BİYOKÜTLE VE BİTKİDEN ORGANİK BİLEŞİKLERİN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM

2014
DOKTORA TEZİ
KİMYA

Mehmet Kuddusi AKALIN

BİYOKÜTLE VE BİTKİDEN ORGANİK BİLEŞİKLERİN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM

Mehmet Kuddusi AKALIN

Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalında
Doktora Tezi
Olarak Hazırlanmıştır

KARABÜK

Haziran 2014

Mehmet Kuddusi AKALIN tarafından hazırlanan "BİYOKÜTLE VE BİTKİDEN ORGANİK BİLEŞİKLERİN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM" başlıklı bu tezin Doktora Tezi olarak uygun olduğunu onaylarız.

Prof. Dr. Selhan KARAGÖZ .....
Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ .....
İkinci Tez Danışmanı, Bülent Ecevit Üniversitesi

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 04/ 06/ 2014

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)	İmzası
Başkan : Prof. Dr. Erdal DİNÇ (AÜ)	.....
Üye : Prof. Dr. Selhan KARAGÖZ (KBÜ)	.....
Üye : Prof. Dr. Nevin AYTEMİZ (KBÜ)	.....
Üye : Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ (BEÜ)	.....
Üye : Doç. Dr. Adnan BULUT (KKÜ)	.....
Üye : Doç. Dr. Deniz BİNGÖL (KOÜ)	.....
Üye : Yrd. Doç. Dr. Figen ARSLAN BİÇER (KBÜ)	.....

...../...../ 2014

KBÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Mustafa BOZ .....
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

"Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim."

Mehmet Kuddusi AKALIN

ÖZET

Doktora Tezi

BİYOKÜTLE VE BİTKİDEN ORGANİK BİLEŞİKLERİN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM

Mehmet Kuddusi AKALIN

Karabük Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanları:
Prof. Dr. Selhan KARAGÖZ
Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ
Haziran 2014, 145 sayfa

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu bitkiler ve biyokütlelerden değerli bileşiklerin ekstrakte edilmesi için kullanılan en kullanışlı ve etkili ekstraksiyon yöntemlerinden biridir. Süperkritik ekstraksiyon proseslerinde genellikle çözücü olarak su, karbon dioksit ve etanol kullanılır. Etanol zehirli olmaması ve yenilenebilir çözücü olması nedeniyle süpekritik ekstraksiyonda yaygın olarak kullanılır. Deneysel tasarımın klasik optimizasyona (tek değişkenin değiştirilerek diğer değişkenlerin sabit tutulduğu optimizasyon) kıyasla önemli avantajları bulunmaktadır. Deneysel tasarımın en önemli avantajı klasik optimizasyondan daha az sayıda deney sayısı sağlamasıdır. Böylece malzeme ve kimyasal kullanımını azaltır. Bunun yanında deney tasarımı değişkenler arasındaki etkileşimler hakkında bilgi sağlar. Bu çalışmada biyokütleden/bitkiden biyo-yağların/ekstraktların süperkritik etanol

ekstraksiyonu merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarımları kullanılarak incelenmiştir. Alman kayını (biyokütle), ısırgan otu ve funda yaprağından (bitki) biyo-yağların/ekstraktların süperkritik etanol ekstraksiyonunda deneysel proses koşullarının (ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/bitki derişimi) incelenmesi için merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır. Box-Behnken tasarımı ise alıç çekirdeği (biyokütle) ve adaçayı (bitki) biyo-yağların/ekstraktların süperkritik etanol ekstraksiyonunda aynı proses koşullarının incelenmesi için kullanılmıştır. Üç bağımsız değişkenin ve bunların etkileşimlerinin biyo-yağ/ekstrakt verimine etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Süperkritik etanol ekstraksiyon prosesi için en önemli faktör ekstraksiyon sıcaklığı olarak bulunmuştur. Tüm süperkritik etanol ekstraksiyon tasarımları için uygulanan deneysel tasarımlarda kullanılan modelin etkinliğinin göstergesi olan yüksek R^2 değerleri elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktlar ve biyo-yağlar çoğunlukla fenolik bileşikler ve asit esterlerden oluşmaktadır.

Anahtar Sözcükler : Süperkritik etanol ekstraksiyonu, deneysel tasarım, biyokütle, bitki.

Bilim Kodu : 201.1.004

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

EXPERIMENTAL DESIGN FOR SUPERCRITICAL ETHANOL EXTRACTION OF ORGANIC COMPOUNDS FROM BIOMASS AND PLANT

Mehmet Kuddusi AKALIN

Karabük University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Thesis Advisors:
Prof. Dr. Selhan KARAGÖZ
Assoc. Prof. Dr. Mehmet AKYÜZ
June 2014, 145 pages

Supercritical fluid extraction is one of the most useful and effective methods to extract valuable compounds from plants and biomass. Water, carbon dioxide and ethanol are commonly used as solvents in the supercritical extraction process. As ethanol is a non-toxic and renewable solvent, it is commonly used in supercritical extraction. The experimental design method has important advantages when compared to classical optimization (which involves changing one variable at a time while other variables are kept constant). The most important advantage is that the design of experiments requires a fewer number of experiments than classical optimization. Thus, it reduces the use of materials and chemicals. In addition, the design of experiments provides information about the interactions among the variables. In thisstudy, the supercritical ethanol extraction of bio-oils/extracts from

biomass/plants has been investigated using central composite and Box-Behnken designs. The central composite design was used to investigate experimental process conditions (extraction temperature, extraction time and biomass/plant concentration) for the supercritical ethanol extraction of bio-oil/extracts from German beech wood (biomass) and stinging nettle, heather leaves (plants). The Box-Behnken design was used to investigate the same experimental process conditions for the supercritical ethanol extraction of bio-oil/extracts from hawthorn stones (biomass) and sage (plant). The effects of three independent variables and their interactions on the yields of bio-oils and extracts were analyzed using response surface methodology. The most significant factor in the supercritical ethanol extraction process was found to be the extraction temperature. High correlation coefficients which indicate the effectiveness of the adopted model were obtained from all supercritical ethanol extraction designs. The obtained extracts and bio-oils commonly consisted of phenolic compounds and acid esters.

Key Words : Supercritical ethanol extraction, design of experiments, biomass, plant.

Science Code : 201.1.004

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının danışmanlığını üstlenen, engin bilgi ve tecrübeleriyle bana yol göstererek akademik yaşamımda ilerlememi sağlayan, yalnızca akademik yaşamımda değil, karşılaştığım tüm zorluklarda yakın bir dost gibi davranarak bana her türlü desteği veren değerli hocam Prof. Dr. Selhan KARAGÖZ'e en içten duygularımla teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının ikinci danışmanlığını üstlenen, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak bana her konuda yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet AKYÜZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı yürütürken dostluğu ve yardımlarıyla yanımda olarak bana destek olan, değerli dostum ve çalışma arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Kubilay TEKİN'e çok teşekkür ederim.

Karabük Üniversitesi'ne sağladığı maddi destekten dolayı teşekkür ederim (Proje no:KBÜ-BAP-13/1-DR-008).

Tez çalışmamda bana yardımcı olan değerli dostum Yusuf Girayhan KARAKUŞ ve değerli arkadaşım Saime YAĞCI'ya teşekkür ederim.

Sevgili aileme, hayatım boyunca bana her türlü desteği sundukları ve her konuda bana yardımcı oldukları için tüm kalbimle teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve doktora tez çalışmaları sırasında da bana çok destek olan sevgili eşim Ece AKALIN'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL ii
ÖZET iv
ABSTRACT vi
TEŞEKKÜR viii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
SİMGELER VE KISALTMALAR xvii

BÖLÜM 1 1
GİRİŞ 1

BÖLÜM 2 4
GENEL BİLGİLER 4
2.1. BİYOKÜTLE 4
2.2. DEĞERLİ BİLEŞİK KAYNAĞI OLARAK BİTKİLER 5
2.3. EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ 6
2.3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu 7
2.3.2. Katı Faz Ekstraksiyonu 7
2.3.3. Katı Faz Mikroekstraksiyonu 8
2.3.4. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu 9
2.3.5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon 10
2.3.6. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu 11
2.3.6.1. Süperkritik Etanol 19
2.3.6.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu için Literatür Taraması 20
2.4. DENEYSEL TASARIM 22
2.4.1. Birinci Dereceden Modeller için Tasarımlar 24
2.4.1.1. Faktöryel Deney Tasarımları 25
2.4.1.2. Plackett-Burmann Tasarımı 28

Sayfa

2.4.2. İkinci Dereceden Modeller için Tasarımlar 29
2.4.2.1. Merkezi Kompozit Tasarım 30
2.4.2.2. Box-Behnken Tasarımı 35
2.4.3. Modellerin Analizi 36
2.4.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Deneysel Tasarım için Literatür Taraması 43
2.4.4.1. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Merkezi Kompozit Tasarım için Literatür Taraması 43
2.4.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Box-Behnken Tasarımı için Literatür Taraması 47

BÖLÜM 3 51
MATERYAL VE YÖNTEM 51
3.1. KULLANILAN HAMMADDELER 51
3.2. HAMMADDELERE YAPILAN ANALİZLER 51
3.2.1. Nem Tayini 52
3.2.2. Uçucu Madde Tayini 52
3.2.3. Kül Tayini 53
3.2.4. Elementel Analiz 53
3.2.5. Hammaddelerin Yüzey Analizleri 53
3.3. SÜPEKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU 54
3.4. SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU SONUCU ELDE EDİLEN ÜRÜNLERE YAPILAN ANALİZLER 55
3.4.1. Elementel Analiz 55
3.4.2. Biyo-yağların ve Ekstraktların GC-MS Analizi 56
3.4.3. Ekstraksiyon Sonrası Katı Ürünlerin Yüzey Analizi 56
3.5. SÜPEKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM 56

BÖLÜM 4 58
DENEYSEL TASARIM ÇALIŞMALARI 58
4.1. ALMAN KAYININDAN BİYO-YAĞLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM 58

Sayfa

4.2. ISIRGAN OTUNDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM.....76

4.3. FUNDA YAPRAĞINDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM.....89

4.4. ALIÇ ÇEKİRDEĞİNDEN BİYO-YAĞLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN BOX-BEHNKEN TASARIM.....102

4.5. ADAÇAYINDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN BOX-BEHNKEN TASARIM.....121

BÖLÜM 5 135

SONUÇLAR.....135

KAYNAKLAR.....139

ÖZGEÇMİŞ.....145

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Soxhlet ekstraksiyon sistemi 10
Şekil 2.2. Saf bir bileşen için süperkritik hal bölgesi 12
Şekil 2.3. Karbondioksit için yoğunluk-basınç diyagramı 14
Şekil 2.4. Üç faktörlü tam faktöryel deney tasarımı 27
Şekil 2.5. Üç faktörlü yarım kesirli faktöryel tasarım 28
Şekil 2.6. Merkezi kompozit tasarımın yapısal elemanları 30
Şekil 2.7. İki faktörlü merkezi kompozit tasarım 31
Şekil 2.8. Box-Behnken tasarımının şematik gösterimi 35
Şekil 3.1. Yüksek basınç yüksek sıcaklık reaktörünün şematik gösterimi 54
Şekil 4.1. Tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar 62
Şekil 4.2. Biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi 64
Şekil 4.3. Biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi 65
Şekil 4.4. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 66
Şekil 4.5. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 67
Şekil 4.6. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 68
Şekil 4.7. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 69
Şekil 4.8. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 70
Şekil 4.9. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 71
Şekil 4.10. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri 75
Şekil 4.11. Isırgan ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar 80
Şekil 4.12. Isırgan ekstrakt verimi için pareto çizelgesi 81
Şekil 4.13. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 82

Sayfa

Şekil 4.14. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 83
Şekil 4.15. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 84
Şekil 4.16. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri 88
Şekil 4.17. Funda ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar 93
Şekil 4.18. Funda ekstrakt verimi için pareto çizelgesi 94
Şekil 4.19. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 95
Şekil 4.20. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 96
Şekil 4.21. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 97
Şekil 4.22. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri 101
Şekil 4.23. Tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar 106
Şekil 4.24. Biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi 108
Şekil 4.25. Biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi 109
Şekil 4.26. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 110
Şekil 4.27. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 111
Şekil 4.28. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi 112
Şekil 4.29. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 113
Şekil 4.30. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 114
Şekil 4.31. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi 115
Şekil 4.32. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri 120
Şekil 4.33. Adaçayı ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar 125
Şekil 4.34. Adaçayı ekstrakt verimi için pareto çizelgesi 126
Şekil 4.35. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 127

Sayfa

Şekil 4.36. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 128

Şekil 4.37. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi 129

Şekil 4.38. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri 134

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Gaz, sıvı ve süperkritik halin karakteristik değerleri 13

Çizelge 2.2. Bazı çözücülerin kritik özellikleri 15

Çizelge 2.3. Üç faktörlü merkezi kompozit tasarım matrisi 33

Çizelge 2.4. Box-Behnken tasarımının yapısı 36

Çizelge 2.5. F dağılım tablosu (α=0,05) 39

Çizelge 2.6. Varyans analizi tablosu (ANOVA) 40

Çizelge 4.1. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları 58

Çizelge 4.2. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 60

Çizelge 4.3. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 61

Çizelge 4.4. Biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi 63

Çizelge 4.5. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için kritik koşullardaki tahmini ve gözlenen sonuçlar 72

Çizelge 4.6. Merkez noktadaki deneyden elde edilen biyo-yağın bileşimi 73

Çizelge 4.7. Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri 74

Çizelge 4.8. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları 76

Çizelge 4.9. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 77

Çizelge 4.10. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 78

Çizelge 4.11. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu 80

Çizelge 4.12. Ekstrakt verimi için kritik koşullarda tahmini ve gözlenen sonuçlar.. 85

Çizelge 4.13. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi 86

Çizelge 4.14. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri 87

Çizelge 4.15. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları 89

Çizelge 4.16. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 90

Çizelge 4.17. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 91

Çizelge 4.18. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu 93

Çizelge 4.19. Ekstrakt verimi için kritik koşullarda tahmini ve gözlenen sonuçlar.. 98

Çizelge 4.20. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi 99

Sayfa

Çizelge 4.21. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri 100
Çizelge 4.22. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları 102
Çizelge 4.23. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 104
Çizelge 4.24. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 105
Çizelge 4.25. Biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi tablosu 107
Çizelge 4.26. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için kritik koşullardaki tahmini ve gözlenen sonuçlar 116
Çizelge 4.27. Merkez noktadaki deneyden elde edilen biyo-yağın bileşimi 117
Çizelge 4.28. Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri 119
Çizelge 4.29. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları 121
Çizelge 4.30. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 122
Çizelge 4.31. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi 123
Çizelge 4.32. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu 125
Çizelge 4.33. Ekstrakt verimi için kritik koşullarda tahmini ve gözlenen sonuçlar 130
Çizelge 4.34. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi 131
Çizelge 4.35. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri 133

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

SS_{reg} : regresyon kareler toplamı

SS_{art} : artık değerlerin kareler toplamı

SS_{top} : cevap değerlerinin kareler toplamı

SS_{sh} : saf hatanın kareler toplamı

SS : kareler toplamı

Df : serbestlik derecesi

MS : kareler ortalaması

KISALTMALAR

GC-MS : Gas Chromatography-Mass Spectrometry
(Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi)

GC-FID : Gas Chromatography-Flame Ionization Detector
(Gaz Kromatografisi-Alev İyonlaşma Detektör)

SEM : Scanning Electron Microscope
(Taramalı Elektron Mikroskobu)

CCD : Central Composite Design
(Merkezi Kompozit Tasarım)

BBD : Box-Behnken Design
(Box-Behnken Tasarım)

RSM : Response Surface Methodology
(Cevap Yüzey Yöntemi)

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İnsanlar tarih boyunca doğadan ve biyokütle kaynaklarından faydalanmıştır. Öncelikle biyokütleyi yakıt, bitkileri besin kaynağı olarak kullanan insanlar, yüz yıllar boyunca artan bilgi birikimi ve bilimsel gelişmeler sonucunda bu kaynakların farklı amaçlar için de kullanılabileceğini keşfetmiştir. Özellikle bazı bitkilerin hastalıklara ve yaralara iyi geldiğinin keşfedilmesiyle birlikte bitkilerin tıbbî alanda kullanılması önem kazanmıştır. Bilimsel gelişmelere paralel olarak günümüzde her bitkinin yapısındaki farklı bileşenler nedeniyle farklı etkilere sahip olduğu ve yapısındaki bileşenlerin özelliklerine göre çeşitli alanlarda kullanılabileceği bilinmektedir. Bitkilerin yapısında bulunan aktif bileşenlerin veya değerli bileşenlerin elde edilmesi için kullanılan yaygın yöntemlerden biri ekstraksiyon işlemidir. En basit tanımıyla ekstraksiyon istenilen bir bileşiğin ya da bileşiklerin seçici olarak bir matriksten transfer edilerek ayrılması işlemidir. İlerleyen teknolojiyle birlikte çok çeşitli ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bazıları buhar distilasyonu, Soxhlet ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrasonik ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonudur. Yaygın olarak su, karbon dioksit ve etanolün kullanıldığı süperkritik akışkan ekstraksiyonu, bitkilerden aktif bileşenlerin ekstrakte edilmesi için uygulanan en kullanışlı ve etkili yöntemlerden biridir (Akalın et al., 2013a). Bitkilerden bileşiklerin ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılan süperkritik karbon dioksit, kritik sıcaklığının düşük olması nedeniyle termal olarak dayanıksız olan bileşiklerin ekstrakte edilebilmesini sağlar. Bununla birlikte ucuz olması, zehirli olmaması ve ekstraksiyon sonrasında zararlı kalıntılar bırakmaması da süperkritik karbon dioksitin yaygın olarak kullanılmasında önemli rol oynamaktadır (Laitinen, 1999). Ancak süperkritik karbon dioksitin ekstraksiyon verimliliği azdır ve verimliliği artırmak

için etanol, metanol gibi yardımcı ya da tamamlayıcı çözücülerle birlikte kullanılmaktadır. Zehirli olmaması ve yenilenebilir bir çözücü olmasından dolayı etanol süperkritik akışkan ekstraksiyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Diğer ekstraksiyon yöntemlerine göre daha verimli ve avantajlı olması nedeniyle bitkilerden veya biyokütlelerden değerli ya da aktif bileşenlerin elde edilmesinde süperkritik akışkan ekstraksiyonunun kullanımı hızla artmaktadır.

Sanayinin gelişmesi ve dünyadaki küreselleşme ile birlikte şirketler arasındaki rekabet artmıştır. Özellikle endüstriyel alanda daha kısa sürelerde daha ekonomik yöntemlerle daha verimli üretim yapmak şirketler için büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle her alanda deneysel koşulların optimizasyonu önemli hale gelmiştir. Bu anlamda deneysel tasarımın diğer değişkenlerin sabit tutularak yalnızca tek değişkenin değiştirilmesiyle gerçekleştirilen klasik optimizasyon yöntemine göre önemli avantajları bulunmaktadır. Deneysel tasarımda klasik optimizasyona göre daha az deney yapılabilmektedir. Böylelikle klasik optimizasyona göre daha kısa zamanda, daha az hammadde ve kimyasal kullanılması sağlanarak sonuç elde edilebilmektedir (Akalın et al., 2013b). Deneysel tasarımın tek değişkenin değiştirilerek gerçekleştirilen klasik optimizasyon yöntemine göre diğer avantajları aşağıdaki gibi sıralanabilir.

- Deneysel tasarımda değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri de hesaba katılırken klasik optimizasyonda değişkenler arasındaki bu etkileşimler hesaba katılmaz.

- Klasik optimizasyon yöntemi yalnızca deneylerin gerçekleştirildiği şartlarda bilgi sağlarken; deneysel tasarımda deney koşullarının etki ettiği tüm bölgeyle ilgili bilgi sağlanır.

- Deneysel tasarımda deney bölgesinin her noktasından elde edilen bilgilerin kalitesi, klasik optimizasyon yönteminden daha fazladır. Ayrıca önceki maddede de belirtildiği gibi diğer değişkenlerin sabit tutulup, tek değişkenin değiştirilerek gerçekleştirilen klasik yöntemlerde deney bölgesinin istenen bir

noktasından değil, yalnızca deneyin gerçekleştirildiği koşullardan bilgi alınabilmektedir (Leardi, 2009).

Faktöryel tasarım, merkezi kompozit tasarım (central composite design), Box-Behnken tasarımı gibi çok sayıda deneysel tasarım yöntemleri bulunmaktadır. Bu deneysel tasarım yöntemleri aynı temellere dayansa da her biri farklı özellikler sunmaktadır. Klasik deneysel yöntemlere göre avantajları fazla olsa da deneysel tasarım yöntemi hâlâ geniş uygulama alanlarında kullanılmamaktadır. Ancak sağladığı avantajların giderek daha geniş çevreler tarafından fark edilmesiyle birlikte deneysel tasarımla ilgili bilimsel çalışmalar ve deneysel tasarımın farklı alanlardaki uygulamaları hızla artmaktadır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. BİYOKÜTLE

Organik ve az miktarda inorganik maddelerin heterojen karışımından oluşan biyokütle terimi, yeryüzünde yaşayan ya da yakın zamanda yaşamış tüm canlıları ve canlıların atıklarını kapsar. Yenilenebilir bir enerji kaynağı olan biyokütle başlıca karbon ve hidrojenden oluşur. Ayrıca yapısında biyokütlenin çeşidine göre azot, kükürt gibi heteroatomlar bulunabilir. Yapısındaki bileşenlerin çeşidi ve miktarı biyokütlenin türüne göre değişiklik gösterse de temel olarak lignoselülozik biyokütlenin yapısında selüloz, hemiselüloz ve lignin bileşenleri bulunur. Bu bileşenler dışında biyokütlenin yapısında inorganik bileşikleri barındıran kısım olan kül bulunabilir.

D-glukopiranoz birimlerinin β-1,4 glikozidik bağlanmaları ile oluşan selüloz bitkiye danayanıklılık sağlayan bir polisakkarittir. Bitkinin yapısındaki selüloz oranı bitkinin türüne göre değişiklik göstermekle birlikte biyokütlelerin yapısında ağırlıkça %40-50 civarında selüloz bulunmaktadır (Liu and Sun, 2010; McKendry, 2002).

Ksilan ve glukomannandan oluşan düz zincirli iskeletin yüksek derecede dallanmasından oluşan hemiselülozun yapısı biyokütle türüne göre değişiklik göstermekle birlikte, genel olarak D-glukopiranoz, D-galaktopiranoz ve D-mannopiranoz, L-arabinofuranoz, D-ksilopiranoz monomerlerinden oluşmaktadır. Selüloz gibi hemiselüloz da bitkiye dayanıklılık sağlayan bileşendir (Basu, 2010; Rowell, 2005; Ren and Sun, 2010).

Bitkilerin sıvı akışını düzenlemek, enerji depolamak ve mikroorganizmaların saldırılarına karşı korunmak için kullandığı lignin, hidroksil- ve metoksi- grupları

bağlı fenilpropan birimlerinin birbirlerine başlıca eter bağlarıyla bağlandığı aromatik yapıda bir bileşiktir (Savage et al., 2010; Rowell, 2005; Lu and Ralph, 2010).

2.2. DEĞERLİ BİLEŞİK KAYNAĞI OLARAK BİTKİLER

Geleneksel tıbbî sistemlerin temelini oluşturan bitkiler, yüz yıllardır hastalıkları tedavi etmek, yaraları iyileştirmek gibi amaçlar için kullanılmaktadır. Dünyada klinik olarak kullanılan ilaçların yarısından fazlasını doğal ürünler ve bu ürünlerin türevleri oluşturmaktadır. Dünyadaki çiçekli bitki türlerinin yaklaşık yarısı tropikal ormanlarda bulunmaktadır. Buradaki bitkiler potansiyel ilaç ya da yeni ilaçların geliştirilmesinde önemli bir kaynak arz etmektedir. Örneğin bazı kanser ilaçlarında bulunan etkin maddeler, Amerikan yerlileri tarafından tıbbî olarak kullanılan papaya ve porsuk ağacı gibi bitkilerden türetilmiştir (Gurib-Fakim, 2006). Günümüzde tıptaki gelişmelere paralel olarak ilaç kullanımı önemli ölçüde yaygın olsa da hâlâ çoğu insan hastalıklarının ya da rahatsızlıklarının iyileştirilmesi için tıbbî bitkilerden faydalanmaktadır.

Bitkilerin tıbbî alanlarda kullanımı temel olarak şu yollarla olabilmektedir:

- Bazı bitkiler (özellikle tropikal bölgelerde yetişen) doğrudan etken madde kaynağı olarak kullanılabilmektedir (Gurib-Fakim, 2006). Örneğin Güney Amerika'da yetişen orman sarmaşığından ekstrakte edilen alkaloid D-tubocurarine bileşiği cerrahide kas gevşetici olarak kullanılmaktadır. Ekstrakte edilen bu bileşiğin laboratuvarda sentezi henüz gerçekleştirilememiştir. Bazı etkin bileşenlerin laboratuvarda sentezlenmesi, o bileşiklerin bitkilerden ekstrakte edilmesinden daha pahalıya mal olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı bazı bitkilerin doğrudan etken madde kaynağı olarak kullanılması daha avantajlıdır.

- Bitkiler ayrıca yarı-sentetik bileşiklerin geliştirilmesi için başlangıç noktası olarak kullanılabilmektedir (Gurib-Fakim, 2006). Örneğin steroidlerin üretimi için gerekli olan sapogeninler, saponin ekstraktlarından elde edilmektedir.

- Tıp alanında bitkilerden faydalanılmasının bir diğer yolu da yeni bileşiklerin sentezlenmesinde bitkilerin model kaynağı olarak kullanılmasıdır (Gurib-Fakim, 2006). Örneğin koka bitkisinden elde edilen kokain, lokal anestezide kullanılan prokain gibi bileşiklerin sentezlenmesinde model olmuştur.

Bitkilerin yapısındaki etken bileşikler bitkinin türüne, yetiştiği iklime ve bölgeye göre farklılar göstermektedir. Bu etken bileşiklerin de farklı özellikleri ve farklı etkileri bulunmaktadır. Bitkilerden elde edilen değerli bileşiklerin sağlık alanı dışında parfümeri, tekstil, boya sanayi gibi alanlarda da kullanımı mevcuttur. Bu nedenle günümüzde bitki türlerinin incelenmesi, bu bitkilerin yapısındaki bileşiklerin aydınlatılması ile bu bileşiklerin ne gibi etkilere ve özelliklere sahip olduğunun belirlenmesi konusunda çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.3. EKSTRAKSİYON TEKNİKLERİ

Etkileşimli bir ayırma prosesi olan ekstraksiyon bir bileşiğin (ya da bileşiklerin) seçici olarak bir katıdan bir sıvıya (katı-sıvı ekstraksiyonu); birbirine karışmayan bir sıvıdan başka bir sıvıya (sıvı-sıvı ekstraksiyonu) ya da bir sıvıdan reaktif özellikte bir katıya (katı faz ekstraksiyonu) transfer edilmesi işlemidir. Ekstraksiyon teknikleri ana hatlarıyla bu şekilde sınıflandırılsa da gelişen teknolojiyle birlikte kozmetik, ilaç, besin gibi çeşitli sektörlerde bir karışımdan istenilen bileşikleri ayırmada kullanılan basit ya da ileri çok çeşitli teknikler de bulunmaktadır (Temelli, 2012; Meloan, 1999). Temel olarak ekstrakte edilmek istenen bileşiğin transfer işlemi yalnızca o bileşiğin çözünebildiği bir çözücü ile gerçekleştirilse de ekstraksiyon işleminde yalnızca çözünürlük etkili değildir. Ekstraksiyonu etkileyen faktörlerden biri çözünen maddenin her bir fazdaki aktiflik katsayısındaki değişikliktir (Meloan, 1999). Ekstrakte edilebilen bileşiklerin fazlardaki dağılımı elektrostatik bağlara (iki iyon arasındaki, bir iyon ve dipol arasındaki ya da iki dipol arasındaki elektrostatik bağlar), hidrojen bağlarına ve kimyasal bağlara bağlıdır. Genellikle bir bileşiğin sudaki ya da alkoldeki çözünürlüğü bileşiğin hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğiyle alakalıdır. Hidrojen bağı oluşturabilme yeteneği bileşiğin dipol momentiyle ölçülebilen polarlığına bağlıdır. Kimyasal bağlar ise π (pi) ve σ (sigma) bağlarını içeren asit baz etkileşimleriyle alakalıdır (Meloan, 1999). Ekstraksiyon işleminde

kullanılan bazı teknikler sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, katı faz mikroekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu şeklinde sınıflandırılabilir.

2.3.1. Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu

Sıvı-sıvı ektraksiyonu bir numunenin, genellikle ağır ya da yoğun fazın sulu faz, hafif fazın da organik bir çözücü olduğu, birbirine karışmayan iki sıvı veya faz arasında dağılması ya da ayrılması esasına dayanır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonunun seçiciliği ve etkisi birbirine karışmayan iki çözücünün seçimine önemli derecede bağlıdır. Sulu fazda %10'dan daha az çözünmeleri, deriştirme işleminde gerçekleştirilen buharlaştırma aşamasında yüksek uçuculuğa sahip olmaları gibi özelliklerinden dolayı sıvı-sıvı ekstraksiyonda genellikle organik çözücüler kullanılmaktadır (Dean, 2009). Sıvı-sıvı ekstraksiyon işleminde birbirine karışmayan iki sıvı kullanılmasıyla genellikle iki çözücü arasında etkileşim olmadığı varsayılsa da ekstrakte edilmek istenen bileşiklerin derişimi çok düşükse, küçük miktarda bile olsa bir çözücünün diğeri içerisinde dağılımı yani ikinci çözücünün birinci çözücü üzerine etkisi göz önüne alınmalıdır (Meloan, 1999).

2.3.2. Katı Faz Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu, ayrılmak istenen fazdaki örneğin, istenilen bileşiğin seçici olarak yüzeyine adsorplandığı bir katı fazla muamele edilmesidir. Bu ekstraksiyon çeşidi bileşenlerin izolasyonu, zenginleştirilmesi ve temizlenmesi için kullanılan yaygın bir örnek hazırlama yöntemidir (Dean, 2009). Katı faz ekstraksiyonda kullanılan malzeme yaklaşık 1 cm çapında silika kaplı küçük gözenekli bir disktir. Ayrılmak istenen bileşikler sorbent olarak da adlandırılabilen bu diskte tutunurken istenmeyen bileşikler ya da safsızlıklar tutunmadan diskten geçer. Hangi bileşiklerin tutunarak ayrılacağı diskin yapıldığı ya da kaplandığı malzeme ile ayarlanabilmektedir (Meloan, 1999). Diskin yapımında başlangıç maddesi olarak yüksek bor içeriğine sahip boncuk şeklinde camlar kullanılır. Borun yıkanmasıyla birlikte yüksek oranda gözenekli hale gelen yüzeyde çok sayıda –OH grubunun olduğu bir parçacık oluşur. Parçacık bu haliyle doğrudan polar bileşiklerin tutunması

için kullanılabilse de organik bileşiklerin tutunması için uygun değildir. Bu nedenle organik bileşiklerin yüzeye tutunması için yüzeyin apolar hale getirilmesi gerekir (Meloan, 1999). Katı faz ekstraksiyonunda kullanılan sorbentler normal faz, ters faz ve iyon değişimi şeklinde sınıflandırılabilir. Normal fazda sorbentler amino, diol gibi polar fonksiyonel gruplara sahipken, ters fazda kullanılan sorbentlerde metil, oktil gibi apolar fonksiyonel gruplar bulunmaktadır. İyon değişiminde kullanılan malzemeler katyonik veya anyonik fonksiyonel gruplardan birine sahip olabilmektedir. Böylece iyonlaşmış haldeyken karşıt yüklü bileşikleri çekebilmektedirler. Kullanılan malzemeler genel olarak florisil, alumina tabanlı olmakla birlikte, yaygın olarak kullanılanlar fonksiyonel grupların yüzeydeki silanol gruplarına bağlandığı silika tabanlıdır (Dean, 2009). Katı faz ekstraksiyonun geleneksel sıvı-sıvı ekstraksiyona göre bazı avantajları bulunmaktadır (Meloan, 1999):

- Eser miktardaki bileşikler ayrılabilir.
- Daha az çözücüye ihtiyaç duyulur.
- Daha hızlıdır.
- Deriştirme basamaklarına olan ihtiyacı azaltır.

2.3.3. Katı Faz Mikroekstraksiyonu

Mikro-ölçekli bir katı faz ekstraksiyon olan katı faz mikroekstaksiyon sistemi bir tutucu ve değiştirilebilir şekilde monte edilmiş fiberden oluşur. Sistem şırıngaya benzemekle birlikte şırıngadaki iğne yerine koruyucu bir kılıf içerisinde adsorbent ile kaplı kaynaşık silika çubuktan meydana gelen fiber bulunur (Meloan, 1999).

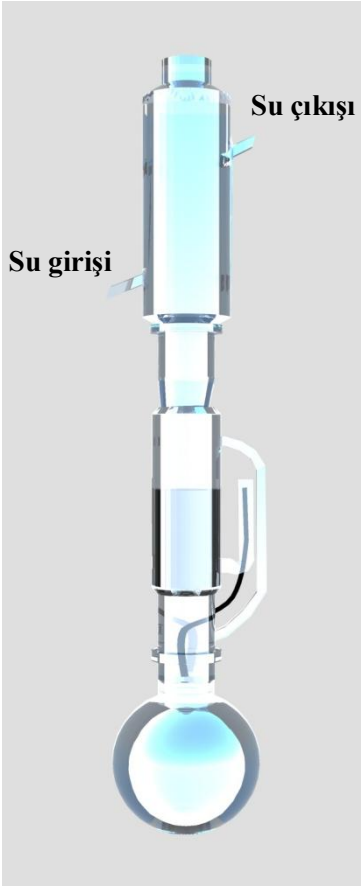
İki aşamalı bir proses olan katı faz mikroekstraksiyonda ilk olarak ön deriştirme işlemi için ekstrakte edilmek istenen organik bileşen, üzeri kaplanmış silika fibere adsorplanır. Daha sonra bu organik bileşenin ayrılması ve tayini için uygun bir cihaz içerisine desorpsiyonu gerçekleştirilir. Bu ekstraksiyon çeşidinde hedeflenen organik bileşiğin ayrılması ve tayini için en önemli etken kullanılacak malzemenin seçimidir. En çok kullanılan sabit faz, havadan ve sudan benzen, toluen gibi çok çeşitli apolar bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan polidimetilsiloksandır. Yüksek sıcaklıklarda

kararlı olması ve şırınga içerisine yerleştirilebilecek uygun silindirik geometriye sahip olması nedeniyle gaz kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle birlikte kullanılabilen en etkin malzeme kaynaşmış-silika polidimetilsiloksan-kaplı fiberdir. Bu yöntem kullanıldığında gerekli olan desorpsiyon olayı gaz kromatografisinin sıcak enjektör kısmında gerçekleşmektedir. Gaz kromatografisinin alev iyonlaşma detektörü, elektron yakalama detektörü gibi farklı detektörlerle birlikte kullanılabilmesi de bileşiklerin daha geniş ve etkin analizinin gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır (Dean, 2009).

2.3.4. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Bitkilerden, topraktan, atık sulardan pestisitler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi organik bileşiklerin ekstraksiyonunda çalkalama hunisi, ultrasonik banyo gibi çok çeşitli yöntemler bunlunsa da geçmişten beri kullanılan Soxhlet ekstraksiyonu bu yöntemler arasında önemli bir yer tutmaktadır.

Tipik bir Soxhlet ekstraksiyonu sisteminde (Şekil 2.1) çözücü rezervuarı, ekstraktör bölümü, ısı kaynağı ve su-soğutmalı geri soğutucu kısmı bulunmaktadır. Bu yöntemde katı örnek ekstraktör bölümünün içindeki tüp kısmında bulunan gözenekli selüloz bir kartuja yerleştirilir. Ekstraktör kısmı organik çözücünün bulunduğu balona ve geri-soğutucuya bağlanır. Çözücünün elektrikli bir ısıtıcı ile ısıtılmasıyla birlikte çözücü buharlaşır ve geri-soğutucu kısmında yoğunlaşarak ekstraktör kısmına iner. Bu şekilde katı örneğin bulunduğu kısım çözücü ile birlikte dolmaya başlar ve bu esnada organik bileşikler katı örnekten çözücüye geçer. Çözücü tüpün üst kısmına kadar arttığında, tüpün üst kısmında bulunan ve organik çözücü içeren balona bağlı bir iç tüpe geçer. Sifon etkisiyle iç tüpte ve ekstraktör kısmında bulunan tüm çözücü balona geçer. Uçuculuğu daha fazla olan çözücü, balondan saf bir şekilde tekrar buharlaşarak aynı işlem tekrar tekrar gerçekleşir (Dean, 2009).



Şekil 2.1. Soxhlet ekstraksiyon sistemi (Dean, 2009).

2.3.5. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Gerçekleştirilecek katı-sıvı faz ekstraksiyonu fazla sayıda ise örneklerin teflon bir kaba konularak mikrodalga enerjisiyle ısıtıldığı mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi daha kullanışlıdır. Mikrodalga enerjisi moleküler yapıdaki değişiklikleri artırmayan, iyonların yer değiştirmesini ve dipollerin rotasyonunu sağlayan iyonlaştırıcı olmayan bir radyasyondur. Çözücü moleküllerinin kutuplanabilirliği (elektrik alanda bazı moleküllerin dipol momentinin uyarılmış olması) çözücünün doğasına ve bağıl elektriksel geçirgenliğine bağlıdır. İki yük arasındaki itme kuvvetiyle ilgili olan bağıl elektriksel geçirgenlik ne kadar büyük olursa verilen frekans için o kadar fazla termal enerji açığa çıkar ve daha hızlı ısınma sağlanır. Hekzan, toluen gibi apolar çözücülerin bağıl elektriksel geçirgenliği düşük olduğundan mikrodalga enerjisinden etkilenmezler. Bu nedenle bu tür çözücüler

mikrodalga destekli ekstraksiyonda kullanılacaksa polar katkılar kullanılmalıdır (Meloan, 1999).

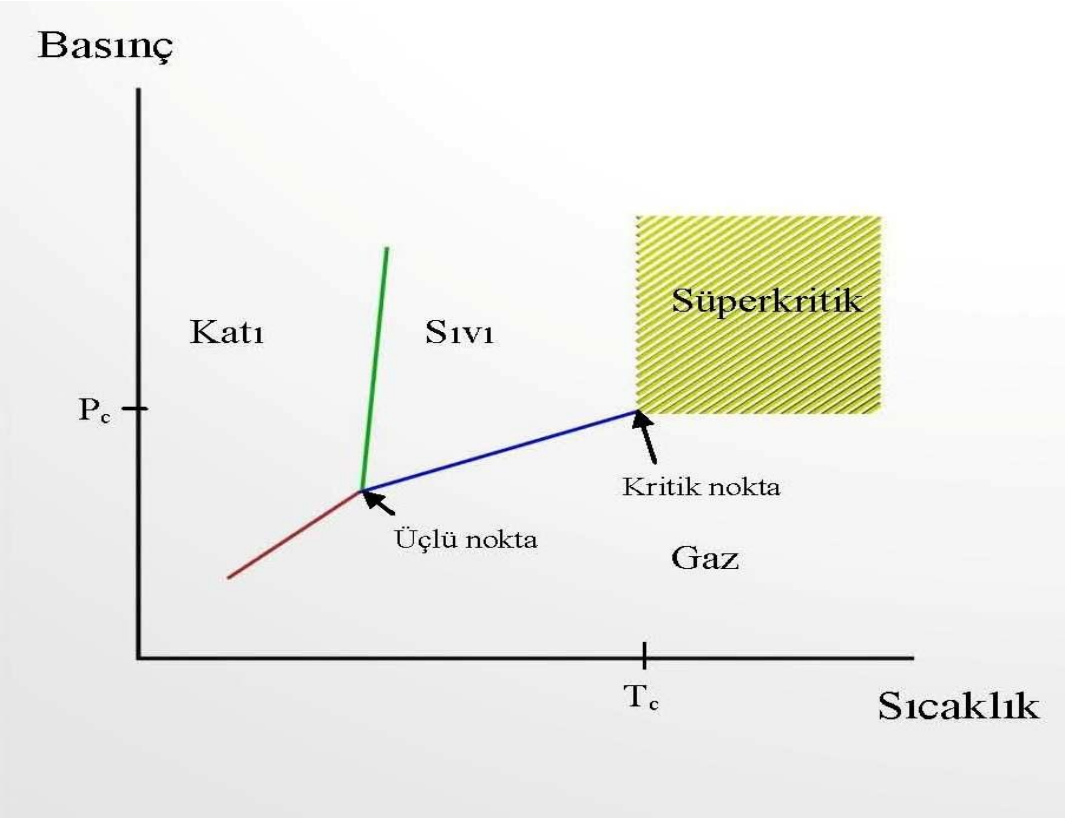
Genel olarak bir mikrodalga sistem, mikrodalga jeneratörü, frekans yönlendiricisi, rezonans boşluğu ve bir güç kaynağından meydana gelmektedir. Ekstraksiyonda kullanılacak örnek, rezonans boşluğu kısmına mikrodalga radyasyonunu absorplayabilecek bir organik çözücüyle birlikte yerleştirilir. Elektromanyetik enerjinin frekans yönlendiricisi yardımıyla mikrodalga jeneratöründen rezonans boşluğu kısmına iletilmesiyle, bu kısımda bulunan örnek ve organik çözücü mikrodalga enerjisine maruz kalır. Ekstraksiyonda kullanılan organik çözücünün dielektrik sabiti ne kadar yüksek olursa çözücünün mikrodalga radyasyonu absorplayıp ısınması o kadar iyi olur. Genel olarak açık (atmosferik) ve kapalı (basınçlı) olmak üzere iki çeşit mikrodalga destekli ekstraksiyon sistemi bulunmaktadır. Açık mikrodalga sistemlerinde ekstraksiyon sıcaklığı organik çözücünün kaynama noktasına kadar olurken, kapalı sistemde genel olarak 200 psi'dan daha düşük basınçlarda ve 110-145°C sıcaklıklarda ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilebilmektedir (Dean, 2009).

2.3.6. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan terimi, kritik sıcaklık ve basıncının üzerinde bir sıcaklık ve basınca sahip olan maddeler için kullanılır (Dean, 2009). Kritik sıcaklık, gaz halindeki maddenin bu sıcaklıktan sonra basınç uygulanarak sıkıştırılsa bile sıvılaştırılamayacağı sıcaklık noktasıdır. Kritik sıcaklıkta gaz halindeki maddenin sıvılaştırılması için gerekli olan basınç değerine de kritik basınç denir (Özkal, 2004). Yani kritik noktadan sonra basıncın artırılması ile sıvılaşma; sıcaklığın artırılmasıyla da gazlaşma meydana gelmez (Dean, 2009). Şekil 2.2'de saf bir bileşen için süperkritik hal bölgesi gösterilmiştir.

Bir madde kritik noktası üzerinde bir basınca sıkıştırılıp, sıcaklığı da artırıldığında süperkritik akışkana dönüşür. Maddenin basıncı artırıldıkça gazın yoğunluğu artarken, sıcaklığın artışı da sıvının yoğunluğunu düşürür ve kritik noktaya gelindiğinde gazın ve sıvının yoğunluğu özdeş olur. Böylelikle sıvı faz ile gaz faz

arasındaki fark kaybolarak, hem sıvı fazın hem de gaz fazın özelliğine sahip tek bir faz halinde süperkritik akışkan oluşur. Süpekritik akışkan, sıvıların yoğunluğuna ve çözücü özelliğine; gazların da yüksek difüzite ile düşük viskozite özelliğine sahiptir. Böylelikle süperkritik akışkan bir gaz gibi hızlı dağılabilme ve bir sıvı gibi maddeleri bileşenlerine ayırarak çözebilme yeteneğine sahip olur. Bu özellikleri sayesinde çözünen madde ve süperkritik akışkan arasında yüksek oranda kütle transferi meydana gelir (Wang, 2005; Özkul, 2004; Patel, 2005). Bu karakteristik özelliklerin gaz, sıvı ve süperkritik haldeki değerleri Çizelge 2.1'de verilmiştir (Brunner, 2005).



Şekil 2.2. Saf bir bileşen için süperkritik hal bölgesi (Brunner, 2005).

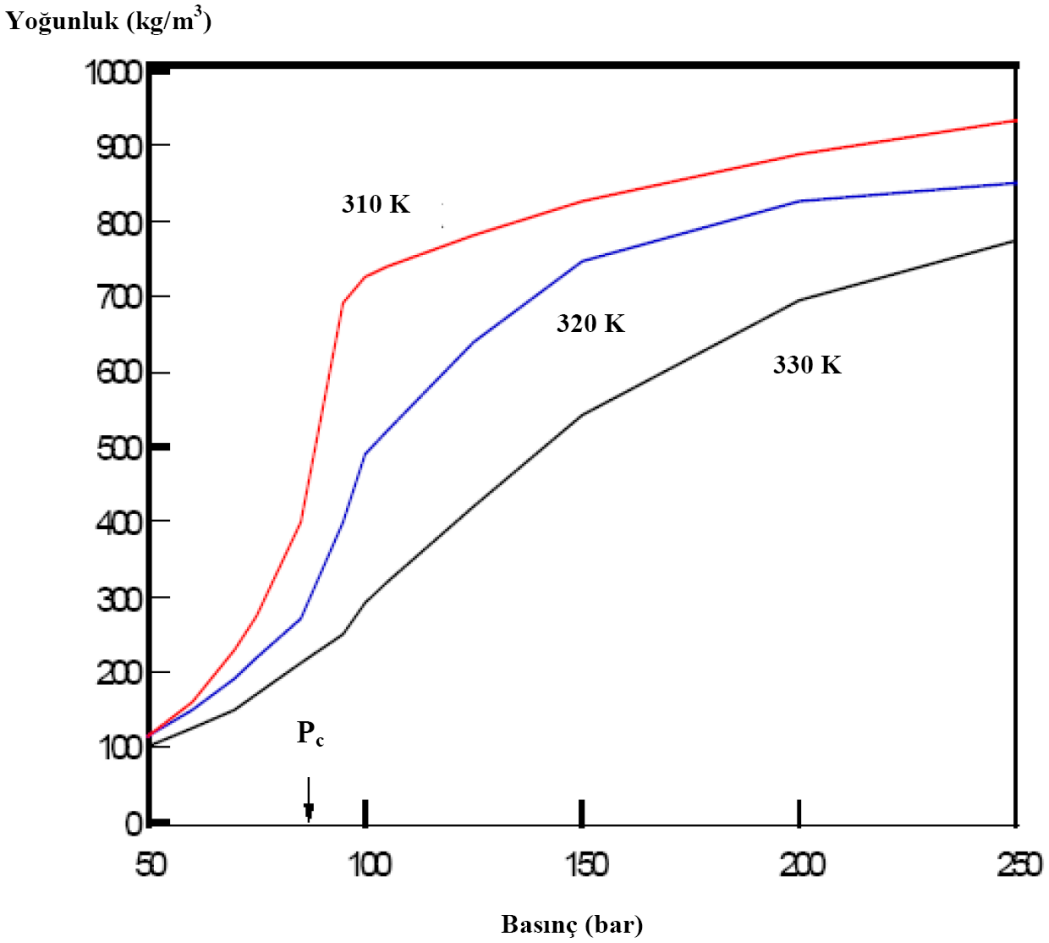
Süperkritik akışkan proseslerinde kütle ve ısı transferi için yürütücü kuvvet potansiyeli denge halindeki fark ile belirlenir. Denge hali, termodinamik dengede gaz özelliğinde olan çözücü tarafından çözülen maddenin miktarı; sıvı veya katı fazda çözünen çözücünün miktarı ile bu fazların denge bileşimleri ve çözücünün seçiciliği hakkında bilgi verir (Brunner, 2005).

Çizelge 2.1. Gaz, sıvı ve süperkritik halin karakteristik değerleri (Brunner, 2005).

Akışkan	**Yoğunluk, ρ (g/cm^3)**	**Difüzite, D (cm^2/s)**	**Viskozite, μ (g/cm.s)**
Gaz (P=1 atm, T=15-30°C)	$(0,6\text{-}2,0).10^{-3}$	0,1-0,4	$(0,6\text{-}2,0).10^{-4}$
Sıvı (P=1 atm, T=15-30°C)	0,6-1,6	$(0,2\text{-}2,0).10^{-5}$	$(0,2\text{-}3,0).\ 10^{-2}$
Süperkritik akışkan $P=P_c$; $T\approx T_c$	0,2-0,5	$0,7.10^{-3}$	$(1\text{-}3).10^{-4}$
Süperkritik akışkan $P=4P_c$; $T\approx T_c$	0,4-0,9	$0,2.10^{-2}$	$(3\text{-}9).10^{-4}$

Süperkritik akışkan, kritik noktası civarında yüksek derecede sıkıştırılabilir özelliğe sahiptir. Bu nokta civarında sıcaklık ve basınçtaki çok az bir değişim yoğunluğun önemli derecede değişmesine neden olur (Özkal, 2004). Bir bileşiğin süperkritik akışkandaki çözünürlüğü buhar basıncına ve yoğunluğa bağlı olup, yoğunluğun ve basıncın artmasıyla çözünürlük artar. Çözücü kuvvetini en fazla etkileyen faktör ise süperkritik akışkanın yoğunluğudur. Basınç ve sıcaklıktaki değişimlerin süperkritik akışkanın yoğunluğunu etkilemesiyle süperkritik akışkanın çözücü kuvveti de değişiklik gösterir. Süperkritik akışkanların bu özelliği sayesinde basınç ve sıcaklıkla çözücü kuvveti artırılabilir ya da akışkanın yoğunluğu ayarlanarak seçici olarak bileşiklerin çözünmesi sağlanabilir (Wang, 2005; Patel, 2005). Yüksek yoğunluğa dolayısıyla daha büyük çözme kuvvetine sahip süperkritik akışkanlar ile normalde sıvı veya gaz haldeki akışkanda çözünürlüğü az olan maddelerin çözünmesi sağlanabilir (Özkal, 2004). Genel olarak basınç sabitken sıcaklık artırıldığında süperkritik akışkanın çözücü kuvveti azalırken; sabit sıcaklıkta basıncın artırılmasıyla birlikte süperkritik akışkanın çözücü kuvveti artar (Patel, 2005). Yüksek basınçlarda çözücülerin çözme kuvvetinin artması, süperkritik koşullarda çözücü moleküllerinin kümeler oluşturarak çözünen maddenin moleküllerini sarması ile açıklanabilir (Meloan, 1999). Süperkritik akışkanın yoğunluğu ne kadar yüksek olursa çözünürlüğün de o kadar arttığı Şekil 2.3'den anlaşılmaktadır. Şekilde düşük sıcaklıkta (310 K), kritik basınç civarında yoğunluk önemli ölçüde değişirken; bu

noktadan sonra sıcaklığın artmasıyla yoğunluktaki değişim çok azdır. Kritik nokta civarında sıcaklığın ve basıncın değiştirilmesiyle yoğunlukta meydana gelen bu değişim sayesinde akışkanın çözücü kuvveti de değişiklik gösterir (Wang, 2005).



Şekil 2.3. Karbon dioksit için yoğunluk-basınç diyagramı (Wang, 2005).

Ekstraksiyon için kullanılacak süperkritik akışkanın seçimi ürün verimi ve seçiciliği için son derece önemlidir (Özkal, 2004). Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda çok geniş yelpazede farklı çözücüler kullanılabilmektedir (Dean, 2009). Bazı yaygın çözücülerin kritik sıcaklık ve basıncı Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2'de verilen değerlere bakıldığında karbon dioksit ve etan gibi apolar bileşiklerin kritik sıcaklığının 50°C'den daha az olduğu, metanol veya su gibi polar bileşiklerin kritik sıcaklığının ise 200°C'den daha yüksek olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, bir bileşenin kritik sıcaklığının önemli ölçüde bileşenin polaritesine

bağlı olmasıdır (Laitinen, 1999). Doğal maddelerin süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılacak çözücü seçiminde genel olarak akışkanın kritik sıcaklık ve basıncı, tehlikeli olup olmaması ve polarlığı göz önüne alınır. Örneğin kullanılacak çözücünün kritik basıncı yüksek ise ekstraksiyonda uygulanacak yüksek basınçlar maliyeti artırırken; çözücünün kritik sıcaklığı yüksek ise uygulanacak yüksek sıcaklıklar ısıya karşı hassas maddelerin bozulmasına neden olabilir (Özkal, 2004).

Çizelge 2.2. Bazı çözücülerin kritik özellikleri (Laitinen, 1999).

Çözücü	Sıcaklık, T_c (°C)	Basınç, P_c (bar)	Yoğunluk, ρ (g/ml)
Amonyak	132,5	113,5	0,24
Benzen	289,0	48,9	0,30
n-Bütan	152,0	38,0	0,23
Karbon dioksit	31,1	73,8	0,45
Klorotriflorometan	28,8	39,5	0,58
Diklorodiflorometan	111,7	39,9	0,56
Etan	32,2	48,9	0,20
Etanol	243,4	63,8	0,28
Etilen	9,3	50,4	0,22
İzopropanol	235,3	47,6	0,27
Metanol	240,5	79,9	0,27
Nitröz oksit	36,5	72,3	0,46
n-Propan	96,8	42,6	0,22
Propilen	91,9	46,2	0,23
Su	374,2	221,2	0,34
Toluen	318,6	41,1	0,29

Süperkritik akışkan teknolojisinde orta düzeyde kritik basınç noktasına (73,8 bar), düşük kritik sıcaklık noktasına (31,1°C) sahip olması; toksik özelliği ve reaktifliğinin az olması; atmosfere doğrudan verilebilmesi; hava ve ışığa maruz kaldığında kimyasal değişime uğraması ihtimalinin düşük olması, ucuz olması ve alkanlar gibi apolar bileşikler için ideal bir ekstraksiyon akışkanı olması nedeniyle en çok karbon dioksit (CO_2) kullanılır. Karbon dioksitin dezavantajları ise apolar olmasından dolayı büyük ölçekli uygulamalar için yetersiz çözücü kuvvetine sahip olması ve polar bileşiklerin ekstrakte edilmesinde çok etkin olmamasıdır. Karbon dioksitle birlikte etanol gibi polar bir çözücü kullanılarak polar bileşiklerin de ekstrakte edilebilmesine olanak sağlanır (Dean, 2009; Patel, 2005).

Süperkritik akışkanın basıncında ya da sıcaklığındaki küçük bir değişim, süperkritik akışkanın yoğunluğuna büyük ölçüde etki eder. Süperkritik akışkanın çözücü kuvveti de önemli oranda kritik noktadaki yoğunluğuna bağlı olup, genel olarak yüksek yoğunluk güçlü çözücü kuvveti sağlar. Sıcaklık ve basınçtaki küçük değişimlerle yoğunluğunun önemli ölçüde değiştirilebilmesi süperkritik akışkanların sahip olduğu önemli bir özelliktir. Basıncın artırılması ile süperkritik akışkanın yoğunluğu artarak sıvıya benzer bir hale gelse de, vizkozitesi ve difüzitesi sıvı ve gaz değerleri arasında kalır (Laitinen, 1999). Süperkritik akışkanın vizkozite ve difüzite değerleri ve bu değerlerdeki değişimler sıcaklık ve basınca bağlıdır. Kritik nokta civarlarında vizkozite ve difüzitedeki değişiklik daha fazla olur. Sıcaklık arttığında süperkritik akışkanın difüzitesi artarken, vizkozitesi düşer (Taylor, 1997). Süperkritik akışkanın yüzey geriliminin sıfıra yakın olması da mikrogözenekli malzemelere kolay bir şekilde nüfuz edebilmesine olanak sağlar. Bu fizikokimyasal özellikler ekstraksiyon işlemlerinde süperkritik çözücülerin sıradan organik sıvı çözücülerden daha etkili olmasını sağlar (Laitinen, 1999). Gazlara benzer viskozite ve difüziteye, sıvılara benzer yoğunluğa ve basınca bağlı olarak değişen çözücü kuvvetine sahip olmaları süperkritik akışkanları ekstraksiyon için önemli hale getirmektedir (Taylor, 1997).

Klasik ekstraksiyon ve Soxhlet ekstraksiyonu gibi geleneksel metodlar ekstraksiyon için etkili olsalar da; yüksek ekstraksiyon sıcaklıklarında ısıya karşı hassas bileşikler bozunabilir. Ayrıca bu metodlarda kullanılan zehirli çözücüler az miktarda da olsa çözünen maddede kalabilir. Bu dezavantajları sebebiyle geleneksel metodların besin ve tıbbî ekstraktların eldesinde kullanılması sorun teşkil etmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yönteminin çeşitli koşullarda uygulanabilmesiyle seçici olarak daha yüksek kalitede, daha değerli spesifik ürünler elde edilebilmektedir (Özkal, 2004).

Süperkritik çözücülerin organik bileşikleri çözebilme özelliği, 1930'larda geliştirilen ve halen günümüzde uygulaması olan motor yağlarından asfaltın ayrılması; Solexol prosesi adı verilen balık yağından A vitamininin ekstrakte edilmesi gibi işlemlerle yıllardan beri endüstride kullanılmaktadır (Laitinen, 1999).
Endüstriyel ölçekte süperkritik akışkan ekstraksiyon prosesleri ekstraktın elde edileceği maddeye göre farklı uygulama türlerine sahiptir. Katı maddelerden

ekstraksiyon işlemlerinde genellikle kesikli ya da tek basamaklı sistemler kullanılmaktadır. Bunun nedeni katıların sürekli sistemlerde basınçlı kazanlarda idare edilmesinin zor olmasıdır. Akışkan karışımlarından ekstraksiyonun gerçekleştirildiği proseslerde ise genel olarak çok basamaklı sistemler kullanılmaktadır. Çok basamaklı sistemler arasında ters akımlı olarak çalışanlar en etkili proseslerdir (Brunner, 2005).

Tek basamaklı süperkritik akışkan ekstraksiyon prosesleri büyük ölçekli ve küçük ölçekli olmak üzere iki şekilde kullanılabilir. Büyük ölçekli prosesler genel olarak besin endüstrisinde kahve çekirdeklerinden ve siyah çay yapraklarından kafein eldesi, şerbetçi otundan keskin aromaların eldesi gibi işlemler için kullanılmaktadır. Şifalı bitkiler ile baharatlardan esansiyel yağların, oleoresinlerin ve değerli bileşiklerin ekstraksiyonu gibi prosesler ise küçük ölçekli olarak yürütülmektedir (Brunner, 2005).

Çok basamaklı proseslerde gerekli çözücü miktarını azaltması, üretim hacmini artırması ve yüksek ekstrakt derişimleri elde edilmesine olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı ters akımlı sistemlerin daha etkin olmasını sağlamaktadır. Bu proseslerin endüstriyel boyutta tokoferol ve tokotrienollerin zenginleştirilmesi, alkol ve suyun ayrılması, narenciye yağlarının ayrılması, karotenoidlerin zenginleştirilmesi gibi işlemlerde uygulamaları bulunmaktadır (Brunner, 2005).

Süperkritik akışkanlar tepken, katalizör ve ürünler için reaksiyon ortamı olarak görev yapabilir ya da hem çözücü hem de tepken olarak davranabilirler. Bununla birlikte süperkritik akışkanın çözücü gücü basınçla değiştirilerek polietilen, etilen tabanlı polimerler ve polisiloksan gibi polimerlerin parçalanması işlemleri için kullanılabilir. Süperkritik su oksijenasyonu, süperkritik suyun apolar bir çözücü olarak davranarak toluen gibi organik bileşikler ve oksijen, hidrojen gibi gazlar için tam bir karışma sağlaması özelliğinden faydalanarak organik atıkların bertaraf edilmesinde kullanılabilir. Süperkritik koşullarda klorlu hidrokarbonlar gibi organik bileşikler hızlı bir şekilde karbon monoksit, su ve hidroklorik aside dönüşebilmektedir (Laitinen, 1999).

1870'li yıllarda kobalt (II) klorürün, demir (III) klorürün, potasyum bromürün ve potasyum iyodürün süperkritik etanolde çözünürlüğünün incelendiği çalışma ile katıların çözünürlüğünün süperkritik akışkan içerisinde önemli ölçüde arttığı keşfedilmiştir. Endüstriyel olarak ise süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunun ilk ticari kullanımı yiyecek ve meşrubat sanayinde gerçekleşmiştir. 1970'lerde yapılan çalışmada ise kahvenin kafeinsizleştirilmesi için süperkritik karbon dioksitin kullanılması süperkritik ekstraksiyon işlemleri için önemli bir gelişme olmuştur. Besin endüstrisinde organik bileşiklerin ekstraksiyonu için süperkritik karbon dioksit yaygın olarak kullanılmaktadır. Süperkritik karbon dioksit limon yağının ekstraksiyonu, nikotin ekstraksiyonu, fasulye ve ayçiçeğinden lipitlerin ekstraksiyonu gibi işlemlerde endüstriyel olarak da kullanımı mevcuttur (Wang, 2005). Özellikle besin endüstrisinde süperkritik karbon dioksitin kullanılmasının en önemli nedeni düşük olan kritik sıcaklığının (Tc=31,1°C), termal olarak dayanıksız olan besin bileşiklerinin ekstrakte edilebilmesini sağlamasıdır. Bununla birlikte ucuz olması, zehirli olmaması ve bazı geleneksel organik çözücülerin aksine ekstraksiyon sonrasında zararlı kalıntılar bırakmaması da süperkritik karbon dioksitin besin endüstrisinde kullanımında önemli rol oynamaktadır (Laitinen, 1999). Bunların dışında normal basınç değerlerinde kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve yiyeceklerde az miktarda bulunmasının zararlı olmaması gibi özellikleri de besin endüstrisi için uygun bir bileşik haline getirmektedir. Süperkritik karbon dioksit apolar ve az oranda polar olan ve düşük molekül ağırlıklı bileşikler için iyi bir çözücüdür (Brunner, 2005). Süperkritik karbon dioksitin bazı çözücü özellikleri şu şekildedir:

- Orta düzeyde molekül ağırlığına sahip oksijenli organik bileşikleri çekim gücü yüksektir.
- Serbest yağ asitleri ve bunların gliseritleri ile pigmentler daha az çözünürdür.
- 100°C'den düşük sıcaklıklarda suyun çözünürlüğü çok azdır.
- Proteinler, polisakkaritler, şekerler ve mineral tuzları çözmez.
- Basınç arttığında süperkritik karbondioksit az uçucu, yüksek molekül ağırlığına sahip veya daha polar bileşikleri ayırma özelliğine sahip olur (Brunner, 2005).

Bu özelliklerine rağmen süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu sonucunda elde edilen ürün verimi düşük olmaktadır. Yapısında %10'dan fazla su bulunduran

örneklerdeki su karbondioksitin örnek ile etkileşimine engel olarak ekstraksiyonu azaltabilmekte ya da ekstraksiyonu bozabilmektedir. Bunun için kurutucu maddeler kullanılması, örneklerin kurutularak suyun uzaklaştırılması gibi çeşitli yöntemlerle suyun uzaklaştırılması gerekmektedir. Ayrıca apolar bir bileşik olan karbondioksit polar bileşiklerin ekstrakte edilmesi için uygun bir çözücü değildir. Bu nedenle karbon dioksitle birlikte etanol, metanol gibi yardımcı ya da tamamlayıcı çözücüler kullanılmaktadır. İnsan vücuduna zararının çok az olması ve besin ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi nedeniyle doğal ürünlerin ekstraksiyonunda yardımcı veya tamamlayıcı olarak kullanılan en yaygın çözücü etanoldür (Meloan, 1999; Asep et al., 2013). Karbon dioksitle birlikte kullanılan tamamlayıcıların polarlaştırılabilme özelliğine sahip karbon dioksitin polarlığını değiştirdiği ya da çözünen etrafında çözücü küreler şeklinde bulunarak ekstraksiyona müdahil olduğu düşünülmektedir (Meloan, 1999).

2.3.6.1. Süperkritik Etanol

Biyokütleden fermentasyonla elde edilebilen etanol süperkritik akışkan teknolojisinde yaygın olarak kullanılan yenilenebilir bir çözücüdür (Akalın et al., 2013b). Etanolün kritik noktasının (≈241°C sıcaklık ve 6,3 MPa) üstündeki koşullardaki etanole süperkritik etanol adı verilir. Yaygın olarak teknolojide ve bilimsel uygulamalarda kullanılsa da özellikle kritiğe yakın ve süperkritik koşullarda saf etanolün termodinamik özellikleriyle ilgili fazla sayıda çalışma bulunmamaktadır. Yüksek polariteye sahip olması nedeniyle etanol süperkritik akışkan teknolojisinde genellikle yardımcı ya da tamamlayıcı çözücü olarak, çözünen maddenin çözünürlüğünü ve süperkritik akışkanın seçiciliğini artırmak amacıyla kullanılabilmektedir. Bunun dışında etanolün yenilenebilir biyo-yakıt olarak kullanımı da yaygındır. Literatürde saf etanolün kritik nokta civarı ve süperkritik koşullardaki termodinamik özellikleriyle ilgili fazla bilgi olmamasının yanında, kritik nokta civarında mevcut deneysel veriler de geniş oranda farklılıklar göstermektedir. Etanolün 20°C'deki yoğunluğu 0,789 g/mL olup; kaynama noktası ≈78°C, kritik sıcaklığı 241°C (±6), kritik basıncı da 63 bar (±4)'dır. Etanolün kritik nokta civarı ve süperkritik koşullardaki yoğunluğunu belirlemek için gerçekleştirilen çalışmada 373-673 K arasındaki sıcaklıklarda, 0,226-40,292 MPa basınç koşullarında

gerçekleştirilen deneylerde etanolün yoğunluğunun 0,092-0,498 g/cm^3 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Bazaev et al., 2007). Kritik sıcaklığın altındaki 200°C sıcaklıkta basıncın 5 MPa'dan 65 MPa'a yükselmesiyle etanolün yoğunluğu 0,56 g/cm^3'den 0,70 g/cm^3'e artmaktadır. Kritik sıcaklıkta kritik basınç noktasında 0,44 g/cm^3 civarında olan yoğunluk, basıncın yükselmesiyle (65 MPa) 0,63 g/cm^3 civarına yükselmiştir. Kritik sıcaklığın biraz üzerindeki sıcaklıkta (280°C), 5-15 MPa değerleri arasında basınçtaki değişim etanolün yoğunluğunu önemli ölçüde etkilemiştir. Süperkritik hale geçilmeye başlanan ve süperkritik hale geçilen bu koşullarda, düşük basınçlarda (≈5 MPa) yoğunluk 0,08 g/cm^3 civarındadır. Basınç 15 MPa'a kadar yükseltiğinde etanolün yoğunluğu 0,48 g/cm^3'e kadar çok hızlı bir şekilde yükselmektedir. Bu noktadan sonra basıncın yükseltilmesi (65 MPa) etanolün yoğunluğunun 0,62 g/cm^3'e kadar artmasına neden olmaktadır (Bazaev et al., 2007). Süperkritik akışkanların sahip olduğu basınç ya da sıcaklıktaki küçük değişimlerin, süperkritik akışkanın yoğunluğuna büyük ölçüde etki etme özelliği süperkritik etanolde de görülmektedir. Süperkritik akışkanın çözücü kuvveti de önemli oranda akışkanın yoğunluğuna bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak süperkritik akışkanın yüksek yoğunluğa sahip olması iyi bir çözücü kuvveti sağlamaktadır (Laitinen, 1999).

2.3.6.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu için Literatür Taraması

Asep vd. kakao yağından trigliseritlerin ve yağ asitlerinin süperkritik karbon dioksit ile ekstraksiyonunda polar yardımcı çözücülerin (etanol, izopropanol ve aseton) etkisini incelemişlerdir (Asep et al., 2013). Çalışmada en yüksek verimin etanol kullanıldığında elde edildiği ve kullanılan etanol derişiminin artırılmasıyla ekstrakt veriminin arttığı rapor edilmiştir. Ito ve Cao üzüm çekirdeği yağından lipidleri ekstrakte etmek için saf süperkritik karbon dioksit ve karbon dioksitle birlikte etanol kullanmıştır (Ito and Cao, 2003). Saf karbon dioksit kullandıkları deneylerde en yüksek verimi (%6,2) 30-40 MPa basınç ve 35-40°C sıcaklık koşullarında elde etmişlerdir. Aynı koşullarda süperkritik karbon dioksitle birlikte tamamlayıcı çözücü olarak %10 etanol kullandıklarında elde ettikleri verimin %4 oranında daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir. Lee vd. Tayvan mandalinası (*Citrus depressa* Hayata) kabuklarından süperkritik karbondioksit ve etanol ekstraksiyonu ile elde edilen

nobiletin ve tangeretin verimine tamamlayıcı çözücü çeşidi (etanol ve metanol), tamamlayıcı çözücü yüzdesi, sıcaklık, basınç gibi ekstraksiyon koşullarının etkisini incelemişlerdir (Lee et al., 2010). Tamamlayıcı çözücü olarak etanolün kullanıldığı deneylerde elde edilen nobiletin ve tangeretin verimi metanol kullanılan deneylerden daha yüksek olmuştur. Ayrıca etanol yüzdesinin %9,1'e kadar artırılmasıyla elde edilen ürün verimlerinde artış meydana gelmiştir. Etanol ve metanol gibi tamamlayıcı çözücülerin hidrojen bağlanmalarıyla maddelerin çözünürlüğünü artırdığı düşünülmektedir. Çalışmada metanol kullanılan deneylerden elde edilen verimin etanol kullanılan deneylerden daha düşük olması ve etanolün zehirli olmaması nedeniyle daha uygun bir tamamlayıcı çözücü olarak etanol seçilmiştir.

Garmus vd. pitanga (Brezilya kirazı) yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için 60°C sıcaklık, 400 bar basınçta tek basamaklı ve sıralı olarak süperkritik karbon dioksit, etanol ve su ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir (Garmus et al., 2014). Sıralı ekstraksiyonla gerçekleştirilen deneylerden elde edilen etanol ekstrakt veriminin (%16) süperkritik karbon dioksit ekstrakt veriminden (%5) daha yüksek olmuştur. Ekstraksiyon basamakları ayrı ayrı karşılaştırıldığında tek basamaklı yalnızca süperkritik etanol ile gerçekleştirilen deneyden elde edilen toplam verimin (%20) sıralı olarak süperkritik karbon dioksit ve etanol ekstraksiyonundan elde edilen verimden (%16) daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca etanolün süperkritik karbon dioksitte çözünen bileşikleri de ekstrakte ettiği belirtilmiştir.

Martinez-Correa vd. *Baccharis dracunculifolia* yapraklarından polifenollerin, flavonoidlerin, artepillin C'nin ekstrakte edilmesi için süperkritik karbon dioksit, etanol ve suyun kullanıldığı tek basamaklı ve iki basamaklı ekstraksiyon sistemlerini incelemişlerdir (Martinez-Correa et al., 2012). Çalışmada tek basamaklı ve iki basamaklı proseslerde en yüksek toplam polifenol derişimlerinin etanol kullanılan ya da sıralı olarak etanol ekstraksiyonu yapılan deneylerden elde edildiği rapor edilmiştir. Karabibergillerden *Piper piscatorum* yapraklarının süperkritik ekstraksiyonunun 400 bar ve 40-70°C sıcaklıklarda gerçekleştirildiği çalışmada karbon dioksitle birlikte yardımcı çözücü olarak etanol ve metanol kullanılmıştır (Pimentel et al., 2013). Çalışmada elde edilen ekstrakttaki başlıca bileşenlerden olan

piperovatine ve pipercallosidine bileşiklerinin verimleri de incelenmiş ve en yüksek verimlerin süperkritik karbondioksitle birlikte etanolün kullanıldığı (400 bar ve 40°C) deneyden elde edildiği rapor edilmiştir.

Yüksek lipid içeriğine sahip özel bir malzeme olan *Saccharomyces cerevisiae* kurutulmuş membran karışımından lipidlerin ekstraksiyonu için süperkritik karbon dioksit ve yardımcı çözücü olarak da etanol (%9, w/w) kullanılmıştır (Hegel et al., 2011). Gerçekleştirilen deneylerde (20 MPa ve 40°C) seçici olarak trigiliseritlerin ve fosfolipidlerin ekstraksiyonu incelenmiştir. Çalışmada fosfolipitlerin ekstraksiyonu için etkili olmayan süperkritik karbon dioksitin trigiliseritler gibi doğal lipidlerin ekstrakte edilmesinde kullanılabildiği ancak etanol gibi polar çözücülerin eklenmesiyle daha etkili bir şekilde trigiliseritlerin ekstrakte edilebildiği ve fosfolipidlerin de ekstrakte edilmesine olanak sağladığı rapor edilmiştir.

Soya fasulyelerinin püre haline getirilmesi işleminden arta kalan küspe olan okaradan yağ bileşenlerinin geri dönüşümü için tamamlayıcı çözücü olarak etanol ile birlikte süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Quitain et al., 2006). 40-80°C sıcaklık ve 12-30 MPa basınç koşullarında gerçekleştirilen deneylerde en yüksek yağ geridönüşümü (%63,5) 40°C sıcaklık, 20 MPa basınç ve %10 mol etanol kullanılan koşullardan elde edilmiştir. Çalışmada etanolün tamamlayıcı olarak kullanılmasıyla (%10 mol) elde edilen ekstrakt veriminin yalnızca süperkritik karbon dioksit kullanılmasıyla elde edilen verimden yaklaşık üç kat fazla olduğu rapor edilmiştir. Apolar olan karbon dioksitin polar bileşiklerin ekstraksiyonunda çok etkin olmadığı, ancak tamamlayıcı olarak etanol kullanılmasının karbon dioksitin ekstraksiyon gücünü artırarak ekstraktlardaki polifenollerin ve izoflavonların miktarını önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir.

2.4. DENEYSEL TASARIM

Deneysel tasarım genel olarak deneylerin bir yönteme göre planlanıp tasarlanmasından sonra belirlenen tasarım çerçevesinde deneylerin gerçekleştirilmesiyle elde edilen sonuçların istatistiksel ve uygulamalı matematiğin analiz yöntemleriyle değerlendirilerek incelenmek istenen sistem için bir model

oluşturulmasıdır (Webster, 2002). Matematiksel olarak faktörler ile cevap arasında sebep sonuç ilişkisi oluşturan deneysel tasarım yöntemi istenilen tasarım değişkenlerinin (bağımsız değişkenler ya da faktörler) elde edilen sonuçlara (cevap değişkenleri ya da bağımlı değişkenler) etkilerinin belirlenmesi ve elde edilen sonuçların değerlendirilerek analiz edilmesi temeline dayanır (Montgomery, 2005; Bozan, 2012).

Deneysel tasarım alanında çalışmalar ilk olarak 1920'li yıllarda Ronald Fisher tarafından iklim koşulları, gübre çeşidi gibi faktörlerin ürünlere etkisini incelemek amacıyla tarım alanında kullanılmıştır. Aynı dönemlerde varyans analizi ve çok etkenli tasarımlarla ilgili çalışmalar gerçekleştirilmiş olup; 1950'li yıllardan itibaren üretimde ve ürünlerde kaliteyi artırmak amacıyla deneysel tasarım üzerindeki çalışmalar artmıştır. Optimum koşulların belirlenmesi amacıyla Box ve Wilson tarafından cevap yüzeyi yöntemi geliştirilmiştir. Box ve Wilson tarafından geliştirilen cevap yüzey yönteminin önceki çalışmalardan farkı cevap eğrileri yerine cevap yüzeyleriyle ilgileniyor olmasıdır. Bunun dışında Box ve Wilson gerçekleştirdikleri çalışmalarla merkezi kompozit tasarımın geliştirilmesine katkıda bulunmuşlardır. Daha sonraki yıllarda araştırmacılar tarafından bu çalışmalara paralel olarak çok çeşitli tasarımlar geliştirilmiştir. 1990'lardan sonra ise deneysel tasarım yöntemi özellikle de cevap yüzeyi yöntemi verimliliği artırmak amacıyla kimya, tıp, gıda, otomotiv sanayi gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır (Baş, 2010).

Tipik bir deneysel tasarımda değiştirilebilen parametreler, etkenler, model parametreleri, bağımsız değişkenler gibi çeşitli terimlerle de adlandırılan faktörler mevcuttur. Bu faktörler kullanılan modelden elde edilen sonuçlara etki eden bağımsız değişkenler olup, çalışılan bilim dalına bağlı olarak incelenmek istenen sıcaklık, gübre miktarı, basınç gibi hemen her türlü değişken faktör olarak belirlenebilir (Baş, 2010). Deney tasarımı aşamasında faktörlerle birlikte deney sonunda incelenmek istenen cevaplar da belirlenir (Bozan, 2012). İncelenmek istenen cevaplar ve faktörler belirlendikten sonra bu faktörler için faktör seviyeleri, faktör aralığı gibi terimlerle de adlandırılan faktör değerleri yani bir çalışma aralığı belirlenir. Faktör değerleri dolayısıyla deney planması belirlenirken araştırıcının

konu hakkındaki bilgisi ve tecrübesi önemli rol oynar (Webster, 2002). Bunun dışında faktör değerlerinin belirlenmesinde çalışılan sistemin limitleri de göz önüne alınmalıdır. Örneğin belirli bir basınca veya sıcaklığa dayanabilen cihazda ya da sistemde çalışılıyorsa, faktör değerleri dolayısıyla çalışma sınırları belirlenirken sistemin dayanabileceği maksimum basınç veya sıcaklık değerleri de göz önüne alınmalıdır. Faktör değerleri belirlendikten sonra kullanılan yönteme göre deney planlaması ortaya çıkar ve deneyler buna göre gerçekleştirilir. Planlanan ve tasarlanan deneylerden elde edilen, araştırıcının incelemek istediği sonuçlar bağımlı değişkenler, bağımlı parametreler, cevap değişkenleri gibi terimlerle de adlandırılabilen ve faktörlerin bir fonksiyonu olan cevaplardır (Webster, 2002; Baş, 2010).

Deneysel tasarım alanında gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda faktörler ile cevaplar arasındaki ilişkileri, faktörlerin birbiri arasındaki etkileşimleri analiz etmek amacıyla cevap yüzeyi yönteminde genel olarak birinci dereceden modeller için kullanılan tam faktöryel (full factorial) deney tasarımı, kesirli faktöryel (fractional factorial) deney tasarımı, Plackett-Burman tasarımı ve ikinci dereceden modeller için kullanılan merkezi kompozit tasarım, Box-Behnken tasarımı gibi çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir (Baş, 2010; Bradley, 2007; Webster, 2002; Öztürk, 2007).

2.4.1. Birinci Dereceden Modeller için Tasarımlar

Cevap yüzeyi yöntemlerinin amaçları optimum cevabın bulunması, faktörlerin değişiminin cevaba nasıl bir etkisinin olduğunun belirlenmesi ve faktörler (bağımsız değişkenler) ile cevap arasındaki fonksiyonel ilişkinin deney sonuçlarına göre belirlenmesidir. Bu ilişkinin belirlenmesinde basit yapıda olmalarından dolayı düşük dereceli polinomlar, yüksek dereceli polinomlara göre daha çok tercih edilmektedir. Ancak yüksek dereceli polinomların kullanılmasının gerekli olduğu durumlar da mevcuttur. Faktörler ile cevabın ilişkisini belirleyen fonksiyon, cevap değişkeni (bağımlı değişken) ile faktörlerin (bağımsız değişkenlerin) lineer bir fonksiyonu olduğunda birinci dereceden bir modeldir (Bradley, 2007; Baş, 2010).

Birinci dereceden modelin genel denklemi şu şekildedir:

$$y= \beta_0+\sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i \qquad (i=1,2,\ldots\ldots,k) \qquad (2.1)$$

$$y= \beta_0+ \beta_1x_1+ \beta_2x_2+ \beta_3x_3+\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots + \beta_kx_k \qquad (2.2)$$

y: Bağımlı değişken

$x_1, x_2,\ldots, x_k$: Bağımsız değişkenler

$\beta_0, \beta_{1,\ldots,} \beta_k$: Regresyon sabitleri

Birinci dereceden modeller; bağımsız değişkenler ile cevap (bağımlı değişken) arasındaki matematiksel ilişkiyi temsil eden modellerdir ve regresyon modeli olarak da adlandırılır. Burada $x_1,x_2,\ldots,x_k$ bağımsız değişkenleri (faktörleri), y gözlenen cevap değeri ve $\beta_0, \beta_{1,\ldots,} \beta_k$ ise regresyon sabitlerini göstermektedir (Bradley, 2007; Baş, 2010). Birinci dereceden modeller düz yüzeyleri tanımlamada kullanılırlar ve bu modeller fonksiyon bölgesinin çok büyük ve çok fazla eğimli olmadığı durumlarda uygundur (Bradley, 2007).

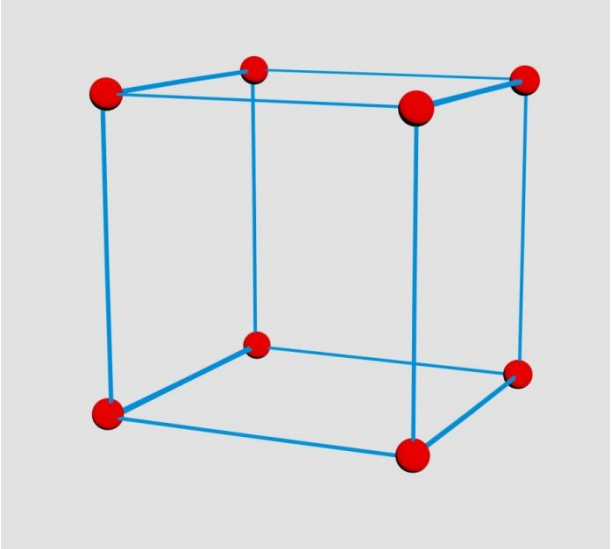
2.4.1.1. Faktöryel Deney Tasarımları

Bu deneysel tasarım yönteminde faktörler birlikte değiştirilerek etkileşimler incelenir. Bu yöntemin en önemli özelliklerinden biri deneysel verilerin etkili kullanımı ve ana etkiler ile ilgilenilen etkileşimlerin değerlendirilmesinde klasik yöntemlere göre daha az sayıda deney yapılmasını sağlamasıdır (Webster, 2002). Faktöryel tasarımlar çoğunlukla fazla sayıda olası faktörler bulunduğunda ya da eleme için kullanılır. Eleme işlemi cevap üzerinde hangi faktörlerin önem etkisine sahip olduğunun belirlenmesi ve önem etkisine sahip olmayan faktörlerin göz ardı edilmesidir (Öztürk, 2007; Webster, 2002).

Tam Faktöryel Deney Tasarımları

Tam faktöryel deney tasarımında her faktörün bütün değerlerinin kombinasyonları bütün aralıklarda test edilir. Bu nedenle en eksiksiz faktöryel deney tasarımı çeşididir

(Montgomery, 2005). Tam faktöryel tasarımın bu özelliği bütün ana etkileri ve tüm olası etkileşimleri hesaplamasına olanak sağlayarak önemli bir avantaj teşkil eder (Webster, 2002). Ancak bu tasarım yönteminin diğer tasarım yöntemlerine göre dezavatajlarından bir tanesi deney sayısını ve dolayısıyla da maliyeti önemli derecede artırmasıdır. Bu dezavantajın önüne geçebilmek için tam faktöryel tasarımda genel olarak her bir faktör için minimum ve maksimum olmak üzere iki değer kullanılır. Bu çeşit tam faktöryel tasarımlar, gerçekleştirilecek deney sayısını veren formüle bağlı olarak 2^k tasarımlar ya da iki düzeyde tam faktöryel tasarımlar olarak adlandırılabilir (Öztürk, 2007; Webster, 2002). Burada k değeri faktörlerin sayısı göstermekte olup, 2^k formülü ile tasarımdaki deney sayısı hesaplanabilir. Örneğin üç faktörlü bir 2^k tasarımı için gerçekleştirilecek deney sayısı 8 olarak hesaplanır. Faktör için verilen minimum ve maksimum değerlere bağlı olarak, faktörün verilen bu değerler arasında cevaplara olan etkisi incelenir. Eğer faktör önemli ise faktörün aradaki değerlerinin cevaba olan etkisini incelemek ve bu etkileri daha iyi anlamak amacıyla ara değerlerde daha fazla deney yapılabilir. Eğer faktör önemsiz ise ilerleyen deneyleri basitleştirmek adına faktör sabit tutulabilir (Webster, 2002). Tam faktöryel tasarımların önemli bir eksikliği gerçekleştirilecek deney sayısının fazla olmasıdır. Deney sayısını azaltmanın yollarından biri 1/2, 1/4 şeklinde kesirli faktöryel tasarımlar kullanmaktır. Bu şekildeki kesirli faktöryel tasarımlar deney sayısının 2'nin kuvvetine eşit olduğu koşullarda kullanılabilir (Öztürk, 2007). Üç faktörlü tam faktöryel tasarımın şematik gösterimi Şekil 2.4'de verilmiştir (Brereton, 2004).

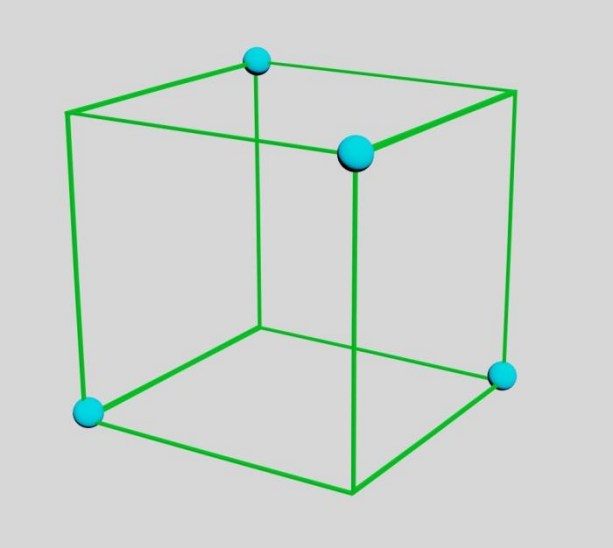


Şekil 2.4. Üç faktörlü tam faktöryel deney tasarımı (Brereton, 2004).

Kesirli Faktöryel Tasarım

Tam faktöryel tasarımlar, her seferde bir değişkenin değiştirilebildiği klasik tasarımlardan daha az deney sayısı verseler de faktör sayısının çok olduğu durumlarda tam faktöryel tasarımlardaki deney sayısı da artmaktadır. Bu gibi durumlarda kullanılan kesirli faktöryel tasarım deney sayısını azaltır ancak tam faktöryel tasarımlara kıyasla sonuçlar hakkında daha az bilgi sağlaması eksik yanlarından biridir. Örneğin kesirli faktöryel tasarımda tüm faktörler arasındaki bütün etkileşimlerin hesaplanması mümkün olmamaktadır. Ancak araştırıcının modellenen sistem hakkında bilgisi ile hangi faktörlerin etkileşiminin olup olmayacağı tahmin edilerek bu eksiklik giderilebilir. Deney sayısını azaltmak adına kullanılan kesirli faktöryel tasarımların da çeşitli türleri bulunmaktadır. Yarım-kesirli tasarım kullanıldığında elde edilen deney sayısı tam faktöryel tasarımdaki deney sayının yarısı olurken; çeyrek-kesirli tasarım kullanılırsa elde edilen deney sayısı tam faktöryel tasarımın dörtte biri olmaktadır. Bu yöntemler kullanılarak deney sayısı azaltılabilse de eğer tasarlanan sistemdeki faktör sayısı 8'den az ise gerekli etki değerlendirilmesinin yapılabilmesi için tam faktöryel tasarımdaki deney sayısının en az yarısı kadar deney gerçekleştirilmelidir. Kesirli faktöryel tasarımın önemli avantajlarından biri önceden gerçekleştirilmiş olan kesirli faktöryel tasarımdan elde edilen verilerin daha geniş başka bir kesirli faktöryel tasarımda da kullanılabilir

olmasıdır. Deney tasarlanırken hangi kesirli faktöryel tasarımın kullanılacağına karar verirken gerçekleştirilebilecek deney sayısı ve hangi etkilerin ölçülmek istendiği konuları göz önüne alınmalıdır (Webster, 2002). Üç faktörlü yarım kesirli bir faktöryel tasarımın şematik gösterimi Şekil 2.5'de verilmiştir (Brereton, 2004). Görüldüğü gibi 3 faktörlü bir tam faktöryel tasarımda gerçekleştirilmesi gereken deney sayısı 8 iken, yarım kesirli faktöryel tasarımda gerçekleştirilmesi gereken deney sayısı 4 olmaktadır.



Şekil 2.5. Üç faktörlü yarım kesirli faktöryel tasarım (Brereton, 2004).

2.4.1.2. Plackett-Burman Tasarımı

Kesirli faktöryel tasarımların özel bir türü olan Plackett-Burmann tasarımlarında, gerçekleştirilecek deney sayısı 2^{k+1} formülüyle hesaplanır. Burada k faktör sayısını temsil eder. Dolayısıyla bu tasarımdaki deney sayısı 4, 8, 12 gibi 4'ün katları şeklindedir (Öztürk, 2007; Webster, 2002). Bu tasarımda en az sayıda deney ile en fazla sayıda faktörün cevap üzerindeki ana etkileri belirlenebilirken; faktörler arasındaki etkileşimler hesaplanamamaktadır. Bu tasarımda yapılan varsayıma uygun olmayan ana etkiler kolaylıkla tespit edilerek, gerçekleştirilecek ileriki deneylerde etkinin gerçek değeri bulunabilmektedir. Plackett-Burman tasarımında dikkat edilmesi gereken önemli hususlardan biri faktörler arasındaki etkileşimlerin önemli olup olmadığının belirlenmesidir. Faktörler arası etkileşimlerden birinin bile önemli

olması, ana etkilerin önemliliğini belirlemede yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olur (Webster, 2002).

2.4.2. İkinci Dereceden Modeller için Tasarımlar

Cevap yüzeyinde eğri, kavis olduğunda birinci dereceden modeller sistemi analiz etmede yetersiz kalır. Bu nedenle parabolik eğrilerin olduğu cevap yüzeylerinde ikinci dereceden modellerin kullanılması gerekmektedir. İkinci dereceden modellerde birinci dereceden modellerdeki tüm terimlerle birlikte, tüm karesel terimler ve çapraz çarpım terimleri bulunmaktadır. Genel olarak ikinci dereceden bir model şu şekilde ifade edilir (Cornell, 1990):

$$y= \beta_0+\sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i+\sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2+\sum \sum_{i<j}^{k} \beta_{ij} x_i x_j \qquad (i=1, 2, 3,\ldots\ldots\ldots, k) \qquad (2.3)$$

y: Bağımlı değişken
$x_1, x_2,\ldots, x_k$: Bağımsız değişkenler
β_i: Lineer terimler için regresyon sabitleri
β_{ii}: Karesel terimler için regresyon sabitleri
β_{ij}: Etkileşim terimleri için regresyon sabitleri

Üç faktörlü bir ikinci dereceden eşitlik ve eşitlikteki terimler şu şekilde ifade edilir (Brereton, 2004):

$$y= \beta_0+ \beta_1x_1+ \beta_2x_2+ \beta_3x_3+ \beta_{11}x_1^2+ \beta_{22}x_2^2+ \beta_{33}x_3^2+ \beta_{12}x_1x_2+ \beta_{13}x_1x_3+ \beta_{23}x_2x_3 \qquad (2.4)$$

β_0: Kesişim noktası
$\beta_1x_1+ \beta_2x_2+ \beta_3x_3$: Her bir faktöre bağlı lineer terimler
$\beta_{11}x_1^2+ \beta_{22}x_2^2+ \beta_{33}x_3^2$: Her bir faktöre bağlı ikinci dereceden (karesel) terimler
$\beta_{12}x_1x_2+ \beta_{13}x_1x_3+ \beta_{23}x_2x_3$: Faktörler arasındaki etkileşim terimleri
y: Cevap değişkeni

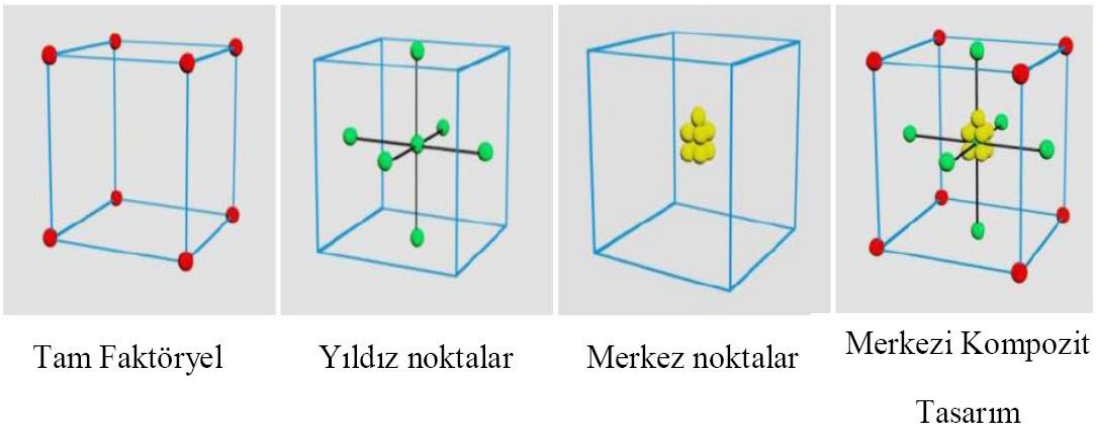
Denklemdeki terimlerden kesişim terimi belirli şartlardaki bir ortalama değerdir. Lineer terimler cevapla verilen faktör arasındaki doğrudan ilişkiyi sağlar. Karesel

terimler ise lineer terimleri dengeleyen terimlerdir. Bu terimler eğim olmasını sağlayan, maksimum ve minimumun elde edilmesinde rol oynayan terimlerdir. Etkileşim terimleri iki faktörün cevap üzerine etkisini belirten terimler olmasından dolayı önemlidir (Brereton, 2004).

İkinci dereceden modeller esnek yapıda olmalarından dolayı fonksiyonel yapıları çeşitli şekillerde ele alabilir ve gerçek cevap yüzeyini iyi derecede tahmin edebilir. İkinci dereceden modeller için çok sayıda tasarım çeşidi olsa da bunlar arasında en yaygın kullanılanları Box ve Wilson tarafından geliştirilen Merkezi Kompozit Tasarım (Central Composite Design) ve Box-Behnken tasarımıdır (Bradley, 2007; Baş, 2010).

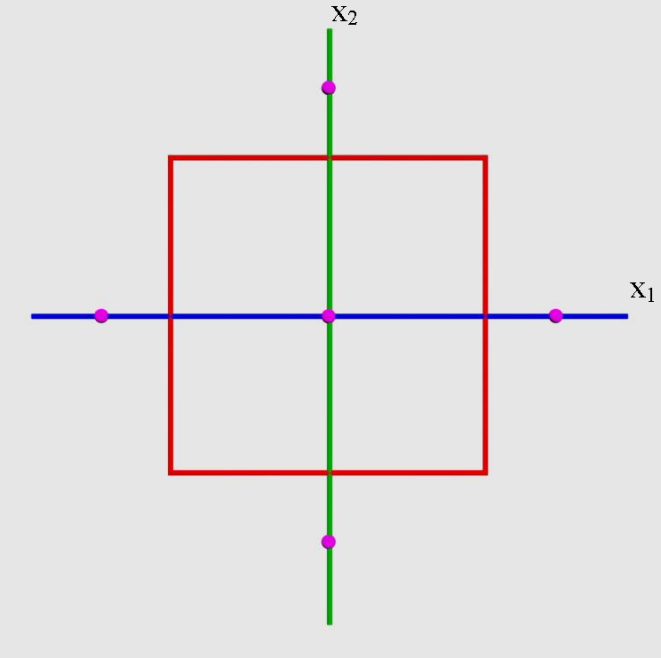
2.4.2.1. Merkezi Kompozit Tasarım

Merkezi kompozit tasarım tam faktöryel tasarımdan gelen faktöryel noktaları, merkez noktaları ve eksenel noktaları içeren bir tasarım yöntemidir. Birinci dereceden model gözlenen sonuçlara iyi derecede uymadığında; karesel terimlere eksenel noktalarla birlikte daha fazla merkez noktanın eklenmesiyle merkezi kompozit tasarım oluşturulabilir (Öztürk, 2007; Bradley, 2007; Baş, 2010, Webster, 2002). Şekil 2.6'da merkezi kompozit tasarımın yapısal elemanları şematik olarak gösterilmiştir (Brereton, 2004).



Şekil 2.6. Merkezi kompozit tasarımın yapısal elemanları (Brereton, 2004).

Merkezi kompozit tasarım sıralı denemelerden türetilen bir yöntem olup; k faktör sayısını göstermek üzere 2^k tane faktöryel deneye ait nokta, 2k tane eksenel nokta (yıldız nokta) ile n_c tane merkez noktadan oluşmaktadır (Myers, 2009; Brereton, 2004). Şekil 2.7'de iki faktörlü merkezi kompozit tasarım görülmektedir (Bradley, 2007, Myers, 2009).



Şekil 2.7. İki faktörlü merkezi kompozit tasarım (Bradley, 2007).

Merkezi kompozit tasarımda faktöryel noktalar birinci dereceden model tasarımını temsil ederken, merkez noktalar sistemdeki eğim ile ilgili bilgi sağlar. Eğer sistemde eğim varsa eklenmiş olan eksenel noktalar karesel terimler için etkili bir değerlendirme sağlar. Merkezi kompozit tasarımdaki bu üç bileşen birbirinden farklı ve önemli görevlere sahiptir. Faktöryel noktalar etkileşimli terimlerin değerlendirilmesini sağlayan noktalardır. Etkileşimli terimler için hiçbir bilgi sağlamayan eksenel noktalar, ikinci derece yani karesel terimlerin tahmininde rol oynar. Merkez noktalar ise hatanın değerlendirilmesini sağlarken aynı zamanda karesel terimlerin tahminine de katkıda bulunan bileşenlerdir. Eksenel noktaların tasarım merkezinden uzaklığını ifade eden eksenel uzaklık (α) değerinin seçimi ilgilenilen alan ile çalışılan bölgenin büyüklüğüne bağlıdır (Myers, 2009). Eksenel uzaklık (α), merkezi kompozit tasarımın dönel ya da dikey olmasına göre farklı

değerler alır. Merkezden tüm yönlere doğru eşit hassaslıkta tahmin sağlayan dönel tasarımlarda eksenel uzaklık α şu şekilde hesaplanır (Webster, 2002; Öztürk, 2007):

$$\alpha = \pm\sqrt[4]{2^k} \tag{2.5}$$

α: Eksenel uzaklık
k: Faktör sayısı

Dikey tasarımlarda ise eksenel uzaklık şu şekilde ifade edilir (Bradley, 2007):

$$\alpha = \pm\left(\frac{\sqrt{n_f n}-n_f}{2}\right)^{1/2} \tag{2.6}$$

α: Eksenel uzaklık
n: Toplam nokta sayısı
n_f: Faktöryel tasarımdaki nokta sayısı

Dönel tasarımlar tahminlerdeki güvenilirliğin yalnızca tasarımın merkez noktalarından uzaklıklara bağlı olduğunu ifade eder. Tasarımın dönel olması yalnızca α değerine bağlı olup, merkez noktadaki tekrar sayısından bağımsızdır. Örneğin tasarımın dönel olması, iki faktörlü bir tasarım için belirlenen dairenin yarıçapındaki tüm deneysel noktaların eşit ölçüde iyi düzeyde tahmin edileceğini ifade eder. Tasarımın dikey olması ise lineer, karesel ve etkileşim terimlerinin tümünün tasarım matrisinde birbirine dikey olduğunu ifade eder (Brereton, 2004). Dikey tasarımların bir özelliği de faktör etkilerinin bağımsız olarak tahmin edilebilmesidir (Taavitsainen, 2012). Her iki koşul genellikle birbiriyle uyumlu değildir. Ancak her iki koşul için α değerleri arasındaki fark çok fazla değildir ve bazı durumlarda tasarımın eksenel noktalarındaki bu farklılık çok büyük bir önem arz etmez. Deneysel tasarım alanında istatistikle alakalı literatür çok geniş olup hangi deney tasarımının daha iyi olduğu konusunda kesin bir görüş bulunmamaktadır (Brereton, 2004).

Üç faktörlü bir merkezi kompozit tasarımda oluşturulan tasarım matrisi ve bu matrisi oluşturan bileşenler Çizelge 2.3'de gösterilmiştir. Burada faktörün aldığı minimum değer -1, maksimum değer +1, merkez değer 0 olup, α ise eksenel uzaklıktaki değeri temsil etmektedir. Tasarım matrisindeki satırlarda o faktör değerlerindeki deneyler, sütunlarda da faktörler bulunur (Brereton, 2004).

Çizelge 2.3. Üç faktörlü merkezi kompozit tasarım matrisi

x_1	x_2	x_3	
-1	-1	-1	Faktöryel noktalar
-1	-1	+1	
-1	+1	-1	
-1	+1	+1	
+1	-1	-1	
+1	-1	+1	
+1	+1	-1	
+1	+1	+1	
-α	0	0	Eksenel noktalar
+ α	0	0	
0	- α	0	
0	+ α	0	
0	0	- α	
0	0	+ α	
0	0	0	Merkez noktalar
0	0	0	
0	0	0	
0	0	0	

Bir D tasarım matrisi, cevapları içeren y vektörü ve sabitler arasındaki ilişkiyi oluşturan b vektörü matematiksel olarak aşağıdaki gibi ifade edilebilir (Brereton, 2004).

$$y=D.b \tag{2.7}$$

y: Cevapları içeren vektör

D: Tasarım matrisi

b: Sabitler arasındaki ilişkiyi oluşturan vektör

Genellikle regresyon modellerindeki sabitlerin bulunmasında en çok kullanılan yöntemlerden birisi en küçük kareler yöntemidir. En basit örnekle açıklamak

gerekirse, cevapların ya da çıktıların y, bağımsız parametrelerin ya da girdilerin x olarak gösterildiği ve çıktılarla girdilerin birbirlerine E(y)=a+bx şeklinde bağlı olduğu varsayılır. Burada a ve b bilinmeyen sabitlerdir ve girdilerle çıktılar arasındaki ilişkiyi ifade eden denklemi bulabilmek adına bu sabitler için mümkün olan en doğru değerler bulunmalıdır. Bunun için farklı girdi (x) değerlerine karşılık çıktı (y) değerleri elde edilir. Bu değerler belirli bir noktalar kümesi oluşturur ancak hata gibi çeşitli nedenlerden dolayı bu noktalar a+bx şeklinde bir doğru vermez. En küçük kareler yöntemi çıktıların gerçek değerleri ile denklemin verdiği çıktı değerleri arasındaki farkların kareleri toplamını en küçük yapacak a ve b katsayılarının seçilmesini sağlamaktadır (Bozan, 2012).

Doğrusal denklemlerdeki sabitlerin bulunmasında kullanılan en küçük kareler yöntemi doğrusal olmayan denklemdeki sabitlerin bulunması için de kullanılabilir. Tasarım matrisindeki değerler ile cevap değerleri bilindiği için sabitler genel olarak şu şekilde hesaplanabilir (Brereton, 2004):

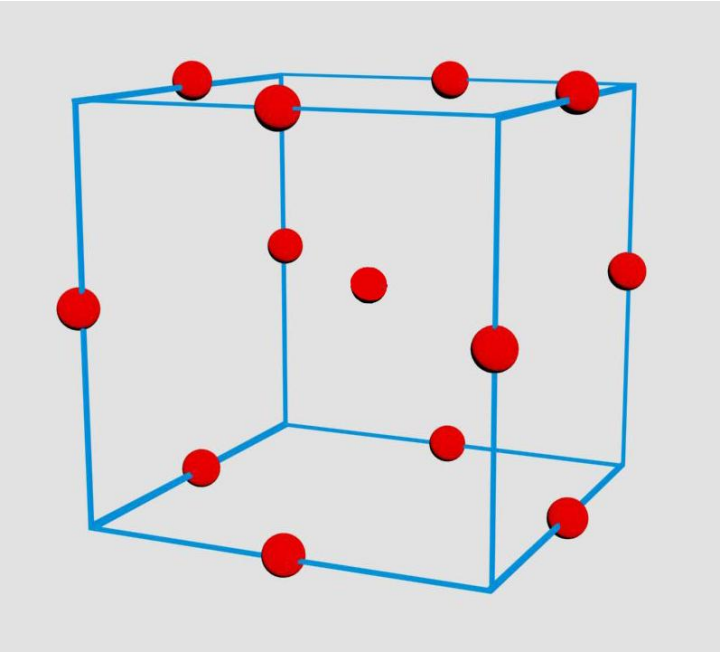
$$b=(D'.D)^{-1}.D'.y \tag{2.8}$$

b: Sabitler arasındaki ilişkiyi oluşturan vektör
y: Cevapları içeren vektör
D: Tasarım matrisi
D': Tasarım matrisinin devriği
D^{-1}: Tasarım matrisinin tersi

Regresyon analiziyle sabitlerin bulunmasıyla bir cevap modeli oluşturulabilir ve bu sabitlerin büyüklüğüne bağlı olarak hangi sabitin önemli olduğu değerlendirilebilir. Gerçekleştirilen tasarımın analizi, modelin uygun olup olmaması, hangi faktörün önemli olduğu gibi değerlendirmeler için t-testleri, F-testi, varyans analizi gibi çok çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

2.4.2.2. Box-Behnken Tasarımı

Box-Behnken tasarımları merkezi kompozit tasarımlara alternatif olan, üç düzeyli tamamlanmamış faktöryel tasarıma dayalı ikinci dereceden tasarımlardır (Bruns, 2006). Bu tasarım 1960 yılında tasarıma adını veren araştırmacılar tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Şekil 2.8'de verilen 3 faktörlü Box-Behnken tasarımından anlaşıldığı üzere bu tasarımda merkez nokta dışındaki tüm tasarım noktaları bir kübün kenarlarının orta noktasında bulunur. Yani her nokta yarıçapı $\sqrt{2}$ olan ve başlangıç noktası merkez olan bir küre üzerindedir.



Şekil 2.8. Box-Behnken tasarımının şematik gösterimi (Bruns, 2006).

Bu tasarımın en büyük avantajı tüm deney noktalarının faktörlerin en yüksek ya da en düşük değerlerinde olmasıdır. Bu nedenle tasarımda bu değerler dışında deney noktaları bulunmaz ve tasarım sonucu meydana gelebilecek muhtemel uç deney koşullarının önüne geçilebilir. Bir diğer avantajı merkezi kompozit tasarıma göre daha az deney sayısı vermesidir. Örneğin 3 faktörlü bir merkezi kompozit tasarımda merkez noktalar hariç toplam 14 deney noktası varken; Box-Behnken tasarımında merkez noktalar hariç toplam 12 deney noktası bulunmaktadır. Box-Behnken tasarımı tamamlanmamış blok adı verilen özel bir blok yapısına sahiptir ve bu özel

blok yapısının 8, 13 veya daha yüksek faktörlü bir sisteme uygun olmaması dezavantajlarından biridir (Webster, 2002; Baş, 2010; Bruns, 2006). Çizelge 2.4'de üç faktörlü bir Box-Behnken tasarımının yapısı verilmiştir (Webster, 2002).

Tasarım her bir bölümde iki faktörün iki düzeyli tam tasarım şeklinde üçüncü faktör düzeyinin ise 0 olarak belirlenerek düzenlendiği üç bölümden oluşmaktadır. Deney noktaları merkezi koordinat sisteminin orijininde olan küre yüzeyinde ve kübün her bir kenarının orta noktasına teğet şekilde bulunmaktadır (Bruns, 2006). Merkezi kompozit tasarımlar için önemli bir alternatif olan Box-Behnken tasarımında deney noktaları kübün kenarlarında bulunurken, kübün köşelerinde deney noktası bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu tasarımda faktöryel noktalar bulunmamaktadır (Myers, 2009). Tasarımdaki deney sayısı, k faktör sayısını ve n_c de merkez nokta sayısını göstermek üzere $2k(k-1)+n_c$ formülüyle hesaplanır (Baş, 2010).

Çizelge 2.4. Box-Behnken tasarımının yapısı (Webster, 2002).

x_1	x_2	x_3
-1	-1	0
+1	-1	0
-1	+1	0
+1	+1	0
-1	0	-1
+1	0	-1
-1	0	+1
+1	0	+1
0	-1	-1
0	+1	-1
0	-1	+1
0	+1	+1
0	0	0

2.4.3. Modellerin Analizi

Regresyon modelinde hatanın önemli derecede azaltılıp azaltılmadığı ya da regresyon modelinin sistemi tanımlamada uygun olup olmadığı varyans analizi ile değerlendirilebilir (Deniz Gibbins, 2010). Hataların varyans olarak adlandırılması nedeniyle bu yönteme istatistiksel bir terim olan varyans analizi de (ANOVA) denilmektedir. Deneysel verilerin analizi ve modelin değerlendirilmesi için

geliştirilen varyans analizi özellikle çok parametreli veya çok seviyeli modellerde kullanılır (Aydın, 2010). Varyans analizi genel olarak kareler toplamları (toplam, regresyon, artık), serbestlik dereceleri, ortalama kare değerler ve modelin verileri ne kadar tanımlayabildiğinin belirlenmesini sağlayan F değerlerinden oluşan tablo şeklinde gösterilir. Varyans analizi tablosunda bulunan ve modelin uygunluğunun belirlenmesinde kullanılan, deney sayısından modeldeki sabit sayısının çıkarılmasıyla bulunan serbestlik derecesi terimi de bulunmaktadır. Bu değerlerin hesaplanması için matematiksel formüller şu şekilde ifade edilmektedir (Brereton, 2004; Bruns, 2006; Myers, 2009):

$$SS_{reg} = \sum_{i=1}^{n} (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (2.9)$$

SS_{reg}: Regresyon kareler toplamı
$\hat{y}_i$: Tahmini cevap değeri

$$SS_{art} = SS_{top} - SS_{reg} \quad (2.10)$$

SS_{art}: Artık değerlerin kareler toplamı
SS_{top}: Modeldeki varyasyonun kareler toplamı
SS_{reg}: Regresyon kareler toplamı

$$SS_{ue} = \sum_{i=1}^{m} n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 \quad (2.11)$$

SS_{ue}: Uyum eksikliğinin kareler toplamı
$\bar{y}_i$: n_i gözlenen değerin ortalaması

$$SS_{top} = \sum_{i=1}^{n} (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.12)$$

SS_{top}: Modeldeki varyasyonun kareler toplamı
y_i: Gözlenen cevap değeri

Bu formüllerdeki kareler toplamı (SS) kareler toplamını ifade etmektedir. SS_{top} modeldeki toplam varyasyonun kareler toplamını, SS_{art} ise bir gözlemin ilgili

faktörün seviyesinin ortalamasından sapmasını ifade etmektedir. Eğer modelde tekrarlar mevcutsa SS_{sh} terimi aşağıdaki gibi hesaplanabilir (Bozan, 2012; Brereton, 2004).

$$SS_{sh} = SS_{art} - SS_{ue} \quad (2.13)$$

SS_{ue}: Uyum eksikliğinin kareler toplamı
SS_{sh}: Saf hatanın kareler toplamı

Varyans analizi tablosundaki bir başka terim serbestlik derecesidir. Bir faktörün serbestlik derecesi o faktörün sayısından bir çıkarılmasıyla; etkileşimli terimlerin serbestlik derecesi terimlerin serbestlik derecelerinin çarpımıyla; toplam serbestlik derecesi toplam gözlem sayısından bir çıkarılmasıyla; hatanın serbestlik derecesi toplam gözlem sayısından parametre sayısının çıkarılmasıyla bulunabilmektedir (Bozan, 2012). Varyans analizinden elde edilen sonuçlar kullanılarak modelin uygunluğu F-testi ile değerlendirilebilmektedir. Regresyon modelinin anlamlılığı bağımlı değişken y ile bağımsız değişkenler x_1, x_2,…, x_k arasında bir ilişki olup olmamasıyla belirlenebilir. Buna göre uygun hipotezler şu şekildedir:

$H_0 : \beta_1 = \beta_2 = \ldots = \beta k = 0$ ve
$H_1 : \beta i$? 0 en az bir i için

Çalışılan güven aralığındaki F dağılım tablolarından (Çizelge 2.5) deney sayısı ve serbestlik derecesine göre F değeri belirlendikten sonra modelin F değeri ile karşılaştırılır. Eğer hesaplanan F değeri, tablodan okunan F değerinden büyükse H_0 reddedilir. Buna göre bağımsız değişkenlerden (ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/bitki derişimi) en az bir tanesi modele önemli derecede katkı sağlamaktadır (Bradley, 2007; Webster, 2002).

Çizelge 2.5. F dağılım tablosu (α=0,05) (Bruns, 2006).

ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	30	40	60	120	∞
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0	250.1	251.1	252.2	253.3	254.3
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45	19.46	19.47	19.48	19.49	19.50
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.62	8.59	8.57	8.55	8.53
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.75	5.72	5.69	5.66	5.63
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.50	4.46	4.43	4.40	4.36
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.81	3.77	3.74	3.70	3.67
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.38	3.34	3.30	3.27	3.23
8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.08	3.04	3.01	2.97	2.93
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.86	2.83	2.79	2.75	2.71
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.70	2.66	2.62	2.58	2.54
11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.57	2.53	2.49	2.45	2.40
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.47	2.43	2.38	2.34	2.30
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.38	2.34	2.30	2.25	2.21
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.31	2.27	2.22	2.18	2.13
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.25	2.20	2.16	2.11	2.07
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.19	2.15	2.11	2.06	2.01
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.15	2.10	2.06	2.01	1.96
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.11	2.06	2.02	1.97	1.92
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.07	2.03	1.98	1.93	1.88
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.04	1.99	1.95	1.90	1.84
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.92	1.87	1.82	1.77	1.71
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.84	1.79	1.74	1.68	1.62
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.74	1.69	1.64	1.58	1.51
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.65	1.59	1.53	1.47	1.39
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.55	1.50	1.43	1.35	1.25
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.46	1.39	1.32	1.22	1.00

Dolayısıyla F oranının belirlenen güven aralığındaki F dağılım tablolarındaki değerden büyük olması modelin geçerli ve deneysel verileri öngörmede başarılı olduğunun göstergesidir (Brereton, 2004; Khayet et al., 2010; Khayet et al., 2011). Modelin F değeri ortalama karesel regresyon değerinin ortalama karesel hata değerine bölünmesiyle hesaplanır (Bozan, 2012). Varyans analizi tablosu Çizelge 2.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 2.6. Varyans analizi tablosu (ANOVA).

Varyasyon	**SS**	**Df**	**MS**	**F**	**F_{tablo}**
Regresyon	SS_{reg}	p-1	SS_{reg} / Df_{reg}	MS_{reg} / MS_{art}	A
Artık	SS_{art}	n-p	SS_{art} / Df_{art}		
Uyum eksikliği	SS_{ue}	m-p	SS_{ue} / Df_{ue}		
Saf hata	SS_{sh}	n-m	SS_{sh} / Df_{sh}		
Toplam	SS_{top}	n-1			

SS: Kareler toplamı
Df: Serbestlik derecesi
MS: Kareler ortalaması
n: Toplam gözlem sayısı
p: Modeldeki parametrelerin sayısı
m: Faktör değerleri kombinasyonlarının sayısı
A: Tablodan okunan değer

Varyans analizi tablosunda bulunan diğer bir test yöntemi de uyum eksikliği testidir. Uyum eksikliği testi yalnızca saf hatanın tahminine olanak sağlayan tekrar deneyleri içeren tasarımlara uygulanabilmektedir. Modelde tekrarlar bulunduğunda artık

kareler toplamı rastgele hatalar (saf hata) ve modelin uyum eksikliği testi olmak üzere ikiye ayrılır (Bruns, 2006). Saf hata, modelleme hatalarından bağımsız bir hata terimidir. Bu yönteme göre öncelikle saf hatanın kareler toplamı ve artık kareler toplamı hesaplandıktan sonra uyum eksikliği testi kareler toplamı hesaplanır. Daha sonra uyumsuzluk testi ortalama kareler ve saf hata ortalama kareler değerleri, ilgili kareler toplamının serbestlik derecesine bölünmesiyle hesaplanır. Son olarak da uyum eksikliği testi hesaplanır (Taavitsainen, 2012; Bruns, 2006):

$$F_{ue} = MS_{ue} / MS_{sh} \quad (2.14)$$

F_{ue}: Uyum eksikliği testi için F değeri
MS_{ue}: Ortalama karesel uyum eksikliği
MS_{sh}: Ortalama karesel saf hata

Uyum eksikliği testi için bulunan F değerinin tablodan okunan F değerinden küçük olması modelin uyum eksikliği göstermediği anlamına gelir (Bruns, 2006).

Faktörlerin önemliliğini belirlemek için kullanılan yöntemlerden biri olan t-testi bir regresyon sabitinin, sabitin standart sapmasına bölünmesiyle hesaplanması olan test istatistiğine dayalı bir yöntemdir. t-testlerinin çok çeşitli uygulamaları olmasına rağmen genel olarak ana basamaklar şu şekildedir (Taavitsainen, 2012; Brereton, 2004):

- $(D'D)^{-1}$ matrisinin hesaplanması.
- Gözlenen ve tahmin edilen veriler arasındaki hatanın kareler toplamının hesaplanması.
- Hatanın kareler toplamının ortalamasının (s) bulunması.
- İlk basamakta gerçekleştirilen matris işleminden her bir parametrenin varyansının (υ) alınması.
- Her sabit (b) için $t = b \Big/ \sqrt{s/\upsilon}$ ile t değerinin hesaplanması.

Buradaki simgelerin anlamları şu şekildedir:
D: Tasarım matrisi
D': Tasarım matrisinin devriği

$(D'D)^{-1}$: Tasarım matrisiyle matrisin devriğinin çarpımından elde edilen matrisin tersi

b: Regresyon sabiti

s: Hatanın kareler toplamının ortalaması

υ: Her bir parametre için varyans

Son adımda bulunan oran ne kadar büyük olursa, sabit yani faktör de o kadar önemlidir. Tablolar ya da hazır programlar yardımıyla t-testi gerçekleştirilebilmektedir (Brereton, 2004). t-testi ile birlikte faktörlerin sonuçlara etkisini değerlendirmede kullanılan bir yöntem de pareto çizelgeleridir. Pareto çizelgelerinde faktörler cevabı etkilemede bağıl önemlerine göre sıralanırlar. Faktörlerin etkisi negatif ya da pozitif yönde olabilir. Pareto çizelgesinde belirli bir güven aralığındaki t değeri bulunur ve hesaplanan faktör değerleri bu t değerinden ne kadar büyük olursa faktörün etkisinin o kadar fazla olduğunu ifade eder (Öztürk, 2007). Genellikle modeldeki bir terimin %95 güven aralığı için p değeri 0,05'ten ya da %90 güven aralığı için 0,1'den küçük ise, o terim önemli olarak değerlendirilmektedir (Taavitsainen, 2012; Bozan, 2012).

Cevaptaki değişikliklerin ne kadarının model tarafından açıklanabildiği R^2 değerinden (belirlilik katsayısı) anlaşılabilmektedir. R^2 değeri maksimum 1 olmaktadır ve bu değer ne kadar yüksek olursa (1'e ne kadar yakın olursa) model deneysel verileri o kadar fazla açıklamaktadır. Genel olarak R^2 değeri regresyon kareler toplamının toplam kareler toplamına bölünmesiyle hesaplanmaktadır. Düzeltilmiş belirlilik katsayısı (Düzeltilmiş-R^2) değeri ise modeldeki faktör sayısı için hesaplanmaktadır (Bruns, 2006; Bozan, 2012).

$$\text{Düzeltilmiş } R^2 = 1 - \frac{MS_{hata}}{SS_{top} / Df_{top}} \qquad (2.15)$$

Düzeltilmiş-R^2: Düzeltilmiş belirlilik katsayısı

MS_{hata}: Ortalama karesel hata

SS_{top}: Modeldeki varyasyonun kareler toplamı

Df_{top}: Modeldeki toplam serbestlik derecesi

Deneysel tasarım yönteminde ilk olarak sistemi etkileyen bağımsız parametreler yani faktörler ve çalışma aralığını ifade eden faktör değerleri belirlenir. Tasarım matrisi oluşturulduktan sonra tasarıma göre gerçekleştirilecek deneyler belirlenir. Deneyler gerçekleştirildikten sonra elde edilen sonuçlara göre cevap yüzeyinin detaylı bir matematiksel modellemesi yapılabilir. Son olarak matematiksel modelleme yapıldıktan sonra modelin uygunluğunun değerlendirilmesi, faktör etkileşimlerinin, faktörlerin önemliliğinin belirlenmesi için varyans analizi, F-testi, t-testi gibi yöntemler uygulanarak modelin analizi yapılır (Brereton, 2004).

2.4.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Deneysel Tasarım için Literatür Taraması

2.4.4.1. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Merkezi Kompozit Tasarım için Literatür Taraması

Moringa oleifera tohumlarının süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılarak basınç, sıcaklık, süpekritik akışkan akış hızı ve ekstraksiyon süresi parametrelerinin elde edilen yağ verimine etkisi incelenmiştir (Zhao and Zhang, 2013). Basıncın, ekstraksiyon süresinin ve karbon dioksit akış hızının artışı elde edilen yağ verimlerini önemli derecede artırmıştır. Sıcaklık parametresinin ise basınca bağlı olarak yağ verimine etki ettiği rapor edilmiştir. Düşük basınçlarda sıcaklığın artışı yağ veriminde azalmaya neden olurken yüksek basınçlarda sıcaklığın artışı yağ verimini artırmıştır.

Triasetin, diasetin ve monoasetin karşımından (mol oranı 1:2:1) seçici olarak triasetinin süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuyla eldesi gerçekleştirilmiştir (Rezayat and Ghaziaskar, 2011). Çalışmada ilk basamakta yarı-sürekli süperkritik karbon dioksit sisteminde CCD yöntemi kullanılarak basınç, sıcaklık, karbon dioksit akışı ve ekstraksiyon süresi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Diasetin ve triasetin ekstraksiyon verimine en fazla etkisi olan faktörlerin basınç ve sıcaklığın karesel terimleri; basınç, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve akış hızının etkileşimleri olduğu rapor edilmiştir. Yüksek basınç ve düşük sıcaklıklarda karbon dioksitin

yoğunluğunun artmasıyla elde edilen ekstrakt verimlerinde artış olduğu ancak aynı koşullarda seçiciliğin azaldığı belirtilmiştir. İkinci basamakta süperkritik karbon dioksit fraksiyonunun sürekli sistemde gerçekleştirildiği deneylerde faktöryel tasarım yöntemi kullanılarak basınç ve karbon dioksit akış hızı faktörlerinin etkisi incelenmiştir.

Esansiyel yağların saz bitkisinin bir türünden (*Cyperus rotundus* Linn.) süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonuyla elde edildiği bir başka çalışmada merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulanmıştır (Wang et al, 2012). Elde edilen yağların verimine basınç, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve karbon dioksit akış hızı parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Basınç, karbon dioksit akış hızı, ekstraksiyon süresi parametrelerinin lineer terimleri; sıcaklık ve basıncın karesel terimleri; ekstraksiyon süresi ile karbon dioksit akış hızının etkileşim teriminin yağ verimine etki ettiği belirtilmiştir. Basıncın ve karbon dioksit akış hızının artışıyla birlikte yağ veriminde önemli derecede artış olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca aynı bitkiden süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde elde edilen maksimum yağ veriminin (%1,82), n-hekzan ile gerçekleştirilen Soxhlet ekstraksiyonundaki yağ veriminden (%0,68) önemli ölçüde daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

Capparis spinosa tohum yağının süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ve ultrases destekli ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada tamamlayıcı olarak metanol kullanılmıştır (Ara et al., 2014). Süperkritik ekstraksiyon uygulamasında basınç, sıcaklık, metanol hacmi, dinamik ekstraksiyon süresi ve statik ekstraksiyon süresi parametrelerinin yağ verimine etkisini incelemek için yarım kesirli faktöryel tasarım kullanılırken; merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulandığında basınç, metanol hacmi ve dinamik ekstraksiyon parametrelerinin yağ verimine etkisi incelenmiştir. Merkezi kompozit tasarımdan elde edilen sonuçlara göre yağ verimine en fazla etki eden parametre basınç olmuştur. Ultrasonik destekli ektsraksiyondan elde edilen en yüksek yağ verimi (%27,9) süperkritik akışkan ekstraksiyonundan elde edilen yağ veriminden (%25,1) yüksek olsa da çevreye zararlı organik çözücülerin kullanılmaması nedeniyle süpekririk akışkan ekstraksiyonunun daha iyi bir yöntem olduğu rapor edilmiştir.

Ayva çekirdeklerinden (*Cydonia oblonga* Miller) ultrasonik destekli ekstraksiyon ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile yağ asitlerinin eldesinin gerçekleştirildiği çalışmada merkezi kompozit tasarım kullanılmıştır (Daneshvand et al., 2012). Süperkritik ekstraksiyon işleminde yalnızca karbon dioksit ve karbon dioksitle birlikte tamamlayıcı olarak metanolün kullanılmıştır. Ayva çekirdeklerinden süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonla elde edilen yağ asitleri miktarına basınç, sıcaklık, statik ektsraksiyon süresi, dinamik ekstraksiyon süresi ve metanol hacmi faktörlerinin etkisi incelenmiştir (Daneshvand et al., 2012). Bu faktörlerden basınç ve dinamik ekstraksiyon süresi önemli olarak bulunmuştur. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için en yüksek verim (%24,32) 353 bar basınç, 35°C sıcaklık, 150 µL metanol hacmi, 10 dakika statik ekstraksiyon süresi ve 60 dakika dinamik ekstraksiyon süresinde elde edilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyon ile elde edilen en yüksek yağ verimi ultrasonik destekli ekstraksiyondan elde edilen en yüksek yağ veriminden (%19,5) daha yüksek olsa da, yağlardaki yağ asidi bileşimleri birbirine benzer olduğu rapor edilmiştir. Yağ ekstraktlarında bulunan temel bileşenler linoleik, palmitik, oleik, stearik ve eikosanoik asitlerdir.

Mersin bitkisi (*Myrtus communis* L.) yapraklarından esansiyel yağlar süperkritik karbondioksit ekstraksiyonuyla elde edilmiştir (Ghasemi et al, 2011). Tamamlayıcı olarak metanolün kullanıldığı çalışmada; basınç, sıcaklık, statik ve dinamik ekstraksiyon süresi parametrelerinin ekstrakt verimine etkisini incelemek amacıyla merkezi kompozit tasarım yöntemi kullanılmıştır. Ekstrakt verimini en çok etkileyen parametrelerin basınç, metanol hacmi ve basınç ile dinamik ekstraksiyon süresinin etkileşimi olduğu rapor edilmiştir. Basıncın artışıyla birlikte elde edilen ekstrakt verimlerinde artış meydana gelmiştir. Bunun nedeninin yüksek basınçlarda yüksek akışkan yoğunluğuna ulaşılmasıyla analitlerin çözünürlüğündeki artış olduğu belirtilmiştir. Polar organik bileşiklerin süperkritik karbon dioksitte çözünürlüğü az olduğundan polar bir tamamlayıcı olarak metanolün kullanılmasıyla birlikte polar organik bileşiklerin veriminde önemli derecede artış olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada hidrodistilasyon yöntemiyle süperkritik akışkan ekstraksiyonu karşılaştırılmış ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunun bileşenlerin eldesinde daha seçici bir yöntem olduğu belirtilmiştir.

Toprak örneğindeki 4-nitrotoluen ve 3-nitrotoluen bileşiklerinin belirlenmesi işlemi süperkritik akışkan ekstraksiyonuyla birleştirilmiş sıvı-sıvı mikro-ekstraksiyonu ve GC-FID sistemi ile gerçekleştirilmiştir (Jowkarderis and Raofie, 2012). Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda etkili olan parametreleri (basınç, sıcaklık, tamamlayıcı hacmi, dinamik ekstraksiyon süresi) incelemek amacıyla kesirli faktöryel tasarımla birlikte merkezi kompozit tasarımın uygulandığı çalışmada süperkritik akışkan olarak karbon dioksit, tamamlayıcı olarak da metanol kullanılmıştır. Bu parametreler arasında basınç, dinamik ekstraksiyon süresi ve tamamlayıcı hacmi önemli olurken, sıcaklık parametresinin istatistiksel olarak önemli olmadığı rapor edilmiştir. Tamamlayıcı olarak kullanılan metanol hacminin artışıyla ekstraksiyon veriminin arttığı rapor edilmiştir. Basıncın artışı karbon dioksitin çözücü kuvvetini artırarak ekstrakt geri dönüşümünün artmasına neden olmuştur.

Tütün yapraklarının süperkritik karbon dioksit ile ekstraksiyonunda tamamlayıcı olarak etanolün kullanıldığı çalışmada elde edilen solanesol verimine ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, basınç ve ekstraksiyon süresi) etkisi incelenmiştir (Huang et al., 2008). Solanesol verimi için önemli olan parametreler basınç, sıcaklık ve sürenin karesel terimleri; sıcaklık ve basınç arasındaki lineer etkileşim terimi ile sıcaklığın lineer terimidir. En yüksek solanesol veriminin (ağ. %3,74) 45°C sıcaklık, 38 MPa basınç ve 2,6 saatlik ekstraksiyon süresinde elde edildiği rapor edilmiştir.

Roselle bitkisinin tohumlarından fitosterolün süperkritik akışkan ekstraksiyonu elde edildiği çalışmada akışkan olarak karbon dioksit kullanılırken tamamlayıcı olarak etanol kullanılmıştır (Nyam et al, 2010). Tamamlayıcı olarak etanolün kullanılması çözünürlüğü artırarak ekstraksiyon veriminin yalnızca süperkritik karbon dioksitle elde edilen verimden daha yüksek olmasını sağlamıştır. Merkezi kompozit tasarım yönteminin kullanıldığı çalışmada bütün parametreler ekstraksiyon verimine pozitif yönde etki ederken; en çok etkisi olanlar sırasıyla süperkritik akışkan akış hızı, sıcaklık ve basınç olmuştur. Fitosterol derişimine ise basınç parametresi önemli derecede etki ederken; sıcaklığın ve süperkritik akışkan akış hızının önemli derecede bir etkisi olmadığı belirtilmiştir. Çalışmada ayrıca süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile Soxhlet ekstraksiyonundan elde edilen yağ verimleri ve yağlardaki fitosterol derişimleri karşılaştırılmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonuyla elde edilen yağ

verimi ve yağdaki fitosterol derişimi, Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen yağ verimi ve yağdaki fitosterol derişiminden daha fazla olmuştur.

2.4.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunda Box-Behnken Tasarımı için Literatür Taraması

Domates kabuğundan süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile likopen elde edildiği çalışmada, likopen verimine etki eden parametreleri incelemek için üç faktörlü Box-Behnken tasarımı uygulanmıştır (Yi et al., 2009). Sıcaklık (40-100°C), basınç (20-40 MPa), akış hızı (1,0-2,0 mL/min) parametrelerinin etkisi incelendiğinde, likopen verimini en fazla etkileyen terimler sıcaklık, basınç ve sıcaklığın karesel terimi olmuştur. En yüksek toplam likopen miktarı (31,25 μg/g) 100°C sıcaklık, 40 MPa basınç, 1,5 mL/min akış hızında elde edilmiştir. Genel olarak bakıldığında en yüksek ekstrakt verimlerinin yüksek sıcaklıklarda, nispeten de yüksek basınç ve akış hızında elde edildiği rapor edilmiştir. Çalışmada sıcaklığın artması çözücü yoğunluğunu azalttığından sabit basınçta likopen verimini düşüreceği; ancak aynı zamanda yüksek sıcaklığın çözünen maddenin çözünürlüğünü artırarak yüksek kütle transferi sağlayarak verimi artıracağı belirtilmiştir. Dolayısıyla karbon dioksit yoğunluğu ve çözünen maddenin buhar basıncı arasındaki dengeye göre sıcaklık artışının verim üzerine pozitif ya da negatif etkisi olabilmektedir. Süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği çalışmada çözünen buhar basıncının verime etkisinin daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Basıncın artışıyla birlikte karbon dioksitin yoğunluğu artarak süperkritik akışkanın çözücü kuvveti artmaktadır. Bu nedenle gerçekleştirilen çalışmada basıncın artmasıyla elde edilen likopen veriminin artmasına neden olduğu belirtilmiştir.

Bir mantar türü olan *Chroogomphus rutilus*'dan antioksidant polisakkaritlerin ekstraksiyonunda BBD yöntemi kullanılmıştır (Sun et al., 2010). Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve su:hammadde oranı parametrelerinin ekstraksiyon verimine etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon işleminde parametrelerin etkisi önem sırasına göre su:hammadde oranı, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığı şeklindedir. Parametrelerin lineer ve karesel terimleri ile sıcaklık ve su/hammadde

oranı, ekstraksiyon süresi ve su:hammadde oranı parametrelerinin etkileşim terimlerinin ekstraksiyon verimine etkisinde önemli olduğu bulunmuştur.

Sığırdili bitkisinden (*Alkanna tinctoria*) alkannin elde edilmesinde kritik altı ve süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Akgun et al, 2011). Basınç (50-350 bar), sıcaklık (30-80°C) ve karbon dioksit akış hızı (5-20 g/min) parametrelerinin alkannin verimine etkisi Box-Behnken tasarım yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Çalışmada alkannin verimine etki eden en önemli parametrenin basınç olduğu belirtilmiştir. Ayrıca düşük sıcaklık (30°C) ve basınçta (50 bar) ekstraksiyon işleminin geçekleşmediği; alkannin veriminin de kritik altı bölgeden süperkritik koşul bölgesine geçtikten sonra artmaya başladığı belirtilmiştir. Basıncın yükselmesiyle süperkritik karbon dioksitin yoğunluğunun artarak moleküller arasındaki uzaklığın azalmasını ve alkannin türevleri ile karbon dioksit arasındaki etkileşimin artmasını sağlamıştır. Böylelikle alkannin türevlerinin süperkritik karbon dioksitte çözünürlüğünün artmasıyla daha yüksek alkannin verimlerinin elde edilebildiği rapor edilmiştir. Genel olarak sıcaklığın artışı, karbon dioksit akış hızının da azalması alkannin veriminin artışına neden olmuştur. En yüksek alkannin verimi (%1,47) 80°C sıcaklık, 175 bar basınç, 5 g/min karbon dioksit akış hızı koşullarında elde dilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyondan elde edilen bu verimin n-hekzan ile gerçekleştirilen klasik ekstraksiyon metodundan elde edilen verimden (%1,24) yüksek olduğu belirtilmiştir.

Satureja hortensis bitkisinden esansiyel yağların süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu ile elde edildiği çalışmada süperkritik akışkanın polaritesini artırmak ve yağların, ekstraktların bitki yapısından desorpsiyonunu sağlamak amacıyla tamamlayıcı olarak metanol kullanılmıştır (Khajeh, 2011). Süperkritik akışkan ekstraksiyonuna parametrelerin etkisini incelemek için kesirli faktöryel tasarım ve Box-Behnken tasarım yöntemleri uygulanmıştır. Tasarımda basınç, sıcaklık, metanol yüzdesi, ekstraksiyon süresi parametrelerinin elde edilen verime etkisi incelenmiş ve sıcaklık, basınç, metanol yüzdesinin önemli parametreler olduğu belirtilmiştir. Basıncın artması yüksek akışkan yoğunluğuna neden olmuş böylelikle yüksek yağ ve ekstrakt verimi elde edilmesine olanak sağlamıştır. Sıcaklığın artması yağların ve

ekstraktların uçuculuklarını artırdığından, gerçekleştirilen çalışmada sıcaklığın artışının yüksek verim elde edilmesini sağladığı rapor edilmiştir.

Japon sarmaşığından (*Pueraria lobata*) flavonoidlerin süperkritik karbon dioksit ekstraksiyon ile elde edildiği çalışmada tamamlayıcı çözücü olarak etanol kullanılmıştır (Wang et al., 2008). Box-Behnken deney tasarımının uygulandığı ekstraksiyonda basınç, sıcaklık ve etanol miktarı parametrelerinin flavonoid verimine etkisi incelenmiştir. Kullanılan etanol miktarının artışı elde edilen flavonoid veriminde artışa neden olurken; sıcaklık ve basıncın artışı belirli bir noktaya (50°C, 40 MPa) kadar verimi artırmış, bu noktadan sonra ise verimin azalmasına neden olmuştur. Sıcaklığın verime bu şekilde etkisinin, kritik basınç civarında akışkanın yoğunluğunun sıcaklıktaki değişime karşı çok hassas olmasıyla açıklanabileceği belirtilmiştir. Ancak sıcaklık artışı kütle transferini hızlandırarak ekstraksiyon verimine pozitif yönde etkisi olacağından sıcaklığın etkisinin tam olarak açıklanmasının zor olduğu rapor edilmiştir. Basıncın artması akışkan yoğunluğunun artmasını sağlayarak ekstrakt veriminin artmasına neden olmuştur. Ancak belirli bir noktadan sonra basıncın artışıyla veriminin düşmesinin, ekstrakte edilen analitlerin uçuculuklarına ve polaritelerine bağlı olabileceği rapor edilmiştir. Etanol ise karbon dioksitin polaritesini artırarak daha yüksek flavonoid verimi elde edilmesini sağlamıştır.

Tüketilmiş kahve telvesinden yağların ve diterpenlerin süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile eldesinde üç faktörlü BBD kullanılmıştır (Barbosa et al., 2014). Çalışmada hem yalnızca karbon dioksit hem de karbon dioksitle birlikte tamamlayıcı olarak etanol kullanılmıştır. Toplam ekstraksiyon verimi ve dipertenik bileşiklerin derişimine basınç (140-190 bar), sıcaklık (40-70°C) ve etanol miktarı (ağ. %0-5) parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Toplam ekstraksiyon verimine etki eden parametreler önemlilik sırasına göre sıcaklık, basınç ve etanol miktarı olmuştur. Sıcaklığın ve etanol miktarının karesel terimleri, basınç ile sıcaklığın etkileşim terimi, sıcaklık ile etanol miktarının etkileşim terimi de istatistiksel olarak önemli olan terimler olduğu belirtilmiştir. Sıcaklık ve basınç parametrelerinin önemli olması her iki parametredeki değişimlerin yoğunluk, viskozite, difüzite gibi önemli özelliklere fiziksel olarak etki etmesinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle bu iki

parametredeki değişimlerin hidrodinamik, kütle transferi ve çözünürlük olaylarına önemli derecede etki ederek süperkritik akışkan ekstraksiyonu sistemlerinin performansını belirlediği rapor edilmiştir. Etanol miktarı parametresinin önemli olmasının nedeni olarak ise süperkritik karbon dioksitin daha polar bileşikleri ekstrakte edebilmesine olanak sağlaması olarak belirtilmiştir. Çalışmada en yüksek toplam ekstraksiyon verimi (%11,97) 190 bar basınç, 55°C sıcaklık ve ağ. %5 etanol koşullarında elde edilmiştir.

Deniz iğdesinden biyoaktif maddelerin (tokoferoller, likopen ve β-karoten) eldesinde yalnızca karbon dioksit ve karbondioksitle birlikte metanol, etanol, 2-propanol kullanılarak (%10-30) süperkritik akışkan ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir (Kagliwal et al, 2011). Box-Behnken tasarım yöntemi kullanılarak biyoaktif maddelerin verimine önemli derecede etki eden parametrelerin basınç ve sıcaklık olduğu belirtilmiştir. Genel olarak basıncın artışıyla tokoferol ve karoten verimleri artarken; sıcaklığın artması elde edilen verimlerin azalmasına neden olmuştur. Yalnızca süperkritik karbon dioksit kullanılmasıyla elde edilen en yüksek tokoferol ve karoten verimleri sırasıyla %77,2 ve %75,5 olurken; karbon dioksitle birlikte 2-propanol (%30) kullanıldığında tokoferol verimi %91,14, karoten verimi %69,61 olduğu belirtilmiştir. Aralarında fazla bir fark olmasa da genel olarak 2-propanol kullanıldığında elde edilen tokoferol ve karoten verimleri, etanol ve metanol kullanılarak elde edilen verimlerden daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HAMMADDELER

Biyokütleden biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu deneylerinde biyokütle kaynağı olarak Alman kayını ve alıç çekirdeği kullanılmıştır. Alman kayını talaşı atık olarak (mobilya üretiminden arta kalan) Tepe Home şirketinden temin edilmiştir. Batı Karadeniz Bölgesi'nden toplanan alıç meyveleri kurutulup meyve kısımlarının ayrılmasıyla elde edilen alıç çekirdekleri öğütülerek deneylerde kullanılmıştır. Bitkilerden biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu deneylerinde ise bitki olarak ısırgan otu, funda yaprağı ve adaçayı kullanılmıştır. Türkiye'nin Hatay bölgesinden temin edilen ısırgan otu, sapı ve yaprağıyla birlikte öğütülüp, 4 saat süreyle 105°C sıcaklıkta etüvde kurutulduktan sonra süperkritik etanol ekstraksiyonu deneylerinde kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan funda yaprakları Marmara bölgesinden, adaçayı ise Ege bölgesinden temin edilmiştir. Her iki bitki de öğütüldükten sonra 4 saat süreyle 105°C sıcaklıkta etüvde kurutularak süperkritik etanol ekstraksiyonu deneylerinde kullanılmıştır. Kullanılan etanol analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.2. HAMMADDELERE YAPILAN ANALİZLER

Deneylerde kullanılan biyokütle (Alman kayını talaşı, alıç çekirdeği) ve bitkilere (ısırgan otu, funda yaprağı, adaçayı) nem tayini, uçucu madde tayini, kül tayini analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca hammaddelerin yüzey yapılarını görüntülemek için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hammaddelerin içeriğindeki % karbon (C), % hidrojen (H) ve % azot (N) ve % oksijen (O) miktarını belirlemek için elementel analiz yapılmıştır.

3.2.1. Nem Tayini

Hammaddelerin nem içeriğinin belirlenmesinde ilk olarak örnekler oda sıcaklığında hassas terazide tartılarak (± 0,0001 g) ilk ağırlıkları (W_0) belirlenmiştir. Saat camına konulan örnekler 103 ± 2ºC'deki etüvde yaklaşık bir saat süreyle bekletildikten sonra çıkarılarak desikatörde oda sıcaklığına soğutulup hassas terazide tekrar tartılarak son ağırlıkları (W_s) belirlenmiştir.

Hammaddelerdeki yüzde nem içeriği aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$\text{Nem \%} = [(W_0 - W_s)/ W_0] \times 100 \quad (3.1)$$

W_0: Alınan örnek ağırlığı (g),

W_s: Deneyden sonraki ürün ağırlığıdır (g).

Deneylerde kullanılan kayın talaşı, ısırgan otu, funda yaprağı, alıç çekirdeği ve adaçayının nem içerikleri sırasıyla %7,5, %7,6, %5,6, %9,5 ve %4,5 olmuştur.

3.2.2. Uçucu Madde Tayini

Uçucu madde tayininde ilk olarak örnekler kurutulmuştur. Kuru örneklerden oda sıcaklığında hassas terazide tartılarak (± 0,0001 g) 1 g (W_0) alınmıştır. Kapalı bir şekilde, sabit tartıma getirilmiş porselen krozeye konularak, 7 dakika boyunca 950 ± 5ºC'deki fırında bekletildikten sonra, kroze desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulup hassas terazide tartılmıştır. Krozenin boş ağırlığı tartımdan çıkarılarak örneklerin son ağırlıkları (W_s) belirlenmiştir. Deneylerde kullanılan kayın talaşı, ısırgan otu, funda yaprağı, alıç çekirdeği ve adaçayının uçucu madde içerikleri sırasıyla %94,19, %72,8, %81,32, %84,70 ve %78,83 olmuştur. Hammaddelerdeki uçucu madde miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$\text{Uçucu madde miktarı \%} = [(W_0 - W_s)/ W_0] \times 100 \quad (3.2)$$

W_0: Kuru halde alınan örnek ağırlığı (g),

W_s: Deneyden sonraki ürün ağırlığıdır (g).

3.2.3. Kül Tayini

Gerçekleştirilen kül tayininde örnekler kurutulduktan sonra hassas teraziyle tartılarak yaklaşık 2 g örnek alınarak sabit tartıma getirilmiş krozeye konulmuştur. Kroze kül fırınına konularak fırının sıcaklığı yavaş yavaş 600°C'ye çıkarılarak bu sıcaklıkta örnek içeriğindeki tüm karbon yanana kadar bekletilmiştir. Desikatörde oda sıcaklığına kadar soğutulan kroze hassas terazide tartıldıktan sonra boş krozenin ağırlığı çıkarılarak örneklerin son ağırlıkları (W_s) bulunmuştur. Hammadde içerisindeki yüzde kül miktarı aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır. Deneylerde kullanılan kayın talaşı, ısırgan otu, funda yaprağı, alıç çekirdeği ve adaçayının kül içerikleri sırasıyla %0,76, %17,6, %4,9, %1,40 ve %8,7 olmuştur.

$$\text{Kül (\%)} = (W_s / W_0)x100 \quad (3.3)$$

Burada;
W_0: Kuru haldeki örnek ağırlığı (g),
W_s: Deneyden sonraki ürün ağırlığı (g).

3.2.4. Elementel Analiz

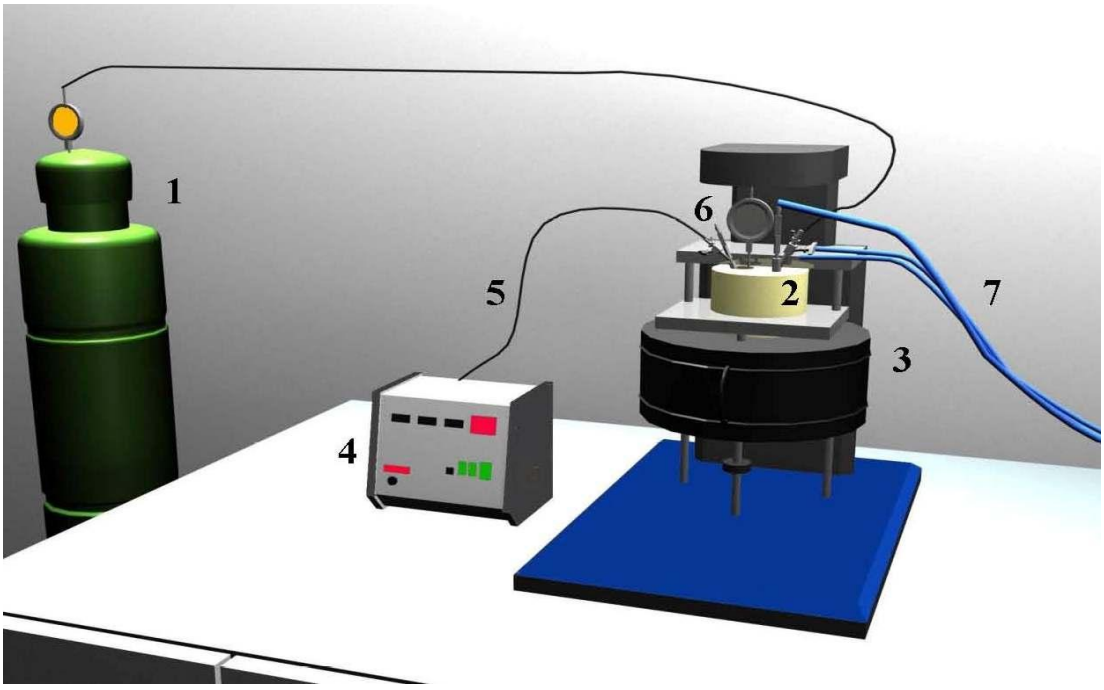
Süperkritik etanol ekstraksiyonunda kullanılan hammaddelere LECO CHNS TRuSpec cihazı kullanılarak elementel analiz yapılmıştır. Hammaddelerin % karbon (C), % hidrojen (H) ve % azot (N) içeriği belirlenmiştir. % Oksijen (O) miktarı farktan hesaplanmıştır.

3.2.5. Hammaddelerin Yüzey Analizleri

Hammaddelerin yüzey yapılarının görüntülenmesinde ve karakterize edilmesinde FEI Quanta 450 FEG tipi SEM cihazı kullanılmıştır.

3.3. SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU

Biyokütleler ve bitkilerden biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu ile eldesinde yüksek basınç yüksek sıcaklık reaktörü kullanılmıştır. Reaktör 500 mL kapasiteye sahip, sökülebilir başlıklıdır. Esnek grafit düz contaya sahip olup maksimum 500ºC'de çalışmaya uygundur. Reaktör paslanmaz çelikten imal edilmiştir ve manyetik tipte bir karıştırıcıya sahiptir. Sıcaklık ölçümü sabit termoçift ile yapılmaktadır ve sistemin maksimum çalışma basıncı 5000 psi olup basınç manometresi 5000 psi'a kadar basınçları ölçebilecek kapasitededir. Ayrıca reaktör soğutma sistemine sahiptir ve reaktöre yüksek basınç regülatörlü azot tüpü bağlanmıştır. Şekil 3.1'de Parr/USA marka 4575 reaktör şeklinin uyarlanmış hali gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Yüksek basınç yüksek sıcaklık reaktörünün şematik gösterimi: 1) Azot tüpü, 2) Reaktör, 3) Fırın, 4) Sıcaklık kontrol ünitesi, 5) Termoçift, 6) Basınç ölçer, 7) Soğutma borusu (giriş ve çıkış) (Akalın et al, 2013a).

Süperkritik etanol ekstraksiyonu deneylerinde 200 mL etanol ile birlikte deneysel tasarımdan elde edilen parametrelere göre belirlenen miktarda biyokütle/bitki reaktöre konularak sistem kapatılmıştır. Kapatılan sistem azot gazı ile yıkanarak ortamdaki oksijen uzaklaştırılmıştır. Ekstraksiyonun gerçekleştirileceği sıcaklık ve

ekstraksiyon süresi de deneysel tasarımdaki parametrelere göre belirlenmiştir. Süperkritik etanol ekstraksiyonunda reaktöre saf azot gazı verilerek funda yaprakları, alıç çekirdeği ve adaçayı kullanılan deneylerde 1 MPa başlangıç basıncı uygulanmış; ısırgan otu kullanılan deneyde 2 MPa başlangıç basıncı uygulanmış; Alman kayını kullanılan deneyde ise başlangıç basıncı uygulanmamıştır. Süperkritik etanol ekstraksiyonu gerçekleştirildikten sonra reaktör durdurulup oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Daha sonra reaktör içerisindeki katı ve sıvı ürünler bir behere alınarak reaktör 200 mL etanol ile yıkanmıştır. Vakum filtrasyonu ile katı ve sıvı ürünler ayrılmıştır. Sıvı ürüne susuz sodyum sülfat eklenip süzülmesiyle sıvı ürün içeriğindeki muhtemel suyun uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son olarak döner buharlaştırıcıda etanolün uzaklaştırılmasıyla biyo-yağ/ekstrakt elde edilmiştir. Biyokütle/ bitki derişimi ile ekstrakt/biyo-yağ verimi aşağıdaki formüllere göre hesaplanmıştır:

$$\text{Biyoyağ/ekstrakt verimi (ağ.\%)} = \frac{\text{Biyoyağ /ekstrakt miktarı}}{\text{Hammadde miktarı}} \text{ x } 100 \qquad (3.4)$$

$$\text{Biyokütle/bitki derişimi (\%)} = \frac{\text{Biyokütle /bitki miktarı (g)}}{\text{Etanol miktarı (mL)}} \text{ x } 100 \qquad (3.5)$$

Biyokütlelerin süperkritik ekstraksiyonunda biyokütle dönüşüm verimi de hesaplanmıştır. Dönüşüm veriminin hesaplanması için filtre kağıdında kalan katı ürün 105°C sıcaklıkta etüvde kurutulup soğutularak, oda sıcaklığında tartılmıştır. Biyokütle dönüşüm veriminin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\text{Biyokütle dönüşüm verimi (ağ.\%)} = \left(1 - \frac{\text{Katı ürün miktarı}}{\text{Hammadde miktarı}}\right) \text{ x } 100 \qquad (3.6)$$

3.4. SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU SONUCU ELDE EDİLEN ÜRÜNLERE YAPILAN ANALİZLER

3.4.1. Elementel Analiz

Süperkritik etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen biyo-yağlara, ekstraktlara ve katı ürünlere seçici olarak LECO CHNS TRuSpec cihazı kullanılarak elementel analiz

yapılmıştır. Hammaddelerin % karbon (C), % hidrojen (H) ve % azot (N) içeriği belirlenmiştir. % Oksijen (O) miktarı farktan hesaplanmıştır.

3.4.2. Biyo-yağların ve Ekstraktların GC-MS Analizi

Süperkritik etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen biyo-yağlar ve ekstraktlar seçici olarak gaz kromatografisi kütle spektrometresi cihazı (GC-MS) kullanılarak analiz edilmiştir. Ayırma işlemi 30 m x 0.25 mm i.d. fenil metil siloksan kapiler kolona sahip 6890 Gas Chromotograph Agilent kullanan HP5MS ile gerçekleştirilmiştir. Biyo-yağ/bitki ekstraktları için kullanılan sıcaklık programı şu şekildedir. Gaz kromotografi fırını 40°C'de başlatılmak üzere programlanmış ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletilmiştir. Ardından 2°C/dk ısıtma hızı ile sıcaklık 170°C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 5 dakika bekletildikten sonra 6°C/dk ısıtma hızıyla 10 dakika bekletilmek üzere sıcaklık 250°C'ye çıkarılmıştır. Son olarak 15°C/dk ısıtma hızı ile sıcaklık 300°C'ye çıkarılmış ve bu sıcaklıkta 10 dakika bekletilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (1 mL/dk) kullanılmıştır. Kolon sonunda elektron çarpışma iyonizasyonu moduyla çalıştırılan Agilent 5973 serisi kütle seçici detektörü kullanılmıştır. Biyo-yağ/ekstrakt içerisinde bulunan organik bileşikler NIST kütüphanesine sahip G1035A yazılımı ile aydınlatılmıştır.

3.4.3. Ekstraksiyon Sonrası Katı Ürünlerin Yüzey Analizi

Süperkritik etanol sonucunda elde edilen katı ürünler seçici olarak FEI Quanta 450 FEG tipi SEM cihazında analiz edilmiştir. Böylelikle seçilen katı ürünlerin yüzey yapıları görüntülenip ve incelenmiştir.

3.5. SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN DENEYSEL TASARIM

Alman kayını talaşından, ısırgan otundan ve funda yapraklarından biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonunda üç faktörlü Merkezi Kompozit Tasarım yöntemi kullanılmıştır. Uygulanan merkezi kompozit tasarım yönteminde üç faktörün (sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/bitki derişimi) elde edilen biyo-

yağ/ekstrakt verimine etkisi incelenmiştir. Ayrıca biyokütle kaynağı olan Alman kayını talaşının kullanıldığı ekstraksiyon yönteminde elde edilen dönüşüm oranına sıcaklık, süre ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi de incelenmiştir. Kullanılan her bir biyokütle/bitki kaynağı için seçilen faktörlerin değer aralığı önceden gerçekleştirilen ön denemeler sonucunda belirlenmiştir.

Alıç çekirdeği ve adaçayından biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonunda ise Box-Behnken tasarım yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan Box-Behnken tasarım yönteminde üç faktörün (sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/bitki derişimi) elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimine etkisi incelenmiştir. Bir biyokütle kaynağı olan alıç çekirdeğinin kullanıldığı ekstraksiyon işleminde elde edilen dönüşüm oranına sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi de incelenmiştir. Kullanılan her bir biyokütle/bitki kaynağı için seçilen faktörlerin değer aralığı ön denemeler sonucunda belirlenmiştir.

Ön denemelerle faktörlerin değer aralıkları belirlendikten sonra deney tasarımından elde edilen koşullara göre deneyler yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen sonuçlara göre matematiksel model oluşturulmuş ve sonuçlar Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodolgy) kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca matematiksel modelin geçerliliğinin, faktörlerin önemlilik derecesinin belirlenmesi amacıyla sonuçlar analiz edilmiştir.

Biyokütleden biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu için deneysel tasarım çalışmalarında STATISTICA 8.0 yazılımı kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

DENEYSEL TASARIM ÇALIŞMALARI

4.1. ALMAN KAYININDAN BİYO-YAĞLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM

Tez kapsamında odunsu bir biyokütle olan Alman kayını talaşından biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulanmıştır. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Üç değişkenli merkezi kompozit tasarımda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi sırasıyla x_1, x_2 ve x_3 olarak kodlandıktan sonra ön denemeler sonucunda faktörlerin değer aralıkları (minimum, maksimum ve merkez noktalar) belirlenmiştir. Çizelge 4.1'de faktörler ve faktör aralıkları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları.

Faktörler	**Sembol**	**Faktörlerin değer aralıkları**				
		-1,76	-1	0	+1	+1,76
Sıcaklık (°C)	x_1	265	280	300	320	335
Süre (dk)	x_2	37	60	90	120	143
Biyokütle derişimi (%)	x_3	4	8	10	15	16

Çizelge 4.1'de faktörlerin minimum değerleri -1, maksimum değerleri +1 ve merkez değerleri de 0 olarak kodlanmıştır. Yıldız noktalar ise α= -1,76 ve α= +1,76 olarak verilmiştir. Maksimum ve minimum noktaların dışında kalan eksenel (yıldız) noktalar da α değerine göre gösterilmiştir. Bu faktör değerlerine göre oluşturulan

kodlanmış ve kodlanmamış değerlerle verilen iki merkez nokta ile altı adet eksenel (yıldız) noktaya sahip tasarım matrisi ve tasarımdaki koşullardan elde edilen cevap değerleri Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de gösterilmiştir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi deney koşulları biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne önemli ölçüde etki etmiştir.

Bağımsız değişkenler (faktörler) ile bağımlı değişkenler (deneyden elde edilen cevaplar) arasındaki ilişkiyi oluşturmak için ikinci dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenler olan biyo-yağ verimi (y_1) ve biyokütle dönüşümü (y_2) ile bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve biyokütle derişimi (x_3) arasındaki ilişki için oluşturulan ikinci dereceden polinom eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$y_1 = -673{,}772 + 4{,}273x_1 + 0{,}366x_2 + 1{,}234x_3 - 0{,}006x_1^2 - 0{,}001x_2^2 + 0{,}056x_3^2 - 0{,}001x_1x_2 - 0{,}012x_1x_3 + 0{,}006x_2x_3 \quad (4.1)$$

$$y_2 = -1794{,}83 + 10{,}73x_1 + 1{,}21x_2 + 16{,}71x_3 - 0{,}02x_1^2 - 0{,}002x_2^2 + 0{,}21x_3^2 - 0{,}003x_1x_2 - 0{,}04x_1x_3 + 0{,}004x_2x_3 \quad (4.2)$$

y_1 ve y_2: Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü
x_1, x_2, x_3: Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, biyokütle derişimi

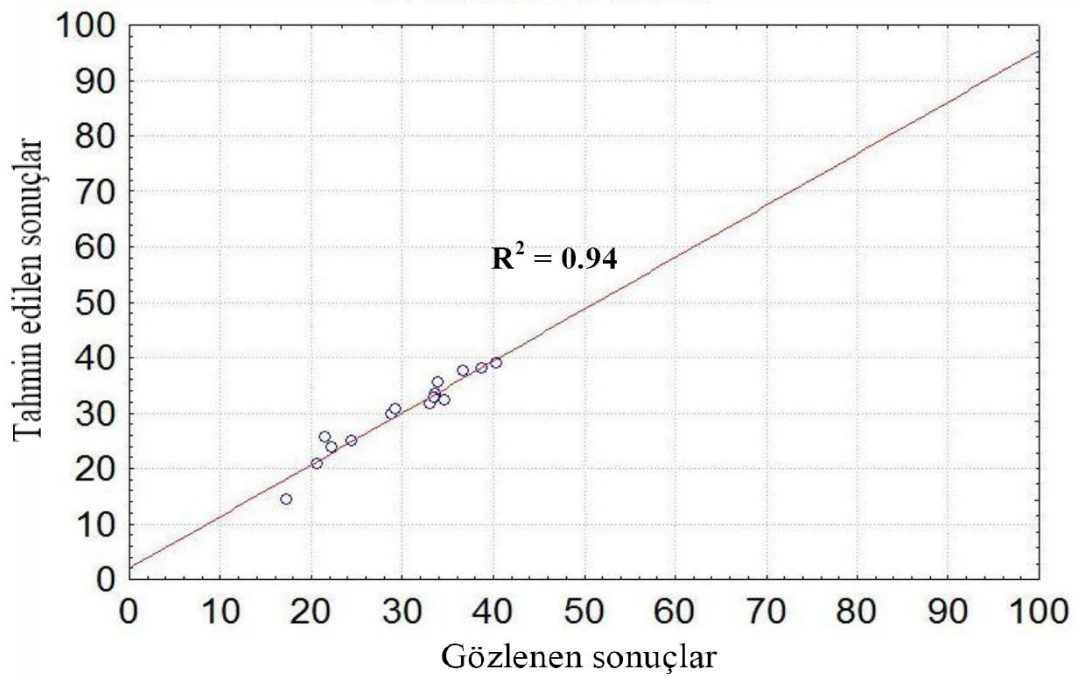
Çizelge 4.2. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevaplar	
		x_1	x_2	x_3	Y_1	Y_2
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Biyokütle derişimi (%)**	**Biyo-yağ verimi (ağ.%)**	**Biyokütle dönüşümü (ağ.%)**
1	1	-1	-1	-1	22,25	48,69
2	1	-1	-1	+1	20,60	55,03
3	1	-1	+1	-1	21,50	47,56
4	1	-1	+1	+1	24,50	67,37
5	1	+1	-1	-1	38,81	87,56
6	1	+1	-1	+1	33,10	88,50
7	1	+1	+1	-1	36,75	88,50
8	1	+1	+1	+1	33,70	85,77
9(C)	1	0	0	0	33,70	81,60
10	2	-1,76	0	0	17,35	40,90
11	2	+1,76	0	0	34,00	87,65
12	2	0	-1,76	0	28,85	69,00
13	2	0	+1,76	0	34,65	87,35
14	2	0	0	-1,76	40,37	65,63
15	2	0	0	+1,76	29,31	86,22
16(C)	2	0	0	0	33,55	81,40

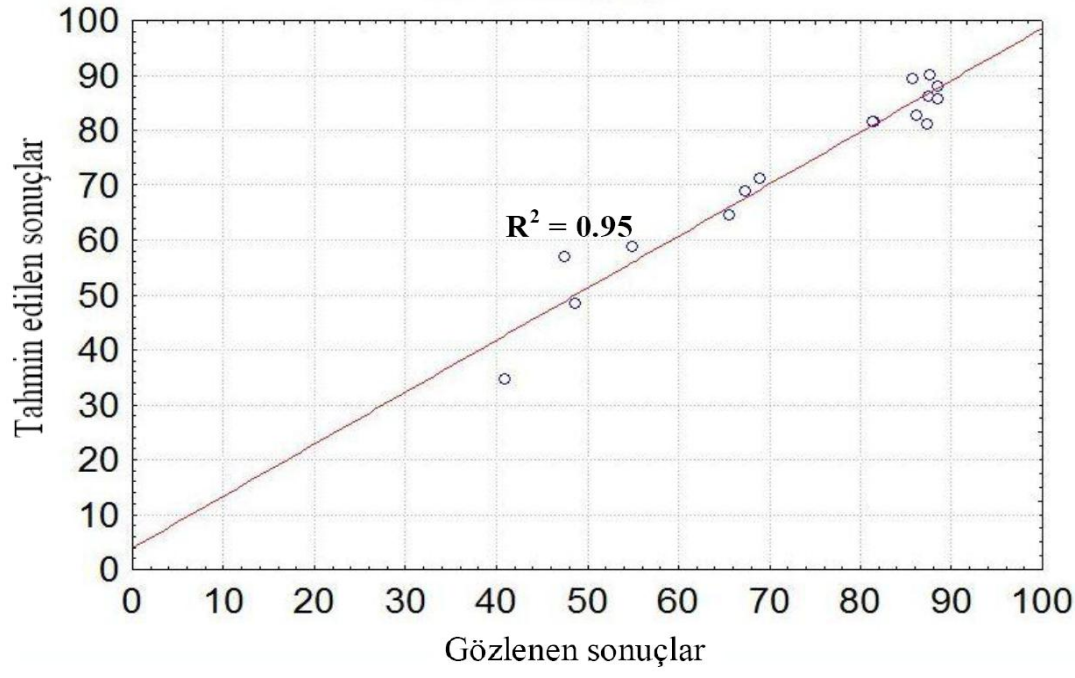
Çizelge 4.3. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevaplar	
		x_1	x_2	x_3	Y_1	Y_2
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Biyokütle derişimi (%)**	**Biyo-yağ verimi (ağ.%)**	**Biyokütle dönüşümü (ağ.%)**
1	1	280	60	8	22,25	48,69
2	1	280	60	15	20,60	55,03
3	1	280	120	8	21,50	47,56
4	1	280	120	15	24,50	67,37
5	1	320	60	8	38,81	87,56
6	1	320	60	15	33,10	88,50
7	1	320	120	8	36,75	88,50
8	1	320	120	15	33,70	85,77
9(C)	1	300	90	10	33,70	81,60
10	2	265	90	10	17,35	40,90
11	2	335	90	10	34,00	87,65
12	2	300	37	10	28,85	69,00
13	2	300	143	10	34,65	87,35
14	2	300	90	4	40,37	65,63
15	2	300	90	16	29,31	86,22
16(C)	2	300	90	10	33,55	81,40

Biyo-yağ verimi (ağ.%) ve biyokütle dönüşümü (ağ.%) için deneysel sonuçlara karşı hesaplanan sonuçlar Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.1. Tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar, a) Biyo-yağ verimi b) Biyokütle dönüşümü.

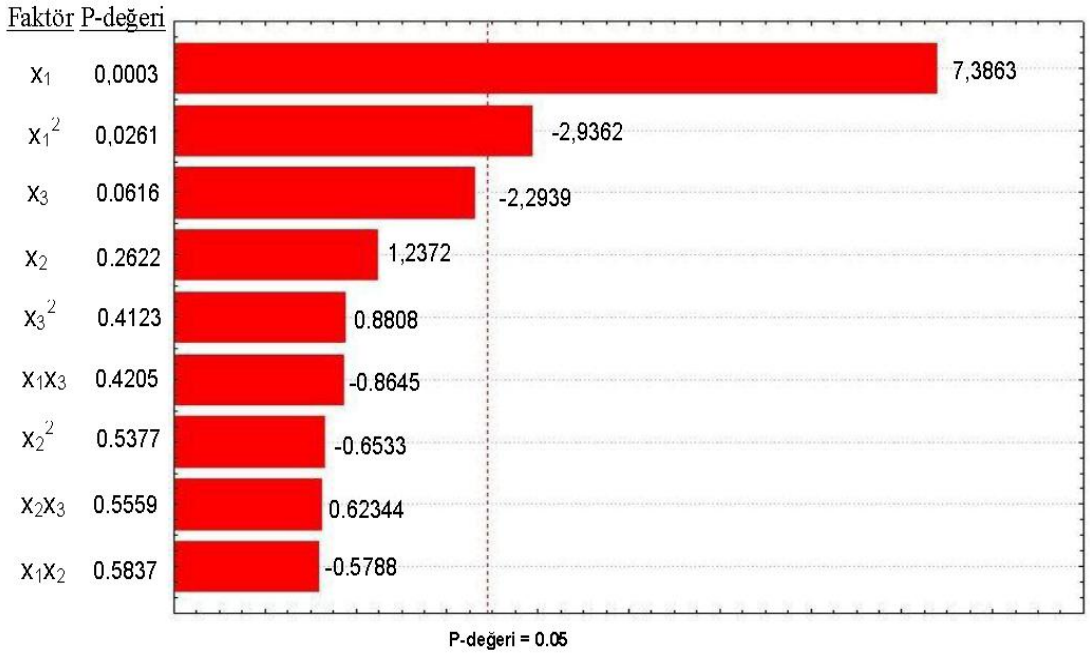
Deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyum belirlilik katsayısı R^2 değeri ile değerlendirilir. Şekil 4.1'den görüldüğü gibi R^2 değerleri biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için sırasıyla 0,94 ve 0,95 olmuştur. Bu sonuçlar cevaplardaki değişimlerin %94 ve % 95'inin model tarafından açıklanabildiğini göstermektedir. R^2 değerinin 0,75'den fazla ve yüksek olması bu deney aralığında modelin yeterliliğini ifade etmektedir (Daneshvand et al., 2012; Banik and Pandey, 2008; Mohapatra et al, 2011; Haaland, 1989). Düzeltilmiş R^2 değerleri ise biyo-yağ verimi için 0,84; biyokütle dönüşümü için ise 0,87 olmuştur. Varyasyon katsayısı yüzdesi ise biyo-yağ verimi için %9,33; biyokütle dönüşümü için ise %8,44 olmuştur. Varyasyon katsayısı yüzdesi ne kadar düşük olursa, deneysel veriler arasındaki tahmin ve güvenilirlik o kadar fazladır (Liu et al., 2009).

Çizelge 4.4. Biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi.

Varyasyon	**SS**	**Df**	**MS**	**F_{hes}**	**$F_{0.05}$**
Biyo-yağ verimi					
Regresyon	682,55	9	75,84	9,56	4,10
Artık	47,57	6	7,93		
Uyum eksikliği	47,56	5	9,51		
Saf hata	0,01	1	0,01		
Toplam	730,12	15			
R^2 0,94		Düzeltilmiş-R^2	0,84		
Biyokütle dönüşümü					
Regresyon	4060,91	9	451,21	11,88	4,10
Artık	227,97	6	37,99		
Uyum eksikliği	227,95	5	45,59		
Saf hata	0,02	1	0,02		
Toplam	4288,88				
R^2 0,95		Düzeltilmiş-R^2	0,87		

İkinci dereceden polinomların istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi tablosu ile kontrol edilmiştir. Çizelge 4.4'de biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi gösterilmiştir. Çizelge 4.4'den görüldüğü gibi biyo-yağ verimi için hesaplanan F değeri (9,56), tablodan okunan (4,10) değerden büyük olması null hipotezinin (H_0) reddedildiği dolayısıyla deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin göstergesidir. Benzer şekilde biyokütle dönüşümü için hesaplanan F değeri (11,88), tablodan okunan F değerinden (4,10) büyük olmuştur. Dolayısıyla bu sonuç da deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğin göstergesidir.

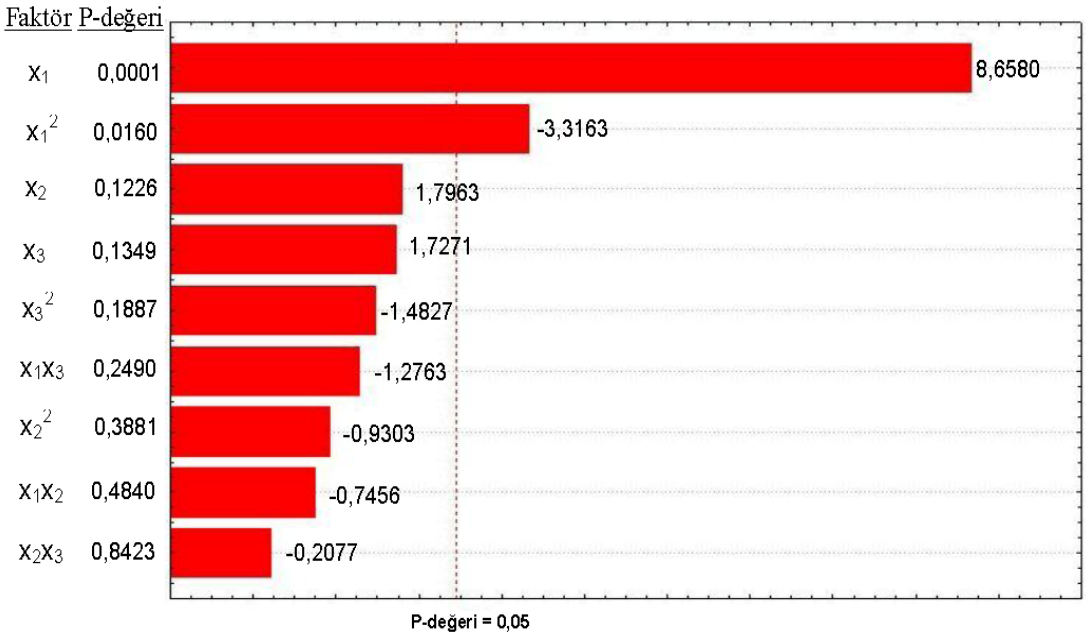
Şekil 4.2'de biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi verilmiştir. Faktörleri önemlilik derecesine göre sıralayan pareto çizelgeleri varyans analizi etki değerlendirmesini göstermektedir. Pareto çizelgelerindeki t değeri ne kadar büyük, p değeri de ne kadar küçük olursa ilgili sabit de o kadar önemli olmaktadır. Şekil 4.2.'den görüldüğü gibi biyo-yağ verimi için en önemli faktör en yüksek t değerine (7,3863) ve en düşük p değerine (0,0003) sahip olan sıcaklığın lineer terimidir.



Şekil 4.2. Biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi.

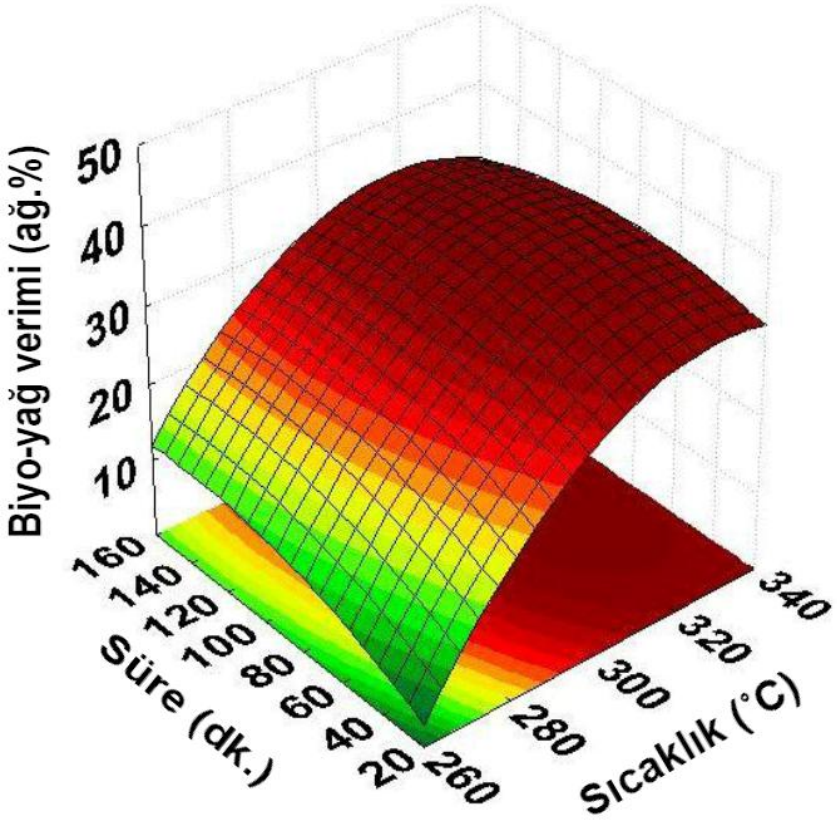
Şekil 4.3'de ise biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi verilmiştir. Şekil 4.3.'den görüldüğü gibi biyokütle dönüşümü için en önemli faktör en yüksek t değerine (8,6580) ve en düşük p değerine (0,0001) sahip olan sıcaklığın lineer terimidir. Buna göre hem biyokütle verimi hem de biyokütle dönüşümü için en önemli değişkenin sıcaklık olduğu anlaşılmaktadır. Ekstraksiyon süresi (x_2), biyokütle derişimi (x_3) ve bunların karesel ve etkileşim terimleri ise istatistiksel olarak önemli olmamıştır. Sıcaklık (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve biyokütle derişimi (x_3) biyokütle dönüşümünde pozitif değere sahiptir. Buna göre bu faktörlerdeki artış, biyokütle dönüşümünde artışa neden olmaktadır. Biyo-yağ veriminde ise sıcaklık (x_1) ve süre (x_2) faktörlerinin lineer terimleri, biyokütle derişiminin karesel terimi, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin etkileşim terimi pozitif değere sahipken, biyokütle

derişiminin (x_3) lineer terimi, sıcaklığın ve ekstraksiyon süresinin karesel terimleri, sıcaklık ve sürenin etkileşim terimi, sıcaklık ve biyokütle derişiminin etkileşim terimi ise negatif değere sahiptir. Bu değerlere göre biyokütle derişimindeki artış biyo-yağ veriminin azalmasına neden olmaktadır.



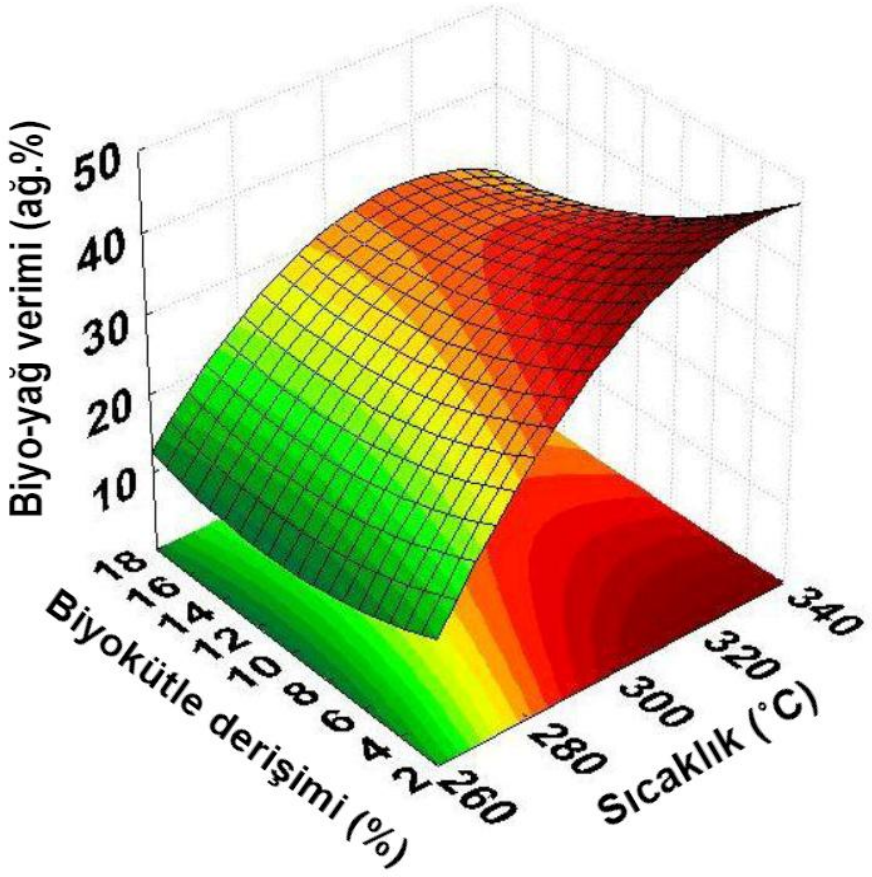
Şekil 4.3. Biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi.

Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi faktörlerinin biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.4'de ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının fonksiyonu olarak biyo-yağ veriminin cevap yüzeyi verilmiştir. Şekil 4.4'den anlaşıldığı gibi düşük sıcaklıklarda (280°C) uzun ekstraksiyon süreleri biyo-yağ veriminin artmasına neden olmaktadır. Merkez nokta ve merkez nokta civarındaki ekstraksiyon sürelerinde (~90-100 dk) ekstraksiyon sıcaklığının 320°C'ye kadar artmasıyla biyo-yağ verimi artarak maksimum düzeye ulaşmaktadır.



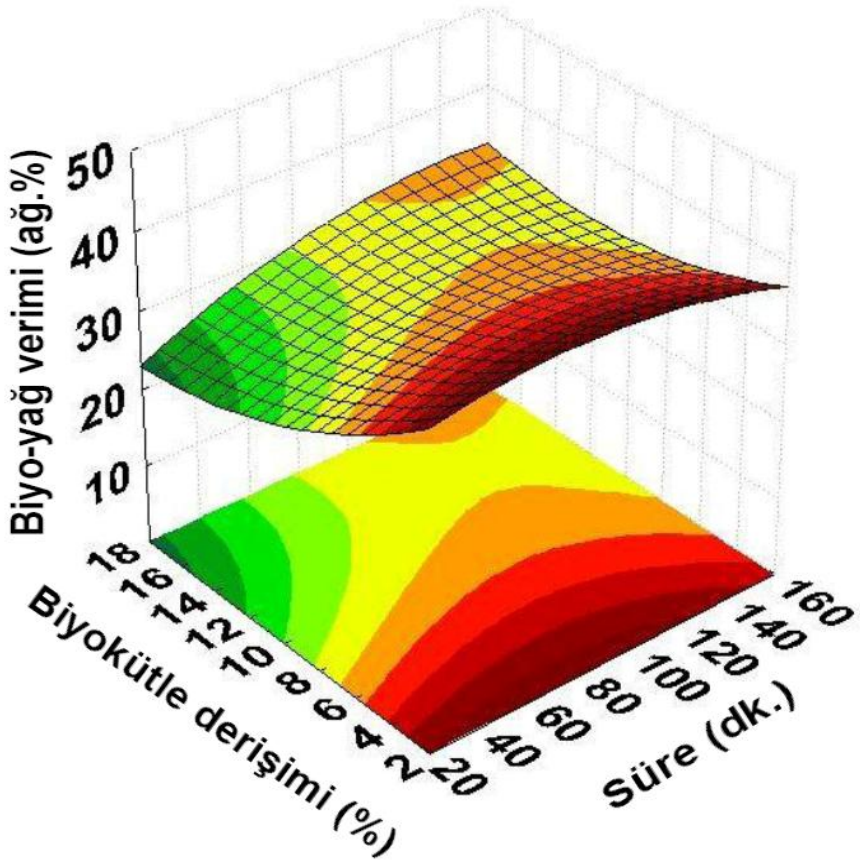
Şekil 4.4. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Sıcaklığın ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi Şekil 4.5'de verilmiştir. Buna göre 300°C'den yüksek sıcaklıklarda, sıcaklıktaki artış biyo-yağ veriminin artmasına neden olmaktadır. Genel olarak biyokütle derişiminin artmasıyla birlikte elde edilen biyo-yağ veriminde azalma meydana gelmektedir.



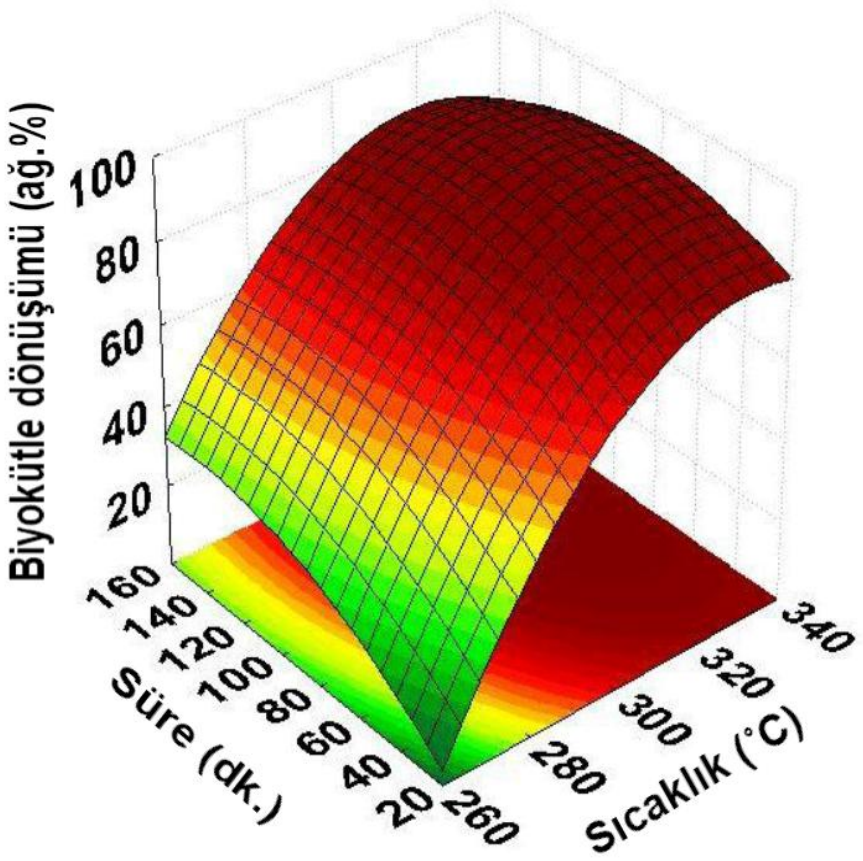
Şekil 4.5. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Biyo-yağ veriminin biyokütle derişimi ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak verildiği Şekil 4.6'da, en yüksek verimin düşük biyokütle derişimlerinde ~60-80 dk. ekstraksiyon sürelerinden elde edildiği görülmektedir. Ancak 80 dakikadan uzun ekstraksiyon sürelerinde elde edilen biyo-yağ veriminde azalma meydana gelmektedir.



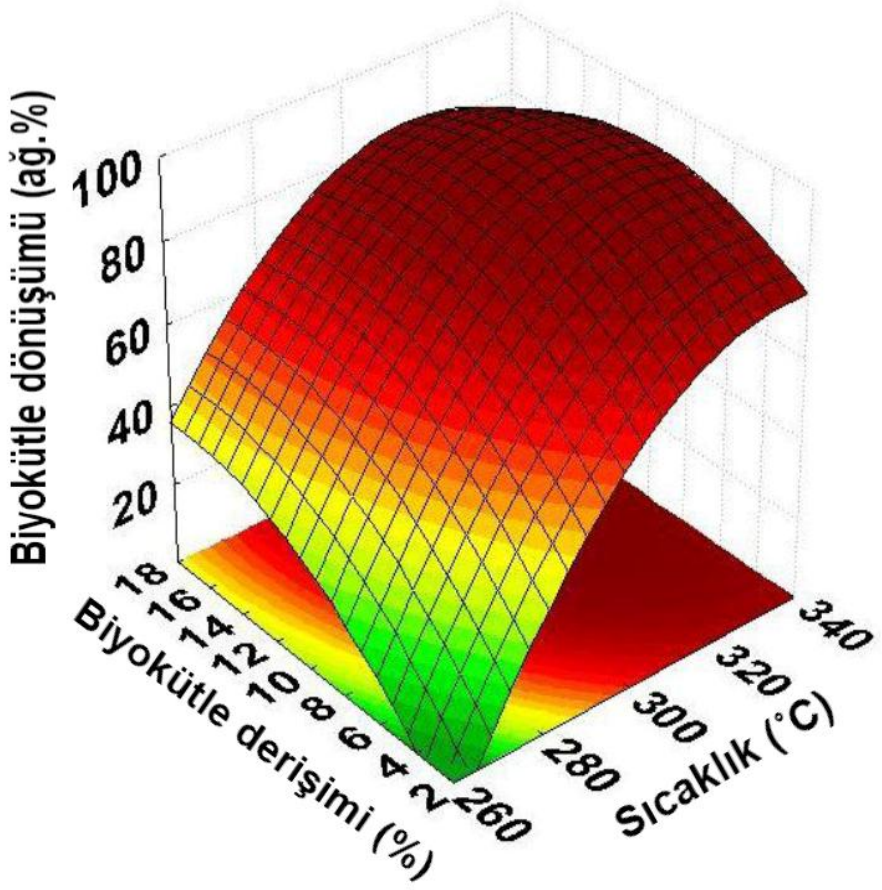
Şekil 4.6. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Şekil 4.7'de biyokütle dönüşümü ekstraksiyon süresi ve sıcaklığın fonksiyonu olarak verilmiştir. En yüksek biyokütle dönüşümü 320-330°C civarı sıcaklık ve 100-120 dakika civarı sürelerde elde edilmiştir. Genel olarak sıcaklığın 320-330°C'ye kadar artışı tüm ekstraksiyon sürelerinde dönüşümü artırmıştır. Ancak bu noktadan sonra sıcaklığın artmasıyla biyokütle dönüşümü azalmaya başlamıştır.



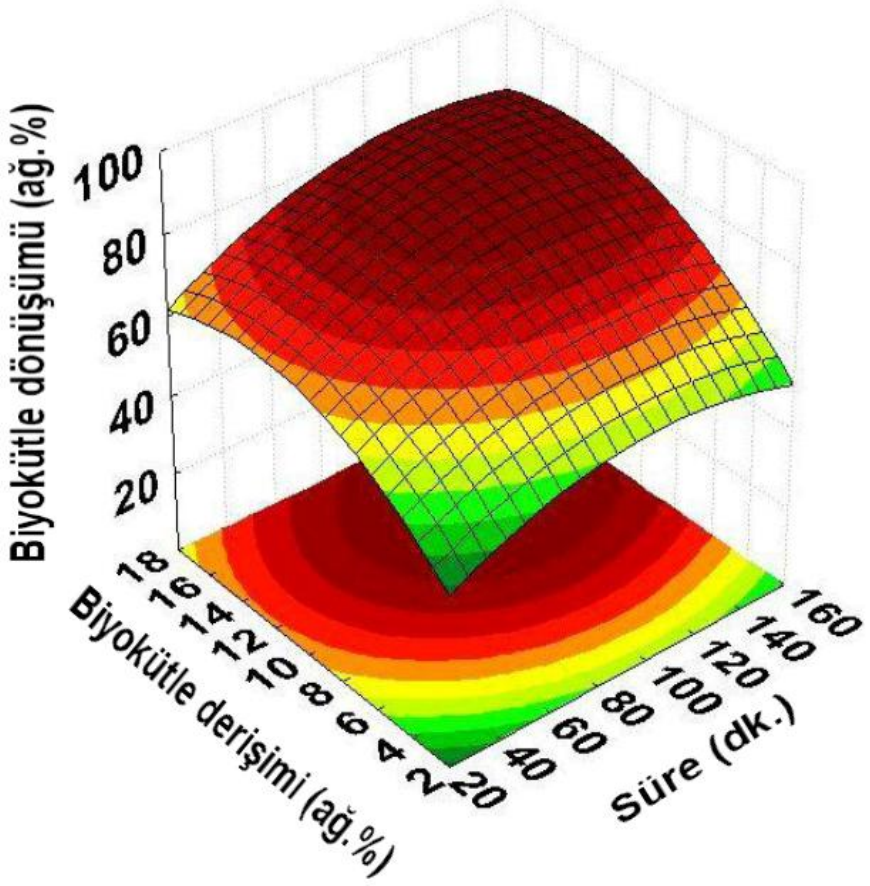
Şekil 4.7. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Şekil 4.8'de biyokütle dönüşümü biyokütle derişimi ve sıcaklığın fonksiyonu olarak verilmiştir. Elde edilen en yüksek biyokütle dönüşümü 320-330°C civarı sıcaklıklarda %12-14 civarındaki biyokütle derişimlerinde elde edilmiştir. En yüksek dönüşümün elde edildiği 320-330°C sıcaklıklarda biyokütle derişiminin artışı dönüşümün de artmasına neden olurken; %12-14'den daha yüksek derişimlerde dönüşüm azalmaya başlamıştır.



Şekil 4.8. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyinin verildiği Şekil 4.9'da, en yüksek verimin diğer fonksiyonlardaki verilerle uyumlu olarak 100-120 dakika sürelerde, %12-14 biyokütle derişimlerinde elde edilmiştir. Yüksek biyokütle derişimlerinde ekstraksiyonun süresinin artırılmasıyla elde edilen dönüşümdeki artış; düşük derişimlerde sürenin artırılmasıyla elde edilenden daha fazla olmuştur.



Şekil 4.9. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Çizelge 4.5'de deney tasarımının geçerliliğini belirleyen ve tasarım sınırları içinde olan optimum koşullar gösterilmektedir. Deneysel tasarıma göre biyo-yağ verimi için 316°C ekstraksiyon sıcaklığı, 124 dakika ekstraksiyon süresi, %16 biyokütle derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan biyo-yağ verimi ağ. %33,50 olmuştur. Biyokütle dönüşümü için ise 322°C ekstraksiyon sıcaklığı, 100 dakika ekstraksiyon süresi, %12 biyokütle derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan biyokütle dönüşümü ağ. %91,95 olmuştur. Model tahmininin geçerliliğini belirlemek amacıyla bu koşullarda deneyler yapılmıştır. Biyo-yağ verimi için tahmini değer %33,51 olurken, deney sonucunda %31,28 verim elde edilmiştir. Bu verilere göre tahmini değer ile gözlenen değer arasında %6,6 sapma bulunmaktadır. Biyokütle dönüşümü için ise tahmini değer %91,95 olurken, deney sonucunda %88,00 dönüşüm elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre tahmini değer ile

gözlenen değer arasında %4,3 sapma bulunmaktadır. Her iki değer de modelin geçerliliği için kabul edilebilir oranlardır.

Çizelge 4.5. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için kritik koşullardaki tahmini ve gözlenen sonuçlar.

Faktörler	Gözlenen minimum	Kritik değerler	Gözlenen maksimum
Biyo-yağ verimi			
Sıcaklık (°C)	265	316	335
Ekstraksiyon süresi (dk.)	37	124	143
Biyokütle derişimi (%)	4	16	16
Tahmini biyo-yağ verimi (ağ.%)		33,51	
Gerçek biyo-yağ verimi (ağ.%)		31,28	
Biyokütle dönüşümü			
Sıcaklık (°C)	265	322	335
Ekstraksiyon süresi (dk.)	37	100	143
Biyokütle derişimi (%)	4	11,54	16
Tahmini biyokütle dönüşümü (ağ.%)		91,95	
Gerçek biyokütle dönüşümü (ağ.%)		88,00	

Çizelge 4.6. Merkez noktadaki deneyden elde edilen biyo-yağın bileşimi.

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
7,16	83	2-Hidroksipropanoik asit etil ester	1,72
8,21	92	2-Siklopenten-1-on	0,08
9,58	95	2-Furanmetanol	1,23
11,68	86	Tetrahidro-2-furanmetanol	0,13
13,13	83	2-Hidroksibütanoik asit etil ester	2,93
13,42	90	2- Hidroksibütanoik asit	0,36
13,80	83	Etoksi asetik asit etil ester	0,13
15,06	72	2,2-Dietoksietanol	0,08
18,51	81	Fenol	0,19
18,80	96	3,4-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,12
18,99	96	2,3-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,63
21,10	95	3-Metil-1,2-siklopentandion	1,37
22,45	95	2-Furankarboksilik asit etil ester	0,45
22,78	87	2-Hidroksi-3,4-dimetil-2-siklopenten-1-on	0,48
22,94	93	2-Metilfenol	0,13
23,18	96	4-Oksopentanoik asit etil ester	1,11
24,41	95	2-Metoksifenol	1,80
24,53	87	2,3,4-Trimetil-2-siklopenten-1-on	0,08
26,25	96	3-Etil-2-hidroksi-2-siklopenten-1-on	1,61
28,67	87	Benzoik asit etil ester	0,14
29,04	81	4-Metoksi-3-metilfenol	0,22
29,56	90	Bütandioik asit etil ester	0,22
29,83	96	2-Metoksi-4-metilfenol	1,35
30,66	91	2-Hidroksi-3-propil-2-siklopenten-1-on	0,59
30,81	80	Dietil metilsüksinat	0,65
32,21	72	Bütandioik asit dimetil ester	0,49
33,20	96	3-Metoksi-1,2-benzendiol	0,83
34,00	81	4-Etil-2-metoksifenol	4,81
34,35	90	Pentandioik asit dietil ester	1,13
35,27	80	5-Oksotetrahidrofuran-2-karboksilik asit etil ester	0,24
36,17	72	Tetrahidro-6-propil-2H-piran-2-on	0,28
37,49	93	2,6-Dimetoksifenol	7,08
38,03	91	2-Metoksi-4-propilfenol	4,03
38,98	74	Hekzandioik asit dietil ester	0,36
39,69	95	2-Metoksi-4-(1-propenil)fenol	0,55
41,48	83	1,2,4-Trimetoksibenzen	4,11
44,73	72	5-Tert-bütilpirogallol	5,08
44,87	72	Homovanilil alkol	0,31
45,04	72	Flopropion	0,47
46,28	83	1-(4-Hidroksi-3,5-dimetoksifenil)-etanon	0,19
47,00	97	4-Hidroksi-3-metoksibenzoik asit etil ester	0,18
47,67	99	2,6-Dimetoksi-4-(2-propenil)fenol	1,55
48,00	72	4-Propil-1,1'-difenil	7,36
49,14	86	4-Hidroksi-3-metoksifenilasetil formik asit	0,38

Çizelge 4.6. (devam ediyor).

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
49,73	95	4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit	0,37
49,90	90	3-(4-Hidroksi-3-metoksifenil)-2-propenoik asit	0,21
52,39	97	1-(4-Hidroksi-3,5-dimetoksifenil)etanon	0,54
52,88	96	Etil-,beta,-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propiyonat	0,20
54,35	76	3,5-Dimetoksi-4-hidroksifenilasetik asit	0,17
58,96	80	3,6-Diazahomoadamantan-9-ol	1,63
63,27	98	Hekzadekanoik asit etil ester	0,25
68,46	92	Linoleik asit etil ester	0,07
74,05	72	Etil hekzadekandioat	0,06
80,36	92	2',4'-Dihidroksiasetofenon oksim	0,16

Çizelge 4.6'da 9 numaralı (merkez nokta) deneyden elde edilen biyo-yağın içeriğindeki bileşikler verilmiştir. Çizelge 4.6.'dan biyo-yağ içeriğinde çoğunlukla fenolik bileşikler olduğu görülmektedir. Bu bileşikler temel olarak odunun yapısındaki lignin kısmından kaynaklanmaktadır (Klein and Virk, 2008). Bağıl konsantrasyonlar dikkate alındığında 4-propil-1,1'-difenil başlıca bileşik olarak bulunmuştur.

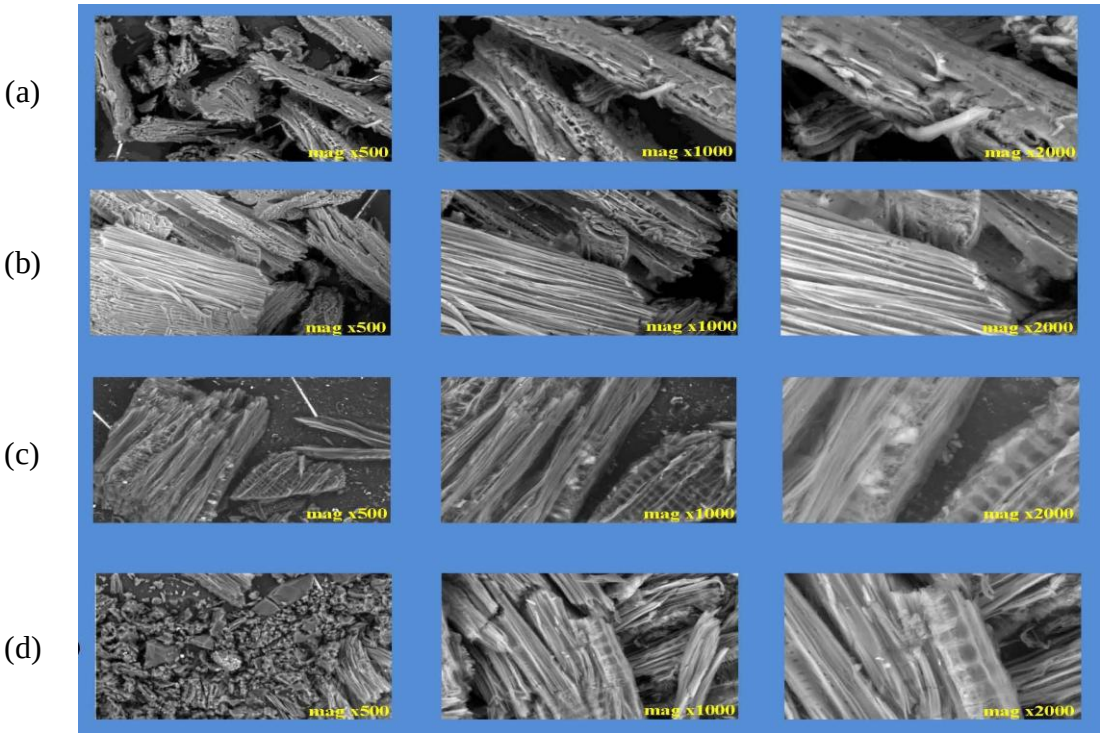
Çizelge 4.7. Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri.

Ürün	Deney no	%C	%H	%O[a]	H/C	O/C
Hammadde	-	45,98	7,43	46,59	1,94	0,76
Biyo-yağ	2	59,15	7,80	33,05	1,58	0,42
Biyo-yağ	9	60,36	8,38	31,26	1,67	0,39
Biyo-yağ	14	58,03	8,19	33,78	1,69	0,44
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	2	50,63	6,87	42,50	1,63	0,63
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	9	58,94	6,77	34,29	1,38	0,44
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	14	62,59	6,59	30,82	1,26	0,37

[a] Farktan

Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelgeye göre biyo-yağlar hammaddeye göre daha yüksek miktarda karbon ve daha düşük miktarda oksijen içermektedir. Süperkritik ekstraksiyon prosesinin önemli derecede oksijen uzaklaştırılmasına neden olduğu O/C oranlarından anlaşılmaktadır. Hammaddenin O/C oranı 0,76 iken biyo-yağdaki

oran 0,39'a kadar düşmüştür. Biyo-yağlardaki karbon içerikleri birbirine yakın olmakla birlikte en yüksek karbon içeriği %60,36 ile 9 numaralı deneyden elde edilen biyo-yağda olmuştur. Ekstraksiyon sonrası katı ürünlerin karbon içeriğinin sıcaklık artışıyla birlikte artarken, en yüksek karbon içeriği %62,59 ile 14 numaralı deneyden elde edilen katı üründe gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri a) Hammadde, b) Deney no: 2, c) Deney no: 9, d) Deney no: 14.

Ekstraksiyon sonrası elde edilen seçilmiş katı ürünlerin SEM görüntüleri Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekilden farklı koşullardan elde edilen katı ürünlerin SEM görüntülerinin nispeten değişik olduğu görülmektedir. Düşük sıcaklıktaki 2 numaralı deneyden elde edilen katı ürünün yüzey morfolojisi lif matriksi şeklinde olmuştur. Ancak daha yüksek sıcaklıktaki 9 ve 14 numaralı deneylerden elde edilen katı ürünlerde bu yapı parçalanarak amorf yapı haline dönüşmüştür. Bunun nedeninin 9 ve 14 numaralı deneylerde katı ürün yapısındaki uçucuların uzaklaşması olduğu düşünülmektedir.

4.2. ISIRGAN OTUNDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM

Tez kapsamında ısırgan otunun süperkritik etanol ekstraksiyonu için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulanmıştır. Isırgan ekstrakt verimine ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Üç değişkenli merkezi kompozit tasarımda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi sırasıyla x_1, x_2 ve x_3 olarak kodlandıktan sonra ön denemeler sonucunda faktörlerin değer aralıkları (minimum, maksimum ve merkez noktalar) belirlenmiştir. Çizelge 4.8'de faktörler ve faktörlerin değer aralıkları verilmiştir.

Çizelge 4.8. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları.

Faktörler	**Sembol**	**Faktörlerin değer aralıkları**				
		-1,76	-1	0	+1	+1,76
Sıcaklık (°C)	x_1	264	280	300	320	336
Süre (dk)	x_2	36	60	90	120	144
Bitki derişimi (%)	x_3	6	8	10	12	14

Çizelge 4.8'de faktörlerin minimum değerleri -1, maksimum değerleri +1 ve merkez değerleri de 0 olarak kodlanmıştır. Yıldız noktalar ise α= -1,76 ve α= +1,76 olarak verilmiştir. Maksimum ve minimum noktaların dışında kalan eksenel (yıldız) noktalar α değerine göre gösterilmiştir. Bu faktör değerlerine göre oluşturulan kodlanmış ve kodlanmamış değerlerle verilen dört merkez nokta ile altı adet eksenel (yıldız) noktaya sahip tasarım matrisi ve tasarımdaki koşullardan elde edilen cevap değerleri Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi deney koşulları ekstrakt verimine önemli ölçüde etki ederken minimum ve maksimum ısırgan ekstrakt verimi sırasıyla ağ. %30,50 ve % 42,80 olmuştur.

Çizelge 4.9. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevap
		x_1	x_2	x_3	Y_1
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	1	-1	-1	-1	35,70
2	1	-1	-1	+1	33,60
3	1	-1	+1	-1	36,40
4	1	-1	+1	+1	32,60
5	1	+1	-1	-1	42,80
6	1	+1	-1	+1	40,10
7	1	+1	+1	-1	42,60
8	1	+1	+1	+1	39,30
9(C)	1	0	0	0	39,60
10(C)	1	0	0	0	39,30
11	2	-1,76	0	0	30,50
12	2	+1,76	0	0	41,60
13	2	0	-1,76	0	37,40
14	2	0	+1,76	0	37,70
15	2	0	0	-1,76	36,30
16	2	0	0	+1,76	36,10
17(C)	2	0	0	0	39,70
18(C)	2	0	0	0	39,90

Çizelge 4.10. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevap
		x_1	x_2	x_3	Y_1
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	1	280	60	8	35,70
2	1	280	60	12	33,60
3	1	280	120	8	36,40
4	1	280	120	12	32,60
5	1	320	60	8	42,80
6	1	320	60	12	40,10
7	1	320	120	8	42,60
8	1	320	120	12	39,30
9(C)	1	300	90	10	39,60
10(C)	1	300	90	10	39,30
11	2	264	90	10	30,50
12	2	336	90	10	41,60
13	2	300	36	10	37,40
14	2	300	144	10	37,70
15	2	300	90	6	36,30
16	2	300	90	14	36,10
17(C)	2	300	90	10	39,70
18(C)	2	300	90	10	39,90

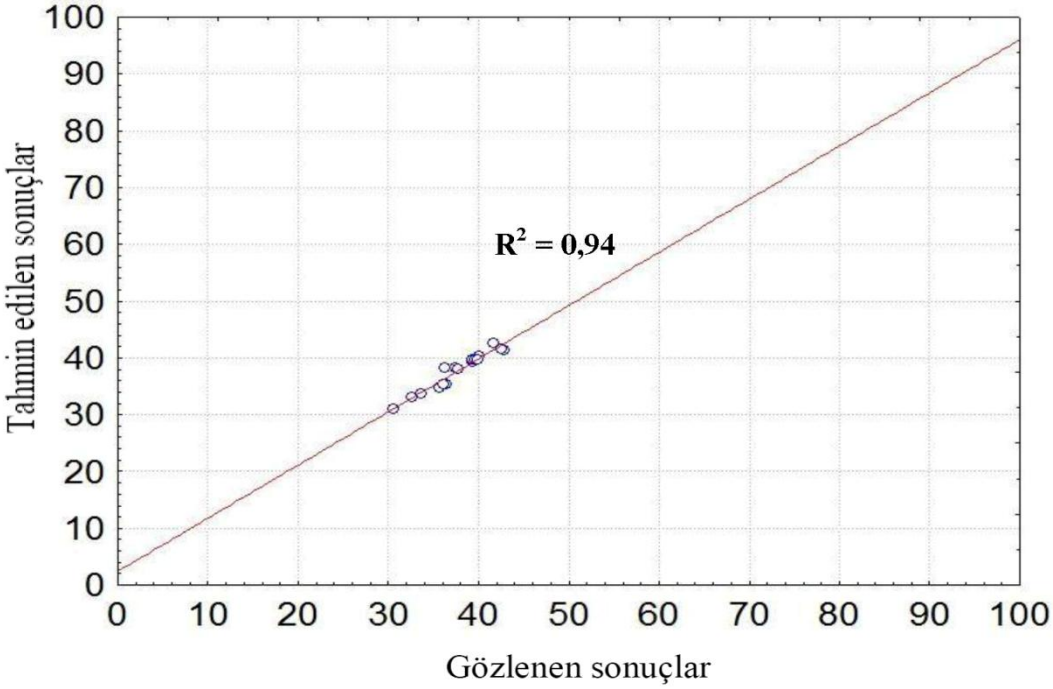
Bağımsız değişkenler (faktörler) ile bağımlı değişkenler (deneyden elde edilen cevaplar) arasındaki ilişkiyi oluşturmak için ikinci dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenler olan ekstrakt verimi (y_1) ile bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve biyokütle derişimi (x_3) arasındaki ilişki için oluşturulan ikinci dereceden polinom eşitliği aşağıdaki gibidir.

$$y_1 = -249{,}31 + 1{,}569x_1 + 0{,}186x_2 + 4{,}656x_3 - 0{,}002x_1^2 - 0{,}001x_2^2 - 0{,}227x_3^2 - 0{,}0002x_1x_2 - 0{,}0003x_1x_3 - 0{,}005x_2x_3 \quad (4.3)$$

y_1: Ekstrakt verimi
x_1, x_2, x_3: Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, bitki derişimi

Deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyum belirlilik katsayısı R^2 değeri ile değerlendirilir. Şekil 4.11'den görüldüğü gibi ısırgan ekstrakt verimi için R^2 değeri 0,94 olmuştur. Bu sonuçlar bağımsız değişkenlerle ilişkili olarak cevaplardaki değişimlerin %94'ünün model tarafından açıklanabildiğini ve toplam varyansın yalnızca %6'sının hesaplanamadığını göstermektedir. R^2 değerinin 0,75'den fazla ve yüksek olması bu deney aralığında modelin yeterliliğini ifade etmektedir (Daneshvand et al., 2012; Banik and Pandey, 2008; Mohapatra et al, 2011; Haaland, 1989). Ekstrakt verimi için düzeltilmiş belirlilik katsayısı (Düzeltilmiş-R^2) değeri 0,87 bulunmuştur. Varyasyon katsayısı yüzdesi ısırgan ekstrakt verimi için %3,3 olmuştur. Varyasyon katsayısı yüzdesinin düşük olması, deneysel veriler arasındaki tahmin ve güvenilirliğin fazla olduğunu göstermektedir (Liu et al., 2009).



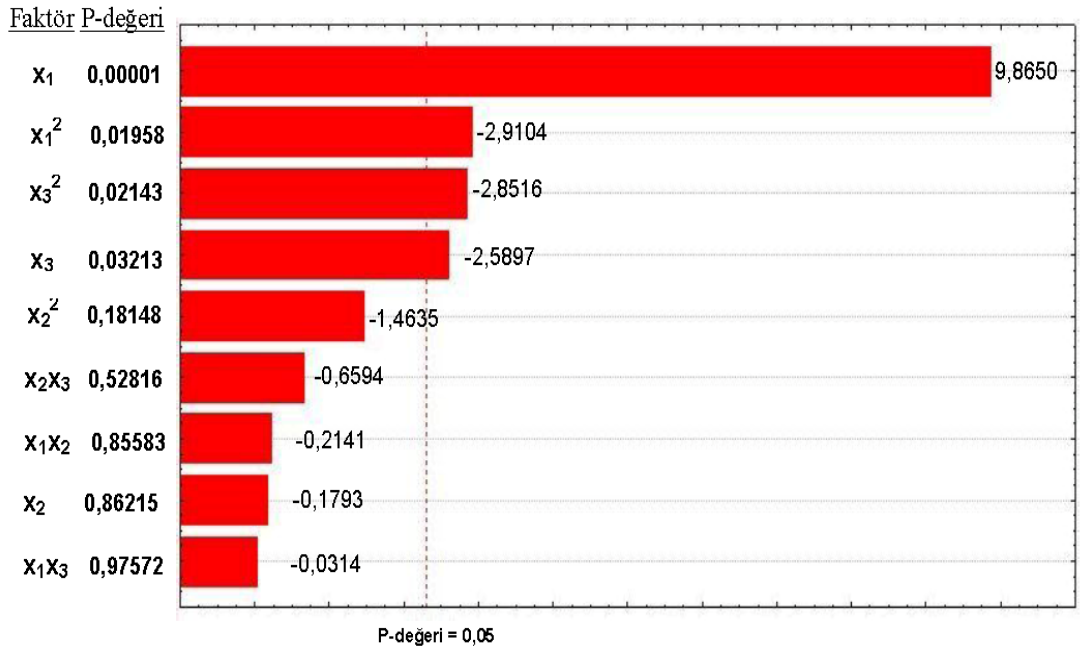
Şekil 4.11. Isırgan ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar.

Çizelge 4.11. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu.

Varyasyon	SS	Df	MS	F_{hes}	$F_{0,05}$
Ekstrakt verimi					
Regresyon	180,68	9	20,075	13,09	3,39
Artık	12,27	8	1,534		
Uyum eksikliği	12,08	5	2,417		
Saf hata	0,19	3	0,063		
Toplam	192,95	17			
R^2 0,94		Düzeltilmiş-R^2 0,87			

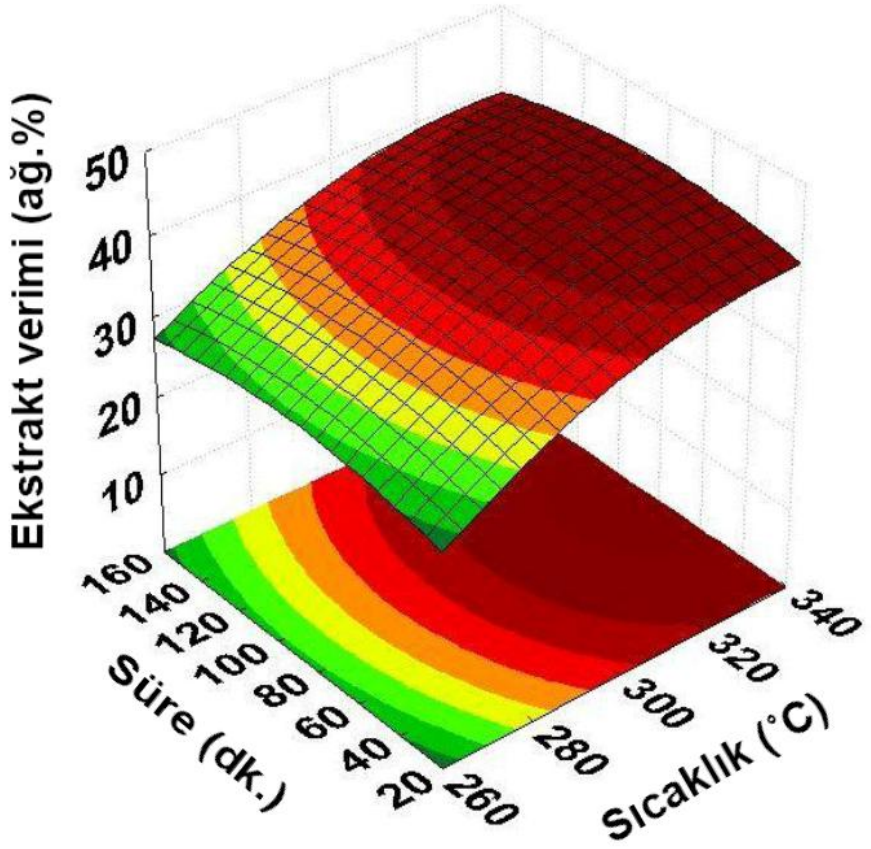
İkinci dereceden polinomun istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi tablosu ile kontrol edilmiştir. Çizelge 4.11'de ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu gösterilmiştir. Çizelge 4.11'den görüldüğü gibi model için hesaplanan F değeri (13,09), %95 güven aralığı için tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden (3,39) büyüktür. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden büyük olması null hipotezinin (H_0) reddedildiğini gösterir. Dolayısıyla bu sonuç deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin ve modelin önemli derecede geçerli olduğunun göstergesidir.

Şekil 4.12'de ekstrakt verimi için pareto çizelgesi verilmiştir. Faktörleri önemlilik derecesine göre sıralayan pareto çizelgeleri varyans analizi etki değerlendirmesini göstermektedir. Pareto çizelgelerindeki t değeri ne kadar büyük, p değeri de 0,05'den ne kadar küçük olursa ilgili parametre de o kadar önemli olmaktadır. Buna göre sıcaklığın ve bitki derişiminin lineer terimleri ile karesel terimleri istatistiksel olarak önemlidir. Ekstraksiyon süresinin lineer ve karesel terimleri ile etkileşim terimleri ise istatistiksel olarak önemli değildir. Pareto çizelgesinden görüldüğü gibi yalnızca sıcaklığın lineer terimi (x_1) pozitif değere sahipken diğer tüm terimler negatif değerli olmuştur. Buna göre en önemli faktörün sıcaklık olduğu anlaşılmaktadır.



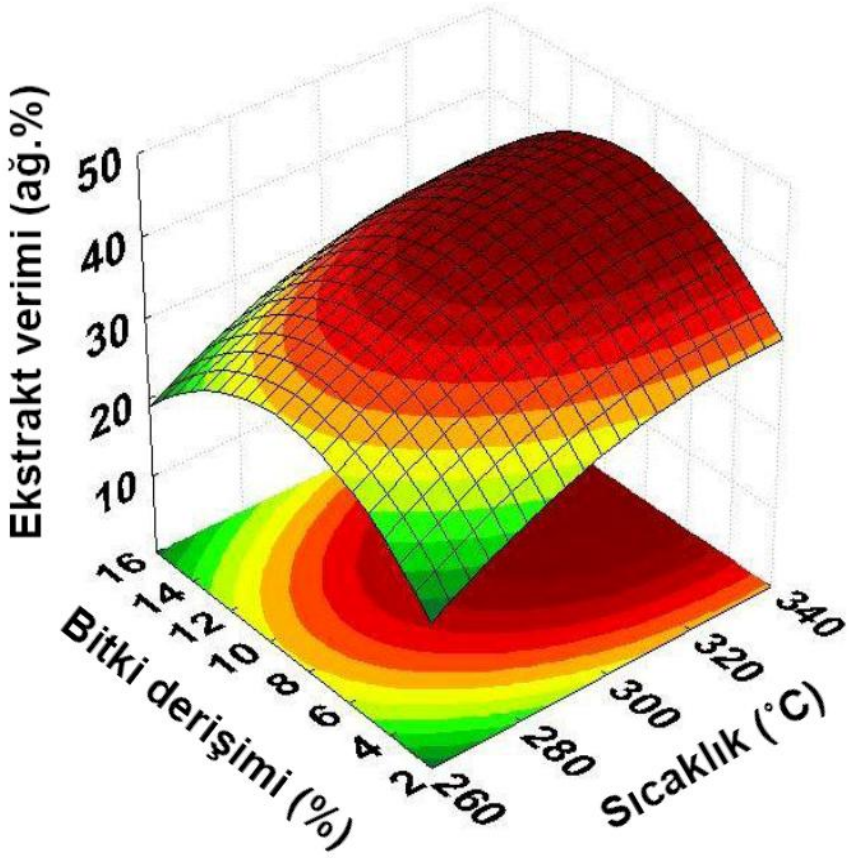
Şekil 4.12. Isırgan ekstrakt verimi için pareto çizelgesi.

Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin ekstrakt verimine etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.13'de ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin cevap yüzeyi verilmiştir. Şekil 4.13'deki üç boyutlu cevap yüzeyine göre genel olarak sıcaklık artışıyla elde edilen ısırgan ekstrakt veriminde artış meydana gelmiştir. En yüksek ekstrakt verimi 310°C'den yüksek sıcaklıklarda 90 dakika civarındaki sürelerden elde edilmiştir.



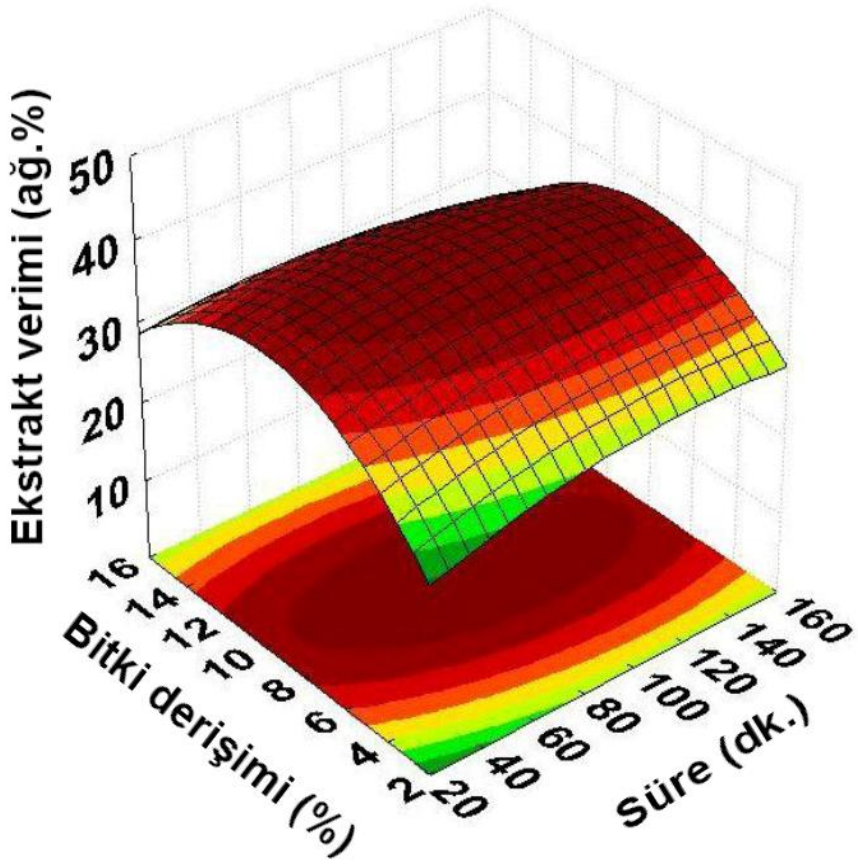
Şekil 4.13. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Sıcaklığın ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin üç boyutlu cevap yüzeyi Şekil 4.14'de verilmiştir. Genel olarak sıcaklığın artışıyla ekstrakt veriminde de artış meydana gelmektedir. Aynı sıcaklıkta bitki derişiminin artmasıyla birlikte ekstrakt verimi de artış göstermiş ve en yüksek verim %9-10 civarındaki bitki derişimlerinde elde edilmiştir. Ancak bu noktadan sonraki bitki derişimi artışları sonucunda verim azalmıştır.



Şekil 4.14. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Ekstrakt veriminin bitki derişimi ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak verildiği Şekil 4.15'de, en yüksek verimin merkez nokta civarı olan, %8-10 bitki derişimi, 80-100 dakika ekstraksiyon süresindeki koşullardan elde edildiği görülmektedir. Aynı derişimlerde ekstraksiyon süresinin 80-100 dakikaya kadar artırılmasıyla ekstrakt veriminde artış meydana gelmiştir. Ancak daha uzun sürelerde elde edilen verim azalmaya başlamıştır. Benzer şekilde aynı ekstraksiyon süresinde bitki derişiminin merkez nokta civarına kadar artırılmasıyla verimde artış olmuş; ancak bu noktadan yüksek derişimlerde verim azalmıştır.



Şekil 4.15. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Çizelge 4.12'de deney tasarımının geçerliliğini belirleyen ve tasarım sınırları içinde olan optimum koşullar gösterilmektedir. Deneysel tasarıma göre ısırgan ekstrakt verimi için 335°C ekstraksiyon sıcaklığı, 87 dakika ekstraksiyon süresi, %9 bitki derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan ekstrakt verimi ağ. %42,70 olmuştur. Model tahmininin geçerliliğini belirlemek amacıyla bu kritik

koşullarda deneyler yapılmıştır. Ekstrakt verimi için kritik koşullardaki deney sonucunda %45,30 verim elde edilmiştir. Bu verilere göre tahmini değer ile gözlenen değer arasında %5,74 sapma bulunmaktadır. Dolayısıyla ısırgan ekstrakt verimi tahmini için kullanılan modelin geçerliliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çizelge 4.12. Ekstrakt verimi için kritik koşullarda tahmini ve gözlenen sonuçlar.

Faktörler	Gözlenen minimum	Kritik değerler	Gözlenen maksimum
Ekstrakt verimi			
Sıcaklık (°C)	264	335	336
Ekstraksiyon süresi (dk.)	36	87	144
Bitki derişimi (%)	6	9	14
Tahmini ekstrakt verimi (ağ.%)		42,70	
Gerçek ekstrakt verimi (ağ.%)		45,30	

Elde edilen ekstraktın içeriğindeki bileşikleri belirlemek amacıyla seçici olarak merkez noktadaki koşullardan elde edilen ekstrakta GC-MS analizi yapılmıştır. Çizelge 4.13'de ekstrakt içeriğindeki bileşikler verilmiştir. Ekstraktın yapısında yağ asidi esterleri, fenoller ve azot içerikli bileşikler gibi çok çeşitli bileşikler bulunmaktadır. Bileşiklerin bağıl bolluklarına bakıldığında hekzadekanoik asit etil ester, linoleik asit etil ester ve 9,12,15-oktadekatrienoik asit etil ester öne çıkan bileşiklerdir. Yağ asidi esterlerinin ısırgan otundaki yağ asitlerinin etanol ile reaksiyonu sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Isırgan otunun çeşitli kısımlarından elde edilen yağ asitleri ve karotenoidlerin analizinin gerçekleştirildiği çalışmada ısırgan otunun yağ asitleri açısından zengin bir kaynak olduğu ve yapraklarda α-linolenik asidin, tohumlarda ise linoleik asidin başlıca bileşikler olduğu rapor edilmiştir (Sovova et al., 2004).

Çizelge 4.13. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi.

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
5,67	72	Hidroksiasetik asit etil ester	0,12
6,39	78	2-Hidroksipropanoik asit etil ester	0,29
9,33	96	2-Furanmetanol	0,19
12,84	83	2-Hidroksibütanoik asit etil ester	0,31
18,22	94	Fenol	0,94
19,69	91	2-Etil-4-metilpirol	0,36
20,92	70	2-Etil-5-metilpiridin	0,38
22,55	86	2-Metilfenol	0,19
22,77	76	1-(1H-pirol-2-il)etanon	0,67
25,49	90	Feniletil alkol	0,24
26,21	81	3-Piridinol	0,25
27,07	93	3-Etilfenol	0,52
27,51	76	2-Etoksifenol	0,32
28,53	87	4-Etilfenol	0,91
29,28	80	Bütandioik asit dietil ester	1,07
32,18	76	Benzenasetik asit etil ester	0,54
34,07	91	Pentandioik asit dietil ester	1,42
34,34	93	İndol	1,31
35,38	70	2,5-Dietilfenol	0,47
36,91	98	Benzenpropanoik asit etil ester	2,39
38,41	94	3-Metil-1H-indol	1,53
41,83	93	3-Fenil-2-propenoik asit etil ester	0,39
42,42	86	1-Etil-1H-indol	0,59
44,98	87	3-Metilkinolin	0,16
54,26	96	Tetradekanoik asit etil ester	0,93
56,33	99	[R-[R*,R*-(E)]]- 3,7,11,15-Tetrametil-2-hekzadeken	1,51
63,01	98	Hekzadekanoik asit etil ester	13,95
68,22	99	Linoleik asit etil ester	10,05
68,39	99	9,12,15-Oktadekatrienoik asit etil ester	9,95
69,15	99	Oktadekanoik asit etil ester	3,51
73,94	94	Heptadekanoik asit etil ester	1,39
76,07	89	2,8-Dimetil-undekanoik asit etil ester	0,62
81,77	97	Etil tetrakosanoat	1,31

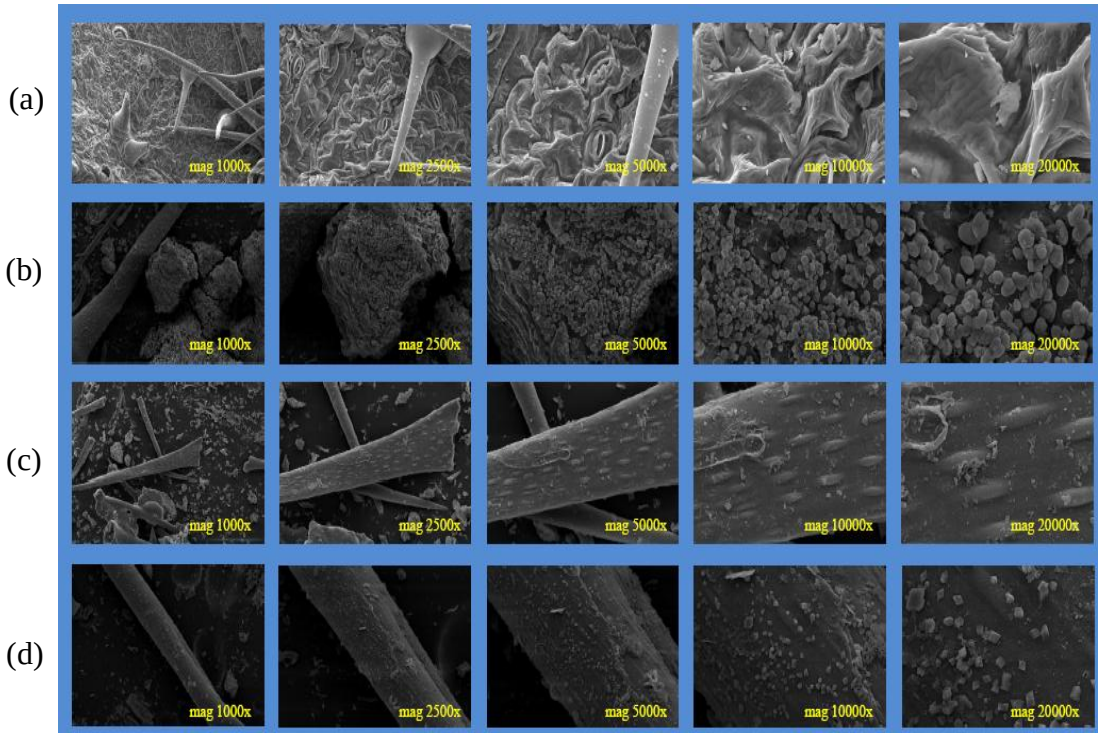
Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri Çizelge 4.14'de verilmiştir. Beklendiği gibi ekstraktlar hammaddeye göre daha yüksek miktarda karbon ve daha düşük miktarda oksijen içermektedir. Süperkritik ekstraksiyon prosesinin önemli derecede deoksijenasyona neden olduğu ekstraktların O/C oranının hammaddeki orandan daha düşük olmasından anlaşılmaktadır. Literatürdeki önceki çalışmalarda biyokütlenin etanol ekstraksiyonunda oksijen içeren grubun dekarbonilasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarıyla parçalandığı belirtilmiştir (Brand et al., 2013; Hui et al., 2010). Bu tepkimeler sonucunda ekstraktların içeriğindeki oksijen azalmaktadır. Ekstraktların ve katı ürünlerin H/C oranları hammaddeki orandan daha düşüktür. Bu sebeple ısırgan ekstraktlarının ve ekstraksiyon sonrası elde edilen katı ürünlerin aromatik içeriğinin yüksek olduğu söylenebilir. Katı ürünlerin düşük oranda karbon, yüksek oranda oksijen içeriğine sahip olması da süperkritik etanol ekstraksiyonunun etkisini göstermektedir. Ekstraksiyon sonrası katı ürünlerde en yüksek karbon içeriği (%30,53) 1 numaralı deneyden elde edilen katı üründe bulunmuştur.

Çizelge 4.14. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri.

Ürün	**Deney no**	**%C**	**%H**	**%N**	**%O[a]**	**H/C**	**O/C**	**N/C**
Hammadde	-	36,85	5,38	3,20	54,57	1,75	1,11	0,07
Ekstrakt	1	52,55	6,47	4,88	36,10	1,48	0,52	0,08
Ekstrakt	8	50,44	5,73	4,40	39,43	1,36	0,59	0,07
Ekstrakt	9	47,30	5,86	5,72	41,12	1,49	0,65	0,10
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	1	30,53	3,42	2,46	63,59	1,34	1,56	0,07
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	8	24,57	2,14	1,48	71,81	1,05	2,19	0,05
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	9	27,14	2,20	2,73	67,93	0,97	1,88	0,09

[a] Farktan

Hammadde ve ekstraksiyon sonrası elde edilen seçilmiş katı ürünlerin SEM görüntüleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Ekstraksiyon öncesinde hammadde yüzeyinde bozulmamış hücre ve tüp şeklindeki tüyler gözlenmektedir. Ektsraksiyon sonrasında bu hücreler kopup parçalanmış; tüp şeklindeki yapıların da kırılarak homojen olmayan yüzeyde küçük parçacıkların oluştuğu gözlenmiştir.



Şekil 4.16. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri a) Hammadde, b) Deney no: 15, c) Deney no: 2, d) Deney no: 9.

4.3. FUNDA YAPRAĞINDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN MERKEZİ KOMPOZİT TASARIM

Tez kapsamında funda yaprağının süperkritik etanol ekstraksiyonu için merkezi kompozit tasarım yöntemi uygulanmıştır. Funda ekstrakt verimine ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Üç değişkenli merkezi kompozit tasarımda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi sırasıyla x_1, x_2 ve x_3 olarak kodlandıktan sonra ön denemeler sonucunda faktörlerin değer aralıkları (minimum, maksimum ve merkez noktalar) belirlenmiştir. Çizelge 4.15'de faktörler ve faktör aralıkları verilmiştir.

Çizelge 4.15. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları.

Faktörler	**Sembol**	**Faktörlerin değer aralıkları**				
		-1,76	-1	0	+1	+1,76
Sıcaklık (°C)	x_1	264	280	300	320	336
Süre (dk)	x_2	36	60	90	120	144
Bitki derişimi (%)	x_3	6	8	10	12	14

Çizelge 4.15'de faktörlerin minimum değerleri -1, maksimum değerleri +1 ve merkez değerleri de 0 olarak kodlanmıştır. Yıldız noktalar ise α= -1,76 ve α= +1,76 olarak verilmiştir. Maksimum ve minimum noktaların dışında kalan eksenel (yıldız) noktalar α değerine göre gösterilmiştir. Bu faktör değerlerine göre oluşturulan kodlanmış ve kodlanmamış değerlerle verilen dört merkez nokta ile altı adet eksenel (yıldız) noktaya sahip tasarım matrisi ve tasarımdaki koşullardan elde edilen cevap değerleri Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17'de gösterilmiştir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi deney koşulları ekstrakt verimine önemli ölçüde etki ederken minimum ve maksimum funda ekstrakt verimi sırasıyla ağ. %43,22 ve %69,92 olmuştur.

Çizelge 4.16. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevap
		x_1	x_2	x_3	Y_1
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	1	-1	-1	-1	48,28
2	1	-1	-1	+1	43,22
3	1	-1	+1	-1	48,31
4	1	-1	+1	+1	44,10
5	1	+1	-1	-1	67,65
6	1	+1	-1	+1	62,79
7	1	+1	+1	-1	66,10
8	1	+1	+1	+1	63,60
9(C)	1	0	0	0	48,95
10(C)	1	0	0	0	47,82
11	2	-1,76	0	0	44,75
12	2	+1,76	0	0	69,92
13	2	0	-1,76	0	50,13
14	2	0	+1,76	0	55,95
15	2	0	0	-1,76	52,92
16	2	0	0	+1,76	55,71
17(C)	2	0	0	0	50,10
18(C)	2	0	0	0	47,50

Çizelge 4.17. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Blok	Bağımsız değişkenler			Cevap
		x_1	x_2	x_3	Y_1
		Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	1	280	60	8	48,28
2	1	280	60	12	43,22
3	1	280	120	8	48,31
4	1	280	120	12	44,10
5	1	320	60	8	67,65
6	1	320	60	12	62,79
7	1	320	120	8	66,10
8	1	320	120	12	63,60
9(C)	1	300	90	10	48,95
10(C)	1	300	90	10	47,82
11	2	264	90	10	44,75
12	2	336	90	10	69,92
13	2	300	36	10	50,13
14	2	300	144	10	55,95
15	2	300	90	6	52,92
16	2	300	90	14	55,71
17(C)	2	300	90	10	50,10
18(C)	2	300	90	10	47,50

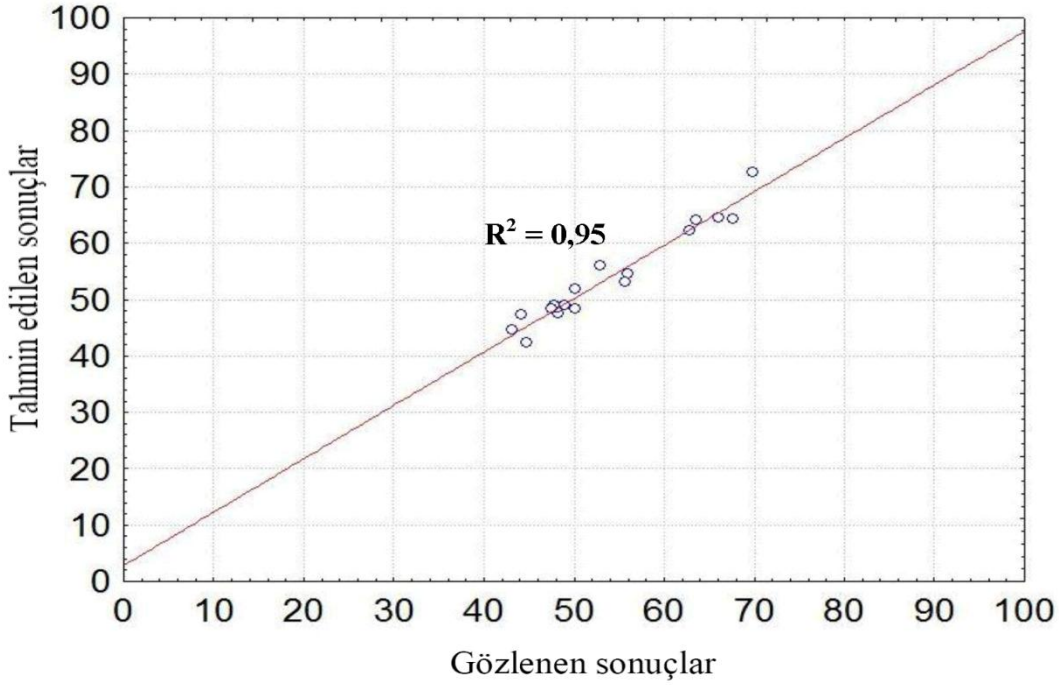
Bağımsız değişkenler (faktörler) ile deneyden elde edilen cevap arasındaki ilişkiyi oluşturmak için ikinci dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenler olan ekstrakt verimi (y_1) ile bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve bit derişimi (x_3) arasındaki ilişki için oluşturulan ikinci dereceden polinom eşitliği aşağıdaki gibidir.

$$y_1= 652,631- 3,949x_1- 0,250x_2- 12,547x_3+ 0,007x_1^2+ 0,002x_2^2+0,488x_3^2-0,0003x_1x_2 + 0,006x_1x_3+ 0,007x_2x_3 \quad (4.4)$$

y_1: Ekstrakt verimi
x_1, x_2, x_3: Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, bitki derişimi

Deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyum belirlilik katsayısı R^2 değeri ile değerlendirilir. Şekil 4.17'den görüldüğü gibi funda ekstrakt verimi için R^2 değeri 0,95 olmuştur. Bu sonuçlar bağımsız değişkenlerle ilişkili olarak cevaplardaki değişimlerin %95'inin model tarafından açıklanabildiğini ve toplam varyansın yalnızca %5'inin açıklanamadığını göstermektedir. R^2 değerinin 0,75'den fazla ve yüksek olması bu deney aralığında modelin yeterliliğini ifade etmektedir (Daneshvand et al., 2012; Banik and Pandey, 2008; Mohapatra et al, 2011; Haaland, 1989). Ekstrakt verimi için düzeltilmiş belirlilik katsayısı (Düzeltilmiş-R^2) değeri 0,87 bulunmuştur. Funda ekstrakt verimi için varyasyon katsayısı yüzdesi %5,45'tir. Bu değerin düşük olması deneysel veriler arasındaki tahmin ve güvenilirliğin yüksek olduğunu ifade etmektedir (Liu et al., 2009).



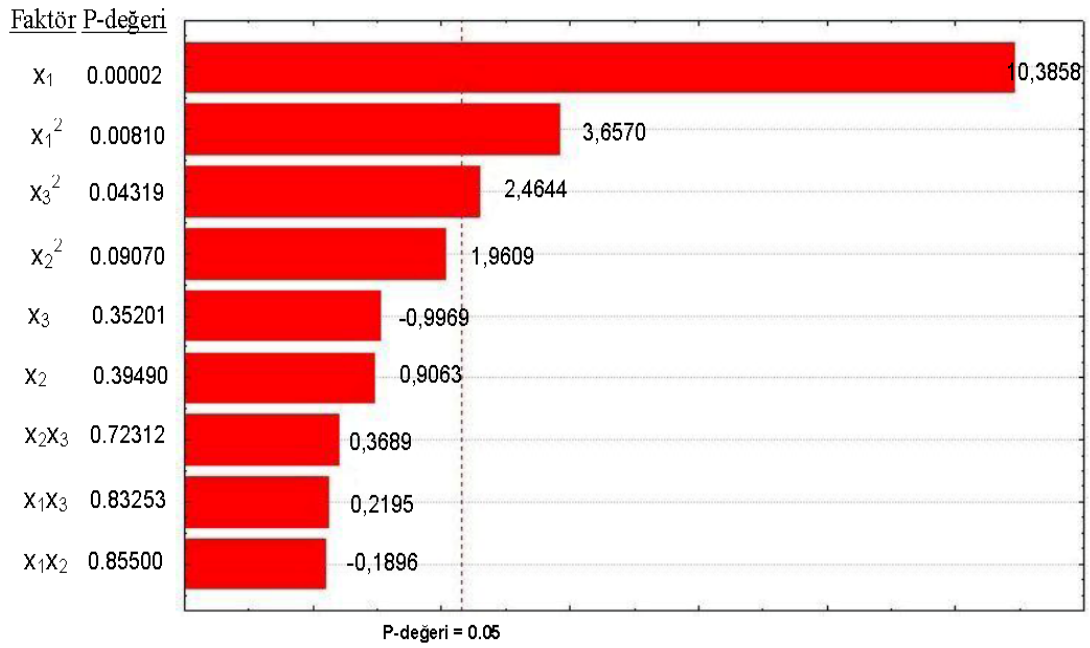
Şekil 4.17. Funda ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar.

Çizelge 4.18. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu.

Varyasyon	SS	Df	MS	F_{hes}	$F_{0,05}$
Ekstrakt verimi					
Regresyon	1197,26	9	133,03	15,54	3,39
Artık	68,50	8	8,56		
Uyum eksikliği	64,31	5	12,86		
Saf hata	4,19	3	1,40		
Toplam	1263,52	17			
R^2 0,95		Düzeltilmiş-R^2	0,87		

İkinci dereceden polinomun istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi tablosu ile kontrol edilmiştir. Çizelge 4.18'de ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu gösterilmiştir. Çizelge 4.18'den görüldüğü gibi model için hesaplanan F değeri (15,54), % 95 güven aralığı için tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden (3,39) büyüktür. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden büyük olmasıyla null hipotezi (H_0) reddedilir. Dolayısıyla bu sonuç deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin ve modelin önemli derecede geçerli olduğunun göstergesidir.

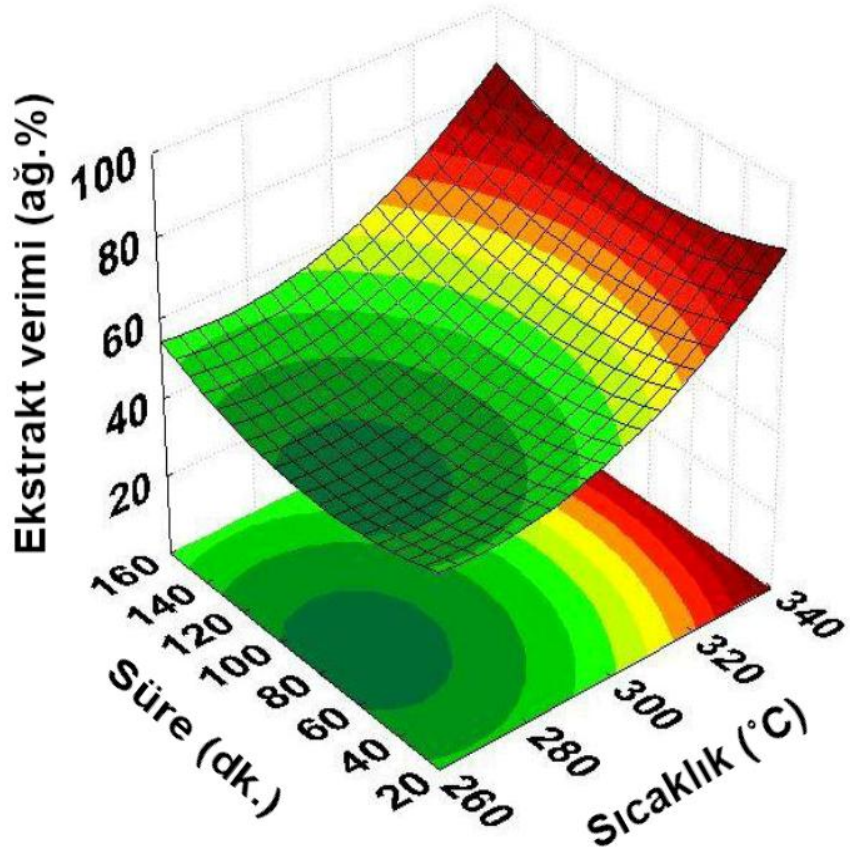
Şekil 4.18'de ekstrakt verimi için pareto çizelgesi verilmiştir. Faktörleri önemlilik derecesine göre sıralayan pareto çizelgeleri varyans analizi etki değerlendirmesini göstermektedir. Pareto çizelgelerindeki t değeri ne kadar büyük, p değeri de ne kadar küçük olursa ilgili parametre de o kadar önemli olmaktadır. Pareto çizelgesine göre sıcaklığın lineer terimi ve karesel terimi ile bitki derişiminin karesel terimi istatistiksel olarak önemlidir. Bitki derişiminin lineer terimi, ekstraksiyon süresinin lineer ve karesel terimleri ile etkileşim terimleri ise istatistiksel olarak önemli değildir. Buna göre en önemli faktörün sıcaklık olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.18. Funda ekstrakt verimi için pareto çizelgesi.

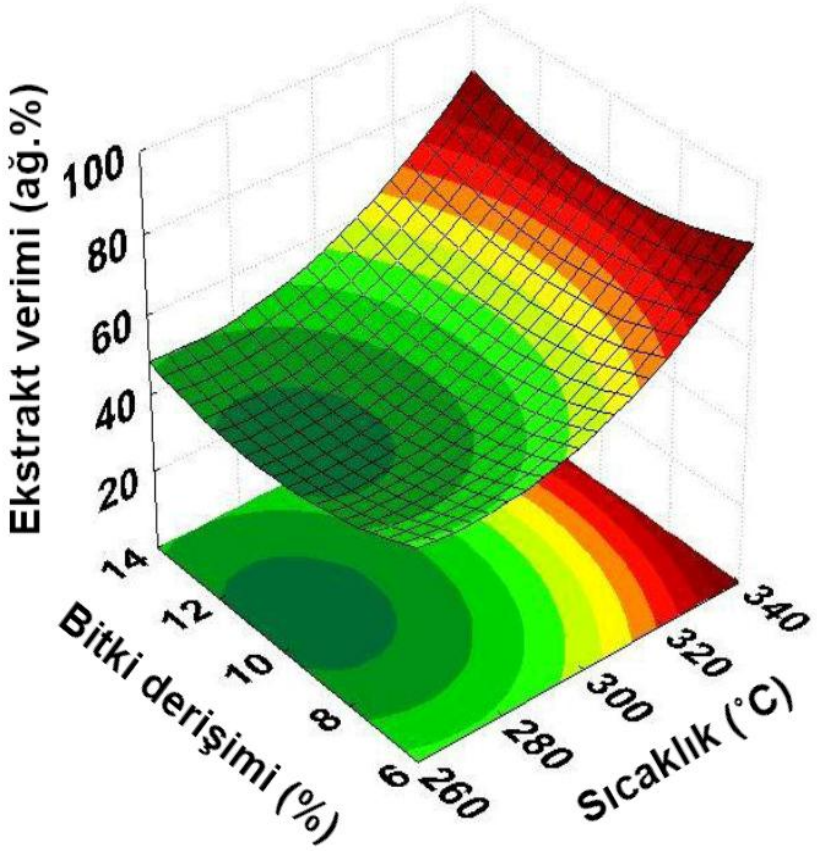
Eksraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin ekstrakt verimine etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.19'da ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin cevap yüzeyi verilmiştir.

Şekil 4.19'dan görüldüğü gibi tüm ekstraksiyon sürelerinde sıcaklığın artışıyla birlikte ekstrakt verimi artmıştır. En yüksek ekstrakt verimleri kısa ve uzun ekstraksiyon sürelerinde 340°C sıcaklık civarlarında elde edilmiştir. Aynı sıcaklıkta kısa ekstraksiyon sürelerinde yüksek olan ekstrakt verimi, sürenin artmasıyla azalmış; ancak 100 dakikadan daha uzun ekstraksiyon sürelerinde elde edilen verimlerde tekrar artış olmuştur.



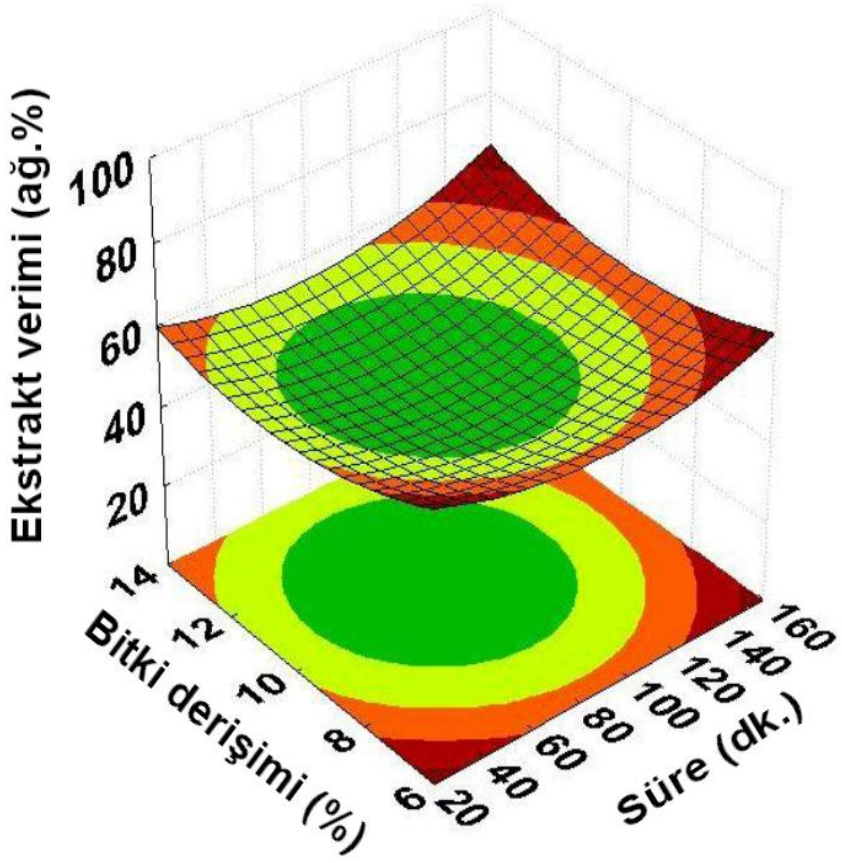
Şekil 4.19. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Sıcaklığın ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin üç boyutlu cevap yüzeyi Şekil 4.20'de verilmiştir. Tüm bitki derişimlerinde ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla elde edilen ekstrakt veriminde artış olmuştur. En yüksek ekstrakt verimleri 340°C civarında düşük ve yüksek bitki derişimlerinde elde edilmiştir. Düşük bitki derişimlerinde yüksek olan ekstrakt verimi, bitki derişiminin % 10 civarına kadar artırılmasıyla azalmaya başlamış; ancak bu noktadan sonraki yüksek bitki derişimlerinde ekstrakt verimi tekrar artış göstermiştir.



Şekil 4.20. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Ekstrakt veriminin bitki derişimi ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak verildiği Şekil 4.21'de, en yüksek verimin en kısa ekstraksiyon sürelerinde ve düşük bitki derişimlerinde elde edilmiştir. Bununla birlikte uzun ekstraksiyon sürelerinde düşük ve yüksek bitki derişimlerinde elde edilen ekstrakt verimleri de yüksek olmuştur. Uzun sürelerde bitki derişiminin %10'a kadar artırılması funda ekstrak veriminde azalmaya neden olurken; bu noktadan daha uzun sürelerde verim artma eğilimi göstermiştir.



Şekil 4.21. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Çizelge 4.19'da deney tasarımının geçerliliğini belirleyen ve tasarım sınırları içinde olan optimum koşullar gösterilmektedir. Deneysel tasarıma göre funda ekstrakt verimi için 270°C ekstraksiyon sıcaklığı, 79 dakika ekstraksiyon süresi, %11 bitki derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan ekstrakt verimi ağ. %42,45 olmuştur. Model tahmininin geçerliliğini belirlemek amacıyla bu koşullarda deneyler yapılmıştır. Ekstrakt verimi için kritik koşullardaki deney sonucunda %42,95 verim elde edilmiştir. Bu verilere göre tahmini değer ile gözlenen değer arasında %1,16 sapma bulunmaktadır. Dolayısıyla funda ekstrakt verimi tahmini için kullanılan modelin geçerliliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çizelge 4.19. Ekstrakt verimi için kritik koşullarda tahmini ve gözlenen sonuçlar.

Faktörler	**Gözlenen minimum**	**Kritik değerler**	**Gözlenen maksimum**
Ekstrakt verimi			
Sıcaklık (°C)	264	270	336
Ekstraksiyon süresi (dk.)	36	79	144
Bitki derişimi (%)	6	11	14
Tahmini ekstrakt verimi (ağ.%)		42,45	
Gerçek ekstrakt verimi (ağ.%)		42,95	

Ekstraktın içeriğindeki bileşikleri belirlemek amacıyla seçici olarak merkez noktadaki ekstrakta GC-MS analizi yapılmıştır. Çizelge 4.20'de ekstrakt içeriğindeki bileşikler verilmiştir. Ekstrakt içeriğinde asitler, asit esterler, fenoller, esterler, triterpenler, ketonlar ve uzun zincirli alkanlar gibi çok sayıda farklı organik bileşik bulunmaktadır. Ekstrakt içeriğindeki bağıl derişimi en yüksek bileşik (Z,Z)- 9,12-oktadekadienoik asittir. Funda yapraklarına farklı ekstraksiyon tekniklerinin uygulandığı diğer çalışmalarda fenoller ve β-amirin bileşikleri rapor edilmiştir (Zhao, 2011; Pancost et al, 2002).

Çizelge 4.20. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi.

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
5,14	91	Hidroksiasetik asit etil ester	0,20
6,39	78	2-Hidroksipropanoik asit etil ester	0,41
8,71	97	2-Furanmetanol	0,19
12,32	90	2-Hidroksibütanoik asit etil ester	0,19
17,85	95	Fenol	0,53
18,43	96	2,3-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,19
21,48	95	Etil 2-hekzenoat	0,11
21,94	93	2-Furankarboksilik asit etil ester	0,20
22,60	97	4-Oksopentanoik asit etil ester	0,44
23,78	93	2-Metoksifenol	0,74
24,02	72	3-Etil-2,4-dimetil-1H-pirol	0,27
25,50	96	3-Etil-2-hidroksi-2-siklopenten-1-on	0,21
27,21	93	2-Etoksifenol	0,16
28,18	90	3,3-Dimetil-6-metilensiklohekzen	1,15
29,00	90	Bütandioik asit dietil ester	0,79
29,72	93	Oktanoik asit etil ester	0,14
30,30	86	Dietil metilsüksinat	0,55
33,42	83	4-Etil-2-metoksifenol	0,40
33,63	94	Hidrokinon	0,24
33,79	91	Pentandioik asit dietil ester	0,47
34,40	96	Nonanoik asit etil ester	0,10
36,63	95	Benzenpropanoik asit etil ester	0,16
36,74	97	2,6-Dimetoksifenol	0,60
37,40	87	2-Metoksi-4-propilfenol	0,20
42,94	96	Etil 3-hidroksibenzoat	0,28
46,76	93	Dodekanoik asit etil ester	0,24
47,92	72	Etil .alfa.-d-glukopiranosit	0,84
52,32	95	Etil-.beta.-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-propionat	0,11
53,28	74	1-Hekzadesin	0,35
53,72	90	1,3-Benzodioksol-5-propanoik asit etil ester	0,26
53,98	98	Tetradekanoik asit etil ester	0,69
57,56	72	2-(3,3-Dimetilbüt-1-inil)tieno[2,3-b]tiyofen	0,24
62,00	76	1,5-Dimetil-2-fenil-4-propan-2-ilpirazol-3-on	0,55
62,68	98	Hekzadekanoik asit etil ester	2,00
68,13	98	Etil oleat	0,85
68,90	97	Oktadekanoik asit etil ester	0,37
70,37	93	Okzasikloheptadek-8-en-2-on	1,51
70,60	90	(Z,Z)- 9,12-Oktadekadienoik asit	12,95
73,60	87	Etil hekzadekandioat	0,43
74,98	93	7-Hekzadesin-1-ol	1,04
75,16	97	8-(2-Oktilsiklopropil)oktanal	1,88

Çizelge 4.20. (devam ediyor).

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
87,44	98	Tetrakosan	1,15
88,27	97	Vitamin E	1,20
93,51	94	Oktadekan	0,75
94,25	97	.beta.-Amirin	2,52
101,05	97	(1S,2R,4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10S,12aR,14bS)-10-hidroksi-1,2,6a,6b,9,9,12a-heptametil-2,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradekahidro-1H-pisen-4a-karboksilik asit metil ester	0,89
101,30	93	2-Benzoil-1-naftalenkarboksilik asit	1,92

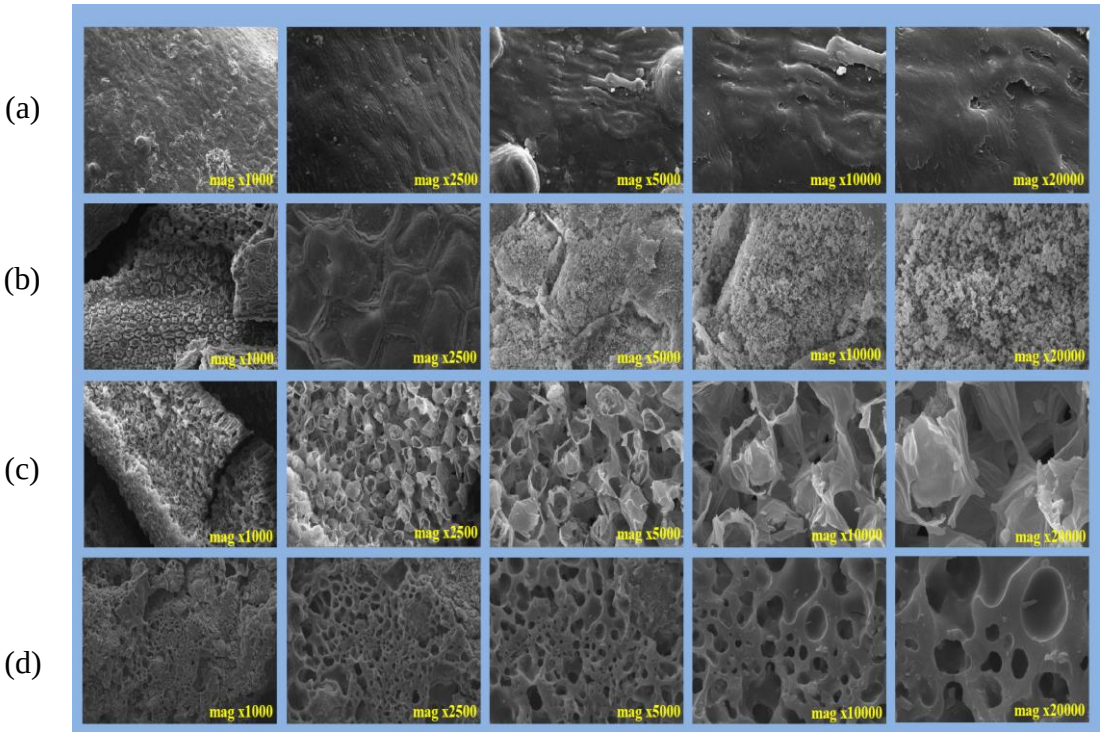
Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri Çizelge 4.21'de verilmiştir. Ekstraksiyon sonrası elde edilen katı ürünler hammaddeye göre daha yüksek miktarda karbon ve daha düşük miktarda oksijen içermektedir. Ekstraktların ise karbon içeriği hammaddeden düşük olurken, oksijen içeriği hammaddeden daha fazla olmuştur. Aromatik içeriğin arttığı ekstraktların ve katı ürünlerin H/C oranlarının hammaddeki orandan daha düşük olmasından anlaşılmaktadır. Katı ürünlerin karbon içeriğine bakıldığında en yüksek karbon içeriği (%64,29) 9 numaralı deneyden elde edilmiştir.

Çizelge 4.21. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri.

Ürün	Deney no	%C	%H	%N	%O[a]	H/C	O/C	N/C
Hammadde	-	53,30	7,24	0,93	38,53	1,63	0,54	0,01
Ekstrakt	1	51,25	6,68	0,66	41,41	1,56	0,61	0,01
Ekstrakt	8	40,28	4,21	0,62	54,89	1,25	1,02	0,01
Ekstrakt	9	41,76	5,18	0,50	52,56	1,49	0,94	0,01
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	1	59,53	5,39	1,70	33,38	1,09	0,42	0,02
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	8	63,73	5,37	1,22	29,68	1,01	0,35	0,02
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	9	64,29	5,64	1,57	28,50	1,05	0,33	0,02

[a] Farktan

Funda yapraklarının ekstraksiyon öncesi ve sonrası SEM görüntüleri Şekil 4.22'de verilmiştir. Funda yapraklarının yüzeyinde ekstraksiyon öncesinde bozulmamış hücre ağı yapısı görülmektedir. Ekstraksiyon sonrasında yüzeydeki değişmeler ekstraksiyon işleminin etkisini açıkça göstermektedir. Şekil 4.22b'de en düşük ekstraksiyon sıcaklığında funda yapraklarının yüzeyinde küçük parçacıklar oluştuğu görülmektedir. Merkez noktadaki deney sonrası funda yapraklarında oyuklar görülmeye başlanırken, yüksek sıcaklıktaki deney sonrasında (Şekil 4.22d) yüzeydeki bal peteği şeklinde oyuklar açıkça görülmektedir. Yüksek sıcaklıkta oluşan düzenli oyuklar uçucu maddelerin ekstraksiyon sonrası bitki yapısından tamamen uzaklaştığının bir göstergesidir. İstatistiksel olarak en önemli değişkenin sıcaklık olduğu, SEM görüntülerinde gözlenen bu değişimlerle birlikte desteklenmektedir.



Şekil 4.22. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri a) Hammadde, b) Deney no: 1, c) Deney no: 9, d) Deney no: 8.

4.4. ALIÇ ÇEKİRDEĞİNDEN BİYO-YAĞLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN BOX-BEHNKEN TASARIM

Tez kapsamında biyokütle olarak alıç çekirdeğinden biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonu için Box-Behnken tasarımı uygulanmıştır. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Üç değişkenli Box-Behnken tasarımda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi sırasıyla x_1, x_2 ve x_3 olarak kodlandıktan sonra ön denemeler sonucunda faktörlerin değer aralıkları (minimum, maksimum ve merkez noktalar) belirlenmiştir. Çizelge 4.22'de faktörler ve faktör aralıkları verilmiştir.

Çizelge 4.22. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları.

Faktörler	**Sembol**	**Faktörlerin değer aralıkları**		
		-1	0	+1
Sıcaklık (°C)	x_1	280	300	320
Süre (dk)	x_2	60	90	120
Biyokütle derişimi (%)	x_3	8	10	12

Çizelge 4.22'de faktörlerin minimum değerleri -1, maksimum değerleri +1 ve merkez değerleri de 0 olarak kodlanmıştır. Bu faktör değerlerine göre oluşturulan kodlanmış ve kodlanmamış değerlerle verilen tasarım matrisi ve tasarımdaki koşullardan elde edilen cevap değerleri Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'de gösterilmiştir. Bu çizelgelerden görüldüğü gibi deney koşulları biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne önemli ölçüde etki etmiştir.

Bağımsız değişkenler (faktörler) ile bağımlı değişkenler (deneyden elde edilen cevaplar) arasındaki ilişkiyi oluşturmak için ikinci dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenler olan biyo-yağ verimi (y_1) ve biyokütle dönüşümü (y_2) ile bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve biyokütle derişimi (x_3) arasındaki ilişki için oluşturulan ikinci dereceden polinom eşitlikleri aşağıdaki gibidir.

$$y_1= -873,07+ 5,53x_1+ 0,26x_2+ 12,35x_3- 0,01x_1^2- 0,002x_2^2- 0,25x_3^2- 0,00004x_1x_2- 0,03x_1x_3+ 0,01x_2x_3 \quad (4.5)$$

$$y_2= -2581,19+ 16,27x_1+ 0,63x_2+ 18,64x_3- 0,03x_1^2- 0,002x_2^2- 0,33x_3^2- 0,0001x_1x_2- 0,03x_1x_3- 0,02x_2x_3 \quad (4.6)$$

y_1 ve y_2: Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü
x_1, x_2, x_3: Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, biyokütle derişimi

Tasarım matrisindeki deney koşullarından elde edilen biyo-yağ verimleri ağ. %32,10-40,70 arasında değişiklik gösterirken; elde edilen biyokütle dönüşüm oranı da ağ. %54,80-82,80 arasında değişiklik göstermiştir.

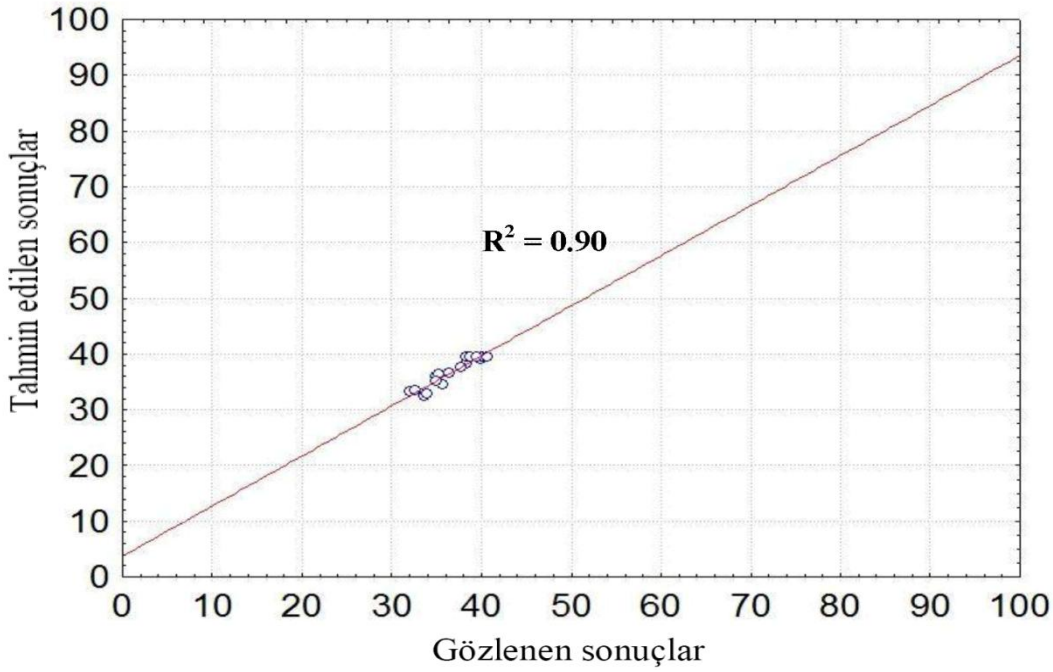
Çizelge 4.23. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Bağımsız değişkenler			Cevaplar	
	x_1	x_2	x_3	Y_1	Y_2
	Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Biyokütle derişimi (%)**	**Biyo-yağ verimi (ağ.%)**	**Biyokütle dönüşümü (ağ.%)**
1	-1	-1	0	33,60	55,30
2	+1	-1	0	35,00	82,80
3	-1	+1	0	33,90	54,80
4	+1	+1	0	35,20	82,10
5	-1	0	-1	32,10	55,40
6	+1	0	-1	39,90	81,40
7	-1	0	+1	32,60	59,10
8	+1	0	+1	35,70	80,00
9	0	-1	-1	38,40	71,20
10	0	+1	-1	37,80	82,10
11	0	-1	+1	34,90	76,10
12	0	+1	+1	36,40	81,20
13(C)	0	0	0	40,10	80,40
14(C)	0	0	0	38,30	79,50
15(C)	0	0	0	38,80	80,80
16(C)	0	0	0	39,50	80,50
17(C)	0	0	0	40,70	81,20

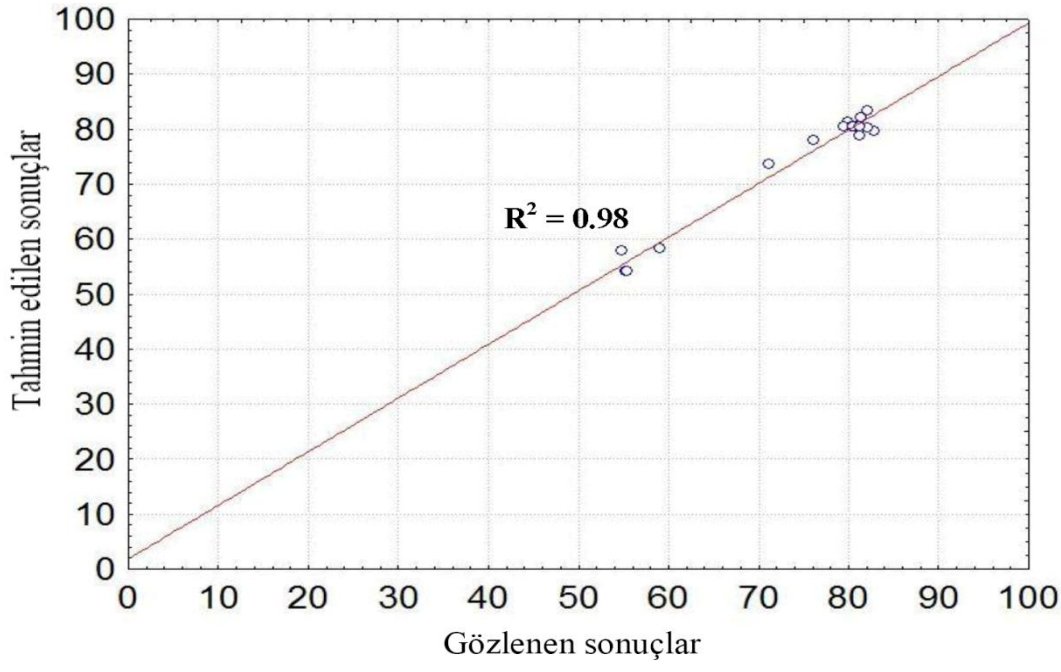
Çizelge 4.24. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Bağımsız değişkenler			Cevaplar	
	x_1	x_2	x_3	Y_1	Y_2
	Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Biyokütle derişimi (%)**	**Biyo-yağ verimi (ağ.%)**	**Biyokütle dönüşümü (ağ.%)**
1	280	60	10	33,60	55,30
2	320	60	10	35,00	82,80
3	280	120	10	33,90	54,80
4	320	120	10	35,20	82,10
5	280	90	8	32,10	55,40
6	320	90	8	39,90	81,40
7	280	90	12	32,60	59,10
8	320	90	12	35,70	80,00
9	300	60	8	38,40	71,20
10	300	120	8	37,80	82,10
11	300	60	12	34,90	76,10
12	300	120	12	36,40	81,20
13(C)	300	90	10	40,10	80,40
14(C)	300	90	10	38,30	79,50
15(C)	300	90	10	38,80	80,80
16(C)	300	90	10	39,50	80,50
17(C)	300	90	10	40,70	81,20

Biyo-yağ verimi (ağ.%) ve biyokütle dönüşümü (ağ.%) için gözlenen sonuçlara karşı tahmin edilen sonuçlar Şekil 4.23'de gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 4.23. Tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar a) Biyo-yağ verimi b) Biyokütle dönüşümü.

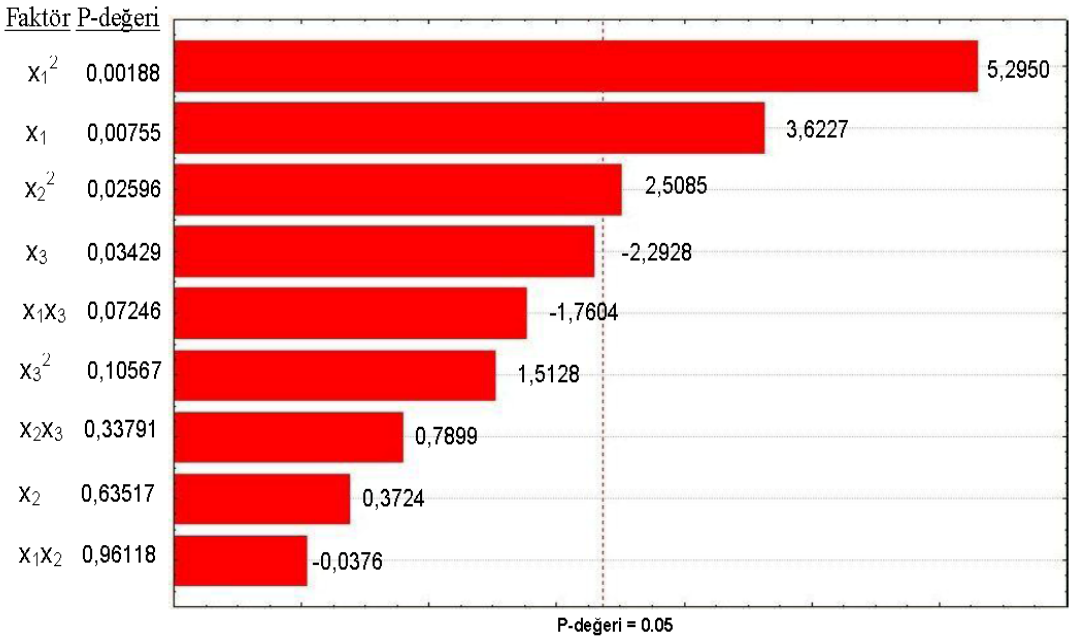
Deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyum belirlilik katsayısı R^2 değeri ile değerlendirilir. Şekil 4.24'den görüldüğü gibi R^2 değerleri biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için sırasıyla 0,90 ve 0,98 olmuştur. Bu sonuçlar bağımsız değişkenlerle alakalı olarak cevaplardaki değişimlerin %90 ve % 98'inin model tarafından açıklanabildiğini göstermektedir. R^2 değerinin 0,75'den fazla ve yüksek olması bu deney aralığında modelin yeterliliğini ifade etmektedir (Daneshvand et al., 2012; Banik and Pandey, 2008; Mohapatra et al, 2011; Haaland, 1989). Ayrıca biyo-yağ verimi için %3,63 ve biyokütle dönüşümü için %3,50 olarak hesaplanan varyasyon katsayısı yüzdeleri, deneysel veriler arasındaki tahmin ve güvenilirliğin iyi olduğunun göstergesidir (Liu et al., 2009).

Çizelge 4.25. Biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi tablosu.

Varyasyon	**SS**	**Df**	**MS**	**F_{hes}**	**$F_{0.05}$**
Biyo-yağ verimi					
Regresyon	109,33	9	12,15	6,86	3,68
Artık	12,37	7	1,77		
Uyum eksikliği	8,64	3	2,88		
Saf hata	3,73	4	0,93		
Toplam	121,70	16			
R^2 0,90		Düzeltilmiş-R^2	0,77		
Biyokütle dönüşümü					
Regresyon	1812,57	9	201,40	30,15	3,68
Artık	46,73	7	6,68		
Uyum eksikliği	45,14	3	15,05		
Saf hata	1,59	4	0,40		
Toplam	1859,30	16			
R^2 0,98		Düzeltilmiş-R^2	0,94		

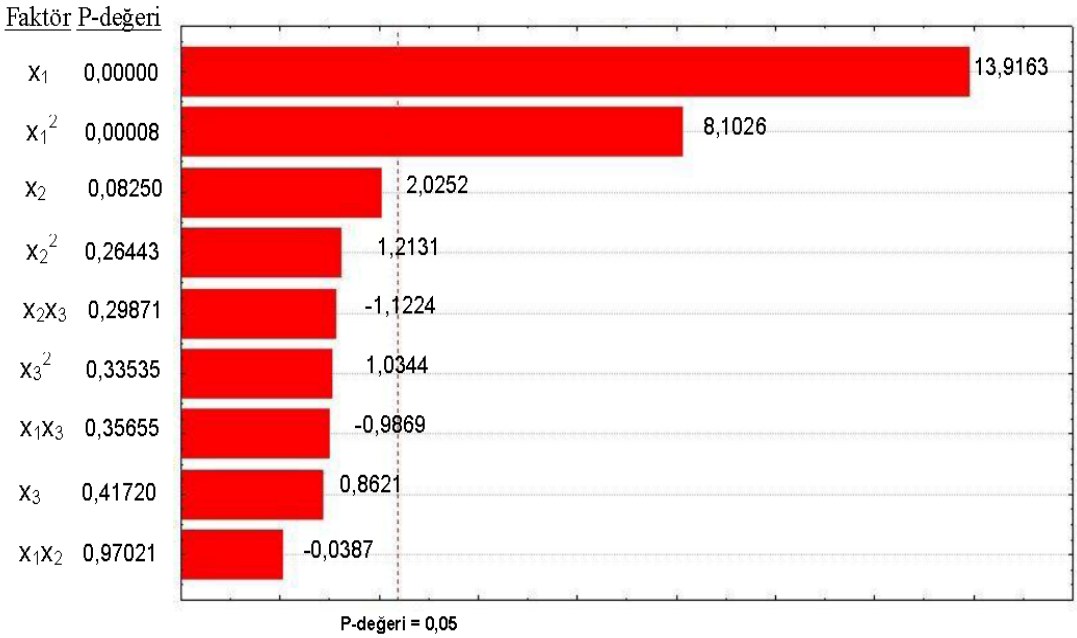
İkinci dereceden polinomların istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi tablosu ile kontrol edilmiştir. Çizelge 4.25'de biyo-yağ ve biyokütle dönüşümü için varyans analizi gösterilmiştir. Çizelge 4.25'den görüldüğü gibi biyo-yağ verimi için hesaplanan F değeri (6,86), tablodan okunan (3,68) değerden büyüktür. Benzer şekilde biyokütle dönüşümü için hesaplanan F değeri (30,15), tablodan okunan F değerinden (3,68) büyük olmuştur. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden büyük olması null hipotezinin (H_0) reddedildiğini gösterir. Dolayısıyla bu sonuç deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin ve modelin önemli derecede geçerli olduğunun göstergesidir.

Şekil 4.24'de biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi verilmiştir. Faktörleri önemlilik derecesine göre sıralayan pareto çizelgeleri varyans analizi etki değerlendirmesini göstermektedir. Şekil 4.24'den görüldüğü gibi biyo-yağ verimi için en önemli faktör sıcaklığın karesel terimi olmuştur. Bunun dışında sıcaklığın lineer terimi ile ekstraksiyon süresinin karesel terimi de istatistiksel olarak önemli faktörlerdir. x_1^2, x_1, x_2^2, x_3^2, x_2x_3 ve x_2 terimleri pozitif değere sahipken, diğer terimler negatif değere sahip olmuştur.



Şekil 4.24. Biyo-yağ verimi için pareto çizelgesi.

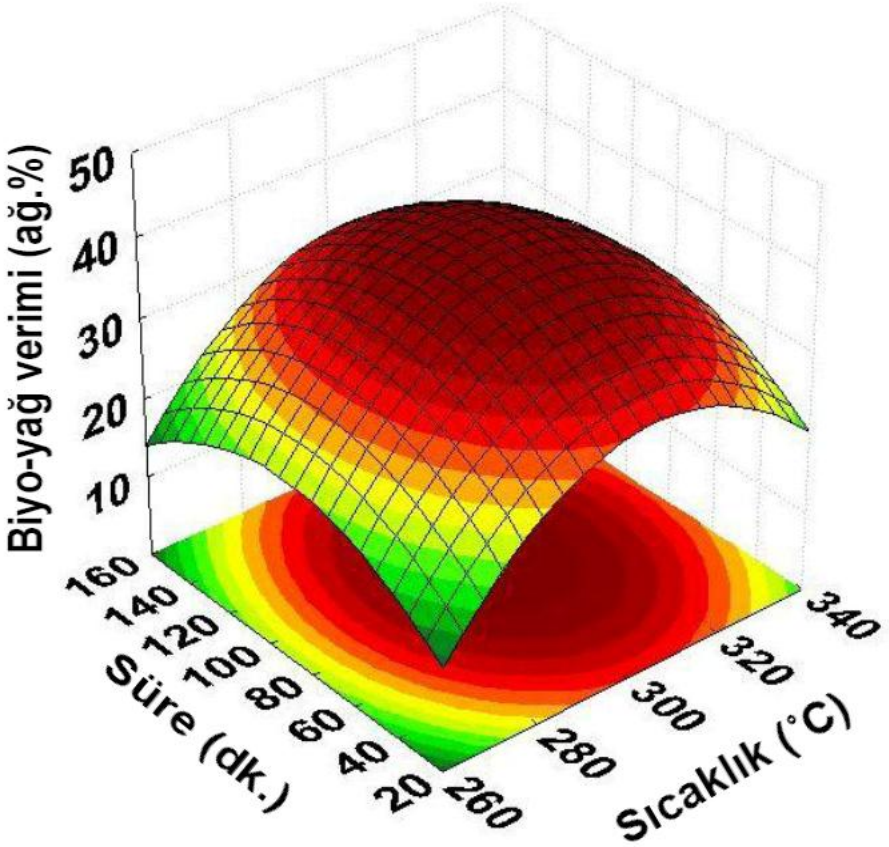
Şekil 4.25'de ise biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi verilmiştir. Şekil 4.25'den görüldüğü gibi biyokütle dönüşümü için en önemli faktör sıcaklığın lineer terimidir. Ayrıca sıcaklığın karesel terimi de istatistiksel olarak önemli bir faktördür. Buna göre hem biyokütle verimi hem de biyokütle dönüşümü için en önemli değişkenin sıcaklık olduğu anlaşılmaktadır. Dönüşüm için sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin lineer ve karesel terimleri pozitif değere sahip olurken, bu parametrelerin etkileşim terimleri (x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3) ise negatif değere sahip olmuştur.



Şekil 4.25. Biyokütle dönüşümü için pareto çizelgesi.

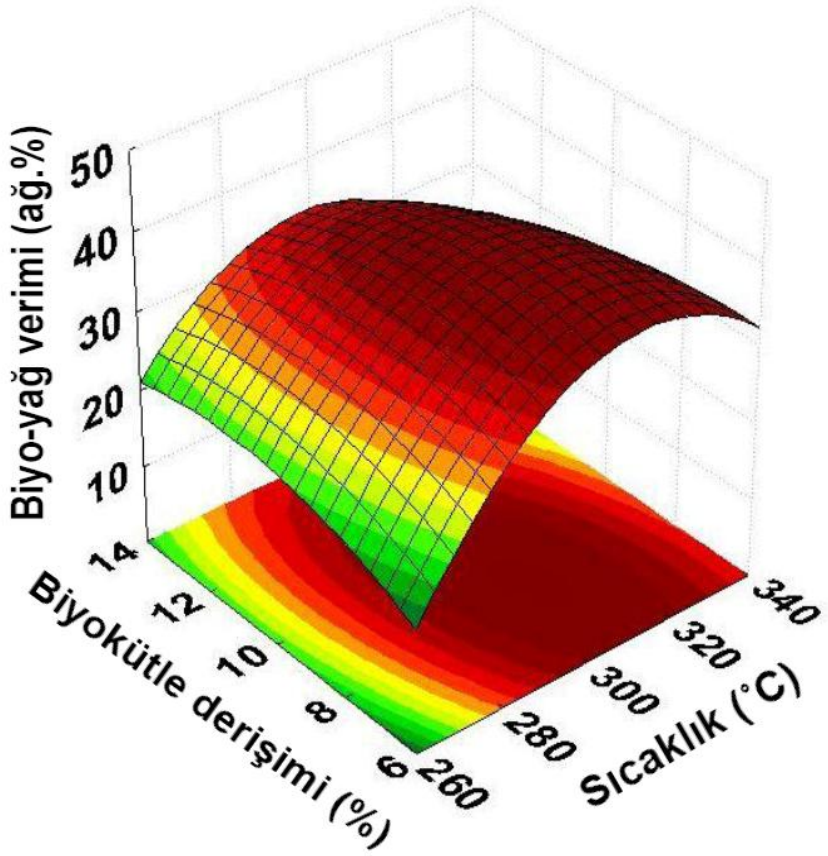
Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişimi faktörlerinin biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümüne etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.26'da ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının fonksiyonu olarak biyo-yağ veriminin cevap yüzey grafiği verilmiştir.

Şekil 4.26'dan anlaşıldığı gibi sıcaklığın 260°C'den 300°C'ye artırılmasıyla biyo-yağ verimi artmıştır. En yüksek biyo-yağ verimi 300°C civarında elde edilirken bu noktadan sonra sıcaklığın artışı biyo-yağ veriminin azalmasına neden olmuştur. En yüksek biyo-yağ veriminin elde edildiği ekstraksiyon süresi ise 80-100 dakika civarındadır. Bu noktadan sonra sürenin uzamasıyla birlikte elde edilen biyo-yağ veriminde azalma meydana gelmiştir.



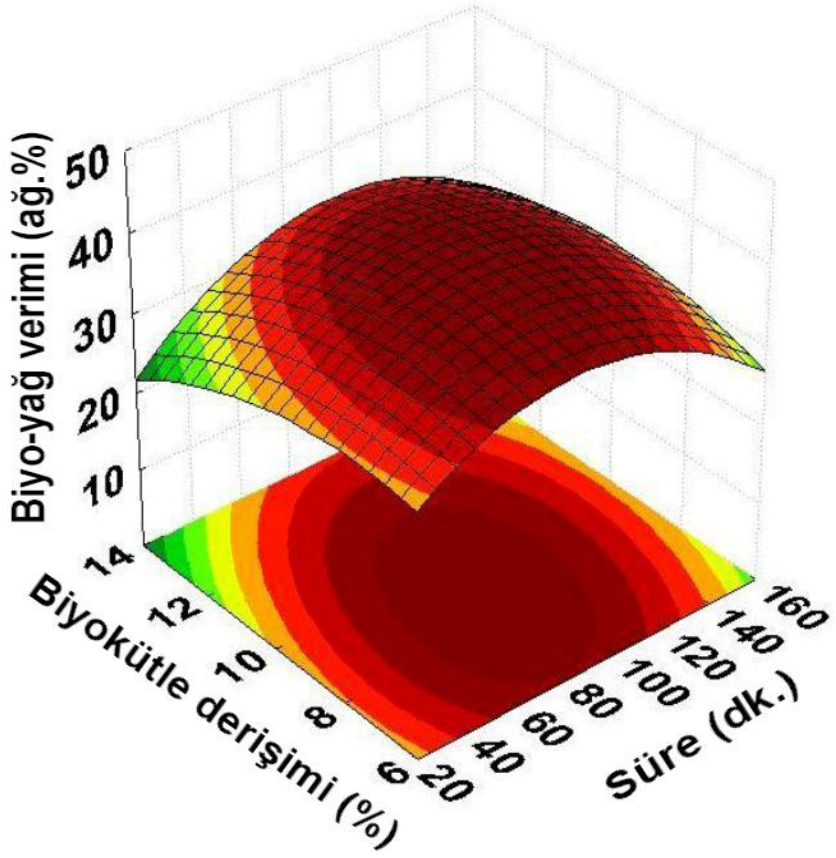
Şekil 4.26. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Sıcaklığın ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzey grafiği Şekil 4.27'de verilmiştir. Sıcaklığın 300-320°C'ye yükseltilmesiyle elde edilen biyo-yağ verimi artmıştır. Bu sıcaklıklarda en yüksek verimler düşük biyokütle derişimlerinde elde edilirken, aynı sıcaklıklarda biyokütle derişiminin artmasıyla biyo-yağ verimi azalmıştır.



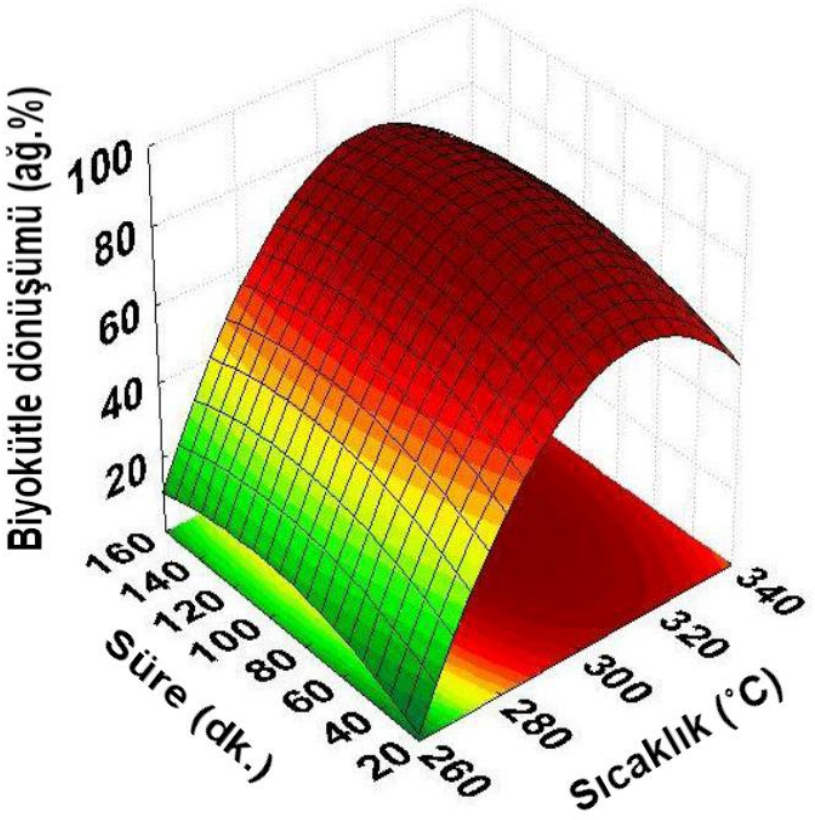
Şekil 4.27. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Biyo-yağ veriminin biyokütle derişimi ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak verildiği Şekil 4.28'de, en yüksek verim %6-10 biyokütle derişimlerinde 80-90 dakika ekstraksiyon sürelerinde elde edilmiştir. En yüksek verimin elde edildiği bu ekstraksiyon sürelerinde, biyokütle derişiminin artırılması biyo-yağ veriminin azalmasına neden olmuştur.



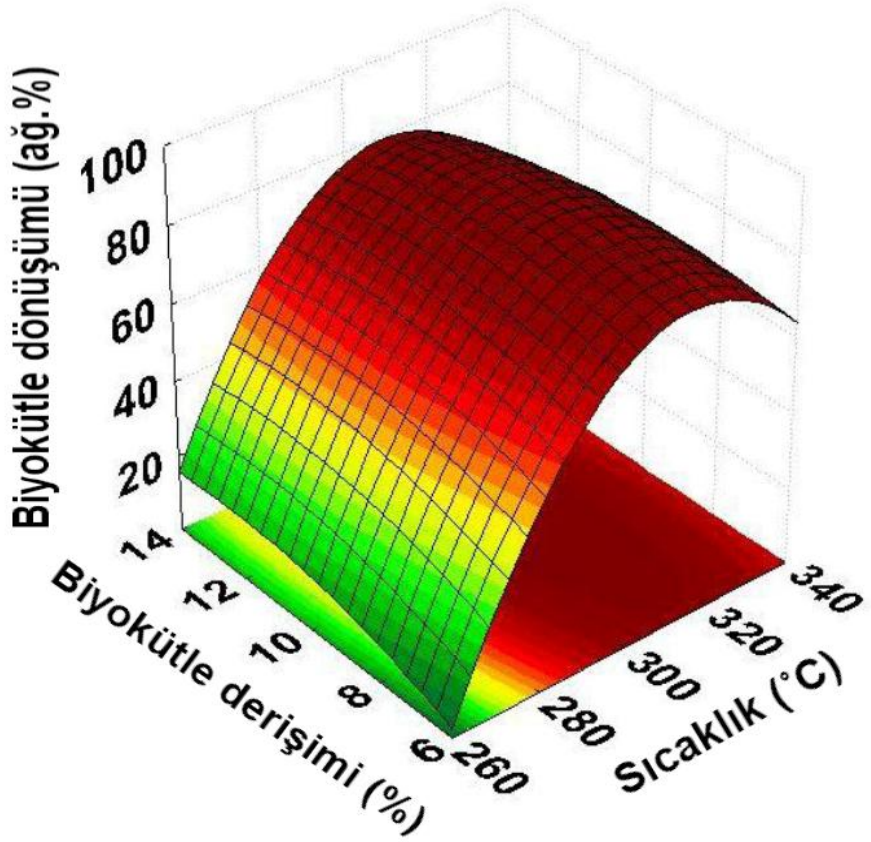
Şekil 4.28. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyo-yağ verimi cevap yüzeyi.

Biyokütle dönüşümünün ekstraksiyon süresi ve sıcaklığının fonksiyonu olarak verildiği Şekil 4.29'da tüm sürelerde sıcaklığın 260°C'den 320°C'ye çıkarılmasıyla biyokütle dönüşümü artmıştır. En yüksek dönüşüm 300-320°C sıcaklık ve 75-135 dakika ekstraksiyon sürelerinde elde edilmiştir. Bu noktadan sonra hem sıcaklığın hem de sürenin artırılması biyokütle dönüşümünün azalmasına neden olmuştur.



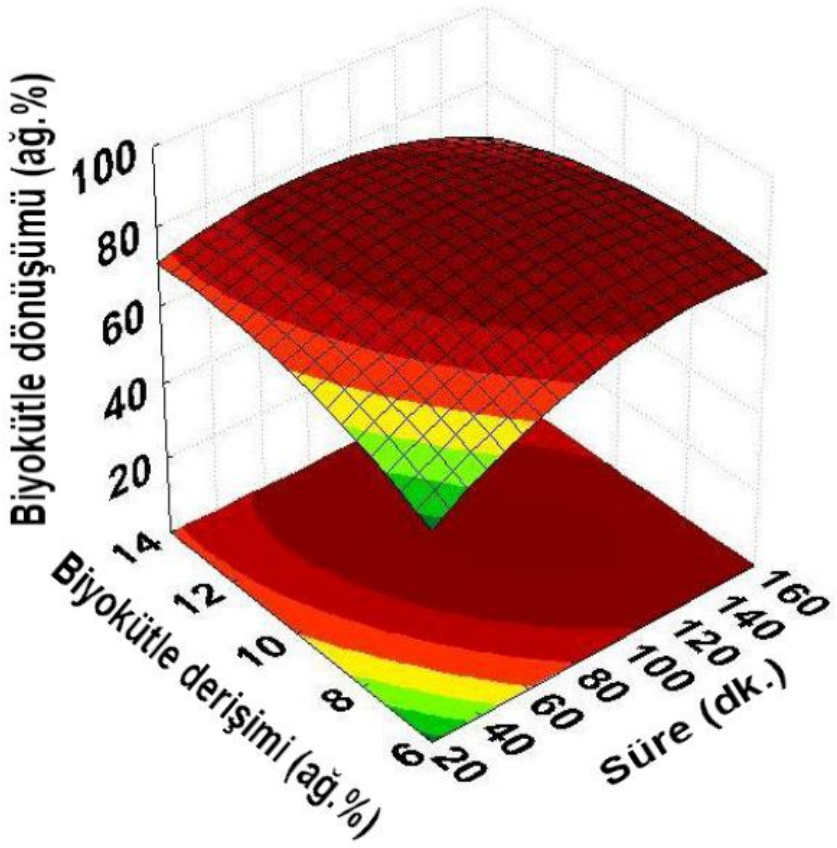
Şekil 4.29. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Şekil 4.30'da ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümünün cevap yüzeyi verilmiştir. Tüm ekstraksiyon sürelerinde sıcaklığın artırılması sonucunda biyokütle dönüşümü artmıştır. Düşük sıcaklıklarda (260°C) biyokütle derişiminin artırılması dönüşümün artmasına neden olmuştur. Yüksek sıcaklıklarda ise (340°C) biyokütle derişiminin artırılmasıyla biyokütle dönüşümü azalmıştır. En yüksek biyokütle dönüşümleri 300-320°C sıcaklıklarda %7-13 arası biyokütle derişimlerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.30. Ekstraksiyon sıcaklığı ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Şekil 4.31'de verilen ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümünün cevap yüzeyine bakıldığında, düşük biyokütle derişimlerinde ekstraksiyon süresinin arttırılmasıyla dönüşümün arttığı görülmektedir. Yüksek derişimlerde ise sürenin 70-110 dakikaya artırılması sonucu dönüşüm artmıştır. Ancak daha 110 dakikadan daha uzun sürelerde biyokütle dönüşümü azalmıştır. En yüksek biyokütle dönüşümleri 100-140 dakika ekstraksiyon sürelerinde, %8-12 biyokütle derişimlerinde elde edilmiştir.



Şekil 4.31. Ekstraksiyon süresi ve biyokütle derişiminin fonksiyonu olarak biyokütle dönüşümü cevap yüzeyi.

Çizelge 4.26'da deney tasarımının geçerliliğini belirleyen ve tasarım sınırları içinde olan kritik koşullar gösterilmektedir. Deneysel tasarıma göre biyo-yağ verimi için 308°C ekstraksiyon sıcaklığı, 88 dakika ekstraksiyon süresi, %8 biyokütle derişimi kritik noktalar olup; bu kritik koşullardaki tahmini/hesaplanan biyo-yağ verimi ağ. %40,23 olmuştur. Biyokütle dönüşümü için ise 313°C ekstraksiyon sıcaklığı, 115 dakika ekstraksiyon süresi, %9 biyokütle derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan biyokütle dönüşümü ağ. %85,19 olmuştur. Model tahmininin geçerliliğini belirlemek amacıyla kritik koşullarda deneyler yapılmıştır. Biyo-yağ verimi için tahmini değer %40,23 olurken, deney sonucunda %45,50 verim elde edilmiştir. Bu verilere göre biyo-yağ verimi için tahmini değer ile gözlenen değer arasında %11,6 sapma bulunmaktadır. Biyokütle dönüşümü için ise tahmini değer %85,19 olurken, deney sonucunda %80,69 dönüşüm elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre tahmini değer ile gözlenen değer arasında %5,3 sapma bulunmaktadır. Her iki değer de modelin geçerliliği için kabul edilebilir oranlardır.

Çizelge 4.26. Biyo-yağ verimi ve biyokütle dönüşümü için kritik koşullardaki tahmini ve gözlenen sonuçlar.

Faktörler	Gözlenen minimum	Kritik değerler	Gözlenen maksimum
Biyo-yağ verimi			
Sıcaklık (°C)	280	308	320
Ekstraksiyon süresi (dk.)	60	88	120
Biyokütle derişimi (%)	8	8	12
Tahmini biyo-yağ verimi (ağ.%)		40,23	
Gerçek biyo-yağ verimi (ağ.%)		45,50	
Biyokütle dönüşümü			
Sıcaklık (°C)	280	313	320
Ekstraksiyon süresi (dk.)	60	115	120
Biyokütle derişimi (%)	8	9	12
Tahmini biyokütle dönüşümü (ağ.%)		85,19	
Gerçek biyokütle dönüşümü (ağ.%)		80,69	

Çizelge 4.27. Merkez noktadaki deneyden elde edilen biyo-yağın bileşimi.

Alıkonma Zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
4,50	90	Propilen glikol	0,22
4,65	72	2-Etoksipropan	0,22
5,41	91	Hidroksiasetik asit etil ester	2,65
5,81	72	3-Pentanol	0,05
6,53	78	2-Hidroksipropanoik asit etil ester	1,22
6,74	94	2-Etoksitetrahidrofuran	0,09
7,20	92	Furfural	0,13
8,55	72	1,2-Bütandiol	0,30
8,99	95	2-Furanmetanol	1,01
9,39	72	2,2-Dietoksipropan	0,08
10,77	83	Tetrahidro-2-furanmetanol	0,43
11,48	72	4-Hidroksi-3-hekzanon	0,07
12,01	94	2-Metil-2-siklopenten-1-on	0,17
12,56	78	2-Hidroksibütanoik asit etil ester	2,32
12,88	90	Oksolan-2-on	0,21
13,09	83	Etoksiasetik asit etil ester	0,14
14,10	83	2,2-Dietoksietanol	0,14
15,77	78	Metoksiasetaldehit dietil asetal	0,04
16,17	93	5-Metil-2-furankarboksaldehit	0,02
16,26	93	3-Metil-2-siklopenten-1-on	0,05
18,35	87	2,3-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,18
20,01	83	Spiro[2.4]heptan-4-on	0,03
20,78	95	3-Metil-1,2-siklopentandion	0,85
20,85	93	2,3-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,08
21,43	89	2-Hekzenoik asit etil ester	0,05
21,91	95	2-Furankarboksilik asit etil ester	0,25
22,63	96	4-Oksopentanoik asit etil ester	0,74
23,99	96	2-Metoksifenol	1,80
25,95	96	3-Etil-2-hidroksi-2-siklopenten-1-on	1,06
28,13	92	Benzoik asit etil ester	0,10
28,55	72	3-Etil-1H-pirol	0,31
29,16	90	Bütandioik asit dietil ester	1,33
29,43	96	2-Metoksi-4-metilfenol	1,14
30,22	93	2-Hidroksi-3-propil-2-siklopenten-1-on	0,20
30,30	93	Dietil metilsüksinat	0,19
32,03	89	Etil 2-metil-3-oksosiklopentan-1-karboksilat	0,07
32,98	96	3-Metoksi-1,2-benzendiol	0,78
33,55	91	4-Etil-2-metoksifenol	2,01
37,18	94	2,6-Dimetoksifenol	4,71
37,60	90	2-Metoksi-4-propilfenol	2,33
39,22	96	(E)-2-Metoksi-4-(prop-1-enil)fenol	0,21
42,72	83	1-(4-Hidroksi-3-metoksifenil)etanon	0,25
44,32	72	1,2,3-Trimetoksi-5-metilbenzen	2,81
44,50	72	Homovanilil alkol	0,32

Çizelge 4.27. (devam ediyor).

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
44,66	76	Flopropion	0,15
46,60	97	4-Hidroksi-3-metoksibenzoik asit etil ester	0,29
47,31	95	2,6-Dimetoksi-4-(2-propenil)fenol	2,56
47,59	72	4-Propil-1,1'-difenil	4,27
48,69	91	3-(4-Hidroksi-3-metoksifenil)-2-oksopropanoik asit	0,28
48,97	70	2-Hidroksi-3-metoksi-6-propan-2-ilsiklohepta-2,4,6-trien-1-on	1,16
49,40	83	3-(3-Hidroksi-4-metoksifenil)prop-2-enoik asit	0,82
51,94	93	1-(4-Hidroksi-3,5-dimetoksifenil)etanon	0,27
52,40	93	Etil 3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propanoat	0,05
53,30	76	3,5-Dimetoksi-4-hidroksifenilasetik asit	0,26
61,63	95	n-Hekzadekanoik asit	0,10
62,73	99	Hekzadekanoik asit etil ester	1,47
65,96	96	8,11-Oktadekadienoik asit metil ester	0,38
66,16	99	8-Oktadekenoik asit metil ester	0,23
67,65	98	9,12-Oktadekadienoik asit metil ester	0,69
68,18	99	Linoleik asit etil ester	8,99
68,39	99	Etil oktadek-9-enoat	6,11
68,96	99	Oktadekanoik asit etil ester	0,59
73,74	93	Eikosanoik asit etil ester	0,43
77,83	91	9-Metiloktadekanoik asit etil ester	0,12
79,70	99	1,3-Dihidroksipropan-2-il-(Z)-oktadek-9-enoat	0,54
82,91	70	Dibenzo[fg,ij]pentafen	0,13
83,65	70	(8R,9S,13S,14S,17S)-2-metoksi-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dekahidrosiklopenta[a]fenantren-3,17-diol	0,21
86,80	74	(4E)-3-Hidroksi-4-[1-(hidroksiamino)etiliden]siklohekza-2,5-dien-1-on	0,45
87,90	83	1,7,7-Trimetilbisiklo[2.2.1]heptan-2-tiyon	0,09
89,52	83	1,2,2-Tri(fenil)etenilbenzen	0,17
89,85	70	[2,3,4-Tri(fenil)siklopenta-1,3-dien-1-il]benzen	0,31
92,55	91	1,2,4,5-Tetra(fenil)siklohekza-1,4-dien	0,11
92,95	86	5-(4-Naftalen-2-ilsülfanilfenil)pirimidin-2,4-diamin	0,13
93,67	78	6-Metoksi-4-metil-8-nitro-5-[4-(fenoksi)fenoksi]kinolin	1,11
94,43	72	2-Metilbifenil	0,53
97,33	74	(4.beta.,5.beta.)- 4,5-Epoksikolestan	0,20
97,85	93	Kolest-4-en-6-on-3-ol	0,14

Çizelge 4.27'de merkez noktadaki deneyden elde edilen biyo-yağın içeriğindeki bileşikler verilmiştir. Biyo-yağın içeriğinde fenoller, asitler, esterler, aldehitler, ketonlar, alkoller ve benzen türevleri bulunmaktadır. Biyo-yağın içeriğinde bulunan fenolik bileşiklerden bazıları 2-metoksifenol, 2-metoksi-4-metilfenol, 4-etil-2-metoksifenol, 2,6-dimetoksifenol ve 2-metoksi-4-propilfenoldür. Bileşiklerin bağıl bolluklarına bakıldığında linoleik asit etil ester biyo-yağın içeriğinde öne çıkan bileşik olmuştur.

Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri Çizelge 4.28'de verilmiştir. Biyo-yağlar hammaddeye göre daha yüksek miktarda karbon ve daha düşük miktarda oksijen içermektedir. Süperkritik ekstraksiyon prosesinin önemli derecede deoksijenasyona neden olduğu biyo-yağların O/C oranının hammaddedeki orandan daha düşük olmasından anlaşılmaktadır. Ekstraksiyon sonrasındaki katı ürünlerin karbon içeriğine bakıldığında en yüksek karbon içeriği (%64,70) en yüksek sıcaklıktan elde edilen katı üründe görülürken, sıcaklığın artışıyla birlikte katı ürünlerdeki karbon içeriği artmıştır. Katı ürünlerdeki en yüksek oksijen içeriği (%38,45) ise en düşük sıcaklıktaki ekstraksiyondan elde edilen üründe olurken; ekstraksiyon sıcaklığının artışıyla katı ürünlerdeki oksijen içeriği de azalmıştır.

Çizelge 4.28. Hammadde, seçilmiş biyo-yağların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri.

Ürün	Deney no	%C	%H	%N	%O[a]	H/C	O/C	N/C
Hammadde	-	46,82	4,79	0,92	47,47	1,23	0,76	0,02
Biyo-yağ	1	52,30	6,10	0,80	40,80	1,40	0,59	0,01
Biyo-yağ	17	59,49	7,21	0,79	32,51	1,45	0,41	0,01
Biyo-yağ	4	63,42	7,11	0,75	28,73	1,34	0,34	0,01
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	1	55,31	5,55	0,69	38,45	1,20	0,52	0,01
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	17	59,80	5,31	0,65	34,25	1,06	0,43	0,01
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	4	64,70	5,18	0,63	29,49	0,96	0,34	0,01

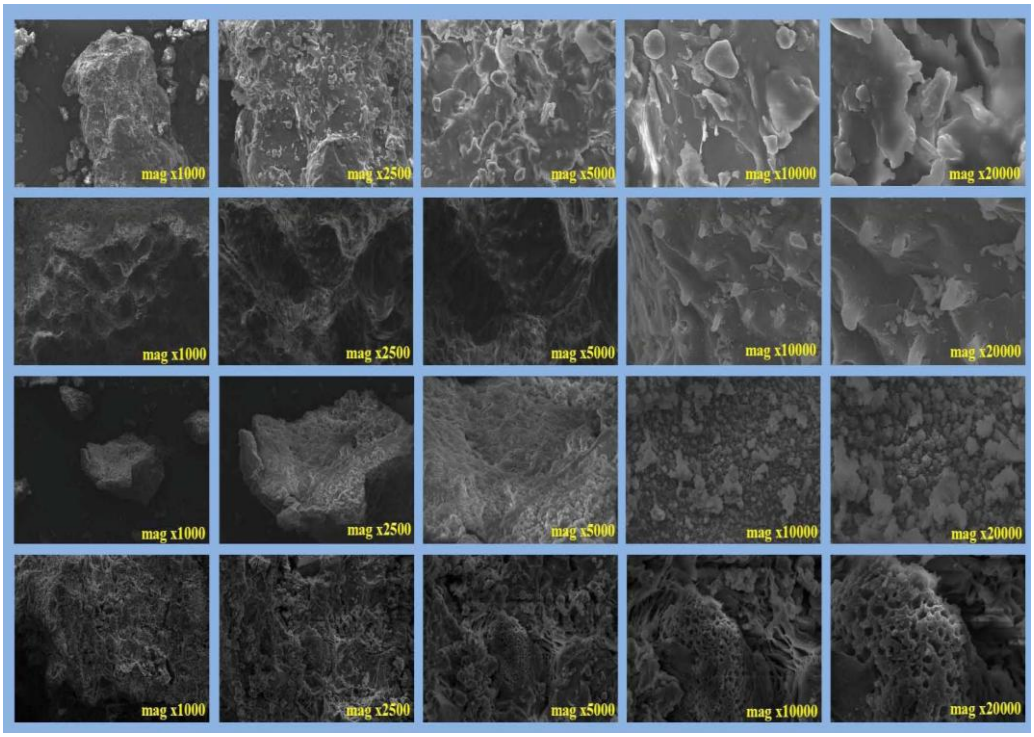
[a] Farktan

(a)

(b)

(c)

(d)



Şekil 4.32. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri a) Hammadde, b) Deney no: 1, c) Deney no: 17, d) Deney no: 4.

Ekstraksiyon sonrası elde edilen seçilmiş katı ürünlerin SEM görüntüleri Şekil 4.32'de verilmiştir. Hammadde yüzeyi süperkritik etanol ekstraksiyonu sonrasında değişikliğe uğramıştır. Hammaddenin fazla pürüzlü olmayan yüzeyinin, ekstraksiyon sonrasında bozunmaya başladığı görülmektedir. En düşük sıcaklıkta (Şekil 4.32b) katı ürünlerin yüzeyinde pürüzlerin artmaya başlayarak, yüzeyde oyuklar görülmeye başlanmış; sıcaklığın artışıyla (Şekil 4.32c) birlikte daha küçük ve ufalanmış parçalar katı ürün yüzeyinde oluşmuştur. En yüksek sıcaklıkta ise (Şekil 4.32d) süperkritik ekstraksiyon işlemiyle birlikte yüzeyde ufak gözenekler oluştuğu görülmektedir.

4.5. ADAÇAYINDAN EKSTRAKTLARIN SÜPERKRİTİK ETANOL EKSTRAKSİYONU İÇİN BOX-BEHNKEN TASARIM

Adaçayının süperkritik etanol ekstraksiyonu için Box-Behnken tasarımı uygulanmıştır. Adaçayı ekstrakt verimine ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin etkisi incelenmiştir. Üç değişkenli Box-Behnken tasarımda ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi sırasıyla x_1, x_2 ve x_3 olarak kodlandıktan sonra ön denemeler sonucunda faktörlerin değer aralıkları (minimum, maksimum ve merkez noktalar) belirlenmiştir. Çizelge 4.29'da faktörler ve faktör aralıkları verilmiştir.

Çizelge 4.29. Faktörler ve faktörlerin değer aralıkları.

Faktörler	**Sembol**	**Faktörlerin değer aralıkları**		
		-1	0	+1
Sıcaklık (°C)	x_1	280	300	320
Süre (dk)	x_2	60	90	120
Bitki derişimi (%)	x_3	8	10	12

Çizelge 4.29'da faktörlerin minimum değerleri -1, maksimum değerleri +1 ve merkez değerleri de 0 olarak kodlanmıştır. Bu faktör değerlerine göre oluşturulan kodlanmış ve kodlanmamış değerlerle verilen tasarım matrisi ve tasarımdaki koşullardan elde edilen cevap değerleri Çizelge 4.30 ve Çizelge 4.31'da gösterilmiştir. Minimum adaçayı ekstrakt verimi (%44,80) 280°C sıcaklık, 60 dakika ekstraksiyon süresi ve %10 bitki derişimi koşullarından elde edilmiştir. En yüksek adaçayı ekstrakt verimi (%72) ise 320°C sıcaklıkta, 90 dakikalık süre ve %12'lik derişimde elde edilmiştir.

Çizelge 4.30. Kodlanmış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Bağımsız değişkenler			Cevap
	x_1	x_2	x_3	Y_1
	Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	-1	-1	0	44,80
2	+1	-1	0	58,80
3	-1	+1	0	50,20
4	+1	+1	0	63,10
5	-1	0	-1	49,80
6	+1	0	-1	71,00
7	-1	0	+1	44,90
8	+1	0	+1	72,00
9	0	-1	-1	51,00
10	0	+1	-1	54,10
11	0	-1	+1	51,50
12	0	+1	+1	54,80
13(C)	0	0	0	51,00
14(C)	0	0	0	52,80
15(C)	0	0	0	49,60
16(C)	0	0	0	50,40
17(C)	0	0	0	51,60

Çizelge 4.31. Kodlanmamış değerlerle oluşturulan tasarım matrisi.

Deney	Bağımsız değişkenler			Cevap
	x_1	x_2	x_3	Y_1
	Sıcaklık (°C)	**Ekstraksiyon süresi (dk)**	**Bitki derişimi (%)**	**Ekstrakt verimi (ağ.%)**
1	280	60	10	44,80
2	320	60	10	58,80
3	280	120	10	50,20
4	320	120	10	63,10
5	280	90	8	49,80
6	320	90	8	71,00
7	280	90	12	44,90
8	320	90	12	72,00
9	300	60	8	51,00
10	300	120	8	54,10
11	300	60	12	51,50
12	300	120	12	54,80
13(C)	300	90	10	51,00
14(C)	300	90	10	52,80
15(C)	300	90	10	49,60
16(C)	300	90	10	50,40
17(C)	300	90	10	51,60

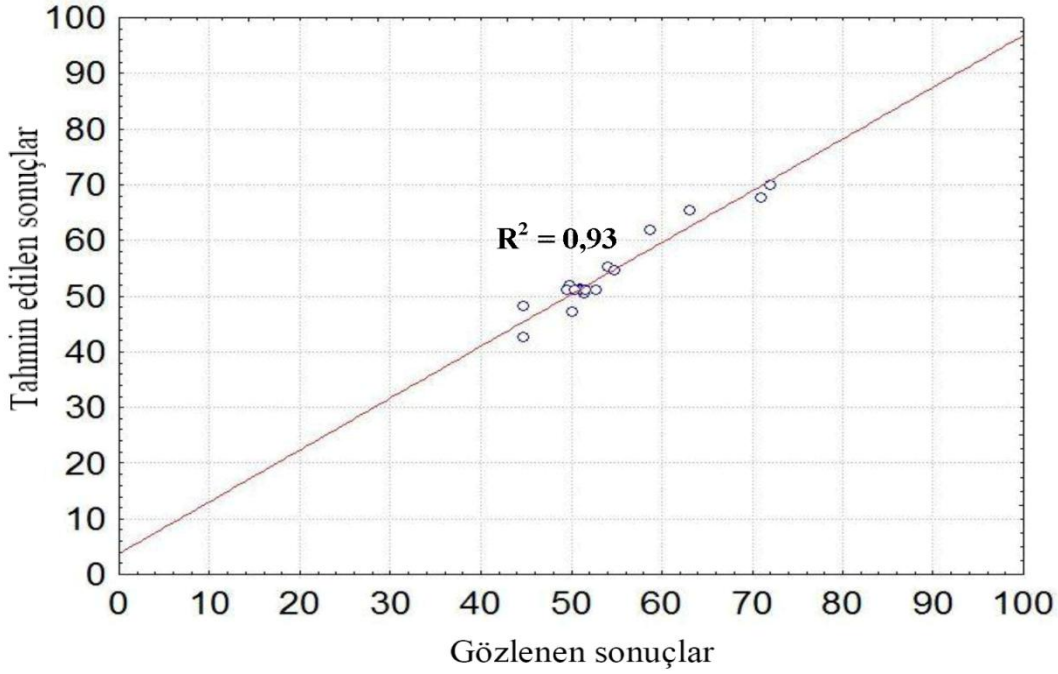
Bağımsız değişkenler (faktörler) ile bağımlı değişken (deneyden elde edilen cevap) arasındaki ilişkiyi oluşturmak için ikinci dereceden polinom eşitliği kullanılmıştır.

Bağımlı değişkenler olan ekstrakt verimi (y_1) ile bağımsız değişkenler olan ekstraksiyon sıcaklığı (x_1), ekstraksiyon süresi (x_2) ve biyokütle derişimi (x_3) arasındaki ilişki için oluşturulan ikinci dereceden polinom eşitliği aşağıdaki gibidir.

$$y_1= 1168,66- 7,134x_1+ 0,537x_2- 28,862x_3+ 0,012x_1^2- 0,002x_2^2+ 0,868x_3^2- 0,001x_1x_2+ 0,037x_1x_3+ 0,001x_2x_3 \quad (4.7)$$

y_1: Ekstrakt verimi
x_1, x_2, x_3: Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi, bitki derişimi

Deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyum belirlilik katsayısı R^2 değeri ile değerlendirilir. Şekil 4.33'den görüldüğü gibi adaçayı ekstrakt verimi için R^2 değeri 0,93 olmuştur. Bu sonuçlar bağımsız değişkenlerle ilişkili olarak cevaplardaki değişimlerin %93'ünün model tarafından açıklanabildiğini ve toplam varyansın yalnızca %7'sinin hesaplanamadığını göstermektedir. R^2 değerinin 0,75'den fazla ve yüksek olması bu deney aralığında modelin yeterliliğini ifade etmektedir (Daneshvand et al., 2012; Banik and Pandey, 2008; Mohapatra et al, 2011; Haaland, 1989). Ekstrakt verimi için düzeltilmiş belirlilik katsayısı (Düzeltilmiş-R^2) değeri 0,84 bulunmuştur. Deneysel veriler arasındaki tahmin ve güvenilirliğin iyi olduğu, adaçayı ekstrakt verimi için varyasyon katsayısı yüzdesinin %5,77 olarak bulunmasından anlaşılmaktadır.



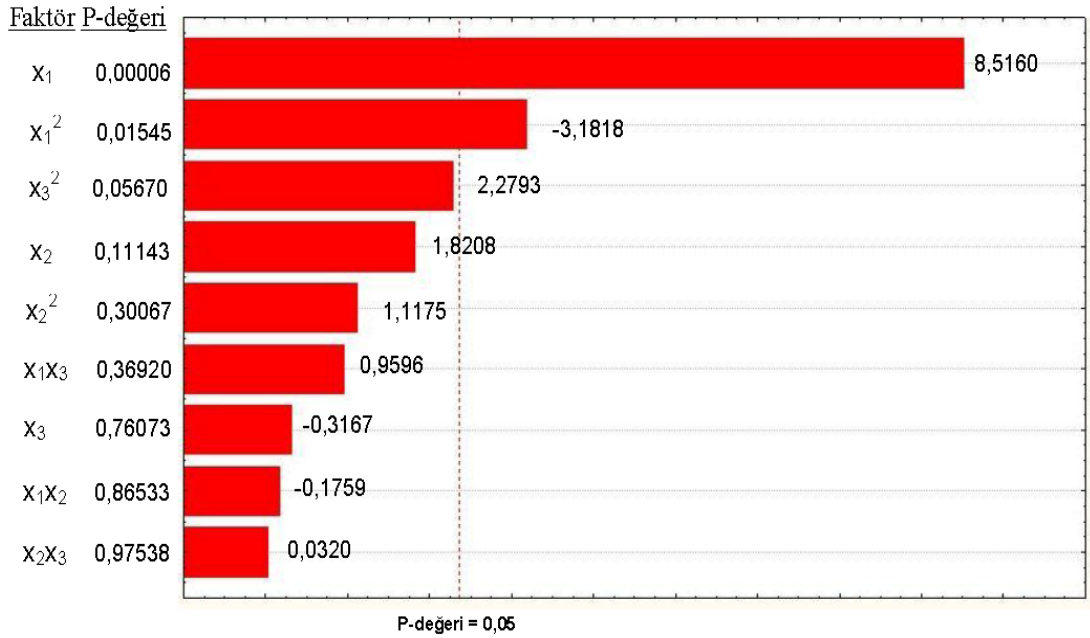
Şekil 4.33. Adaçayı ekstrakt verimi için tahmin edilen sonuçlara karşı gözlenen sonuçlar.

Çizelge 4.32. Ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu.

Varyasyon	SS	Df	MS	F_{hes}	$F_{0,05}$
Ekstrakt verimi					
Regresyon	915,58	9	101,73	10,41	3,68
Artık	68,41	7	9,77		
Uyum eksikliği	62,52	3	20,84		
Saf hata	5,89	4	1,47		
Toplam	983,99	16			
R^2 0,93		Düzeltilmiş-R^2	0,84		

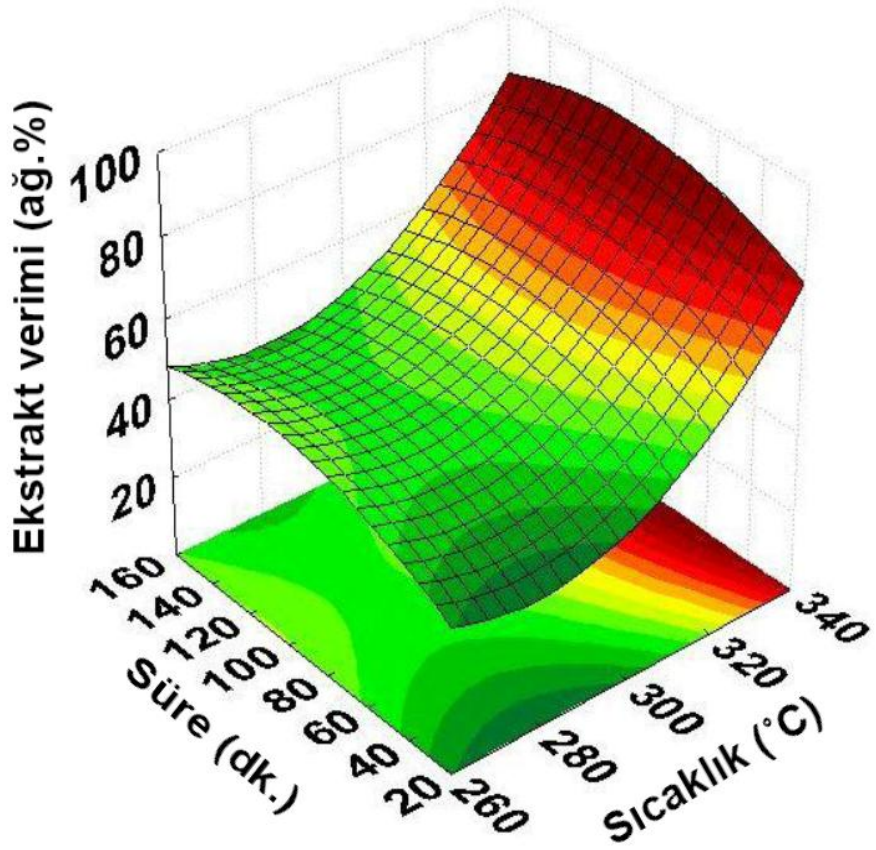
İkinci dereceden polinomun istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi tablosu ile kontrol edilmiştir. Çizelge 4.32'de ekstrakt verimi için varyans analizi tablosu gösterilmiştir. Çizelge 4.32'den görüldüğü gibi model için hesaplanan F değeri (10,41), %95 güven aralığı için tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden (3,68) büyüktür. Hesaplanan F değerinin tablodan okunan $F_{0,05}$ değerinden büyük olması null hipotezinin (H_0) reddedildiğini gösterir. Dolayısıyla bu sonuç deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin ve modelin önemli derecede geçerli olduğunun göstergesidir.

Şekil 4.34'de ekstrakt verimi için pareto çizelgesi verilmiştir. Faktörleri önemlilik derecesine göre sıralayan pareto çizelgeleri varyans analizi etki değerlendirmesini göstermektedir. Pareto çizelgesine göre yüksek t değerine ve en düşük p değerine sahip sıcaklığın lineer ve karesel terimleri istatistiksel olarak önemli olurken; diğer faktör terimleri ve etkileşim terimleri istatistiksel olarak önemli değildir. Sıcaklığın ve ekstraksiyon süresinin lineer terimleri, ekstraksiyon süresinin ve bitki derişiminin karesel terimleri, sıcaklık ve derişimin etkileşim terimi, süre ve derişimin etkileşim terimi pozitif değere sahipken; sıcaklığın karesel terimi, biyokütle derişiminin lineer terimi, sıcaklık ve ekstraksiyon süresinin etkileşim terimi negatif değere sahiptir.



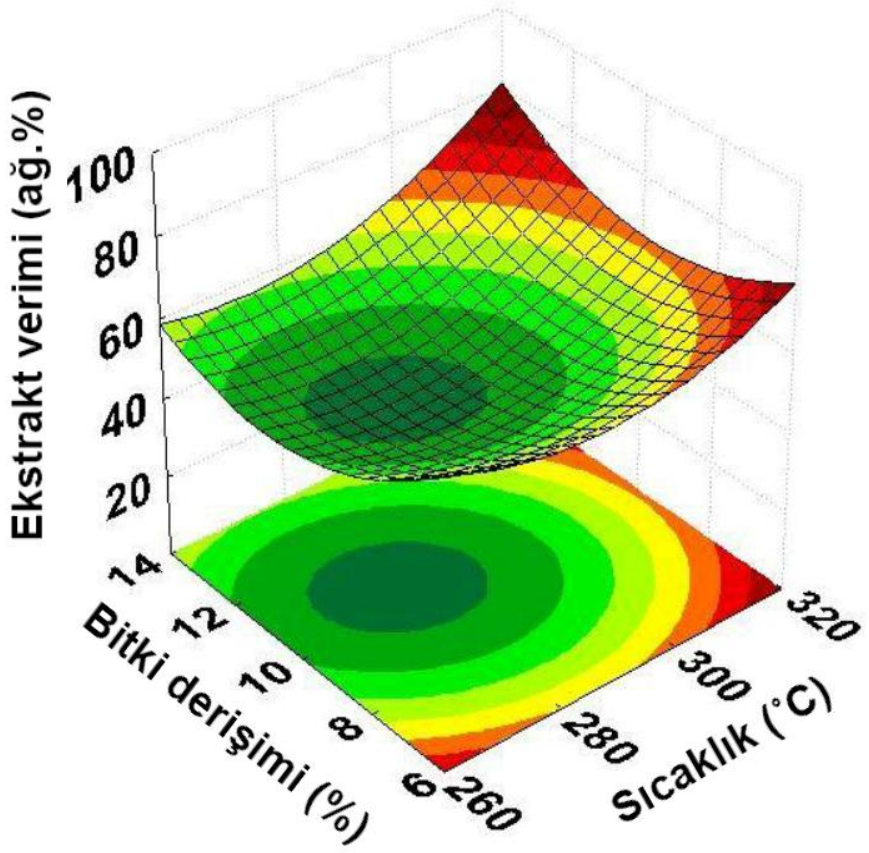
Şekil 4.34. Adaçayı ekstrakt verimi için pareto çizelgesi.

Ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon süresi ve bitki derişimi faktörlerinin ekstrakt verimine etkisi cevap yüzey yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Şekil 4.35'de ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon sıcaklığının fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin cevap yüzeyi verilmiştir. Üç boyutlu cevap yüzeyine göre genel olarak sıcaklığın artışı ekstrakt veriminin artmasına neden olmuştur. Yüksek ve düşük sıcaklıklarda düşük ekstraksiyon sürelerinden 100 dakika civarına kadar sürenin artırılmasıyla ekstrakt veriminde artış olurken; daha uzun sürelerde verim azalmaya başlamıştır.



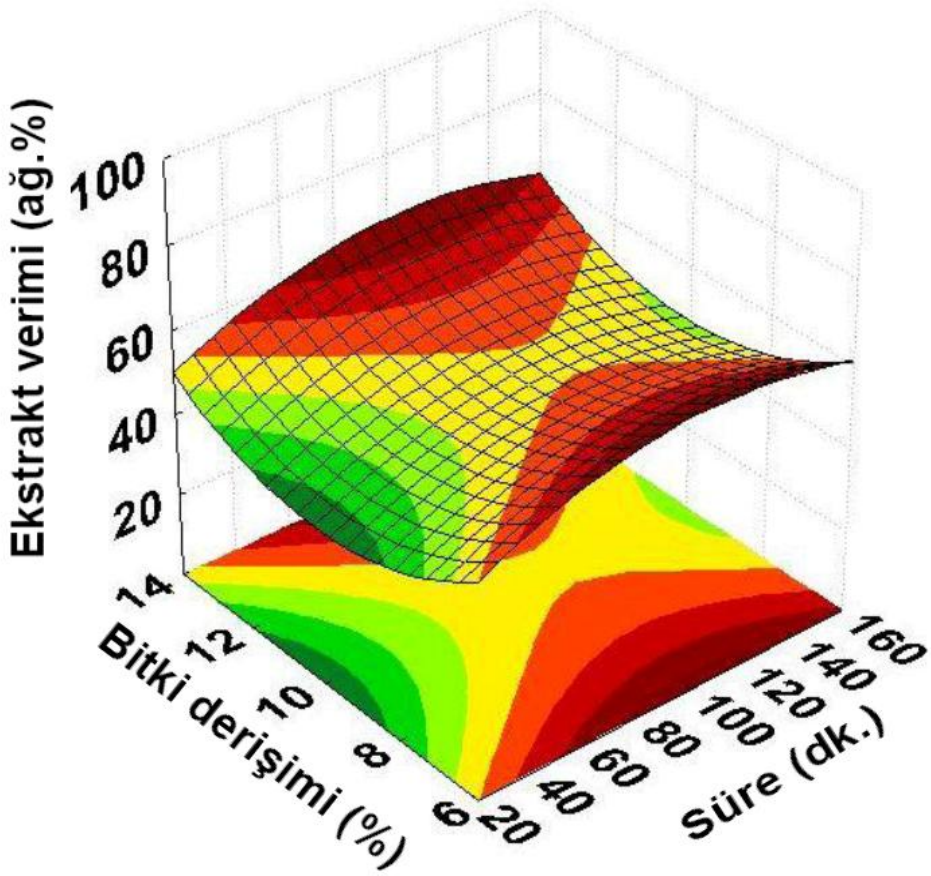
Şekil 4.35. Ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Sıcaklığın ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt veriminin üç boyutlu cevap yüzeyi Şekil 4.36'da verilmiştir. Üç boyutlu cevap yüzeyine göre en fazla ekstrakt verimi yüksek sıcaklık (320°C) ve yüksek bitki derişiminde elde edilmektedir. Düşük sıcaklıkta (260°C), %6 civarındaki bitki derişimlerinde ekstrakt verimi yüksek iken sıcaklığın artmasıyla verim azalmıştır. Ancak sıcaklığın 320°C'ye artıtılmasıyla tekrar yüksek verimlere ulaşılmıştır. 280°C sıcaklık civarında %9-12 bitki derişimlerinde ekstrakt verimi en düşük olmuştur.



Şekil 4.36. Ekstraksiyon sıcaklığı ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Ekstrakt verimi bitki derişimi ve ekstraksiyon süresinin fonksiyonu olarak Şekil 4.37'de verilmiştir. Tüm ekstraksiyon sürelerinde en yüksek ekstrakt verimi düşük ve yüksek bitki derişimlerinde elde edilmiştir. Düşük ve yüksek derişimlerde ekstraksiyon süresi artırıldığında elde edilen verim artarken; 140 dakikadan daha uzun ekstraksiyon sürelerinde verim azalmıştır. En yüksek ekstrakt verimleri sıcaklık ve sürenin fonksiyon olarak verildiği grafiğe benzer şekilde 80-120 dakika civarındaki sürelerde elde edilmiştir. Diğer cevap yüzeylerinden farklı bir yapıda olan bitki derişimi-sıcaklık ile bitki derişimi-süre cevap yüzeylerinde genel olarak bitki derişiminin yüksek ve düşük olduğu koşullarda yüksek ekstrakt verimlerine ulaşılırken, orta noktalarda daha düşük verimler elde edilmiştir.



Şekil 4.37. Ekstraksiyon süresi ve bitki derişiminin fonksiyonu olarak ekstrakt verimi cevap yüzeyi.

Çizelge 4.33'de deney tasarımının geçerliliğini belirleyen ve tasarım sınırları içinde olan optimum koşullar gösterilmektedir. Deneysel tasarıma göre adaçayı ekstrakt verimi için 280°C ekstraksiyon sıcaklığı, 110 dakika ekstraksiyon süresi, %11 bitki derişimi kritik noktalar olup; bu koşullardaki tahmini/hesaplanan ekstrakt verimi ağ. %47,04 olmuştur. Model tahmininin geçerliliğini belirlemek amacıyla bu koşullarda deneyler yapılmıştır. Ekstrakt verimi için kritik koşullardaki deney sonucunda %49,21 verim elde edilmiştir. Bu verilere göre tahmini değer ile gözlenen değer arasında %4,41 sapma bulunmaktadır. Buna göre ekstrakt verimi tahmini için kullanılan modelin geçerliliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çizelge 4.33. Ekstrakt verimi için kritik koşullardaki tahmini ve gözlenen sonuçlar.

Faktörler	Gözlenen minimum	Kritik değerler	Gözlenen maksimum
Ekstrakt verimi			
Sıcaklık (°C)	280	280	320
Ekstraksiyon süresi (dk.)	60	110	120
Bitki derişimi (%)	8	11	12
Tahmini ekstrakt verimi (ağ.%)		47,04	
Gerçek ekstrakt verimi (ağ.%)		49,21	

Çizelge 4.34'de adaçayı ekstraktı içeriğindeki bileşikler verilmiştir. Adaçayı ekstraktının içeriğinde çoğunlukla fenol, 2-metoksifenol, 4-etilfenol, 4-etil-2-metoksifenol, 2,6-dimetoksifenol gibi fenolik bileşikler ve 2-hidroksipropanoik asit etil ester, 2-hidroksibütanoik asit etil ester, pentandioik asit etil ester, hekzadekanoik asit etil ester gibi asit esterler bulunmaktadır. Ekstraktın içeriğinde limonen, kamfor gibi bileşikler de bulunmuştur. Bağıl bolluklar dikkate alındığında ekstraktın içeriğinde (Z,Z)-9,12-oktadekadienoik asit başlıca bileşik olmuştur. Adaçayının süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonu, Soxhlet ekstraksiyonu ve hidrodistilasyonunun gerçekleştirildiği çalışmada adaçayı ekstraktının içeriğinde benzer şekilde limonen, kamfor bileşiklerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Glisic et al., 2010). Köri çiçekleri, adaçayı yaprakları ve her ikisinin karışımlarının süperkritik karbon dioksit ekstraksiyonunun ve hidrodistilasyonunun gerçekleştirildiği çalışmadan elde edilen adaçayı ekstraktının içeriğinde kamfor bulunduğu belirtilmiştir (Maksimovic, 2013).

Çizelge 4.34. Merkez noktadaki deneyden elde edilen ekstraktın bileşimi.

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
4,39	83	Pirol	0,17
5,15	91	Hidroksiasetik asit etil ester	0,25
6,37	83	2-Hidroksipropanoik asit etil ester	1,34
8,71	96	2-Furanmetanol	0,23
12,23	83	2-Hidroksibütanoik asit etil ester	0,74
16,40	80	2-Hidroksi-3-metilbütanoik asit etil ester	0,07
17,84	94	Fenol	0,53
18,36	70	2,3-Dimetil-2-siklopenten-1-on	0,53
19,29	91	2-Etil-4-metil-1H-pirol	0,20
20,01	74	Limonen	0,21
20,17	96	Ökaliptol	0,13
21,39	96	Etil 2-hekzenoat	0,24
21,86	87	2-Furankarboksilik asit etil ester	0,27
22,56	95	4-Oksopentanoik asit etil ester	0,48
23,72	89	2-Metoksifenol	0,90
23,96	80	3-Etil-2,4-dimetil-1H-pirol	0,53
25,08	81	Feniletil alkol	0,19
26,54	93	Kamfor	0,16
27,15	91	2-Etoksifenol	0,37
28,18	94	4-Etilfenol	1,08
28,95	90	Bütandioik asit dietil ester	1,03
29,26	90	1H-pirol-2-karboksilik asit etil ester	0,41
29.98	96	2,2,4-Trimetil-3-oksabisiklo[2.2.2]oktan-5-ol	0,40
30,23	96	Dietil metilsüksinat	0,53
33,36	87	4-Etil-2-metoksifenol	0,65
33,74	91	Pentandioik asit etil ester	0,86
35,04	76	3,4-Dietilfenol	0,26
36,56	98	Benzenpropanoik asit etil ester	0,55
36,68	95	2,6-Dimetoksifenol	0,46
37,33	78	2-Metoksi-4-propilfenol	0,23
38,05	76	3-Metil-1H-indol	0,26
38,38	76	Hekzandioik asit dietil ester	0,16
39,98	87	1-(4-Etoksifenil)etanon	0,41
45,53	78	(4Z)-4-[(Z)-büt-2-eniliden]-3,5,5-trimetilsiklohekz-2-en-1-on	0,25
52,26	96	Etil 3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propionat	0,20
53,21	78	4-Siklohekzilidenbütan-1-ol	0,17
53,90	98	Tetradekanoik asit etil ester	0,18
55,89	95	[R-[R*,R*-(E)]]- 3,7,11,15-Tetrametil-2-hekzadeken	0,18
62,61	99	Hekzadekanoik asit etil ester	3,61
67,90	99	Linoleik asit etil ester	1,29

Çizelge 4.34 (devam ediyor).

Alıkonma zamanı (dk.)	Eşleşme oranı (%)	Bileşik Adı	Alan (%)
68,08	98	Etil oktadek-9-enoat	1,42
68,48	98	(Z,Z,Z)-9,12,15-Oktadekatrienoik asit etil ester	0,66
68,84	99	Oktadekanoik asit etil ester	0,67
69,27	90	6,9a-Dimetil-3-metiliden-3a,4,5,6,6a,9b-hekzahidroazuleno[8,7-b]furan-2,9-dion	0,11
70.49	91	(Z,Z)-9,12-Oktadekadienoik asit	10,39
71,95	91	2,3,4,5-Tetrametil-7,7-di(fenil)bisiklo[4.1.0]hepta-2,4-dien	0,96
73,67	90	Heptadekanoik asit etil ester	0,43
74,90	96	(Z,Z)-9,12-Oktadekadien-1-ol	0,51
75,07	95	(Z)-14-Metilhekzadek-8-enal	1,16
77,81	96	Eikosanoik asit etil ester	0,23
79,56	90	4a-Metil-7-propan-2-il-1,3,4,5,6,7,8,8a-oktahidronaftalen-2-on	0,22
81,52	93	2,8-Dimetil-undekanoik asit etil ester	0,18
82,10	83	1,4-bis(Propan-2-ilamino)antrasen-9,10-dion	0,16
88,15	97	Vitamin E	0,35
93,36	70	5,6,8-Trimetil-7-[4-(1,3,4-trimetil-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)bütil]-1,2,3,4-tetrahidronaftalen	0,37
94,07	74	Urs-12-en	0,34
95,11	91	(4,4,6a,6b,8a,11,11,14b-oktametil-1,2,3,4a,5,6,7,8,9,10,12,12a,14,14a-tetradekahidropicene-3-il) asetat	0,86

Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve ekstraksiyon sonrası katı ürünlerin elementel bileşimleri Çizelge 4.35'de verilmiştir. Süperkritik etanol ekstraksiyonu sonrasında elde edilen ekstraktların karbon içeriği hammaddeden önemli oranda yüksek olmuştur. Benzer şekilde ekstraksiyon sonrası katı ürünlerin karbon içeriği hammaddeden nispeten fazla olsa da, aradaki fark çok fazla olmamıştır. Ekstraktların karbon içeriği ekstraksiyon sıcaklığının artmasıyla artmış ve en fazla karbon miktarı (%71,59) ekstraksiyon sıcaklığının en yüksek olduğu deneyden elde edilmiştir. Ekstraktlara benzer şekilde katı ürünlerin karbon içeriği de sıcaklık artışıyla artış göstermiştir. Süperkritik ekstraksiyon prosesi ekstraktlarda oksijenin uzaklaştırılmasına neden olmuş; böylelikle ekstraktların O/C oranı hammaddedeki orandan daha düşük olmuştur. Ancak ekstraksiyon sonrası katı ürünlerin oksijen içeriğinde pek fazla değişik olmamış ve katı ürünlerin oksijen içeriği hammaddeyle yakın olmuştur.

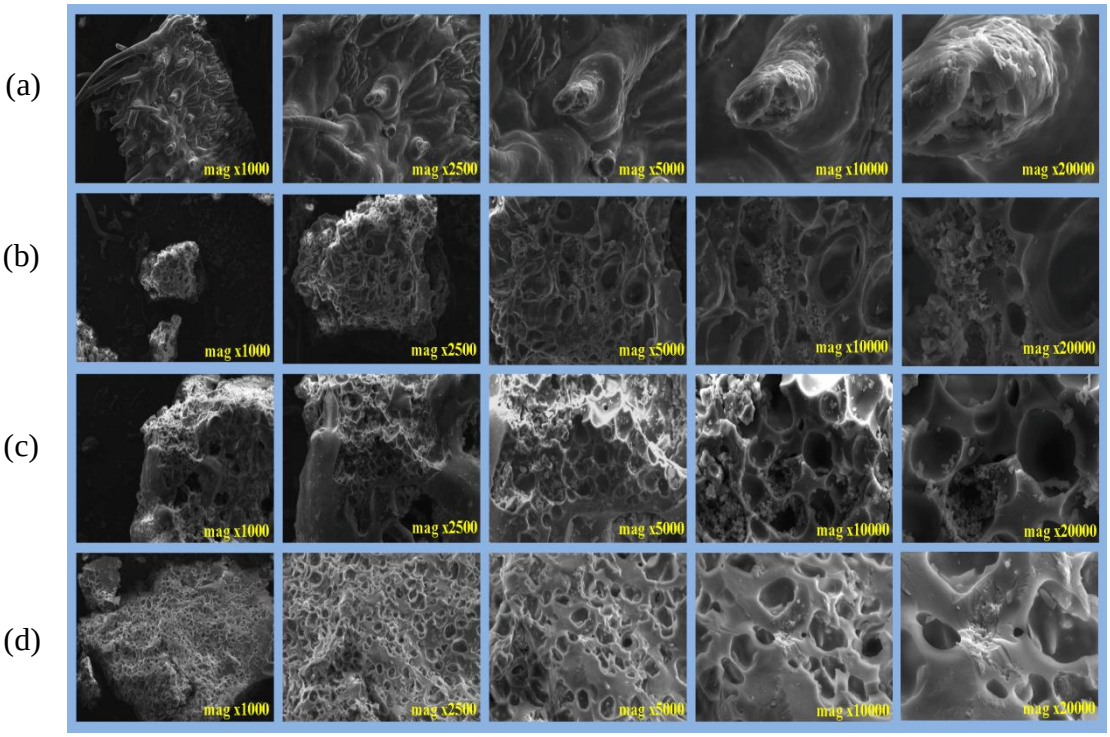
Çizelge 4.35. Hammadde, seçilmiş ekstraktların ve katı ürünlerin elementel bileşimleri.

Ürün	Deney no	%C	%H	%N	%O[a]	H/C	O/C	N/C
Hammadde	-	52,62	6,28	1,94	39,16	1,43	0,56	0,03
Ekstrakt	1	68,05	8,65	2,02	21,28	1,53	0,23	0,03
Ekstrakt	17	68,65	8,67	2,03	20,65	1,52	0,23	0,03
Ekstrakt	4	71,59	8,46	2,17	17,78	1,42	0,19	0,03
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	1	53,12	4,79	2,18	39,91	1,08	0,56	0,04
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	17	54,14	4,63	1,82	39,41	1,03	0,55	0,03
Ekstraksiyon sonrası katı ürün	4	55,85	4,56	1,65	37,94	0,98	0,51	0,03

[a] Farktan

Hammadde ve ekstraksiyon sonrası elde edilen seçilmiş katı ürünlerin SEM görüntüleri Şekil 4.38'de verilmiştir. Ekstraksiyon öncesinde adaçayının yüzeyinde dallanmış tüp şeklindeki yapılar görülmektedir. Şekil 4.38b'deki en düşük ekstraksiyon sıcaklığında elde edilen katı üründe bu dallanmış yapıların koparak, yerlerinde oyuklar oluşmaya başladığı görülmektedir. Şekil 4.38c'de orta dereceli

sıcaklık koşulunda adaçayının yüzeyindeki oyukların sıcaklık etkisiyle artmaya başladığı görülmektedir. En yüksek ekstraksiyon sıcaklığında ise yüzeydeki gözenekliliğin önemli oranda arttığı ve yüzeyin süngere benzer gözenekli bir yapı haline geldiği görülmektedir.



Şekil 4.38. Hammadde ve seçilmiş katı ürünlerin SEM analizleri a) Hammadde, b) Deney no: 1, c) Deney no: 17, d) Deney no: 4.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR

Alman kayını talaşından, ısırgan otundan ve funda yapraklarından biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonunda üç faktörlü Merkezi Kompozit Tasarım uygulanmıştır. Merkezi kompozit tasarım yönteminde üç faktörün (sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve biyokütle/bitki derişimi) elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimine etkisi incelenmiştir. Ayrıca biyokütle kaynağı olan Alman kayını talaşının kullanıldığı ekstraksiyon yönteminde elde edilen biyokütle dönüşüm yüzdesine sıcaklık, süre ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi de incelenmiştir. Alıç çekirdeği ve adaçayından biyo-yağların süperkritik etanol ekstraksiyonunda ise Box-Behnken tasarım yöntemi uygulanmıştır. Merkezi kompozit tasarımdaki gibi Box-Behnken tasarımında da üç faktörün (sıcaklık, süre ve biyokütle/bitki derişimi) elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimine etkisi incelenmiştir. Alıç çekirdeğinin süperkritik etanol ekstraksiyonunda biyokütle dönüşüm yüzdesine sıcaklık, süre ve biyokütle derişimi faktörlerinin etkisi de incelenmiştir. Kullanılan her bir biyokütle/bitki kaynağı için seçilen faktörlerin değer aralığı önceden gerçekleştirilen denemeler sonucunda belirlenmiştir.

Gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen sonuçlara göre oluşturulan matematiksel modelin geçerliliğini belirlemek amacıyla deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitlikleri arasındaki uyumun göstergesi olan R^2 değerleri tüm tasarımlarda 0,90 ve üzerinde olmuştur. Bu değerlerin bu derece yüksek olması her iki deney tasarımı yönteminde biyokütle veya bitkilerin süperkritik etanol ekstraksiyonunda elde edilen deneysel verilerle ikinci dereceden polinom eşitliklerinin uyumlu olduğunu göstermektedir. Biyokütle dönüşümü için en yüksek R^2 değeri (0,98) alıç çekirdeğinin süperkritik ekstraksiyonunda elde edilirken, ekstrakt/biyo-yağ verimi için ise 0,95 ile funda ekstrakt veriminden elde edilmiştir.

Modelin deneysel verileri tahmin edebilme özelliği ve ikinci dereceden polinomların istatistiksel açıdan önemliliği varyans analizi ile incelenmiştir. Merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarımlarının tamamında hesaplanan F değeri %95 güven aralığında tablodan okunan F değerinden yüksektir. Bu sonuçlar deneysel verilerin iyi derecede tahmin edilebilirliğinin ve modelin önemli derecede geçerli olduğunun göstergesidir.

Süpekritik etanol ekstraksiyonunda elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimi ile biyokütle dönüşümüne etki eden faktörlerin önemlilik derecesi pareto çizelgeleri ile belirlenmiştir. Hem merkezi kompozit tasarım hem de Box-Behnken tasarımında bitki ve biyokütlenin süperkritik etanol ekstraksiyonu için en önemli faktörün sıcaklık olduğu bulunmuştur. Buna göre hammaddeden bağımsız olarak sıcaklık süperkritik etanol ekstraksiyonundan elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimi ile biyokütle dönüşüm oranına önemli ölçüde etki etmiştir. Ekstraksiyona sıcaklıktan sonra etki eden en önemli faktör ısırgan ekstrakt verimi için bitki derişimi, funda ekstrakt verimi için bitki derişiminin karesel terimi, alıç çekirdeğinden elde edilen biyo-yağ verimi için ise ekstraksiyon süresinin karesel terimi, Alman kayınından elde edilen biyo-yağ verimi için ise sıcaklığın karesel terimi istatistiksel olarak önemli olmuştur.

Merkezi kompozit tasarım ile Box-Behnken tasarımında biyo-yağ/ekstrakt veriminin ekstraksiyon sıcaklığı-ekstraksiyon süresi; ekstraksiyon sıcaklığı-biyokütle/bitki derişimi ve ekstraksiyon süresi-biyokütle/bitki derişiminin fonksiyonu olarak verildiği üç boyutlu cevap yüzeyleri incelenmiştir. Her iki tasarım için cevap yüzeylerine bakıldığında genel olarak sıcaklığın artışıyla elde edilen biyo-yağ/ekstrakt verimi artmış olup, sıcaklık değişimi verime önemli ölçüde etki etmiştir. Sıcaklık değişiminin verimi önemli ölçüde etkilemesi, model analizinde süperkritik etanol ekstraksiyon için en önemli faktörün sıcaklık olarak bulunmasını destekler niteliktedir.

Biyokütle ve bitkilere seçici olarak ekstraksiyon öncesi ve sonrası yapılan SEM analizi görüntülerinde süperkritik etanol ekstraksiyonun etkisi açıkça görülmektedir. Genel olarak ekstraksiyon öncesinde hammadde yüzeyindeki bozulmamış hücre ve yapılarda ekstraksiyon sıcaklığının artırılmasıyla parçalanma ve bozulmanın artması

sonucunda, uçucuların bitki ve biyokütle matriksinden uzaklaşmasıyla yüzeyde oyukların oluştuğu ve yüzeydeki gözenekliliğin arttığı görülmüştür. Yüzeyde gözlenen bu değişimler süperkritik etanol ekstraksiyonunun etkisini açıkça göstermektedir. Yüzeyde sıcaklığa bağlı olarak gözlenen bu değişimler model analizlerinde süperkritik etanol ekstraksiyonu için en önemli faktörün sıcaklık olması sonucunu destekler niteliktedir.

Süperkritik etanol ekstraksiyonunda kullanılan hammaddelerin ve deney sonrası elde edilen ekstraktların elementel bileşimleri incelenmiştir. Elementel analiz sonuçlarına göre Alman kayınından ve alıç çekirdeğinden elde edilen biyo-yağlar ile ısırgan otundan ve adaçayından elde edilen ekstraktların karbon içeriği, hammaddelerin karbon içeriğinden fazla olmuştur. Funda ekstraktlarının karbon içeriği ise hammaddeden daha az olmuştur. Süperkritik ekstraksiyon sonucunda elde edilen biyo-yağların, ısırgan ve adaçayı ekstraktlarının oksijen içeriği hammaddeden düşük olurken; funda ekstraktlarında ise oksijen içeriği hammaddeden yüksek olmuştur.

Süperkritik etanol ekstraksiyonu sonucu elde edilen biyo-yağ ve ekstraktların içeriğini belirlemek amacıyla seçici olarak merkez noktadaki deneylerden elde edilen ürünlere GC-MS analizi yapılmıştır. Ekstraksiyon sonucu elde edilen biyo-yağ ve ekstraktların içeriğinde ortak olarak asit esterler ve fenolik bileşikler bulunmaktadır. Hekzadekanoik asit etil ester ve 2-furanmetanol tüm süperkritik etanol ekstraksiyonu sonucunda elde edilen biyo-yağ ve ekstraktlarda ortak olarak bulunan bileşikler olmuştur. Ortak olarak bulunan bileşikler dışında süperkritik etanol ekstraksiyonunda kullanılan bitki ve biyokütlelere özgü bileşikler de ekstraktların ve biyo-yağların içeriğinde bulunmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışma sonucunda çeşitli bitki ve biyokütlelerin süperkritik etanol ekstraksiyonu için merkezi kompozit ve Box-Behnken tasarım kullanılarak tasarlanan modellerin sistemi tanımlamada uygun olduğu görülmüştür. Her iki tasarım yönteminde hammaddeden bağımsız olarak süperkritik etanol ekstraksiyonunda en önemli faktör sıcaklık olmuştur. Bitki veya biyokütlenin süperkritik etanol ekstraksiyonunda sistemi tanımlamak ve sistemi etkileyen faktörleri belirlemek için merkezi kompozit tasarım ve Box-Behnken tasarımının

kullanılabileceği ortaya konmuştur. Süperkritik etanol ekstraksiyon sonucu biyokütleden elde edilen biyo-yağlar biyo-yakıt olarak ya da değerli kimyasalların elde edilmesinde kullanılabilir. Benzer şekilde esansiyel yağlar (değerli kimyasalların) elde edilmesinde bitkilerin süperkritik etanol ekstraksiyonuyla elde edilen ekstraktlar da kullanılabilir.

KAYNAKLAR

Akalın, M. K., Karagöz, S. and Akyüz, M., "Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 84: 164-172 (2013a).

Akalın, M. K., Karagöz, S. and Akyüz, M., "Supercritical extraction of bio-oils from German beech wood: Design of experiments", ***Industrial Crops and Products***, 49: 720-729 (2013b).

Akgun, I. H., Erkucuk, A., Pilavtepe, M. and Yeşil-Çeliktaş, O., "Optimization of total alkannin yields of Alkanna tinctoria by using sub- and supercritical carbon dioxide extraction", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 57: 31-37 (2011).

Ara, K. M., Karami, M. and Raofie, F., "Application of response surface methodology for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction and ultrasound-assisted extraction of Capparis spinosa seed oil", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 85: 173-182 (2014).

Asep, E. K., Jinap, S., Jahurul, M. H. A., Zaidul, I. S. M. and Singh, H., "Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide", ***Innovative Food Science and Emerging Technologies***, 20: 152-160 (2013).

Aydın, K., "Klinoptilolitin yapısal özelliklerinin katı sıvı ekstraksiyonla değişimlerinin incelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, ***Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 19-33 (2010).

Banik, R. M. and Pandey, D. K., "Optimizing conditions for oleanolic acid extraction from *Lantana camara* roots using response surface methodology", ***Industrial Crops and Products***, 27: 241-248 (2008).

Barbosa, H. M. A., de Melo, M. M. R., Coimbra, M. A., Passos, C. P. and Silva, C. M., "Optimization of the supercritical fluid coextraction of oil and diterpenes from spent coffee grounds using experimental design and response surface methodology", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 85: 165-172 (2014).

Baş, C., "Cevap yüzeyi tasarımları ve sinir ağları yaklaşımı", Doktora Tezi, ***Ankara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü***, Ankara, 1-66 (2010).

Bazaev, A. R., Abdulagatov, I. M., Bazaev, E. A. and Abdurashidova, A., "PVT measurements for pure ethanol in the near-critical and supercritical regions", ***International Journal of Thermophysics***, 28: 194-219 (2007).

Bozan, A., "Optimization of laser welding seam geometry using response surface methodology (RSM)", Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İstanbul, 15-39 (2012).

Bradley, N., "The response surface methodology", Yüksek Lisans Tezi, ***Indiana University Department of Mathematical Sciences***, Indiana, US, 4-46 (2007).

Brand, S., Susanti, R. F., Kim, S. K., Lee, H-S., Kim, J. and Sang, B-I., "Supercritical ethanol as an enhanced medium for lignocellulosic biomass liquefaction: influence of physical process parameters", ***Energy***, 59: 173-182 (2013).

Brereton, R. G., "Chemometrics, Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant", ***John Wiley&Sons***, Bristol, UK, 15-102 (2004).

Brunner, G., "Supercritical fluids: technology and application to food processing", ***Journal of Food Engineering***, 67: 21-33 (2005).

Bruns, R. E., Scarminio, I. S. and Barros Neto, B., "Statistical Design Chemometrics", ***Elsevier***, Netherlands, 199-243, 245-308 (2006).

Cornell, J. A., "How to Apply Response Surface Methodology, 2nd Ed.", ***American Society for Quality Control Statistics Division***, Wisconsin, US, 1-60 (1990).

Daneshvand, B., Ara, K. M. and Raofie, F., "Comparison of supercritical fluid extraction and ultrasound-assisted extraction of fatty acids from quince (Cydonia oblonga Miller) seed using response surface methodology and central composite design", ***Journal of Chromatography A***, 1252: 1-7 (2012).

Dean, J. R., "Extraction Techniques in Analytical Sciences", ***Wiley,*** Great Britain, 130-350 (2009).

Deniz G., R., "Optimization of aqueous enzymatic oil extraction from safflower via response surface methodology", Yüksek Lisans Tezi, ***İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** İstanbul, 22-29 (2010).

Garmus, T. T., Paviani, L. C., Queiroga, C. L., Magalhães, P. M. and Cabral, F. A., "Extraction of phenolic compounds from pitanga (Eugenia uniflora L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO_2, ethanol and water as solvents", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 86: 4-14 (2014).

Ghasemi, E., Raofie, F. and Najafi, N. M., "Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from *Myrtus communis* L. leaves", ***Food Chemistry***, 126: 1449-1453 (2011).

Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M. and Skala, D., "Extraction pof sage (Salvia officinalis L.) by supercritical CO_2: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 52: 62-70 (2010).

Gurib-Fakim, A., "Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow", ***Molecular Aspects of Medicine***, 27: 1-93 (2006).

Haaland, P. D., "Experimental Design in Biotechnology", ***Marcel Dekker Inc***., New York, US, 55-85 (1989).

Hegel, P. E., Camy, S., Destrac, P. and Condoret, J. S., "Influence of pretreatments for extraction of lipids from yeast by using supercritical carbon dioxide and ethanol as cosolvent", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 58: 68-78 (2011).

Huang, W., Li, Z., Niu, H., Wang, J. and Qin, Y., "Bioactivity of solanesol extracted from tobacco leaves with carbon dioxide-ethanol fluids", ***Biochemical Engineering Journal***, 42: 92-96 (2008).

Hui, L., Yuan, X., Zeng, G., Huang, D., Huang, H., Tong, J., You, Q. and Zhang, J., "The formation of bio-oil from sludge by deoxy-liquefaction in supercritical ethanol, ***Bioresource Technology***, 101: 2860-2866 (2010).

Ito, Y. C. and Cao, X. L., "Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography", ***Journal of Chromatography A***, 1021: 117-124 (2003).

Jowkarderis, M. and Raofie, F., "Optimization of supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample preparation method for determination of 4-nitrotoluene and 3-nitrotoluene in a complex matrix", ***Talanta***, 88: 50-53 (2012).

Kagliwal, L. D., Patil, S. C., Pol, A. S., Singhal, R. S. and Patravale, V. B., "Separation of bioactives from seabuckthorn seeds by supercritical carbon dioxide extraction methodology through solubility parameter approach", ***Separation and Purification Technology***, 80: 533-540 (2011).

Khajeh, M., "Optimization of process variables for essential oil components from Satureja hortensis by supercritical fluid extraction using Box-Behnken experimental design", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 55: 944-948 (2011).

Khayet, M., Abu Seman, M. N. and Hilal, N., "Response surface modeling and optimiza-tion of composite nanofiltration modified membranes", ***Journal of Membrane Science***, 349: 113–122 (2010).

Khayet, M., Zahrim, A. Y. and Hilal, N., "Modelling and optimization of coagulation ofhighly concentrated industrial grade leather dye by response surface methodology", ***Chemical Engineering Journal***, 167: 77–83 (2011).

Klein, M. T. and Virk, P. S., "Modeling of lignin thermolysis", ***Energy Fuels***, 22:2175-2182 (2008).

Laitinen, A., "Supercritical fluid extraction of organic compounds from solids and aqueous solutions", Doktora Tezi, ***Helsinki University of Technology Department of Chemical Technology***, Helsinki, Finland, 13-22 (1999).

Leardi, R., "Experimental design in chemistry: A tutorial", ***Analytica Chimica Acta***, 652: 161-172 (2009).

Lee, Y. H., Charles, A. L., Kung, H. F., Ho, C. T. and Huang, T. C., "Extraction of nobiletin and tangeretin from Citrus depressa Hayata by supercritical carbon dioxide with ethanol as modifier", ***Industrial Crops and Products***, 31: 59-64 (2010).

Liu, J., Miao, S., Wen, X. and Sun, Y., "Optimization of polysaccharides (ABP) extraction from the fruiting bodies of Agaricus blazei Murill using response surface methodology (RSM)", ***Carbohydrate Polymers,*** 78: 704-709 (2009).

Maksimovic, S., Kesic, Z., Lukic, I., Milovanovic, S., Ristic, M. and Skala, D., "Supercritical fluid extraction of curry flowers, sage leaves, and their mixture", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 84: 1-12 (2013).

Martinez-Correa, H. A., Cabral, F. A., Magalhães, P. M., Queiroga, C. L., Godoy, A. T., Sánchez-Camargo, A. P. and Paviani, L. C., "Extracts from the leaves of Baccharis dracunculifolia obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO_2, ethanol and water", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 63: 31-39 (2012).

Meloan, C. E., "Chemical Separations Principles, Techniques, and Experiments", ***Wiley***, Toronto, Canada, 121-430 (1999).

Mohapatra, D. P., Brar, S. K., Tyagi, R. D. and Surampalli, R. Y., "Parameter optimization of ferro-sonication pre-treatment process for degradation of bisphenol A and biodegradation from wastewater sludge using response surface model", ***Journal of Hazardous Materials***, 189: 100-107 (2011).

Montgomery, D. C., "Design and Analysis of Experiments, 6th Ed.", ***John Wiley&Sons***, USA, 1-22 (2005).

Myers, R. H., Montgomery, D. C. and Anderson-Cook, C. M., "Response Surface Methodology, 3rd Ed.", ***John Wiley&Sons***, New Jersey, 511-735 (2009).

Nyam, K. L., Tan, C. P., Lai, O. M., Long, K. and Che Man, Y. B., "Optimization of supercritical fluid extraction of phytosterol from roselle seeds with a central composite design model" ***Food and Bioproducts Processing***, 88: 239-246 (2010).

Özkal, S. G., "Supercritical carbon dioxide extraction of apricot kernel oil", Doktora Tezi, ***Middle East Technical University Department of Food Engineering***, Ankara, 1-21 (2004).

Öztürk, P., "Chemometric evaluation and optimization of blood alcohol determination by using gas chromatography", Doktora Tezi, ***Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, İzmir, 35-45 (2007).

Pancost, R. D., Baas, M., van Geel, B. and Damste, J. S. S., "Biomarkers as proxies for plant inputs to peats: an example from a sub-boreal ombrotrophic bog", ***Organic Geochemistry***, 33: 675-690 (2002).

Patel, P. M., "Supercritical fluid extraction of rice bran with adsorption on rice hull ash", Doktora Tezi, ***Louisiana State University Agricultural and Mechanical College,*** Louisiana, US, 29-55 (2005).

Pimentel, F. A., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Queiroz, F., Barbosa, L. C. A., Morais, A. R., Nelson, D. L., Andrade, M. A., Zacaroni, L. M. and Pimentel, S. M. N. P., "Extracts from lthe leaves of *Piper piscatorum* (Trel. Yunc.) obtained by supercritical extraction of with CO_2, employing ethanol and methanol as co-solvents", ***Industrial Crops and Products***, 43: 490-495 (2013).

Quitain, A. T., Oro, K., Katoh, S. and Moriyoshi, T., "Recovery of oil components of okara by ethanol-modified supercritical carbon dioxide extraction", ***Bioresource Technology***, 97: 1509-1514 (2006).

Rezayat, M. and Ghaziaskar, H. S., "Continuous extraction of glycerol acetates from their mixture using supercritical carbon dioxide", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 55: 937-943 (2011).

Sovova, H., Sajfrtova, M., Bartlova, M. and Opletal, L., "Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 30: 213-224 (2004).

Sun, Y. X., Liu, J. C. and Kennedy, J. F., "Extraction optimization of antioxidant polysaccharides from the fruiting bodies of Chroogomphis rutilus (Schaeff.:Fr.) O.K. Miller by Box-Behnken statistical design", ***Carbohydrate Polymers***, 82: 209-214 (2010).

Taavitsainen, V. M. T., "Experimental Optimization and Response Surfaces", Chemometrics in Practical Applications, Ed: Varmuza, K., ***InTech***, Croatia, 91-139 (2012).

Taylor, L., "Supercritical fluid chromatography and extraction", Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Ed: Settle, F. A., ***Prentice Hall***, USA, 183-194 (1997).

Temelli, F., "Application of supercritical fluid extraction in food processing", Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Ed: Pawlysizn, J., ***Elsevier***, Netherlands, 415-434 (2012).

Wang, H., Liu, Y., Wei, S. and Yan, Z., "Application of response surface methodology to optimise supercritical carbon dioxide extraction of essential oil from *Cyperys rotundus* Linn.", ***Food Chemistry***, 132:582-587 (2012).

Wang, L., Yang, B., Du, X. and Yi, C., "Optimisation of supercritical fluid extraction of flavonoids from *Pueraria lobata*", ***Analytical Methods***, 108: 737-741 (2008).

Wang, T.; "Supercritical fluid extraction of minerals in martian soils", Doktora Tezi, ***Graduate School of Vanderbilt University Chemical Engineering***, Tennessee, 9-22 (2005).

Webster, P. G., "Design of experiments in the Möbius modeling framework", Yüksek Lisans Tezi, ***University of Illinois Department of Electrical Engineering***, Illinois, 9-54 (2002).

Yi, C., Shi, J., Xue, S. J., Jiang, Y. and Li, D., "Effects of supercritical fluid extraction parameters on lycopene yield and antioxidant activity", ***Food Chemistry***, 113: 1088-1094 (2009).

Zhao, J., "The extraction of high value chemicals from heather (*Calluna vulgaris*) and bracken (*Pteridium aquilinum*)", Doktora Tezi, ***The University of York***, York, UK, 11-68 (2011).

Zhao, S. and Zhang, D., "A parametric study of supercritical carbon dioxide extraction of oil from oleifera seeds using a response surface methodology", ***Separation and Purification Technology***, 113: 9-17 (2013).

ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Kuddusi AKALIN 1984'de Adana'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini aynı şehirde tamamladı; Ç.E.A.Ş. Seyhan Anadolu Lisesi'nden mezun olduktan sonra, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne girdi. 2009 yılında mezun olduktan sonra Karabük Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak göreve başladı. Karabük Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda başlamış olduğu yüksek lisans programını 2011 yılında tamamladı. Halen Karabük Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

ADRES BİLGİLERİ

Adres: Karabük Üniversitesi
Fen Fakültesi
Kimya Bölümü
KARABÜK

Tel: (0370) 433 8374

E-posta: mehmetakalin@karabuk.edu.tr

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Akalın, M. K., Karagöz, S., Akyüz, M., "Supercritical extraction of bio-oils from German beech wood: Design of experiments", ***Industrial Crops and Products***, 49: 720-729 (2013).

Akalın, M. K., Karagöz, S., Akyüz, M., "Application of response surface methodology to extract yields from stinging nettle under supercritical ethanol conditions", ***The Journal of Supercritical Fluids***, 84: 164-172 (2013).