

**Zeytin Karasuyunun Fenolik Maddelerinin
Ardışık Homojenizasyon-Ekstraksiyon Prosesleri ile
Zenginleştirilmesi ve Biyoarıtılabilirliğinin Kolaylaştırılması
için Entegre Bir Proses Geliştirilmesi**

Proje No: 111M441

Prof.Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ
Alper KARAKAYA

OCAK 2013
ANKARA

ÖNSÖZ

Tamamlanan proje, 109M290 nolu ve “Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi” konulu proje ile başlatılan zeytin karasuyunun arıtımı ve değerlendirilmesi çalışmalarının devamı olarak, benzer bir endüstri atığının da birlikte değerlendirilebileceği düşüncesi ile ele alınmıştır. Zeytin ve üzüm işleme endüstrileri atıkları fenolik bileşenlerce zengindir ve bu atıkların sadece arıtılmasına değil, çeşitli biyoaktivitelere sahip fenoliklerinin geri kazanılıp değerlendirilmesine yönelik çalışmalar da özellikle son yıllarda hız kazanmıştır. Zeytinyağı üretim prosesinin sıvı atığı olan zeytin karasuyu ve üzüm işleme proseslerinin katı atığı olan cibre, antioksidan özellikleri kanıtlanmış fenolik maddelerce zengin olmaları nedeniyle değerlidirler. Bu proje kapsamında, zeytin karasuyu ile cibrenin muamele edilerek karasudaki fenolik maddelerin cibreye geçmesi, antioksidan özellikteki zeytin karasuyu fenoliklerinin cibrede bulunan fenolikler ile birlikte toplu geri kazanımı ve fenolik madde derişimi azaltılmış olan zeytin karasuyunun biyoarıtımı entegre proses içinde gerçekleştirilmiştir. Prosesin ileri çalışmalarda ölçek büyütme ile gerçek sistemlere uygulanabilmesi teknolojik açıdan başarılı bir örnek olacaktır.

Projeyi maddi olarak destekleyerek gerçekleşmesini sağlayan ve pozitif yaklaşımları ile işlemleri hızlı bir şekilde sonuçlandıran TÜBİTAK Mühendislik Araştırma Destek Grubu'na; zeytin karasuyunun sağlanmasında ve biyoarıtımda kullanılmasında katkıda bulunan Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş'nin Yönetim Kurulu Başkanı Prof.Dr.Yahya Laleli'ye; üzüm cibresinin sağlanmasında yardımcı olan Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr.Ertan Anlı'ya; deneysel tasarım yöntemine katkıda bulunan Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof.Dr.Adnan Kenar'a; araştırmalar için alt-yapıyı sağlayan Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne; projeyi izleyen proje danışmanına ve projenin mali işlemlerini yürüten Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederiz.

Prof.Dr. Zekiye Serpil TAKAÇ

Proje Yürütücüsü

Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLOLAR DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Zeytin Karasuyu	2
2.2 Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi ve Antioksidan Özelliği.....	3
2.3 Zeytin Karasuyundan Fenollerin Çözücü Ekstraksiyonu ile Geri Kazanımı.....	6
2.4 Üzüm Cibresi.....	7
2.5 Üzüm Cibresinin Fenolik Bileşimi ve Antioksidan Özellikleri.....	8
2.6 Üzüm Cibresinden Fenoliklerin Çözücü Ekstraksiyonu ile Geri Kazanımı.....	9
2.7 Zeytin Karasuyunun <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Biyoarıtımı.....	10
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1 Kimyasallar ve Cihazlar	11
3.2 Zeytin Karasuyu ile Üzüm Cibresinin Muamelesi.....	11
3.3 Zeytin Karasuyu ile Muamele Edilmiş Cibreden Fenollerin Geri Kazanımı.....	12
3.4 Mikroorganizma Saklama ve Çoğaltma.....	12
3.5 Biyoarıtım	13
3.6 Analizler.....	13
3.6.1 pH ölçümü.....	13
3.6.2 Toplam fenol derişimi	13
3.6.3 Renk giderimi	14
3.6.4 Hücre derişimi	14
3.6.5 HPLC analizleri.....	14
3.6.6 Toplam antioksidan aktivite tayini.....	16
3.7 Deney Tasarım, Veri Analizi ve Optimizasyon.....	16
4. BULGULAR	17
4.1 Zeytin Karasuyundaki Fenolik Bileşenlerin Cibreye Geçmesi için Optimum Muamele Koşullarının Belirlenmesi	17

4.1.1 Faktöriyel Tasarım I: Zeytin karasuyu/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının etkileri	17
4.1.1.1 İncelenen parametrelerin toplam fenol giderimine etki dereceleri.....	19
4.1.1.2 İncelenen parametrelerin renk giderimine etki dereceleri	22
4.1.2 Faktöriyel Tasarım II: Cibrenin parçalanma süresi, parçalanma sonrasında karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının etkileri	25
4.1.2.1 İncelenen parametrelerin toplam fenol giderimine etki dereceleri.....	26
4.1.2.2 İncelenen parametrelerin renk giderimine etki dereceleri.....	29
4.1.3 Merkezi Kompozit Tasarım I: ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi etkileri.....	32
4.1.3.1 Toplam fenol giderimi için veri analizi.....	34
4.1.3.2 Renk giderimi için veri analizi.....	36
4.1.3.3 ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi için optimizasyon.....	38
4.1.4 Merkezi Kompozit Tasarımı II: Çalkalama süresi etkisi.....	39
4.1.4.1 Toplam fenol giderimi için veri analizi.....	40
4.1.4.2 Renk giderimi için veri analizi.....	42
4.1.4.3 Çalkalama süresi için optimizasyon.....	43
4.1.4.4 Optimum çalkalama süresinde gerçekleştirilen deneyler	44
4.1.5 Optimum koşullarda cibre ile muamele edilmiş zeytin karasuyunun fenolik bileşen dağılımındaki değişim	45
4.2 Zeytin Karasuyu ile Muamele Edilmiş Cibreden Çözücü Ekstraksiyonu ile Fenollerin Geri Kazanımında Optimum Koşulların Belirlenmesi	46
4.2.1 n-Hekzan ile yağ giderimi etkisi.....	46
4.2.2 Çözücü türü etkisi.....	47
4.2.3 Çözücü ekstraksiyonu koşullarının optimize edilmesi.....	53
4.2.3.1 Geri kazanılan toplam fenol miktarı için veri analizi.....	55
4.2.3.2 Çözücü/cibre oranı ve sıcaklık için optimizasyon.....	56
4.2.3.3 Optimum çözücü/cibre ve sıcaklıkta gerçekleştirilen deneyler	57
4.3 Optimum Koşullarda Cibre ile Muamele Edilmiş Zeytin Karasuyunun <i>R. glutinis</i> ile Biyoarıtımı.....	58
5. TARTIŞMA/SONUÇ.....	60

KAYNAKLAR	63
EKLER.....	69
EK1 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu ve Analizlerin Doğruluğu.....	70
EK 2 Zeytin karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşiklerin HPLC Kromatogramları ve Tirozol İçin Kalibrasyon Doğrusu.....	72
EK 3 Bazı Fenolik Maddelere ait HPLC Kromatogramları	75
EK4 Çözücü Ekstraksiyonu Sonucu ZK ile Muamele Edilmiş Cibreden Geri Kazanılan Fenollerin ZK Fenolleri ile Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramları	79
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU.....	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım I).....	20
Şekil 4.2 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine ana ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım I).....	21
Şekil 4.3 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım I).....	23
Şekil 4.4 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım I).....	24
Şekil 4.5 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım II).....	27
Şekil 4.6 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım II).....	28
Şekil 4.7 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım II).....	30
Şekil 4.8 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım II).....	31
Şekil 4.9 Toplam fenol gideriminin ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi ile değişimi (Merkezi Kompozit Tasarımı I)	36
Şekil 4.10 Renk giderimine ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi etkisi (Merkezi Kompozit Tasarımı I)	38
Şekil 4.11 Çalkalama süresi ile toplam fenol gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (Merkezi Kompozit Tasarımı II)	41
Şekil 4.12 Çalkalama süresi ile renk gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (Merkezi Kompozit Tasarımı II)	43
Şekil 4.13 Cibre ile muameleden önce ve sonra zeytin karasuyunun HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması	46

Şekil 4.14 ZK muamele edilmiş cibrenin n-hekzan ile yıkanmasının etil alkol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılan ekstraksiyonda toplam fenol geri kazanımına etkisi (çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm).....	47
Şekil 4.15 Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden fenolik maddelerin geri kazanımı için yapılan çözücü ekstraksiyonunda çözücü türünün etkisi (çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm)	48
Şekil 4.16 “ZK ile muamele edilmiş” ve “ZK ile muamele edilmemiş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarlarının karşılaştırılması (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a); T=30 °C, N=150 rpm).....	49
Şekil 4.17 Çözücü ekstraksiyonu ile “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenolik madde çeşitliliğinin çözücü türü ile değişimini gösteren karşılaştırmalı HPLC kromatogramları a) t=0-80 dk, b) t=0-30 dk.....	50
Şekil 4.18 “ZK ile muamele edilmiş cibre”den ve “ZK ile muamele edilmemiş cibre”den etil alkol:su (1.1) çözücüsü ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları	51
Şekil 4.19 Zeytin karasuyunun ve etil alkol:su (1:1) ile ekstrakte edilmiş cibrenin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları.....	51
Şekil 4.20 Geri kazanılan toplam fenol miktarına çözücü/cire oranı ile sıcaklık etkisi (Merkezi Kompozit Tasarımı III).....	56
Şekil 4.21 <i>R. glutinis</i> ile “Cibre ile muamele edilmiş ZK” ve “cibre ile muamele edilmemiş ZK” nın biyoarıtımında toplam fenol derişimi ve ortam pH'ının zamanla değişimi (T=30 °C, N= 150 rpm, muamele edilmiş ZK: TF ₀ = 93.2 mg/L, üre: 2.27 g/L, muamele edilmemiş ZK: TF ₀ = 131.3 mg/L, üre: 2.27 g/L).....	59
Şekil 4.22 <i>R. glutinis</i> ile “Cibre ile muamele edilmiş ZK” ve “cibre ile muamele edilmemiş ZK” nın biyoarıtımında kuru hücre derişiminin zamanla değişimi (T=30 °C, N= 150 rpm, muamele edilmiş ZK: TF ₀ = 93.2 mg/L, üre: 2.27 g/L, muamele edilmemiş ZK: TF ₀ = 131.3 mg/L, üre: 2.27 g/L)	59
Şekil EK 1.1 Toplam fenol derişimi hesabında kullanılan kalibrasyon doğrusu	70
Şekil EK 2.1 Zeytin karasuyu ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı	72
Şekil EK 2.2 Tirozolün HPLC kromatogramı	73
Şekil EK 2.3 Oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) HPLC kromatogramı	73
Şekil EK 2.4 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış tirozole (ve hidroksitirozole) ait kalibrasyon grafiği	74
Şekil EK 3.1 Epigallokateşine ait HPLC kromatogramı	75
Şekil EK 3.2 Epigallokateşin gallata ait HPLC kromatogramı	75
Şekil EK 3.3 Epikateşine ait HPLC kromatogramı	76

Şekil EK 3.4	2,5 dihidroksibenzoik asite ait HPLC kromatogramı	76
Şekil EK 3.5	3,4 dihidroksifenilasetik asite ait HPLC kromatogramı.....	77
Şekil EK 3.6	3-hidroksi 4-metoksi fenol asetik asit.....	77
Şekil EK 3.7	4 hidroksifenilasetik asite ait HPLC kromatogramı	78
Şekil EK 4.1	Etil alkol:su (1.1) kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	79
Şekil EK 4.2	Metanol kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	79
Şekil EK 4.3	Su kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	80
Şekil EK 4.4	Etil alkol kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	80
Şekil EK 4.5	Aseton kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	81
Şekil EK 4.6	Etil asetat kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı.....	82

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1 Zeytin karasuyunda bulunan ana biyofenoller	4
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar	11
Tablo 3.2 a HPLC analiz koşulları.....	15
b HPLC analizinde uygulanan gradyen program.....	15
Tablo 4.1 “Faktöriyel Tasarım I”de incelenen faktörler ve seviyeleri.....	18
Tablo 4.2 “Faktöriyel Tasarım I” deney matrisi ve elde edilen cevaplar.....	18
Tablo 4.3 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin, TF giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım I).....	19
Tablo 4.4 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım I).....	21
Tablo 4.5 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım I).....	22
Tablo 4.6 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım I).....	25
Tablo 4.7 “Faktöriyel Tasarım II”de incelenen faktörler ve seviyeleri.....	26
Tablo 4.8 “Faktöriyel Tasarım II” deney matrisi ve elde edilen cevaplar.....	26
Tablo 4.9 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım II).....	27
Tablo 4.10 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım II).....	29
Tablo 4.11 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım II).....	30
Tablo 4.12 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım II).....	32
Tablo 4.13 “Merkezi Kompozit Tasarımı I”de incelenen faktörler ve seviyeleri	33
Tablo 4.14 “Merkezi Kompozit Tasarımı I” deney matrisi ve elde edilen cevaplar.....	33

Tablo 4.15 Toplam fenol giderimi için olası modellerin <i>lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I).....	34
Tablo 4.16 Toplam fenol gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I).....	35
Tablo 4.17 Renk giderimi için olası modellerin <i>lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I).....	36
Tablo 4.18 Renk gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I).....	37
Tablo 4.19 “Merkezi Kompozit Tasarımı-II”de incelenen faktör seviyeleri.....	39
Tablo 4.20 “Merkezi Kompozit Tasarımı II” deney tasarımı ve elde edilen cevaplar.....	39
Tablo 4.21 Toplam fenol giderimi için olası modellerin <i>lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II).....	40
Tablo 4.22 Toplam fenol gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II).....	41
Tablo 4.23 Renk giderimi için olası modellerin <i>lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II).....	42
Tablo 4.24 Renk gideriminde cevap yüzey kübik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II).....	42
Tablo 4.25 Optimizasyon tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II).....	44
Tablo 4.26 Model optimum değerlerinde gerçekleştirilen deneyler ve sonuçların model ile uyumu.....	45
Tablo 4.27 Farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyonların t= 24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri	52
Tablo 4.28 ZK ile muamele edilmiş cibre ve ZK ile muamele edilmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların t=24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri	53
Tablo 4.29 “Merkezi Kompozit Tasarımı III” de incelenen faktörler ve seviyeleri.....	54
Tablo 4.30 “Merkezi Kompozit Tasarımı III”de deney matrisi ve elde edilen cevaplar.	54
Tablo 4.31 Geri kazanılan toplam fenol miktarı için olası modellerin <i>lack of fit</i> testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III).....	55
Tablo 4.32 Geri kazanılan toplam fenol miktarına cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III).....	55
Tablo 4.33 Optimizasyon tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III)	57
Tablo EK-1.1 Toplam fenol derişim analizinde tekrar verileri.....	71
Tablo EK 1.2 TF derişimi verileri için t testi sonuçları.....	71

SİMGELER DİZİNİ

IC ₅₀	% 50 İnhibisyon için gerekli miktar
log P	Çözücünün 1-oktanol ve sudaki dağılıma katsayısının logaritması
N	Karıştırma hızı (rpm)
T	Sıcaklık (°C)
t	Zaman (dk, st)

Kısaltmalar

BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
HPLC	Yüksek basınç (performans) sıvı kromatografisi
% inh.	% İnhibisyon
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
OMW	Olive mill wastewater
TA	Toplam antioksidan
TF	Toplam fenol
TFo	Başlangıç toplam fenol derişimi
ZK	Zeytin karasuyu

ÖZET

Bu proje, zeytinyağı endüstrisi sıvı atığı zeytin karasuyunun (ZK) üzüm cibresi ile muamele edilerek cibrenin fenolik maddelerce zenginleştirilmesi ve böylece her iki atıktan değerli kimyasallar eldesinin ve zeytin karasuyu biyoarıtımının entegre bir proses içinde sağlanması amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, laboratuvar ölçeğinde kesikli sistemlerde çalışılmış ve çeşitli parametrelerin etkisi deneysel tasarım yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Projenin ilk bölümünde, zeytin karasuyu üzüm cibresi ile farklı koşullarda muamele edilerek karasudaki fenolik bileşenlerin cibreye geçişi için optimum koşullar araştırılmıştır. Cibrenin parçalanma süresi=240 s, ZK/cibre oranı=3 mL/g, cibre ile zeytin karasuyunun birlikte çalkalanma süresi=323 dk ve çalkalama sıcaklığı (N=150 rpm)=30 °C olarak belirlenen optimum koşullarda zeytin karasuyunda %64 TF giderimi ve % 72 renk giderimi elde edilmiştir. Zeytin karasuyundan cibreye geçen ve cibrede bulunan fenolik maddelerin birlikte çözücü ekstraksiyonu ile geri kazanılması için optimum koşullar ise en iyi çözücü olan etil alkol:su (1:1) ile çözücü/cibre oranı=30 mL/g, sıcaklık=43 °C, ekstraksiyon süresi=5 st olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda 11.97 mg/g toplam fenol geri kazanılmış ve ekstraktın toplam antioksidan aktivitesi %81 (inh.) olarak bulunmuştur. Cibre ile muamele edilmiş zeytin karasuyu %25 oranında seyreltilerek *Rhodotorula glutinis* mayası ile biyoarıtımda kullanılmış (T=30 °C, N=150 rpm, 2.27 g/L üre derişimi) ve 120 st sonunda %55 toplam fenol giderimi elde edilmiştir.

ABSTRACT

The objective of the project is to enrich the phenolic compounds in grape marc (GM), which is the waste of grape processing, by its treatment with olive mill wastewater (OMW), which is the liquid waste of olive processing, to produce fine chemicals from the wastes; and also to biodegrade OMW in an integrated process. Batch experiments were conducted in laboratory scale and experimental design methods were used to investigate the process parameters. In the first part of the study, the optimum conditions for the treatment of OMW with GM to provide the removal of phenolic compounds with a high degree were investigated. Under the conditions of crashing time of GM=240 s, OMW/GM ratio=3 mL/g, treatment of OMW with GM in a shaker (N=150 rpm)=323 min and temperature of treatment=30°C, 64% total phenol removal and 72% of colour removal from OMW were obtained. The conditions for the solvent extraction of phenolic compounds from treated GM, which was enriched by phenolics by the transfer of OMW phenolics, were also optimized. Under the conditions of solvent/treated GM ratio=30 mL/g, temperature=43 °C and extraction time=5 h, the extraction with ethyl alcohol:water (1.1) resulted in the recovery of 11.97 mg/g phenolics. The total antioxidant activity of the recovered phenolics was found to be 81% (inh.). The treated OMW was subjected to biodegradation by *Rhodotorula glutinis* yeast under the conditions of 30 °C, 150 rpm, and 2.27 g/L urea and 55% total phenol removal was obtained after 120 h of operation.

1. GİRİŞ

Projede, zeytinyağı endüstrisi sıvı atığı zeytin karasuyunun (ZK) benzer kimyasal özelliklere sahip olan üzüm endüstrisi atığı cibre ile birlikte entegre bir proses içinde kullanılarak, karasuyun fenolik yükünün azaltılması ve cibrede bulunanlar ile birlikte miktarı ve çeşitliliği artmış olan fenollerin geri kazanılarak antioksidan olarak kullanımının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde yenilenebilir biyokütleler olarak ele alınan iki endüstriyel atığın arıtım ve değerlendirilme süreçlerinin bir arada gerçekleştirilmesi planlanmıştır. Projenin hedefi, zeytin karasuyu ve cibrede bulunan fenolik maddelerin birarada toplanarak yüksek toplam antioksidan aktiviteli bir karışım eldesi ve zeytin karasuyundaki toplam fenol derişiminin düşürülerek biyoarıtım başarısının artırılması olarak ortaya konulmuştur.

Proje, üç alt bölümden oluşacak şekilde yapılandırılmıştır. İlk bölümde, zeytin karasuyu ile üzüm cibresinin karasuyun toplam fenol derişimini ve rengini en yüksek değerlerde giderecek muamele koşulları optimize edilmiştir. İkinci bölümde, en uygun koşullarda ZK ile muamele edilmiş cibrede fenolik maddeleri en yüksek miktarda geri kazanacak çözücü ekstraksiyonun koşulları optimize edilerek geri kazanılan fenollerin bileşimi ve toplam antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. İlk iki bölümde, deney planlamada kullanılan istatistiksel yöntemlerinden yararlanılmış ve az sayıda deney ile doğru sonuçlara ulaşılmasını sağlayan deney tasarımları yapılmıştır. Projenin üçüncü bölümünde ise cibre ile en uygun koşullarda muamele edilerek toplam fenol miktarı azaltılmış olan zeytin karasuyunun *R. glutinis* ile biyoarıtımı gerçekleştirilerek cibre muamele edilmemiş karasuya göre olan üstünlüğü araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Zeytin Karasuyu

Dünyada “Akdeniz diyeti”ne olan ilgi nedeniyle zeytinyağı tüketiminin artışıyla birlikte son yıllarda zeytinyağı sektörü daha fazla önem kazanmıştır. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (IOC) 2004/2005 ile 2009/2010 yılları arasında dünyadaki zeytinyağı üretiminin ortalama 2 793 200 ton/yıl olduğu bildirilmiştir ([http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang., 2011](http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang.,2011)). En fazla zeytinyağı üretimi, toplam üretimin %75.3 ile Avrupa Birliği ülkelerindedir. Ülke sıralaması İspanya (%52.2), İtalya (%27.9) ve Yunanistan (%17.3) şeklindedir (http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang.,2011, [http://www.internationaloliveoil.org/production2_ang., 2011](http://www.internationaloliveoil.org/production2_ang.,2011)). Türkiye de %4.6 oranı ile zeytinyağı üretiminde önemli ülkeler arasında yerini almıştır ([http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang., 2011](http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang.,2011)).

Zeytinyağı üretiminde kullanılan proseslerden üç fazlı sistemde fazla miktarda atık su çıkması, iki fazlı sisteme geçiş ile önlenmiş olsa da dünyada sadece İspanya'nın ağırlıklı olarak iki fazlı sisteme geçmesi Türkiye dahil diğer ülkelerde zeytinyağı fabrikalarının atık suyunun arıtılmasını önemli kılmaktadır. Üç fazlı sistem ile zeytinyağı üretiminde %20 zeytinyağı, %30 yarı-katı atık ve %50 sıvı atık (zeytin karasuyu, vejetasyon suyu) oluşmaktadır (PARASKEVA et al., 2006). Dünya'da zeytinyağı üretimi sonucu yıllık açığa çıkan karasu miktarı değişkenlik göstermekle beraber, Akdeniz ülkeleri için yaklaşık 30 milyon ton olarak verilmiştir (RAMOS-CORMENZANA et al., 1996). Koyu kırmızı renkli, organik madde ve mineral madde bakımından zengin ve asidik özellikte olan zeytin karasuyu yüksek biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ= 35-110 g/L) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ= 40-220 g/L) değerlerine sahiptir (BORJA et al., 2006, NIAOUNAKIS and HALVADAKIS, 2006). Zeytin karasuyunun organik fraksiyonu başlıca şekerler, polifenoller, tanenler, polialkoller, pektinler ve lipidler içerir (McNAMARA et al., 2008). Karasuda 30'dan fazla sayıda fenolik bileşen tanımlanmıştır ve bunların yapıları ve miktarları işletmenin bulunduğu bölgenin toprak ve iklim özellikleri ile kullanılan prosese göre önemli ölçüde değişmesine karşın toplam polifenol miktarı 0.5–24 g/L arasındadır. Toplam organik bileşen miktarı 25-45 g/L'dır ve kuru ağırlığın %60'ı kadar da şeker içermektedir (NIAOUNAKIS and HALVADAKIS, 2006).

Zeytinyağı fabrikalarının bertarafı önemli bir sorun oluşturan sıvı atığının fenolik bileşenlerinin antioksidan özelliklerinin olması, bu atığın bir yan ürün olarak ele alınıp, katma değeri yüksek antioksidanların geri kazanımı veya bu maddelerden yeni moleküllerin üretimleri için proses

geliştirilmesini de önemli yapmaktadır. Değerli kimyasal antioksidanların zeytin karasuyundaki derişimlerinin artırılması, bunlardan yeni moleküllerin üretilmesi ve geri kazanımları arıtım prosesi içine entegre edilebildiği ölçüde, çevre dostu üretim proseslerine de katkı yapılmış olacaktır.

Zeytin karasuyuna toksik özellik kazandıran biyofenoller aynı zamanda yüksek antioksidan özelliğe sahip bileşiklerdir. Zeytin karasuyunun içerdiği fenolik bileşenlerden en yüksek antioksidan aktivite değeri taşıyanı hidroksitirozoldür ve yüksek bir ekonomik değere sahiptir. Ancak fenolik maddelerin karasu ortamından ayrılarak saflaştırılması yüksek maliyetli işlemler gerektirdiğinden, saf preparatları piyasada yüksek fiyatlarla satılmaktadır. Zeytin karasuyunda bulunan antioksidan maddelerin geri kazanımı için çeşitli yöntemler mevcuttur. Patent literatüründe de çözücü ekstraksiyonu, membran ayırma sistemleri, kromatografik teknikler ve integral işlemler kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur (TAKAÇ and KARAKAYA, 2009).

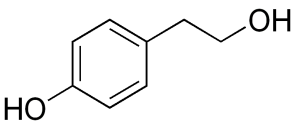
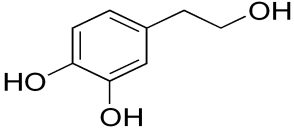
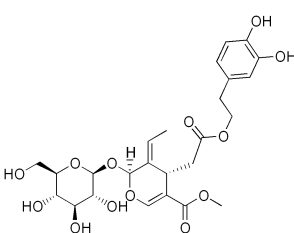
2.2 Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi ve Antioksidan Özelliği

Zeytin karasuyunda bulunan biyofenollerin oluşumu, meyvenin çeşidi ve olgunluğuna, iklim koşullarına, depolama süresine ve proses tekniğine bağlı olarak değişir (OBIED et al., 2005). Zeytinin hem etli kısmı hem de çekirdeği fenolik bileşikler açısından zengindir. Bu fenolik bileşikler, zeytinin işlenmesi sırasında serbest kalarak su ve yağ fazları arasında dağılır; bir kısmı ise zeytin kekinde tutulur. Serbest kalan fenolik bileşiklerin su ve yağ fazı arasındaki dağılımı, fenolik bileşenlerin iki fazdaki çözünürlüklerine bağlıdır. Zeytin fenollerini amfililik özellik gösterirler ve su fazında yağ fazından daha çok çözünürler. Zeytinyağında bulunan fenollerin derişimi 50-100 mg/g yağ aralığında değişir (NIAOUNAKIS and HALVADAKIS, 2006). Zeytinyağının fenolik fraksiyonu, zeytin meyvesinin toplam fenol içeriğinin yalnızca % 2'sini içerir, kalan % 98'lik kısım ise zeytin karasuyuna geçer. Zeytin karasuyunda bulunan fenoller, depolama süresince, yıkımı oldukça zor olan yüksek molekül ağırlıklı polimerlere polimerize olma eğilimindedirler (MORILLO et al., 2009).

Zeytinde bulunan biyofenoller basit veya karmaşık yapıda çok fonksiyonlu gruplar içerebilirler. Vanilik asit, kumarik asit, kafeik asit, tirozol ve hidroksitirozol gibi basit biyofenoller alken, alkol ve karboksilik gruplar içerir. Sekoiridoitler (oleuropein ve ligstrosit), glikozidik ve monoterenoid gruplar taşırlar. Naturel zeytinyağının fenolik bileşenleri BENDINI et al., (2007) tarafından şu şekilde gruplandırılmıştır: Benzoik asit türevleri (3-hidroksibenzoik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksibenzoik asit, gentisik asit, vanilik asit, gallik asit, şirincik asit); sinamik asit ve türevleri (*o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit, kafeik

asit, ferulik asit, sinapinik asit); fenil etil alkoller (tirozol (*p*-hidroksifenil etanol), hidroksitirozol (3,4-dihidroksifenil etanol); diğ er fenolik asitler ve türevleri (*p*-hidroksifenilasetik asit, 4-hidroksi-3-metoksifenilasetik asit, 3-(3,4-dihidroksifenil) propanoyik asit); sekoiridoitlerin dialdehid formu (dekarboksimetiloleuropein aglikon, dekarboksimetil ligstrosit aglikon); sekoiridoit aglikonlar (oleuropein aglikon, ligstrosit aglikon, oleuropein aglikonun aldehit formu, ligstrosit aglikonun aldehit formu); flavonoller ((+)-taksifolin); flavonler (apigenin, luteolin); lignanlar ((+)-pinoresinol, (+)-1-asetoksipinorsinol, (+)-1-hidroksipinoresinol); ve hidroksiizokromanlar (1-fenil-6,7-dihidroksiizokroman, 1-(3'-metoks-4'-hidroksi)fenil- 6,7-dihidroksiizokroman). Zeytin karasuyunda bulunan ana biyofenoller Ş ekil 1.1'de gösterilmiştir (TAKAÇ and KARAKAYA, 2009).

Tablo 2.1 Zeytin karasuyunda bulunan ana biyofenoller (TAKAÇ and KARAKAYA, 2009)

Biyofenol	Kimyasal Yapısı	Özellikleri
Tirozol		IUPAC ismi: 4-(2-hidroksietil)fenol Molekül ağırlığı: 138.164 g/mol CAS No.: 501-94-0
Hidroksitirozol		IUPAC ismi: 4-(2-hidroksietil)-1,2-benzendiol Molekül ağırlığı: 154.16 g/mol CAS No.: 10597-60-1
Oleuropein		IUPAC ismi: 4 <i>S</i> ,5 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-4-[2-[2-(3,4-dihidroksifenil)etoksi]-2-oksoetil]- 5-etiliden-6-[[[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)- 2-tetrahidropirani]oksi]-4 <i>H</i> -piran-3-karboksilik asit, metil ester Molekül ağırlığı: 540.514 g/mol CAS No.: 32619-42-4

Zeytin karasuyunda bulunan biyofenollerin antioksidan, serbest radikal tutucu, antimikrobiyal ve antikarsinojenik özellikleri çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuş ve OBIED et al., (2005) tarafından özetlenmiştir. Zeytin karasuyuna antioksidan özelliğini özellikle *orto*-difenolik bileşenler kazandırmaktadır. Bunlar arasında hidroksitirozol ve oleuropein zeytin karasuyundan geri kazanımları için üzerinde çok çalışılan bileşiklerdir. Bunların yanısıra, sonradan tanımlanan hidroksitirozil açıldihidroelenolat ve *p*-kumarol-6'-sekologanozid isimli fenolik maddelerin yüksek antioksidan özelliğe sahip oldukları da bildirilmiştir (OBIED et al., 2007b).

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek -karbonhidrat, DNA, protein ve lipidler gibi substratların oksitlenmelerini önlemek veya geciktirme suretiyle- hücrelere zarar vermelerini engelleyen moleküllerdir. Antioksidanlar, metabolizma için ve günlük hayatı kolaylaştırmada büyük bir öneme sahiptir. Canlılar için savunma sistemi olarak görev yaptıkları gibi, endüstriyel alanda özellikle gıda sektörü ve plastik sektöründe katkı maddesi olarak kullanılırlar.

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler arasında hidrokstitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), antioksidan özelliği nedeni ile dikkat çekici bir bileşiktir (BENDINI et al., 2007). Hidrokstitirozol, doğal besin antioksidanı olarak ve fonksiyonel gıdaların, farmasötik çözeltilerin ve kozmetiklerin hazırlanmasında kullanılır (FERNANDEZ-BOLANOS et al., 2006); aynı zamanda antimikrobiyal ve antikarsinojenik etkisi de vardır (BOUALLAGUI and SAYADI, 2006). *In vitro'da* yapılan çalışmalar sonucunda, hidrokstitirozolün düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri bağladığı, trombositlerin bir araya gelmesini inhibe ettiği, insan nötrofilleri için lökotrien ürettiği ve hücre korumasını sağladığı görülmüştür. Hidrokstitirozolün ayrıca, *-in vitro'da-* gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel ajan olduğu ispatlanmıştır (ALLOUCHE et al., 2004). Hidrokstitirozol son zamanlara kadar ticari olarak bulunmazken, son zamanlarda araştırmalarda kullanılmak üzere ticari olarak (1000-2000 \$/g) sağlanabilmekte ve antioksidan olarak farklı markalarda piyasada bulunmaktadır (OBIED et al., 2005).

Hidrokstitirozol üretimi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; kimyasal sentez, oleuropeinin hidrolizi, saflaştırılmış tirozinazın kullanımı ile enzimatik sentez, zeytin karasuyundan saflaştırma ve iki fazlı zeytinyağı üretim prosesinin sıvı-katı atığının hidrotermal işlemidir (ALLOUCHE et al., 2004). Bunlara karşın, zeytin karasuyundan hidrokstitirozol geri kazanımı için çözücü ekstraksiyonu başta olmak üzere membran ayırma sistemleri, kromatografik teknikler gibi ayırma işlemleri de çalışılmaktadır (HE et al., 2012).

Zeytin karasuyu, biyoaktif bir polifenol olan oleuropein açısından da oldukça zengindir. Oleuropein, üç yapısal alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler; bir polifenol olan hidrokstitirozol, bir sekoiridoid olan elenolik asit ve glukozdur. Hidrokstitirozol zeytin ürünlerinde basit fenol olarak bulunabileceği gibi, elenolik asitle oleuropein oluşturmak üzere esterleşebilir ve aglikonu verbaskozid molekülünün parçası olabilir (KHOUFI et al., 2011). Hidrokstitirozolün zeytinyağının ekstraksiyonu sırasında esteraz aktivitesi ile oleuropeinin hidrolizi sonucu oluştuğu düşünülmektedir (OBIED et al., 2005).

FKI et al., (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin karasuyu ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki radikal tutma etkileri belirlenerek karşılaştırılmıştır. IC_{50} , DPPH derişimini %50 azaltmak (inhibe etmek) için gereken antioksidan miktarıdır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir. Buna göre; zeytin karasuyundan elde edilen *orto*-dihidroksillenmiş aromatik bileşenler, DPPH üzerinde yüksek tutma aktivitesi sergilemiştir. Bu bileşiklerden hidroksitirozole ait IC_{50} değeri 0.57 $\mu\text{g/mL}$, 3,4-dihidroksifenilasetik aside ait IC_{50} değeri ise 0.64 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur. Sadece tek hidroksil fonksiyonuna sahip olan tirozol ve *p*-hidroksifenilasetik asit ise daha düşük aktivite göstermişlerdir; IC_{50} değerleri sırasıyla 10.9 ve 12 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Zeytin karasuyunda bulunan ferulik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit için IC_{50} değerleri sırasıyla 1.21, 0.87 ve 9.50 $\mu\text{g/mL}$ olarak verilmiştir. OBIED et al., (2007a) iki ayrı zeytin karasuyu ekstraktının antioksidan aktivitesini DPPH yöntemi ile belirlemiş ve standart antioksidanlar ile karşılaştırmıştır. Buna göre standart olarak kafeik asit and Trolox'un IC_{50} değerleri sırasıyla 1.73 ± 0.07 ppm ve 4.2 ± 0.1 ppm iken ekstraktların IC_{50} değerleri 28.3 ± 1.7 ppm ve 34.7 ± 1.6 ppm olarak bulunmuştur. Son yıllarda zeytin karasuyunun fenolik bileşenleri ve antioksidan aktiviteleri üzerine çalışmalar hız kazanmıştır. HE et al., (2012) saflaştırdıkları ZK ekstraktının başlıca hidroksitirozol ve glikozid türevi olduğunu belirtmişler ve DPPH yöntemi ile ZK ekstraktına, zeytin yaprağına ve üzüm ekstraktına ait IC_{50} değerlerinin sırasıyla 8.2, 25.6 ve 18.4 $\mu\text{g/ml}$ olduğunu bulmuşlardır. EL-ABBASSI et al., (2012), kullandıkları zeytin karasularında toplam fenol bileşimini, flavonidleri, flavanoller ve proantosiyonidinleri belirlemişler ve ZK'da en fazla bulunan fenolik maddenin hidroksitirozol olduğunu (%55-79) belirtmişlerdir. Zeytin karasuyunun antioksidan aktivitesinin ise askorbik asite yakın olduğunu bildirmişlerdir. AZAIZEH et al., (2012) çalıştıkları beş farklı zeytin karasuyundaki ana bileşenlerin hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit, vanilik asit, verbaskozid, oleuropein, ferulik asit ve *p*-kumarik asit olduğunu; DPPH ile yaptıkları antioksidan testlerinde alkil aromatik alkol grubunun en yüksek antioksidan aktivitesini ($IC_{50}=20$ mg/L) ve saf hidroksitirozolün ise daha yüksek antioksidan aktivitesi ($IC_{50}=2$ mg/L) gösterdiğini belirtmişlerdir.

2.3 Zeytin Karasuyundan Fenollerin Çözücü Ekstraksiyonu ile Geri Kazanımı

Fenolik maddelerin zeytin karasuyundan ayrılmaları ve saflaştırılmaları üzerine pek çok sistem geliştirilmiştir. Bu sistemlere örnek genellikle etilasetat ile yapılan çözücü ekstraksiyonu, membran filtrasyonu, XAD reçinesine adsorpsiyon ve Sephadex LH-20 ile jel filtrasyon verilebilir. Çözücü ekstraksiyonu düşük ve orta molekül ağırlıklı bileşenler için seçicidir; ancak hidroksitirozol glikozid gibi yüksek polariteli bileşenler için ekstraksiyon

etkinliđi dūřtktdr (HE et al., 2012). De MARCO et al., (2007), asitlendirilmiř zeytin karasuyundan etil asetat ekstraksiyonu ile en fazla hidroksitirozol elde edildiđini, ayrıca ekstraktta tirozol, kafeik asit, vanilik asit, verbaskozit gibi diđer biyofenollerin de tanımlandıđını bildirmiřtir. Çalıřmada hidroksitirozolūn yūksək antioksidan aktivitesi elde edilmiřtir. Zeytin karasuyundaki fenollerin aseton, aseton-HCl-etilasetat, %20 metanol ve %80 metanol ve karıřımı ile ekstraksiyonunun incelendiđi bir çalıřmada ise en iyi ekstraksiyon verimi uzun sūreli antioksidan aktivitesi ile beraber %20 metanol ile elde edilmiř; ekstraktların antioksidan etkinliđi serbest hidroksitirozol ile orantılı olarak bulunmuřtur (De LEONARDIS et al., 2009). Aynı çalıřmada, zeytin karasuyu ekstraktının antioksidan aktivitesinin toplam fenol miktarına deđil, fenol içeriđine bađlı olduđu belirlenmiřtir. Bir diđer çalıřmada ise, zeytin karasuyunun etanol ile ekstraksiyonunda, 30-120 dk arasındaki ekstraksiyon sūresinin önemli olmadığı ve ekstraksiyondan önce karasuyun 50-60, 80 °C sıcaklıđa ısıtılmasının toplam fenol deriřimi ve antioksidan aktivitesini dūřdūđđ gōzlenmiřtir (GALANAKIS et al., 2010). Mevcut sistemlerle yūksək saflıkta antioksidan preparatları hazırlanabilmektedir. Ancak bu sistemlerin maliyetleri çok yūksək olduđundan bu ūrūnlerin saf preparatları da çok pahalıdır. İřletmeler bu ūrūnlerin maliyetlerini dūřdūrecek yeni ve ucuz sistemlerin geliřtirilmesi için çalıřmaktadırlar (TAKAÇ and KARAKAYA, 2009).

2.4 Ūzūm Cibresi

Ūzūmūn dūnyadaki yıllık ūretimi yaklařık 67 milyon tondur (<http://faostat.fao.org/>) Ūretimin % 80 kadar kısmı řarap yapımında kullanılmakta ve iřlenen ūzūmūn ađırlıkça %20'si atık olarak çıkmaktadır (LAFKA et al., 2007). Tūrkiye ise; yaklařık 500 000 hektar bađ alanı ile (<http://faostat.fao.org/>) İspanya, Fransa ve İtalya'dan sonra bađ alanı būyūklūđü açısından dūnyanın en būyūk 4. ūlkesidir. Ūlkemizde 2009 yılı istatistiklerine gōre 4.2 milyon ton ūzūm ūretilmektedir (<http://faostat.fao.org/>). Ūzūm endūstrisi atıkları ve/veya yan ūrūnleri ūlkemizde henūz bazı istisnai denemeler dıřında henūz deđerlendirilmemektedir.

Ūzūm iřleme endūstrisinin atık tūrleri, ūretilen ūrūn ve uygulanan prosese gōre deđiřmektedir. Őrnek olarak, řarap yapımında kullanılan ūzūm tūrūne, ūretilen řarap cinsine, aynı cins řarap için uygulanan prosese gōre farklı miktar ve ūzellikte katı ve sıvı atıklar oluřmaktadır. řarap yapımı sırasında yıllık 5-9 milyon ton gibi būyūk bir miktarda atık açıđa çıkmaktadır. Bu atıklar, řeker, tanen, polifenol, polialkol, pektin ve lipidler gibi organik bileřiklerin yūksək miktarları nedeniyle yarattıkları yūksək kirlilik yūkū sonucu yūksək KOİ ve BOİ deđerlerine sahiptirler ve atıldıkları sahalarda zararlı etkiler yaparlar (LAFKA et al., 2007). řarap ūretim prosesinin katı atıkları bařlıca ūzūm cibresi (kabuk, çekirdek ve sap

birlikte), maya tortusu ve filtrasyon atıkları olarak gruplandırılabilirken, sıvı atıklar üretimin her basamağında temizleme işleminden gelen sıvı atıklar ve filtrelerin, boruların temizlenmesi sonucu açığa çıkan sıvı-çamur atıklar olabilir. Üzüm cibresi, üzümün kuru ağırlık olarak yaklaşık %15'idir ve 150 g/kg'a kadar şeker, 9 kg/t fenoller/pigmentler, 5-75 kg/t tartarat ile %30-40 lif içerir. Üzüm çekirdeğinde ise %12-17 yağ (%78 linoleik asit) ve %4-6 fenol bulunmaktadır (NERANTZIS and TATARIDIS, 2006).

2.5 Üzüm Cibresinin Fenolik Bileşimi ve Antioksidan Özellikleri

Şarap endüstrisinin katı ve sıvı bütün atıkları ile ekstraktları çeşitli kullanımlara sahip, yararlı özellikte yan ürünler olarak değerlendirilebilir. Üzüm cibresi etanol, tartarat, malat, sitrik asit, çekirdek yağı, hidrokolloidler ve diyet lifler gibi değerli ürünlerin kaynağıdır. Ayrıca, üzüm cibresi şarap yapımı sırasındaki yetersiz ekstraksiyon nedeniyle yüksek fenol içeriğine sahiptir (ARVANITTOYANNIS et al., 2006). Son yıllarda, özellikle üzüm ve bileşenlerinde bulunan fenolik bileşenlerin antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikarsinojen etkileri belirlendikten sonra, tıp, gıda ve kozmetik alanlarında kullanılmak üzere geri kazanımları önem kazanmıştır. Üzümde bulunan fenolik bileşenler başlıca antosiyaninler, flavanoller, flavonoller, stilbenler (resveratrol) ve fenolik asitlerdir. Antosiyaninler üzüm kabuğunda bulunan pigmentler, flavanoidler çekirdek ve sapta bulunan kateşin, epikateşin ve prosiyanidin polimerlerdir. Antosiyaninler kırmızı üzümde bulunurken, flavan-3-oller beyaz çeşitlerde yer almaktadır. Özellikle resveratrol son dönemde Fransız Paradoksu olarak da bilinen adıyla literatüre geçmiştir (ANLI et al., 2008, XIA et al. 2010). FERNÁNDEZ-MAR et al., (2012) şarapta bulunan en önemli biyoaktif moleküllerin polifenol yapıdaki resveratrol ve hidroksitirozol ile bir indolamin olan melatonin olduğunu belirterek, bunlar arasında en fazla miktarda resveratrol bulunduğunu belirtmişler ve bu maddelerin antioksidan, antikanser, antimikrobiyal aktivitelerini özetlemişlerdir. LACHMAN et al., (2009), kırmızı üzüm, cibre, çekirdek, kabuk ve şarapta bulunan toplam fenol, toplam antosiyanin, prosiyanidin ve fenoliklerin antioksidan aktiviteleri üzerine etkisini tartışmışlardır. Başlıca üzüm kabuğunda bulunan resveratrolün kardiyovasküler hastalıkların riskini azalttığını belirtmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivitesi, LDL inhibisyonu ve polifenoller cibre ve üzümde bulunmuştur. Çalışmada ayrıca, cibre, kabuk ve çekirdekteki fenolik antioksidanlar ve resveratrol ile antioksidan aktiviteler arasında istatistik ilişkiler verilmiştir. VESKOUKIS et al., (2012) cibre ekstraktının antioksidan aktivitesinin *in vivo* ve *in vitro* etkilerini karşıladıkları çalışmada, etil alkol ile ekstrakte edilen fenollerin DPPH ile ölçülen antioksidan aktivitelerinin %90 (inh.)'na yaklaştığını görmüşlerdir. HOGAN et al., (2010), etil alkol:su (10:1) ile ekstraksiyondan sonra

DPPH ile baktıkları antioksidan aktivitesinin (%inh.) kırmızı üzüm cibresi için % 66.1 ± 0.6, beyaz üzüm cibresi için 67.4 ± 4.1 ve elma için 54.6 ± 13.2 olduğunu bildirmişlerdir.

2.6 Üzüm Cibresinden Fenoliklerin Çözücü Ekstraksiyonu ile Geri Kazanımı

Şarap üretimi atıklardan polifenollerin geri kazanımı halen laboratuvar ve pilot ölçek boyutta gerçekleşmektedir. Bu amaçla kullanılan mevcut teknolojiler ise membran ayırma işlemleri (nano ve ultrafiltrasyonlar), reçinelere adsorpsiyon ve ekstraksiyondur (ANOYMOUS, 2004). Literatürde, üzümdeki fenolik bileşenleri yüksek katma değerli yan ürünler olarak değerlendiren çoğu çalışmada hammadde olarak cibre gibi atıklardan daha çok üzüm, üzüm çekirdeği ve üzüm kabuğu kullanılmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda da organik çözücü ve süperkritik CO₂ ekstraksiyonu (FIORI et al., 2009, VATAI et al., 2009) uygulanmıştır. Üzüm cibresinde ise ezilme şekli, çözücü türü ve ekstraksiyon süresi, geri kazanılan polifenol verimine ve antioksidan aktivitesine etkisi en çok incelenen parametrelerdir. Örneğin, üzüm cibresi ve saplarındaki antioksidan fenolik bileşenlerin çözücü ekstraksiyonu ile geri kazanımında cibrenin oluşum yöntemi ile beraber, yağ uzaklaştırmanın, çözücü türünün, sıcaklığın ve maserasyon süresinin etkisini inceleyen çalışmalarda etanol ile ekstraksiyonun ve 60°C sıcaklığın fenol geri kazanımında yüksek verimi sağladığı belirlenmiştir (SPIGNO and De FAVERI 2007, SPIGNO et al., 2007). NEGRO et al., (2003) kırmızı üzüm cibresinden, kabuğundan ve çekirdeğinden etanol ile ekstrakte edilen fenolikleri gruplandırmış ve antioksidan aktivitelerini karşılaştırmışlardır. Cibrenin yüksek bir antioksidan aktivitesine sahip olduğu ve yüksek miktardaki proantosiyanidinler ile çekirdeğin katkısının en fazla olduğunu bulmuşlardır. Bir diğer çalışmada, kırmızı şarap yapımında kullanılan üzüm kabuğu ve çekirdeğindeki polifenollerin çözücü olarak sudaki farklı derişimlerinde metanol, etanol, aseton, isopropanol ve etilasetat kullanılarak, farklı ekstraksiyon süresi ve pH değerlerinde incelenen geri kazanımlarda toplam fenol miktarı ile antioksidan aktivitesi arasında bir korelasyon olmadığı bildirilmiştir. 1:1 etanol:su çözücüsü ile en yüksek fenolik kazanımının olduğu (%95.6), ancak en yüksek antioksidan aktivitesine (%93.3 inh.) etanol ekstraktı ile ulaşıldığı belirlenmiştir (LAFKA et al., 2007). SHOJAEE-ALIABADI et al., (2012) cibreden en yüksek miktarda polifenol ve antioksidan aktivitesi elde etmek üzere etil alkol:su ile yaptıkları çözücü ekstraksiyonunda, sıcaklık, süre ve etil alkol:su oranının etkisini deneysel tasarım uygulayarak incelemişler ve optimum değerleri 44.93 °C, 19.34 st ve 70:08 etil alkol:su oranı 70.08 olarak bulmuşlardır. Bu koşullarda ekstrakte edilen toplam fenol miktarı 388.79 mg/100 g ve antioksidan aktivitesi %91.01 (% inh.) olarak verilmiştir.

2.7 Zeytin Karasuyunun *Rhodotorula glutinis* ile Biyoarıtımı

Zeytinyağı fabrikası sıvı atığının arıtılarak, kullanıldığı/bertaraf edildiği toprak ve suya zarar vermeyecek özelliklere getirilebilmesi için uygulanan çeşitli prosesler arasında biyoprosesler çevre dostu, güvenli ve birçok durumda da uygun maliyetlidir. Zeytin karasuyunun biyolojik proseslerle arıtımına yönelik süreli ve patent literatüründe çok sayıda yayın yer almaktadır. Bu tür çalışmalarda, zeytin karasuyunun yapısında polifenoller, tanenler ve lignin bulunduğu için bu maddeleri parçalayabilen mikroorganizmalara odaklanılmıştır. Birçok bakteri ve fungus bu maddeleri kısmi olarak parçalayabilir.

Zeytin karasuyunun biyoarıtımında *Rhodotorula* türü mayaların kullanımı ile ilgili süreli yayın literatüründe yer alan iki çalışmadan bir araştırma grubumuza aittir (KARAKAYA et al., 2012). Çalışmada, biyoarıtımda parametre olarak ele alınan başlangıç toplam fenol derişimi, azot kaynağı tür ve derişimi, sıcaklık, başlangıç pH değeri ve karıştırma hızının fenol giderimi üzerine etkileri incelenmiş ve 30 °C, 150 rpm koşullarına üre varlığında yapılan biyoarıtımda %89 fenol giderimine ulaşılmıştır. Çalışmada ayrıca biyoarıtım süresince ortam pH değerinin arttığı ve bu şekilde zeytin karasuyunun asidik özelliğinin de giderildiği belirtilmiştir. JORBOI et al. (2012) ise *Rhodotorula mucilaginosa* ile yaptıkları çalışmalarında zeytin karasuyunun ve ayrıca altı fenolik bileşenin biyoarıtımını incelemişlerdir. Zeytin karasuyunda bulunan protokateşik asit, vanilik asit, *p*-kumarik asit ve tirozol bileşenlerini tamamen; gallik asit ve kateşölü sırasıyla %56 ve %44 oranında giderebilmiştir. *R. mucilaginosa* kullanılan ZK arıtım ortamlarında ise %5.84-%34.81 fenol ve %38.38-%56.91 KOİ giderimi elde edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kimyasallar ve Cihazlar

Ortam hazırlama ve analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıkta, HPLC analizlerinde kullanılan çözücüler ise kromatografik saflıktadır. Zeytin karasuyu, Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi'nden (Burhaniye/Balıkesir) (iki ve üç fazlı üretim) sağlanmıştır. 2011 hasat dönemine ait zeytin karasuyu, kullanılmadan önce -30 °C sıcaklıkta saklanmış ve deneylerde stoktan alınarak santrifüjlenen karasu kullanılmıştır. Kullanılan karasuyun pH değeri 4.7 ve toplam fenol derişimi ise 1056 mg/L'dir. 2011 hasat dönemine ait Öküzgözü cinsi üzümüne ait preslenmiş cibre ise Vinkara Şarap Fabrikasından (Kalecik/Ankara) sağlanmış ve -30 °C sıcaklıkta depolanmıştır. Üzüm cibri kullanılmadan önce stoktan alınarak 60 °C sıcaklıkta 24 saat kurutulmuştur. Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Model
Öğütücü (Homojenizatör)	Krups KA950 Prep Expert Mutfak Robotu
Çalkalamalı Hava Banyosu	Edmund Bühler TH 30; Shel Lab S16R-2
HPLC	Waters Alliance
UV-VIS Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Rotina 35 R
Döner Buharlaştırıcı	Heidolph
Terazi	Mettler AB54-S; Scaltec
pH-metre	Sartorius PP25
Ultrasaf Su Cihazı	Millipore
Etüv; Kurutucu	Friocell 222; Zhichang- ZRD 5110
Laminer Akış Kabini	Biolab Faster BHG 2004-S
Sterilizatör	ALP CL-40M

3.2 Zeytin Karasuyu ile Üzüm Cibresinin Muamelesi

Cibre, zeytin karasuyu (ZK) ile muamele edilmeden önce öğütücüde parçalanmış ve homojen forma getirilmiştir. Kullanılan öğütücü 2 L hacimli (kullanım hacmi=1.5 L), metal blender haznesine sahip, 1200 W gücünde bir mutfak robotudur. Cibrenin öğütücüde

parçalanma süresi incelenen parametrelerden birisidir. Öğütme derecesi, blender haznesine her seferinde 100 g kuru cibre konularak standardize edilmiştir. Öğütülmüş olan kuru cibre, zeytin karasuyu ile farklı oranlarda (mL/g) karıştırılmıştır. Zeytin karasuyu/cibre oranı incelenen parametrelerden bir diğeridir. Cibre miktarı her denemede 7 g olacak şekilde sabitlenmiş; konulan karasu miktarı değiştirilerek istenilen ZK/cibre oranı ayarlanmıştır. Karışım, 150 rpm çalkalama hızındaki çalkalamalı hava banyosunda yerleştirilen ağız alüminyum kağıt ile kapatılmış 250 mL erlenlere konularak zeytin karasuyunun cibre ile muamelesi gerçekleştirilmiştir. Çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı incelenen diğer iki parametredir.

3.3 Zeytin Karasuyu ile Muamele Edilmiş Cibreden Fenollerin Geri Kazanımı

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibre, çözücü ekstraksiyonundan önce derişik HCl ile asitlendirilmiştir (pH~1.5). Bunun için kuru cibre 1:1 oranda damıtık su ile karıştırılmış, derişik HCl ile pH'ı 1.5 civarına ayarlanmış ve 24 st süre ile 60 °C de kurutulmuştur. Çözücü ekstraksiyonundan önce yapılan n-hekzan ile yıkama (yağ ekstraksiyonu) ve en uygun çözücü seçimi için yapılan ekstraksiyon işlemleri, çözücü:cibre oranı 10:1 (h/a) değerinde tutularak 250 mL hacimli erlenlerde 5 g kuru cibre ve 50 mL sıvı hacmi ile, T=30 °C ve N=150 rpm sabit koşullarda çalkalamalı hava banyosunda 24 süre ile yapılmıştır. Belli zaman aralıkları ile ortamlardan 1'er mL örnek alınmış, 0.45 µM filtreden süzölmüş ve döner buharlaştırıcıda (N=50 rpm, T=65 °C) kuruluğa kadar buharlaştırılmışlardır. Kurutulan örnekler daha sonra etil alkol:su (60:40) karışımında çözünerek toplam fenol derişim analizleri yapılmıştır. En uygun olduğu belirlenen çözücü ile optimum ekstraksiyon koşullarının araştırıldığı deneylerde ise çözücü/cibre oranı (h/a) ve sıcaklık incelenen parametrelerdir.

3.4 Mikroorganizma Saklama ve Çoğaltma

Projede, ticari olarak sağlanan *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) mayası kullanılmıştır Maya agar içeren eğik tüplerde (+4 °C), petri kaplarında (+4 °C) ve mikrobank™ viallerde (Pro-Lab Diagnostics Microbank™) (-30 °C) saklanmış ve belli zaman aralıkları ile stok tazeleme işlemi yapılmıştır. *R. glutinis* çoğaltılması için kullanılan katı ortam, 5 g/L pepton, 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü, 10 g/L glukoz, 20 g/L agar içeren ve damıtık su yerine zeytin karasuyu ile hazırlanan ZK-agar ortamıdır. Maya, biyoarıtımlarda kullanılmadan önce bu ortamda 30° C'de 24 st süre ile inkübe edilmiştir.

3.5 Biyoarıtım

Biyoarıtımlar, ZK-agar ortamında çoğalmış hücreler ile cibreye muamele edilmiş ve edilmemiş zeytin karasuyu kullanılarak yapılmıştır. Biyoarıtım ortamları için kullanılacak zeytin karasuyu istenilen oranda seyreltikten sonra üre ile azot takviyesi yapılmış ve ortamlar sterilize edilmiştir. Biyoarıtımlar 250 mL erlenlerde 100 mL toplam hacimde, 30 °C ve 150 rpm'de çalışan hava banyosuna gerçekleşmiştir.

3.6 Analizler

3.6.1 pH ölçümü

Biyoarıtım ortamından alınan örnekler, +4 °C ve 12000xg'de santrifüjlendikten sonra, üst fazın pH değeri pH-metre ile izlenmiştir.

3.6.2 Toplam fenol derişimi

Örnek hazırlama: Örneklerin pH değerleri %37'lik HCl ile 2'ye getirildikten sonra, fenolik bileşenler etil asetat ile üç kez ekstrakte edilmiş ve susuz sodyum sülfat ile 30 dk kurutulmuştur. Döner buharlaştırıcıda etil asetatı tamamen uzaklaştırılan örnekler, daha sonra etil alkol-su karışımında (60:40) tekrar çözülmüş ve toplam fenol derişim analizi için Folin-Ciocalteu yöntemi uygulanmıştır (AYED et al., 2005).

Folin-Ciocalteu yöntemi: Toplam fenol analizi için, yukarıdaki aşamalardan geçirilerek analize hazırlanan örnekten 20 µl cam tüplere alınmış; üzerine 1.58 mL saf su ve 100 µl Folin reaktifi eklenmiştir. Çok iyi bir şekilde karıştırılan (vortekslenen) çözelti 8 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda 300 µl doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenerek tekrar vortekslenen tüp, ağzı kapatılarak 40 °C'deki su banyosunda 30 dk tutulmuş ve örneğin $\lambda=765$ nm'de absorbansı okunmuştur.

Kalibrasyon doğrusu: Toplam fenol analizinde standart olarak gallik asit kullanılmıştır. Gallik asitin %10 etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan farklı derişimleri (50-600 mg/L) ile çalışma doğrusu çizilmiş ve örneklerin toplam fenol derişimi gallik asit eşdeğeri olarak (mg gallik asit/L) hesaplanmıştır. Toplam fenol giderim yüzdesinin hesaplanmasında ise Eş.(3.1) kullanılmıştır.

$$\%TF \text{ giderimi} = \frac{(\text{Örneğin başlangıç TF derişimi} - \text{Örneğin son TF derişimi})}{\text{Örneğin başlangıç TF derişimi}} * 100 \quad (3.1)$$

Kullanılan kalibrasyon doğrusu ile TF derişim analizlerinin doğruluğuna ait bilgiler EK 1'de yer almaktadır.

3.6.3 Renk giderimi

Zeytin karasuyu örneklerinin renk analizi spektrofotometrik olarak yapılmıştır. 25 kat seyreltilen örnekler 0,45 µM filtreden süzölmüş ve λ=395 nm de absorbanları ölçölmüştür. (FLOURI et al., 1996). Renk giderimi Eşt. (3.2) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Renk giderimi (\%)} = \frac{\text{Başlangıç absorbanı} - \text{Örnek absorbanı}}{\text{Başlangıç absorbanı}} * 100 \quad (3.2)$$

3.6.4 Hücre derişimi

Biyoarıtım ortamından alınan örnekler 12.000xg'de 10 dk santriföjlendikten sonra çöken hücreler, darası bilinen bir petri kabına konularak 85 °C'da 24 st kurutulmuşlardır. Kurutma işleminde sonra petri kabındaki katının ağırlığı hassas terazide tartılarak kuru hücre derişimi mg/ml olarak hesaplanmıştır.

3.6.5 HPLC analizleri

Zeytin karasuyu ile cibrede bulunan ve ekstraksiyon ortamından geri kazanılan fenolik bileşenlerin HPLC ile analizi, FKI et al., (2005) tarafından kullanılan yöntem modifiye edilerek yapılmıştır. Buna göre zeytin karasuyu örnekleri, üç kez eşit hacimde etil asetat ile ekstrakte edildikten sonra toplanan organik fazlar bir döner buharlaştırıcıda 40 rpm ve 45 °C koşullarında buharlaştırılmıştır. Fenolik kalıntı metanol içinde çözüldükten sonra 0.45 µm PVDF filtreden (Millipore Millex-HV) süzölerek HPLC analizlerinde kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan taşıyıcı fazlar bidistile su kullanarak hazırlanmış (Millipore MilliQ Gradient) ve 0.45 µm PVDF membrandan (Millipore Durapore®) vakumlu pompa yardımı ile süzölmüştür. Taşıyıcı fazlardaki gaz kabarcıkları, 30 dk süre ile ultrasonik banyoda uzaklaştırılarak HPLC için kullanıma hazır hale getirilmıştir. Analiz koşulları Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2 a HPLC analiz koşulları

Değişken	Değer
Kolon	XTerra RP18 (Waters)
Kolon boyutu	4.6 mm x 150 mm, 5 µm
Hareketli faz akış hızı	0.3 ml/dk
Kolon sıcaklığı	25 o C
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector(Waters 2487)
Dalga boyu	280 nm
Taşıyıcı faz A	%70 : %30 asetonitril : bidistile su
Taşıyıcı faz B	%0.1 fosforik asit
Analiz süresi	80 dk
Enjeksiyon hacmi	20 µl

b HPLC analizinde uygulanan gradyen program

t (dk)	Taşıyıcı faz A	Taşıyıcı faz B
0	20	80
45	30	70
52.5	50	50
80	20	80

HPLC analizinde doğruluk analizi, piklerin hangi maddelere ait olduğu ve kantitatif değerlendirmede kullanılan kalibrasyon doğruları TÜBİTAK 109M290 nolu proje kapsamında yapılmıştır (TAKAÇ, 2011). Buna göre ZK örneklerindeki tirozol, hidroksitirozol, kateşol, 4-metil kateşol ve vanilik asite ait pikler bilinmektedir. EK-2'de bir ZK örneğinin fenolik maddelerini gösteren HPLC kromatogramı, bu çalışmada da kullanılan tirozol ve hidroksitirozole ait HPLC kromatogramları ve tirozole ait kalibrasyon doğrusu ayrıca verilmiştir. Bu çalışma kapsamında ise standart epigallokateşin, epigallokateşin gallat, epikateşin, 2,5 dihidroksibenzok asit, 3,4 dihidroksifenilasetik asit, 3-hidroksi 4-metoksifenilasetik asit, 4-hidroksifenilasetik asit için HPLC analizleri yapılmış ve elde edilen kromatogramlar EK 3'de verilmiştir. Uygulanan HPLC analiz koşullarında, bu fenolik maddelerden epigallokateşin ve 2,5 dihidroksibenzok asitin cibrede bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada zeytin karasuyunda epigallokateşin varlığı da belirlenmiştir.

3.6.6 Toplam antioksidan aktivite tayini

Toplam antioksidan (TA) aktivitesi, örneklerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal tutma etkisi belirlenerek hesaplanmıştır. Çalışmada, FKI et al., (2005) tarafından kullanılmış olan yöntem modifiye edilerek uygulanmıştır. Bunun için örnekler öncelikle evaporatörde kurutularak metanol fazına alınmıştır. 4 mL metanol içinde bulunan örnek ile 10 mL 1.5×10^{-4} M DPPH çözeltisi (metanolde hazırlanmış) bir tüpte iyice karıştırılarak ağzı kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Eş zamanlı olarak, 4 mL metanol ve 10 mL 1.5×10^{-4} M DPPH çözeltisi karıştırılıp kontrol olarak oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından örneğe ve kontrole ait absorbans değerleri $\lambda=520$ nm'de ölçülerek Eş.(3.3)'den toplam antioksidan aktivitesi % inhibisyon olarak hesaplanmıştır (OBIED et al., 2007a).

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} * 100 \quad (3.3)$$

Toplam antioksidan aktivite tayin yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği TÜBİTAK 109M290 nolu proje kapsamında yapılmıştır (TAKAÇ, 2011).

3.7 Deney Tasarım, Veri Analizi ve Optimizasyon

Bu amaçla faktöriyel tasarım ve merkezi kompozit tasarımlar, Design Expert 6.0 paket programı (deneme sürümü) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan program ile; veriler arasındaki ilişkiyi analiz edilerek istatistiksel olarak anlamlandırılmış, cevap yüzey yöntemi üç boyutlu grafikler ile görüntülenmiş ve çıktıları ifade eden fonksiyonlar bulunarak optimizasyon yapılmıştır. Çalışmanın birinci bölümünde yapılan deney tasarımında izlenen yol; *i*) incelenen parametreler arasında daha az önemli olanların faktöriyel tasarımlar ile bulunması, *ii*) bunların sabit değerlerinde önemli parametreler ile merkezi kompozit tasarımlar yapılarak cevap yanıtlarının elde edilmesi, ve *iii*) en önemli parametrenin optimize edilmesidir. Çalışmanın ikinci bölümünde yapılan deney tasarımında izlenen yol ise; *i*) incelenen parametreler arasında merkezi kompozit tasarım yapılarak cevap yanıtlarının elde edilmesi, ve *ii*) en önemli parametrenin optimize edilmesidir. Deneysel tasarım sonucu bulunan en iyi değerler, tekrarlı deneyler ile ayrıca sınıanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Zeytin Karasuyundaki Fenolik Bileşenlerin Cibreye Geçmesi için Optimum Muamele Koşullarının Belirlenmesi

Zeytin karasuyunda (ZK) bulunan fenolik bileşenlerin üzüm cibresine geçirilerek toplam fenol derişimini azaltmak amacıyla, karasu ile cibre farklı koşullarda muamele edilmiştir. Bu amaçla cibrenin parçalanma süresi (s), zeytin karasuyu/cibre oranı (mL/g), parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalanma süresi (dk) ve çalkalama sıcaklığı (°C), etkileri incelenecek parametreler olarak seçilmiştir. Bu parametreler faktör olarak, toplam fenol (TF) derişimi ile renk giderimi ise cevap olarak seçilerek deney tasarımları yapılmıştır. Öncelikle, faktöriyel tasarımlar yapılarak toplam fenol ve renk giderimi için önemli olan parametreler ikiye indirilmiştir. Sonrasında bu parametreler ile iki faktörlü merkezi kompozit tasarımı yapılarak cevap yüzeyleri belirlenmiştir. Ardından seçilen parametre için, tek faktörlü merkezi kompozit tasarımı yapılmış ve optimizasyon ile en yüksek toplam fenol giderimi ve renk giderimini verecek koşullar ve elde edilecek cevap değerleri bulunmuştur. Son olarak bu optimum değerler deneysel olarak sınınanarak kuramsal değerlere yakınlığı belirlenmiştir.

4.1.1 Faktöriyel Tasarım I: Zeytin karasuyu/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının etkileri

Yapılan ilk deney setinde; zeytin karasuyu/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanma sonrasında karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinden, toplam fenol giderimi ve renk giderimi üzerine daha önemli olanlarını belirlemek üzere tam faktöriyel tasarım (2^4) yapılmıştır. Tablo 4.1'de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri verilmiştir. Tablo 4.2'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.1 “Faktöriyel Tasarım I”de incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör		Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
		-1	+1
A:	ZK/cibre oranı (mL/g)	5	10
B:	Çalkalama sıcaklığı °C	20	30
C:	Cibrenin parçalanma süresi (s)	30	120
D:	Çalkalama süresi (dk)	30	120

Tablo 4.2 “Faktöriyel Tasarım I” deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney #	A: ZK/cibre oranı	B: Çalkalama sıcaklığı	C: Cibrenin parçalanma süresi	D: Çalkalama süresi	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	-1	-1	-1	-1	30,33002	11,2000
2	1	-1	-1	-1	13,04348	-0,26667
3	-1	1	-1	-1	24,95983	13,6000
4	1	1	-1	-1	17,08623	15,6000
5	-1	-1	1	-1	37,24463	17,86667
6	1	-1	1	-1	23,46778	6,266667
7	-1	1	1	-1	29,40546	29,33333
8	1	1	1	-1	5,356186	10,4000
9	-1	-1	-1	1	36,28571	21,86287
10	1	-1	-1	1	48,40000	1,293661
11	-1	1	-1	1	23,37492	22,48062
12	1	1	-1	1	11,55614	9,173127
13	-1	-1	1	1	36,11429	34,02329
14	1	-1	1	1	27,71429	7,632600
15	-1	1	1	1	34,07748	43,66925
16	1	1	1	1	17,66251	15,11628

Yapılan 16 deney sonucunda elde edilen veriler istatistiksel analizler ile değerlendirilmiş ve incelenen faktörlerin cevaplara etki değerleri bulunmuştur. Toplam fenol giderimi ve renk giderimi için ayrı ayrı yapılan değerlendirmeler sonucunda, bu değerlere daha fazla etki eden parametreler belirlenmiştir.

4.1.1.1 İncelenen parametrelerin toplam fenol giderimine etki dereceleri

Sistem parametrelerinin toplam fenol giderimine tekli ve çoklu etkileri Tablo 4.3'de yer almaktadır. Buna göre, A parametresinin (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine etkisi en yüksek ve %68 değerindedir. Diğer ana parametreler ve çoklu parametrelerin etkileri ise bu parametre yanında istatistiksel olarak önem taşımamaktadır.

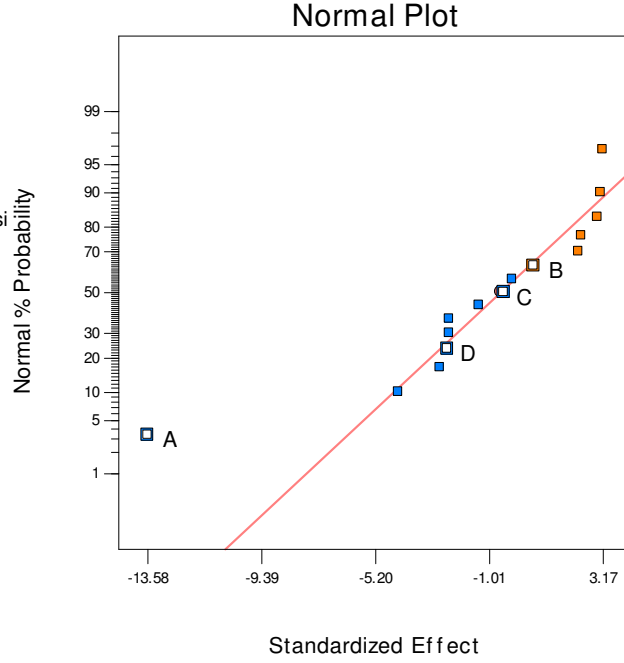
Tablo 4.3 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin, TF giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım I)

	Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
Require	Intercept			
Model	A-ZK/Cibre oranı	-13,5754	737,1696	67,7958
Model	B-Çalkalama sıcaklığı	0,62744	1,574724	0,144824
Model	C-Cibrenin parçalanma süresi	-0,47171	0,890051	0,081856
Model	D-Çalkalama süresi	-2,54591	25,92653	2,384404
Error	AB	2,279544	20,78529	1,911576
Error	AC	-2,48425	24,68604	2,270319
Error	AD	-2,81602	31,71992	2,917209
Error	BC	2,973453	35,3657	3,252503
Error	BD	3,171988	40,24603	3,701335
Error	CD	3,091106	38,21974	3,514982
Error	ABC	-1,38396	7,661425	0,704604
Error	ABD	-0,16451	0,10825	0,009956
Error	ACD	-4,35154	75,74375	6,965979
Error	BCD	-2,48249	24,65097	2,267094
Error	ABCD	2,37645	22,59006	2,077556
	Lenth's ME	9,575558		
	Lenth's SME	19,43977		

Parametrelerin ana ve çoklu etkilerinin normal dağılım grafiğinde de A parametresinin (ZK/cibre oranı) gösterdiği sapma açıkça görülmektedir (Şekil 4.1).

Design-Expert® Software
Toplam fenol giderimi

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.868
p-value = 0.073
A: ZK/Cibre oranı
B: Çalkalama sıcaklığı
C: Cibrenin parçalanma süresi
D: Çalkalama süresi
■ Positive Effects
■ Negative Effects

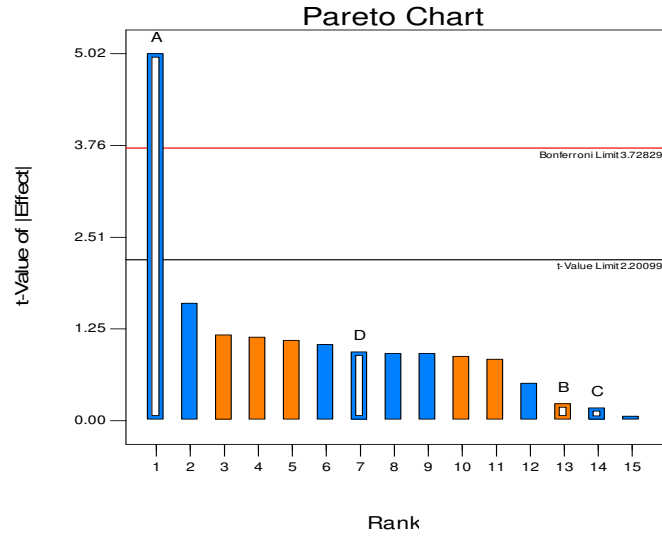


Şekil 4.1 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım I)

Pareto grafiğine göre de sadece A parametresi (ZK/cibre oranı), t ve Bonferroni limitinin üzerine çıkmıştır (Şekil 4.2). Bu, ana ve çoklu etkiler arasında ZK/cibre oranının toplam fenol giderimi üzerine anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Verilerin ANOVA analizine göre de sadece A parametresi (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine üzerinde anlamlı bir etkiye sahiptir (Tablo 4.4).

Sonuç olarak; incelenen dört parametreden -incelenen değerler aralığında- toplam fenol giderimi üzerine en fazla etkiye sahip olan parametrenin ZK/cibre oranı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2. ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine ana ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım I)

Tablo 4.4 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım I)

Response	1	Toplam fenol giderimi				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob >F	
Model	765,5609	4	191,3902	6,542703	0.0060	significant
A-ZK/Cibre oranı	737,1696	1	737,1696	25,20025	0.0004	
B-Çalkalama sıcaklığı	1,574724	1	1,574724	0,053832	0.8208	
C-Cibrenin parçalanma süresi	0,890051	1	0,890051	0,030427	0.8647	
D-Çalkalama süresi	25,92653	1	25,92653	0,886302	0.3667	
Residual	321,7772	11	29,25247			
Cor Total	1087,338	15				

4.1.1.2 İncelenen parametrelerin renk giderimine etki dereceleri

Sistem parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri Tablo 4.5'de verilmiştir. Buna göre, A parametresinin (ZK/cibre oranı) toplam fenol giderimine etkisi en yüksek ve %42 değerindedir. Diğer parametreler bu iki parametre yanında yeterince önemli görülmemektedir.

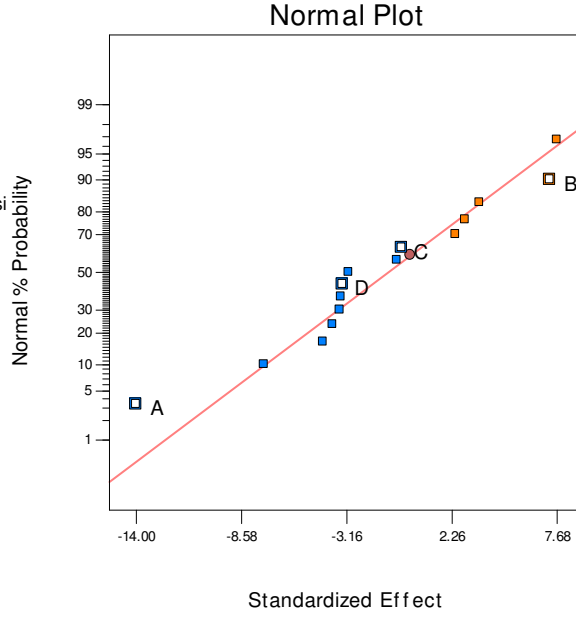
Tablo 4.5 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım I)

	Term	Effect	SumSqr	% Contribtn	
Require	Intercept				
Model	A-ZK/Cibre oranı	-13,995	783	42	
Model	B-Çalkalama sıcaklığı	7,32819	215	11,4073	
Model	C-Cibrenin parçalanma süresi	-0,3058	0,37401	0,01986	
Model	D-Çalkalama süresi	-3,3549	45	2	
Error	AB	-3,4994	49	3	
Error	AC	-3,4394	47	3	
Error	AD	-4,3574	76	4	
Error	BC	3,70276	55	3	
Error	BD	-3,8662	60	3	
Error	CD	-0,5442	1,18454	0	
Error	ABC	-3,03501	36,84513	1,956631	
Error	ABD	2,464104	24,28723	1,289753	
Error	ACD	2,965659	35,18052	1,868233	
Error	BCD	-7,39826	218,9368	11,62646	
Error	ABCD	7,683184	236,1252	12,53924	
	Lenth's ME	13,37772			
	Lenth's SME	27,15871			

Parametrelerin ana ve çoklu etkilerinin normal dağılım grafiğinde ise A parametresi (ZK/cibre oranı) yanısıra B parametresi de (çalkalama sıcaklığı) sapma göstermektedir (Şekil 4.3).

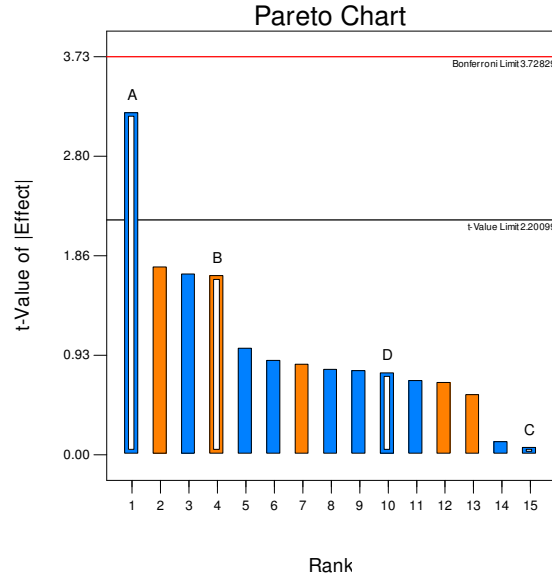
Design-Expert® Software
Renk giderimi

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.932
p-value = 0.430
A: ZK/Cibre oranı
B: Çalkalama sıcaklığı
C: Cibrenin parçalanma süresi
D: Çalkalama süresi
■ Positive Effects
■ Negative Effects



Şekil 4.3 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım I)

Pareto grafiğine göre ise sadece A parametresi (ZK/cibre oranı) t limitinin üzerine çıkmıştır (Şekil 3.4). Bu, diğer ana ve karşılıklı etkileşimler arasında ZK/cibre oranının renk giderimi üzerine anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım I)

Verilerin ANOVA analizi de sadece A parametresinin (ZK/cibre oranı) renk giderimi üzerine diğer etkilere göre daha bir anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 4.6).

Sonuç olarak; incelenen dört parametreden –çalışılan değerler aralığında- zeytin karasuyundan renk giderimi üzerine en fazla etkiye sahip olan parametrenin ZK/cibre oranı olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.6 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım I)

Response	2	Renk giderimi				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variancetable [Partialsum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob> F	
Model	1043,649	4	260,9123	3,418983	0.0476	significant
A-ZK/Cibre oranı	783,4448	1	783,4448	10,26622	0.0084	
B-Çalkalama sıcaklığı	214,8096	1	214,8096	2,814855	0.1215	
C-Cibrenin parçalanma süresi	0,374008	1	0,374008	0,004901	0.9454	
D-Çalkalama süresi	45,02097	1	45,02097	0,589953	0.4586	
Residual	839,4413	11	76,31284			
Cor Total	1883,091	15				

4.1.2 Faktöriyel Tasarım II: Cibrenin parçalanma süresi, parçalanma sonrasında karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının etkileri

Zeytin karasuyunun üzüm cibresi ile muamele edilmesi prosesinde toplam fenol derişimi ve renk giderimini etkileyen parametrelerden ZK/cibre oranının en önemli parametre olduğunun bulunmasından sonra, bu parametre sabit değerde tutularak kalan üç parametre ile yeni bir tam faktöryel tasarım (2^3) yapılmıştır. "Faktöriyel Tasarım II"nin amacı; cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının toplam fenol ve renk giderimi üzerine etki derecelerinin bulunması ve aralarında daha az önemli görünen parametrelerin elenmesidir. Bu tasarımda ZK/cibre oranı bir önceki denemede en iyi TF ve renk gideriminin sağlandığı 5 mL/g değerinde sabit tutulmuştur. Tablo 4.7'de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri yer almaktadır. Tablo 4.8'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.7 “Faktöriyel Tasarım II”de incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör		Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
		-1	+1
A:	Cibrenin parçalanma süresi (s)	30	240
B:	Çalkalama sıcaklığı (°C)	10	30
C:	Çalkalama süresi (dk)	30	240

Tablo 4.8 “Faktöriyel Tasarım II” deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney #	A: Cibrenin parçalanma süresi	B: Çalkalama sıcaklığı	C: Çalkalama süresi	Toplam fenol giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	-1	-1	-1	16,50327	28,83295
2	1	-1	-1	21,32353	49,42792
3	-1	1	-1	29,43981	32,43848
4	1	1	-1	21,01708	45,19016
5	-1	-1	1	41,90476	44,51754
6	1	-1	1	36,03175	55,26316
7	-1	1	1	40,37855	61,97479
8	1	1	1	38,60410	65,75630

Yapılan 8 deney sonucunda elde edilen veriler istatistiksel analizler ile değerlendirilmiş ve incelenen faktörlerin cevaplara etki değerleri bulunmuştur. Toplam fenol giderimi ve renk giderimi için ayrı ayrı yapılan değerlendirmeler sonucu, incelenen üç parametreden daha fazla etkili olan parametreler seçilmiştir.

4.1.2.1 İncelenen parametrelerin toplam fenol giderimine etki dereceleri

Sistem parametrelerinin TF giderimine tekli ve çoklu etkileri Tablo 4.9’da verilmiştir. Buna göre, C parametresinin (çalkalama süresi) toplam fenol giderimine etkisi en yüksek ve %85 değerindedir. Diğer ana ve çoklu parametreler ise bu C parametresi yanında yeterince önemli görülmemektedir.

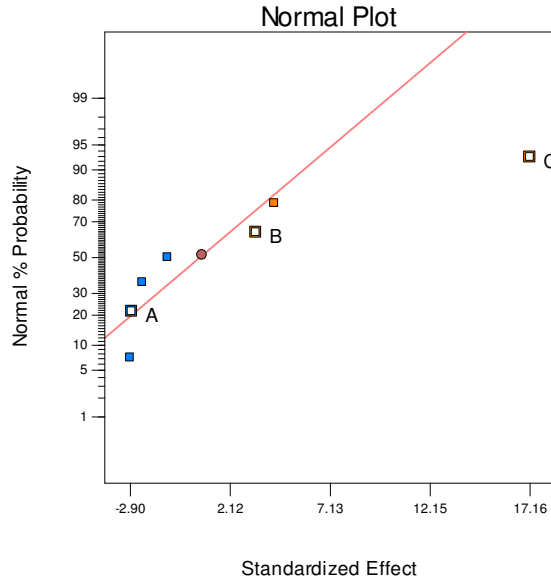
Tablo 4.9 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım II)

	Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
Model	A: Cibrenin parçalanma süresi	-2,81248	15,82011	2,27655
Model	B: Çalkalama sıcaklığı	3,419059	23,37993	3,364426
Model	C: Çalkalama süresi	17,15887	588,8534	84,73736
Error	AB	-2,2861	10,45255	1,504146
Error	AC	-1,01125	2,045253	0,294317
Error	BC	-2,89599	16,7735	2,413745
Error	ABC	4,335389	37,59119	5,409459
	Lenth's ME	16,11613		
	Lenth's SME	38,56902		

Parametrelerin ana ve çoklu etkilerin normal dağılım grafiğinde de C parametresinin (çalkalama süresi) gösterdiği sapma açıkça görülmektedir (Şekil 4.5).

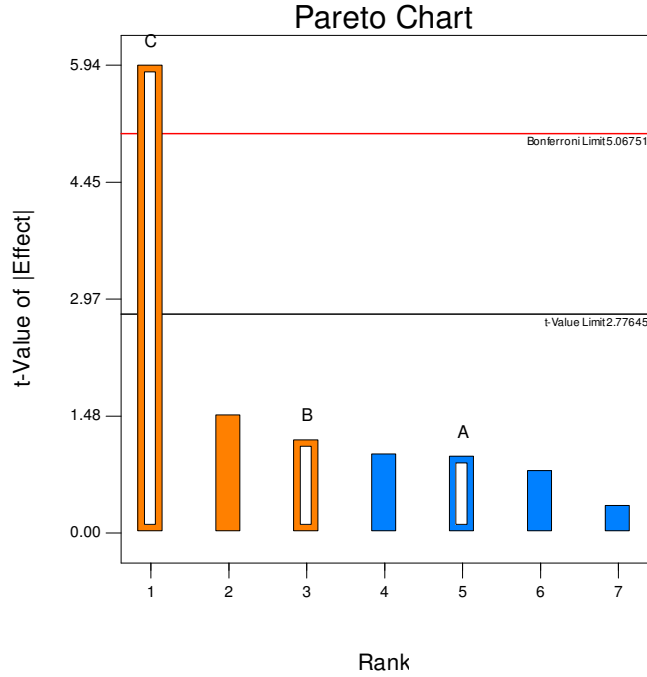
Design-Expert® Software
Toplam fenol giderimi

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.824
p-value = 0.154
A: Parçalanma süresi
B: Sıcaklık
C: Çalkalama süresi
■ Positive Effects
■ Negative Effects



Şekil 4.5 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım II)

Pareto grafiğine göre de sadece C parametresi (çalkalama süresi), t ve bonferroni limitinin üzerine çıkmıştır (Şekil 4.6). Yani diğer ana ve karşılıklı etkileşimler arasında C parametresi toplam fenol giderimi üzerine anlamlı etkiye sahiptir.



Şekil 4.6 ZK/cibre oranı, cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım II)

Verilerin ANOVA analizine göre de sadece C parametresi (çalkalama süresi) toplam fenol giderimine üzerine anlamlı bir etkiye sahiptir (Tablo 4.10)

Sonuç olarak; incelenen üç parametreden zeytin karasuyunda toplam fenol giderimi üzerine en fazla etkiye sahip olan parametrenin cibre ile zeytin karasuyunun **çalkalama süresi** olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.10 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, TF giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım II)

Response	1	Toplam fenol giderimi				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	628,0535	3	209,3512	12,52428	0.0168	significant
A-Cibrenin parçalama süresi	15,82011	1	15,82011	0,946427	0.3857	
B-Çalkalama sıcaklığı	23,37993	1	23,37993	1,398688	0.3024	
C-Çalkalama süresi	588,8534	1	588,8534	35,22773	0.0040	
Residual	66,86249	4	16,71562			

4.1.2.2 İncelenen parametrelerin renk giderimine etki dereceleri

Sistem parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri Tablo 4.11’de verilmiştir. Buna göre, C parametresi (çalkalama süresi) ile A parametresinin (cibrenin parçalanma süresi) renk giderimine etkisi daha yüksek ve sırasıyla %54 ve %24 değerlerindedir. Diğer parametre olan çalkalama sıcaklığı ise bu iki parametre yanında daha az önemlidir.

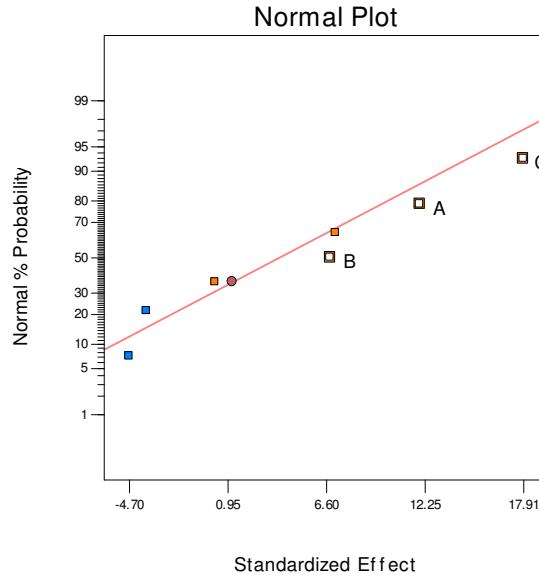
Parametrelerin ana ve çoklu etkilerin normal dağılım grafiğinde ise tüm parametreler yaklaşık aynı sapmayı vermiştir (Şekil 4.7).

Tablo 4.11 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının, renk giderimine tekli ve çoklu etki değerlendirmesi (Faktöriyel Tasarım II)

	Term	Effect	SumSqr	% Contribtn
Require	Intercept			
Model	A: Cibrenin parçalanma süresi	11,96844	286,4872	23,97607
Model	B: Çalkalama sıcaklığı	6,829539	93,28521	7,807025
Model	C: Çalkalama süresi	17,90557	641,219	53,66353
Error	AB	-3,70185	27,40735	2,293717
Error	AC	-4,70488	44,27178	3,705098
Error	BC	7,145656	102,1208	8,546475
Error	ABC	0,219797	0,096621	0,008086
	Lenth's ME	38,56225		
	Lenth's SME	92,28695		

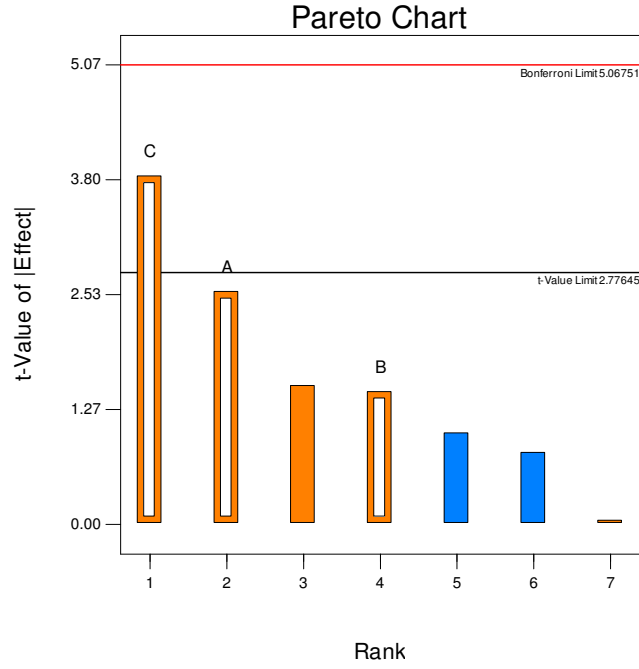
Design-Expert® Software
Renk giderimi

Shapiro-Wilk test
W-value = 0.893
p-value = 0.396
A: Cibrenin parçalanma süresi
B: Çalkalama sıcaklığı
C: Çalkalama süresi
■ Positive Effects
■ Negative Effects



Şekil 4.7 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığı parametrelerinin renk giderimine tekli ve çoklu etkileri normal dağılım grafiği (Faktöriyel Tasarım II)

Pareto grafiğine göre ise, sadece C parametresi (çalkalama süresi) t limitinin üzerine çıkmıştır (Şekil 4.8). Bu, diğer ana ve karşılıklı etkileşimler arasında C parametresinin renk giderimi üzerine anlamlı etkiye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için Pareto grafiği (Faktöriyel Tasarım II)

Verilerin ANOVA analizine göre seçilen model anlamlıdır (Tablo 4.12). C parametresinin F değeri modelin F değerinden düşük olduğu için renk giderimine etkisinde diğer ana etkilere göre daha anlamlı fark vardır.

Tablo 4.12 Cibrenin parçalanma süresi, parçalanmadan sonra karasu ile birlikte çalkalama süresi ve çalkalama sıcaklığının renk giderimine tekli ve çoklu etkileri için ANOVA analizi (Faktöriyel Tasarım II)

Response	2	Renk giderimi				
ANOVA for selected factorial model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	1020,991	3	340,3305	7,828344	0.0377	significant
A-Parçalanma süresi	286,4872	1	286,4872	6,589831	0.0622	
B- Çalkalama Sıcaklığı	93,28521	1	93,28521	2,145763	0.2168	
C-Çalkalama süresi	641,219	1	641,219	14,74944	0.0185	
Residual	173,8966	4	43,47414			
Cor Total	1194,888	7				

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri birlikte değerlendirildiğinde; incelenen üç parametreden zeytin karasuyundan renk giderimi üzerine cibrenin parçalanma süresi ve karasu ile birlikte çalkalama süresinin çalkalama sıcaklığına göre daha fazla etkiye sahip oldukları sonucuna varılmıştır.

4.1.3 Merkezi Kompozit Tasarım I: ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi etkileri

Yapılan “Faktöriyel Tasarım I” ile zeytin karasuyundan toplam fenol giderimi üzerine ZK/cibre oranının; “Faktöriyel Tasarım II ile de çalkalama süresinin diğer parametrelere göre daha önemli olduğu belirlenmiştir. Zeytin karasuyunun renginin gideriminde ise “Faktöriyel Tasarım I”e göre ZK/cibre oranı, “Faktöriyel Tasarım II”ye göre de çalkalama süresi ve cibrenin parçalanma süresi önem taşımaktadır. Projenin amaçlarından ilki, zeytin karasuyunda çevreye toksik etki yapan fenolik maddelerin azaltılarak sonraki biyoarıtım prosesinin verimini artırmaktır. Projenin ikinci amacı da, zeytin karasuyundan cibreye geçen fenolik maddelerin cibredeki fenolik maddeler ile birlikte geri kazanılarak değerli antioksidanların elde edilmesidir. Bu nedenle, çalışmada zeytin karasuyundaki toplam fenol derişiminin azalmasının renk giderimine göre daha önemli olduğu kabul edilerek, çalışmalar ZK/cibre

oranı ve çalkalama süresi parametre olarak alınıp bunların en yüksek fenol giderimini sağlayan değerleri araştırarak sürdürülmüştür. Bu çalışmalarda, daha önceki denemelerde en çok TF ve renk gideriminin sağlandığı parametre seviyeleri olan, cibre parçalanma süresi 240 s ve çalkalama sıcaklığı 30 °C olarak sabit alınmıştır.

Çalışmanın bu aşamasında ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi ile iki faktörlü bir merkezi kompozit tasarımı yapılmıştır. Tablo 4.13'de incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri yer almaktadır. Tablo 4.14'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.13 “Merkezi Kompozit Tasarımı I”de incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış ş seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1,2671	-1	0	1	1,2671
A ZK/cibre oranı : oranı (g/mL)	2,5	2,868897	4,25	5,631103	6
B Çalkalama süresi : (dk)	200	242,1597	400	557,8403	600

Tablo 4.14 “Merkezi Kompozit Tasarımı I” deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney #	A:	B:	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
	ZK/cibre oranı (mL/g)	Çalkalama süresi (dk)		
1	2,868897	242,1597	48,33234	51,66431
2	5,631103	242,1597	34,96129	28,89518
3	2,868897	557,8403	55,62835	57,36544
4	5,631103	557,8403	34,06790	25,21246
5	2,5	400	64,89518	60,32224
6	6	400	30,73258	25,31870
7	4,25	200	42,58487	52,08924
8	4,25	600	50,62537	63,66856
9	4,25	400	48,06432	53,73584
10	4,25	400	55,56879	54,67422
11	4,25	400	51,75700	58,10907
12	4,25	400	48,36212	49,43343
13	4,25	400	51,51876	58,94122

Yapılan 13 deney sonunda elde edilen cevaplar (TF giderimi ve renk giderimi) ile veri analizleri yapılmış ve cevaplar üzerine incelenen parametrelerin etkisini gösteren modeller değerlendirilerek cevap yüzeyle oluşturulmuştur.

4.1.3.1 Toplam fenol giderimi için veri analizi

Toplam fenol giderim cevaplarının model uygunluk analizine göre, cevaplar kuadratik ve lineer modellere uygundur (Tablo 4.15).

Tablo 4.15 Toplam fenol giderimi için olası modellerin *lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

Lack of Fit Tests							
	Sum of		Mean	F	p-value		
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F		
<u>Linear</u>	<u>198,6</u>	<u>6</u>	<u>33,1</u>	<u>3,55</u>	<u>0,1201</u>	<u>Suggested</u>	
2FI	181,84	5	36,37	3,9	0,1058		
<u>Quadratic</u>	<u>58,56</u>	<u>3</u>	<u>19,52</u>	<u>2,09</u>	<u>0,2437</u>	<u>Suggested</u>	
Cubic	14,01	1	14,01	1,5	0,2874	Aliased	
Pure Error	37,28	4	9,32				
"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.							

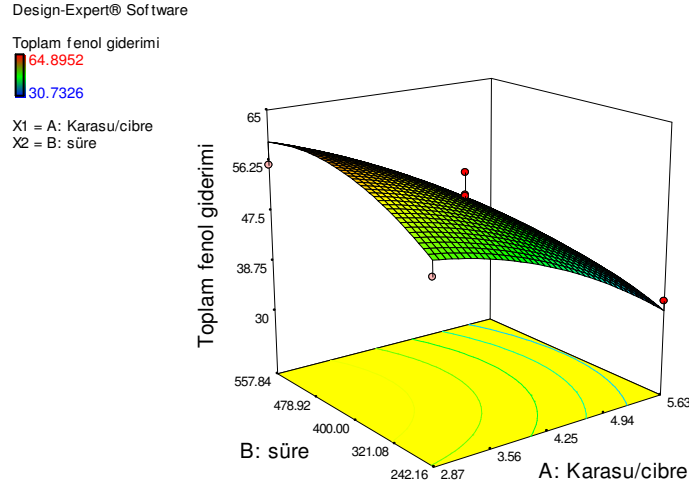
Kuadratik modele göre seçilen yüzey cevaplarının ANOVA analizine göre, ZK/cibre oranı parametresinin toplam fenol giderimine, çalkalama süresi parametresine göre önemli bir fark göstererek etki ettiği görülmektedir (Tablo 4.16). Modelin *lack of fit* değerinin önemsiz çıkması elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir. Model denklemi Eş. 4.1'de verilmiştir.

$$TF \text{ giderimi (\%)} = +9,39006733 + 9,541996561 * ZK/cibre \text{ oranı} + 0,176948763 * \text{Çalkalama süresi} - 0,009391785 * ZK/cibre \text{ oranı} * \text{Çalkalama süresi} - 1,604608761 * ZK/cibre \text{ oranı}^2 - 0,000153072 * \text{Çalkalama süresi}^2 \quad (4.1)$$

Tablo 4.16 Toplam fenol gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

Response	1	Toplam fenol giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model							
Analysis of variancetable [Partialsum of squares - Type III]							
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob>F	
	Model	1026,66	5	205,33	15	0,0013	significant
	A-ZK/cibre oranı (mL/g)	848,44	1	848,44	61,97	0,0001	
	B-Çalkalama süresi (dk)	38,17	1	38,17	2,79	0,1389	
	AB	16,77	1	16,77	1,22	0,305	
	A2	48,3	1	48,3	3,53	0,1024	
	B2	74,98	1	74,98	5,48	0,0518	
	Residual	95,84	7	13,69			
	Lack of Fit	58,56	3	19,52	2,09	0,2437	Not significant
	PureError	37,28	4	9,32			
	Cor Total	1122,5	12				

Şekil 4.9'da verilen cevap yüzey grafiği, toplam fenol gideriminin ZK/cibre oranının 3 seviyesinin altındaki değerlere yaklaştıkça doygunluğa ulaşma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde 300 st'den sonra toplam fenol giderim eğrisi doygunluğa ulaşmaktadır.



Şekil 4.9 Toplam fenol gideriminin ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi ile değişimi (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

4.1.3.2 Renk giderimi için veri analizi

Renk giderimi cevaplarının model uygunluk analizine göre, cevaplar kuadratik modele uygunmaktadır (Tablo 4.17). Model denklemleri Eş. 4.2'de verilmiştir.

$$\text{Renk giderimi (\%)} = -32,56197398 + 41,05763094 * \text{ZK/cibre oranı} + 0,095899081 * \text{Çalkalama süresi} - 0,010761612 * \text{ZK/cibre oranı} * \text{Çalkalama süresi} - 5,496600477 * \text{ZK/cibre oranı}^2 - 4,43728E-05 * \text{Çalkalama süresi}^2 \quad (4.2)$$

Tablo 4.17 Renk giderimi için olası modellerin *lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

Lack of Fit Tests						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob> F	
Linear	733,76	6	122,29	8,45	0,029	
2FI	711,74	5	142,35	9,84	0,0229	
<u>Quadratic</u>	<u>138,72</u>	<u>3</u>	<u>46,24</u>	<u>3,2</u>	<u>0,1456</u>	<u>Suggested</u>
Cubic	109,28	1	109,28	7,55	0,0515	Aliased
PureError	57,89	4	14,47			
"Lack of Fit Tests": Want the selected model to have insignificant lack-of-fit.						

Kuadratik modele göre seçilen yüzey cevaplarının ANOVA analizine göre, ZK/cibre oranının renk giderimine çalkalama süresine göre önemli bir farkla etki ettiği görülmektedir (Tablo 4.18). Modelin *lack of fit* değerinin önemsiz olması, elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir.

Tablo 4.18 Renk gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

2	Renk giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partialsum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob> F	
Model	2000,39	5	400,08	14,24	0,0015	significant
A-ZK/cibre oranı (mL/g)	1366,72	1	1366,72	48,66	0,0002	
B-Çalkalama süresi (dk)	38,63	1	38,63	1,38	0,2792	
AB	22,01	1	22,01	0,78	0,4054	
A2	566,72	1	566,72	20,18	0,0028	
B2	74,98	1	74,98	5,48	0,0518	
Residual	95,84	7	13,69			
Lack of Fit	58,56	3	19,52	2,09	0,2437	Not significant
PureError	37,28	4	9,32			
Cor Total	1122,5	12				

Şekil 4.10'da verilen cevap yüzey grafiğinden görüldüğü gibi, renk giderimi ZK/cibre oranı parametresi seviyesi 3'ün altında doygunluğa ulaşmıştır. Çalkalama süresinde ise 200-400 dk aralığında önemli bir değişim olmamaktadır.

Design-Expert® Software

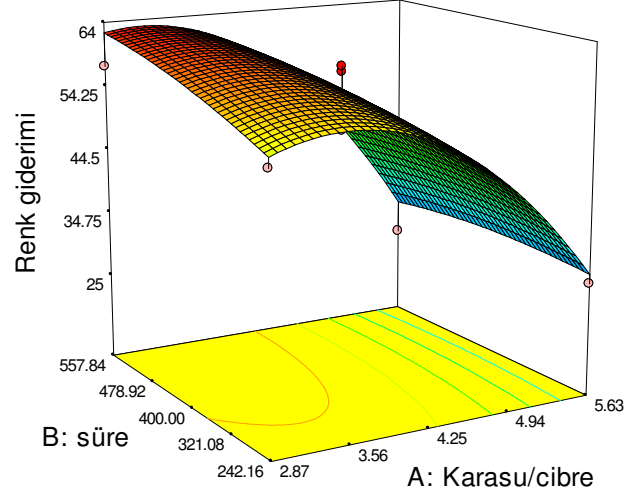
Renk giderimi

63.6686

25.2125

X1 = A: Karasu/cibre

X2 = B: süre



Şekil 4.10 Renk giderimine ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi etkisi (Merkezi Kompozit Tasarımı I)

4.1.3.3 ZK/cibre oranı ve çalkalama süresi için optimizasyon

ZK/cibre oranı ve çalkalama süresinin zeytin karasuyundan toplam fenol giderimi ve renk giderimine etkisini veren modeller (Eş. 4.1 ve 4.2) belirlendikten sonra, bu çıktıları en iyi yapan parametre değerlerini bulmak amacıyla optimizasyon çalışması yapılmış ve ZK/cibre oranı=2.11 mL/g ve çalkalama süresi=528 dk değerlerinde TF giderimi %62.67 ve renk giderimi %55.84 olarak bulunmuştur. Optimizasyon sonucu bulunan ZK/cibre oranı, denenen aralığın dışındadır. Ayrıca, ZK/cibre oranı >3 olduğu durumda karışım aşırı yoğun olmakta ve çalkalama aşamasında fiziksel zorluk doğurmaktadır. Yani ZK/cibre oranının 3'den küçük olması uygulanabilir değildir. Bu nedenle ZK/cibre oranının bulunan optimum değere en yakın ve uygulanabilen bir değere olan 3'de sabit tutulmasına karar verilmiştir. Ayrıca, çalkalama süresi için de optimum nokta olarak hesaplanan değer çok uzundur. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşamasında, sadece çalkalama süresi parametre alınarak tek faktörlü merkezi kompozit tasarım yapılmış ve toplam fenol giderimi ile renk giderimini en yüksek yapacak çalkalama süresi araştırılmıştır.

4.1.4 Merkezi Kompozit Tasarımı II: Çalkalama süresi etkisi

Yapılan faktöriyel tasarımlar ve iki faktörlü merkezi kompozit tasarım deneyleri sonucu zeytin karasuyundan toplam fenol giderimi ve renk gideriminde en önemli parametrenin çalkalama süresi olduğu belirlenmiştir. Çalışmanın son aşamasında bu parametre ile tek faktörlü bir merkezli kompozit tasarımı yapılmıştır. Bu tasarımda, bu aşamaya kadar en uygun oldukları belirlenen ZK/cibre oranı=3 mL/g, çalkalama sıcaklığı= 30 °C ve cibrenin parçalama süresi 240 s sabit değerleri kullanılmıştır. Tek faktörlü tasarım için çalkalama süresi parametre seviyesi olarak ise 30-400 dk aralığı seçilmiştir. Tablo 4.19'da incelenen parametre seviyeleri verilmiştir. Tablo 4.20'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.19 “Merkezi Kompozit Tasarımı II”de incelenen faktör seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1	-0,5	0	0,5	1
A: Çalkalama süresi (dk)	30	122	215	307,5	400

Tablo 4.20 “Merkezi Kompozit Tasarımı II” deney tasarımı ve elde edilen cevaplar

Deney #	Çalkalama süresi (dk)	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	30	53,5954	51,3825
2	30	53,3023	52,4578
3	122,5	62,0000	62,0000
4	307,5	66,0000	65,0000
5	400	67,2012	66,9739
6	400	65,0000	66,9739
7	215	65,0000	64,7465

Çalkalama süresi etkisinin incelendiği 7 deney sonunda elde edilen cevaplar (TF giderimi ve renk giderimi) ile veri analizleri yapılmış ve bu cevaplar üzerine incelenen parametrenin etkisini gösteren modeller değerlendirilerek cevap yüzeyleri oluşturulmuştur.

4.1.4.1 Toplam fenol giderimi için veri analizi

Elde edilen veriler, toplam fenol giderim cevaplarının kuadratik modele uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.21). Model, Eş. 4.3 ile gösterilmiştir.

$$TF \text{ giderimi (\%)} = +50,84057819 + 0,100900765 * \text{çalkalama süresi} - 0,000158381 * \text{çalkalama süresi}^2 \quad (4.3)$$

Tablo 4.21 Toplam fenol giderimi için olası modellerin *lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

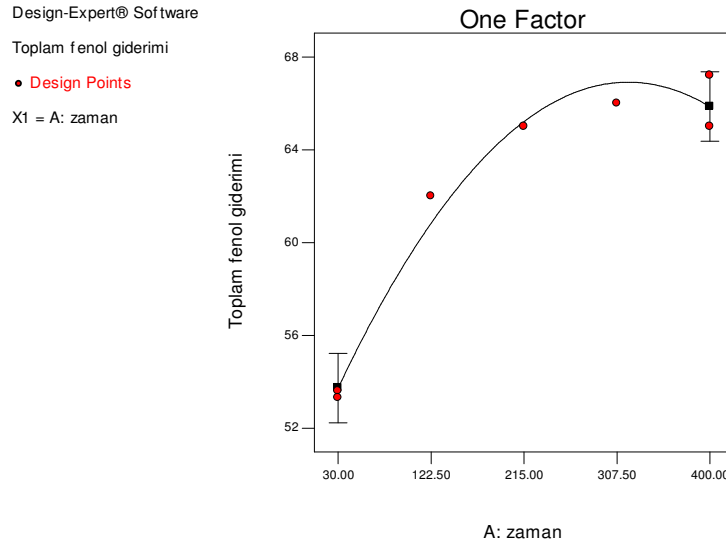
Lack of Fit Tests							
		Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob> F		
Linear	38,7	3	12,9	10,46	0,0885		
<u>Quadratic</u>	<u>2,49</u>	<u>2</u>	<u>1,25</u>	<u>1,01</u>	<u>0,4974</u>	<u>Suggested</u>	
Cubic	0,087	1	0,087	0,071	0,8154		
PureError	2,47	2	1,23				

Verilerin ANOVA analizine göre modelin *lack of fit* değerinin önemsiz olması, elde edilen cevap yüzeylerinin seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.22).

Tablo 4.22 Toplam fenol gideriminde cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

Response	1	Toplam fenol giderimi					
ANOVA for Response Surface Quadratic Model							
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]							
		Sum of		Mean	F	p-value	
	Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
	Model	201,87	2	100,93	81,45	0,0006	significant
	A-zaman	165,66	1	165,66	133,68	0,0003	
	A2	36,2	1	36,2	29,21	0,0057	
	Residual	4,96	4	1,24			
	Lack of Fit	2,49	2	1,25	1,01	0,4974	not significant
	Pure Error	2,47	2	1,23			
	Cor Total	206,82	6				

Şekil 4.11'de toplam fenol gideriminin zaman ile değişim grafiği yer almaktadır.



Şekil 4.11 Çalkalama süresi ile toplam fenol gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

4.1.4.2 Renk giderimi için veri analizi

Renk giderimi cevaplarının model uygunluk analizine göre, cevaplar kübik modele uygundur (Tablo 4.23). Elde edilen model, Eşit. 4.4 ile verilmiştir.

$$\text{Renk giderimi (\%)} = +46,36896906 + 0,207467063 * \text{çalkalama süresi} - 0,000771172 * \text{çalkalama süresi}^2 + 9,53285 \text{ E-}07 * \text{çalkalama süresi}^3 \quad (4.4)$$

Tablo 4.23 Renk giderimi için olası modellerin *lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

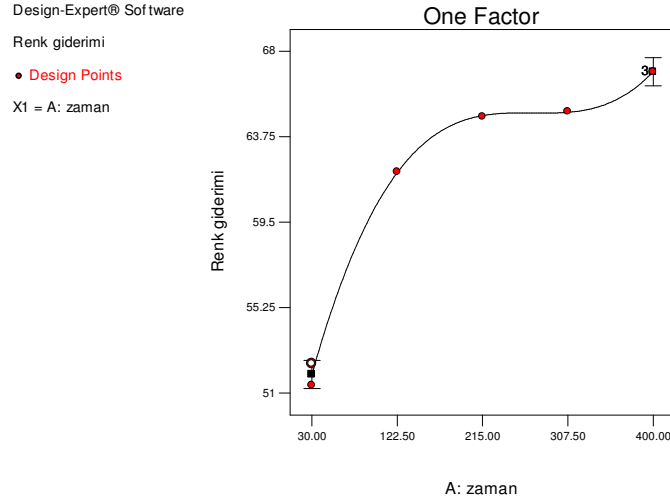
Model Summary Statistics						
	Std.		Adjusted	Predicted		
Source	Dev.	R-Squared	R-Squared	R-Squared	PRESS	
Linear	3	0,8316	0,7979	0,69	82,75	
Quadratic	1,56	0,9637	0,9455	0,9125	23,35	
<u>Cubic</u>	<u>0.44</u>	<u>0.9978</u>	<u>0.9956</u>	<u>0.9912</u>	<u>2.34</u>	<u>Suggested</u>

Verilerin ANOVA analizine göre modelin *lack of fit* değerinin önemsiz olması, elde edilen cevap yüzeylerinin seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir (Tablo 4.24).

Tablo 4.24 Renk gideriminde cevap yüzey kübik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

Response	2	Renk giderimi					
ANOVA for Response Surface Cubic Model							
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]							
	Sum of		Mean	F	p-value		
Source	Squares	df	Square	Value	Prob> F		
Model	266,38	3	88,79	456,28	0,0002		significant
A-zaman	0,62	1	0,62	3,19	0,1722		
A2	35,26	1	35,26	181,2	0,0009		
A3	9,11	1	9,11	46,8	0,0064		
Residual	0,58	3	0,19				
Lack of Fit	5,69E+00	1	5,69E+00	0.020	0,9013		not significant
Pure Error	0,58	2	0,29				
Cor Total	266,96	6					

Şekil 4.12'de renk gideriminin çalkalama süresi ile değişim grafiği yer almaktadır.



Şekil 4.12 Çalkalama süresi ile renk gideriminin değişimi için deneysel veriler ve model eğrisi (Merkezi Kompozit Tasarımı II)

4.1.4.3 Çalkalama süresi için optimizasyon

Çalkalama süresinin zeytin karasuyundan toplam fenol giderimi ve renk giderimine etkisini veren modeller belirlendikten sonra, bu çıktıları en iyi yapan çalkalama süresini bulmak üzere optimizasyon yapılmıştır. Buna göre, çalkalama süresi $t = 323$ dk'da % 66.9 toplam fenol giderimi ve % 65.05 renk giderimi sağlanacaktır (Tablo 4.25).

Tablo 4.25 Optimizasyon tablosu(Merkezi Kompozit Tasarımı II)

Constraints							
			Lower	Upper	Lower	Upper	
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance	
Çalkalama süresi	is in range	30	400	1	1	3	
Toplam fenol giderimi	maximize	53,3023	67,2012	1	1	5	
Renk giderimi	maximize	51,3825	66,9739	1	1	1	
Solutions							
Number	zaman	Toplam fenol giderimi	Renk giderimi	Desirability			
1	<u>323,38</u>	<u>66,9072</u>	<u>65,0522</u>	<u>0.961</u>	<u>Selected</u>		

Optimize edilen modelinin tercih edilirlilik değeri (desirability) 0.961 olarak bulunmuştur ki bu değerin 1'e yakın olması modelin gerçeğe yakınlığını göstermektedir. Bu nedenle, son olarak modelden hesaplanan optimum koşullarda deney yapılarak modelin gerçeğe uygunluğu araştırılmıştır.

4.1.4.4 Optimum çalkalama süresinde gerçekleştirilen deneyler

Modelin gerçeğe uygunluğunun araştırılması için optimum koşullarda yapılan 5 paralel deneyin koşulları ve cevap değerleri Tablo 4.26'da verilmiştir.

Tablo 4.26 Model optimum değerlerinde gerçekleştirilen deneyler ve sonuçların model ile uyumu

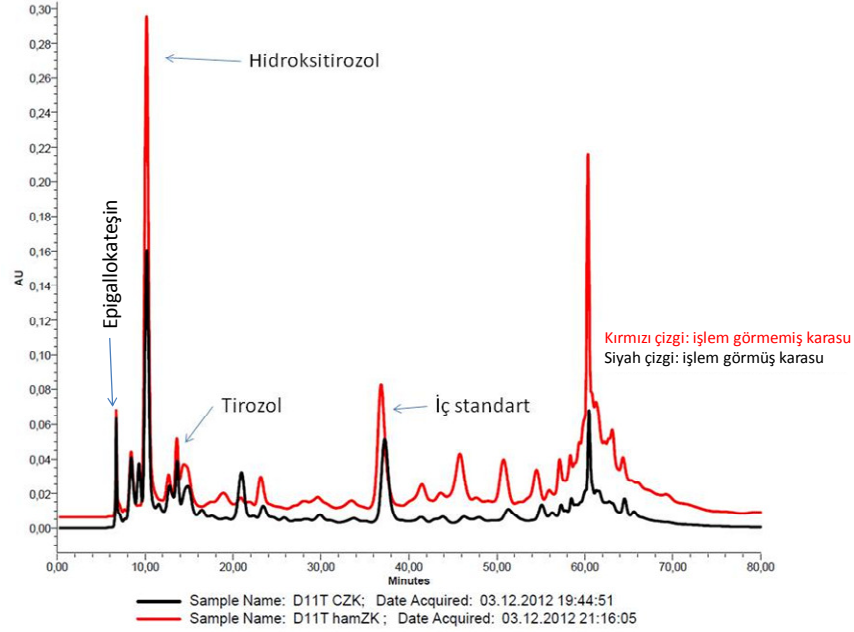
Deney #	ZK/Cibre oranı (mL/g)	Çalkalama süresi (dk)	Cibrenin parçalama süresi (s)	Çalkalama sıcaklığı (°C)	TF giderimi (%)	Renk giderimi (%)
1	3	323	240	30	64,0771	71,6428571
2	3	323	240	30	64,66121	72,2142857
3	3	323	240	30	66,64720	74,3928571
4	3	323	240	30	62,26636	73,2500000
5	3	323	240	30	64,41297	72,0714286
Standart sapma					1,563182	1,10858201
Ortalama değerler					64,41297	72,7142857
Model değerleri					66,90720	65,0522000
Fark					% 3.87	% 9,74

Optimum koşulda yapılan deney verilerinin ortalamaları, model kullanılarak hesaplanan toplam fenol giderimi değerlerinden %3.87, renk giderimi değerlerinden ise %9.74 farklıdır. Farkların az olması -model sonuçları ile deneysel verilerin yakınlığı (özellikle TF giderimi açısından) zeytin karasuyundaki fenolik ve renk verici maddelerin zeytin karasuyuna geçmesi için yapılan tasarımın iyi olduğunu ve sonuçların uygulanabilir olduğunu göstermiştir. Zeytin karasuyunda toplam fenol gideriminin, renk giderimi ile paralel olmadığı daha önceki çalışmalarımızdan bilinmektedir. Yapıda bulunan farklı maddeler de koyu renge sebep olabilmektedir. Bu nedenle, projenin amacı da göz önüne alınarak, gerçek değerler ile uyum sağlayan toplam fenol giderimine ait denklem ve koşullar uygun olarak değerlendirilmiştir.

4.1.5 Optimum koşullarda cibre ile muamele edilmiş zeytin karasuyunun fenolik bileşen dağılımındaki değişim

Belirlenen en uygun koşullarda cibre ile muamele edilen zeytin karasuyunun toplam fenol derişiminde deneysel olarak %64 azalma sağlanmıştır. Bu azalmanın zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelere göre dağılımını bulmak amacıyla zeytin karasuyunun cibre ile muamele edilmeden ve edildikten sonra HPLC analizleri yapılmıştır. Şekil 4.13'de gösterilen karşılaştırmalı kromatograma göre ZK'da bulunan fenoller arasında (analiz koşullarında görülebilecek) bazıları yok olmuş ve bazılarının da miktarları azalmıştır. Bu fenoller arasında antioksidan özellikte olan hidroksitirozol ve tirozolin cibre ile muamele edildikten sonra zeytin

karasuyundaki miktarlarının azalması önemlidir. Ayrıca kromatogramda cibreden ZK'ya geçen bir fenolik tespit edilmemiştir.



Şekil 4.13 Cibre ile muameleden önce ve sonra zeytin karasuyunun HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması

4.2 Zeytin Karasuyu ile Muamele Edilmiş Cibreden Çözücü Ekstraksiyonu ile Fenollerin Geri Kazanımında Optimum Koşulların Belirlenmesi

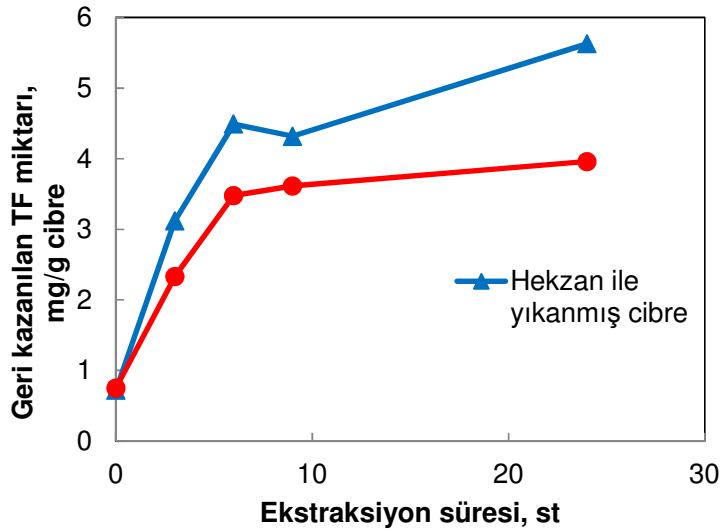
Zeytin karasuyun ile cibrenin muamelesi için belirlenen optimum koşullarda (cibrenin parçalanma süresi=240 s, ZK/cibre oranı=3 mL/g, cibre ile zeytin karasuyunun birlikte çalkalanma süresi=323 dk ve çalkalama sıcaklığı=30 °C) karasuda bulunan fenolik maddelerin cibreye geçmesi sağlandıktan sonra muamele edilmiş cibredeki tüm fenolik maddelerin çözücü ekstraksiyonu ile geri kazanılması için en uygun koşullar araştırılmıştır.

4.2.1 n-Hekzan ile yağ giderimi etkisi

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibredeki fenolik maddelerin çözücü ile geri kazanımından önce cibrede bulunan ve ayrıca zeytin karasuyundan cibreye geçen yağın n-hekzan ile uzaklaştırılmasının geri kazanım üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ZK ile muamele edilmiş ve HCl ile asitlendirilmiş (pH~1.5) cibre, her biri 30 dk olan üç adımda (2

kere 4:1 (h/a) ve bir kere 3:1 (h/a) n-hekzan ile yıkanmıştır. Sonrasında cibreler süzölmüş ve etil alkol:su (1:1) ile çözücü ekstraksiyonu yapılmış ve belirli zaman aralıkları ile (t=0, 3, 6, 9 ve 24 st) alınan örneklerde toplam fenol miktarı belirlenmiştir. Ayrıca karşılaştırma amaçlı olarak, aynı cibre örneği n-hekzan ile yıkanmadan aynı koşullarda etil alkol:su (1:1) ile muamele edilmiştir.

n-Hekzan ile yıkanmış ve yıkanmamış “ZK ile muamele edilmiş cibreden” etil alkol:su (1:1) çözücüsüne ekstrakte olan toplam fenol miktarının ekstraksiyon süresi ile değişimi Şekil 4.14’de verilmiştir. Buna göre, n-hekzan ile yıkama, ZK muamele edilmiş cibreden fenolik maddelerin çözücü ile geri kazanımında olumlu etki göstermektedir. n-Hekzan ile yıkanmış cibreden yıkanmamış cibreye göre t= 24 st sonunda (yaklaşık denge) %42 daha fazla toplam fenol geri kazanılmıştır. Bu nedenle, fenol geri kazanımında kullanılacak çözücü seçimi deneylerinde n-hekzan ile yıkanmış örnekler kullanılmıştır.



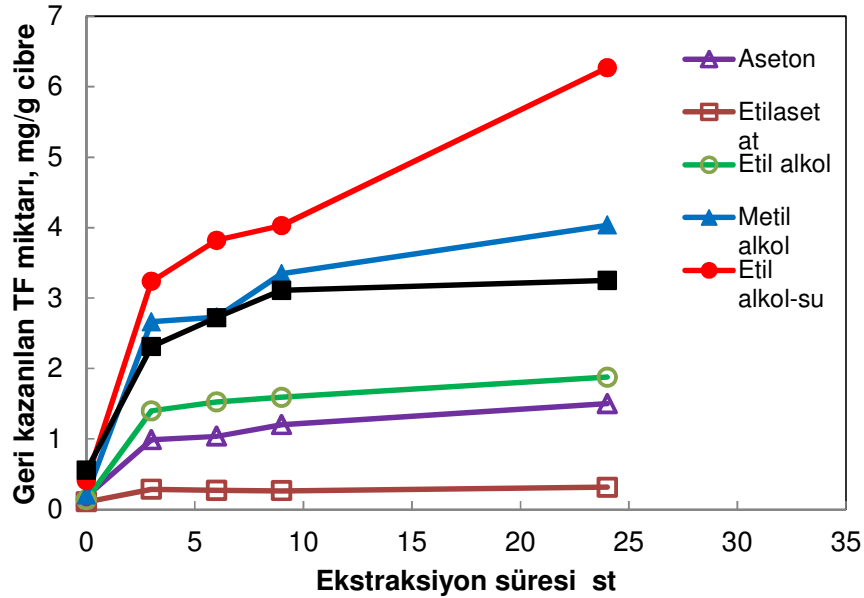
Şekil 4.14 ZK muamele edilmiş cibrenin n-hekzan ile yıkanmasının etil alkol:su (1:1) çözücüsü kullanılarak yapılan ekstraksiyonda toplam fenol geri kazanımına etkisi (çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm)

4.2.2 Çözücü türü etkisi

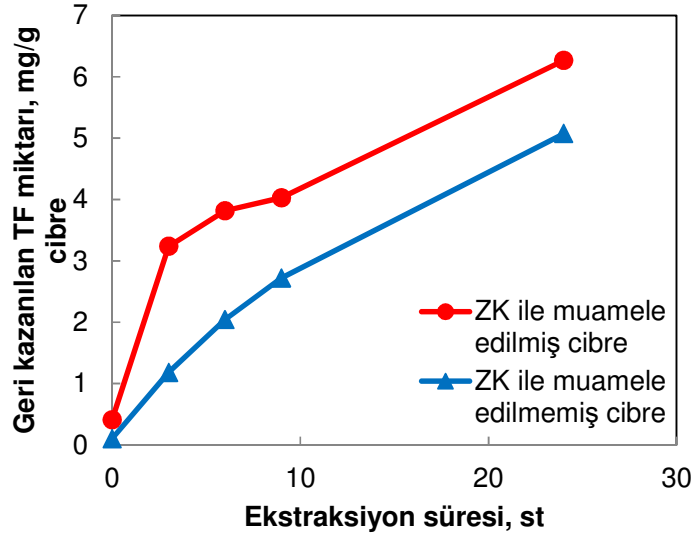
Asitlendirilmiş ve n-hekzan ile yıkanmış olan “ZK ile muamele edilmiş cibre” örnekleri, yapılarında bulunan ve zeytin karasuyundan yapılarına geçen fenolik maddelerin geri kazanımı amacıyla çözücü ekstraksiyonuna tabi tutulmuşlardır. Bu amaçla birim cibre kuru kütlesinden en fazla toplam fenol geri kazanımını sağlayacak çözücü belirlemek üzere 6

ayrı çözücü ile ekstraksiyon yapılmıştır. Kullanılan çözücüler; etil alkol:su (1:1), etil alkol, su, metil alkol, etil asetat ve asetonur. Organik çözücüler; suda tamamen çözünen (etil alkol (logP=-0.24), metil alkol (logP=-0.76), aseton (logP=-0.23)) ve kısmen çözünen (etil asetat, logP=0.68)) gruplardan seçilmiştir (FABER, 2000). Ekstraksiyon ortamlarından belirli zaman aralıkları ile (t=0, 3, 6, 9 ve 24 st. ler) alınan örneklerdeki toplam fenol miktarının ekstraksiyon süresi ile değişimi Şekil 4.15’de verilmiştir. Buna göre çözücülerin geri kazanımda etkinlik sırası etil alkol:su (1:1) > metil alkol > su > etil alkol > aseton > etil asetat şeklindedir. Bazı çözücülerde sapma olmakla birlikte tüm ekstraksiyonlarda yaklaşık 5 st’den sonra dengeye gelinmiştir.

Etil alkol:su (1.1) kullanılarak “ZK ile muamele edilmemiş cibrede” bulunan fenollerin de aynı koşullarda geri kazanımı incelenmiş ve “ZK ile muamele edilmiş cibre” ve “ZK ile muamele edilmemiş cibreden” geri kazanılan toplam fenol miktarları Şekil 4.16’da karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Buna göre, “ZK ile muamele edilmiş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarı “ZK ile muamele edilmemiş” cibreden kazanılana göre t=24 st sonunda %23 fazladır ki bunun nedeni, zeytin karasuyundan cibreye geçen fenollerdir.



Şekil 4.15 Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden fenolik maddelerin geri kazanımı için yapılan çözücü ekstraksiyonunda çözücü türünün etkisi (çözücü/cibre: 10 (h/a), T=30 °C, N=150 rpm)



Şekil 4.16 “ZK ile muamele edilmiş” ve “ZK ile muamele edilmemiş” cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarlarının karşılaştırılması (çözücü: etil alkol:su (1:1), çözücü/cibre: 10 (h/a); T=30 °C, N=150 rpm)

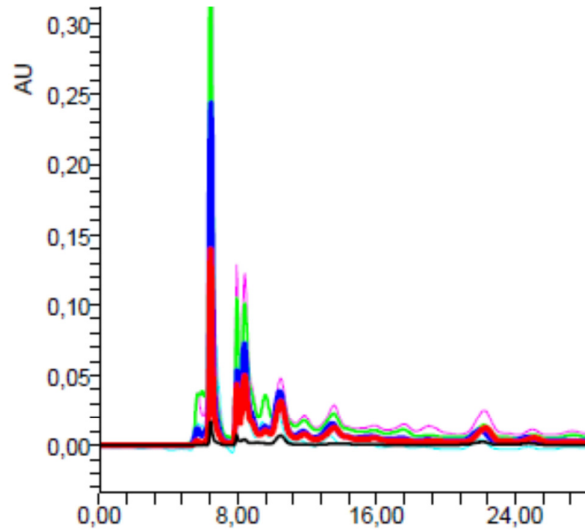
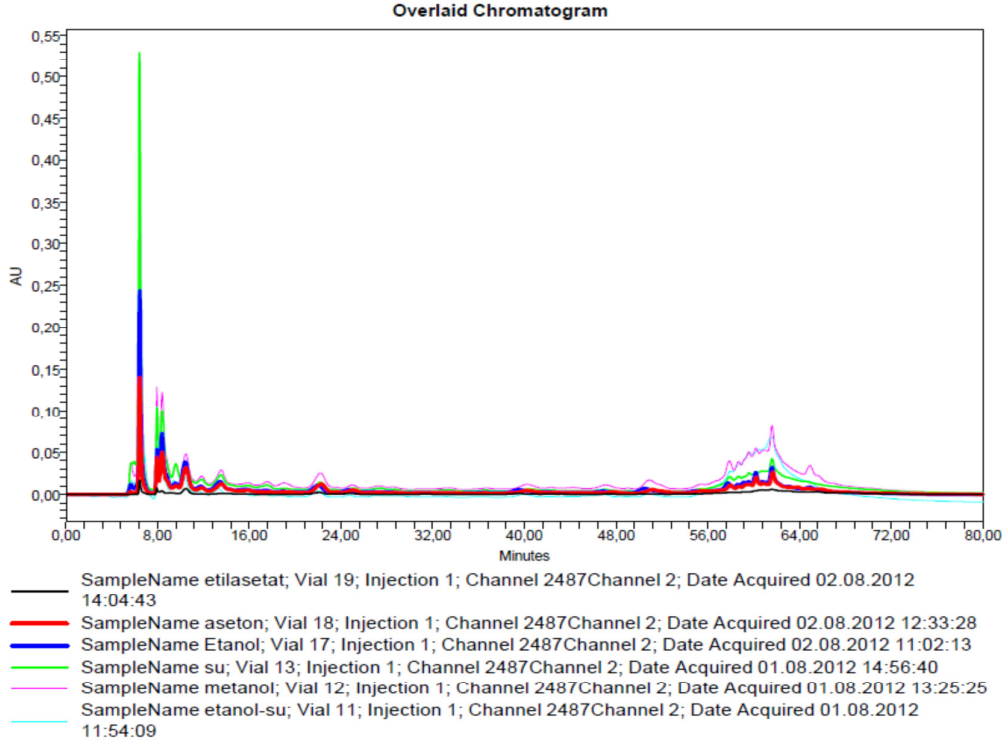
Ekstraksiyonda kullanılan çözücü türünün geri kazanılan fenol çeşitliliğine etkisi ise kalitatif HPLC analizleri ile araştırılmıştır. Şekil 4.17’de tüm çözücü ekstraksiyonlarının t=24 st örneklerine ait karşılaştırmalı HPLC kromatogramları yer almaktadır. Buna göre düşük ekstraksiyon özelliği gösteren etil asetat ve aseton ile geri kazanılan fenolik madde sayısı da azdır.

EK-4’de, her bir çözücü ile geri kazanılan fenolik maddelerin zeytin karasuyunda fenolik maddeler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramları ayrı ayrı verilmiştir.

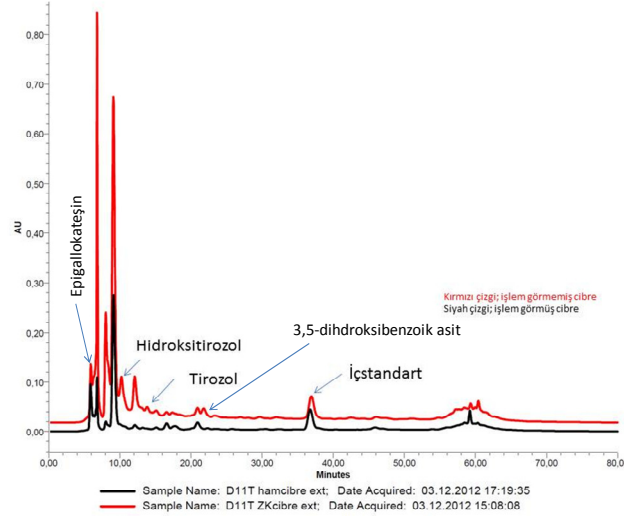
Şekil 4.18’de “ZK ile muamele edilmiş cibre” ve “ZK ile muamele edilmemiş cibre” örneklerinin etil alkol:su (1:1) ekstraktlarının t=24 st HPLC kromatogramları karşılaştırılmıştır. Buna göre, cibre zeytin karasuyu ile muamele edildikten sonra geri kazanılan fenolik madde sayısı daha fazladır. Zeytin karasuyunun önemli fenolikleri hidroksitirozol ve tirozolün de cibreye geçtiği görülmektedir.

Şekil 4.19’da, zeytin karasuyunda bulunan ve cibreden etil alkol:su (1:1) ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları verilmiştir. Bu kromatogramlar, zeytinkarasuyu ve cibredeki fenolik madde dağılımının önemli ölçüde farklı olduğunu

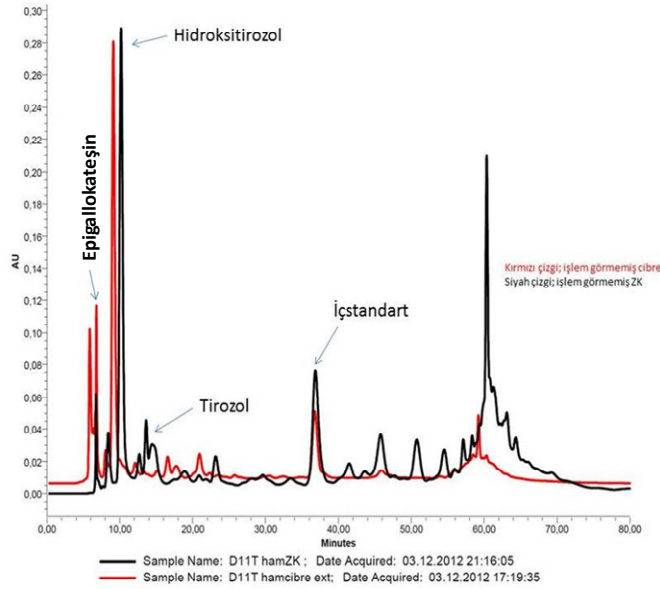
göstermektedir. Zeytin karasuyunun önemli fenolik maddeleri hidrokstitirozol ve tirozol cibrede bulunmamaktadır.



Şekil 4.17 Çözücü ekstraksiyonu ile “ZK ile muamele edilmiş cibreden” geri kazanılan fenolik madde çeşitliliğinin çözücü türü ile değişimini gösteren karşılaştırmalı HPLC kromatogramları
a) t=0-80 dk, b) t=0-30 dk



Şekil 4.18 “ZK ile muamele edilmiş cibre”den ve “ZK ile muamele edilmemiş cibre”den etil alkol:su (1.1) çözücüsü ile geri kazanılan fenolik maddelerin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları



Şekil 4.19 Zeytin karasuyunun ve etil alkol:su (1:1) ile ekstrakte edilmiş cibrenin karşılaştırmalı HPLC kromatogramları

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarının çözücü türü ile değişimi yanı sıra, geri kazanılan çözeltilerde toplam antioksidan aktivitesinin çözücü türü ile değişimi incelenmiştir. Her bir çözücü ile ekstraksiyonun t= 24 st de geri kazanılan fenollerin toplam antioksidan (TA) aktivite değerleri Tablo 4.27’de verilmiştir. Tablo 4.27’de ayrıca tüm çözücüler ile t=24 st de geri kazanılan toplam fenol miktarları da yer almaktadır. Buna göre çözücülerin antioksidan aktivitelerinin korunmasındaki etkinlik sırası su > etil alkol:su (1:1) > metil alkol > etil alkol > aseton > etil asetat şeklindedir. Bu sıra, su hariç, çözücülerin TF geri kazanım etkinlikleri ile aynıdır. Su ile ekstraksiyonda gözlenen yüksek antioksidan aktivitesi, fenolikler dışında suda çözünen ve antioksidan aktivite gösteren diğer maddeler nedeniyle olabilir. En iyi çözücü etil alkol:su (1:1) kullanıldığı zaman ise geri kazanılan fenolik karışımda en yüksek antioksidan aktivitesi elde edilmiştir.

Tablo 4.28’de, zeytin karasuyu ile muamele edilmiş ve edilmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların t=24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri verilmiştir. Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarı daha yüksek olmasına karşın, her iki örneğin de toplam antioksidan aktivite değerleri aynıdır.

Tablo 4.27 Farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyonların t= 24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri

Çözücü	TA aktivitesi (% inhibisyon)	Geri kazanılan TF miktarı (mg/g cibre)
Su	89	3.25
Etil alkol:su	85	6.27
Metil alkol	83	4.03
Etil alkol	78	1.88
Aseton	71	1.50
Etil asetat	12	0.31

Tablo 4.28 ZK ile muamele edilmiş cibre ve ZK ile muamele edilmemiş cibreden etil alkol:su (1:1) ile yapılan ekstraksiyonların t=24 st örneklerinde geri kazanılan toplam fenol miktarı ve toplam antioksidan aktiviteleri

Örnek	TA aktivitesi (% inhibisyon)	Geri kazanılan TF miktarı (mg/g cibre)
ZK ile muamele edilmiş cibre	85	6.27
ZK ile muamele edilmemiş cibre	86	5.07

4.2.3 Çözücü ekstraksiyonu koşullarının optimize edilmesi

Zeytin karasuyu ile muamele edilmiş cibreden fenolik maddelerin en fazla geri kazanıldığı etil alkol:su (1:1) ile yapılacak çözücü ekstraksiyonunda en uygun koşulları bulmak amacıyla yapılan denemelerde çözücü/cibre oranı (mL/g) ve sıcaklık ($^{\circ}$ C) etkileri incelenecek parametreler olarak seçilmiştir. Etil alkol:su (1.1) ile yapılan ekstraksiyonda yaklaşık t=5 st'de dengeye gelindiği deneysel olarak gözlemlendiği için (Şekil 4.16) ve ayrıca ön deneme tasarımlarında t=2-24 st arasında yapılan deneylerde de t=5 st sonrasında cevap üzerine etkisinin çok az olduğu belirlendiği için nedeniyle ekstraksiyon süresi parametre olarak seçilmemiş ve deneyler t=5 st sabit ekstraksiyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Cevap yüzey yöntemine göre yapılan merkezi 2 faktörlü merkezi kompozit tasarımda çözücü/cibre oranı (mL/g) ve sıcaklık ($^{\circ}$ C) parametreleri faktör, geri kazanılan toplam fenol miktarı (mg/g) ise cevap olarak seçilmiştir (Merkezi Kompozit Tasarımı III).

Tablo 4.29'da incelenen parametreler (faktörler) ve seviyeleri yer almaktadır. Tablo 4.30'de ise, oluşturulan deney tasarım matrisi ve deneyler sonunda elde edilen cevaplar yer almaktadır.

Tablo 4.29 “Merkezi Kompozit Tasarımı III” de incelenen faktörler ve seviyeleri

Faktör	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye	Kodlanmış seviye
	-1,267103	-1	0	1	1,267103
A: Çözücü/cibre oranı (mL/g)	10,52765	14	27	40	43,47235
B: Sıcaklık (°C)	10,99345	15	30	45	49,00655

Tablo 4.30 “Merkezi Kompozit Tasarımı III”de deney matrisi ve elde edilen cevaplar

Deney #	Çözücü/cibre oranı (mL/g)	Sıcaklık (°C)	Geri kazanılan TF (mg/g)
1	14	15	6,512821
2	40	15	8,987179
3	14	45	11,44872
4	40	45	11,88462
5	10,52765	30	7,24359
6	43,47235	30	10,29487
7	27	10,99345	7,525641
8	27	49,00655	12,23077
9	27	30	11,25641
10	27	30	10,53846
11	27	30	10,57692
12	27	30	11,87179
13	27	30	10,82051
13	30	43	11,08974
13	30	43	12,85897

Yapılan 13 deney sonucunda elde edilen veriler istatistiksel analizler ile değerlendirilmiş ve incelenen faktörlerin cevaplara etki değerleri bulunmuştur. Geri kazanılan toplam fenol miktarı için yapılan değerlendirmeler sonucunda, bu değere daha fazla etki eden parametre çözücü/cibre oranı olarak belirlenmiştir.

4.2.3.1 Geri kazanılan toplam fenol miktarı için veri analizi

Geri kazanılan toplam fenol miktarı cevaplarının model uygunluk analizine göre, cevaplar kuadratik modele uygun bulunmuştur (Tablo 3.31).

Tablo 4.31 Geri kazanılan toplam fenol miktarı için olası modellerin *lack of fit* testi ile deneysel verilere uygunluk tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III)

Lack of Fit Tests						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Linear	9,880835	6	1,646806	5,273246	0.0647	
2FI	8,842004	5	1,768401	5,662605	0.0589	
Quadratic	1,406408	3	0,468803	1,501155	0.3426	Suggested
Cubic	0,983608	1	0,983608	3,149618	0.1506	Aliased
Pure Error	1,249178	4	0,312295			

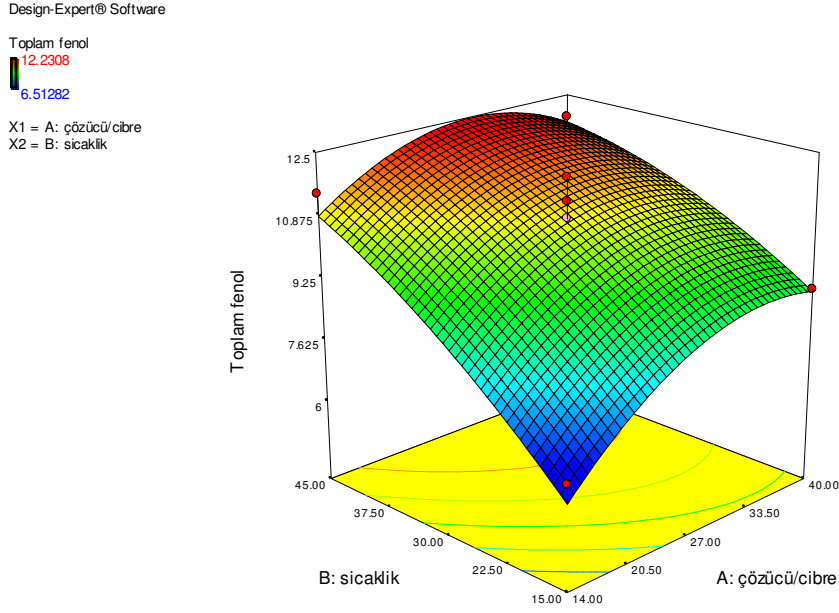
Yüzey cevabı kuadratik modelin ANOVA analizine göre ise *lack of fit* değeri önemsiz bulunmuştur (Tablo 4.32). Bu, elde edilen yüzey cevaplarının seçilen modele uygun olduğunu göstermektedir. Model denklemleri Eşit. 4.5 ile verilmiştir.

Tablo 4.32 Geri kazanılan toplam fenol miktarına cevap yüzey kuadratik modeli için ANOVA tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III)

Response	1	Geri kazanılan TF miktarı				
ANOVA for Response Surface Quadratic Model						
Analysis of variance table [Partial sum of squares - Type III]						
	Sum of		Mean	F	p-value	
Source	Squares	df	Square	Value	Prob > F	
Model	41,23358	5	8,246716	21,73796	0.0004	significant
A-çözücü/cibre oranı	6,368178	1	6,368178	16,78622	0.0046	
B-sıcaklık	26,39098	1	26,39098	69,56538	< 0.0001	
AB	1,038831	1	1,038831	2,738311	0.1419	
A ²	6,480407	1	6,480407	17,08205	0.0044	
B ²	0,955189	1	0,955189	2,517834	0.1566	
Residual	2,655586	7	0,379369			
Lack of Fit	1,406408	3	0,468803	1,501155	0.3426	not significant
Pure Error	1,249178	4	0,312295			
Cor Total	43,88917	12				

$$\text{Geri kazanılan TF miktarı} = -3,50027 + 0,508926 * \text{çözücü/cibre oranı} + 0,312881 * \text{sıcaklık} - 0,00261 * \text{çözücü/cibre oranı} * \text{sıcaklık} - 0,00663 * \text{çözücü/cibre oranı}^2 - 0,00191 * \text{sıcaklık}^2 \quad (4.5)$$

Şekil 4.20'de verilen cevap yüzey grafiğinden görüldüğü gibi çözücü/cibre oranı ve sıcaklık parametrelerinde, toplam fenol değerleri için doygunluğa ulaşılmıştır.



Şekil 4.20 Geri kazanılan toplam fenol miktarına çözücü/cibre oranı ile sıcaklık etkisi (Merkezi Kompozit Tasarımı III)

4.2.3.2 Çözücü/cibre oranı ve sıcaklık için optimizasyon

Çözücü/cibre oranı ile sıcaklığın cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarına etkisini veren model (Eş.4.5) belirlendikten sonra, bu çıktıyı en iyi yapan çözücü/cibre oranı ile sıcaklık değerlerini bulmak üzere optimizasyon yapılmıştır. Buna göre çözücü/cibre oranınının 30 mL/g ve sıcaklığın 43 °C olduğu koşullarda geri kazanılan toplam fenol miktarı 12.3423 mg/g olacaktır (Tablo 4.33)

Tablo 4.33 Optimizasyon tablosu (Merkezi Kompozit Tasarımı III)

Constraints						
		Lower	Upper	Lower	Upper	
Name	Goal	Limit	Limit	Weight	Weight	Importance
çözücü/cibre	is target = 30.00	14	40	1	1	3
sicaklik	is target = 43.00	15	45	1	1	3
Toplam fenol	maximize	6,512821	12,23077	1	1	5
Solutions						
Number	çözücü/cibre	sicaklik	Toplam fenol	Desirability		
1	30	43	12,34228	0,999999	Selected	

Optimize edilen modelinin tercih edilirlık değeri (desirability) 0.99 olarak bulunmuştur ki bu değerin 1'e yakın olması modelin gerçeğe yakınlığını göstermektedir. Bu nedenle, son olarak modelden (Eşt. 4.5) hesaplanan optimum koşullarda deney yapılarak modelin gerçeğe uygunluğu araştırılmıştır.

4.2.3.3 Optimum çözücü/cibre ve sıcaklıkta gerçekleştirilen deneyler

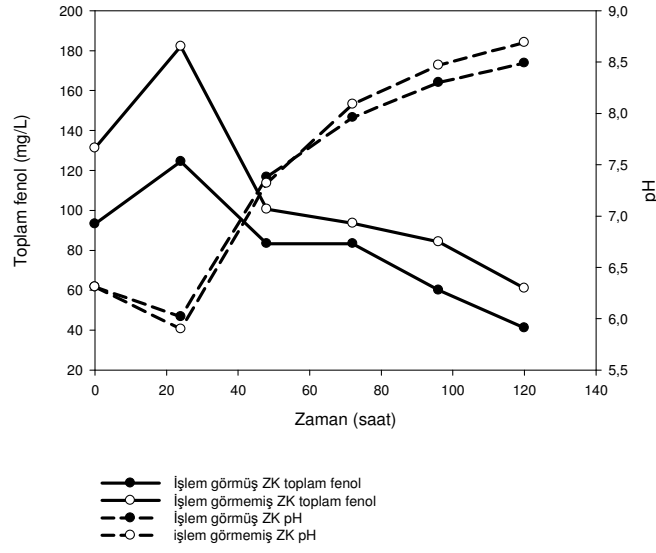
Eşt. 4.5 ile verilen modelin gerçeğe uygunluğunun araştırılması için optimum koşullarda yapılan iki paralel deneyde (çözücü/cibre oranı=30 mL/g; T=43 °C) cibreden geri kazanılan toplam fenol miktarı ortalaması 11,97436 mg/g olarak bulunmuştur. Bu, model kullanılarak hesaplanan toplam fenol miktarından (12.3423 mg/g) %2.98 farklıdır. Farkın az olması - model sonuçları ile deneysel verilerin yakınlığı- ZK ile muamele edilmiş cibreden etil alkol:su (1.1) ekstraksiyonu ile toplam fenol geri kazanımı için yapılan tasarımın iyi ve sonuçların uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

En uygun koşullarda geri kazanılan fenolik madde karışımının özellikleri incelendiği zaman ise toplam antioksidan aktivitesinin %81 (inh.) olduğu; bu karışıma zeytin karasuyundan geçen önemli antioksidan fenolik maddeler tirozol ve hidroksitirozolün miktarlarının ise sırasıyla 0.038 ve 0.1698 mg/g cibre olduğu belirlenmiştir. Bu değerler belirlenen optimum koşullarda geri kazanılan antioksidan maddelerin değerli olduğunu göstermektedir.

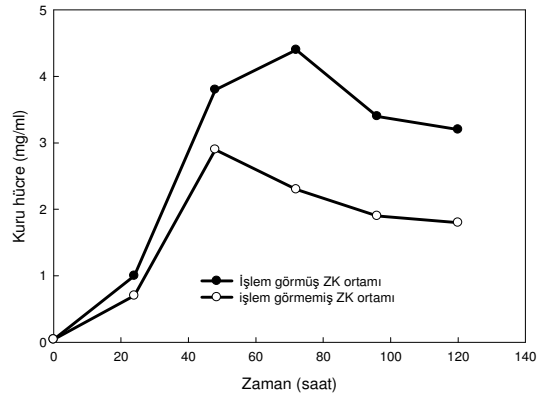
4.3 Optimum Koşullarda Cibre ile Muamele Edilmiş Zeytin Karasuyunun *R. glutinis* ile Biyoarıtımı

Belirlenen en uygun koşullarda cibre ile muamele edilerek toplam fenol derişimi düşürülmüş olan zeytin karasuyu, önce %10 ve %20 değerlerine seyreltilerek *R. glutinis* ile biyoarıtım denemeleri yapılmıştır. 120 st sürdürülen biyoarıtımların sonunda ulaşılan toplam fenol giderimleri %10 ve %20 ZK ortamları için sırasıyla %59 ve %73'dür. Bu değerler, karasuyun cibre ile muamele edilerek biyoarıtıma tabi tutulduğu zaman yüksek değerlerde fenol giderimi sağlanabileceğini göstermiştir.

Biyoarıtım çalışmaları, muamele edilmemiş ZK ile karşılaştırmalı olarak sürdürülmüştür. Bu amaçla "cibre ile muamele edilmiş ZK" ve "cibre ile muamele edilmemiş ZK" aynı oranda (%25) seyreltilerek ve üre ile desteklenerek 120 st süre ile biyoarıtımlar yapılmıştır. Şekil 4.21'de her iki ortam için pH ile toplam fenol derişiminin zaman ile değişimleri yer almaktadır. Buna göre, zaman ile ortam pH değeri ile toplam fenol derişimi uyum içinde değişmiş ve pH artarken toplam fenol derişimi düşmüştür. 120 st biyoarıtım sonunda cibre ile muamele edilmiş ZK ortamında toplam fenol %55 azalarak 41 g/L ye ve muamele edilmemiş ZK ortamında toplam fenol %53 azalarak 61 g/L ye düşmüştür. Şekil 4.22'de ise aynı biyoarıtımlarda zaman ile kuru hücre derişiminin zamanla değişimi yer almaktadır. Cibre ile muamele edilmiş ZK ortamında –başlangıç substrat toplam fenol derişimi daha az olmasına karşın- çoğalan mikroorganizma miktarı daha fazladır. Cibre ile muamele edilmemiş ZK ile en fazla 2.9 mg/ml hücre derişimine çıkılırken, bu değer cibre ile işlem görmüş ZK'da 4.4 mg/mL'dir. Bu, zeytin karasuyundaki bazı fenolik maddelerin cibreye geçmesi ile hücre üzerine olan inhibisyon etkinin azaldığını ve hücrelerin daha çok çoğalabildiğini göstermektedir. Buna karşın, her iki ortamda çoğalan hücreler zeytin karasuyunu arıtımında benzer etkinliği göstermişlerdir.



Şekil 4.21 *R. glutinis* ile "Cibre ile muamele edilmiş ZK" ve "cibre ile muamele edilmemiş ZK" nın biyoarıtımında toplam fenol derişimi ve ortam pH'ının zamanla değişimi (T=30 °C, N= 150 rpm, muamele edilmiş ZK: TF₀= 93.2 mg/L, üre: 2.27 g/L, muamele edilmemiş ZK: TF₀= 131.3 mg/L, üre: 2.27 g/L)



Şekil 4.22 *R. glutinis* ile "Cibre ile muamele edilmiş ZK" ve "cibre ile muamele edilmemiş ZK" nın biyoarıtımında kuru hücre derişiminin zamanla değişimi değişimi (T=30 °C, N= 150 rpm, muamele edilmiş ZK: TF₀= 93.2 mg/L, üre: 2.27 g/L, muamele edilmemiş ZK: TF₀= 131.3 mg/L, üre: 2.27 g/L)

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Zeytin karasuyunun biyoarıtımdan önce üzüm cibresi ile muamele edilerek toplam fenol derişiminin düşürülmesi ve cibrede bulunan fenolik maddelerin zeytin karasuyundan gelen fenolik maddeler ile birlikte geri kazanımı ile yüksek antioksidan özellikte fenolik madde karışımı eldesini amaçlayan projede herbir işlem için belirlenen optimum koşullar ve elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

Zeytin karasuyu ile cibrenin muamelesi için en iyi koşullar: Cibrenin parçalanma süresi=240 s, ZK/cibre oranı=3 mL/g, cibre ile zeytin karasuyunun birlikte çalkalanma süresi=323 dk ve çalkalama sıcaklığı (N=150 rpm)=30 °C . Bu koşullarda zeytin karasuyunun cibre ile muamelesi sonucu %64 TF giderimi ve % 72 renk giderimi elde edilmiştir. Zeytin karasuyunun cibre ile muamelesine yönelik literatürde herhangi bir çalışma yer almamaktadır. Ancak, ZK ticari reçineler başta olmak üzere çeşitli materyallere adsorplanarak toplam fenol derişimi azaltılmaya çalışılmıştır. Örneğin, AGALIAS et al., (2007) zeytin karasuyundaki polifenollerini geri kazanmak ve çevre problemlerini azaltmak amacıyla yaptıkları çalışmada, filtrasyon, XAD16 ve XAD7HP reçinelerine adsorpsiyon, çözücü buharlaştırması gibi ardışık işlemlerden sonra %99.99 fenol giderimi ile polifenol ve laktonca zengin yüksek antioksidan aktiviteli bir karışım elde etmişlerdir. AZZAM et al., (2010) ise zeytin karasuyunun aktif karbona adsorpsiyonunda %90 civarında fenol giderimi elde etmiştir. PETELAS et al., (2007), zeytin karasuyunun -fenolikleri çözücü ekstraksiyonu ile fenollerini uzaklaştırılmış pirinaya (zeytinyağı üretim prosesi katı atığı)- adsorpsiyonunda %35'e kadar fenol uzaklaştırılmasını sağladıklarını bildirmişlerdir. Verilen bu örneklerde olduğu gibi, benzer çalışmalarda ticari materyaller veya farklı bir atık kullanılmıştır.

Cibredeki fenolik maddelerin çözücü ekstraksiyonu için en iyi koşullar: HCl ile asitlendirme ve hekzan ile yıkamanın ardından en iyi çözücü etil alkol:su (1:1) ile çözücü/cibre oranı=30 mL/g, sıcaklık (N=150 rpm)=43 °C, ekstraksiyon süresi=5 st koşullarında ekstraksiyondur. Bu koşullarda 11.97 mg/g cibre toplam fenol geri kazanılmış ve ekstraktın toplam antioksidan aktivitesi %81 (inh.) olarak bulunmuştur. Cibre ve zeytin karasuyundaki fenolik maddeleri bir arada ekstraksiyona yönelik herhangi bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Buna karşın, cibredeki fenolikleri çözücü ekstraksiyonu ile geri kazanmayı hedefleyen çalışmalarda genellikle etil alkol veya etil alkol:su karışımı kullanılmakta ve bu projede elde edilen civarında antioksidan aktiviteleri elde edilmektedir.

Cibre ile muamele edilmiş zeytin karasuyunun biyoarıtımda kullanılması: Muamele edilmiş cibre %25 oranında seyreltilerek *R. glutinis* ile biyoarıtımda kullanılmış (T=30 °C, N=150 rpm, 2.27 g/L üre derişimi) ve 120 st sonunda %55 toplam fenol giderimi elde edilmiştir. Cibre veya başka bir tarımsal materyal ile muamele edilmiş zeytin karasuyunun biyoarıtımına yönelik bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Zeytin karasuyunun *R. glutinis* ile biyoarıtımına yönelik yaptığımız çalışmalar ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada karasuyun cibre ile muamelesinin biyoarıtıma olumsuz bir etki yapmadığı ve yaklaşık aynı performans ile biyoarıtımın gerçekleştiği belirlenmiştir.

Proje önerisinde çalışmanın başarı ölçütlerinden ilki; zeytin karasuyu ve üzüm cibresindeki fenolik bileşenlerin antioksidan aktivitelerini kaybetmeden yüksek verimle (hedef >%80) geri kazanılma koşulların belirlenmesi olarak verilmiştir. Proje sonunda ise belirlenen en uygun koşullarda %81 (inh.) antioksidan aktiviteli ve 11.97 mg/g derişiminde fenolik madde geri kazanılmıştır. Projenin başarı ölçütlerinden ikincisi; birim kütle cibre başına hesaplanacak olan fenol giderim derecesinin yüksek olmasıdır. Proje tamamlandığında belirlenen en uygun koşullarda ZK için toplam fenol giderimi %64 olarak bulunmuştur. Bu değer, 2 mg TF/g cibreye karşılık gelmektedir. Projenin son başarı ölçütü zeytin karasuyunun biyoarıtımında yüksek fenol giderimidir (>%80). Projede, cibre ile muamele edilen ZK seyreltilerek biyoarıtımlarda kullanıldığı zaman yaklaşık %55 TF giderimi sağlanmıştır. Bu değer biyoarıtımdan önceki %60 civarında TF giderimi ile birleştirildiği zaman proses içinde yüksek derecede TF giderimi sağlandığı görülmektedir. Prosesin sonunda giderilemeyen TF miktarı ise tüm çalışmalarımız boyunca biyoarıtım sonunda giderilmeden ortamda kalan TF miktarı ile yaklaşık aynıdır (KARAKAYA et al., 2012). Bunun, *R. glutinis* mayası tarafından kullanılmayan fenolik maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak, bu proje ile ülkemiz için önemli iki tarımsal atığının birlikte değerlendirilmesinin mümkün olacağı gösterilmiş ve atıkların biyo/arıtımı ile değerli madde eldesi aynı proses içinde sağlanmıştır. Önerilen proses, sürdürülebilir olması açısından da önemlidir.

Öneriler:

1. Laboratuvar ölçekte elde edilen sonuçların uygulamada ne derece sağlanabileceğini görmek amacıyla saha çalışması yapılmalıdır.
2. Zeytin karasuyunun biyoarıtımından önce önemli derecede fenol ve renk giderilmesini sağlayan cibre ile muamele, önemli bir önışlem olarak düşünülmelidir. Ancak, uygulamada kullanılacak cibre ve zeytin karasuyunun miktarları çok fazla olacağı için

- ölçek büyütme çalışmalarında cibrenin parçalanması için bilyalı öğütücü, değirmen gibi sistemler değerlendirilmelidir. En uygun muamele koşulları yeniden bulunmalıdır.
3. Bu çalışma ile tarım kaynaklı iki atıktan, iki ayrı antioksidan özellikte fenolik grup birlikte elde edilmiştir. Sonuçlar elde edilen karışımın değerli olduğunu göstermektedir. Ancak, bu fenolik karışımın kimyasal ve biyolojik özellikleri üzerine daha ayrıntılı olarak çalışılması gerekmektedir.
 4. *R.glutinis*, cibre ile muamele edilmiş zeytin karasuyunda toplam fenol giderimi sağlamıştır. Toplam proses içinde fenol giderim derecesi yüksektir. Biyoarıtımdaki giderimin artırılması yönünde çalışmalar sürdürülmelidir.

KAYNAKLAR

AGALIAS,A., Magiatis,P. Skaltsounis,A-L., Mikros,E., Tzarbopoulos,A., Gikas,E., Spanos,I., Manios, T., A New Process for the Management of Olive Oil Mill Waste Water and Recovery of Natural Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 2671-2676, (2007).

ALLOUCHE, N., Damak, M., Ellouz, R., Sayadi, S., Use of Whole Cells Of *Pseudomonas aeruginosa* for Synthesis of The Antioxidant Hydroxytyrosol via Conversion of Tyrosol, *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4, 2105-2109, (2004).

ANLI R.E., Vural N., Kızılet E., An Alternative Method for the Determination of Some of the Antioxidant Phenolics in Varietal Turkish Red Wines, *Journal of the Institute of Brewing*, 114:3, 239-245, (2008).

ANOYMOUS, 2004. Review on Winery Waste Management Technologies, LIFE Environment DIONYSOS LIFE03 ENV/GR/0002232004 (www.pharm.uoa.gr/dionysos/.../State%20of%20the%20art%20-%20Report.pdf). Erişim tarihi: Ocak 2011

ARVANITOYANNIS I.S., Ladas D., Mavromatis A., Review: Wine Waste Treatment Methodology, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1117–1151 (2006).

AYED, L., Asass, N., Sayadi, S., Hamdi, M., Involvement of Lignin Peroxidase in The Decolourization of Black Olive Mill Wastewaters by *Geotrichum candidum*, *Letters in Applied Microbiology*, 40, 1, 7-11, (2005).

AZAIZEH,H., Halahlih,F., Najami,N., Brunner,D., Faulstich, M., Tafesh,A., Antioxidant Activity of Phenolic Fractions in Olive Mill Wastewater, *Food Chemistry*, 134, 2226–2234, (2012).

AZZAM, M-O,J.,Al-Malah,K., Al-Gazzawi, Z., Al-Omari, S., Dynamic Treatment Response of Olive Mills Wastewater Using Series of Adsorption Steps, *Clean – Soil, Air, Water*, 38:9, 822-830, (2010).

BENDINI, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., et al. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: A Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, 1679-1719, (2007).

BOUALLAGUI, Z., Sayadi S., Production of High Hydroxytyrosol Yields via Tyrosol Conversion by *Pseudomonas aeruginosa* Immobilized Resting Cells, *J. Agric. Food Chem.*, 54, 9906-9911, (2006).

BORJA, R., Rinco'n, B., Raposo, F., Anaerobic Biodegradation of Two-Phase Olive Mill Solid Wastes and Liquid Effluents: Kinetic Studies and Process Performance. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 81, 1450-1462, (2006).

De LEONARDIS, A., MACCIOLA, V., NAG, A., Antioxidant Activity of Various Phenol Extracts of Olive-Oil Mill Wastewaters, *Acta Alimentaria*, 38(1) 77-86, (2009).

De MARCO E., Savarese M., Paduano A., Sacchi R., Characterization and Fractionation of Phenolic Compounds Extracted from Olive Oil Mill Wastewaters, *Food Chemistry*, 104, 858–867, (2007).

EL-ABBASSI, A., Kiai, H., Hafidi, A., Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater, *Food Chemistry*, 132, 406–412, (2012).

FABER, K. 2000. Biotransformations in Organic Chemistry. Springer, pp:340, Graz.

FERNANDEZ-BOLANOS, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., Extraction of Interesting Organic Compounds from Olive Oil Waste, *Grasas y Aceites*, 57, 1, 95-106, (2006).

FERNÁNDEZ-MAR M.I., Mateos R., García-Parrilla M.C., Puertas B., Cantos-Villar E., Bioactive Compounds in Wine: Resveratrol, Hydroxytyrosol and Melatonin: A review, *Food Chemistry*, 130, 797–813, (2012).

FIORI L., Faveri D., Casazza A.A., Perego P., Grape By-products: Extraction of Polyphenolic Compounds Using Supercritical CO₂ and Liquid Organic Solvent - A Preliminary Investigation. *CyTA, - Journal of Food*, 7:3, 163–171, (2009).

FKI, I., Allouche, N., Sayadi, S., The Use of Polyphenolic Extract, Purified Hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from Olive Mill Wastewater for The Stabilization of Refined Oils: A Potential Alternative to Synthetic Antioxidants, *Food Chemistry*, 93, 197-204, (2005).

FLOURI F., Sotirchos D., Ioannidou S., Balis,C., Decolorization of Olive Oil Mill Liquid Wastes by Chemical and Biological Means. *International Biodeterioration & Biodegradation*.189-192, (1996).

GALANAKIS C.M., TORNBERG, E., GEKASC, V. Recovery and preservation of phenols from olive waste in ethanolic extracts, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85, 1148–1155, (2010).

HE,J., Alister-Briggs M., de Lyster T., Jones,G.P., Stability and Antioxidant Potential of Purified Olive Mill Wastewater Extracts, *Food Chemistry*, 131, 1312–1321, (2012).

HOGAN,S., Zhang,I., Li,j., Sun,S., Canning,C., Zhou,K., Antioxidant Rich Grape Pomace Extract Suppresses Postprandial Hyperglycemia in Diabetic Mice by Specifically Inhibiting alpha-Glucosidase, *Nutrition & Metabolism* 7:71, (2010).

JARBOUI R. Baati H, Fetoui F, Gargouri A, Gharsallah N, Ammar E., Yeast Performance in Wastewater Treatment: Case Study of *Rhodotorula mucilaginosa*. *Environ Technol.*, 33 (7-9), 951-60, (2012).

KARAKAYA A., Laleli Y., Takaç S., Development of Process Conditions for Biodegradation of Raw Olive Mill Wastewater by *Rhodotorula glutinis*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75; 75-82, (2012).

KHOUFI, S., Hamza, M., Sayadi, S., Enzymatic Hydrolysis of Olive Wastewater for Hydroxytyrosol Enrichment, *Bioresource Technology*, 102, 19, 9050-9058, (2011).

LAFKA T.I., Sinanoglou V., Lazos E.S., On the Extraction and Antioxidant Activity of Phenolic Compound from Winery Wastes, *Food Chemistry*, 104, 1206–1214, (2007).

LACHMAN J., Šulc M., Faitová K., Pivec V., Major factors influencing antioxidant contents and antioxidant activity in grapes and wines, *International Journal of Wine Research*, 1, 101–121, (2009).

McNAMARA, J.C., Anastasiou, C.C., O'flaherty, V., Mitchell, R., Bioremediation of Olive Mill Wastewater, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 127-134, (2008).

MORGAN E., Chemometrics: Experimental Design, John Wiley & Sons, London (1995).

MORILLO, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J., Bioremediation and Biovalorisation of Olive-Mill Wastes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 25-39, (2009)

NEGRO C., Tommasi L., Miceli A., Phenolic Compounds and Antioxidant Activity from Red Grape Marc Extracts. *Bioresource Technology* 87, 41-44, (2003).

NERANTZIS E.T., Tataridis P., 2006. Integrated Enology-utilization of winery by-products into high added value products, *e-Journal of Science and Technology*, 1-12 ([e-jst.teiath.gr/issue_3_2006/Nerantzis_3.pdf](http://ejst.teiath.gr/issue_3_2006/Nerantzis_3.pdf)).

NIAOUNAKIS, M., Halvadakis, C.P., Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey, 2nd ed., *Waste Management Series Volume 5, Elsevier BV*, 14, 23-64, (2006).

OBIED, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R., Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *J. Agric. Food. Chem.*, 53:4, 823-837, (2005).

OBIED, H.K., Bedgood Jr. D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Bioscreening of Australian Olive Mill Waste Extracts: Biophenol Content, Antioxidant, Antimicrobial and Molluscicidal Activities *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1238–1248, (2007a).

OBIED, H.K., Karuso, P., Robards, K.. Novel Secoiridoids with Antioxidant Activity from Australian Olive Mill Waste. *J. Agric. Food. Chem.*, 55:8, 2848-2853 (2007b).

PARASKEVA, P., Diamadopoulos, E., Technologies for Olive Mill Wastewater (OMW) Treatment: A Review, *J. Chem Technol. Biotechnol.*, 81, 1475–1485, (2006).

PETELAS,A.V., Elia,E., Stainakis, A.S., Halvadakis,C.P., Use of Low-Cost Agricultural By-Product for the Adsorption of Total Phenols Contained in Olive Mill Wastewater, *Proceedins*

of the 10th International Conference on Environmental Science and Technology, Kos Island (2007), A1145-a1152.

RAMOS-CORMENZANA A., Juirez-Jimenez B., Garcia-Pareja M.P., Antimicrobial Activity of Olive Mill Waters (Alpechin) and Biotransformed Mill Wastewater Waste- Olive Oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 96, 283-290 (1996).

SHOJAEE-ALIABADI,S., Hosseini,S.M., Tiwari, B., Hashemi,M., Fadavi,G., Khaksar,R., Polyphenols Content and Antioxidant Activity of Ghure (Unripe Grape) Marc Extract: Influence of Extraction Time, Temperature and Solvent Type, *International Journal of Food Science and Technology*, doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03203.x, (2012).

SPIGNO G., De Faveri, D.M., Antioxidants from Grape Stalks and Marc: Influence of Extraction Procedure on Yield, Purity and Antioxidant Power of the Extracts. *Journal of Food Engineering*, 78, 793–801, (2007).

SPIGNO G., Tramelli L., De Faveri D.M., Effects of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. *Journal of Food Engineering* 81, 200–208, (2007).

TAKAÇ,S., Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması İçin Biyoproses Geliştirilmesi, TÜBİTAK 109M290 Proje Sonuç Raporu, Ankara, (2011).

TAKAÇ, S., Karakaya, A., Recovery of Phenolic Antioxidants from Olive Mill Wastewater, *Recent Patents on Chemical Engineering*, 2, 230-237, (2009).

XIA E.Q., Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B., Biological Activities of Polyphenols from Grapes: Review, *Int. J. Mol. Sci.* 11, 622-646, (2010).

VATAI T., Škerget, M., Knez Z., Extraction of Phenolic Compounds from Elder Berry and Different Grape Marc Varieties using Organic Solvents and/or Supercritical Carbon Dioxide. *Journal of Food Engineering*, 90:2, 246-254, (2009).

VESKOUKIS, A.S., Kyparos, A., Nikolaidis,M.G., Stagos,D., Aligiannis,N. Halabalaki,M., Chronis,K., Goutzourelas,N., Skaltsounis,L., Kouretas, D., The Antioxidant Effects of a

Polyphenol-Rich Grape Pomace Extract In Vitro Do Not Correspond In Vivo Using Exercise as an Oxidant Stimulus, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, doi:10.1155/2012/185867, (2012).

http://www.internationaloliveoil.org/production1_ang. Erişim Tarihi: 19/08/2011.

http://www.internationaloliveoil.org/production2_ang. Erişim Tarihi: 19/08/2011.

<http://faostat.fao.org/>, erişim tarihi: 08/07/2011

EKLER

EK1 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu ve Analizlerin Doğruluğu

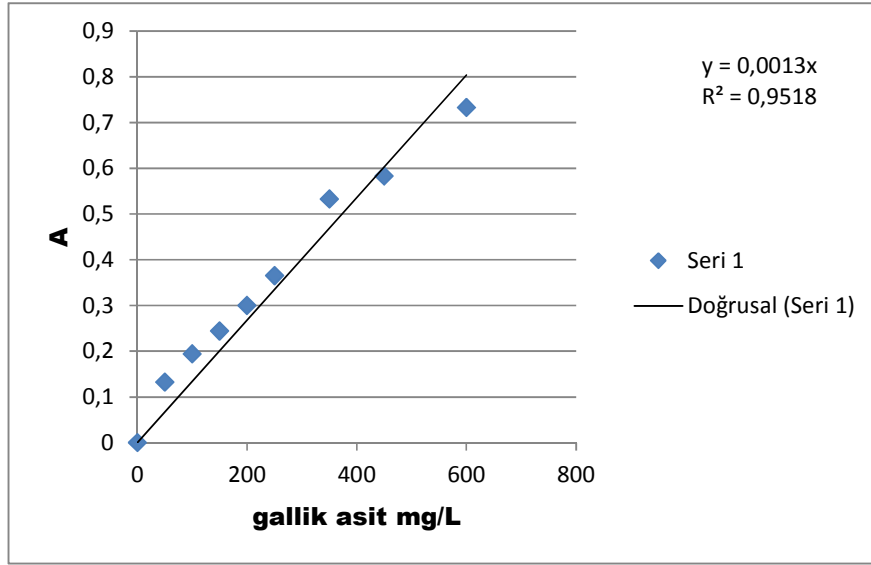
EK 2 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşiklerin HPLC Kromatogramları ve Tirozol İçin Kalibrasyon Doğrusu

EK 3 Bazı Fenolik Maddelere ait HPLC Kromatogramları

EK4 özücü Ekstraksiyonu Sonucu ZK ile Muamele Edilmiş Cibreden Geri Kazanılan Fenollerin ZK Fenolleri ile Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramları

EK 1 Toplam Fenol Derişimi Kalibrasyon Doğrusu ve Analizlerin Doğruluğu

Zeytin karasuyu örneklerine ait toplam fenol (TF) derişimleri, gallik asit eşdeğeri (mg/L) olarak hesaplanmıştır. Gallik asitin %10 etil alkol çözeltisi içinde hazırlanan farklı derişimleri (50-600 mg/L) ile çizilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil EK 1.1'de verilmiştir. Kalibrasyon doğrusu için örnekler analizlenirken üç paralel analiz yapılarak ortalamaları alınmıştır.



Şekil EK 1.1 Toplam fenol derişimi hesabında kullanılan kalibrasyon doğrusu ve denklemi

Verilerin istatistik olarak değerlendirilmesi (Verifikasyon)

Analizlerin doğrulanması (verifikasyon) 350 mg/L gallik asit çözeltisi ile yapılmıştır. 10 ayrı örnek ile yapılan toplam fenol tayininde okunan absorpsiyon (A_{765}) değerlerinden, kalibrasyon denklemi kullanılarak toplam fenol (TF) derişimleri hesaplanmıştır (Tablo Ek-1.1). Elde edilen veriler ile t testi yapılmış ve sonuçlar Tablo Ek-1.2'de verilmiştir.

Yapılan istatistiksel analiz, iki yanlı bir deneme için elde edilen verilerin kendi içerisindeki farklılıklarını analiz eder. Hesaplanan mutlak t değeri, t çizelgesinde $p:0.05$ ve $p:0.01$ seviyelerinde olması gereken değerlerden (sırası ile 2.26 ve 3.25) küçük olduğu için yapılan analizler %99 ve %95 güven aralığı içindedir (MORGAN, 1995); sistematik bir hata yapılmamıştır.

Tablo EK-1.1 Toplam fenol derişim analizinde tekrar verileri

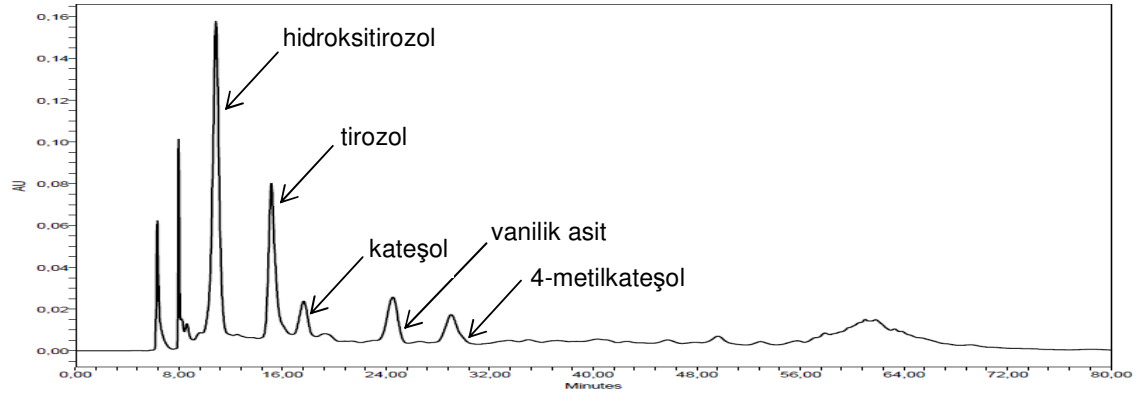
Abs 765 nm	Toplam fenol mg/L
0,471	362,3077
0,456	350,7692
0,466	358,4615
0,449	345,3846
0,455	350
0,467	359,2308
0,447	343,8462
0,493	379,2308
0,445	342,3077
0,471	362,3077

Tablo EK 1.2 TF derişimi verileri için t testi sonuçları

Hesaplanan ortalama TF derişimi (mg/L)	Standart sapma	Stok çözelti TF derişimi (mg/L)	N (tekrar sayısı)	Hesaplanan t değeri	Serbestlik derecesi (N-1)	P:0,05 olasılık seviyesi ve 9 serbestlik derecesi için t değeri	P:0.01 olasılık seviyesi ve 9 serbestlik derecesi için t değeri
355,3846	10,69203	350	10	-1,5926	9	2,26	3,25

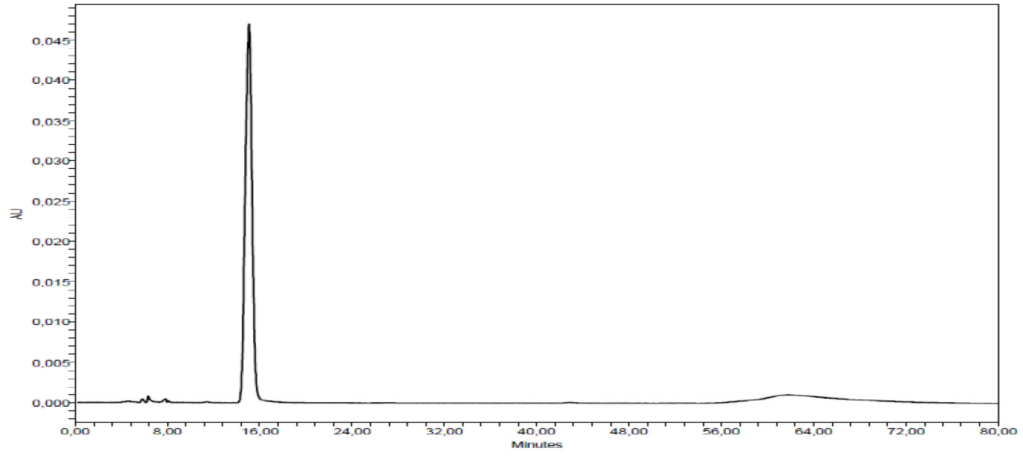
EK 2 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşiklerin HPLC Kromatogramları ve Tirozol İçin Kalibrasyon Doğrusu

Şekil EK 2-1'de zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelerin gösterildiği HPLC kromatogramı yer almaktadır. Kromatogram 109M290 nolu projede kapsamında elde edilmiştir (TAKAÇ, 2011).

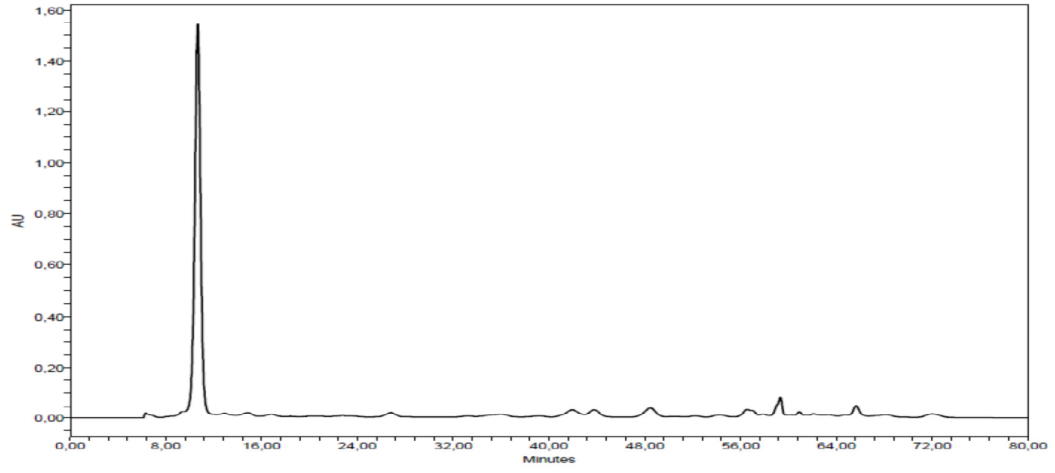


Şekil EK 2.1 Zeytin karasuyu ekstraktlarına ait HPLC kromatogramı (TAKAÇ, 2011)

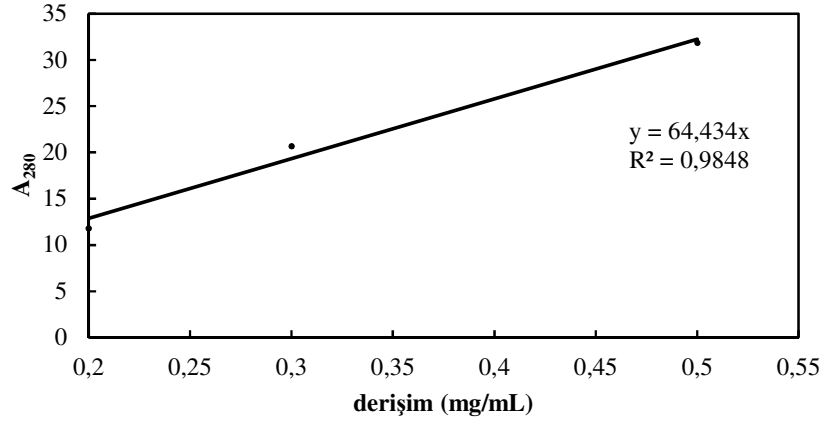
Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden tirozol ve hidroksitirozol (oleuropein hidrolizati) için HPLC kromatogramları Şekil EK 2.2 ve Şekil Ek 2.3'de; tirozol için hazırlanan kalibrasyon grafiği ise Şekil EK 2.4'de verilmiştir (TAKAÇ, 2011). Tirozolün üç farklı derişimi, aynı hacim ve derişimde *p*-kumarik asit (iç standart) çözeltisi ile karıştırılarak analizlenmiştir. Hidroksitirozol ticari olarak elde edilemediğinden ve oleuropein hidrolizatının derişimi bilinmediğinden kimyasal yapısı oldukça benzer olan tirozol için çizilmiş olan kalibrasyon grafiği kullanılmıştır.



Şekil EK 2.2 Tirozolün HPLC kromatogramı (TAKAÇ, 2011)

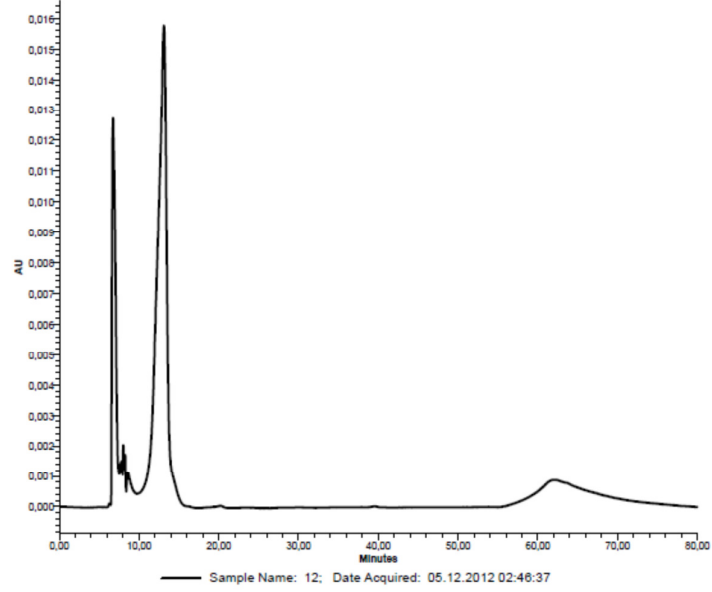


Şekil EK 2.3 Oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) HPLC kromatogramı (TAKAÇ, 2011)

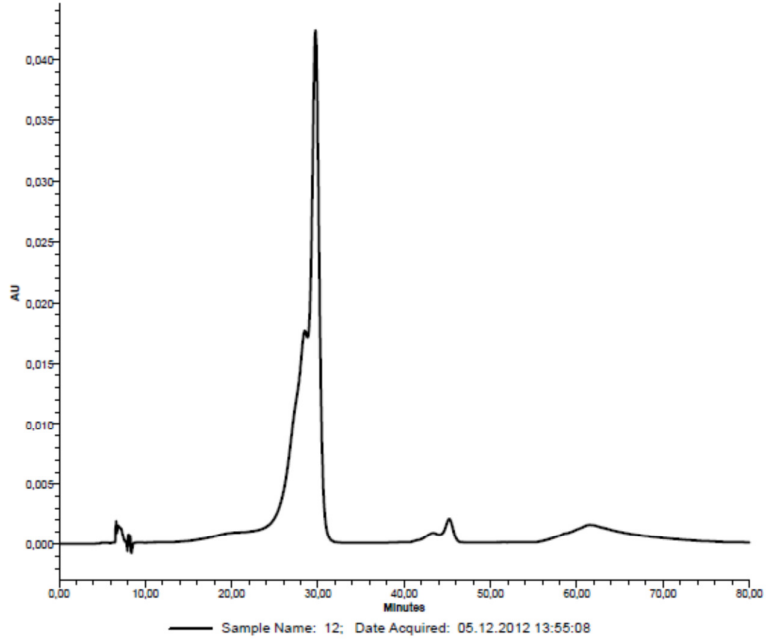


Şekil EK 2.4 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış tirozole (ve hidrokstirozol) ait kalibrasyon grafiği (TAKAÇ, 2011)

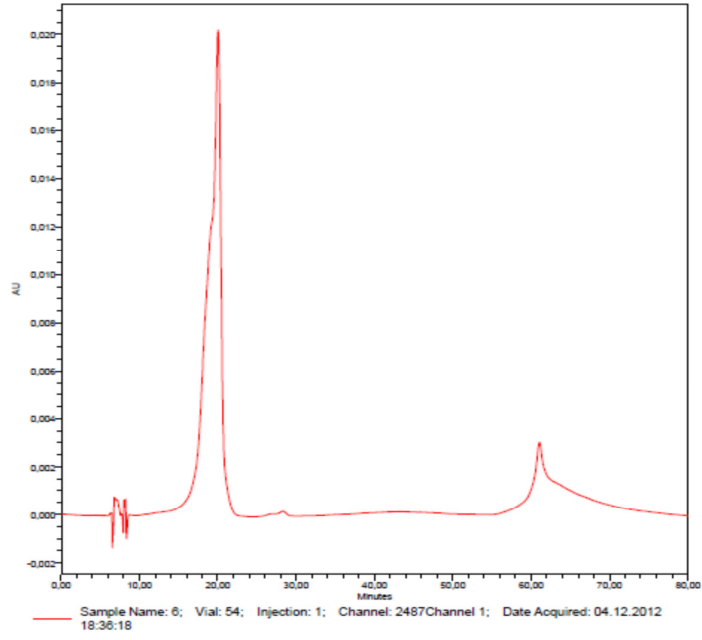
EK 3 Bazı Fenolik Maddelere ait HPLC Kromatogramları



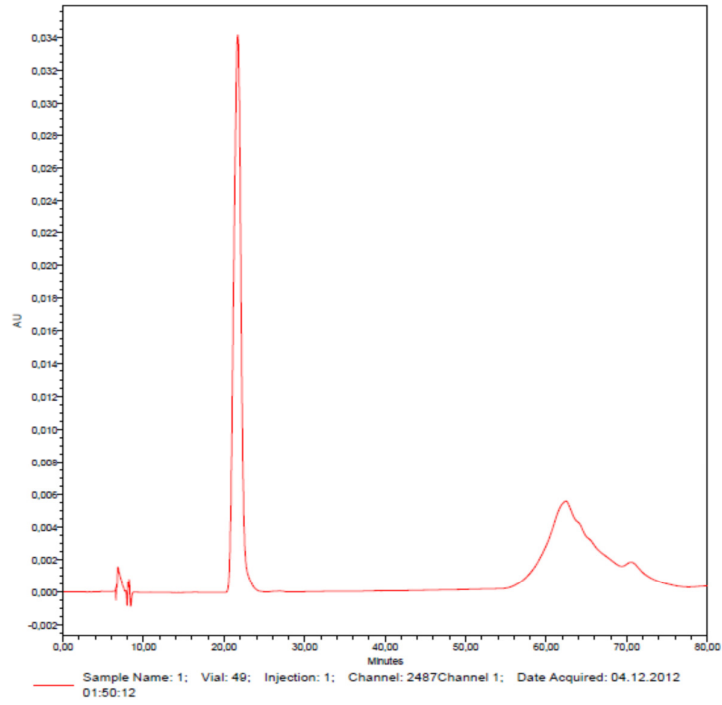
Şekil EK 3.1 Epigallokateşine ait HPLC kromatogramı



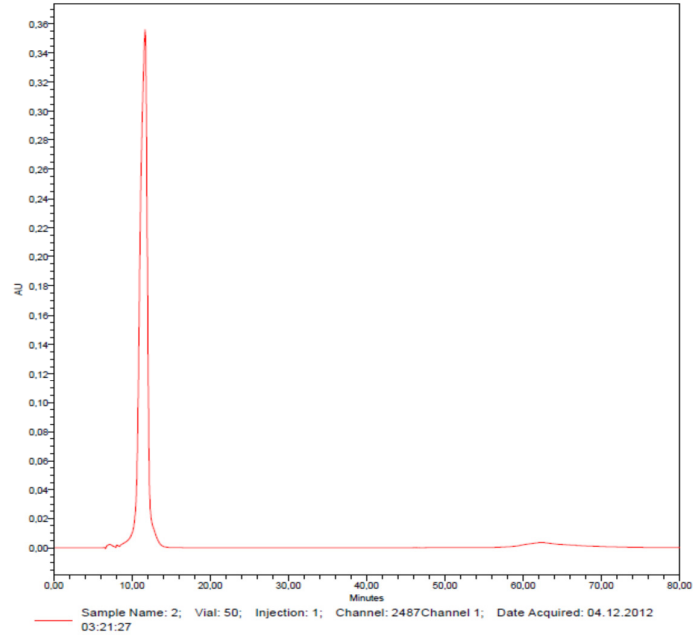
Şekil EK 3.2 Epigallokateşin gallata ait HPLC kromatogramı



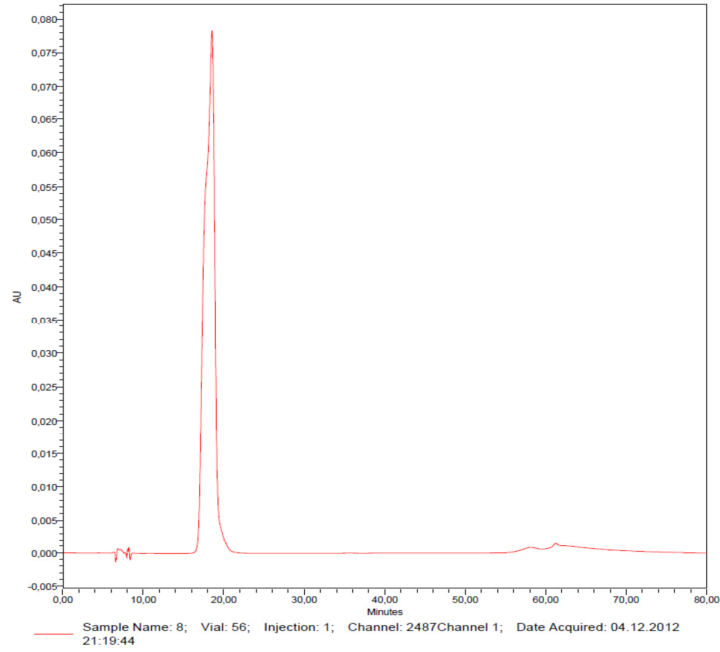
Şekil EK 3.3 Epikateşine ait HPLC kromatogramı



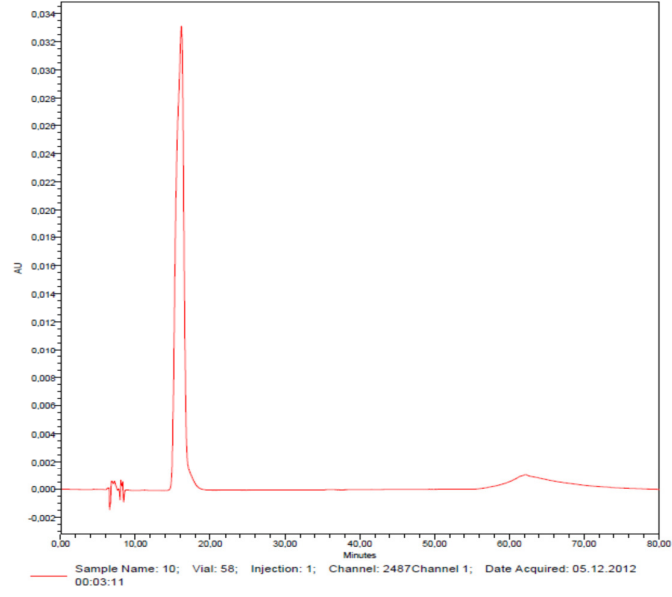
Şekil EK 3.4 2,5 dihidroksibenzoik asite ait HPLC kromatogramı



Şekil EK 3.5 3,4 dihidroksifenilasetik asite ait HPLC kromatogramı

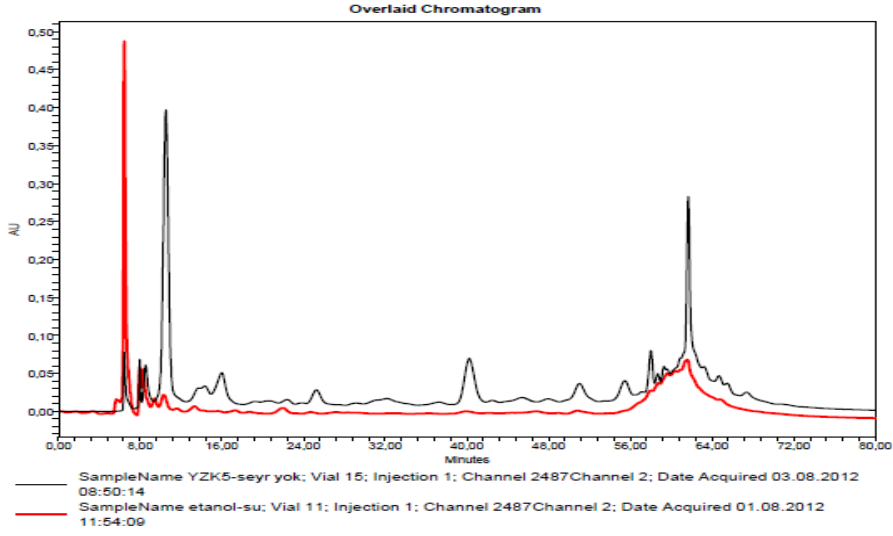


Şekil EK 3.6 3-hidroksi 4-metoksi fenol asetik asit

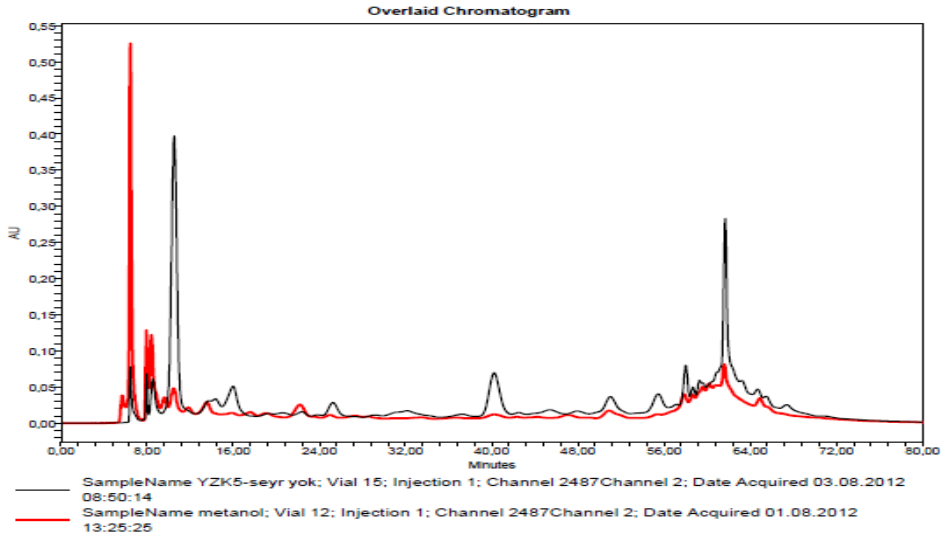


Şekil EK 3.7 4 hidroksifenilasetik asite ait HPLC kromatogramı

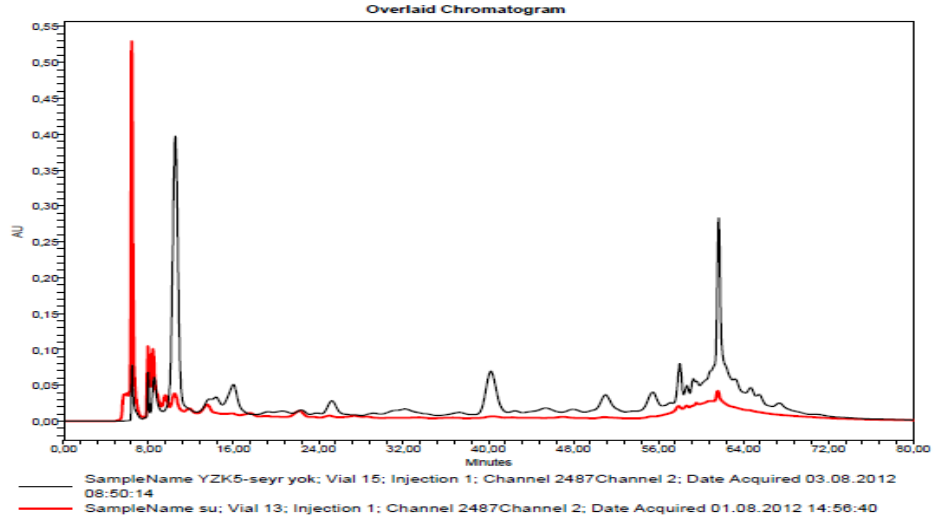
EK 4 Çözücü Ekstraksiyonu Sonucu ZK ile Muamele Edilmiş Cibreden Geri Kazanılan Fenollerin, ZK Fenollerini ile Karşılaştırmalı HPLC Kromatogramları



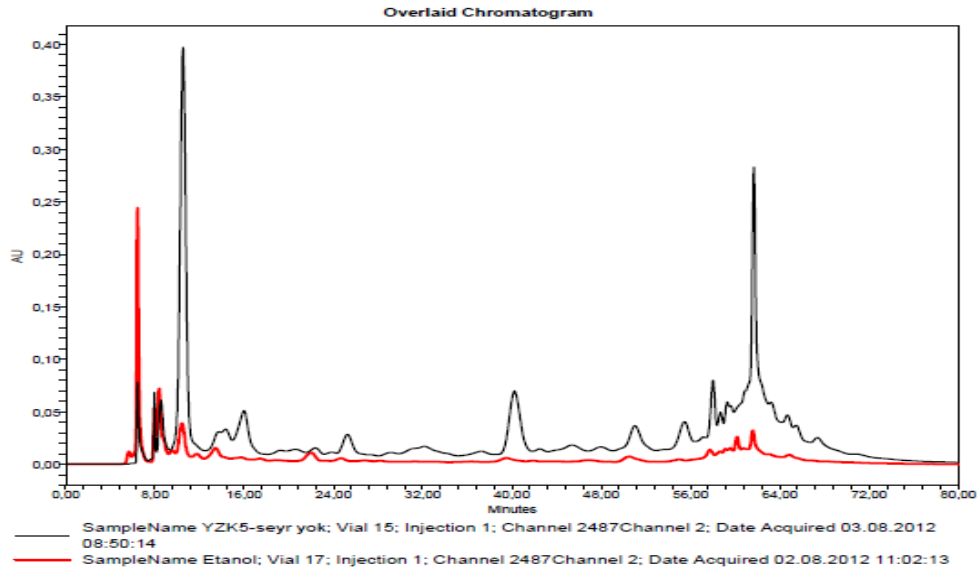
Şekil EK 4.1 Etil alkol:su (1.1) kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



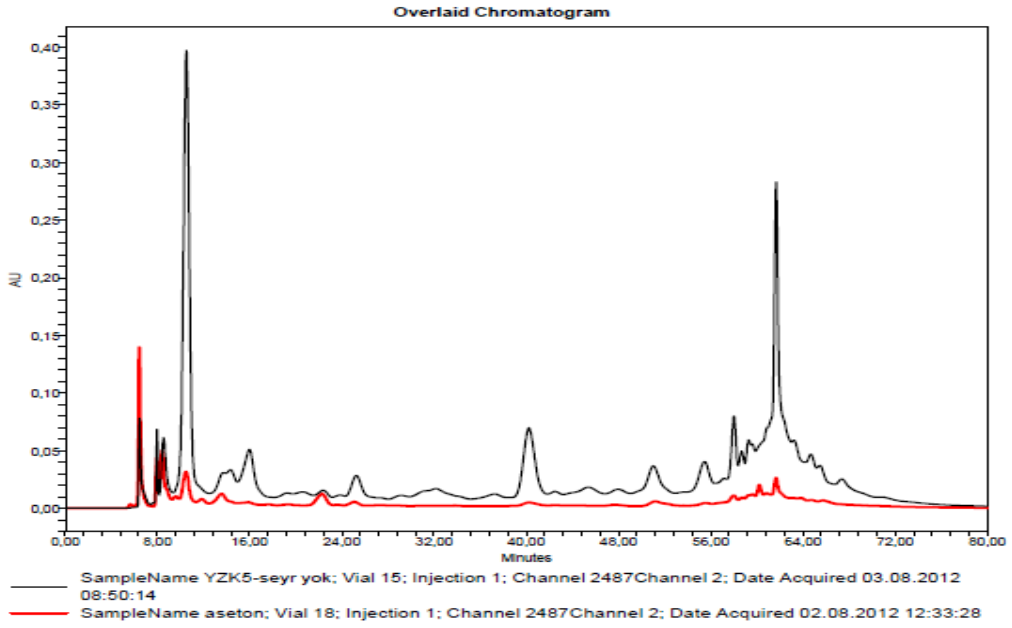
Şekil EK 4.2 Metanol kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



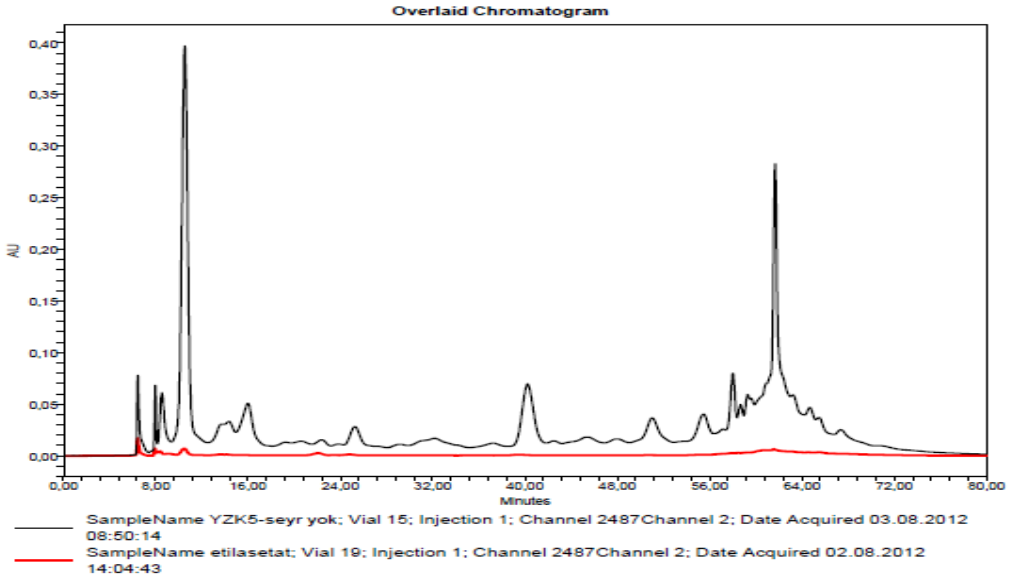
Şekil EK 4.3 Su kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK'daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 4.4 Etil alkol kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK'daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 4.5 Aseton kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı



Şekil EK 4.6 Etil asetat kullanılarak “ZK ile muamele edilmiş cibredené geri kazanılan fenoliklerin ZK’daki fenolikler ile karşılaştırmalı HPLC kromatogramı

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: 111M441
Proje Başlığı: Zeytin Karasuyunun Fenolik Maddelerinin Ardışık Homojenizasyon-Ekstraksiyon Prosesleri ile Zenginleştirilmesi ve Biyoarıtılabilirliğinin Kolaylaştırılması için Entegre Bir Proses Geliştirilmesi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Prof.Dr. Zekiye Serpil Takaç Alper Karakaya
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü 06100 Tandoğan Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: --
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15.11.2011 – 15.11.2012
Öz (en çok 70 kelime) Zeytin karasuyunun (ZK) cibre ile muamelesinde optimum koşullar; cibrenin parçalanma süresi=240 s, ZK/cibre=3 mL/g, cibre ile ZK'nın birlikte çalkalanma süresi=323 dk ve sıcaklık=30°C'dir. Bu koşullarda ZK'da %64 fenol giderimi sağlanmıştır. Muamele edilmiş cibrede bulunan fenoliklerin ekstraksiyon ile geri kazanılmasında optimum koşullar etilalkol:su (1:1)/cibre=30 mL/g, sıcaklık=43°C, süre=5 st'dir. Bu koşullarda antioksidan aktivitesi %81 (inh.) olan 11.97 mg/g fenol kazanılmıştır. Muamele edilmiş %25 ZK'nın <i>R.glutinis</i> 1e biyoarıtımında 120 st'de %55 fenol giderimi sağlanmıştır.
Anahtar Kelimeler: Zeytin karasuyu, üzüm cibresi, fenolik bileşenler, antioksidan, <i>Rhodotorula glutinis</i>
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input type="checkbox"/> ✓ Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: --
Ekte Bulunan "ARDEB Başarı Öyküsü Formu", "Kazanımlar" Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarının Başarı Öyküsü Niteliği Taşıdığını Düşünüyorsanız "ARDEB Başarı Öyküsü Formu"nu doldurunuz.