



**NAR KABUKLARINDAN ENZİMATİK VE
ORGANİK ASİT YÖNTEMLERİ İLE PEKTİN
EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU**

HALENUR KELEŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI
Prof. Dr. Özlem AKPINAR
Haziran - 2019
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAR KABUKLARINDAN ENZİMATİK VE ORGANİK ASİT
YÖNTEMLERİ İLE PEKTİN EKSTRAKSİYONU VE
KARAKTERİZASYONU

HALENUR KELEŞ

TOKAT
Haziran - 2019

Halenur KELEŞ tarafından hazırlanan “**Nar Kabuklarından Enzimatik ve Organik Asit Yöntemleri İle Pektin Ekstraksiyonu ve Karakterizasyonu**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27 HAZİRAN 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Özlem AKPINAR

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Melih GÜZEL
Gümüşhane Üniversitesi

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

ONAY

Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü



TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Halenur KELEŞ

27 Haziran 2019

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAR KABUKLARINDAN ENZİMATİK VE ORGANİK ASİT YÖNTEMLERİ İLE PEKTİN EKSTRAKSİYONU VE KARAKTERİZASYONU

HALENUR KELEŞ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. ÖZLEM AKPINAR)

Bu çalışmada nar kabuğundan enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile pektin ekstrakte edilmiş ve elde edilen pektinin fiziksel, kimyasal ve yapısal özellikleri geleneksel pektin ekstraksiyon yöntemi olan sitrik asit ile ekstrakte edilen pektin ile karşılaştırılmıştır. Enzimatik pektin ekstraksiyonu için selüloz enzimi (*Aspergillus Niger*) kullanılmıştır. Her iki yöntem (enzimatik ve geleneksel sitrik asit ekstraksiyonu) yanıt yüzey yöntemi kullanılarak optimize edilmiştir. Enzimatik ekstraksiyon için optimum koşullar 0.075 U/mL enzim konsantrasyonu, 9.99 g nar/100 mL substrat konsantrasyonu ve 2.58 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Sitrik asitle pektin ekstraksiyonu için optimum koşullar 8 mL/g solvent/katı oranı, pH 1 ve 3 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Pektin verimleri ise sırasıyla %7.19, %5.35 olarak belirlenmiştir. Pektinlerin FTIR analizleri sonucunda yapıları benzer bulunmuştur. Her iki yöntemle elde edilen pektinin yüksek (DE>50) metoksilli pektin olduğu saptanmıştır. Enzimatik ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen pektinin sitrik asitle ekstrakte edilen pektine göre verimi ve esterleşme derecesi daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmanın sonuçları, şimdye kadar biyoaktif bileşikleri ile ön plana çıkan nar kabuğunun pektin üretiminde de kullanılabileceği göstermiştir.

2019, 82 SAYFA

ANAHTAR KELİMELER: Pektin, Ekstraksiyon, Selüloz, Nar Kabuğu, Sitrik Asit

ABSTRACT

MASTER THESIS

CHARACTERIZATION AND EXTRACTION OF PECTIN WITH ENZYMATIC AND ORGANIC ACID METHODS FROM POMEGRANATE PEELS

HALENUR KELEŞ

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. ÖZLEM AKPINAR)

In this study, pectin was extracted from pomegranate peel by enzymatic extraction method and the physical, chemical and structural properties of the extracted pectin was compared to pectin extracted with conventional citric acid extraction method. The cellulase (*Aspergillus Niger*) enzyme was used for the enzymatic pectin extraction. Both methods (enzymatic and conventional citric acid extraction) were optimized by using response surface methodology. The optimum conditions for the enzymatic extraction were determined as 0.075 U/mL of enzyme concentration, 9.99 g pomegranate/100 mL of substrate concentration and 2.58 h of extraction time. The optimum conditions for pectin extraction with citric acid were determined as 8 mL/g of solvent/solid ratio, pH 1 and 3 h of extraction time. The yields for both pectins were determined as 7.19% and 5.35% respectively. The structures of both pectins were similar to each other based on the FTIR analysis. Pectins obtained by the both methods were found to be high (DE> 50) methoxylated pectin. The yield and esterification degree of the enzymatically extracted pectin were found to be higher than those of citric acid extracted pectin. The results of this study have shown that so far the pomegranate peel, which has come to the forefront with its bioactive compounds, could be to be used in the production of pectin.

2019, 82

KEYWORDS: Pectin, Extraction, Cellulase, Pomegranate Peel, Citric Acid

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, planlanmasında ve çalışmanın yürütülmesinde bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Özlem AKPINAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Gıda Mühendisliği bölüm hocalarından Sayın Ali CİNGÖZ'e, Sayın Semra TOPUZ'a ve Değerli Arkadaşım Sümeyya ERDOĞMUŞ'a ve tezimin değerlendirilmesinde değerli katkılarını sunan juri üyeleri Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOKATLI ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melih GÜZEL'e ve bu süreçte yanımda olan değerli ailem ve arkadaşlarımda çok teşekkür ederim.

Halenur KELEŞ

27 Haziran 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETİ	3
2.1. Pektinin Yapısı.....	3
2.2. Pektinin Tarihçesi	4
2.3. Pektinin Özellikleri.....	5
2.3.1. Pektinin fiziksel ve kimyasal özellikleri	5
2.3.2. Pektinin jelleşmesi	6
2.4. Pektin Üretimi.....	9
2.4.1. Geleneksel asit ekstraksiyonu ile pektin üretimi	11
2.4.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile pektin üretimi	14
2.4.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile pektin üretimi.....	16
2.4.4. Sub-kritik su ekstraksiyonu ile pektin üretimi	17
2.4.5. Enzimatik ekstraksiyon ile pektin üretimi	18
2.5. Selülozlar	22
2.6. Pektinin Kullanım Alanları	24
2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)	25
2.8. Nar Kabuğu.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	31
3.1. Materyal	31
3.2. Yöntem.....	31
3.2.1. Pektinin sitrik asit ile ekstraksiyonu	31
3.2.2. Pektinin enzimatik ekstraksiyonu	32

3.2.3. Deneysel tasarım ve yanıt yüzey metodu ile ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu	32
3.3. Pektin Analizleri	34
3.3.1. Pektinin kuru madde, kül, toplam şeker, indirgen şeker ve protein içeriği	34
3.3.2. Pektinin karakterizasyonu	36
3.3.3. Pektinde üronik asit tayini	37
3.3.4. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi	38
3.4. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	39
4.1. Pektinin Enzimatik Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu	39
4.2. Pektinin Sitrik Asit ile Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu	45
4.3. Pektinlerin Kuru Madde, Kül, Toplam Şeker, İndirgen Şeker ve Protein İçerikleri	52
4.4. Pektinlerin Çözünürlüğü	53
4.5. Pektinlerin Eşdeğer Ağırlığı, Metoksil İçeriği, Galakturonik Asit Anhidronik Asit İçeriği ve Esterleşme Derecesi.....	54
4.6. Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spektroskopisi.....	57
5. SONUÇ.....	60
6. KAYNAKLAR	61
7. EKLER.....	77
EK I. Toplam Şeker Analizinden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı	78
EK II. DNS Çözeltilsinin Hazırlanışı.....	79
EK III. Bradford Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	80
EK IV. Üronik Asit Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı.....	81
8. ÖZGEÇMİŞ.....	82

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
AUA	Anhidronik asit
BSA	Bovin Serum Albumin
DNS	Dinitrosalisilik asit
EA	Eküvalent ağırlık
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
DE	Esterleşme Derecesi

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Pektinin yapısı	4
Şekil 2.2. Pektin yapıları (A) yüksek metoksilli pektin (B) düşük metoksilli pektin	7
Şekil 2.3. Pektinin endüstriyel üretim süreci	11
Şekil 4.1. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri(enzimatik ekstraksiyon)	43
Şekil 4.2. Model yeterlilik grafikleri (enzimatik ekstraksiyon)	44
Şekil 4.3. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri (sitrik asit ile ekstraksiyon)	50
Şekil 4.4. Model yeterliliği grafikleri (sitrik asit ile ekstraksiyonu).....	51
Şekil 4.5. Enzimatik ekstrakte edilmiş pektinin FTIR spektrumu	58
Şekil 4.6. Sitrik asitle ekstrakte edilmiş pektinin FTIR spektrumu	58
Şekil 4.7. Ticari pektinin FTIR spektrumu	59

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Ticari pektinlerin özellikleri	6
Çizelge 2.2. Bazı ticari ve ticari olmayan pektin kaynaklarının karşılaştırılması	8
Çizelge 2.3. Bazı meyve ve sebzelerin pektin içerikleri	10
Çizelge 2.4. Asit ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve ve sebze kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi	13
Çizelge 2.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi	15
Çizelge 2.6. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi	17
Çizelge 2.7. Sub-kritik su ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi	18
Çizelge 2.8. Çeşitli meyve artıklarından enzimatik ekstraksiyon koşullarının elde edilen pektin ve verimine etkisi	20
Çizelge 3.1. Sitrik asit ekstraksiyonu için denenen bağımsız değişkenlerin aralıkları	33
Çizelge 3.2. Enzimatik ekstraksiyonu için denenen bağımsız değişkenlerin aralıkları	34
Çizelge 4.1. Deneysel tasarım ve nar kabuklarından enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektin verimleri	40
Çizelge 4.2. Nar kabuklarında enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektin verimlerinin ANOVA çizelgesi	41
Çizelge 4.3. Optimum enzimatik ekstraksiyon koşullarında elde edilen deneysel ve tahmini pektin verimleri	44
Çizelge 4.4. Deneysel tasarım ve nar kabuklarından sitrik asit ekstraksiyonla elde edilen pektin verimleri	47
Çizelge 4.5. Nar kabuklarında sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektin verimlerinin ANOVA çizelgesi	48

Çizelge 4.6. Optimum sitrik asit ekstraksiyon koşullarında elde edilen deneysel ve tahmini pektin verimleri	51
Çizelge 4.7. Pektin örneklerinde nem, kül, toplam şeker ve protein miktarları	53
Çizelge 4.8. Pektinlerin çözünürlüğü	54
Çizelge 4.9. Pektin örneklerinde eşdeğer ağırlık, metoksil, anhidronik asit, esterleşme ve galaktronik asit miktarları	57



1. GİRİŞ

Pektin bitkilerin hücre duvarında, özellikle meyve ve sebzelerin orta lamellerinde bulunan doğal bir polisakkarittir. Gıda ve gıda sanayi dışında kozmetik, ilaç, tekstil ve kağıt endüstrisinde kullanılmaktadır. Günümüzde doğal ürünlere talebin artması ile doğal bir polisakkarit olan pektin, değerli bir katkı maddesi konumuna gelmiştir. Gıda sanayinde kıvamlaştırıcı, jelleştirici, dolgu maddesi, emülsifiye ve tekstür ajanı olarak kullanılmaktadır (Thakur ve ark., 1997; Zouambia ve ark., 2009).

Pektinin elde edilmesi; bitki materlinden ekstraksiyon işlemi ile başlayıp, ekstraksiyon sonrası çöktüme, filtrasyonu, saflaştırma, kurutma ve öğütme aşamalarını içeren geniş bir üretim sürecini kapsamaktadır (May, 1990; Kratchanova ve ark., 1994; Lopes da Silva ve Rao, 2006; Kai ve ark., 2008; Gentilini ve ark., 2014). Ticari pektin üretimi için yaygın olarak kullanılan kaynaklar; turunçgil kabukları (Putnik ve ark., 2017), elma posası (Kumar ve ark., 2010) ve şeker pancarı küspesidir (Chen ve ark., 2015). Pektin yaygın olarak bulunduğu materyalden sıcak asitli su ekstraksiyonu ile elde edilmektedir. Ekstraksiyon için mineral asitler yaygın olarak kullanılmasına rağmen; çevresel kaygılar, atık sorunu ve ekstrakte edilen pektinin depolimerizasyonu gibi sorunlardan dolayı, farklı yöntemler araştırılmaktadır. Bu yöntemlerden birisi, mineral asit yerine organik asit kullanımınıdır (Yapo, 2009; Güzel ve Akpınar, 2017). Organik asit, ekstraksiyon verimini artırmakta ve elde edilen pektinin fizikokimyasal özelliklerine daha az olumsuz etki yaratmaktadır. Gerek mineral gerekse organik asit kullanımında, kullanılan yüksek sıcaklığa bağlı olarak pektinin yapısı ve özellikleri bozulabilir (Ptichkina ve ark., 2008). Bu nedenle son yıllarda farklı ekstraksiyon teknikleri (mikrodalga, ultrasonik, sub-kritik su ve enzimatik ekstraksiyon gibi) araştırılmakta ve geliştirilmektedir.

Pektin ekstraksiyonunda araştırılan ve bu çalışmada kullanılan yöntemlerden birisi enzimatik olarak pektinin ekstraksiyonudur (Puri ve ark., 2012). Pektin üretimi, materyalin enzim etkisiyle çözünür hale getirilerek ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen pektinin, alkol ile çöktürülmesi, filtrasyonu, saflaştırılması, kurutulması ve öğütülmesi aşamalarından oluşmaktadır. Açığa çıkan polimer geleneksel asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektine göre daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve yapısal ve işlevsel özelliklerini daha iyi korumaktadır. Ayrıca çevre ile dost, daha az atık sorunu olan seçici bir yöntemdir (Adetunji ve ark., 2016).

Nar (*Punica granatum L: punicaceae*) eski çağlardan beri bilinen taze olarak tüketilmesinin yanı sıra gıda sanayinde bir çok alanda (meyve suyu, renklendirici, reçel vb) kullanılabilen ve sahip olduğu biyoaktif bileşenler sayesinde insan sağlığı açısından önem kazanmış bir meyvedir (Seçmen ve ark., 1986). Nar kabukları tüm meyvenin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır (Abid ve ark., 2016) ve büyük bir kısmı atılmaktadır. Daha önceki çalışmalarda; nar kabuğunun yaklaşık %10 oranında pektin içerdiği bildirilmiştir (Moorthy ve ark., 2015; Abid ve ark., 2016; Pereira ve ark., 2016; Abid ve ark., 2017; Khatib ve ark., 2017) ve pektinin de yüksek metoksilli olduğu bulunmuştur (Pereira ve ark., 2016; Güzel, 2017). Dolayısıyla nar kabuğu potansiyel ve alternatif bir pektin kaynağı olarak kullanılabilir.

Bu çalışmanın amacı çevreye dost, yapısal özellikleri korunmuş bir şekilde nar kabuklarından pektin ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen pektinlerin karakterizasyonudur. Pektinin enzimatik yöntemlerle ekstraksiyonu oldukça yeni bir yöntem olduğundan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmada nar kabuklarından enzimatik yöntem ile pektin ekstraksiyonu ve ekstraksiyon koşullarının enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve süre bakımından optimize edilmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda sitrik asit ile nar kabuklarından pektin ekstraksiyon yapılmış ve her iki yöntemle üretilen pektinler karakterize edilerek karşılaştırılmış, elde edilen pektinlerin gıda uygulamalarına uygunluğu araştırılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETİ

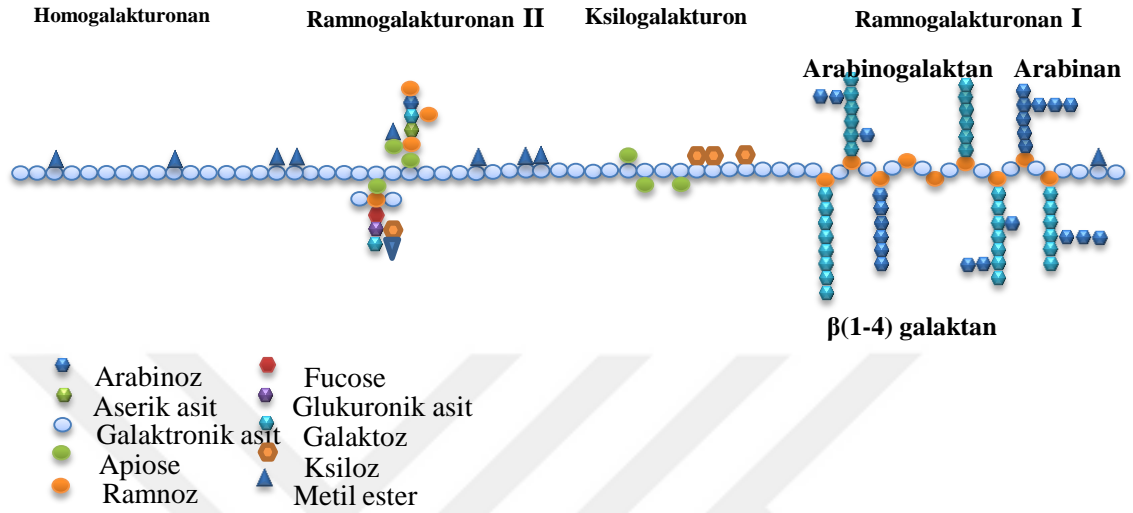
2.1. Pektinin Yapısı

Pektin, α -D-galakturonik asit moleküllerinin α -1,4-glikozidik bağlarının birbirlerine bağlanmasıyla oluşan, karboksil gruplarının bir kısmı metil alkol ile esterleşmiş poligalakturonik asit zinciridir (Thakur ve ark., 1997). Bitki hücre duvarında bulunan doğal bir polisakkarit olup, hemiselüloz ve selüloz ile birlikte pek çok bitkinin orta lamellerinde bulunmaktadır (Stephen ve ark., 2006; Buggenhout ve ark., 2009). En çok bu tabakada bulunurken plazma membranına doğru azalmaktadır. Nem oranı yüksek yerlerde ve büyümesi hızlı olan bitkilerde pektin daha fazladır (Glickman, 1969).

Pektik maddeler; protopektin, pektinik asit, pektin, pektik asit ve bunların tuzlarını içeren bir gruptur. Pektik asit (poligalakturonik asit); esterleşmemiş galakturonik asit birimlerinden oluşan zinciridir. Pektat; poligalakturonik asidin nötral veya asidik haldeki tuzudur. Pektinik asit; orta derecede metil esteri içeriğine sahip pektik maddelere verilen isimdir. Protopektin ise, pektin zincirleri birbirleriyle esterleşmemiş, -COOH grupları üzerinden metal iyonu (Mg, Ca) ile bağlanmıştır. Sınırlı sayıda fosforik asit üzerinden ester köprüsü de içeren doğal pektindir. Olgunlaşmamış meyvelerde ve çoğu bitki dokusunda protopektin halinde iken olgunlaşma ile miktarı azalmaktadır. Suda çözünmez, kısmi hidrolizi ile pektine ve pektinik asit dönüşür. Pektin; değişik oranlarda metil ester grubu bulduran şeker ve asitle uygun koşullarda jel yapabilme özelliğine sahip ve suda çözünebilen bir polisakkarittir. Esterleşme derecesi ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak özellikleri değişiklik göstermektedir.

Pektin molekülü homogalakturonan (HG), ramnogalakturonan I (RGI), ramnogalakturonan II (RGII) ve ksilogalakturon (KGA) olmak üzere dört temel yapıdan oluşmaktadır (Willats ve ark., 2001). Homogalakturonan (HG); D-galakturonik asit birimlerinin α (1-4) glikozidik bağlarıyla bağlanmış düz polimer zincirlerinden oluşur ve karboksil grupları metil gruplarıyla farklı oranlarda esterleşmiştir. Ramnogalakturonan I; ana zincirinin α (1-2) D-galakturonik asit ile α (1-4) L-Ramnoz moleküllerinin tekrarlanmasıyla meydana gelmiş polimerdir. Yan zincirlerini monomerler halinde bağlanmış nötral şekerlerden (arabinoz, fruktoz, galaktoz, glukoz, mannoz, ksiloz) oluşturmaktadır. Bitkinin cinsine, şeker türevlerine, miktarına ve uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir (Axelos ve Thibault, 1991). Galakturonik asit ana zincirine

ramnoz, apioz, frukoz gibi moleküllerin yan zincir olarak bağlanması ile ‘Ramnogalakturonan II’ yapısı oluşmaktadır (Ridley ve ark., 2000). Ana zincire β (1-3)-D-ksilozun yan zincir olarak bağlanması ile de ‘ksilogalakturonan’ yapısı oluşmaktadır (Willats ve ark., 2001). Şekil 2.1’de pektinin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Pektinin yapısı (Vincken ve ark., 2003)

2.2. Pektinin Tarihçesi

İlk olarak reçel yapımında kullanılan pektin 18. yüzyılda keşfedilmiştir. Fransız kimyager Louis Nicolas Vauquelin 1700’li yıllarındaki çalışmalarında, pektinin bazı meyve ve sebzelerin jel yapabilme özelliğini bahsetmiştir (Vauquelin, 1790). Bilimsel olarak ilk yapılan çalışma ise, 1825 yılında Fransız kimyager Henri Braconnot tarafından yapılmıştır. Henri Braconnot pektin yapısını tanımlayarak, Yunanca “pektos” yani “donmak” kelimesinden türemiş “pektik asit” ismini vermiştir. Henri Braconnot pektini “meyve yapısının önemli bir parçasını oluşturan pektin, pektinaz isimli enzim ile pektik aside dönüşür ve bu kimyasal yıkım sırasında meyve, hücre duvarları bozuldukça yumuşar” şeklinde tanımlamıştır (Braconnot, 1825).

İlk başta endüstriyel reçel üreticileri pektin için hammaddeyi, meyve suyu üretimindeki meyvelerin atıklarından temin etmişlerdir. Sanayi devriminin başlamasıyla reçel üreticilerinin kaliteli reçel üretmek için pektine olan ihtiyacın arttığını fark etmiş ve ticari olarak pektin üretimine geçmişlerdir (Anonim, 2001). Ticari pektin, ilk olarak sıvı bir şekilde Almanya’da 1908 yılında üretilip satılmıştır. 1913 yılında patenti alınarak

Amerika'da üretilen pektinin, dünya genelinde yıllık üretimi 2014 yılı itibari ile 80 bin ton ulaşmıştır. Türkiye pektini ithalatla karşılamakta ve gıda sanayinde ihtiyacın da giderek arttığı görülmektedir (Arslan, 1994; Anonim, 2001).

2.3. Pektinin Özellikleri

2.3.1. Pektinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Pektin açık renkte olup suda çözünebilen bir polisakarittir. Ancak yapısı ve viskozitesinden dolayı, en fazla %4'lük pektin çözeltisi hazırlanabilmektedir. Pektin; formamid, dimetil formamid, sıcak gliserol ve dimetil sülfoksit çözeltileri hariç diğer organik çözücülerde çözünmemektedir. Bu özelliğinden dolayı etanol, metanol, propanol veya aseton gibi suyla karışabilen çözücüler, Cu^{+2} ve Al^{+3} çok değerlikli kationlar, setiltrimetik amonyum bromür, suda çözülen polietilen ve kazein gibi proteinler pektini çöktürmektedir (Kirk-Othmer, 1967; Evranuz, 1985).

Pektinin erime noktası olmayıp, ısıtıldığında kömürleşmektedir (Ridley ve ark., 2001). Ortalama molekül ağırlığı 10000-400000 Da arasındadır ve ekstraksiyon yöntemine ve elde edildiği kaynağına göre değişmektedir (DeVries ve ark., 1986; Rolin, 1993; Mukhiddinov ve ark., 2000; Novosel'skaya ve ark., 2000). Pektin molekülündeki galaktronik asit grupları, metil gruplarıyla veya kationlarla beraber veya serbest halde bulunabilir (Mccomb ve Mcready, 1957). Molekül ağırlığı, nötralizasyon derecesiyle doğru orantılıdır (Chen ve ark., 1967; Herp ve ark., 1967; Kirk-Othmer., 1967; Rombouts ve ark., 1986; Tanglertpaibul ve ark., 1987).

Ortamda bulunan şekerler, pektinin viskozitesini etkileyen önemli bir faktördür. Viskozitesi maltoz ve dekstroz ile doğru orantılı şekilde artarken, dekstrin ile ters orantılı olarak azalmaktadır (Chen ve ark., 1967). Pektin yüksek optik çevirme açısına sahiptir. D-galakturonik asidin spesifik rotasyonu $+51.9^\circ$ iken, pektinin spesifik rotasyonu ise yaklaşık olarak $+230^\circ$ olarak ölçülmüştür (Mcready ve ark., 1951; Kirk-Othmer, 1967). Ticari olarak üretilen pektinlerin kaynaklarına göre özellikleri Çizelge 2.1.'de özetlenmiştir (Zitko ve ark., 1965).

Çizelge 2.1. Ticari pektinlerin özellikleri (Zitko ve ark., 1965)

Kaynak	Galakturonik asit %	Esterleşme derecesi %	Spesifik rotasyon	Viskozite (mL/g)
Ayçiçeği	71.7	38.7	+ 227°	340
Elma	87.1	62.5	+ 253°	600
Turunçgil	72.9	67	+ 215°	500
Şekerpancarı	68.5	54.8	+ 215°	174

Pektinin sulu çözeltisi; yapısında serbest halde bulunan karboksil grupları sayesinde asidik bir yapıda olup, % 0.5-1'lik pektin çözeltisinin pH'sı 3.2-3.4 arasındadır. Sıcak asitle reaksiyona sokulduğunda asit konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlı olarak metil ester grupları ile glikozid bağlar hidroliz olup, galaktronik asidi oluşturmaktadır. Yüksek sıcaklıkta asit, pektinin depolimerize olmasını neden olarak molekül ağırlığını düşürürken; düşük sıcaklıkta ise, daha çok metil ester gruplarını hidrolize ederek pektinin deesterifikasyonunu sağlayarak düşük metoksilli pektini oluşturur (Kirk Othmer, 1967; Bozok, 1971). Seyreltik alkali oda sıcaklığında metil ester gruplarının sabunlaşmasını neden olduğundan, poligalakturonik asit zincirlerinde parçalanmaya sebep olmaktadır. Yüksek sıcaklık derecelerinde ise parçalanma hızı artmaktadır (McCreedy, 1966; Kirk-Othmer, 1967).

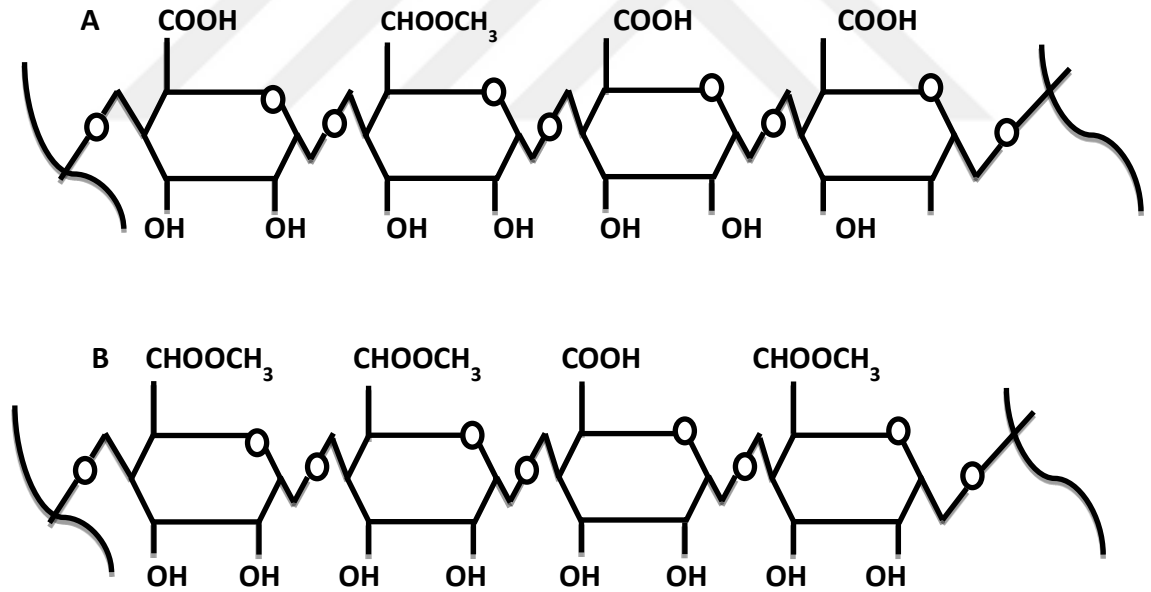
2.3.2. Pektinin jelleşmesi

Pektinin, pH 1.5-3.5 arasında %55 şeker veya Ca^{+2} iyonları içeren ortamda, en belirgin özelliği jelleşmesidir. Jelleşme özelliği, pektini gıda sanayiinde önemli bir polisakkarit haline getirmektedir (Lotzkar ve ark., 1946). Esterifikasyon derecesine bağlı olarak ikiye ayrılan pektin; esterleşme oranı %50'nin altında ise düşük metoksilli (DM), %50'nin üzerinde ise yüksek metoksilli (YM) pektin olarak adlandırılmıştır ve bu yüzdesel farklılıklar pektinin jel oluşturmasını etkilemektedir (McCreedy, 1966; Klavons ve ark., 1986; Rombouts ve ark., 1986; Thibault, 1986; Kujawski ve ark., 1987). Her iki pektinin kimyasal yapısı Şekil 2.2' de gösterilmiştir.

Düşük metoksilli pektin; galaktronik asit zincirindeki karboksil gruplarının Ca^{+2} kationuyla iyonik bağ kurması ve bu şekilde üç boyutlu ağ oluşturmasıyla jelleşmektedir (Şekil 2.2B) (Axelos ve ark., 1991). Poligalakturonik zincirleri negatif

boşluklardan oluşan ikiye bükülmüş simetri şeklinde bir dizin oluşturur ve karboksil gruplarına karşı yüksek seçiciliği olan Ca^{+2} iyonları bu boşluklara yerleşerek “yumurta kutusu” bağlanması olarak tanımlanan jelleşme mekanizmasını oluşturur (Rao ve ark., 2006). Düşük metoksilli pektinde jel oluşturma gücü, metoksil gruplarıyla ters orantılıdır (Thibault ve ark., 1986).

Yüksek metoksilli pektinin jel mekanizmasıyla düşük metoksilli pektinin jel oluşturma mekanizmasından farklıdır (Şekil 2.2A). Düşük metoksilli pektin şekersiz ortamda jelleşebilirken, yüksek metoksilli pektinin jelleşmesi için pH'nın 3.6'dan düşük olması ve %55 oranında ortamda şeker bulunması gerekmektedir (Wang ve ark., 2002). Asitli ortamda karboksil grupları iyonlaşır ve zincirdeki itme kuvvetini azaltarak hidrojen bağlarını oluşturur. Jel oluşum aşamasında, hidrofobik etkileşimler de önemli rol oynamaktadır. Bu etkileşimi sağlamak için de su aktivitesinin düşürülmesi gerekmektedir. Şeker su aktivitesi düşürdüğünden, jelleşmede önemli bir diğer faktördür (Tharanathan, 2003; Rascon-Chu ve ark., 2009).



Şekil 2. 2. Pektin yapıları (A) yüksek metoksilli pektin (B) düşük metoksilli pektin

Yüksek ve düşük metoksilli pektinler, farklı fizikokimyasal özelliklere sahip olduğundan dolayı, farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Yüksek metoksilli pektin (yüksek şeker konanstrasyonu ve pH 2.0-3.5) reçel üretimi için gıda endüstrisinde jelleştirici, emülgatör ve koyulaştırıcı olarak kullanılabilirken; düşük metoksilli pektin

ise (düşük şeker konstanstrasyonu ve pH 2.5-6.5); düşük kalorili jöle yapımında, sakız üretiminde, şekersiz ortamda jelleşmesinden dolayı et ve balık konservelerinde, yoğurt, peynir ve süt ürünlerinde kullanılmaktadır (Thakur ve ark., 1997). Çizelge 2.2’de bazı ticari ve ticari olmayan materyallerden elde edilen pektinlerin esterleşme derecelerini gösterilmektedir.

Çizelge 2.2. Bazı ticari ve ticari olmayan pektin kaynaklarının karşılaştırılması

Kaynak/Kullanıldığı bölüm	Pektin İçeriği (%)	Pektin Sınıfı	Kaynaklar
Narenciye Kabuğu	30-35	YM	Lopes da Silva ve ark., 2006
Elma kabuğu	15-20	YM	Lopes da Silva ve ark., 2006
Şeker pancarı küspesi	15-30	YM	Michel ve ark., 1985; Peng ve ark., 2015
Ayçiçeği tablası	5-25	DM	Miyamoto ve ark., 1992; Wiesenborn ve ark.,1999
Soya Kabuğu	28	YM	Kalapathy ve ark., 2001
Kolza tohumu,	6.85	DM	Jeong ve ark., 2014
Papaya(<i>Carica</i>)	25.41	YM	Maran ve ark., 2015
Nar kabuğu	6.13	YM	Güzel ve Akpınar, 2019
Kavun kabuğu	6.54	YM	Güzel ve Akpınar, 2019
Kivi Meyvesi	8.03	YM	Güzel ve Akpınar, 2019
Portakal Kabuğu	11.46	YM	Güzel ve Akpınar, 2019
Elma kabuğunda	13.30	YM	Güzel ve Akpınar, 2019
Greyfut Kabuğu	20.93	YM	Taşan, 2018
Enginar (<i>Cynara scolymus L.</i>)	22.14	DM	Sabater ve ark., 2018
Ekşi portakal kabuğu	28.27	DM	Hosseini ve ark., 2019
Domates kabuğu	15.1	YM	Grassino ve ark., 2016a
Çarkıfelek meyvesi kabuğu	7.52-12.67	YM	Freitas ve ark., 2016
Pomelo (<i>Citrus grandis(L.) Osbeck</i>)	19.6	DM	Liew ve ark., 2018

2.4. Pektin Üretimi

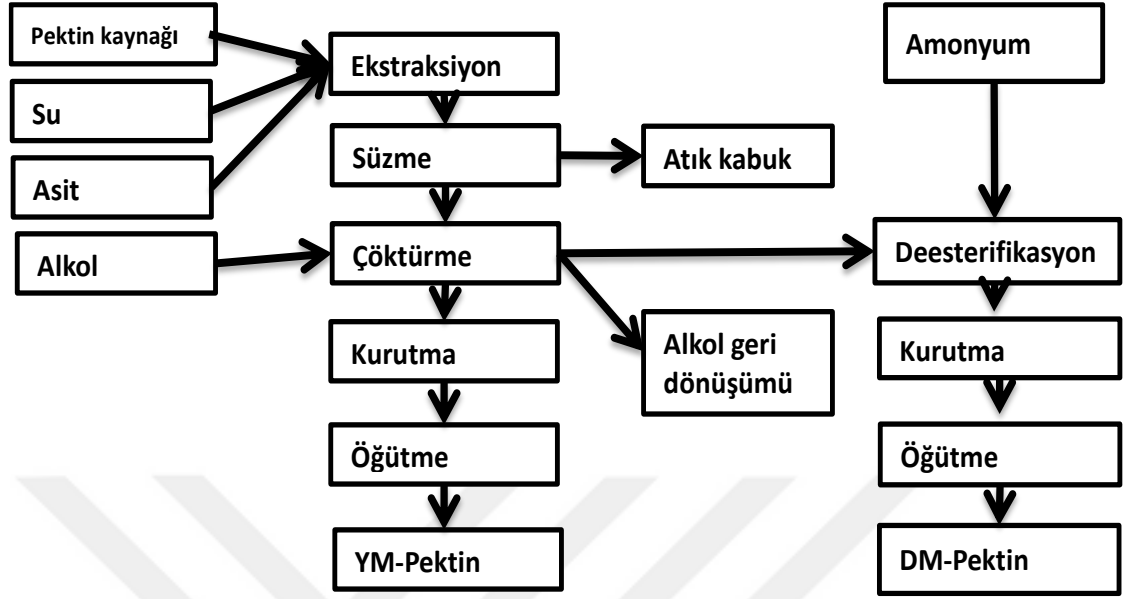
Pektin bitkisel kaynaklı bir polisakkarit olup her meyve ve sebze de farklı nitelikte ve miktarda bulunmaktadır. Molekül ağırlığı ve metilleşme derecesindeki farklılıklardan dolayı farklı hammaddelerden elde edilen pektinlerin jel yapma özellikleri de birbirinden farklıdır. Ayrıca, ekstrakte edilen pektinin özellikleri ekstraksiyon ve ekstraksiyon sonrası işlem şartlarından da etkilenmektedir (Simpson ve ark., 1984). Pektin pek çok bitkide bulunmasına rağmen, üretime degecek miktarda tüm bitkilerde bulunmaz. Ayrıca pektinin elde edildiği bitkiye göre de özellikleri değıştığınden, her alanda her pektinin kullanımı uygun olmayabilir. Endüstriyel olarak elma posası, turunçgil kabukları, ayçiçeğı tablası ve şeker pancarı küspesi en önemli pektin kaynaklarıdır; ancak ticari olarak pektin üretimi için en fazla, fizikokimyasal özelliklerinden dolayı turunçgil kabukları tercih edilmektedir (Simpson ve ark., 1984). Bununla beraber alternatif kaynaklar; kakao kabukları (Chan ve ark., 2013), dut dalı kabuğı (Liu ve ark., 2011), sisal atıkları (Santos ve ark., 2015), karpuz kabuğı (Prakash ve ark., 2014), portakal, elma, nar, kavun, kivi kabukları (Güzel ve Akpınar, 2019), kabak (Ptichkina ve ark., 2008), muz kabukları (Oliveira ve ark., 2016), patates posası (Yang ve ark., 2018), kurt elması (*Solanum lycocarpum*) (Torralbo ve ark., 2012) ve havuç posası (Wikiera ve ark., 2015a; Jafari ve ark., 2017) gibi gıda atıkları da pektin üretimi için araştırılmaktadır. Yapılan literatür taramalarında farklı kaynaklardan elde edilen pektin ve verimleri Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Bazı meyve ve sebzelerin pektin içerikleri

Meyve-Sebze	Pektin (%)	Kaynaklar
Portakal kabuğu	2.95	Georgiev ve ark., 2012
	11.46	Güzel ve Akpınar, 2019
Limon Kabuğu	16.45	Güzel ve Akpınar, 2017
Elma kabuğu	14.5	Wikiera ve ark., 2015a
Muz posası	5.2-12.2	Oliveira ve ark, 2016
Şeker Pancarı	22.4	Mesbahı ve ark., 2005
Armut Posası	0.9-1.4	Çelik, 2007; Baker, 1997
Domates Kabuğu	2.4-4.8	Çelik, 2007; Baker, 1997
Çilek Posası	0.6-0.7	Çelik, 2007; Baker, 1997
Havuç kabuğu	5-15.2	Jafari ve ark., 2017
Nar kabuğu	3.92 -11.18	Pereira ve ark., 2016
Nar kabuğu	6.13	Güzel ve Akpınar, 2019
Kavun kabuğu	6.54	Güzel ve Akpınar, 2019
Kivi Meyvesi	8.03	Güzel ve Akpınar, 2019
Mandalina kabuğu	15.53	Güzel ve Akpınar, 2017
Greyfurt Kabuğu	23.10-27.51; 20.93-38.88	Wang ve ark., 2015; Taşan, 2018
Enginar (<i>Cynara scolymus L.</i>)	22.14	Sabater ve ark., 2018
Pomelo(<i>Citrus grandis(L.) Osbeck</i>)	19.6	Liew ve ark., 2018
Ekşi portakal kabuğu	28.27	Hosseini ve ark., 2019
Kurt elması (<i>Solanum lycocarpum</i>)	33.6	Torralbo ve ark., 2012

Pektin üretimi; materyalin sıcaklık ve asit etkisiyle çözünür hale getirilerek ekstraksiyonu ve ekstrakte edilen pektinin alkol ile çöktürülmesi, filtrasyonu, saflaştırılması, kurutulması ve öğütülmesi aşamalarından oluşur (Yıldırım, 2013). Pektin verimi ve kalitesini etkileyen en önemli faktör, ekstraksiyon aşaması olup, özellikle pH, süre, sıcaklık, solvent/çözücü oranı, çözücünün türü, hammadde, partikül büyüklüğü önemli derecede etkilemektedir (Grassino ve ark., 2016a; Perussello ve ark.,

2017). Yüksek metoksilli ve düşük metoksilli pektinin üretim aşamaları Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 3. Pektinin endüstriyel üretim süreci (Dixon, 2008)

Asit ekstraksiyon yöntemiyle ekstraksiyon işlemi sırasında alet ve ekipmanlar da korozyona sebep olmakta ve ekstraksiyon sonrası asitli solventin direk olarak çevreye atılması çevre açısından da olumsuz etki yaratmaktadır. Son zamanlarda tüketicilerin kimyasal katkılara olan olumsuz bakış açıları nedeniyle, doğal ürünlere yönelik bir eğilim oluşmuştur. Bu nedenle pektin ekstraksiyonunda uygulanan mineral asitlerin kullanımının azaltılması veya tamamen üretimden uzaklaştırılması daha düşük sıcaklıkta daha az solvent ihtiyacı olan ve daha kısa sürede ve yüksek verimde pektin izolasyonuna yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Min ve ark., 2011). Ultrason destekli (ultrasonik) ekstraksiyon, sub-kritik su ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, enzimatik ekstraksiyon bunlardan bazılarıdır (Atalay ve ark., 2018).

2.4.1. Geleneksel asit ekstraksiyonu ile pektin üretimi

Asit ekstraksiyon yönteminde 80 ile 100°C arasında ekstraksiyon sıcaklığında, 0.05-2M konsantrasyonlarında farklı asitler (sülfürik, nitrik, sitrik, fosforik, asetik veya hidroklorik asit) (Georgiev ve ark., 2012) kullanılarak pektin ekstrakte edilmektedir. Yöntemin verimini ve pektinin kalitesini sıcaklık, katı/çözücü oranı, pH değeri, çözücü özellikleri, pektin kaynağı, parçacık büyüklüğü ve difüzyon hızı gibi birçok parametre etkilemektedir. Asitle ekstraksiyon ekonomik olsa da, ekstraksiyon için asitler

kullanıldığından pektinin yapısını bozabilmekte ve çevresel problemlere neden olabilmektedir. Ayrıca pektin ekstraksiyonu sırasında süre ve uygulanan sıcaklığa da bağımlı olarak pektinin veriminde ve kalitesinde azalma meydana gelmektedir (Adetunji ve ark., 2017). Mineral asit ile ekstraksiyonda organik asitle ekstraksiyona kıyasla pektin depolimerizasyonu daha fazladır. Bu nedenlerden dolayı daha çevreci ve doğal olan, organik asitler mineral asitlere alternatif olarak önerilmektedir (Marić ve ark., 2018). Çizelge 2.4’de asit ekstraksiyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalar özetlenmiştir. Kullanılan pektin kaynağı, çözücüler ve ekstraksiyon koşulları pektin verimini etkilemekte olup, özellikle mineral asitlerle üretilen pektinlerin verimleri organik asitle üretilenlere göre daha az olduğu çizelgeden de görülmektedir. Ekstraksiyon işlemi sırasında sıcaklığın artışı ise pektin veriminde olumlu etki yaratmaktadır.

Çizelge 2.4. Asit ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve ve sebze kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi

Hammadde	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Çözücü	Verim(%)	Kaynak
Portakal kabuğu	82	50	pH 1.7, HCl	2.95	Georgiev ve ark., 2012
Limon kabuğu	82	50	pH 1.7, HCl	3.15	Georgiev ve ark., 2012
Muz kabuğu	70-90	50	pH 2.0-4.5 sitrik asit,	5.2-12.2	Oliveira ve ark., 2016
Nar kabuğu	70-90	50	pH 2.0-4.0 sitrik asit,	3.92 -11.18	Pereira ve ark., 2016
Havuç posası	50-90	120-240	pH 0.5-2.5 sitrik asit,	5-15.2	Jafari ve ark., 2017
Greyfüt kabuğu	80	180	pH 1 H ₂ SO ₄ asit	38.88	Taşan, 2018
Elma posası	85	40-150	pH 2.0, H ₂ SO ₄ asit	14.5	Wikiera ve ark., 2015a
Kavun kabuğu	35-95	30-150	pH 1.0 -3.0 sitrik asit,	2.87-28.98	Raji ve ark., 2017
			pH 2.04, HCl	9.72	
			pH 2.04, H ₂ SO ₄ asit	8.38	
Patates posası	90	180	pH 2.04 nitrik asit,	9.83	Yang ve ark., 2018
			pH 2.04 sitrik asit,	14.34	
			pH 2.04 asetik asit	4.08	
Kurt elması (<i>Solanum lycocarpum</i>)	80	30	pH 1 nitrik asit	33.6	Torralbo ve ark., 2012
İncir sarmaşığı (<i>Ficus pumila</i>) çekirdeklerinden	25	30	H ₂ O	5.25	Liang ve ark., 2012
	25	30	pH 4.5 (NH ₄) C ₂ O ₄	5.46	
	85	30	pH 1.5 HCl	6.07	
Nar kabuğu				6.13	Güzel ve Akpınar, 2019
Kavun kabuğu				6.54	
Portakal Kabuğu	80	60	pH 1 sitrik asit	8.3	
Kivi meyvesi				11.46	
Elma kabuğu				13.30	
Şeker pancarı posası	90	4	pH 1 HCl asit	22.4	Mesbahı ve ark., 2005

2.4.2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ile pektin üretimi

İnsan kulağının duyabilir frekans 1-1.6 kHz arasında olup, 20 kHz frekansları ile oluşturulan ses dalgalarına ultrason denmektedir. Bu dalgalar elektromanyetik dalgalardan farklıdır ve yayılmaları için bir dizi genişleme (molekülleri birbirinden ayıran) ve sıkıştırma döngülerini (onları bir araya getiren) içeren bir ortam (katı, sıvı veya gaz) gereklidir. Sıvı ortamda git gide büyüyen ve belirli bir büyüklükte patlayan kavitasyon olarak nitelendirilen hava kabarcıkları oluşmakta ve bu süreç ultrasonik (ultrases) destekli ekstraksiyonun temelini oluşturmaktadır (Luque-Garcia ve ark., 2003). Kavitasyon işlemi yaklaşık 400 µs (mikrosaniye) boyunca yüksek sıcaklık ve basınçlar görülür (5000°C ve 1000 atm) (Luque-Garcia ve ark., 2003; Azmir ve ark., 2013). Ultrasonik dalgalar tarafından indüklenen kavitasyon kabarcıkları hücre bozunmasını sağlar ve hücrelere çözücü girişi yaparak ekstraksiyonu gerçekleştirir (Barba ve ark., 2015; Tiwari, 2015; Misra ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2017).

Ultrases destekli ekstraksiyon iki şekilde kullanılabilir. Birinci yöntem ultrasonik banyo, ikincisi ise ultrasonik prob yöntemidir. Birinci yöntem daha yaygın olarak kullanılmasına rağmen, iki ana dezavantajı bulunmaktadır. Bu dezavantajlar; dağınık enerji dağılımı ve zamanla gücün azalarak kullanılan enerjinin boşa gitmesidir. Bu da ekstraksiyonun tekrarlanabilirliğini sınırlamaktadır. Ultrasonik banyo yöntemine kıyasla ultrasonik prob yönteminde, enerji daha verimli ve kontrollü kullanılmaktadır (Vinatoru, 2001; Luque ve ark., 2003). Bununla beraber prob uçlarının pahalı ve ömürlerinin kısa olması en önemli dezavantajlarıdır (Büyüktuncel, 2013).

Ultrasonik destekli ekstraksiyonunun etkin ve verimli bir şekilde uygulanmasında, ekstrakte edilecek bitkinin özellikleri, nem içeriği, partikül büyüklüğü, kullanılan çözücü ve ultrasonik sistemine uygunluğu, kullanılacak sıcaklık, basınç, frekans, sonikasyon süresi ve solvent-biyokütle oranı ekstraksiyonu önemli derecede etkilemektedir. Çözücü/biyo kütle oranı katı partikül içeriğinin artmasıyla ultrasonik yoğunluğu azalttığı için, bu sıralanan parametreler arasında en önemli faktördür (Wang ve ark., 2006).

Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminin avantajları; ekstraksiyon süresinin ve enerji tüketiminin azaltılması, nispeten daha düşük oranda çözücü kullanımı ve

ekstraksiyonunda daha etkili bir karıştırma ile daha hızlı enerji ve kütle transferidir. Ayrıca azaltılmış termal ve konsantrasyon gradyanları, küçük ekipman boyutu, proses kontrolüne daha hızlı yanıt, daha hızlı başlatma, üretim ve süreç adımlarının azalması da diğer avantajlarıdır (Chemat ve ark., 2008). Dezavantajları ise; pahalı bir sistem olması, verimi kullanılan materyale göre değişiklik göstermesi ve her zaman verimde istenilen sonuca ulaşamamasıdır. Bu nedenler endüstriyel olarak kullanımını sınırlamaktadır (Adetunji ve ark., 2016). Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile pektin ekstraksiyonu konusunda yapılan bazı çalışmalar Çizelge 2.5'te sunulmuştur. Çizelgeden görüldüğü üzere kullanılan hammaddeye bağlı olarak yüksek verimde pektin elde edilebilmekte ve ekstraksiyon geleneksel yöntemlere göre daha düşük sıcaklıkta gerçekleşmektedir (50°C'de pektin verimleri %28.07-29.32 arasında) (Maran ve Priya, 2015; Hosseini ve ark., 2019).

Çizelge 2.5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi

Hammadde	Frekans (kHz,W)	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Solvent	Verim (%)	Kaynak
Nar kabuğu	20	50-70	15-35	pH 1.0-2.0, distile su	4.23-24.18	Moorthy ve ark., 2015
Üzüm posası	37	35-75	20-60	pH 1.0-2.0, sitrik asit	3.19-29.38	Minjares ve ark., 2014
Domates kabuğu	37	60-80	15-90	Amonyum okzalit 16g/L okzalik asit 4g/L	15.1 35.7	Grassino ve ark., 2016a
Greyfurt kabuğu	20	60-80	20-40	pH 1.5, hidroklorik asit	23.10-27.51	Wang ve ark., 2015
	20	30-80	10-60		10-18.11	Xu ve ark., 2014
Çarkıfelek meyvesi kabuğu	20	45-85	2-20	pH 2.0, nitrik asit	7.53-12.67	Freitas ve ark., 2016
Muz(<i>Musa balbisiana</i>) kabuğu	323	60	27	pH 3.2 sitrik asit	8.99	Prakash Maran ve ark., 2017
Ekşi portakal kabuğu	150	50	10	pH 1.5	28.07	Hosseini ve ark., 2019
Sisal (<i>Agave sisalana</i>) bitkisi	61	50	26	asitli su	29.32	Maran ve Priya, 2015

2.4.3. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ile pektin üretimi

Mikrodalga özellikle gıda sanayinde ekstraksiyon, enzim inhibisyonu ve inaktivasyonu, mikroorganizmanın inaktivasyonu ve kurutma işleminde kullanılmaktadır (Bouras ve ark., 2015; Deng ve ark., 2015; Sahin ve ark., 2017). Mikrodalga iki salınımlı (elektrik ve manyetik) dik alandan oluşan elektromanyetik bir dalga olup; temel bilimdeki tanımı 300 MHz-300 GHz frekans aralığında bulunan iyonize edici olmayan elektromanyetik dalgalardır. Mikrodalga gıda içerisinde, hücresel polar bileşiklerle temas ettikten sonra iyonik iletme ve dipollerin dönmesine neden olarak ısı üretmektedir (Wang ve ark., 2016). Mikrodalga enerjisi ısının bir diğer formu şeklinde de değerlendirilmektedir (Naqash ve ark., 2017; Sahin ve ark., 2017; Marić ve ark., 2018).

Mikrodalga destekli ekstraksiyonda, mikrodalgaın yarattığı ısı ile hammaddenin hücre duvarlarını genleşme mekanizmasıyla tahrip edilmekte ve istenen pek çok değerli biyoaktif bileşik elde edilebilmektedir. Ekstraksiyonun en önemli avantajları, daha az çözücü gerektirmesi, ekstraksiyon süresinin kısılması, verimin artması ve düşük enerji tüketimidir (Chemat ve ark., 2017).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon; bitki materyali, solvent çeşidi ve hacmi, pH, mikrodalga gücü, sıcaklık, zaman gibi pek çok parametreden etkilenmektedir. Bu yöntemle pektin ekstraksiyonu konusunda yapılan çalışmalar Çizelge 2.6'da özetlenmiştir. Çizelge incelendiğinde ekstraksiyon süresinin diğer yöntemlere kıyasla, çok kısaldığı görülmekte ve mikrodalga gücünün artışı pektin verimini artırmaktadır (Košťálová ve ark., 2016).

Çizelge 2.6. Mikrodalga destekli ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi

Hammadde	Mikrodalga gücü (W)	Süre (dakika)	Çözücü	Verim (%)	Kaynak
Pomelo kabuğu	390-650	3-7	pH 1.0 -3.0, HCl	4.23 -24.18	Chen ve ark., 2016
Ekşi portakal kabuğu	300-700	1-3	pH 1.5-3.0, sitrik asit	3.19 -29.38	Hosseini ve ark., 2016a, b
Balkabağı kabuğu	1200	2-10	pH 2.5, HCl	15.1 -35.7	Košťálová ve ark., 2016
Portakal kabuğu	160-480	1-3	pH 1.0-2.0 sülfürik asit	23.10 -27.51	Prakash ve ark., 2013
Karpuz kabuğu	160-480	1-3	pH 1.0-2.0, HCl	10-18.11	Maran ve ark., 2014
Muz kabuğu	300-900	1.5-5	pH 1.0-3.0 HCl	7.53-12.67	Swamy ve ark., 2017
Antep fıstığı (<i>Pistacia vera L.</i>)	700	2.75	pH 1.5 asitli su	18.13	Kazemi ve ark., 2019
Greyfüt Kabuğu	360	1.5	pH 1	20.93	Taşhan, 2018

2.4.4. Sub-kritik su ekstraksiyonu ile pektin üretimi

Sub-kritik su, faz değişmeden normal kaynama noktasından daha yüksek sıcaklıklara ulaşabilen yüksek basınçlı sudur. Ekstraksiyonda su çözücü olarak kullanılmakta olup, basınçlı sıcak su ekstraksiyonu veya aşırı ısıtılmış su ekstraksiyonu olarak isimlendirilmektedir (Zakaria ve ark., 2015). Yüksek sıcaklık; suyun vizkozitesi ve yüzey gerilimini azaltırken, difüzyon hızı ve buhar basıncını artırmaktadır. Suyun dielektrik sabiti; 25°C’de 79 civarında olup, 160°C’de ulaştığında bu değer 43’e, 200°C sıcaklığında ise 33’e düşmekte ve bu şekilde iyonik ve iyonik olmayan bileşiklerin ekstrakte edilmesi mümkün olmaktadır (Ueno ve ark., 2008; Brunner, 2009; Chen ve ark., 2015). Çözücünün düşük dielektrik sabiti ve yüksek sıcaklık, bitki dokusunda pektinin çözünürlüğünü artırarak ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmektedir (Adetunji ve ark., 2017; Naqash ve ark., 2017). Yüksek sıcaklıkta, Wander waals, hidrojen ve

dipol bağlar parçalanarak ekstraksiyon verimi artmaktadır. Daha hızlı ekstraksiyon işlemi ile daha yüksek kalitede pektin elde edilebilmektedir (Ueno ve ark., 2008; Zakaria ve ark., 2015). Sub-kritik su ekstraksiyon yöntemi özellikle solvent kullanımını ortadan kaldırdığı için güvenli (Generally Recognized As Safe, GRAS) olarak kabul edilmektedir; ancak yöntemin uygulama maliyeti oldukça yüksek olup, verimin matrikse bağımlı olması, proses koşullarında herhangi bir hatanın pektin zincirinin hidroliziyle sonuçlanabilmesi, yöntemin en önemli dezavantajlarıdır (Khajavi ve ark., 2005; Zakaria ve ark., 2016; Adetunji ve ark., 2017). Çizelge 2.7’de sub-kritik su ekstraksiyonu ile şimdiye kadar yapılan çalışmalar özetlenmiştir. Yapılan çalışmalarda, hammaddeye bağımlı olarak en yüksek pektin verimi %24.64 ile 120.72 °C’de şeker pancarı küspesiyle yapılan ekstraksiyonudur (Chen ve ark., 2015a).

Çizelge 2.7. Sub-kritik su ekstraksiyon koşullarının çeşitli meyve kabuklarından elde edilen pektin verimine etkisi

Hammadde	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Verim (%)	Kaynak
Pomelo (<i>Citrus grandis(L.) Osbeck</i>)	120	0.33	19.6	Liew ve ark., 2018
Turunçgil kabuğu	120	24	21.95	Wang ve ark., 2014
Elma posası	150	24	16.68	Wang ve ark., 2014
Kakao kabuğu	121	0.30	10.09	Muñoz-Almagro ve ark., 2019
Şeker pancarı küspesi	120.72	0.40	24.64	Chen ve ark., 2015a

2.4.5. Enzimatik ekstraksiyon ile pektin üretimi

Bitki hücre duvarı nişasta, selüloz, hemiselüloz (ksiloglukanlar) ve pektin gibi birbirine bağlanan çoklu polisakkaritlerden oluşmaktadır (Acosta-Estrada ve ark., 2014). Bitki hücre duvarını hidrolize ederek hücre geçirgenliğini artıran enzimler, ekstraksiyon işlemlerinde son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Selülazlar, hemiselülazlar, proteazlar ve minimal pektinolitik aktiviteye sahip hidrolitik enzimler, pektin ekstraksiyon için kullanılan başlıca enzimlerdir (Ptichkina ve ark., 2008; Puri ve ark., 2012). Enzimler ekstraksiyon sırasında çözücü/kimyasal madde miktarını azaltıp verimi artırmakta ve yüksek bir seçicilik ile pektini ekstrakte etmektedir (Puri ve ark., 2012). Daha verimli, sürdürülebilir ve çevre dostu bir ekstraksiyon olması nedeniyle son

yıllarda dikkat çekmektedir (Puri ve ark., 2012). Pektinin enzimatik ekstraksiyonunda iki temel yaklaşım kullanılmakta olup bunlar;

1. Pektini parçalayan enzimlerin kullanılması,
2. Bitki hücre duvarını hidroliz ederek pektini elde edilmesini sağlayan enzimlerin (Selülaz, amilaz, ve hemiselülaz gibi enzimler) kullanılmasıdır (Panouille ve ark., 2006).

Pektin ekstraksiyonunda ikinci yaklaşım daha yaygındır. Bu yaklaşım bitki hücre duvarındaki pektin olmayan polisakkaritleri hidrolizleyerek bitki hücre duvarındaki pektin molekülünün açığa çıkmasını sağlamaktadır. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzimlerden biriside selülaz enzimidir. Selülaz, bitki hücre duvarının en önemli polisakkaritlerden biri olan selülozu hidroliz ederek pektinin ekstrakte edilmesini sağlamaktadır Birinci yaklaşım ise; genellikle yüksek metoksilli pektin kaynağından düşük metoksilli pektin üretiminde kullanılmaktadır (Ptichkina ve ark., 2008; Puri ve ark., 2012).

Enzimatik ekstraksiyonun temel prensibi; enzimlerin optimum koşullar altında bitki hücre duvarını hidrolize etmesi ve hücre duvarındaki ve içindeki bileşenleri salınımını sağlamasıdır (Sheldon ve Van Pelt, 2013). Enzimatik ekstraksiyon yöntemi asitli solvent gereksinimini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda ekstraksiyon süresini de kısaltabilir. İşlem daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiği için pektinin yanında aromalar, pigmentler, yağ vb. gibi sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstraksiyonu için de avantaja sahiptir (Dehghan-Shoar ve ark., 2011).

Enzimatik ekstraksiyonda pektin verimi; reaksiyon süresine, enzim tipine ve konsantrasyonuna, sıcaklığa, pH değerine ve bitki materyalinin partikül boyutuna bağlıdır (Roselló-Soto ve ark., 2016; Poojary ve ark., 2017). Şimdiye kadar enzimatik pektin ekstraksiyonu ile yapılan çalışmaların bazıları Çizelge 2.8'de özetlenmiştir. Çalışmalar incelendiğinde, sürenin artışı ekstraksiyon verimini artırmaktadır (Yuliarti ve ark., 2015). Ayrıca farklı enzim kombinasyonlarının kullanımı da pektin verimini olumlu etkileyebilmektedir.

Enzimatik pektin ekstraksiyonunda daha önce belirtildiği gibi asidik pH seviyelerine ve yüksek sıcaklığa ihtiyacı yoktur. Enerji tüketimi daha az, pektin özellikleri ekstraksiyon

koşullarından daha az etkilenmekte ve elde edilen pektinin molekül ağırlığı daha yüksektir. Geleneksel yöntemle göre daha az çözücü kullanımı, pektinin çökeltmesi için gerekli olan daha az alkol kullanımı anlamına gelir. Bu da uzun vadede endüstri için önemli maliyet tasarrufunu sağlar (Puri ve ark., 2012; Roselló-Soto ve ark., 2016; Saha ve ark., 2017). Enzimatik ekstraksiyonun bu avantajları mevcut olmakla birlikte, bu tekniğin laboratuvar ölçeğinin ötesinde, endüstriyel kullanıma çevrilmesi hali hazırda bazı faktörlerden dolayı sınırlı olup ve hala araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Enzimlerin maliyetleride, endüstriyel kullanımını kısıtlayan bir başka durumdur (Norton ve ark., 2006; Puri ve ark., 2012).

Çizelge 2.8. Çeşitli meyve artıklarından enzimatik ekstraksiyon koşullarının elde edilen pektin ve verimine etkisi

Hammadde	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Enzim	Verim (%)	Kaynak
	50	18	Celluclast 1.5L (Cellulase)	14.5	
Elma posası	40	3	Celluclast 1.5L (Cellulase)	4.01-6.53	Wikie ra ve ark., 2015 a, b
	40	3	Viscoferm L. (Arabanaz, selüloz, β-glukanaz, hemiselüloz ve ksilanazı)	4.67-7.00	
	25	0.5	Celluclast 1.5L (Cellulase)	4.48	
Kivi posası	50	4	LaminexC2K (Cellulase (endoglukanaz), hemicellulase xylanase, arabinoxylanse)	82.2	Yuliarti ve ark., 2015
	50	4	ValidaseTRL (Cellulase, hemicellulase, xylanase, mannanase, b-glucanase)	79.1	
Misket limonu kabuğu	50	4	Multifect B (Cellulase, hemicellulase, b-glucanase)	79.3	Dominiak ve ark., 2014a
	50	4	GC880(Cellulase (endoglukanaz))	78.1	
Balkabağı (<i>Cucurbita Moschata</i>)	30	20	Cellulase (endoglukanaz)	4.70	Fissore ve ark, 2009
	30	20	Hemicellulase (xylanase, arabinoxylanse)	6.12	
Hindiba ve Karnabahar	50	4	Celluclast 1.5L (Cellulase)	36.4	Panouille ve ark., 2006
Enginar (<i>Cynara scolymus L.</i>)	50	36-48	Celluclast 1.5L (Cellulase)	22.14	Sabater ve ark., 2018
Kolza tohumu (<i>Brassica napus L.</i>)	50	5	Celluclast 1.5L (Cellulase)	6.85	Jeong ve ark., 2014
	50	5	Alcalase 2.5 L (protease)		

Enzimatik pektin ekstraksiyonu hammaddenin uygun enzim ile muamelesi, uygun sıcaklık ve pH da inkübasyona bırakılması ve süre sonunda substrat enzim etkileşimi sonucunda pektin elde edilmesinden oluşmaktadır. Enzimatik ekstraksiyon sırasında genellikle hücre duvarında bulunan polimerleri hidrolize eden enzimler kullanılır. Pektin ekstraksiyonunda en yaygın kullanılan enzimler selülaz, proteaz, hemiselülaz, alkalaz, ksilanaz, poligalakturonaz, α -amilaz, β -glukosidaz, endopoligalakturonaz ve pektinazdır (Jeong ve ark., 2014; Yuliarti ve ark., 2015; Wikiera ve ark., 2015b).

- **Proteaz;** protein ve peptitlerin hidrolizini katalizleyen enzimdir (Wiseman, 1993).
- **Alkalaz;** proteinlerin hidrolizinde görev alan enzimdir (Chen ve ark., 1991; Sutar ve ark., 1991; Chen ve ark., 1995).
- **Selülaz;** selülozu hidroliz eden enzim grubudur (Bahtiyar ve Duran, 2005).
- **Hemiselülaz;** hemiselülozu hidrolize eden enzim grubudur (Güner ve Dağlıoğlu, 2008).
- **Ksilanaz;** ksilanı hidroliz eden enzimlerin tamamına ksilanolitik enzim sistemi adı verilir. Bu grupta β -1,4 endoksilanaz, β -ksilosidaz, α -L-araninofuranozidaz, α -glukuroninaz, asetilksilan esteraz ve fenolikasit esteraz yer almaktadır (Subramaniyan ve Prema, 2000).
- **β -glukozidaz;** iki glikoz arasındaki veya glikoz ve bir aril ya da alkil olan glikon rezidüleri arasındaki β -glikozitik bağı hidroliz eden enzimdir (Henrissat ve Bairoch, 1996).
- **α -amilaz;** nişastanın α -1,4 bağlarını rastgele hidrolize edebilen ve α -1,6 dallanma noktalarını atlayan enzimdir (Sun ve ark., 2015).
- **Poligalakturonaz;** pektik asitteki α -1,4 glikozidik bağı hidrolitik olarak parçalayan enzimdir (Jacob ve Prema, 2006).
- **Endopoligalakturonaz;** pektik maddeleri oligogalakturanat birimlerine çeviren enzimdir (Hirose ve ark., 1999)
- **Pektinaz;** poligalakturonaz, pektin liyaz ve pektin esteraz enzimlerinden oluşan karışımdır (Heerd ve ark., 2012)

Bitki hücre duvarı, çeşitli polisakaritler (selüloz, ksiloglukan, pektin) ve proteinlerden oluşur (Carpita ve ark., 2000). Ksiloglukan selüloza hidrojen bağı ile bağlıdır. Selüloz/ksiloglukan ağı, bir protein ağı ile birlikte pektik matriksi içinde yer almaktadır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar selüloz ile pektinin yan zincirleri arasında da etkileşim olduğunu göstermektedir (Puri ve ark., 2012; Wijesinghe ve Jeon, 2012; Hamed ve ark., 2013; Sojitra ve ark., 2016). Selülaz, bitki hücre duvarlarının en önemli polisakaritlerden biri olan selülozu hidroliz ederek pektini açığa çıkarmaktadır (Panouillé ve ark., 2006). Selülaz, hemiselülaz ve proteazların birlikte kullanımı, selüloz/ksiloglukan ve protein ağlarının parçalanmasını ve pektik polisakaritlerin izolasyonunu kolaylaştırmaktadır (Oeschlin ve ark., 2003; Zykwincka ve ark., 2005). Pektinolitik enzimler kısıtlı depolimerizasyon yoluyla bitki dokularındaki çözünmeyen ("protopektin" olarak adlandırılan) pektinleri çözündürmektedir. Özellikle bazı "protopektinazlar" pektini ekstrakte etmek için asitten bile daha etkili olabilmektedir. Bitkilerde bulunan nişasta granülleri pektik polisakaritlerin ekstraksiyonunu engelleyebildiğinden, ekstraksiyonda α -amilaz kullanımı pektin elde edilmesine yardımcı olmaktadır (Nakamura ve ark., 1995).

2.5. Selülazlar

Selülazlar, selülozu glikoz monomerlerine parçalayan bir enzim grubudur (Yi ve ark., 1999). Selülozu glikoza hidrolize etmek için en az üç enzim gereklidir. Bunlar: endo-selülazlar (EC 3.2.1.4), ekzo-selülazlar (EC 3.2.1.91) ve β -glukozidazlardır (EC 3.2.1.21). Endo-selülazlar selüloz zincirlerinde iç bağları rastgele hidroliz ederek oligosakkaritler üretirler. Ekzo-selülazlar (selobiyohidrolazlar), selülozun indirgenmeyen ucundan, zinciri sellobiyoz ünitelerine ayırır (Be'guin, 1990; Tomme ve ark., 1995). β -glukozidazlar (sellobiyaz) sellobiyozu glikoza hidrolize etmektedir (Eveleigh, 1987).

Ticari anlamda selülaz enzimleri genellikle optimum pH değerlerine göre sınıflandırılmaktadır. Asidik selülazlar pH 4-6 ve 44-55°C'de optimum hidroliz aktivitesine sahip enzimlerdir. Nötral selülazlar pH 6-8 ve s 50-60°C de optimum hidroliz aktivitesine sahip enzimlerdir. Alkali selülazlar, alkali ortamda genellikle pH 8'in üzerinde optimum selüloz hidroliz aktivitesine sahip enzimlerdir. Selülaz enzimi birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. *Anoxybacillus flavithermus* (İbrahim ve Ahmed, 2007), *Bacillus subtilis* (Deka ve ark., 2011), *Bacillus thuringiensis* (Lin ve ark., 2012), *Bacillus cereus* (Lah ve ark., 2012), *Bacillus licheniformis* (Acharya ve Chaudhary, 2012), *Cellulomonas cellulans* (Mishra ve Pandey, 2007), *Clostridium thermocellum* (Zhuang ve ark., 2007), *Cytophaga hutchinsonii* (Mishra ve Pandey,

2007) selülaaz üreten bakteriler arasındadır. Selülaaz üreten küfler ve mantarlar arasında; *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Rhizopus stolonifer* (Pothiraj, 2006) *Trichoderma*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Neurospora* vb. (Pandey ve ark., 1999) yer almaktadır. Ticari olarak selülaazlar en çok *Trichoderma* sp. *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Bacillus* suşları tarafından üretilmektedir (Tomme ve ark., 1995; Ito, 1997 ; Teeri ve ark., 1998).

Selülaaz enzimi yaygın olarak gıda, kimya, deterjan, kozmetik, kâğıt ve ilaç endüstrilerinde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde meyve sularının berraklaştırılmasında ve glikoz şurubu üretiminde kullanılmaktadır (Saravanan ve ark., 2008). Diğer endüstri alanlarında kumaşlarda parlaklık ve yumuşaklığın elde edilmesi için, deterjan üretiminde, kotların taşlanmasında, endüstriyel atıkların ön işleminde ve yemlerin kalitelerinin artırılmasında kullanılmaktadır (Körlü ve ark., 2008). Çok farklı endüstriyel kullanımları nedeniyle selülaazlar, araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) faaliyetlerinde önemli bir konu olmuştur. En önemli kullanım alanı biyokütlenin biyoyakıtlara fermantasyonu esnasında gerekli şekerlerin üretimidir (Sun ve ark., 2015; Coseri, 2017). Son yıllarda pektin ekstraksiyonunda da kullanılmaya başlanmıştır.

Pektinlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan, enzim selülaazlardır (Dominiak ve ark., 2014; Wikiera ve ark., 2015c). Bitki hücre duvarlarının temel polisakariti olan selülozu hidroliz ederek pektinin ekstraksiyonunu sağlamaktadır. Daha önceki çalışmalarda elma posasından enzimatik ekstraksiyonla pektin elde etmek için Celluclast® 1.5L enzimi kullanılmış ve ekstrakte edilen pektinin asitlerle ekstrakte edilen pektine kıyasla daha fazla galaktronik asit içerdiği, daha yüksek metilasyon derecesine sahip olduğu bulunmuştur (Wikiera ve ark., 2015b). Enginardan (*Cynara scolymus* L) Celluclast® 1.5L (Celluclast) enzimi kullanılarak üretilen pektinin, yüksek verime (21.4 mg g⁻¹) ve galaktronik asit içeriğine (720.0 mg g⁻¹) sahip olduğu tespit edilmiştir (Sabater ve ark., 2018). Sarı çarkıfelek meyvesinden Celluclast® 1.5L enzimi ile elde edilen pektin veriminin %9.17 ve esterleşme oranının %86.9 olduğu saptanmıştır (Liew ve ark., 2015). Altın kivi meyve posasıyla yapılan bir başka çalışmada Celluclast® 1.5L enzimi ile %4.48 veriminde pektin elde edilmiştir (Yuliarti ve ark., 2015). Kanola (*Brassica napus* L.) meyvesiyle yapılan diğer bir çalışmada Celluclast® 1.5L enzimi kullanılmıştır. Pektin verimi %5.41 ve esterleşme oranı %45.77 olan düşük metoksilli pektin elde edilmiştir (Jeong ve ark., 2014). Sistol atıklarından Celluclast® 1.5L enzimi ile elde edilen pektin verimi %14.6 olarak

bulunmuştur (Yang ve ark., 2018a). Pektin verimini artırmak için selülozlar ve diğer enzimlerle beraber kullanılabilir. Birden fazla enzimin birlikte çalışması, hücre duvarlarının daha fazla parçalanmasına neden olmakta ve verimi artırabilmektedir. Çizelge 2.8’de pektin ekstraksiyonunda kullanılan enzim ve enzim kombinasyonları sunulmuştur.

2.6. Pektinin Kullanım Alanları

Gıda katkı maddesi olarak pektin E-440 kodlu ile isimlendirilmekte ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Pektinin doğal yapısı, doğal ürünlerin daha fazla tercih edilmesi, tüketiciler nezdinde de değerli bir katkı konumuna getirmiştir. Gıda sanayinde özellikle kıvamlaştırıcı, jelleştirici, dolgu maddesi, emülsifiye ve tekstür ajanı olarak kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde şekerlemelerde, meyve dolgu katkısı, fırıncılık ve pastacılık ürünlerinde özellikle reçel, jöle ve marmelat üretiminde, süt ürünlerinde ayrıca gıda sanayi dışında kozmetik, ilaç, tekstil, kağıt endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Thakur ve ark., 1997; Zouambia ve ark., 2009).

Gıda sanayinde düşük kalorili alkolsüz içeceklerde pektin, tekstür yapısını kuvvetlendirmek için, şeker yerine kullanılması tekstür kalitesini artırmaktadır. Dondurulmuş ürünlerde, pektin kullanılması buz kristallerinin kontrolünü sağlayarak, gıdanın tat ve rengi gibi özelliklerinin daha iyi korunduğunu bildirilmiştir. Meyve ve sebzede bulunan doğal pektinle, şekerli gıdalarda (asitliği yüksek) tekstür yapısı sağlanmaktadır. Gıdaya göre yüksek metoksilli veya düşük metoksilli pektin ilave ederek tekstür kalitesinin arttırılacağı bildirilmiştir (May, 1990).

Gıda sanayindeki reçel, jöle ve marmelat yapımında, yüksek metoksilli (yüksek şeker konsantrasyonu ve pH 2.0-3.5) pektin jel oluşturmak amacıyla kullanılmaktadır. Reçel ve marmelat yapımında düşük şeker konsantrasyonunda, düşük metoksilli pektin ile kalori değeri daha düşük ürünler hazırlanabilmektedir. Aynı şartlar altında agar ve karragenen gibi polisakkaritler ile hazırlanan ürünler, düşük metoksilli pektinle hazırlanandan daha az dayanıklıdır. Şekerleme endüstrisinde pektinin kullanılmasıyla; meyve tadının güçlenmesi, elastik yapı ve şekerde düzgün-parlak bir yapı sağlanmaktadır (Kar ve ark., 1999; Herbstreith ve ark., 2013a; Herbstreith ve ark., 2013b).

Pektin süt ve süt ürünlerinde protein topaklanmasını önleyerek, yoğurtta faz ve serum ayrımını önler. Süt ürünlerine tekstür gelişimini sağlayan pektin, aynı zamanda sineresisi de önlemektedir (Kar ve ark., 1999; Corredig ve ark., 2001; Matia-Merino ve ark., 2004; Willats ve ark., 2006; Kastner ve ark., 2012; Herbstreith ve ark., 2013a; Herbstreith ve ark., 2013c). Ek olarak pektin kullanımı set tipi (pıhtısı kırılmamış) yoğurtta, suyu bağlamaktadır (May, 1990; Voragen ve ark., 1995). Meyveli yoğurtlarda kalınlaştırıcı olarak modifiye nişaşta eklenmesi, meyvenin tat ve lezzeti baskımlarken, düşük metoksili pektin ilavesi ile meyveli yoğurtlarda tat ve lezzetinin daha iyi korunduğu belirtilmiştir (Graham, 1977). Pektin, mayonezde su tutma kapasitesini ve tekstürünü geliştirirken, ketçap ve soslarda istenilen kıvamı sağlamaktadır (Graham, 1977).

Yapılan çalışmalarda; önemli bir çözünür diyet lifi de olan pektinin, kandaki kolesterol ve glukoz seviyesini düşürdüğü ve kanserin yayılmasını engellediği bildirilmiştir (Arthey ve ark., 1998; Olano-Martin ve ark., 2002; Dongowski ve ark., 2004; Lattimer ve ark., 2010; Barrow ve ark., 2011; Georgiev ve ark., 2012). Bebek ve çocuklarda sık görülen akut bağırsak enfeksiyon hastalıklarının ve diyare oluşumunun pektin katkılı gıdalarla beslenme ile azaldığı ve özellikle kurşun emilimini de azalttığı bildirilmiştir (Arthey ve ark., 1998; Eliaz ve ark., 2006; Lattimer ve ark., 2010). Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada; farelerin düşük metoksilli pektin ilaveli diyet ile beslenmesi karaciğer, kalp, böbrek ve kemiklerde kurşun tutulumunu önemli lde azaltmıştır. Kurşun (Pb) giderilmesinde pektinin büyük rol oynadığını bildirilmiştir (Serguschenko ve ark., 2007). Pektinin toksik bileşenlerin kolay atılımında etkili olduğu belirtilmiştir. Belirli aralıklarla (1-6 gün) turunçgil pektini tüketilmesi As, Pb, Hg, Cd elementlerinin atılımını artırdığı tespit edilmiştir (Eliaz ve ark., 2006).

Pektin kozmetik ürünlerinin, su-yağ emülsiyonlarında emülgatör özelliğiyle ince bir tabaka haline olmasını sağlamaktadır. Tekstil sektöründe pektin, karboksimetil selüloz içeren alginat elyafı üretiminde kullanılmaktadır (Srivastava ve ark., 2011).

2.7. Yanıt Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology)

1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilen yanıt yüzey yöntemi ilk olarak kimya sanayinde uygulamaya başlamıştır. Myers ve Montgomery yanıt yüzey yöntemini proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel

tekniklerin birlikte kullanıldığı metot olarak açıklamıştır (Myers, 1995). Yanıt yüzey yöntemi deneysel çalışma sonuçları üzerinde etkili olan ve çok sayıda parametrelerden oluşan bir tasarım düzleminde, belirli bir bölgeyi ve bu bölgeye ait optimum noktaları tahmin edilmesini içermektedir (Turan ve Atundoğan, 2011). Bu yöntem üç aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar;

- Eleme denemeleri
- Bölge araştırması ve işlemi
- Optimizasyondur

Eleme denemeleri daha az sayıda ve daha verimli deneme yapılmasını sağlamaktadır. Bölge araştırması ile denemelerle belirlenen bağımsız değişkenlerin sistem hedefinde oluşturulan uç noktalara (optimum noktaya yakınlığı) cevap verip vermediğini belirlenmektedir. Optimizasyon aşamasında ise; denemelerin sonucunda optimum nokta belirlenmektedir (Koç ve Ertekin, 2009; Baş, 2010). Yanıt yüzey yönteminde; prosesi etkileyen parametreler bağımsız değişken olarak tanımlanırken, yanıtlar ise bağımlı değişkenlerdir. Gerçek yanıt fonksiyonu optimum nokta etrafında önemli bir eğrilik göstermektedir. Bu eğriler lineer olmayan, ikinci dereceden polinomial, üssel veya eksponensiyel modellerle optimum noktaların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Koç ve Ertekin, 2009; Baş, 2010). Deneme desenleri Box-Wilson ve Box-Behnken tasarımları kullanarak oluşturulmaktadır.

1. Box-Wilson; merkez esaslı bileşik tasarım (CCD): Bu tasarım tam ya da kısmi merkezi noktalı 2^k faktöriyel dağılımını içermektedir. Genişletilmiş merkez noktalarını içeren metottur ve 3 tipi bulunmaktadır.
- Merkezi esaslı bileşik tasarımı (CCC); CCD'nin orijinal formu olup, tasarım noktalarında faktöriyel kare etrafında dairesel veya küresel simetriye sahip tasarımıdır. Her bir faktör için 5 seviye gereklidir.
- İçten çevreleyen merkezi tasarım (CCI); belirli faktör limitlerinde tam ya da kısmi faktöriyel tasarımını oluşturmaktadır. Bu tasarımda her faktör için 5 nokta gereklidir.
- Yüz merkezli tasarımı (CCF); bu modelde de her faktör için 3 seviye vardır (Turan ve Altundoğan, 2011).

2. Box-Behnken tasarım (BB) faktöriyel tasarım içermeyen ve en az işlem gerektiren tasarımdır ve her faktör için 3 seviyeye sahip tasarımdır (Değirmecioğlu ve ark., 2006).

Yanıt yüzey yöntemi, farklı ekstraksiyon yöntemleri ile farklı kaynaklardan pektin ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kakao kabuklarından pektin elde etmek için asit (askorbik asit) ekstraksiyonu ile yapılan bir çalışmada; yanıt yüzey yöntemi pH'yı, sıcaklığı ve süreyi optimize etmek için kullanılmıştır. Optimum koşullar olarak, pH 2.5, 95°C ve 45 dakika olarak belirlenmiştir ve bu koşullarda pektin verimi %4.2 olarak elde edilmiştir (Florentina ve ark., 2018). Ayvadan pektin elde etmek için asit ekstraksiyon yöntemiyle yapılan çalışmada, yanıt yüzey yöntemi pH'yı, sıcaklığı ve süreyi optimize etmek için kullanılmıştır. Optimum koşullar olarak pH 2, 90°C, 90 dakika olarak belirlenmiş ve bu koşullarda pektin verimi %2.86 bulunmuştur (Açıkgöz ve Poyraz, 2006). Mango kabuklarından asit ekstraksiyon yöntemiyle pektin izolasyonunda optimum koşullar; pH 1.16, 63°C, 35 dakika olarak belirlenmiş ve bu koşullarda pektin verimi %18.8 olarak bulunmuştur (Oliveira ve ark., 2018).

Greyfurt kabuğunda ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle yapılan bir çalışmada, yanıt yüzey yöntemi ultrasonik gücü, sıcaklığı ve süreyi optimize etmek için kullanılmıştır. Optimum koşullar 66.71°C, 12.56 W, 27.95 dakika olup, maksimum pektin verimi %27.34 olarak elde edilmiştir (Prakash ve ark., 2015a). Patlıcan kabuğuyla yapılan bir başka çalışmada yanıt yüzey yöntemi ultrasonik güç, pH ve süreyi optimize etmek için kullanılmış, optimum koşullar 50 W, 30 dakika ve pH 1.5 olarak belirlenmiştir ve bu noktada pektin verimi %27.34 olarak bulunmuştur (Milad ve ark., 2019).

Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemiyle papaya kabuklarıyla yapılan çalışmada, optimal koşullarını tahmin etmek için yanıt yüzey yöntemi mikrodalga gücünü, pH'yı ve süreyi optimize etmek için kullanılmış, optimum koşullar olarak 640 W, 180 saniye, pH 3 belirlenmiş ve %26.69 pektin verimi elde edilmiştir (Parniakov ve ark., 2015; Maran ve ark., 2015). Ejderha meyvesinden pektin ekstraksiyonu ile ilgili yapılan bir çalışmada yanıt yüzey yöntemi mikrodalga gücünü, sıcaklığı ve süreyi optimize etmek için kullanılmış, optimum koşullar 400 W, 45°C, 20 dakika olarak belirlenmiş ve pektin verimi %7.5 olarak bulunmuştur (Thirugnanasambandham ve ark., 2014). Hint

inciri (*Opuntia ficus-indica*) ile yapılan bir başka çalışmada yanıt yüzey yöntemi ile optimum koşullar 517 W, 2.15 dakika, pH 2.26 olarak belirlenmiş, pektin verimi ise %12.57 bulunmuştur (Lefsih ve ark., 2017).

Yağsız kolza küspelerinden enzimatik ekstraksiyon ile pektin izolasyonunda optimal koşullarını tahmin etmek için yanıt yüzey yöntemi kullanmış ve optimum koşulların 1:4 Celluclast-Alcalase oranı, pH 5.5 ve 50°C olduğu, verimin %6.85 olduğu ve pektinin düşük metoksilli olduğu belirlenmiştir (Jeong ve ark., 2014). Enginar (*Cynara scolymus L.*)'la yapılan enzimatik pektin ekstraksiyonunda enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve süre optimize edilmiş, optimum koşullar 10.1 U/g (Celluclast® 1.5L) enzim konsantrasyonu, 27.2 saat ekstraksiyon süresi ve %6.5 substrat olarak belirlenmiştir ve pektin verimi bu koşullarda 176 mg/g olarak bulunmuştur (Sabater ve ark., 2018). Hint inciri (*Opuntia ficus-indica*) ile yapılan bir çalışmada yanıt yüzey yöntemi enzim konsantrasyonunu, substrat konsantrasyonunu ve enzim kombinasyonunu optimize etmek için kullanılmış; optimum koşullar 2:1 U/U ve 4 U/g selülaz/ksilanaz oranı ve aktivitesi ve substrat konsantrasyonu ise 22 mL/g olarak belirlenmiş ve bu koşullarda pektin verimi ise %16.67 olarak bulunmuştur (Bayar ve ark., 2018).

Yüzey yanıt yöntemi; bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki matematiksel ilişkiyi ortaya koyan modelin oluşturulmasında deney aralıklarının incelenmesinde, optimum koşulların bulunmasında, ve daha az sayıda deney ile daha doğru sonuca ulaşılmasına sağlayan bir yöntemdir. Bu çalışmada da nar kabuklarından enzimatik ve sitrik asitle pektin ekstraksiyonu yapılarak, pektin verimini en yüksek veren optimum koşullar yanıt yüzey yöntemi ile belirlenmiştir.

2.8. Nar Kabuğu

Nar meyvesinin latince ismi *Punica granatum* olan ve Romalı tarihçi Büyük Pliny'in "natural history" adlı kitabında adı kastaca elması olarak isimlendirilen bir meyvedir. Nar *punicaceae* familyasından olup kırmızı renkte, köşeli, dikenli, 2-5 metre boylarına sahip bir ağaç meyvesi olarak yetişmektedir (Özgüven ve ark., 2000).

Nar (*Punica granatum L.*) tropik ve subtropik bir iklim meyvesidir, kurak iklim koşulları dayanıklıdır. Narın değişik toprak tiplerinde yaşayabildiği -10 °C'ye kadar dayandığı; fakat -15°C ve altındaki sıcaklıklarda tamamen öldüğü bildirilmiştir. Narın anavatanı, başta Türkiye olmak üzere Güney Kafkasya, İran, Afganistan, Güney Asya, Batı Asya, Anadolu ve Akdeniz arasındaki bölgelerdir (Özgüven ve ark., 2000).

Nar genel olarak taze olarak tüketilmesinin yanında çeşitli gıda ve gıda dışı uygulamalarında da (pekmez, sos (nar ekşisi), meyve suyu, konserve, boya, ilaç, sirke, sitrik asit ve hayvan yemi üretimi) kullanılmaktadır. Nar ve suyunun özellikle kalp hastalıkları ve kanser gibi önemli hastalıkları önlediği bildirilmiştir (Lansky ve ark., 1998). Aynı zamanda damar tıkanıklığını önleyici, sindirim sisteminde özellikle kabızlık, mide yanması ve kusmayı önleyici, vücuttaki çeşitli ağrıların giderici, idrar söktürücü, tansiyon düşürücü, ateş düşürücü gibi birçok sağlığa olumlu etkileri ile yüzyıllardır tercih edilen meyvelerin başında gelmektedir. Bununla birlikte antimikrobiyal, antiparazitik, antiviral ve antikanserojen gibi özellikleri de pek çok çalışmalarla belirlenmiştir (Saleh ve ark., 1964; Onur 1983; Yılmaz ve ark., 1992; Anesini ve Perez 1993; Zhanak ve ark., 1995; Mavlyanov ve ark., 1997; Gündoğdu 2006; Cemeroğlu 2007; Gündoğdu ve ark., 2011).

Nar (*Punica granatum*) meyvesi ve kabukları tanen, flavonoid gibi fenolik maddeler ile steroid östrojenler, C-vitamini, organik asitler, şekerler, ursolik asit, betulik asit ve pektin gibi birçok maddeleri bir arada bulundurmaktadır (Fayez ve ark., 1963; Onur., 1983). Zengin antioksidan kaynakları olması nedeniyle, kanseri önlemede büyük önem taşımaktadır. Nar ekstraktının meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir (Sadeghi ve ark., 2015). Narla yapılan bir çalışmada; diyabet hastalarında nar çiçeğinin AST ve ALT değerlerini düşürdüğü bildirilmiştir (Moorthy ve ark., 2015). Nar kabuğu ekstraktıyla yapılan çalışmalarda nar kabuklarının yüksek oranda fenolik bileşik içerdiği belirlenmiştir. Bu

fenolik bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antidiyabetik, antienflamatuar ve sitotoksik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Kabuk ekstraktlarının gram pozitif ve negatif bakterileri ve küflere antimikrobiyal etkisi olduğu, nişastayı hidroliz eden ve enflamasyondan sorumlu enzimleri inhibe edebildiği ve meme ve kemik kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahip olduğu da gözlenmiştir (Demir ve ark., 2019). Önemli bir antioksidan kaynağı olmasının yanı sıra, nar kabuklarından pektin de elde edilebileceği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Çambay, 2011; Moorthy ve ark., 2015; Güzel, 2017). Ekonomik değeri düşük olan nar kabuklarının pektin üretimi amacıyla kullanımı; hem atık sorununu çözebilir, hem de pektin üretiminde alternatif bir kaynak olarak hizmet edebilir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Pektin ekstraksiyonu için; nar kabukları, yerel marketlerden temin edilen nar (*Punica granatum*) meyvesinden elde edilmiştir. Nar kabukları doğrayıcı ile parçalanıp, oda sıcaklığında kurutulmuş ve kurutulan nar kabukları öğütülerek +4°C’de depolanmıştır.

Enzim olarak; *Aspergillus niger*’den elde edilmiş selülaz enzimi kullanılmış ve Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, ABD) firmasından temin edilmiştir. Ticari pektin örneği Tito (Yantai Andre Pectin Co. Ltd., Çin) firmasından alınmıştır. Galaktronik asit, sodyum tetraborat, sülfamik asit, 3-fenilfenol, Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, ABD), dinitro salisilik asit (DNS), sodyum sülfat, Coomassie Brilliantblue, Bovin Serum Albumin (BSA), Merck KGaA (Darmstadt, Almanya), gallik asit (tri hidroksi benzoik asit), Alfa Aesar (Almanya) firmalarından alınmıştır. Diğer kimyasallar da Sigma (Sigma Chemical Company, MO, ABD), Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ya da Alfa Aesar (Alfa Aesar Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Pektinin sitrik asit ile ekstraksiyonu

Whistler ve BeMiller, (1973) prosedürüne göre sitrik asit yöntemiyle pektin ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Öğütülen nar kabukları (1 g) farklı hacimlerde (1.59-18.41 mL/g arasında) ve sitrik asitle farklı pH’lara (0.66-2.34 arasında) ayarlı karıştırılmış, 80°C’ye ayarlı karıştırılmalı su banyosunda farklı sürelerde (0.32-3.68 saat arasında) pektin ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen pektin %96’lık etil alkol ile ilave edilerek çöktürülmüş ve +4°C’de 24 saat bekletildikten sonra filtre edilmiş ve sırasıyla %70’lik asidik etanol (%0.5 HCl), %70’lik etanol ve iki defa %96 etil alkol ile yıkanmıştır. Daha sonra etüde 45°C’de kurutulmuş ve öğütülmüştür (Kliemann ve ark., 2009). Pektin verimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Verim} = \frac{m_0}{m} \times 100$$

m_0 = g cinsinden kurutulmuş pektinin ağırlığı

m = g cinsinden kurutulmuş nar kabuklarının ağırlığı

3.2.2. Pektinin enzimatik ekstraksiyonu

Pektin ekstraksiyonu 50 mM sitrat tampon çözeltisi (pH 5) içinde 40°C'de gerçekleştirilmiştir. Ön denemeler ile en yüksek pektin verimini veren enzimlerden (selüloz, hemiselüloz) selüloz enzimi seçilmiştir ve pektin ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Sitrat tampon çözeltisi içinde hazırlanan farklı substrat konsantrasyonları (1.06-12.27 g nar/100 mL arasında), farklı enzim konsantrasyonları (0.0099-0.1091 U/mL arasında) ve farklı sürelerde (0.32-3.68 saat arasında) pektin ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen pektin %96'lık etil alkol ile ilave edilerek çöktürülmüş ve +4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra sırasıyla %70'lik etanol (2 defa) son olarak bir defa %96'lık etil alkol ile yıkanmıştır. Filtre edilen pektin daha sonra etüvde 45°C'de kurutulmuş ve öğütülmüştür (Martínez-Ávila ve ark., 2016). Pektin verimi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$\text{Verim} = \frac{m_0}{m} \times 100$$

m_0 = g cinsinden kurutulmuş pektinin ağırlığı

m = g cinsinden kurutulmuş nar kabuklarının ağırlığı

3.2.3. Deneysel tasarım ve yanıt yüzey metodu ile ekstraksiyon koşullarının optimizasyonu

Her iki ekstraksiyon yöntemi için de optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Organik asit (Sitrik asit) ile pektin ekstraksiyonu için solvent/nar kabuğu oranı (1.59-18.41 mL/g), süre (0.32-3.68 saat) ve solvent pH'sı (0.66-2.34) aralıklarında optimize edilmiştir (Çizelge 3.1). Optimizasyon için üç değişkenli ve üç seviyeli Merkezi Bileşik tasarımı kullanılmış ve detaylar aşağıda çıkartılmıştır.

- **Bağımsız değişkenler:** Solvent/nar kabuğu oranı, süre, solvent pH'sı
- **Bağımlı değişkenler:** Pektin verimi

Çizelge 3.1. Sitrik asit ekstraksiyonu için denenen bağımsız değişkenlerin aralıkları

Bağımsız Değişkenler		- α	-1	0	+1	+ α
Süre (Saat)	X ₁	0.32	1	2	3	3.68
pH	X ₂	0.66	1.0	1.5	2.0	2.34
SK oranı (mL/g)	X ₃	1.59	5	10	15	18.41

Optimum ekstraksiyon koşullarını pektin veriminin maksimum olduğu noktalar seçilerek belirlenmiştir. Seçilen optimum koşullar için seçilen model aşağıdaki eşitlikte (Eşitlik 1) açıklanmıştır:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Eş. 1})$$

Eşitlikte 1'de Y bağımlı değişkenleri b₀ sabit, b₁, b₂ ve b₃ lineer terimleri, b₁₁, b₂₂ ve b₃₃ kuadratik terimleri, b₁₂, b₁₃ ve b₂₃ (modele optimizasyonuna göre bağımsız değişkenlerin ve interaksiyonlarının tahmini katsayıları) ve X₁, X₂ ve X₃ bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Regresyon ve grafiksel analizi için; Design-Expert V7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) programı kullanılmıştır. Fischer's testi model eşitliğini elde etmek için Student's t-test regresyon katsayılarının istatistiksel farkını tespit etmek için kullanılmıştır

Enzimatik yöntem ile pektin ekstraksiyonu optimizasyonu; süre (0.32-3.68 saat), enzim konsantrasyonu (0.0099-0.1091 U/mL) ve substrat konsantrasyonu (1.06-12.27 g nar/100 mL) bakımından optimize edilmiş ve bağımsız değişkenlerin aralıkları Çizelge 3.2 de verilmiştir. Optimizasyon için üç değişkenli ve üç seviyeli Merkezi Bileşik tasarımı kullanılmış ve detaylar aşağıda çıkartılmıştır.

- **Bağımsız değişkenler:** Enzim konsantrasyonu, substrat konsantrasyonu ve süre
- **Bağımlı değişkenler:** Pektin verimi

Çizelge 3.2. Enzimatik ekstraksiyonu için denenen bağımsız değişkenlerin aralıkları

Bağımsız Değişkenler		-α	-1	0	+1	+α
Süre (Saat)	X_1	0.32	1	2	3	3.68
Enzim(U/mL)	X_2	0.0099	0.0300	0.0590	0.0890	0.1091
Substrat(g nar/100 mL)	X_3	1.06	3.33	6.67	10.00	12.27

Optimum ekstraksiyon koşullarını pektin veriminin maksimum olduğu noktalar seçilerek belirlenmiştir. Seçilen optimum koşullar için seçilen model aşağıdaki eşitlikte (Eşitlik 2) açıklanmıştır:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 \quad (\text{Eş. 2})$$

Eşitlikte 1’de Y bağımlı değişkenleri b_0 sabit, b_1 , b_2 ve b_3 lineer terimleri, b_{11} , b_{22} ve b_{33} kuadratik terimleri, b_{12} , b_{12} ve b_{23} (modele optimizasyonuna göre bağımsız değişkenlerin ve interaksiyonlarının tahmini katsayıları) ve X_1 , X_2 ve X_3 bağımsız değişkenleri temsil etmektedir. Regresyon ve grafiksel analizi için; Design-Expert V7 (Stat-Ease Inc., Minneapolis) programı kullanılmıştır. Fischer’s testi model eşitliğini elde etmek için, Student’s t-test regresyon katsayılarının istatistiksel farkını tespit etmek için kullanılmıştır.

3.3. Pektin Analizleri

3.3.1. Pektinin kuru madde, kül, toplam şeker, indirgen şeker ve protein içeriği

Etüvde 105°C’de sabit ağırlığa getirilen tartım kaplarına 0.25 g pektin konulmuştur. Örnekler etüvde 105°C’de sabit ağırlığa gelene kadar kurutulmuştur. Pektinin nem ve kuru madde içeriği aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (AOAC, 1989).

$$\text{Nem miktarı (\%)} = \frac{\text{Örnek Pektin} - \text{Kurutulmuş Pektin}}{\text{Örnek Pektin}} \times 100$$

$$\text{Kuru Madde(\%)} = 100 - \text{Nem(\%)}$$

Kül miktarını belirlemek için sabit ağırlığa gelmiş porselen krozelere 0.25 g pektin örnekleri tartılmış ve 550°C’de 6-8 saat kül fırınında açık gri kül rengi elde edilene kadar yakılmıştır. Pektinin kül içeriği aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (AOAC, 1989).

$$\text{Kül miktarı (\%)} = \frac{\text{Kül Tartımı}}{\text{Örnek Pektin}} \times 100$$

Pektinde toplam şeker miktarı, fenol sülfirik asit metodu ile glikoz standardı kullanılarak belirlenmiştir (Dubois ve ark., 1956). Bu amaç ile; 10 mg pektin, 5 mL distile su ve 200 µL 0.1 N NaOH karıştırılarak 2 dakika kaynatılmış ve stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözülden 100 µL örnek alınarak, 50 µL %80’lik fenol çözültisinden eklenmiş ve üzerinde 2 mL konsantre sülfirik asit eklendikten sonra 10 dakika beklenerek 490 nm’de spektrofotometre de absorbansı okunmuştur.

Pektinin indirgen şeker miktarı DNS (Dinitro salisilik asit) metodu ile glikoz standardı kullanılarak tayin edilmiştir (Miller, 1959). 10 mg pektin, 5 mL distile su ve 200 µL 0.1 N NaOH karıştırılarak 2 dakika kaynatılmıştır. Hazırlanan çözülden 100 µL, 900 µL saf su ile karıştırılmış ve üzerine 1.5 mL DNS çözültisi eklenmiştir. 100°C sıcaklıkta 5 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra örnekler oda sıcaklığına soğumaya bırakılmış ve oluşan renk spektrofotometrede 560 nm’de okunmuştur.

Pektinin protein içeriği Bradford metodu ile BSA (Bovin Serum Albumin) standardı kullanılarak tayin edilmiştir (Bradford, 1976). 10 mg pektin 5 mL su ve 200 µL 0.1 N NaOH karıştırılarak 2 dakika kaynatılmıştır. Hazırlanan çözülden 0.5 mL alınarak 5 mL Bradford çözültisi ile karıştırılmış ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 595 nm’de absorbansı okunmuştur. Toplam şeker, DNS ve Bradford çözültilerin hazırlanışı sırasıyla EK I, II, III’te verilmiştir.

3.3.2. Pektinin karakterizasyonu

3.3.2.1. Pektinin Soğuk, Sıcak Suda ve Alkalide Çözünürlüğü

0.25 g pektin 10 ml %95'lik alkolle karıştırılmış ve üzerine 50 mL distile su eklenip kuvvetlice çalkalanmıştır. Daha sonra pektinin soğuk suda çözünüp çözünmediği incelenmiştir. Karışım daha sonra 85-95°C'de 15 dakika süre ile karıştırılmış ve pektinin sıcak suda çözünüp çözünmediğine incelenmiştir (Fishman ve ark., 1984). 0.25 g pektin 10 ml %95'lik alkolle karıştırılmış ve üzerine 50 mL distile su eklenip kuvvetlice çalkalanmıştır. Pektin çözeltisinden 5 mL alınıp üzerine 1 mL 0.1 N NaOH eklenmiş ve pektinin soğuk alkalide çözünüp çözülmediği incelenmiştir. Daha sonra 85-90°C'de 15 dakika süre ile karıştırılarak ısıtılmış (Joslyn, 1980) ve 15 dakika sonunda pektinin sıcak alkalide çözünüp çözünmediği incelenmiştir (Fishman ve ark., 1984). Değerlendirmede çözüldü (+2) kısmen çözüldü (+1) ve çözünmedi (0) olarak kaydedilmiştir.

3.3.2.2. Pektinin eküvalent ağırlığı, metoksil ve anhidronik asit içeriği, esterleşme derecesi

Eküvalent ağırlık için; 0.25 g pektin örneği tartılıp üzerine 5 mL etanol eklenmiştir. Sonra 1 g sodyum klorür ve 100 mL distile su ile birkaç damla fenol kırmızısı ilave edilmiştir. Oluşan çözeltiyi 0.1 N sodyum hidroksit ile pembe renk olana kadar titre edilmiştir (Aina, 2012). Eküvalent ağırlık (EA) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$EA = \frac{\text{Örnek Ağırlık}(g) \times 100}{\text{NaOH sarfiyat}(mL) \times \text{Normalite NaOH}}$$

Metoksil içeriği için; 0.25 g pektin tartılıp üzerine 5 mL etanol eklenmiştir. Daha sonra 1 g sodyum klorür ve 100 mL distile su ile birkaç damla fenol kırmızısı ilave edilmiştir. Oluşan çözeltiyi 12.5 mL 0.25 N NaOH çözeltisi ilave edilerek çalkalanmış ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonra 0.25 N HCl çözeltisinden 12.5 mL ilave edilmiş ve 0.1 N NaOH çözeltisi ile titre edilmiştir (Aina, 2012). Aşağıdaki eşitlik ile metoksil içeriği değer hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Metoksil İçeriği} = \frac{\text{NaOH Sarfiyat (mL)} \times \text{Normalite NaOH} \times 31 \times 100}{\text{Örnek Ağırlığı (mg)}}$$

Eküvalent ağırlık ve metoksil içeriği değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlikle anhidronik asit (AUA) değeri hesaplanmıştır (Azad ve ark., 2014). Anhidronik asit değeri ve metoksil içeriği değerleri kullanılarak aşağıdaki eşitlikle esterleşme derecesi (DE) hesaplanmıştır (Azad ve ark., 2014).

$$\% \text{ AUA} = \frac{176 \times 0.1Z \times 100}{W \times 1000} + \frac{176 \times 0.1Y \times 100}{W \times 1000}$$

$$\% \text{ DE} = \frac{176 \times \% \text{ MeO}}{31 \times \% \text{ AUA}} \times 100$$

Z= eküvalent ağırlıkta kullanılan NaOH sarfiyat (mL)

Y= metoksil içeriği belirlemede kullanılan NaOH sarfiyat (mL)

W=örnek ağırlığı (g)

3.3.3. Pektinde üronik asit tayini

Pektinlerin üronik asit içeriği m-hidroksidifenil metodu ile D-galakturonik asit standardı kullanarak belirlenmiştir (Melton ve Smith, 2001). 5 mg pektin bir tüp içine tartılmış, üzerine 1 mL konsantre sülfürik asit eklenerek buzda 5 dakika karıştırılmış, tekrar 1 mL konsantre sülfürik asit eklenerek buzda 5 dakika karıştırılmıştır (toplamda 2 mL konsantre sülfürik asit). Daha sonra örneklerin üzerine 0.5 mL su eklenerek 5 dakika karıştırılmış ve tekrar 0.5 mL su ilave eklenerek karıştırılmıştır (toplamda 1 mL su). Örneklerin hacmi 10 ml'ye su ile tamamlanmıştır ve 10 dakika 2000xg'de santrifüjlenmiştir. Santifüjlenen örneklerin sıvı kısımdan 400 µL alınarak 40 µL 4 M sulfamik asit/potasyum sulfamat çözeltisi (pH 1.6) ile karıştırılmış ve 2.4 mL 75 mM sodyum tetraborat çözeltisi (sülfürik asit içinde hazırlanmış) eklenerek, 20 dakika su banyosu içerisinde kaynatılmıştır. Örnekler oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra üzerlerine 80 µL m-hidroksidifenol çözeltisi ilave edilmiştir ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra oluşan renk spektrofotometrede 525 nm'de okunmuştur. Üronik asit tayini için kullanılan çözeltilerin hazırlanışı EK IV'te verilmiştir.

3.3.4. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi

Yaklaşık 1 mg pektin Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisine (Jasco 4700 Tokyo, JAPONYA) yerleştirilerek titreşim frekans aralığı 4000-400 cm^{-1} olacak şekilde absorbanı ölçülmüştür. Pektin metil esterifikasyonu serbest karboksil gruplarının 1630 (A_{1630}) cm^{-1} ve esterleşmiş grupların 1740 (A_{1740}) cm^{-1} pik alan değerleri ile aşağıdaki bağıntı ile hesaplanmıştır (Virk ve Sogi, 2004).

$$DE = 124.7 \times R + 2.2013$$

$$R = A_{1740}/(A_{1740}+A_{1630}) \times 100$$

3.4. İstatistiksel Analiz

Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Ortalamalar arasındaki farklılıklar %95 güven aralığında Duncan testi ile değerlendirilmiştir. SPSS (Statistical Packag for the Social Sciences) istatistiksel bilgisayar programı sonuçları analiz etmek amacıyla kullanılmıştır (SPSS, Inc., Chicago, IL, ABD).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Pektinin Enzimatik Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Pektin ekstraksiyonu için günümüzde en çok tercih edilen yöntemlerinde biri asitle ekstraksiyon yöntemidir (Guo ve ark., 2013). Enzimatik pektin ekstraksiyonu daha spesifik, ılımlı koşullarda gerçekleşmesi, pektinin yapısında değişikliklere neden olmaması, korozif kimyasalların kullanılmaması ve çevre dostu olmasından dolayı son yıllarda dikkat çeken ve araştırmaların yoğunlaştığı bir yöntemdir. Bu çalışmada yerel marketlerden alınan nar kabukları kurutulmuş ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanan nar kabukları, farklı enzim konsantrasyonları ve farklı sürelerde (0.32-3.68 saat arasında) toplam 20 farklı koşulda ekstrakte edilmiş ve elde edilen pektin verimleri ve program tarafından tahmin edilen verimler Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Yapılan çalışmalarda en yüksek verim; enzim konsantrasyonunun 0.0890 U/mL, substrat konsantrasyonunun 10.00 g nar/100 mL ve sürenin 3 saat olduğu koşulda %6.84 olarak bulunmuştur. En düşük verime ise 0.0595 U/mL enzim konsantrasyonunda, 1.06 g nar/100 mL substrat konsantrasyonunda ve 2 saat ekstraksiyon süresinde %0.99’dur (Çizelge 4.1). En düşük enzim konsantrasyonunda (0.0099 U/mL) verim %4.36 (deney11) iken en yüksek enzim konsantrasyonunda (0.1091U/mL) pektin verimi %5.55 olarak bulunmuştur. En düşük ekstraksiyon süresinde (0.32 saat) verim %1.92 (deney 9) iken en uzun sürede (3.68 saat) pektin verimi %4.90 (deney 10) olarak tespit edilmiştir.

Enzim konsantrasyonunun 0.0300 U/mL’den 0.0890 U/mL’ye artırılması, pektin verimini önemli derecede etkilememekte, hatta düşük substrat konsantrasyonlarında ekstraksiyon süresine de bağımlı olarak verimi negatif etkilemektedir. Enzimin ortamdaki kullanabileceği bütün substratı bitirdikten sonra herhangi bir etkisi kalmadığı görülmektedir. Substrat konsantrasyonu artırıldığında ise, verim önemli derecede artmaktadır. Çizelge 4.1’te görüldüğü üzere ekstraksiyon süresinin artışıyla pektin verimi artarken, enzim konsantrasyonunun artması pektin verimini önemli derecede artırmamış; ancak substrat miktarının artışıyla beraber verimi olumlu etkilemiştir.

Çizelge 4.1. Deneysel tasarım ve nar kabuklarından enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektin verimleri

Deney numarası	Süre (saat)	Enzim (U/mL)	Substrat (g nar/100 mL)	Pektin Verimi	
				Deneysel	Tahmini
1	1	0.0300	3.33	2.62	2.28
2	1	0.0300	10.00	4.29	3.77
3	1	0.0890	3.33	3.19	2.79
4	1	0.0890	10.00	4.79	4.84
5	3	0.0300	3.33	3.61	3.19
6	3	0.0300	10.00	6.61	6.63
7	3	0.0890	3.33	2.65	2.80
8	3	0.0890	10.00	6.84	6.81
9	0.32	0.0595	6.67	1.92	2.46
10	3.68	0.0595	6.67	4.90	4.88
11	2	0.0099	6.67	4.36	4.93
12	2	0.0595	6.67	5.10	5.26
13	2	0.1091	6.67	5.55	5.51
14	2	0.0595	1.06	0.99	1.41
15	2	0.0595	12.27	5.92	6.03
16	2	0.0595	6.67	5.66	5.26
17	2	0.0595	6.67	5.62	5.26
18	2	0.0595	6.67	4.85	5.26
19	2	0.0595	6.67	4.94	5.26
20	2	0.0595	6.67	5.51	5.26

Pektin verimlerindeki farklılıklardan dolayı en uygun ekstraksiyon koşullunun bulunması için verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Pektinin optimizasyonu için kullanılan bağımsız değişkenler ve deneysel veri aralığı Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Kodlanmış değişkenlere göre kuadratik model Eşitlik 3.1’de gösterilmiştir.

$$Y=5.42-0.61X_1-0.05X_2+1.86X_3-0.34X_1X_2+0.73X_1X_3+0.14X_2X_3-1.27X_1^2-0.02X_2^2-0.55X_3^2 \quad (\text{Eş.3.1})$$

Pektin verimi modelinin yeterliliğini ve uygunluğunu saptamak için varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Enzimatik yöntemle nar kabuklarından elde edilen pektin verimi için regresyon katsayısı (R^2) 0.95 olarak bulunmuş model uyum eksikliği göstermemiş ($p < 0.05$) ve regresyon katsayısı %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Pred R^2 , Adj R^2 ile uyum içindedir. Düşük varyasyon katsayısı ve standart sapma deneylerin duyarlılığının yüksek ve güvenilir olduğunu göstermektedir. Adequate Precision değerinin 4’den büyük olması deneylerin duyarlılığı yüksek, güvenilir ve model seçiminin uygun olduğunu göstermektedir.

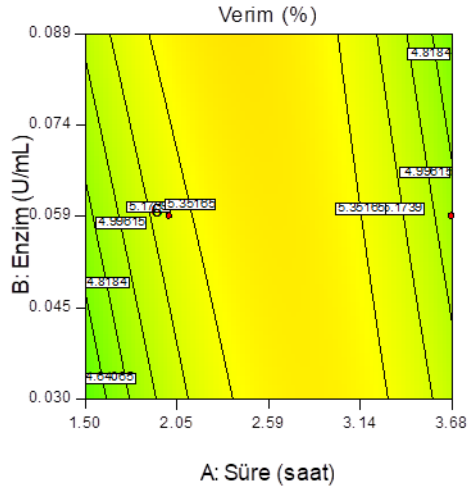
Çizelge 4.2. Nar kabuklarında enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektin verimlerinin ANOVA çizelgesi

Kaynak	Tahmini Katsayı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin Ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F
Model	5.42	43.899	9	4.878	22.093	< 0.0001
X ₁	-0.61	0.470	1	0.470	2.129	0.1752
X ₂	-0.05	0.014	1	0.014	0.063	0.8068
X ₃	1.86	17.502	1	17.502	79.272	< 0.0001
X ₁ X ₂	-0.34	0.406	1	0.406	1.837	0.2051
X ₁ X ₃	0.73	1.910	1	1.910	8.651	0.0148
X ₂ X ₃	0.14	0.156	1	0.156	0.709	0.4196
X ₁ ²	-1.27	4.562	1	4.562	20.665	0.0011
X ₂ ²	-0.02	0.004	1	0.004	0.017	0.8999
X ₃ ²	-0.55	4.308	1	4.308	19.512	0.0013
Residual		2.208	10	0.221		
Uyum Eksikliği		1.568	5	0.314	2.451	0.1738
Saf Hata		0.640	5	0.128		
Toplam		46.107	19			
R^2 : 0.95	Adj R^2 : 0.91		Pred R^2 : 0.72		Adeq Precision: 16.26	
PRESS: 13.11	C.V.: %10.45		Std. Dev.: 0.47			

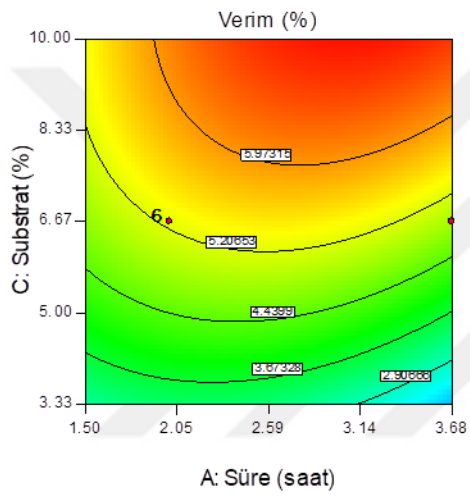
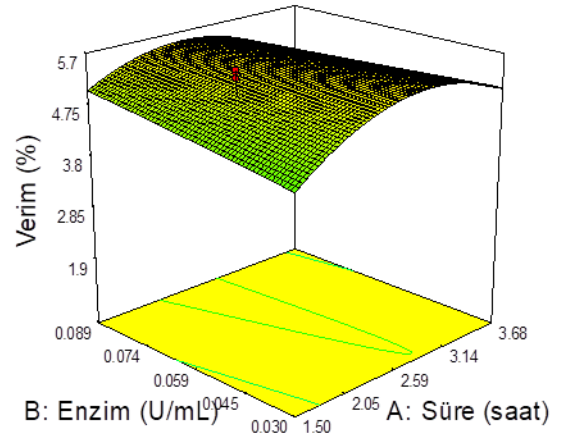
Nar kabuklarından enzimatik ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen pektinlerin verimlerine enzim konsantrasyonu, süre ve substrat konsantrasyonu arasındaki etkileşimi gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.1'te sunulmuştur. Substrat konsantrasyonu 6.67 g nar/100mL'de sabit tutulduğunda en yüksek verim %5.53 olarak, 0.09 U/mL enzim konsantrasyonunda ve 2.48 saatte elde edilmiştir. Enzim konsantrasyonu 0.06 U/mL olduğunda; en yüksek verimin %6.74 olarak, substrat konsantrasyonu 9.99 g nar/100 mL de 3.06 saatte olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon süresi 3 saat olduğunda; en yüksek verimi (%6.81), 0.09 U/mL enzim konsantrasyonu ve 10 g nar/100 mL vermektedir. Substrat konsantrasyonunun artışı verim üzerinde büyük etki yaratırken enzim konsantrasyonundaki artış verimde büyük bir artışa neden olmamıştır (Şekil 4.1B ve C). Şekil 4.1A'da görüldüğü üzere ekstraksiyon süresinin uzaması verimi artırmıştır.

Model yeterliliği ve doğruluğu; gerçek değere karşı çizilen tahmini değer, içsel studentleştirilmiş artıklara karşı çizilen normal % olasılık ve deney numarasına karşı çizilen içsel studentleştirilmiş artıklar diyagnostik eğrileri ile de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, deneyler ile tahmin edilen veriler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Şekil 4.2A). Normal % olasılık eğrisinin normal bir dağılım gösterdiği, herhangi bir sapma olmadığı, ayrıca tüm verilerin sınırlar (± 3) içinde kaldığı görülmekte (Şekil 4.2B ve C) ve geliştirilen modelin uygunluğunu doğrulamaktadır.

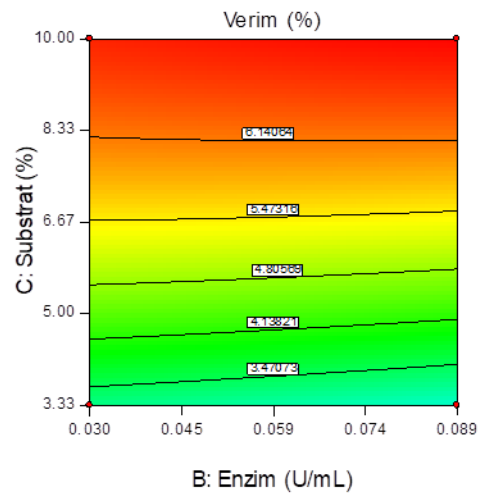
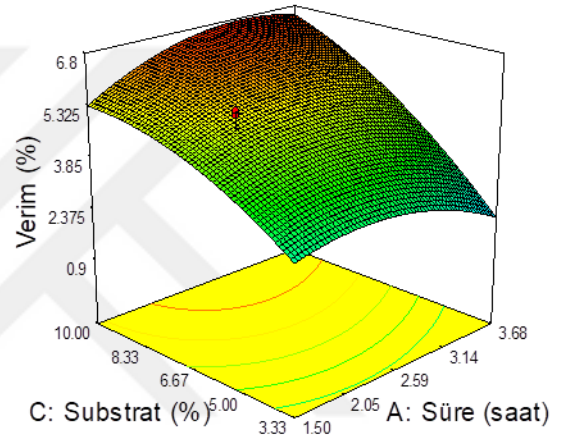
Nar kabuğundan elde edilen pektin veriminin yüksek olması için yapılan optimizasyon çalışmasının sonunda, program tarafından önerilen koşullar arasından optimum ekstraksiyon koşulu olarak; 2.58 saat ekstraksiyon süresi, 0.075 U/mL enzim konsantrasyonu, 9.99 g nar/100 mL substrat konsantrasyonu olarak seçilmiş ve bu koşullar altında yapılan ekstraksiyon sonucunda %7.19 verimle pektin ekstrakte edilmiştir (Çizelge 4.3). Pektin verimi, program tarafından tahmin edilen verimden daha yüksek bulunmuştur.



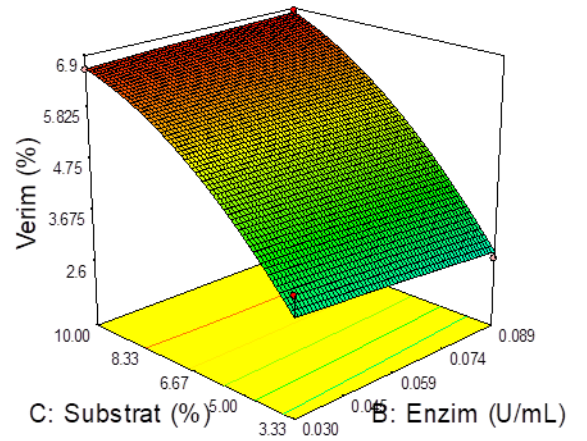
A



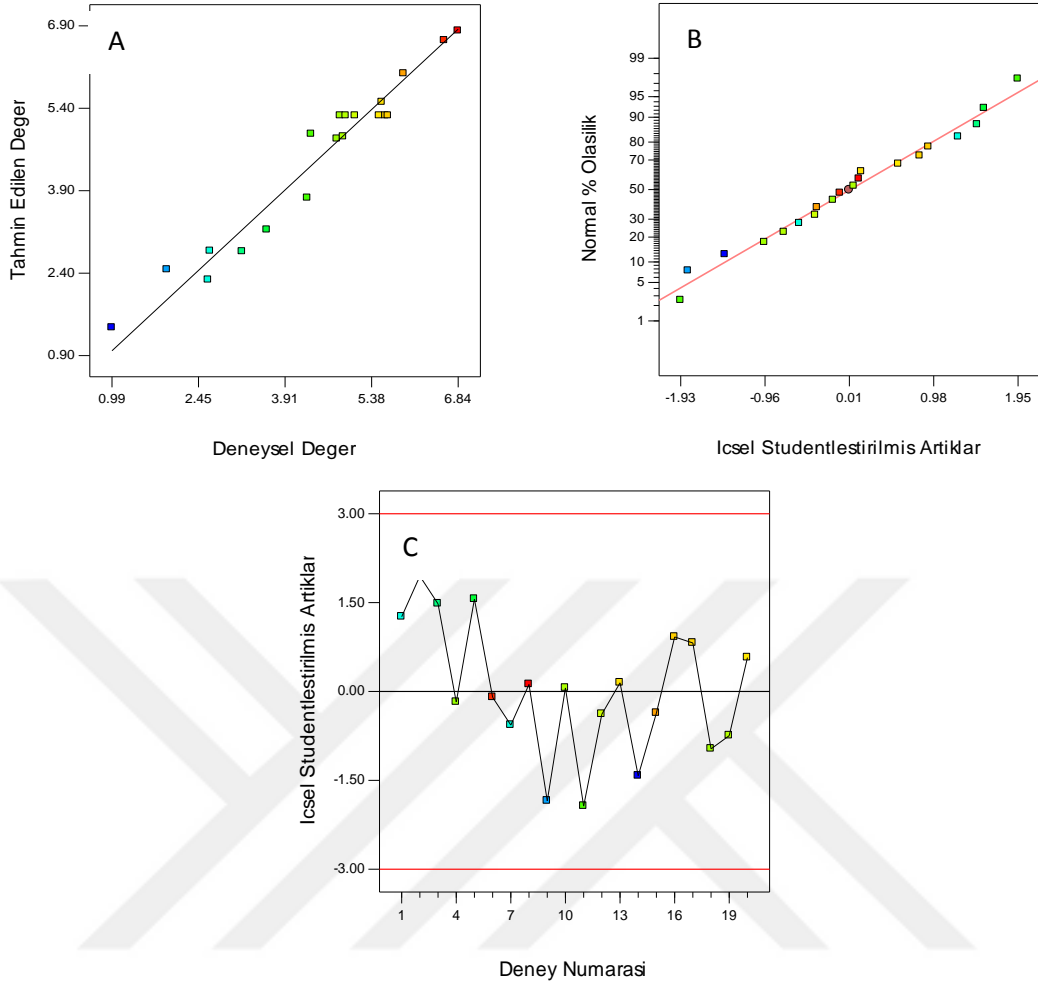
B



C



Şekil 4.1. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri (enzimatik ekstraksiyon)



Şekil 4.2. Model yeterlilik grafikleri (enzimatik ekstraksiyon)

Çizelge 4.3. Optimum enzimatik ekstraksiyon koşullarında elde edilen deneysel ve tahmini pektin verimleri

Süre (saat)	Enzim (mL)	Substrat (g nar/100 mL)	Deneysel Verim (%)	Tahmin Verim (%)
2.58	0.075	9.99	7.19±0.33	6.69

Daha önceki çalışmalarda nar kabuğundan 70-90°C arasında ve 50 dakikada sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinlerin verimi %3.92-11.18 arasında bulunmuştur (Pereira ve ark., 2016). Bir başka çalışmada ise 80°C ve 60 dakikada sitrik asit ekstraksiyonunda pektin verimi %6.13 olarak tespit edilmiştir (Güzel ve Akpınar, 2019). 86°C ve 80 dakikada sülfirik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinin verimi

de % 6.4-11 olarak saptanmıştır (Abid ve ark., 2016). Nar kabuğundan 20 kHz, 50-70°C ve 15-35 dakikada ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen pektin, verimi %4.23-24.18 arasındadır (Moorthy ve ark., 2015). Çalışmalar kullanılan ekstraksiyon yönteminin pektin verimini önemli ölçüde etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları daha önceki çalışmalarda bulunan sonuçlara benzerdir. Özellikler asit ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen pektin verimlerine göre daha yüksektir.

Enzimatik ekstraksiyonla elde edilmiş farklı kaynaklarından elde edilen pektin verimleri incelendiğinde; enginar kabuğundan (*Cynara scolymus L.*) 50°C, 36-48 saatte, %22.14 verimle (Sabater ve ark., 2018), çarkıfelek meyvesinden %16-27 verimler (Vasco-Correa ve Zapata, 2017), balkabağından (*Cucurbita Moschata*) %4.70 verimle (Fissore ve ark., 2009), kivi posasından 25 °C ve 0.5 saatte %4.48 verimle (Yuliarti ve ark., 2015), hindiba ve karnabahardan 50°C ve 4 saatte %36.4 verimle (Panouille ve ark., 2006) ve kolza tohumundan (*Brassica napus L*) 50°C ve 5 saatte %6.85 verimle (Jeong ve ark., 2014) pektin elde edildiği görülmektedir. Çalışmalarda pektinin elde edildiği kaynaktaki farklılıkların verimi önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada nar kabuklarının pektin verimi enginar kabuğundan, çarkıfelek meyvesinden, hindiba ve karnabahardan düşük, balkabağı, kivi posası ve kolza tohumundan yüksek bulunmuştur.

4.2. Pektinin Sitrik Asit ile Ekstraksiyonu ve Ekstraksiyon Koşullarının Optimizasyonu

Mineral asit kullanılarak yapılan pektin ekstraksiyonu pektin depolimerizasyona neden olduğundan dolayı, organik asitler mineral asitlere alternatif olarak önerilmektedir (Marić ve ark., 2018). Bu çalışmada aynı zamanda sitrik asit kullanılarak da pektin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Nar kabuklarından; farklı pH'larda (0.66-2.34), farklı sürelerde (0.32-3.68 saat) ve farklı solvent/katı (SK) (1.59-18.41 ml/g) oranlarında, toplam 20 farklı koşulda pektin ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen pektin verimleri ile program tarafından tahmin edilen verimler Çizelge 4.4'de sunulmuştur.

Yapılan çalışmada, en yüksek pektin verim; pH 1'de, 5 mL/g SK oranında ve ekstraksiyon süresinin 3 saat olduğu koşullarda %7.92 olarak bulunmuştur. En düşük pektin verimi ise pH'nın 2.34, SK oranının 10 mL/g ve ekstraksiyon süresinin 2 saat

olduğu koşulda %0.63 olarak tespit edilmiştir. En kısa ekstraksiyon sũresinde (0.32 saat) pektin verimi %3.12 (deney 1) iken, en uzun ekstraksiyon sũresinde (3.68 saat) verim %6.63 (deney 20) olarak bulunmuştur. Ekstraksiyon sũresinin artması verimi artırmıştır. Birçok araştırmacı, ekstraksiyon sũresinin doğrudan verim ekstraksiyonu ile ilişkili olduğunu, bũylece ekstraksiyon veriminin sũre arttıka arttığını bildirmişlerdir (Peng ve ark., 2014). Bu muhtemelen katı parçacıklardan çözeltiye pektinin kũtle aktarımı için daha fazla zaman sağlamasından kaynaklanmaktadır (Wai ve ark., 2010). En yüksek pH'da (2.34) pektin verimi %0.63 (deney 9) iken, en dũřük pH'da (0.66) verim %7.30 olarak bulunmuştur. pH verimle ters orantılı olup, pH artıka verim azalmaktadır. Dũřük pH'lar pektinin daha çözũnür hale gelmesini sağlamakta, ekstraksiyonu kolaylaştırmakta, dolayısıyla da verimi artırmaktadır. En yüksek SK oranında (18.41 mL/g) pektin verimi %0.79 (deney 7) iken, en dũřük SK oranında (1.59 mL/g) verim %2.37 (deney 17) olarak bulunmuştur. Bitki materyali asit çözeltisi içinde ısıtıldığında, hücre yapısı parçalanarak çözũnmeyen pektini çözũndürmektedir (Garna ve ark., 2010). Bununla beraber asitli çözeltinin oranındaki çok fazla artış, pektini daha fazla asit ortama maruz bıraktığından, pektinde parçalanmalara neden olmakta ve verimi negatif etkilemektedir.

Çizelge 4.4. Deneysel tasarım ve nar kabuklarından sitrik asit ekstraksiyonla elde edilen pektin verimleri

Deney numarası	Süre (saat)	pH	SK (mL/g)	Pektin Verimi	
				Deneysel	Tahmini
1	0.32	1.5	10	3.12	3.32
2	1	2	5	0.92	1.19
3	1	1	5	7.14	6.26
4	1	1	15	1.53	2.09
5	1	2	15	0.77	0.62
6	2	1.5	10	3.44	2.68
7	2	1.5	18.41	0.79	0.06
8	2	1.5	10	2.22	2.68
9	2	2.34	10	0.63	0.24
10	2	0.66	10	7.30	7.43
11	2	1.5	10	2.60	2.68
12	2	1.5	10	2.37	2.68
13	2	1.5	10	3.15	2.68
14	2	1.5	1.59	2.37	2.85
15	2	1.5	10	2.25	2.68
16	3	1	15	5.59	5.50
17	3	2	15	0.95	2.02
18	3	2	5	1.54	1.16
19	3	1	5	7.92	8.26
20	3.68	1.5	10	6.63	6.17

Pektin verimlerindeki farklılıklardan dolayı ekstraksiyon için en uygun koşullun bulunması için verilerin optimize edilmesi gerekmektedir. Kullanılan bağımsız değişkenler ve deneysel veri aralığı Çizelge 4.4’te sunulmuştur. Kodlanmış değişkenlere göre kuadratik model Eşitlik 3.2’de gösterilmiştir.

$$Y = -3.71 + 1.91X_1 + 0.56X_2 - 3.43X_3 - 0.51X_1X_2 + 0.36X_1X_3 + 0.90X_2X_3 + 0.73X_1^2 + 0.41X_2^2 - 0.43X_3^2 \quad (\text{Eş.3.2})$$

Modelin yeterliliğini ve uygunluğunu saptamak için varyans analizi (ANOVA) yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.5’de verilmiştir. Organik asit ile nar kabuklarından elde edilen pektin verimi için, regresyon katsayısı (R^2) 0.95 olarak bulunmuş model uyum eksikliği göstermemiş ($p < 0.05$) ve regresyon katsayısı %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. R^2 ve Adj R^2 yüksek olması modelin uygun olduğunu göstermektedir. Pred R^2 Adj R^2 ile uyum içindedir. Düşük varyasyon katsayısı ve standart sapma deneylerin duyarlılığının yüksek ve güvenilir olduğunu göstermektedir. Adequate Precision değerinin 4’ten büyük olması deneylerin duyarlılığı yüksek, güvenilir ve model seçiminin uygun olduğunu göstermektedir.

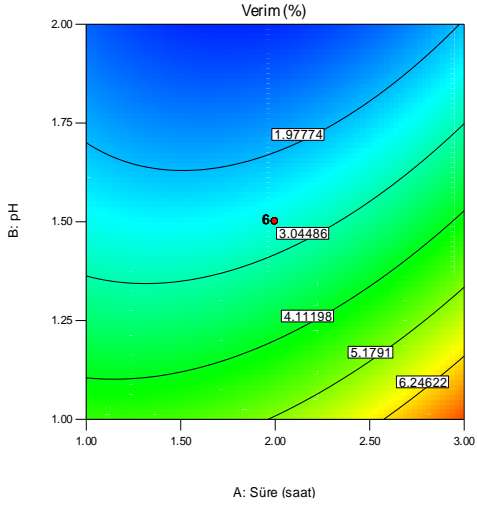
Çizelge 4.5. Nar kabuklarında sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektin verimlerinin ANOVA çizelgesi

Kaynak	Tahmini Katsayı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Karelerin Ortalaması	F-değeri	p-değeri Prob > F
Model	-3.71	104.74	9	11.64	22.99	< 0.0001
X ₁	1.91	3.05	1	3.05	6.03	0.0339
X ₂	0.56	0.26	1	0.26	0.52	0.4869
X ₃	-3.43	4.57	1	4.57	9.03	0.0132
X ₁ X ₂	-0.51	2.05	1	2.05	4.04	0.0721
X ₁ X ₃	0.36	1.01	1	1.01	1.99	0.1882
X ₂ X ₃	0.90	6.49	1	6.49	12.82	0.0050
X ₁ ²	0.73	7.70	1	7.70	15.21	0.0030
X ₂ ²	0.41	2.40	1	2.40	4.75	0.0543
X ₃ ²	-0.43	2.70	1	2.70	5.34	0.0435
Residual		5.06	10	0.51		
Uyum Eksikliği		3.77	5	0.75	2.92	0.1325
Saf Hata		1.29	5	0.26		
Toplam		109.81	19			
R ² : 0.95		Adj R ² : 0.91		Pred R ² : 0.70		Adeq Precision: 16.29
C.V.%: 22.49		Std. Dev. : 0.71		PRESS: 33.24		

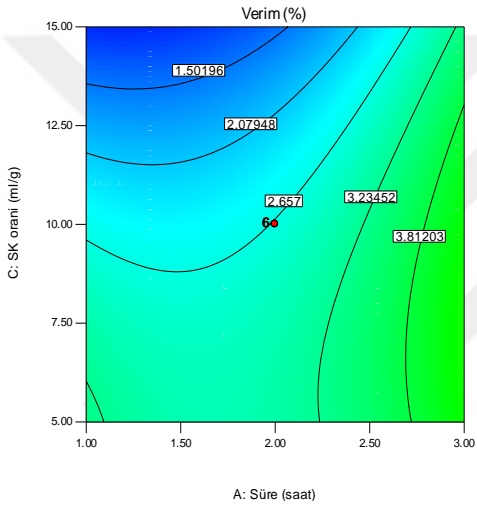
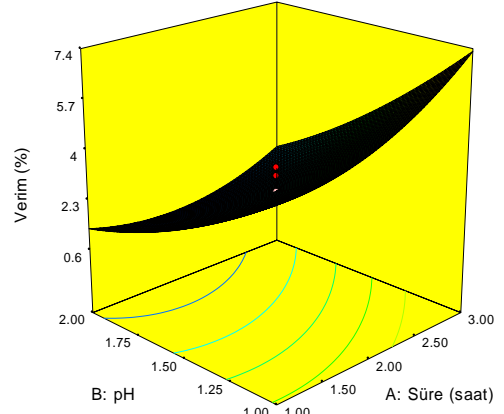
Nar kabuklarından sitrik asit ile elde edilen pektin verimine pH, süre ve SK oranlarının arasındaki etkileşimi gösteren yanıt yüzey ve kontur grafikleri Şekil 4.3'te sunulmuştur. SK oranı 10 mL/g'da sabit tutulduğunda en yüksek verim %7.23 olarak, pH 1 de ve 3 saatte elde edilmiştir. pH 1.5 olduğunda, en yüksek verimin %4.38 olarak 7.53 mL/g SK da ve 3 saatte olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon süresi 1.5 saat olduğunda en yüksek verimi (%6.91) pH 1 ve 1.60 mL/g SK oranı vermektedir.

Model yeterliliği ve doğruluğu; gerçek değere karşı çizilen tahmini değer, içsel studentleştirilmiş artıklara karşı çizilen normal % olasılık ve deney numarasına karşı çizilen içsel studentleştirilmiş artıklar diyagnostik eğrilerle de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, deneyler ile tahmin edilen veriler arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir (Şekil 4.4A). Normal % olasılık eğrisinin normal bir dağılım gösterdiği, herhangi bir sapma olmadığı, ayrıca tüm verilerin sınırlar (± 3) içinde kaldığı görülmekte (Şekil 4.4B ve C) ve geliştirilen modelin uygunluğunu doğrulamaktadır.

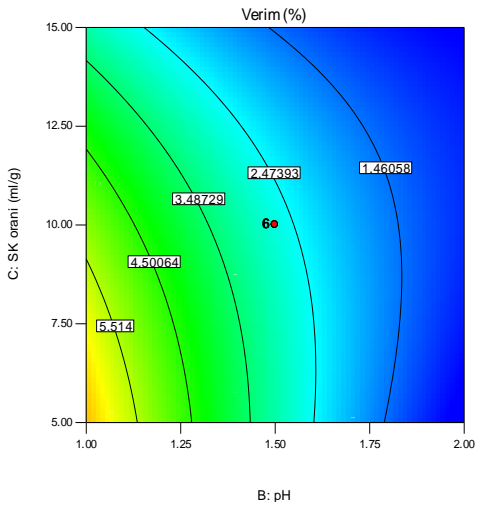
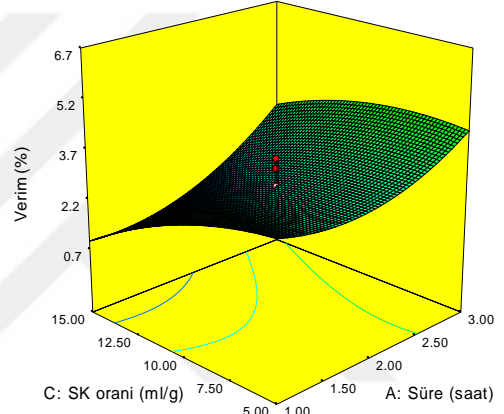
Nar kabuğundan elde edilen pektin veriminin yüksek olması için yapılan optimizasyon çalışmasının sonunda program tarafından önerilen koşullar arasından optimum ekstraksiyon koşulu olarak; 3 saat ekstraksiyon süresi, 8 mL/g SK oranı, pH 1 seçilmiş ve bu koşullar altında yapılan ekstraksiyon sonucunda %5.35 verimle pektin elde edilmiştir (Çizelge 4.6). Önerilen koşullarda program tarafından tahmin edilen verimle deneysel olarak bulunan pektin verimi karşılaştırılmış ve deneysel olarak bulunan pektin verimi tahmin edilen verimden daha düşük çıkmıştır.



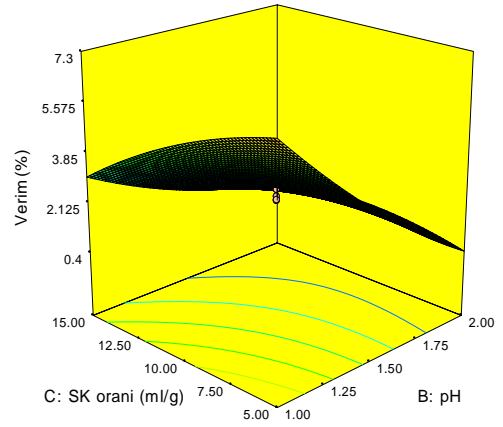
A



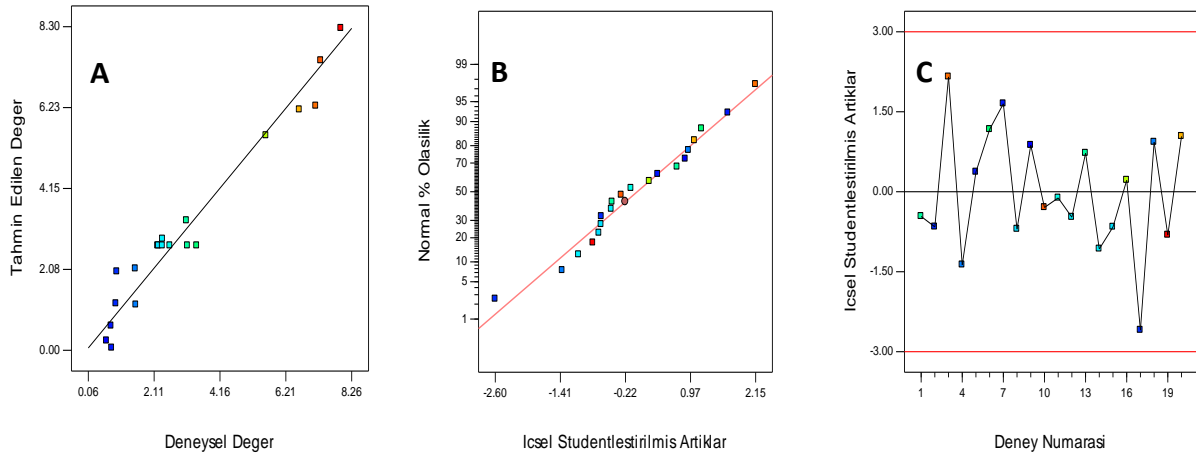
B



C



Şekil 4.3. Yanıt yüzey ve kontur grafikleri (sitrik asit ile ekstraksiyon)



Şekil 4.4. Model yeterliliği grafikleri (sitrik asit ile ekstraksiyon)

Çizelge 4.6. Optimum sitrik asit ekstraksiyon koşullarında elde edilen deneysel ve tahmini pektin verimleri

Süre (saat)	pH	SK oranı (mL/g)	DeneySEL Verim (%)	Tahmin Verim (%)
3	1	8	%5.35±1.04	7.79

Nar kabukları ile yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde; 80°C’de ve 60 dakikada sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinin verimi %6.13 (Güzel ve Akpınar, 2019), bir başka çalışmada ise %3.92 -11.18 arasında bulunmuştur (Pereira ve ark., 2016). Sülfürik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinin verimi ise % 6.4-11 arasında bulunmuştur (Abid ve ark., 2016). Ultrasonik destekli ekstraksiyonda ise pektin verimi %23.87 olarak tespit edilmiştir (Moorthy ve ark., 2016). Organik asitler ile farklı kaynaklardan ekstrakte edilen pektin verimleri incelendiğinde; elma kabuğundan 85°C’de ve 2 saatte %6.2 (tartarik asit), %5.4 (malik asit) ve %5.3 (sitrik asit) verimle (Cho ve ark., 2019), kavun kabuğunda 35-95°C’de ve 30-150 dakikada %2.87-28.98 verimle (Raji ve ark., 2017) pektin elde edilmiştir. Çeşitli meyve atıklarından yapılan çalışmada kivi kabuklarından %8.03, kavun kabuklarından %6.54, nar kabuklarından %6.13, elma kabuklarından %13.30, turunçgil kabuklarından %11.46 (portakal kabukları), %16.45 (limon kabukları), %15.53 (mandalina kabukları), %22.09 (greyfurt kabukları) verimle pektin elde edilmiştir (Güzel ve Akpınar, 2019). Bu çalışmanın sonuçları bulunan pektin veriminin literatürdeki nar kabuğu çalışmalarıyla

karşılaştırıldığında benzer olarak bulunmuştur. Bununla beraber, hammaddedeki farklılıkların ise pektin verimini önemli derecede etkilediği görülmektedir.

4.3. Pektinlerin Kuru Madde, Kül, Toplam Şeker, İndirgen Şeker ve Protein İçerikleri

Enzimatik ve sitrik asit ile optimum koşullarda ekstrakte edilen pektinlerin kuru madde, kül, şeker ve protein içerikleri belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.7’de sunulmuştur. Enzimatik ve sitrik asitle ekstrakte edilen pektinlerin kuru madde içeriği sırasıyla %91.55 ve %69.26, ticari pektinin ise %91.40 olarak tespit edilmiştir. Nar kabuğunda ise kuru madde oranı %67.43 olarak bulunmuştur. Enzimatik olarak elde edilen pektinin ticari pektinine göre kuru madde içeriği benzer iken organik asit ile elde edilen pektinin kuru madde içeriğinden düşüktür. Bu çalışmada nar kabuğunun kül içeriği %5.19 olarak tespit edilmiştir. Sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinin kül içeriği %0.82, enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen pektinin %11.31, ticari pektinin ise %14.48 olarak bulunmuştur. Enzimatik yöntemle ekstrakte edilmiş pektinin ve ticari pektinin kül içeriği %10 un üzerinde iken, organik asit ile ekstrakte edilmiş pektinin kül içeriği ise daha düşüktür. Pektinde kül içeriği elde edildiği kaynağa ve ekstraksiyon yöntemine göre değişmektedir. Sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinlerin kül içerikleri yapılan çalışmalarda %4.73 (ejderha meyvesi) (Muhammad ve ark., 2014), %1.05-12.87 (kivi meyvesi), %1.84 (elma posası) (Johar ve ark., 1960), %0.50 (mandalina kabuğu) (Johar ve ark., 1960), %0.70 (limon kabuğu) (Dang, 1968), %1.08 (elma kabuğu), %1.19 (portakal kabuğu), %1.15 (nar kabuğu), %1.14 (kivi meyvesi) ve %1.35 (kavun kabuğu) olarak bulunmuştur (Güzel ve Akpınar, 2019). Hint incirinden enzimatik olarak üretilen pektinin kül içeriği %8.72 olarak tespit edilmiştir (Bayar ve ark., 2018). Enzimatik ekstraksiyon ile üretilen pektinlerin genel olarak kül içeriği sitrik asitle üretilen pektinden daha fazla olduğu görülmektedir.

Pektinlerin toplam şeker miktarı, enzimatik ekstraksiyon için 0.82 mg/mg, sitrik asit ekstraksiyon için 0.10 mg/mg, ve ticari pektin için 0.47 mg/mg olarak tespit edilmiştir. Protein miktarı enzimatik olarak elde edilen pektinde 0.05 mg/mg, sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektin de 0.02 mg/mg ve ticari pektin de 0.01 mg/mg olarak bulunmuştur. İndirgen şeker miktarı enzimatik olarak elde edilen pektinde 0.10

mg/mg, organik asit ile elde edilen pektin 0.10 mg/mg, ticari pektin de 0.08 mg/mg olarak bulunmuştur. Daha önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde, protein miktarları asit ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen pektin de 2.1 mg/mg (mango kabuğu) (Anderson do ve ark., 2018), enzimatik olarak elde edilen pektinde 0.23 mg/mg (hint inciri meyvesi) (Bayar ve ark., 2018), sub-kritik ekstraksiyon ile elde edilen pektinde 8.6 g/100g-8.1 g/100g (kakao kabuğu) (Muñoz-Almagro ve ark., 2019) olarak bulunmuştur. Toplam şeker miktarı sub-kritik ekstraksiyon ile elde edilen pektinde 58.6 g glikoz/100g -28.9 g glikoz/100g (kakao kabuğu) (Muñoz-Almagro ve ark., 2019) ve enzimatik olarak elde edilen pektinde %1.10-1.21 (altın kivi meyvesi) (Yuliarti ve ark., 2015a) olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışmaya göre nar kabuğundan enzimatik ve organik asit ile elde edilen pektinlerin protein ve şeker miktarı literatüre göre düşük çıkmıştır.

Çizelge 4.7. Pektin örneklerinde kuru madde, kül, toplam şeker, indirgen şeker ve protein miktarları

Pektin	Kuru Madde (%)	Kül (%)	Toplam Şeker (mg/mg)	Protein (mg/mg)	İndirgen Şeker(mg/mg)
Ticari	91.40±0.16 ^a	14.48±0.20 ^a	0.47±0.05 ^b	0.01±0.00 ^c	0.08±0.00 ^b
Enzim	91.55±1.00 ^a	11.31±0.26 ^b	0.82±0.04 ^a	0.05±0.00 ^a	0.10±0.01 ^a
Sitrik Asit	69.26±0.76 ^b	0.82±0.01 ^c	0.10±0.01 ^c	0.02±0.00 ^b	0.10±0.00 ^a

*Her bir değer, 3 paralelin ortalamasıdır. a, b, c Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05)(Kül, toplam şeker, indirgen şeker ve protein miktarları kuru madde bazında verilmiştir)

4.4. Pektinlerin Çözünürlüğü

Polimerizasyon derecesi, metoksil gruplarının sayısı ve dağılımı pektinin suda çözünürlüğünü etkileyen önemli unsurlardır. Molekül ağırlığının azalması, ortam sıcaklığındaki artış çözünürlüğünü artırmaktadır (Thakur ve ark., 1997). Nar kabuklarından enzimatik ve organik asitle optimum koşullarda elde edilen pektinlerin sıcak/soğuk su ve alkali sıcak soğuk su da çözünürlükleri incelenmiş ve sonuçlar ticari pektinin çözünürlüğü ile karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.8). Ticari pektin; soğuk alkali, sıcak alkali, soğuk suda ve sıcak suda çözünürken, enzimatik ekstraksiyonla elde edilen

pektin de soğuk su, sıcak su ve soğuk suda kısmen çözünmüş, sıcak suda tamamen çözünmüştür. Organik asitle elde edilen pektin ise soğuk suda ve soğuk alkalide çözünmemiş, sıcak suda sıcak alkalide kısmen çözünmüştür. Nar kabuğundan sitrik asit ekstraksiyonuyla elde edilen pektinin alkali sudaki çözünürlüğü bakıldığında çözünmüş olarak belirlenmiştir (Güzel, 2017). Yaptığımız çalışmada enzimatik olarak elde edilen pektin soğuk (kısmen) ve sıcak alkali suda çözünürken sitrik asit ile elde edilen pektin soğuk alkali/suda çözünmemektedir.

Çizelge 4.8. Pektinlerin çözünürlüğü

Pektin	Soğuk su	Sıcak Su	Soğuk Alkali	Sıcak Alkali
Ticari	+2	+2	+2	+2
Enzim	+1	+1	+1	+2
Sitrik Asit	0	+1	0	+2

4.5. Pektinlerin Eşdeğer Ağırlığı, Metoksil İçeriği, Galakturonik Asit Anhidronik Asit İçeriği ve Esterleşme Derecesi

Eşdeğer ağırlık enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektinde 391.68 mg, sitrik asit ekstraksiyonla elde edilen pektinde 308.63 mg ve ticari pektin de 684.32 mg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Daha önceki çalışmalar incelendiğinde; misket limonu kabuğundan mineral asit ile elde edilen pektinin eşdeğer ağırlığı 635-699, sitrik asitle elde edilen pektinin eşdeğer ağırlığı 1248-1602, mikrodalga destekli ve mineral asitle elde edilen pektinin eşdeğer ağırlığı 790-794, mikrodalga destekli ve sitrik asitle elde edilen pektinin eşdeğer ağırlığı 1395-2219 olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında üretilen pektinlerin eşdeğer ağırlığı daha düşük bulunmuştur.

Metoksil içeriği pektin sınıflandırılması için önemli bir göstergedir. Yüksek metoksilli pektin %8-11 metoksil içeriğinde %65 ve daha fazla şeker içeriğinde jel oluştururken, düşük metoksilli pektin %7'den az bir metoksil içeriğine sahip olup düşük bir şeker içeriğinde jeller oluşturabilmektedir (Rouse ve ark., 1962). Metoksil içerikleri

enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektinde %11.05, sitrik asit ekstraksiyonla elde edilen pektinde %12.53 ve ticari pektinde ise %5.39 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Enzimatik ve sitrik asit ile elde edilen pektinlerin metoksil içerikleri benzerken, ticari pektinin metoksil içeriği daha düşüktür. Kolza kekiyle enzimatik ekstraksiyon yöntemiyle yapılan çalışmada metoksil içeriği %7.47 olarak bulunmuştur (Jeong ve ark., 2014). Misket limonu kabuğundan asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinlerin metoksil içerikleri sırayla %9.21-9.24 (HCl) %9.78-10.51 (sitrik asit) olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Misket limonu kabuğundan mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen pektinlerin metoksil içerikleri ise sırasıyla %9.15 (HCl), %8.74-9.33 (sitrik asit) olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında üretilen pektinlerin metoksil içeriği daha yüksek bulunmuştur.

Anhidronik asit içeriği, pektinin esterleşmesini, saflığını belirleyen ve pektinin hangi gıda için uygun olduğunu belirlemede önemli bir faktördür (Castillo ve ark., 2014). Bu çalışmada, anhidronik asit içerikleri enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektinde %106.98, sitrik asit ekstraksiyonla elde edilen pektin %116.80 ve ticari pektinde ise %56.33 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Enzimatik ve sitrik asit ile elde edilen pektinlerin anhidronik asit içeriği birbirine yakın ve ticari pektinden daha yüksektir. Daha önceki çalışmalarda; domates kabuklarından ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ve geleneksel ekstraksiyonla yöntemiyle elde edilen pektinlerdeki anhidronik asit içeriği sırasıyla %35.24 ve %31.36-37.55 arasında bulunmuştur (Grassino ve ark., 2016). Elma posası ile asit ekstraksiyonla elde edilen pektinin anhidronik asit içeriği %50.82 olarak bulunmuştur (Sato ve ark., 2011). Literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında üretilen pektinlerin anhidronik asit içeriği daha yüksek bulunmuştur.

Esterleşme derecesi enzimatik ekstraksiyon ile elde edilen pektin için %58.64, sitrik asit ile elde edilen pektin için %60.89 ve ticari pektin için ise %54.32 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9). Meyvelerin olgunlaşma derecesi ve ekstraksiyon yöntemlerinin pektinlerin esterleşme derecesini etkilemektedir. Daha önceki çalışmalarda esterleşme dereceleri kivi pektinleri için %82 ve %90 (Azad ve ark., 2014; Yuliarti ve ark., 2015b), portakal kabuğu pektinleri için %63 ve %75 (Georgiev ve ark., 2012; Venzon ve ark., 2015), limon kabuğu pektini için %55.61 (Georgiev ve ark., 2012) ve greyfurt kabuğu pektini için %56.56-57.54 (Mohamed ve Mohamed, 2015) olarak bildirilmiştir. Misket limonu kabuğundan asit ekstraksiyon ile elde edilen

pektinde esterleşme dereceleri sırayla %70.81-72.81 (HCl) %85.62-87.34 (sitrik asit) olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen pektinde ise esterleşme dereceleri sırayla %77.04-78.49 (HCl) %88.32-91.58 (sitrik asit) olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Çeşitli meyve kabuklarından organik asit ekstraksiyonu elde edilen pektinlerin esterleşme dereceleri, elma kabuğunda %77.62, portakal kabuğunda %69.67, nar kabuğunda %56.74, kivi kabuğunda %84.72 ve kavun kabuğunda %71.98 olarak bildirilmiştir (Güzel ve Akpınar, 2019). Bu çalışmada her iki yöntemle elde edilen pektinin yüksek metoksilli pektin olduğu tespit edilmiştir.

Galakturonik asit içeriği pektin saflık indeksini vermektedir (Liang ve ark., 2012). İncelenen pektinlerin galakturonik asit içerikleri, enzimatik yöntemle elde edilen için %28.08, sitrik asit yöntemiyle elde edilen için %17.38 ve ticari içinde %58.01 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.9). Literatür çalışmaları incelendiğinde, ejderha meyvesinden sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektindeki galakturonik asit içeriği %39.11 (Muhammad ve ark., 2014), Misket limonu kabuğundan elde edilen pektinler de galakturonik asit %91.00-95.93 (HCl) %91.14-95.54 (sitrik asit) olarak bulunmuştur (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Mikrodalga destekli ekstraksiyonla elde edilen pektinler de ise galakturonik asit sırasıyla %79.29-89.86 (HCl) %81.95-85.18 (sitrik asit) bildirilmiştir (Rodsamran ve Sothornvit, 2019). Greyfurt kabuğuyla mikrodalga destekli ekstraksiyon pektinin galakturonik asit içeriği %20.40 olarak bulunmuştur (Taşan, 2018). Çeşitli meyve atıklarından organik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektinlerin galakturonik asit içerikleri, elma kabuğunda %79.78, portakal kabuğunda %76.33, nar kabuğunda %78.48, kivi kabuğunda %94.75 ve kavun kabuğunda %92.97 olarak belirlenmiştir (Güzel ve Akpınar, 2019). Literatür çalışmalarıyla karşılaştırıldığında üretilen pektinlerin galakturonik asit içerikleri bazı çalışmalardan yüksek, bazılarında ise daha düşük bulunmuştur. Hammaddedeki ve ekstraksiyon yöntemindeki farklılıkların buna neden olduğu sonucuna varılmıştır.

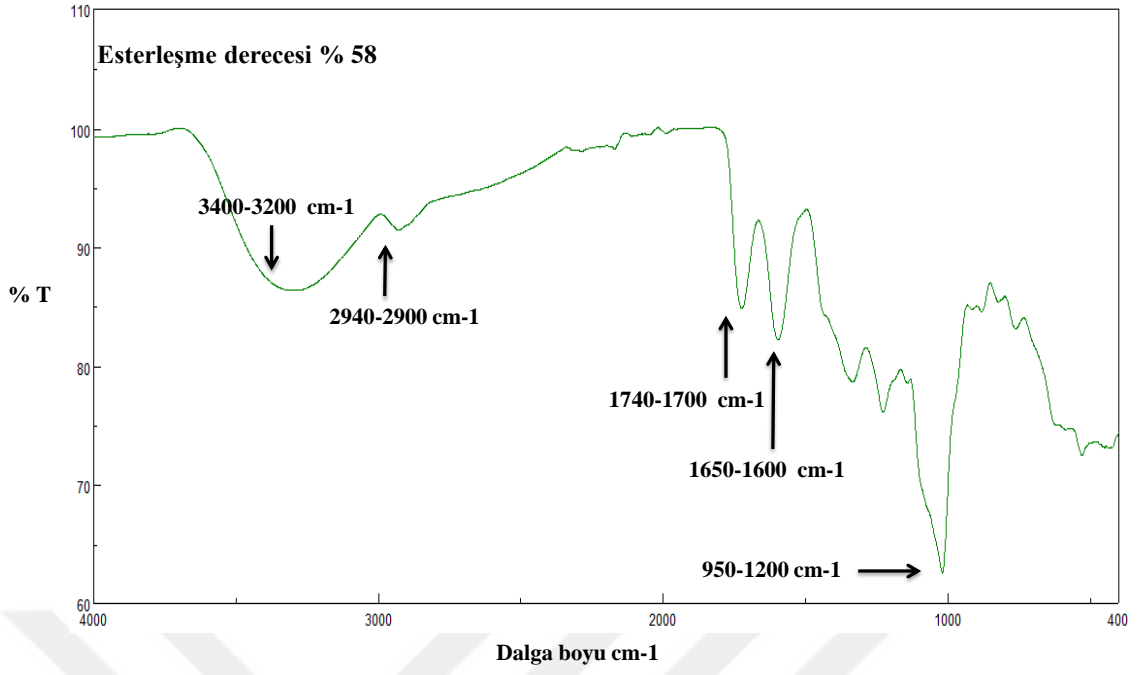
Çizelge 4.9. Pektin örneklerinde eşdeğer ağırlık, metoksil, anhidronik asit, esterleşme ve galaktronik asit miktarları

Pektin	Eşdeğer Ağırlık (mg)	Metoksil (%)	Anhidronik Asit (%)	Esterleşme Derecesi (%)	Galaktronik Asit (%)
Ticari	684.32±15.00 ^a	5.39±0.15 ^c	56.33±0.29 ^c	54.32±1.23 ^c	58.01±8.49 ^a
Enzim	391.68±6.20 ^b	11.05±0.19 ^b	106.98±1.09 ^b	58.64±0.42 ^b	28.08±3.37 ^b
Sitrik Asit	308.62±3.62 ^c	12.53±0.31 ^a	116.80±1.79 ^a	60.89±0.59 ^a	17.38±1.34 ^c

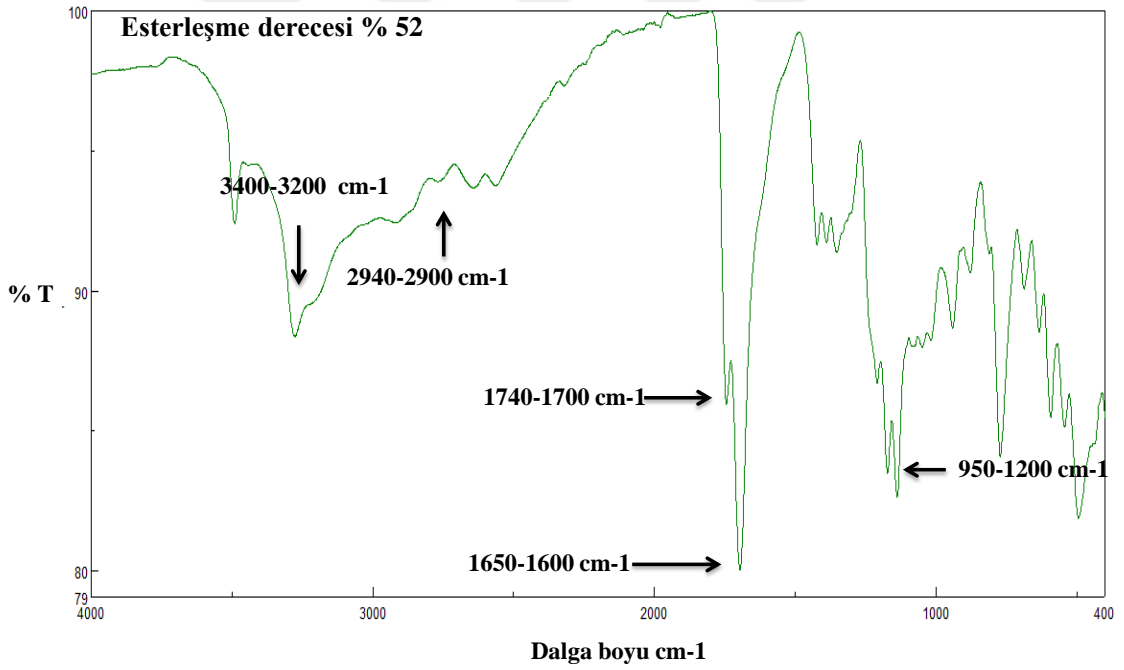
*Her bir değer, 3 paralelin ortalamasıdır. a, b, c Aynı sütunda farklı harflerle işaretlenmiş ortalamalar istatistiki olarak Duncan testine göre birbirinden farklıdır (p<0.05)

4.6. Fourier Transform İnfrared (FTIR) Spektroskopisi

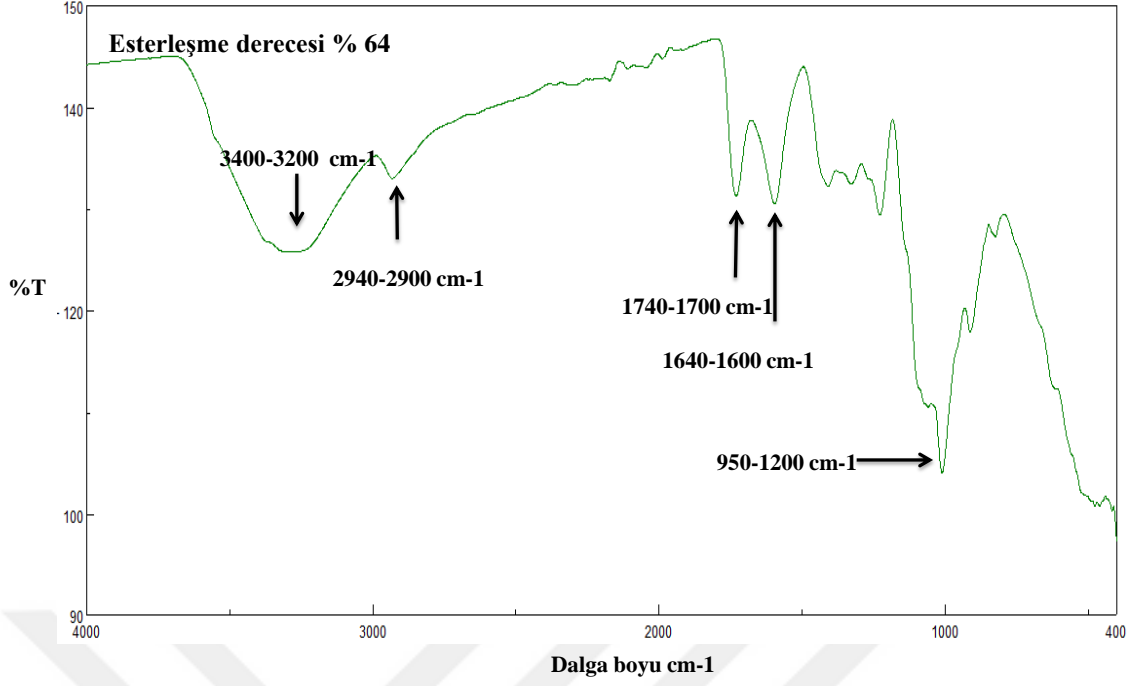
FTIR atomların bağlanma yapısını karakterize etmek için kullanılan bir spektroskopik tekniğidir (Tucureanu ve ark., 2016). Pektinin FTIR spektrumdaki karakteristik pikler 4000-400 cm^{-1} arasında değişmektedir. Yaklaşık 3400-3200 cm^{-1} deki pikler, OH gruplarına ait olup ve OH titreşim bandını göstermektedir. Bunlar polihidroksi grupları için karakteristik zirvelerdir ve çok sayıda OH grubunun varlığını göstergesidir. 2940-2900 cm^{-1} pikler C-H (CH, CH₂ ve CH₃) gerilme bölgesini ifade etmekte ve CH, CH₂ ve CH₃ galakturonik asit metil ester uzantılarına aittir (Tian, ve ark., 2011; Güzel ve Akpınar, 2019). 1500-1800 cm^{-1} deki arasındaki pik pektinin yapısal özelliklerinin incelenmesinde en önemli bölgeler olduğunu pektinin karboksilik asit ve karboksilik ester gruplarının bulunduğu bölgeler olarak bildirmiştir (Chatjigakis ve ark., 1998). 1730 ve 1600 cm^{-1} deki pikler, sırasıyla esterleştirilmiş karboksilik asit gruplarına ve esterlenmemiş karboksilik asit gruplarına karşılık gelmektedir (Singthong ve ark., 2004; Winning ve ark., 2009). Her polisakkarit için özgü "parmak izi" bölgesi, 950-1200 cm^{-1} aralığındaki piklerden oluşmaktadır (Kalapathy ve Proctor, 2001). Her iki yöntemle üretilen pektinin FTIR spektrumları (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6), ticari pektinin FTIR spektruma (Şekil 4.7) benzerdir ve pektin için bildirilen karakteristik piklere sahiptir.



Şekil 4.5. Enzimatik ekstrakte edilmiş pektininin FTIR spektrum



Şekil 4.6. Sitrik asitle ekstrakte edilmiş pektininin FTIR spektrumu



Şekil 4.7. Ticari pektininin FTIR spektrumu

FTIR spektrumlarının 1740 cm^{-1} ve 1630 cm^{-1} 'deki piklerin alanlarına dayanarak, esterleşme dereceleri hesaplanmış ve Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de sunulmuştur. Enzimatik ekstraksiyonla elde edilen pektin, sitrik asit ekstraksiyonu ile elde edilen pektin ve ticari pektinin yüksek ($DE > 50$) esterleşme derecesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Enzimatik (%58.25) ve sitrik asit (%56.84) ekstraksiyonu ile üretilen pektinlerin titrasyon asitliğiyle esterleşme dereceleri yüksek olduğu tespit edilmiştir. FTIR spektrumuna göre enzimatik ve sitrik asit yöntemlerinde yüksek esterleşme derecesine sahip olduğu belirlenmiş ve titrasyon asitliği yöntemiyle bulunan esterleşme dereceleriyle uyumlu bulunmuştur.

5. SONUÇ

Bu çalışmada önemli bir ekonomik değeri olmayan nar kabuklarından, gıda endüstrisi için önemli bir polisakkarit olan pektini elde etmek için enzimatik ekstraksiyon ve sitrik asit ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış, ekstraksiyon koşulları optimize edilmiş ve elde edilen pektinlerin özellikleri karşılaştırılmıştır. Sitrik asit ile pektin ekstraksiyonu için optimum koşullar pH 1, sıvı katı oranı 8 mL/g ve ekstraksiyon süresi 3 saat olarak belirlenmiş ve pektin verimi %5.35 olarak bulunmuştur. Enzimatik pektin ekstraksiyon için optimum koşullar 0.075 U/mL enzim konsantrasyonu, 9.99 g nar/100 mL substrat konsantrasyonu ve 2.58 saat ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiş ve pektin verimi de %7.19 olarak bulunmuştur. Her iki yöntemle elde edilen pektininin yüksek metoksilli pektin olduğu bulunmuştur Enzimatik ekstraksiyon yöntemi, organik asit yöntemine kıyasla verimi ve esterleşme derecesi daha yüksek ve çözünürlüğü daha iyi olan pektin elde edilmesini sağlamıştır. Enzimler selülozu hidroliz ederek selüloz matrisinde sıkışık kalmış pektin ekstraksiyonunu gerçekleştirmekte ve verimin de daha yüksek olmasını sağlamaktadır. Ayrıca enzimatik pektin ekstraksiyon yöntemi diğer yöntemlere kıyasla asidik çözelti gereksinimini ortadan kaldırarak, daha düşük sıcaklıklarda ekstraksiyon işlemini daha ılımlı koşullarda ve daha kısa sürede gerçekleştirmiştir.

Gıda endüstri atığı olarak ortaya çıkan nar kabuğu birçok önemli biyoaktif bileşen içermekte ve bu çalışma ile de pektin üretiminde de kullanılabilceği gösterilmiştir. Enzimatik pektin ekstraksiyon yöntemi ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır ve bu çalışma nar kabuklarından enzimatik yöntemle pektin ekstraksiyonunu gerçekleştirerek literatürdeki boşlukları doldurmuştur. Ayrıca çalışma sonuçları ilerde yapılacak olan araştırmalara altyapı olabilme ve üretilen pektin yüksek metoksilli bir pektin olmasından dolayı gıda ve gıda dışı endüstrilerde jelleştirici, emülgatör ve kıvam artırıcı olarak biyoyumlu ve biyobozunur bir polimer olarak kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

6. KAYNAKLAR

- Abid, M., Renard C. M.G.C., Watrelot A.A., Fendri I., Attia H., ve Ayadi, M.A., 2016. Yield and composition of pectin extracted from Tunisian pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 186-194.
- Abid, M., Cheikhrouhou S., Renard C.M., Bureau S., Cuvelier G. ve Attia H., 2017. Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry*, 215, 318-325.
- Acharya, S. ve Chaudhary A., 2012. Optimization of fermentation conditions for cellulases production by *Bacillus licheniformis* MVS1 and *Bacillus* sp. MVS3 isolated from Indian hot spring. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55 (4), 497-503.
- Acosta-Estrada, B.A., Gutiérrez-Urbe J.A. ve Serna-Saldívar S.O., 2014. Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- Açıkgöz, Ç., ve Poyraz, Z., 2006. Ayva meyvesinden (*cydonia vulgaris pers.*) pektin ekstraksiyonu ve kimyasal karakterizasyonu. *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 12, 27-34.
- Adetunji, L.R., Adekunle A., Orsat V. ve Raghavan V., 2016. Advances in pectin production proses using novel extraction techniques. *Food Hydrocolloids*, 73, 273-280.
- Adetunji, L.R., Adekunle A., Orsat V. ve Raghavan V., 2017. Advances in pectin production proses using novel extraction techniques. *Food Hydrocolloids*, 62, 239-250.
- Aina, A.O., Mustapha M., Barau O.A., Mamman Amina Z., Hauwa H., M.S.U. ve Yagana B. A., 2012. Extraction and characterization of pectin from peels of lemon, grape fruit and sweet orange. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 3 (6), 259-262.
- Anderson do N.O., Daniele de A.P., Eduardo Basílio de O., Sérgio H.S., Paulo C.S. ve Paulo M.R., 2018. Optimization of pectin extraction from Ubá mango peel through surface response methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 395-402.
- Anesini, C. ve Perez, C., 1993. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 39 (2), 119-128.
- Anonim, 2001. International Pectin Producers Association. 2001. www.ippa.info [Ziyaret tarihi:16 Ocak 2016].
- AOAC., 1989. Official Methods of Analysis, 14th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA.
- Arslan, N., 1994, Pektinin fizikokimyasal özellikleri, üretimi ve gıdalarda kullanımı. *Akademik Gıda*, 19 (3), 11-20.
- Atalay, D., Türken T. ve Erge H.S., 2018. Pektin; kaynakları ve ekstraksiyon yöntemleri. *The Journal of Food*, 43 (6), 1002-1018.
- Arthey, D., Ashurst, P.R., 1998. Fruit Processing. Blackie A&P, 248 p, London.
- Axelos, M.A.V. ve Thibault J.F., 1991. The chemistry of low-methoxyl pectin gelation. *The Chemistry and Thecnology of Pectins*, In Walter, R.H.(ed.). California Academic Press, San Diego, 17, 109-118.

- Azad, A.K.M., Ali M.A., Sorifa-Akter M., Jiaur M.R. ve Ahmed M., 2014. Isolation and characterization of pectin extracted from lemon pomace during ripening. *Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2 (2), 30-35.
- Azmir, J., Zaidul I.S.M., Rahman M.M., Sharif K.M., Mohamed A. ve Sahena F., 2013. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436
- Bahtiyari, M., 2005. Selülazların Etki Mekanizmaları, Viskos Kumaşlarda Farklı Tip Enzimlerle Piling Probleminin Önlenmesi ve Elde Edilen Efektlerin Karşılaştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi, Tekstil Mühendisliği Bölümü, İzmir.
- Baker, R.A., 1997. Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *Journal of Food Science*, 62 (2), 225-229.
- Barba, F. J., Brianceau S., Turk M., Boussetta N. ve Vorobiev E., 2015. Effect of alternative physical treatments (ultrasounds, pulsed electric fields, and high-voltage electrical discharges) on selective recovery of biocompounds from fermented grape pomace. *Food and Bioprocess Technology*, 8 (5), 1139-1148.
- Barrow, H., Rhodes, J.M. ve Yu L.G., 2011. The role of galectins in colorectal cancer progression. *International Journal of Cancer*, 129 (1), 1-8.
- Baş, C., 2010. Cevap yüzeyi tasarımları ve sinir ağları yaklaşımı.(Doktora Tezi), Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bayar, N., Friji M. ve Kammoun R., 2018. Optimization of enzymatic extraction of pectin from *Opuntia ficus indica cladodes* after mucilage removal. *Food Chemistry*, 241, 127-134.
- Beguin, P., 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Reviews in Microbiology*, 44 (1), 219-248.
- Bozok, O., 1971. Şeker Teknolojisi, Türkiye Şeker Fab. A.Ş. Yayınları.Sayı, 168.
- Bouras, M., Chadni M., Barba F.J., Grimi N., Bals O. ve Vorobiev E., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Industrial Crops and Products*, 77, 590-601.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braconnot, H., 1825. Recherches sur un nouvel acide univèrellement rependu dans tous les vegetaux *Annales de Chimie et de Physique*, 2, 173-178
- Brunner, G., 2009. Near critical and supercritical water Part I. Hydrolytic and hydrothermal processes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47 (3), 373-381.
- Buggenhout, S. V., Sila D.N., Duvetter T., Loey A.V. ve Hendrickx M., 2009. Pectins in processed fruits and vegetables: part III-texture engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 105-117.
- Büyüktuncel, E., 2013. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, Cilt 38,Sayı 2, 209-242.
- Carpita, N., ve McCann M.C., 2000. In *Biochemistry ve Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists Ed: Buchanan, B., Gruissel, W., Jones, R., Rockville, MD, 52-108 p.
- Castillo-Israel, K.A.T., Baguio S. F., Diasanta M.D.B., Lizardo R.C.M., Dizon E.I. ve Mejico M.I.F., 2014. Extraction and characterization of pectin from Saba banana [*Musa 'saba (Musa acuminata x Musa balbisiana)*] peel wastes: A preliminary study. Food Science Cluster, College of Agriculture, University of the Philippines Los Baños, Laguna, Philippines.

- Chan, S.Y. ve Choo, W.S., 2013. Effect of extraction conditions on the yield and chemical properties of pectin from cocoa husks. *Food Chemistry*, 141 (4), 3752-3758.
- Chemat, F., Tomao V. ve Viot M., 2008. Ultrasound-assisted extraction in food analysis. *Hand book of food analysis instruments*, CRC Press.
- Chemat, F., Rombaut N., Meullemiestre A., Turk M., Perino S., Fabiano-Tixier A.S. ve AbertVian M., 2017. Review of Green Food Processing techniques: Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 41, 357-377.
- Chen, T.S., ve Joslyn M.A., 1967. The Effect of sugars on viscosity of pectin solutions 11. comparison of dextrose, maltose an dextrin. *Journal Colloid Interface Science*, 25, 346-352.
- Chen, S.T., Chen S.Y., Hsiao S.C. ve Wang, K.T., 1991. Kinetic resolution of N-protected amino acid esters in organic solvents catalysed by a stable industrial alkaline protease. *Biotechnology Letter*, 13, 773-778.
- Chen, S.T., Kao C.L. ve Wang K.T., 1995. Alkaline protease catalysis of a secondary amine to form a peptide bond *Annales de Chimie et de Physique*, 46, 314-319.
- Chen, J., Liu W., Li T., Luo S.J. ve ark., 2015. Pectin Modifications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1684-1698.
- Chen,H., Fu X. ve Luo Z., 2015a. Properties and extraction of pectin-enriched materials from sugar beet pulp by ultrasonic-assisted treatment combined with subcritical water. *Food Chemistry*, 168, 302-310
- Chen, Q., Hu Z., Yao F.Y.D. ve Liang, H., 2016. Study of two-stage microwave extraction of essential oil and pectin from pomelo peels. *LWT-Food Sci Technology*, 66, 538-545.
- Chatjigakis A.K., Pappas C., Proxenia N., Kalantz O., Rodis P. ve Polissiou M., 1998. FT-IR spectroscopic determination of the degree of esterification of cell wall pectins from stored peaches and correlation to textural changes. *Carbohydrate Polymers*, 37, 395-408.
- Cho, E.H., Jung H.K., Lee B.H., Kim H.S., Rhee J.K.ve Yoo S.H., 2019. Green process development for apple peel pectin production by organic acid extraction. *Carbohydrate Polymers*, 204, 97-103.
- Cemeroğlu, B., 2007. Gıda analizleri. *Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları*, 34, 168-171.
- Corredig, M. ve Wicker L., 2001. Changes in the molecular weight distribution of three commercial pectins after valve homogenization. *Food Hydrocolloids*, 15 (1), 17-23.
- Coseri, S., 2017. Cellulose: To depolymerize or not to. *Biotechnology Advances*, 35 (2), 251-266.
- Çambay, Z., 2011. Diyabetik sıçanlarda nar (*punica granatum*) çiçeğinin serumdaki aspartat aminotransferaz ve alanin aminotransferaz düzeylerine etkilerinin araştırılması. *Ecological Life Sciences*, 6 (4), 124-133.
- Çelik, S.Y., 2007. Meyve Suyu Üretiminde Kullanım Amaçlı Pektin Liyaz Üreten Yeni Mikroorganizmaların Aranması ve Bulunan Türlerde Enzimin Saflaştırılıp Karakterize Edilmesi.(Doktora tezi) Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 125 s, Erzurum.
- Dang, V., Decker K. ve Sund H., 1968. Purification and properties of l-6 hydroxynicotine oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 4 (1), 95-102.
- Dehghan-Shoar, Z., Hardacre A.K., Meerdink G. ve Brennan C.S., 2011. Lycopene extraction from extruded products containing tomato skin. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (2), 365-371.

- Değirmencioğlu, A. ve Yazgı A., 2006. Tepki Yüzeyleri Metodolojisi" Optimizasyon Esaslı Çalışmalara İlişkin Teorik Esaslar ve Tarımsal Mekanizasyon Uygulamaları". Tarım Makinaları Bilimi Dergisi, 2 (2), 111-115.
- Deka, D., Bhargavi P., Sharma A., Goyal D., Jawed M. ve Goyal A., 2011. Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. *Enzyme research*, 56, 15-16.
- Demir, T., Akpınar Ö., Kara H. ve Güngör H., 2019. Nar (*Punica granatum L.*) kabuğunun in vitro antidiyabetik, antiinflamatuvar, sitotoksik, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. *Akademik Gıda*, 17 (1), 61-71.
- Deng, Q., Zinoviadou K.G., Galanakis C.M., Orlien V., Grimi N., Vorobiev E., ve ark., 2015. The effects of conventional and non-conventional processing on glucosinolates and its derived forms, isothiocyanates: Extraction, degradation, and applications. *Food Engineering Reviews*, 7, 357-381.
- DeVries J.A.M., Hansen J., Søderberg P.E. ve Glahn J.K., 1986. Distribution of methoxyl groups in pectins. *Carbohydrate Polymers*, 6, 165-176.
- Dominiak, M., Søndergaard, K.M., Wichmann J., Vidal-Melgosa S., Willats W.G., Meyer A.S., ve Mikkelsen J.D., 2014. Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloids*, 40, 273-282.
- Dominiak, M., Søndergaard K.M., Wichmann J., Vidal-melgosa S., Willats W.G.T., Meyer A.S. ve Mikkelsen, J.D., 2014a. Application of enzymes for efficient extraction, modification, and development of functional properties of lime pectin. *Food Hydrocolloid*, 40, 273-282.
- Dongowski, G. ve Lorenz A., 2004. Intestinal steroids in rats are influenced by the structural parameters of pectin. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (4), 196-205.
- Dixon, D.W., 2008. Characterization of Commerical Pectin Preparations by Spectroscopic and Chromatographic Techniques Master Thesis. East Tennessee State University, USA.
- Dubois, M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. ve Smith F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350-356.
- Eliaz, I., Hotchkiss A.T., Fishman M.L. ve Rode D., 2006. The effect of modified citrus pectin on urinary excretion of toxic elements. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20 (10), 859-864.
- Evranuz, Ö., 1985. Ayçiçeği tablalarından Pektin Eldesinde Pektin Kalitesini Etkileyen Faktörler ve Konu ile İlgili Teknolojik Öneriler. (Doktora Tezi) İ.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Eveleigh, D.E., 1987. Cellulase: a perspective *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Mathematical and Physical Sciences*, 321 (1561), 435-447.
- Fayez, M.B.E., Negm S.A.R. ve Sharaf A., 1963. Constituents of local plants. *Planta Medica*, 11 (04), 439-443.
- Fissore, E.N., Ponce N.M., Wider E.A., Stortz C.A., Gerschenson L.N. ve Rojas A.M., 2009. Commercial cell wall hydrolytic enzymes for producing pectin-enriched products from butternut (*Cucurbita moschata*, *Duchesne ex Poiret*). *Journal of Food Engineering*, 93 (3), 293-301.

- Florentina P., Sudhir G.W. ve Chidambaram R., 2018. Extraction optimization of pectin from cocoa pod husks (*Theobroma cacao* L.) with ascorbic acid using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, 202, 497-503.
- Fishman, M. L., Pferffer P. E., Barford R. A. ve Donar K.W. 1984. Studies of pectin solution properties by high performance exclusion chromatography. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 32 (2), 372-378.
- Freitas de Oliveira, C., Giordani D., Lutckemier R., Gurak P.D., Cladera-Olivera F.ve Ferreira Marczak L.D., 2016. Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *LWT-Food Sci Technol*, 71, 110-115.
- Garna, H., Mabon N., Robert C., Cornet C., Nott K. ve Legros H., 2010. Effect of extraction conditions on the yield and purity of apple pomace pectin precipitated but not washed by alcohol. *Journal of Food Science*, 72 (1), 1-9.
- Gentilini, R., Bozzini S., Munarin F., Petrini P., Visai L. ve Tanzi M.C., 2014. Pectins from Aloe Vera: Extraction and production of gels for regenerative medicine. *Journal of Applied Polymer Science*, 131, 2-6.
- Georgiev, Y., Ognyanov M., Yanakieva I., Kussovski V. ve Kratchanova M., 2012. Isolation, characterization and modification of citrus pectins. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 1 (3), 223-233.
- Glickman, M., 1969. *Gum Technology in the Food Industry*, Academic Press, New York.
- Graham, H.D., 1977. *Food Colloids*. Avi. Publishing. Company Inc. Westport., 588s, Connecticut.
- Grassino, A.N., Brnčić M., Vikić-Topić D., Roca S., Dent, M. ve Rimac Brnčić S. 2016. Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93-100.
- Grassino, A.N., Brnčić M., Vikić-Topić D., Roca S., Dent M.ve Brnčić S.R. 2016a. Ultrasound assisted extraction and characterization of pectin from tomato waste. *Food Chemistry*, 198, 93-100.
- Guo, X., Zhao W., Pang X., Liao X., Hu X. ve Wu J., 2013. Emulsion stabilizing properties of pectins extracted by high hydrostatic pressure, high-speed shearing homogenization and traditional thermal methods: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 35, 217-225.
- Gündoğdu M., 2006. Pervari (Siirt) yöresi nar (*Punica granatum* L.) populasyonlarında mahalli tiplerin seleksiyonu. (Yüksek Lisans Tezi). Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Gündoğdu, M., Muradoğlu F., Gazioglu Sensoy R.I. ve Yılmaz H., 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L. *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae*, 132, 37-41.
- Güner, K. G. ve Dağlıoğlu O., 2008. Ksilanaz enziminin ekmek yapımında kullanımı. Türkiye 10. Gıda Kongresi, 21-23 Mayıs, 2008, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Güzel, 2017. Meyve Ve Sebze Atıklarından Polisakkarit Ve Fitokimyasal Maddelerin Üretimi. (Doktora Tezi). Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Tokat.
- Güzel M. ve Akpınar Ö., 2017. Turunçgil kabuklarından elde edilen pektinlerin karakterizasyonu ve karşılaştırılması, *Akademik Gıda*, 15 (1), 17-28.
- Güzel M. ve Akpınar Ö., 2019. Valorisation of fruit by-products: Production characterization of pectins from fruit peels. *Food and Bioproducts Processing*, 115, 126-133.

- Hammed, A.M., Jaswir I., Amid A., Alam Z., Asiyani-H T.T. and Ramli N., 2013. Enzymatic hydrolysis of plants and algae for extraction of bioactive compounds. *Food Reviews International*, 29 (4), 352-370.
- Heerd, D., Yegin S., Tari C. ve Fernandez-Lahore M., 2012. Pectinase enzyme-complex production by *Aspergillus spp.* In solid state fermentation: A comparative study. *Food Bioprod Process*, 90 (2), 102-110.
- Henrissat B., ve Bairoch A. 1996. "Updating the sequence-based classification of glycosyl hidrolases". *Biochem Journal*, 316, 695-696.
- Herbstreith ve Fox Corporate Group, 2013a. The Specialists for Pectin. http://www.herbstreith-fox.de/fileadmin/tmp/pdf/broschueren/The_Specialists_for_Pectin.pdf, 25.01.2013.
- Herbstreith ve Fox Corporate Group, 2013b. Confectionary Gum and Jelly Products. http://www.herbstreith-fox.de/fileadmin/tmp_1/pdf/broschueren/Suesswaren_englisch.pdf, 25.01.2013.
- Herbstreith ve Fox Corporate Group, 2013c. Yoghurt Fruit Preparations. <http://www.herbstreith-fox.de/fileadmin/tmp/pdf/>, 25.01.2013.
- Herp, A., Rickards T., Jakosalem L.B. ve Matsumura G., 1967. Depolymerization of Polysaccharides and Synthetic Polymers by L- Ascorbic Acid, *Carbohydrate Research*, 4, 63-71.
- Hirose, N., Kishida M., Kawasaki H. ve Sakai T., 1999. Purification and characterisation of an endo-polygalacturonase from a mutant of *accharomyces cerevisia*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63 (6), 1100-1113.
- Hosseini, S.S., Khodaiyan, F. ve Yarmand M.S., 2016a. Aqueous extraction of pectin from sour orange peel and its preliminary physicochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 82, 920-926.
- Hosseini, S., Khodaiyan F. ve Yarmand M., 2016b. Optimization of microwave assisted extraction of pectin from sourorange peel and its physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 140, 59-65.
- Hosseini, S.S., Khodaiyan F., Kazemi M. ve Najari Z., 2019. Optimization and characterization of pectin extracted from sour orange peel by ultrasound assisted method. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 621-629.
- Ibrahim, A.S.S. ve Ahmed I.E.D., 2007. Isolation and identification of new cellulases producing thermophilic bacteria from an Egyptian hot spring and some properties of the crude enzyme. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1 (4), 473-478.
- Ito, S., 1997. Alkaline cellulases from alkaliphilic *Bacillus* enzymatic properties, genetics, and application to detergents. *Extremophiles*, 1, 61-66.
- Jacob, N. ve Prema, P., 2006. Influence of mode of fermentation on production of polygalacturonase by a novel strain of *streptomyces lydicus*. *Food Technology and Biotechnology*, 44 (2).
- Jafari, F., Khodaiyan F., Kiani H. ve Hosseini S.S., 2017. Pectin from carrot pomace: Optimization of extraction and physicochemical properties. *Carbohydr Polymers*, 157, 1315-1322.
- Jeong, H.S., Kim H.Y., Ahn S.H., Oh S.C., Yang I. ve Choi I.G., 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions for extraction of pectin from rapeseed cake (*Brassica napus L.*) using commercial enzymes. *Food Chemistry*, 157, 332-338.
- Joslyn, M.N., 1980. *Methods of Food Analysis, Physical Chemical and Instrumentation Method of Analysis* (2nd ed.), Academic Press, New York, 5, 67-70.
- Johar, D.S., Krishnamurthy G.V. ve Bhatia B.S., 1960. Utilization of apple pomace. *Food Science*, 9 (3), 82-84.

- Kalapathy, U. ve Proctor A., 2001. Effect of acid extraction and alcohol precipitation conditions on the yield and purity of soy hull pectin. *Food Chemistry*, 73 (4), 393-396.
- Kai, P., Yan Z., Sijin W., Xiaojun L. ve Xiaosong H. 2008. Effect of microwave drying pretreatment on extraction of pectin from apple pomace. *International Food Research Journal* 24 (6), 2402-2407
- Kar, F. ve Arslan, N., 1999. Characterization of orange peel pectin and effect of sugars, l-ascorbic acid, ammonium persulfate, salts on viscosity of orange peel pectin solutions. *Carbohydrate Polymers*, 40, 285-291.
- Kastner, H., Einhorn-Stoll U. ve Senge B., 2012. Structure Formation in Sugar Containing Pectin Gels-Influence of Ca^{+2} on the Gelation of Lowmethoxylated Pectin at Acidic pH. *Food Hydrocolloids*, 27, 42-49.
- Kazemi, M., Khodaiyan F., Labbaf M. ve Hosseini S.S., 2019. Pistachio green hull pectin: Optimization of microwave-assisted extraction and evaluation of its physicochemical, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 271, 663-672.
- Khajavi, S.H., Kimura Y., Oomori T., Matsuno R. ve Adachi S., 2005. Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 68 (3), 309-313.
- Khatib, M., Giuliani, C., Rossi F., Adessi A., Al-Tamimi A. ve Mazzola, G., 2017. Polysaccharides from by-products of the Wonderful and Laffan pomegranate varieties: New insight into extraction and characterization. *Food Chemistry*, 235, 58-66
- Khajavi, S.H., Kimura Y., Oomori T., Matsuno R. ve Adachi S., 2005. Degradation kinetics of monosaccharides in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 68 (3), 309-313.
- Kirk-Othmer, 1967. Pectic Substances. *Encyclopedia of Chemical Technology*, 14, 636-651.
- Kliemann, E., Simas, K.N., Amante E.R., Prudencio E.S., Teofilo R.F., Ferreira M.C. ve Renata Amboni D.M.C., 2009. Optimisation of pectin acid extractioz from passion fruit peel (*Passiflora edulis* flavicarpa) using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (3), 476-483.
- Klavons, J.A., ve Benett R.D., 1986. Determination of Methanol Using Alcohol Oxidase and its Application to Methyl Ester Content of Pectic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 597-599.
- Koç B. ve Ertekin F.K., 2009. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Bornova, İzmir.
- Košťálová, Z., Aguedo M. ve Hromádková Z., 2016. Microwave-assisted extraction of peçtin from unutilized pumpkin biomass. *Process Intensif*, 102, 9-15.
- Körlü, A.E., Duran K., Bahtiyari M.İ. ve Perinçek S., 2008. Selülaz Enziminin Selülozik Esaslı Kumaşlar Üzerine Etkisi. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 18 (1), 35-41.
- Kratchanova, M., Panchev I., Pavlova E. ve Shtereva L., 1994. Extraction of peçtin from fruit materials pretreated in an electromagnetic field of super-high frequency. *Carbohydrate Polymers*, 25 (3), 141-144.
- Kujawski, M. ve Tuszyński T., 1987. A Comparison of Some Methods for the Determination of Methanol Groups in Commercial Pectin Preparation. *Die Nabrung*, 31 (3), 233-238.

- Kumar, A. ve Chauhan G. S., 2010. Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (*steapsin*) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82, 454-459.
- Lah, N.T., Rahman N.B. ve Nama M.B., 2012. Cellulase activity and glucose production by *Bacillus Cereus* monoculture and coculture utilizing palm kernel cake (PKC) under solid state fermentation. *Energy and Biotechnology*, 33, 172-177.
- Lansky, E., Shubert S ve Neeman I., 1998. Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. I. International Symposium of Pomegranate. 15-17 October. Orihuela (Alicante) Spain.
- Lattimer, J.M. ve Houlo M.D., 2010. Effect of Dietary Fiber and its Components on Metabolic Health. *Nutrients*, 2, 1266-1289.
- Lefsih, K., Giacomazza, D., Dahmoune F., Mangione M.R., Bulone D., Biagio P.S.L., Costa M., Guarrasi V. ve Madani K., 2017. Pectin from *Opuntia ficus indica*: Optimization of microwave-assisted extraction and preliminary characterization. *Food Chemistry*, 221, 91-99.
- Liang, R.H., Chen J., Liu W., Liu C.M., Yu W., Yuan M. ve Zhou X.Q., 2012. Extraction, characterization and spontaneous gel-forming property of pectin from creeping fig (*ficus pumila* linn.) seeds. *Carbohydrate Polymers*, 87, 76- 83.
- Liew, S.Q., Chin N.L., Yusof Y.A. ve Sowndhararajan K., 2015. Comparison of acidic and enzymatic pectin extraction from passion fruit peels and its gel properties. *Journal of Food Process Engineering*, 39 (5), 501-511.
- Liew, S.Q., Teoh W.H., Tan C.K., Yusoff R. ve NgohnG.C., 2018. Subcritical water extraction of low methoxyl pectin from pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116,128-135.
- Lin, L., Kan X., Yan H. ve Wang, D., 2012. Characterization of extracellular cellulose-degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electronic Journal of Biotechnology*, 15 (3), 2-2.
- Liu, L., Jiang T. ve Yao J., 2011. A two-step chemical process for the extraction of cellulose fiber and pectin from mulberry branch bark efficiently. *Journal of Polymers and the Environment*, 19 (3), 568-573.
- Lopes da Silva J.A. ve Rao M.A., 2006. Pectins: Structure, Functionality, and Uses. In A. M. Stephen, G. O. Phillips, & P. A. Williams (Eds.), *Food polysaccharides and their applications* (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC/Taylor & Francis.
- Lotzkar, H., Schultz, T.H., Owens, H.S. ve MacLay, W.D., 1946. Effects of salts on the viscosity of pectinic acid solution. *Journal Phys. Chemistry*, 50, 200.
- Luque-Garcı, J.L. ve Luque de Castro M.D., 2003. Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (1), 41-47.
- May, C.D., 1990. Industrial pectins: Sources. production and applications. *Carbohydrate Polymers*, 12, 79-99.
- Matia-Merino, L., Lau K. ve Dickinson E., 2004. Effects of Low-methoxyl amidated pectin and ionic calcium on rheology and microstructure of acidinduced sodium caseinate gels. *Food Hydrocolloids*, 18, 271-281.
- Maran, J.P., Sivakumar V., Thirugnanasambandham K. ve Sridhar R., 2014. Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*, 101, 786-791.
- Maran, J.P. ve Priya B., 2015. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 115 (0), 732-738.
- Marić, M., Grassino, A.N., Zhu Z., Barba F.J., Brnčić M. ve Rimac Brnčić S., 2018. An overview of the traditional and innovative approaches for pectin extraction from

- plant food wastes and byproducts: Ultrasound, microwaves and enzyme-assisted extraction. *Trends Food Sci Technology*, 76, 28- 37.
- Martínez Ávila, G.C.G, Muñiz Márquez D.B, Wong Paz J.E., Belmares Cerda R.E. ve Aguilar C.N., 2016. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 474-481.
- Mavlyanov S.M., Islambekov S.Y., Karimdzhanov A.K. ve Ismailov A.I., 1997. Polyphenols of pomegranate peels show marked antitumor and antiviral action. *Khim Prir Soedin*, 33, 124-126.
- Mccomb, E.A., ve Mcready R.M., 1957. Determination of Acetyl in Pectin and in Acetylated Carbohydrate Polymers *Analytical Chemistry*, 29 (5), 819-821.
- Mcready, R.M., ve ark., 1951. Determination of citrus pectic substances by optical rotation. *Analytical Chemistry*, 23, 975-977.
- Mcready, R.M., ve ark., 1966. Polysaccharides of sugar beet pulp , review of their chemistry. *Journal American Sugar Beet Technology*, 14.
- Melton, L.D. ve Smith B.G., 2001. Determination of the uronic acid content of the plant cell walls using a colorimetric assay. *Current Protocols Current in Food Analytical Chemistry*, 3.(3), 1-6.
- Mesbahı, G., Jamaliana J. ve Farahnaky A., 2005. A Comparative Study on Functional Properties of Beet and Citrus Pectins in Food Systems. *Food Hydrocolloids*, 19, 731-738.
- Michel, F., Thibault J.F., Mercier C., Heitz F. ve Pouillaude F. 1985. Extraction and characterization of pectins from sugar beet pulp. *Journal of Food Science*, 50 (5), 1499-1500.
- Milad, K., Khodaiyan F. ve Hosseini S.S., 2019. Eggplant peel as a high potential source of high methylated pectin: Ultrasonic extraction optimization and characterization. *LWT-Food Science and Technology*, 105, 182-189.
- Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428.
- Min, B., Lim, J., Ko S., Lee K.G., Lee S.H. ve Lee S., 2011. Environmentally friendly preparation of pectins from agricultural byproducts and their structural/rheological characterization. *Biosource Technology*, 102, 3855-3860.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia A., Garau M.C., Meza-Velázquez J.A., Simal S. ve Rosselló C., 2014. Ultrasound-assisted extraction of pectins from grape pomace using citric acid: A response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers*, 106, 179-189.
- Mishra, B.K., ve Pandey Lata A.K., 2007. Lignocellulolytic enzyme production from submerged fermentation of paddy straw. *Indian Journal of Microbiology*, 47 (2), 176-179.
- Misra, N.N., Martynenko A., Chemat, F., Paniwnyk L., Barba F.J. ve Jambrak A.R. 2018. Thermodynamics, transport phenomena, and electrochemistry of external field-assisted nonthermal food technologies. *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*, 58 (11), 1832-1863.
- Miyamoto, A. ve Chang K. C., 1992. Extraction and physicochemical characterization of pectin from sunflower head residues. *Journal of Food Science*, 57 (6), 1439-1443.
- Mohamed, H.A. ve Mohamed B.E.W., 2015. Fractionation and physicochemical properties of pectic substances extracted from grapefruit peels. *Journal Food Process Technology*, 6, 473.

- Moorthy, I.G., Maran J.P., Surya S.M., Naganyashree S. ve Shivamathi C.S., 2015. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromoles*, 72, 1323-1328.
- Moorthy, I.G., Maran, J.P., Surya S.M., Naganyashree S. ve Shivamathi C.S., 2015. Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromoles*, 72, 1323-1328.
- Muhammad, K., Zahari M.N.I., Gannasin S.P., Adzahan N.M. ve Bakar J., 2014. High methoxyl pectin from dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) peel. *Food Hydrocolloid*, 42, 289-297.
- Mukhiddinov, Z.K, Khalikov F.T., Abdusamiev C.C. ve Avloev D.K., 2000. Isolation and structural characterization of a pectin homo and rhamnogalacturonan. *Talanta*, 53, 171-176.
- Muñoz-Almagro, N., Valadez-Carmona L., A. Mendiola J., Ibáñez E. ve Villamiel M., 2019. Structural characterisation of pectin obtained from cacao pod husk. Comparison of conventional and subcritical water extraction. *Carbohydrate Polymers*, 217, 69-78.
- Myers, R.H. ve Montgomery DC., 1995. *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Nakamura, T., Hours, R. A. ve Sakai T., 1995. Enzymatic maceration of vegetables with protopectinases. *Journal Food Science*, 60, 468-472.
- Naqash, F., Masoodi, F.A., Rather S.A., Wani S.M. ve Gani A., 2017. Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin-A Review. *Carbohydr Polymers*, 168, 227-239.
- Norton, I.T., Fryer P. ve Moore S., 2006. Product/Process integration in food manufacture: Engineering sustained health. *AIChE Journal*, 52 (5), 1632-1640.
- Novosel'skaya IL, Voropaeva N.L, Semenova S. ve Rashidova S.S., 2000. Trends in the science and applications of pectins. *Chemistry of Natural Compounds*, 36, 1-10.
- Oeschlin, R., Lutz M.V. ve Amado R., 2003. Pectin substances isolated from apple cellulosic residue: structural characterisation of a new type of rhamnogalacturonan I. *Carbohydrate Polymers*, 51, 301-310.
- Olano-Martin, E., Gibson G.R. ve Rastall R.A., 2002. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 505-511.
- Oliveira, T.Í. S., Rosa M.F., Cavalcante F.L., Pereira P.H.F., Moates G.K., Wellner N., Mazzetto S.E., Waldron K.W. ve Azeredo H.M.C., 2016. Optimization of pectin extraction from banana peels with citric acid by using response surface methodology. *Food Chemistry*, 198, 113-118.
- Oliveira, A.N., Paula D.A., Oliveira E.B., Saraiva S.H., Stringheta P.C. ve Ramos A.M., 2018. Optimization of pectin extraction from Ubá mango peel through surface response methodology. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 395-402.
- Onur, C., 1983. Akdeniz Bölgesi Narlarının Seleksiyonu, Alata Bahçe Kùltürleri. Araştırma Ve Eğitim Merkezi, Erdemli-Mersin.
- Özgüven, A.I. ve Yılmaz C., 2000. Güneydoğu anadolu bölgesinde nar yetiştiriciliği. *Options Mediterraneennes*, 42, 41-48.
- Pandey, A., Selvakumar P., Soccol C.R., ve Nigam P., 1999. State fermentation for production of industrial enzymes. *Current Science*, 77, 149-162.

- Panouille, M., Thibault J.F ve Bonnin E., 2006. Cellulase and protease preparations can extract pectins from various plant byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (23), 8926-8935.
- Parniakov, O., Rosello-Soto E., Barba F.J., Grimi N., Lebovka N. ve Vorobiev E., 2015. New approaches for the effective valorization of papaya seeds: Extraction of proteins, phenolic compounds, carbohydrates, and isothiocyanates assisted by pulsed electric energy. *Food Research International*, 77 (4), 711-717.
- Peng, X.Y., Xu, Q., Yin H., Huang L. ve Du Y., 2014. Characterization of an immunologically active pectin from the fruits of *Lycium ruthenicum*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 64, 69-75.
- Peng, X.Y., Mu T.H., Zhang M., Sun, H.N., Chen J.W. ve Yu M., 2015. Optimisation of production yield by ultrasound-/microwave-assisted acid method and functional property of pectin from sugar beet pulp. *International Journal of Food Science & Technology*, 50 (3), 758-765.
- Pereira, P.H.F., Oliveira T.I.S., Rosa M.F., Cavalcante F.L., Moates G.K., Wellner N., ve ark., 2016. Pectin extraction from pomegranate peels with citric acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 373-379.
- Perussello, C.A., Zhangn Z., Marzocchella A. ve Tiwari B.K., 2017. Valorization of apple pomace by extraction of valuable compounds. *Compr. Rev Food Sci Food Safety*, 16, 776-796.
- Prakash Maran, J., Sivakumar V., Thirugnanasambandham K. ve Sridhar R., 2013. mOptimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. *Carbohydr Polymers*, 97, 703-709.
- Prakash Maran, J., Sivakumar V., Thirugnanasambandham K. ve Sridhar R., 2014. Microwave assisted extraction of pectin from waste *Citrullus lanatus* fruit rinds. *Carbohydrate Polymers*, 101 (1), 786-791.
- Prakash Maran, J. ve Priya B., 2015a. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. *Carbohydrate Polymers*, 115, 732-738.
- Prakash Maran, J., Priya B., Al-Dhabi N.A., Ponmurugan K., Ganesh Moorthy I. ve Sivarajasekar N., 2017. Ultrasound assisted citric acid mediated pectin extraction from industrial waste of *Musa balbisiana*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 35, 204-209.
- Pothiraj, C., Balaji P. ve Eyini M., 2006. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassavawaste. *African Journal Biotechnol*, 5, 1882-1885.
- Ptichkina, N.M., Markina O. A. ve Romyantseva G. N., 2008. Pectin extraction from pumpkin with the aid of microbial enzymes. *Food Hydrocolloids*, 22 (1), 192-195.
- Poojary, M.M., Orlien V., Passamonti P. ve Olsen K., 2017. Enzyme-assisted extraction enhancing the umami taste amino acids recovery from several cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 234, 236-244.
- Puri, M., Sharma D., ve Barrow C.J., 2012. Enzyme assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology*, 30 (1), 37-44.
- Putnik, P., Bursać Kovacević D., Režek Jambrak A., Barba F.J., Cravotto G. ve Binello A., 2017. Innovative “green” and novel strategies for the extraction of bioactive added value compounds from citruswastes - a review. *Molecules*, 22 (5), 27.
- Raji, Z., Khodaiyan F., Rezaei K., Kiani H. ve Hosseini S.S., 2017. bi. *International Journal of Biological Macromolecules*, 98, 709-716.

- Rascon-Chu, A., Martinez-Lopez A.L. ve Carvajal-Millan E., 2009. Pectin from low quality 'Golden Delicious' apples: Composition and gelling capability, *Food Chemistry*, 116 (1), 101-103.
- Rao, M. ve Silva J.L., 2006. Pectins: Structure, Functionality, And Uses, *Food Polysaccharides And Their Applications*. Stephen, A. M., Phillips, G.O. and Williams P.A., Boca Raton, CRC Press, p 353-41, Florida.
- Ridley, B. L., O'Neill M.A. ve Mohnen D.A., 2000. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonid related signaling. *Phytochemistry*, 57 (6), 929-67 .
- Rombouts, F.M., ve Thibault J.F., 1986. Feruloylated Pectic Substances From Sugar-Beet Pulp. *Carbohydrate Research*, 154, 177-187.
- Rodsamran, P., ve Sothornvit R., 2019. Microwave heating extraction of pectin from lime peel: Characterization and properties compared with the conventional heating method. *Food Chemistry*, 278, 364-372.
- Rolin, C., 1993. Pectin. In *Industrial Gums*. Whistler RL, BeMiller JN (eds), (3rd edn), Academic Press, 257-293 p, New York.
- Roselló-Soto, E., Parniakov O., Deng Q., Patras A., Koubaa M. ve Grimi N., 2016. Application of non-conventional extraction methods: Toward a sustainable and green production of valuable compounds from mushrooms. *Food Engineering Reviews*, 8 (2), 214-234.
- Rouse, A.H., Atkins C.D. ve Moore E.L., 1962. The occurrence and evaluation of pectin in component parts of Valencia oranges during maturation. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 75, 307-311.
- Sabater, C., Corzo N., Olano A. ve Montilla A., 2018. extraction of pectin from artichoke (*Cynara scolymus L.*) by-products using Celluclast®1.5L. *Carbohydrate Polymers*, 190, 43-49.
- Sadeghi, F., Nematbakhsh M, Noori-Diziche A., Eshraghi-Jazi F. ve Talebi A., 2015. Protective effect of pomegranate flower extract against gentamicin-induced renal toxicity in male rats. *Journal of Renal Injury Prevention*, 4 (2), 45.
- Saha, S., Singh A.K., Keshari A.K., Raj V., Rai A., ve Maity S., 2018. Modern extraction techniques for drugs and medicinal agents. In *Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food* Academic Press, 65-106.
- Sahin, S., Samli R., Birteks Z., Tan A.S., Barba F.J., Chemat F., Cravotto G. ve Lorenzo J.M., 2017. Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, 22 (7), 1-13.
- Saleh, M.A., Amer M.K ve Radwan A., 1964. Experiment on pomegranate seeds and juice preservation. *Agricultural Research and Reviews*, 42 (4), 54-64.
- Santos, J.D.G., Vieira I.J.C., Braz-Filho R. ve Branco A., 2015. Chemicals from Agave sisalana biomass: Isolation and identification. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (4), 8761-8771.
- Saravanan, K., Sivashankar M. ve Sivacharan S.R.C., 2008. Production And Optimization Of Cellulase From *Aspergillus Niger*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33 (1), 21-31.
- Sato, M.F., Rigoni D.C., Canteri M.H.G., Petkowicz C.L.O., Nogueira A. ve Wosiacki G., 2011. Chemical and instrumental characterization of pectin from dried pomace of eleven apple cultivars. *Maringá*, 33 (3), 383-389.
- Sutar, I.I., Srinivasan M.N. ve Vartak H.G., 1991. A low molecular weight alkaline proteinase from *Conidobolus coronatus*. *Biotechnology Letters*, 13, 119-124.
- Seçmen, O., Gemici Y., Leblebici E., Gork G. ve Bekat L., 1986. Tohumlu Bitkiler Sistematigi. Ege Univ., Fen Fak., Kitaplar serisi, s 116, İzmir.

- Serguschenko, I., Kolenchenko E. ve Khotimchenko M., 2007. Low esterified pectin accelerates removal of lead ions in rats. *Nutrition Research*, 27, 633-639.
- Sheldon, R. A., ve van Pelt S., 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society of Review*, 42 (15), 6223-6235.
- Simpson, B.K., Egyankor K.B. ve Martin A.M., 1984. Extraction, purification and determination of pectin in tropical fruits. *Journal Food Proces Preserv*, 2, 63.
- Singthong, J., Cui S.W., Ningsanond S. ve Goff H.D., 2004. Structural characterization, degree of esterification and some gelling properties of Krueo Ma Noy (*Cissampelos pareira*) pectin. *Carbohydrate Polymers*, 58, 391, 400.
- Sojitra, U.V., Nadar S.S., ve Rathod V.K., 2016. A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. *Food Chemistry*, 213, 296-305.
- Srivastava, P. ve Malviya R., 2011. Sources of Pectin, extraction and its applications in pharmaceutical Industry- An Overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2 (1), 10-18.
- Stephen, A.M., Phillips G.O. ve Williams P.A., 2006. *Food Polysaccharides and Their Application*. CRC Press, p 733 , USA.
- Subramanian, S., ve Prema P., 2000. Cellulase-free xylanases from *Bacillus* and other microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 1-7.
- Sun, L., Wu, D., Ning X., Yangn G., Lin Z., Tian, M. ve Zhou, Y., 2015. α -Amylase-assisted extraction of polysaccharides from *Panax ginseng*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 75, 152-157.
- Swamy, G. J., Sangamithra A. ve Chandrasekar V., 2014. Response surface modeling and process optimization of aqueous extraction of natural pigments from *Beta vulgaris* using Box–Behnken design of experiments. *Dyes and Pigments*, 111, 64-74.
- Swamy, G.J. ve Muthukumarappan K., 2017. Optimization of continuous and intermittent microwave extraction of pectin from banana peels. *Food Chemistry*, 220, 108-114.
- Tanglertpaibul, T., ve Rao M.A., 1987. Intrinsic Viscosity of Serum as Affected by Methods of Determination and Methods of Processing Concentrates. *Journal of Food Science*, 52 (6), 1642-1645.
- Taşan, T. N., 2018. Greyfurt Kabuğundan Mikrodalga Destekli Pektin Ekstraksiyonu Ve Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi). TOĞÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Teeri, T.T., Koivula A., Linder M., Wohlfahrt G., Divne C. ve Jones T.A., 1998. *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose. *Biochemistry Society Trans*, 26, 173- 178.
- Thakur, B.R., Singh R.K., Handa A.K. ve Rao M.A., 1997. Chemistry and uses of pectin-A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37 (1), 47-73.
- Tharanathan, R.N., 2003. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future, *Trends in Food Science and Technology*, 14 (3), 71-78.
- Thirugnanasambandham, K., Sivakumar V. ve Prakash Maran J., 2014. Process optimization and analysis of microwave assisted extraction of pectin from dragon fruit peel. *Carbohydrate Polymers*, 112, 622-626.
- Turan, M. D. ve Altundoğan H.S., 2011. Hidrometalurjik Araştırmalarda Yanıt Yüzey Yöntemlerinin (Yyy) Kullanımı. *Bilimsel Madencilik Dergisi*, 50 (3), 11-23.
- Thibault, J.F. ve Rinaudo, M., 1986. Chain association of pectic molecules during calcium-induced gelation. *Biopolymers*, 25, 456-468.

- Tian, L., Zhao, Y., Guo C. ve Yang X., 2011. A comparative study on the antioxidant activities of an acidic polysaccharide and various solvent extracts derived from herbal *Houttuynia cordata*. *Carbohydrate Polymers*, 83 (2), 537-544.
- Tiwari, B.K., 2015. Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Tomme, P., Warren R.A.J. ve Gilkes NR., 1995. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. *Advances Microbial Physiology*, 37, 1-81.
- Torrallbo, D.F., Batista K.A., Di-Medeiros M.C.B. ve Fernandes K.A., 2012. Extraction and partial characterization of *solanum lycocarpum* pectin. *Food Hydrocolloids*, 27, 378-383.
- Tucureanu, V., Matei A. ve Avram A.M., 2016. FTIR spectroscopy for carbon family study. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46 (6), 502-520.
- Ueno, H., Tanaka M., Hosino M., Sasaki M. ve Goto M., 2008. Extraction of valuable compounds from the flavedo of *Citrus junos* using subcritical water. *Separation and Purification Technology*, 62 (3), 513-516.
- Vasco-Correa, J. ve Zapata A.D.J., 2017. Enzymatic extraction of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) at laboratory and bench scale. *LWT- Food Science and Technology*, 80, 280-285.
- Vauquelin, M. L.N., 1790. Analyse due tamarin. *Annales de Chimie*, 92, 106.
- Venzon, S.S., Canteri, M.H.G., Granato D., Junior B.D., Maciel G.M., Stafussa A.P. ve Haminiuk C.W.I., 2015. Physicochemical properties of modified citrus pectins extracted from orange pomace. *Journal Food Sci. Technology*, 52 (7), 4102-4112.
- Virk, B.S. ve Sogi D.S., 2004. Extraction and characterization of pectin from apple (*Malus pumila Cv Amri*) peel waste. *International Journal of Food Properties*, 3 (3), 693-703.
- Vincken, J.P., Keizer A., Beldman G. ve Voragen A.G.J., 2003. Fractionation of xyloglucan fragments and their interaction with cellulose. *Plant Physiology*, 108, 1579-1585.
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bio active principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8 (3), 303-313.
- Voragen, A.G.J., Pilnik W., Thibault J.F., Axelos M.A.V. ve Renard C.M.G.C., 1995. "Pectins," In *Food polysaccharides and their applications*, Ed: Marcel Dekker, Stephen, A.M., New York, pp. 287-339.
- Wai, W.W., Alkarkhi A.F.M. ve Easad A.F., 2010. Effect of extraction conditions on yield and degree of esterification of durian rind pectin: An experimental design. *Food and Bioproducts Processing*, 88, 209-214.
- Wang, Q., Pagan J. ve Shi J., 2002. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, Pectin From Fruits*, Shi, J., Mazza, G., Le Maguer, M., Eds. CRC Press LLC, Vol 2, Washington.
- Wang, L., ve Weller C.L., 2006. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17 (6), 300-312.
- Wang, X., Chen Q. ve Lü X., 2014. Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137.
- Wang, W., Ma X., Xu Y., Cao Y., Jiang Z., Ding T., Ye X. ve Liu D., 2015. Ultrasound-assisted heating extraction of pectin from grapefruit peel: Optimization and comparison with the conventional method. *Food Chemistry*, 178, 106-114.

- Wang, H., Ding J., ve Ren N., 2016. Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 75, 197-208.
- Wiesenborn, D.P., Wang J., Chang K.C., ve Schwarz J.G., 1999. Comparison of continuous and batch processes for pectin extraction from sunflower heads. *Industrial Crops and Products*, 9 (3), 171-181.
- Wijesinghe, W.A.J.P. ve Jeon Y.J., 2012. Enzyme-assisted extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, 83 (1), 6-12.
- Wikiera, A., Mika M., Starzyńska-Janiszewska A. ve Stodolak B., 2015a. Development of complete hydrolysis of pectins from apple poma. *Food Chemistry*, 172, 675-680.
- Wikiera, A., Mika M., Starzyńska-Janiszewska A. ve Stodolak B., 2015b. Application of Celluclast 1.5L in apple pectin extraction. *Carbohydrate Polymers*, 134, 251-257.
- Wikiera, A., Mika M., ve Grabacka M., 2015c. Multicatalytic enzyme preparations as effective alternative to acid in pectin extraction. *Food Hydrocolloids*, 44, 151-161.
- Willats, W.G., McCartney L., Mackie W. ve Knox J.P., 2001. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, 47 (1-2), 9-27.
- Willats, W.G.T., Knox J.P. ve Mikkelsen J.D., 2006. Pectin: New Insights Into an Old Polymer are Starting to Gel. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 97-104.
- Wiseman, A., 1993. Designer enzyme and cell applications in industry and in environmental monitoring. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 56 (1), 3-13.
- Winning, H., Viereck N., Salomonsen T., Larsen J. ve Engelsen S. B., 2009. Quantification of blockiness in pectins-A comparative study using vibrational spectroscopy and chemometrics. *Carbohydrate Research*, 344, 1833-1841.
- Whistler, R.L. ve BeMiller J.N., 1973. *Industrial Gums Polysaccharides and their Derivatives*. Gum Polysaccharides and Their Derivatives, Ed: Roy. L. Whistler, Academic Press. New York, 429 p.
- Xu, Y., Zhang L., Bailina Y., Ge Z., Ding T., Ye X. ve Liu D., 2014. Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal Food Engineer*, 126, 72-81.
- Yang, J.S., Mu T.H. ve Ma M.M., 2018. Extraction, structure, and emulsifying properties of pectin from potato pulp. *Food Chemistry*, 244, 197-205.
- Yang, Y., Wang, Z., Hu D., Xiao K. ve Wu, J.Y., 2018a. Efficient extraction of pectin from sisal waste by combined enzymatic and ultrasonic process. *Food Hydrocolloids*, 79, 189-196.
- Yapo, B.M., 2009. Biochemical characteristics and gelling capacity of pectin from yellow passion fruit rind as affected by acid extractant nature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4), 1572-1578.
- Yıldırım, E., 2013. Pektin nedir, fizikokimyasal özellikleri nelerdir. *İnovatif Kimya Dergisi*, 3, 30-35.
- Yılmaz H., Şen B. ve Yıldız A., 1992. Akdeniz Bölgesinde Seçilen Narların Bölgesel Adaptasyonu. Türkiye I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 13-16 Ekim, İzmir.
- Yi, J.C., Sandra J.C., John A.B. ve Shu T.C., 1999. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and β -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Apple Environ Microbiol*, 65, 553- 559.

- Yuliarti, O., Goh K.K.T., Matia-Merino L., Mawson J. ve Brennan C., 2015. Extraction and characterisation of pomace pectin from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Food Chemistry*, 187, 290-296.
- Yuliarti, O., Matia-Merino, L.K.T., Goh K., Mawson J.A.K., Williams M. ve Brennan C., 2015a. Characterization of gold kiwifruit pectin from fruit of different maturities and extraction methods. *Food Chemistry*, 166, 479-485.
- Zakaria, S. M. ve Kamal S.M.M., 2015. Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and Algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 3, 1-12.
- Zakaria, S.M. ve Kamal S.M.M., 2016. Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Plants and Algae: Applications in Pharmaceutical and Food Ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8, 23-34.
- Zhanak, J., Zhan B., Yao X., Gao Y ve Shong J., 1995. Antiviral activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum L.* against Herpes virus in vitro. *Chung Kuo Chung Yao Tsa Chih*, 20, 556-558.
- Zhu, Z., Wu, Q., Di X., Li S., Barba F. J. ve Koubaa M., 2017. Multistage recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 40-47.
- Zhuang, J., Marchant M.A., Nokes S.E. ve Strobel H.J., 2007. Economic analysis of cellulase production methods for bio-ethanol. *Applied Engineering in Agriculture*, 23 (5), 679-687.
- Zitko, V., ve Bishop C.T., 1965. Fractionation of Pectic from Sun flowers, Sugar Beets, Apples and citrus Fruits. *Canadian Journal Chemistry*, 43, 3206-3214.
- Zoumba, Y., Moulai-Mostefa N., ve Krea M., 2009. Structural characterization and surface activity of hydrophobically functionalized extracted pectins. *Carbohydrate Polymer*, 78 (4), 841-846.
- Zykwinska, A.W., Ralet M.C.J., Garnier C. D. ve Thibault J. F.J., 2005. Evidence for in vitro binding of pectin side chains to cellulose. *Plant Physiology*, 139 (1), 397-407.

7. EKLER

EK I. Toplam Şeker Analizinden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

EK II. DNS Çözeltisinin Hazırlanışı

EK III. Bradford Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

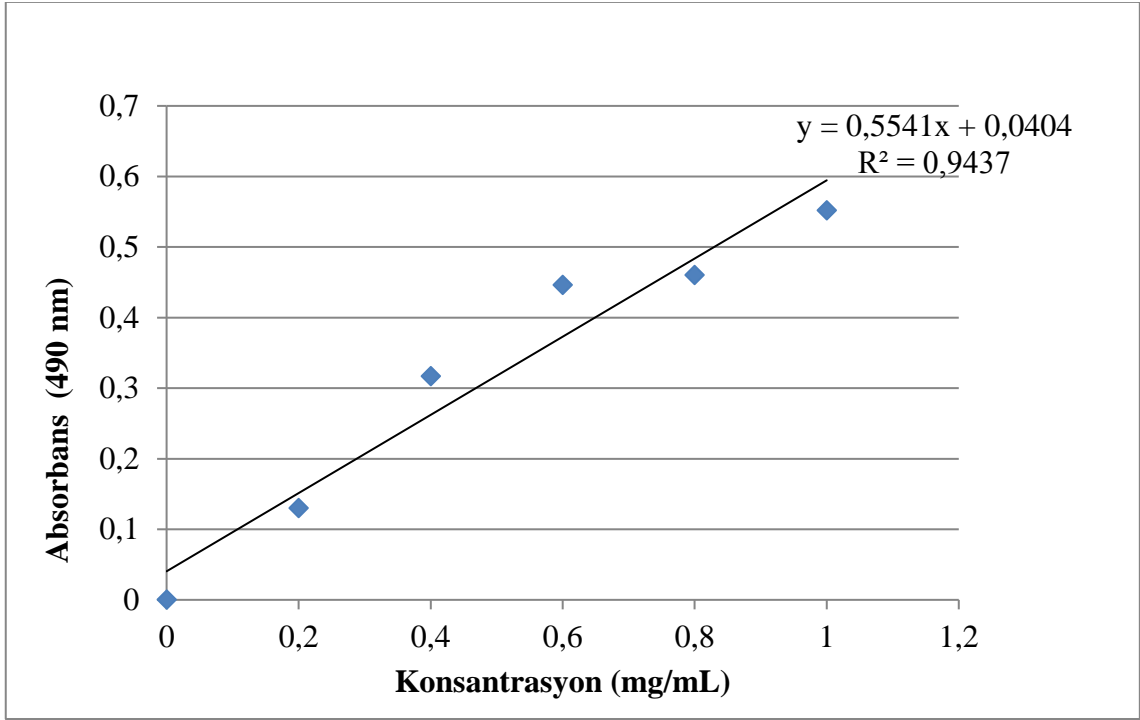
EK IV. Üronik Asit Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı



EK I. Toplam Şeker Analizinden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

%80'lik Fenol Çözeltisi hazırlanışı: 80 g fenol alınıp 100 ml'ye saf su ile tamamlanmıştır.

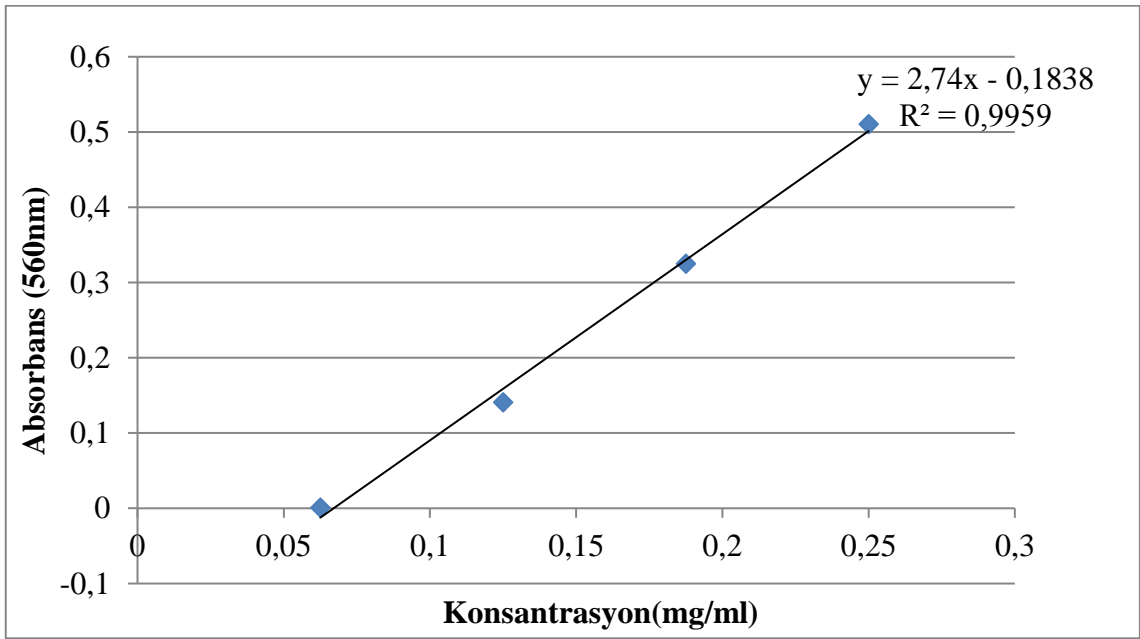
1 mg/ml D-Glikoz Çözeltisi: 100 mg D-Glikoz tartılıp 100 ml saf suda çözündürülmüştür.



EK II. DNS Çözeltisinin Hazırlanışı

DNS Çözeltisi: 5 g dinitrosalisilik asit tartıldı 1 g fenol, 0.25 g sodyum sülfid, 5 g sodyum hidroksit, önce 400 ml saf su içinde çözündürülür, sonra hacmi 500 ml tamamlanır. Standart olarak 2.5 mg/ml konsantrasyonda glikoz çözeltisi kullanılmıştır.

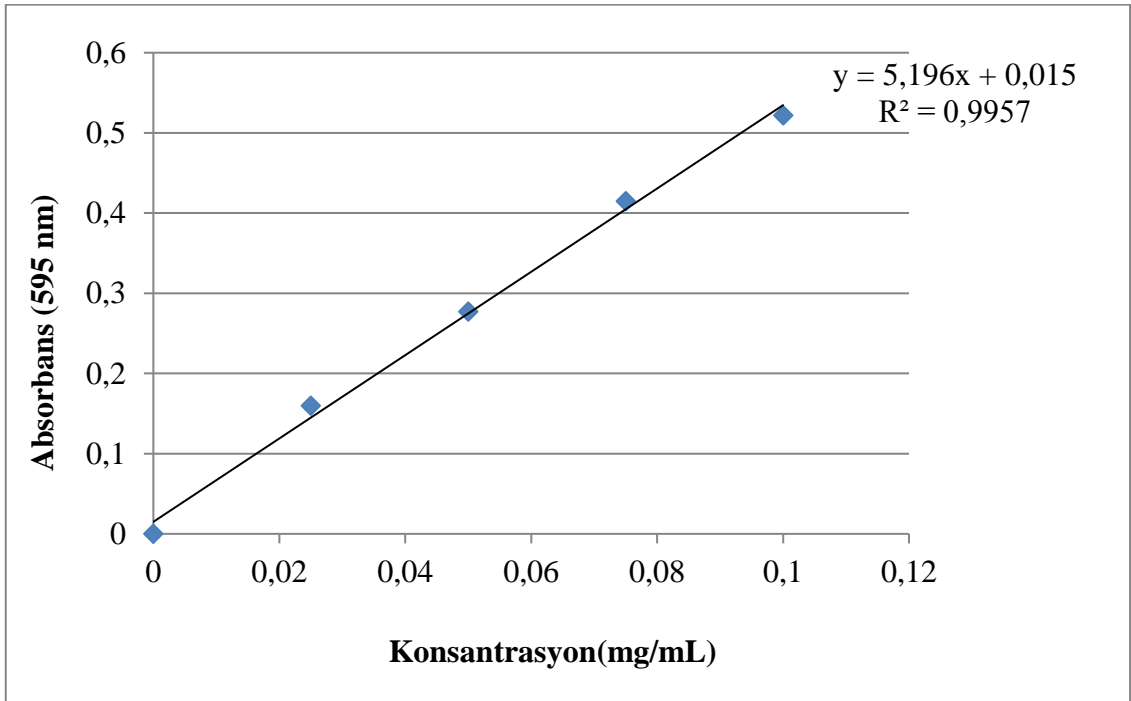
Glikoz Kurve Grafiği



EK III. Bradford Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

50 ml %95 etil alkol, 100 ml ortofosforik asit, 100 mg brilliant blue hazırlanmıştır. 200 ml'ye saf su ile getirilerek bu çözeltiden 25 ml alınmış, 100 ml saf su eklenerek 125 ml bradford çözeltisi hazırlanmıştır. Koyu renkli kapaklı şişede buzdolabında saklanmıştır. Standart olarak 1mg/ml konsantrasyonda BSA çözeltisi kullanılmıştır.

BSA Kurve Grafiği:



EK IV. Üronik Asit Yönteminden Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

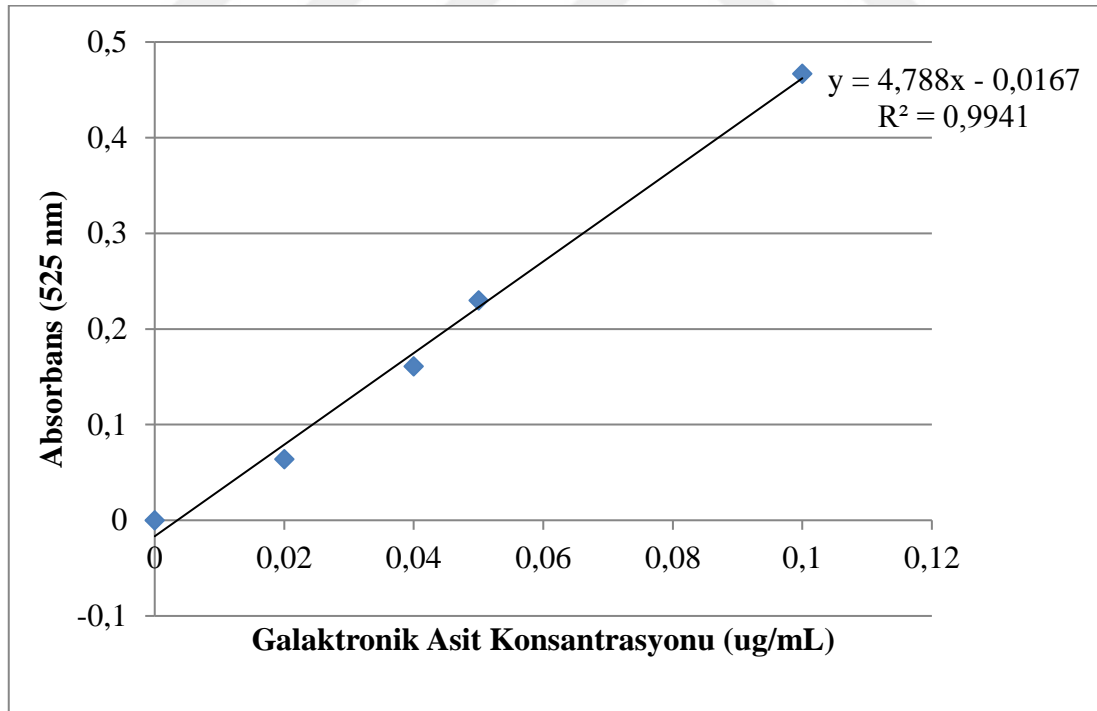
%0.5 NaOH Çözeltisi: 0.5 g kadar NaOH tartılır ve bir miktar su ile manyetik karıştırıcıda çözülürerek hacmi 100 ml'ye tamamlanır.

m-hidroksidifenil Çözeltisi: 0.15 g kadar 3-fenilfenole 80 mL %0.5 NaOH çözeltisi eklenir ve hacmi 100 ml' ye %0.5 NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

75 mM Sodyumtetraborat Çözeltisi: 1.501 g kadar sodyumtetraborata 90 ml konsantre sülfürik asit eklenir ve manyetik karıştırıcıda çözülürerek hacmi 100 ml'ye asitle tamamlanır

4 M Sülfamik asit/Potasyum Sülfamat Çözeltisi: 38.84 g kadar sülfamik aside 50 ml saf su eklenir. Doymun KOH yavaş yavaş eklenerek pH 1.6'ya ayarlanır ve hacmi 100ml' ye doymun KOH ile tamamlanır.

Galaktronik Asit Kurve Grafiği



8. ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Halenur KELEŞ

Cep Tel.: 05534780560

KİŞİSEL BİLGİLERİ

Uyruğu: T.C.

Doğum yeri: Tokat

Doğum Tarihi: 28.03.1989

Medeni Durumu: Bekar

E-Mail: halenurkeles@yandex.com

EĞİTİM DURUMU

- ✓ 2008-2010 Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fizik (FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ)
- ✓ 2010-2014 Iğdır Üniversitesi Gıda Mühendisliği (MÜHENDİSLİK FAKÜLTESİ)
- ✓ 2014-2015 Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi (EĞİTİM FAKÜLTESİ)
- ✓ 2016- Gaziosmanpaşa Üniversitesi (FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ) Gıda Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans (A.B.D.)
- ✓ 2018- Gümüşhane Üniversitesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü (SAĞLIK BİLİMLERİ FAKÜLTESİ)

YABANCI DİL

İngilizce