang, B., Xiuqiao, D., Chun, Y.,** 2008, Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Puerraria lobata*, *Food Chemistry* 108: 737-741.
- Wheeler, A., Boileau, A.C., Wincler, P.C., Compton, J.C., Parakash, I., Jiang, X., Mandarino, P.A.,** 2008, Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men, *Food and Chemical Toxicology* 46: 54-60.

KAYNAKLAR (devam)

- Wingard, R.E., Brown, J.P., Enderlin, F.E., Dale, J.A., Hale, R.L., Seitz, C.T.,** 1980, İntestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners stevioside and rebaudioside A, Cellular and molecular life sciences, 36: 519-520.
- Yoda, S.K., Marques, M.O. M., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A.,** 2003, Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO₂ and CO₂ + Water: extraction kinetics and identification of extracted components, Journal of Food Eng. 57: 125–134.
- Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S.,** 2007, Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit seeds, Food Chemistry 105: 1026–1031.

E-1 Malzeme Güvenlik Veri Listesi (<http://www.Sciencelab.com>, 2009).

Material Safety Data Sheet

Stevia Liquid, 15% Extract MSDS

Section 1: Chemical Product and Company Identification

<p>Product Name: Stevia Liquid, 15% Extract</p> <p>Catalog Codes: SLS2602</p> <p>CAS#: Mixture.</p> <p>RIECS: Not applicable.</p> <p>TSCA: TSCA 8(b) inventory: Water</p> <p>CI#: Not available.</p> <p>Synonym: Stevia Liquid, 15% Extract</p> <p>Chemical Name: Not applicable.</p> <p>Chemical Formula: Not applicable.</p>	<p>Contact Information:</p> <p>Sciencelab.com, Inc. 14025 Smith Rd. Houston, Texas 77396</p> <p>US Sales: 1-800-901-7247 International Sales: 1-281-441-4400</p> <p>Order Online: Sciencelab.com</p> <p>CHEMIREC (24HR Emergency Telephone), call: 1-800-424-9300</p> <p>International CHEMIREC, call: 1-703-527-3887</p> <p>For non-emergency assistance, call: 1-281-441-4400</p>
---	---

Section 2: Composition and Information on Ingredients

Composition:

Name	CAS# % by Weight
Water 7732-18-5	
Stevioside	15

Toxicological Data on Ingredients: Stevioside LD50: Not available. LC50: Not available.

Section 3: Hazards Identification

Potential Acute Health Effects: Slightly hazardous in case of skin contact (irritant), of eye contact (irritant), of ingestion.

Potential Chronic Health Effects:

CARCINOGENIC EFFECTS: Not available.
MUTAGENIC EFFECTS: Not available.
TERATOGENIC EFFECTS: Not available.
DEVELOPMENTAL TOXICITY: Not available.

Section 4: First Aid Measures

Eye Contact:

Check for and remove any contact lenses. In case of contact, immediately flush eyes with plenty of water for at

least 15 minutes. Cold water may be used. Get medical attention if irritation occurs.

Skin Contact:

Wash with soap and water. Cover the irritated skin with an emollient. Get medical attention if irritation develops. Cold water may be used.

Serious Skin Contact: Not available.

Inhalation:

If inhaled, remove to fresh air. If not breathing, give artificial respiration. If breathing is difficult, give oxygen. Get medical attention.

Serious Inhalation: Not available.

Ingestion:

Do NOT induce vomiting unless directed to do so by medical personnel. Never give anything by mouth to an unconscious person. If large quantities of this material are swallowed, call a physician immediately. Loosen tight clothing such as a collar, tie, belt or waistband.

Serious Ingestion: Not available.

Section 5: Fire and Explosion Data

Flammability of the Product: Non-flammable.

Auto-Ignition Temperature: Not applicable.

Flash Points: Not applicable.

Flammable Limits: Not applicable.

Products of Combustion: Not available.

Fire Hazards in Presence of Various Substances: Not applicable.

Explosion Hazards in Presence of Various Substances: Non-explosive in presence of open flames and sparks, of shocks.

Fire Fighting Media and Instructions: Not applicable.

Special Remarks on Fire Hazards: Not available.

Special Remarks on Explosion Hazards: Not available.

Section 6: Accidental Release Measures

Small Spill:

Dilute with water and mop up, or absorb with an inert dry material and place in an appropriate waste disposal container. Finish cleaning by spreading water on the contaminated surface and dispose of according to local and regional authority requirements.

Large Spill:

Absorb with an inert material and put the spilled material in an appropriate waste disposal. Finish cleaning by spreading water on the contaminated surface and allow to evacuate through the sanitary system.

Section 7: Handling and Storage

Precautions: No specific safety phrase has been found applicable for this product.

Storage: Keep container tightly closed. Keep container in a cool, well-ventilated area. Do not store above 25°C (77°F).

Section 8: Exposure Controls/Personal Protection

Engineering Controls:

Provide exhaust ventilation or other engineering controls to keep the airborne concentrations of vapors below their respective threshold limit value.

Personal Protection: Safety glasses. Lab coat.

Personal Protection in Case of a Large Spill:

Splash goggles. Full suit. Boots. Gloves. Suggested protective clothing might not be sufficient; consult a specialist BEFORE handling this product.

Exposure Limits: Not available.

Section 9: Physical and Chemical Properties

Physical state and appearance: Liquid.

Odor: Odorless.

Taste: Not available.

Molecular Weight: Not applicable.

Color: Clear Colorless.

pH (1% soln/water): Neutral.

Boiling Point: The lowest known value is 100°C (212°F) (Water).

Melting Point: Not available.

Critical Temperature: Not available.

Specific Gravity: The only known value is 1 (Water = 1) (Water).

Vapor Pressure: The highest known value is 2.3 kPa (@ 20°C) (Water).

Vapor Density: The highest known value is 0.62 (Air = 1) (Water).

Volatility: Not available.

Odor Threshold: Not available.

Water/Oil Dist. Coeff.: Not available.

Ionicity (in Water): Not available.

Dispersion Properties: See solubility in water.

Solubility: Easily soluble in cold water, hot water.

Section 10: Stability and Reactivity Data

Stability: The product is stable.

Instability Temperature: Not available.

Conditions of Instability: Not available.

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 27 Mayıs 1973, Manisa

Eğitim Durumu

Yüksek Lisans: EGE Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı, (2009)

Lisans: EGE Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü, (1992-1996)

Hazırlık: EGE Üniversitesi Yabancı Diller Bölümü, (1990-1992)

Lisans Projesi: Removal of heavy metal ions from aqueous solution by hollow fiber adsorbents prepared by Radiation-Induced Grafting. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nalan KABAY

Stajlar

- 22000 Gıda Kalite Sistemi, WQS danışmanlık (2006)
- İşletme Stajı, Ateşoğlu Bioyoğurt, İstanbul (2006)
- ISO 9001, Kırmacı Danışmanlık, İsoqar Danışmanlık (2000)
- İşletme Stajı-Ege Gübre Sanayi (1995)
- İşletme Stajı- Akzo Nobel KAmipol Boya Sanayi (1994)

İş Deneyimi

- Şarap tesisi hammadde seçim ve laboratuvar sorumlusu, Çeşme Bağcılık Şarapçılık, İzmir (2006-2007).
- Paketleme, kalite Kontrol, Planlama Mühendisi, Güral Cam Sanayi, Kütahya (artcraft.com.tr) (1998-1999).
- LURGİ Bitkisel hamyağ Ekstraksiyon tesisi Üretim Mühendisi, işletme sorumlusu, Ege Yağ Sanayi (yoncaege.com.tr) , Manisa (1997).

Yayınlar

1. Erkucuk, A., Akgun, İ.H., Yesil-Celiktaş, O, 2009, Supercritical CO₂ extraction of glycosides from *S. rebaudiana* leaves: Identification and optimization, the Journal of Supercritical fluids, Article in Press.

Kurslar ve Sertifikalar

- The Life Long Learning Intensive Course SCF-GSCE "Supercritical Fluids - Green Çözümler in Chemical Engineering", 25 Haziran -10 Temmuz 2009, KOÇ Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- ISO-9000 Kalite Sistemi Kalder (2007)
- Haccp, Kimya Müh. Odası (2005)
- Hızlı Mikrobiyal Sayım Yöntemleri, EBİLTEM (2002)
- Etkili ve Güzel konuşma, EGESEM Ege Üniversitesi (2001)
- İngilizce Çeviri (2001), Toefle hazırlık (2000)
- İşletme Yönetimine Giriş, Dokuz Eylül Üniversitesi, işletme ve iktisat fakültesi (1998).

Yabancı Dil

İngilizce TOEIC 2004 (630), KPDS 2008 (63)

Bilgisayar Bilgisi

Mikrosoft Office, Baan MRP stok control programı

İlgi Alanları

Seramik şekillendirme, yağlıboya resim, yüzme, fitness, yoga, fotoğraf çekme, felsefe, psikoloji, biyoloji.