

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI ATIKLARINDA
POLİFENOL ANALİZİ VE
ISIL İŞLEMLERİN
PRİNA EKSTRAKTLARININ
POLİFENOL KONSANTRASYONUNA VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNE ETKİSİ

SEVGÜL TERCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI

GEBZE
2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI ATIKLARINDA
POLİFENOL ANALİZİ VE
ISIL İŞLEMLERİN
PRİNA EKSTRAKTLARININ
POLİFENOL KONSANTRASYONUNA VE
ANTİOKSİDAN AKTİVİTESİNE ETKİSİ

SEVGÜL TERCAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
ANA BİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. MAHMUT ŞEKER

GEBZE
2009

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI : Zeytinyağı fabrikası atıklarında polifenol analizi ve ısıt işlemlerin prina ekstraktlarının polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktivitesine etkisi

YAZAR ADI : Sevgül TERCAN

Türkiye dünya zeytinyağı üretiminde beşinci, sofralık zeytin üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır. Zeytinyağı üretiminde sürekli ve kesikli olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Her iki yöntemde sıvı atık; karasu ve katı atık; prina olmak üzere iki yan ürün ortaya çıkmaktadır. Zeytinyağı üretimi sezonluk yapıldığı için, kısa sürede yüksek miktarda oluşan atıklar kirletici özelliklerinden dolayı çevre için büyük tehdit oluşturmaktadır. Zeytin ve zeytinyağı doğal antioksidan özellikte polifenol içerdiğine göre karasu ve prinanın da bir polifenol içeriği vardır. Piyasa değeri olan polifenollerin zeytinyağı yan ürünlerinden geri kazanımı hem ekonomik açıdan önemlidir, hem de polifenollerin ayrıştırılması ile bu yan ürünler çevre için çok daha az zararlı bir atık olacaktır.

Çalışmada kimyasal özellikleri belirlenen zeytin karasuyunun, toplam polifenol içeriği numunenin katı ve sıvı faza ayrılmasıyla hesaplandı. Karasudan santrifüj separasyon ile ayrılan kek fazından polifenollerin ekstraksiyon şartları, çözücü etanol kullanılarak: 0,0666 kek(g)/çözücü(ml) oranı, 60°C sıcaklık, 80 dakikalık toplam ekstraksiyon süresi olarak belirlendi. Diğer taraftan, etanol kullanılarak 7,5g karasudan ayrılan kek ve 3g prinanın ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Düşük hacimli etanol kullanıldığında, prina ekstraktlarının polifenol saflığı karasudan ayrılan kek ekstraktlarının polifenol saflığından daha yüksekti; yüksek hacimli etanol kullanıldığında ise kek ekstraktlarının polifenol saflığı prina ekstraktlarından daha yüksek bulundu.

Ayrıca prinadan polifenoller saf su ile ekstrakte edildi, ekstraktlar üç farklı sıcaklıkta (50°C, 75°C, 100°C), 105 dakika süreyle buharlaştırılarak; ısıt işlemlerin prina ekstraktlarının polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktivitesine etkisi incelendi. Prina ekstraktlarının buharlaştırıldığı her sıcaklıkta toplam polifenol

konsantrasyonunda bir azalma tespit edildi ve ısıtma süresinin bir fonksiyonu olarak toplam polifenol konsantrasyonunda 50 ve 75°C sıcaklıklar için önemli fark görülmedi. 50 ve 75°C sıcaklıklar arasında toplam polifenol içeriği 105 dakika sonunda %23 azaldı. Diğer taraftan 100°C sıcaklıkta 105 dakika ısıtma işlemi polifenol içeriğini %65 azalttı. 100°C sıcaklıkta ısıtma işlemi ile gerçekleşen polifenol azalması, 50 ve 75°C sıcaklıklarda görülen polifenol azalmasından daha yüksektir. Korelasyon katsayısı (r^2) incelendiğinde, toplam polifenol bozunmasının 50 ve 75°C sıcaklıklardaki ısıtma işlemlerinde sıfırıncı mertebeden reaksiyon kinetiği izlediği görüldü. Prina ekstraktlarındaki polifenollerin antioksidan aktivitesinin, ekstraktların buharlaştırılması sırasında polifenollerin ısıtma yıkımına ek olarak polifenollerin inaktivasyonu sonucu azaldığı belirlendi.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS : Polyphenol analysis of olive oil mill wastes and the effect of thermal treatments on polyphenol concentration and antioxidant activity of olive cake extracts

AUTHOR : Sevgül TERCAN

Turkey is the fifth largest olive oil producer and the fourth largest table olive producer. Two different systems are used to produce olive oils such as batch and continuous. In both processes two by-product occur, one is liquid waste; olive mill wastewater and the other is solid waste; olive pomace. Because of olive oil production is a seasonal process, huge amount of waste which is a huge danger for environment, occur in short period of time. There are polyphenols not only in olive and olive oil but also in olive mill wastewater and olive pomace. The extraction of polyphenols from olive oil by-products can turn waste of olive oil production into a valuable end product and also these wastes become less dangerous for environment.

In this work, olive mill wastewater whose chemical properties were examined is separated into liquid and solid phases by filtration and total polyphenol content of olive mill wastewater is determined by adding liquid and solid phase polyphenol content. And then the polyphenol extraction conditions of cake separated from olive mill wastewater by centrifuge separation is found by using solvent ethanol as; 0,0666 cake(g)/solvent(ml) ratio, 60°C extraction temperature and 80 minutes total extraction time. On the other hand ethanol was used for extraction of polyphenol from 7,5g cake of OMWW and 3g olive pomace. When low volume ethanol is used, purity of polyphenols in extract of olive pomace was higher than purity of polyphenols in extract of cake of OMWW. However, when high volume ethanol is used, purity of polyphenols in extract of cake of OMWW was higher than purity of polyphenols in extract of olive pomace.

Polyphenols were extracted from olive cake with distilled water and extract phase was evaporated at three different temperatures (50°C, 75°C, 100°C) during 105 min. There was a decrease in total polyphenols concentration at each temperature during the evaporation of polyphenols in the extract of olive cake and the concentration of total polyphenols as a function of heating time does not appear significantly different for temperatures of 50 and 75°C. At temperature between 50 and 75°C total polyphenol content decreased 23% at the end of 105 min. On the other hand thermal treatment at 100°C temperature and 105 min decreased polyphenol content 65% which is higher polyphenol reduction than polyphenol reduction of heat treatment at 50 and 75°C. The examination of correlation coefficient (r^2) shows that total polyphenols degradation followed zero-order reaction kinetics during a thermal treatment at 50 and 75°C. Antioxidant activity of polyphenols in olive cake extract decreased as a result of inactivation of polyphenols in addition to a thermal destruction of polyphenols during the evaporation of olive cake extract.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Mahmut Şeker'e, tez savunma jürimde görev alan Doç. Dr. Murat Özdemir ve Doç. Dr. Alp Er Konukman'a,

Yardımlarını ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim arkadaşlarım Kimya Yük. Müh. Tuğba Çevik Sivrihisar, Araş. Gör. Öznur Kayhan ve Uzman Başak Temur Ergen'a,

Her zaman yanımda olan ve bana inanan sevgili eşim Ali Tercan'a ayrıca sonsuz emek, güven ve sevgileriyle beni bugünlere getiren değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Zeytinyağı Üretim Prosesleri	4
2.2. Zeytin Karasuyu ve Yapılan Çalışmalar	6
2.3. Prina ve Yapılan Çalışmalar	11
2.4. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)	14
2.4.1. Polifenollerin Ekstraksiyonu	16
2.4.2. Isıl İşlemlerin Polifenol Konsantrasyonuna ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi	19
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metot	21
3.2.1. Zeytin Karasuyunun İçeriği ve Polifenol Analizi	21
3.2.1.1. Toplam Katı Madde Tayini	21
3.2.1.2. Askıda Katı Madde Tayini	22
3.2.1.3. pH Tayini	22
3.2.1.4. Yağ Tayini	23
3.2.1.5. Toplam Azot Tayini	23
3.2.1.6. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi	24
3.2.1.7. Toplam Organik Karbon (TOK) Analizi	25
3.2.1.8. Toplam Şeker Tayini	25
3.2.1.9. Toplam Polifenol Tayini	26

3.2.2. Karasudan Ayrılan Fazların İncelenmesi	28
3.2.2.1. Karasu Numunesinden Filtrasyon İle Ayrılan Katı-sıvı Fazların İncelenmesi	28
3.2.2.2. Karasu Numunesinden Santrifüj Separatör İle Ayrılan Kek Fazının İncelenmesi	28
3.2.2.3. Kek Numunelerinden Polifenol Ekstraksiyonu	28
3.2.2.4. Toplam Polifenol Tayini	29
3.2.3. Prinadan Polifenol Ekstraksiyonu ve Isıl İşlemlerin Ekstrakt Polifenol Konsantrasyonuna ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi	29
3.2.3.1. Toplam Katı Madde Tayini	29
3.2.3.2. Polifenol Ekstraksiyonu	30
3.2.3.3. Buharlaştırma ile Polifenol Ekstraktlarına Isıl İşlem Uygulamaları	30
3.2.3.4. Toplam Polifenol Tayini	30
3.2.3.5. DPPH Serbest Radikal Yakalama Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini	31
3.2.3.6. Kinetik Hesaplamalar	31
3.3. İstatistiksel Analiz	33
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Zeytin Karasuyunun İçeriği ve Toplam Polifenol Miktarının Hesaplanması	34
4.1.1. Filtrasyon İle Ayrılan Katı-sıvı Fazların Polifenol İçeriği	36
4.1.2. Santrifüj Separasyon İle Ayrılan Fazların Özellikleri ve Kek Fazının Polifenol İçeriğinin Belirlenen Ekstraksiyon Şartlarında Hesaplanması	38
4.2. Prinadan Polifenol Ekstraksiyonu	45
4.2.1. Çözücü/Prina Oranının Etkisi	46
4.2.2. Ekstraksiyon Zamanının Etkisi	48
4.2.3. Karasudan Ayrılan Kekten ve Prinadan Polifenollerin Geri Kazanımının Karşılaştırılması	49
4.3. Isıl işlemlerin Prina Ekstraktlarının Polifenol Konsantrasyonuna Ve Antioksidan Aktivitesine Etkisi	51

4.3.1. Isıl İşlem Olarak Buharlaştırmanın Toplam Polifenol İçeriği Üzerine Etkisi	51
4.3.2. Isıl İşlem Olarak Buharlaştırmanın Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi	53
4.3.3. Buharlaştırma Sırasındaki Polifenol Kayıplarının Kinetik Analizi	57
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	61
6. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

a	Hız mertebesi
A_0	Sabit
$BOİ$	Biyolojik oksijen ihtiyacı
C_A	Polifenol konsantrasyonu
C_0	Başlangıç polifenol konsantrasyonu
C_t	t (dakika) zamanındaki polifenol konsantrasyonu
E_A	Aktivasyon enerjisi
k	Hız sabiti
$KOİ$	Kimyasal oksijen ihtiyacı
r_A	Polifenol kaybı hızı
R	Evrensel gaz sabiti (1,98 cal/mol.K)
T	Mutlak sıcaklık (K)
t	Zaman

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Üç ve iki fazlı santrifüj sistemleri	5
2.2. En basit fenolik bileşik olan fenol	15
2.3. Zeytin karasuyunda bulunan başlıca fenolik bileşikler	18
3.1. Toplam şeker analizinde elde edilen sukroz kalibrasyon eğrisi	26
3.2. Toplam polifenol analizinde elde edilen caffeic acid kalibrasyon eğrisi	27
4.1. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının ekstraksiyon süresiyle değişimi	40
4.2. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının çalkalama süresiyle değişimi	41
4.3. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının çözücü (etanol) hacmiyle değişimi	42
4.4. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının uygulanan farklı ekstraksiyon sıcaklıklarıyla değişimi	43
4.5. Ekstraksiyonda çözücü olarak saf su ve etanol kullanılarak belirlenen prina toplam polifenol miktarının (a); ekstrakt toplam polifenol miktarlarının (b) ve polifenolce % saflık değerlerinin (c), farklı çözücü/prina oranıyla değişimi	47
4.6. Prina toplam polifenol miktarının ekstraksiyon süresiyle değişimi	48
4.7. Kek ve prina numunelerinin toplam polifenol miktarlarının (a) ve elde edilen ekstraktların polifenolce % saflık değerlerinin (b) kullanılan çözücü hacmiyle değişimi	50
4.8. Farklı sıcaklıklarda uygulanan buharlaştırma sırasında ekstrakt hacminin zamanla değişimi	52
4.9. Farklı sıcaklıklarda konsantrasyon sırasında ekstrakt polifenol içeriğinin zamanla değişimi	52
4.10. Konsantrelerin (a) 50°C, (b) 75°C, (c) 100°C sıcaklıklarda DPPH radikali tutma aktivitesi ve polifenol içeriği kinetiği	55

- 4.11. (a) 50 °C, (b) 75 °C, (c) 100 °C sıcaklıklarda buharlaştırılan prina 59
ekstraktlarının hesaplanan deneysel ve teorik polifenol
konsantrasyonları

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Zeytinyağı üretim proseslerine göre oluşan yan ürünler	12
4.1. Zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri	34
4.2. Deneylerde kullanılan zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri ve birçok yazar tarafından belirtilen zeytin karasuyu kimyasal karakteristiği	35
4.3. Orijinal zeytin karasu numunesinin ve katı-sıvı fazların toplam polifenol içeriği.	36
4.4. Zeytin karasu numunesinin ve santrifüj separatörden çıkan kek-sıvı fazların toplam katı madde içerikleri.	38
4.5. Orijinal zeytin karasu numunesinin (a) ve santrifüj separatör ile ayrılan sıvı fazın (b) kimyasal özellikleri	39
4.6. Ekstraksiyon işleminde farklı numune/çözücü oranları kullanılarak tespit edilen kek fazı toplam polifenol miktarları	42
4.7. Farklı sıcaklıklarda hesaplanan korelasyon katsayısı (r^2) değerleri	57
4.8. Farklı sıcaklıklardaki hız sabitleri	58

1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea*), meyvesi yenen Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türüdür. Uzun ömürlü bir ağaçtır, ortalama ömrü 300–400 yıldır ancak 2000 yaşında zeytin ağacına da rastlanmıştır. Zeytinin ana vatanı olan Anadolu’da zeytin ve zeytinyağı tarihin çok eski devirlerinden beri önemli bir gıda ve ticari ürün olarak değerlendirilmektedir.

Dünya zeytin ve zeytinyağı üretiminin yaklaşık %70’i İspanya, İtalya, Yunanistan gibi Avrupa Birliği ülkelerince gerçekleştirilmektedir. AB dışındaki önemli üretici ülkelerin başında Türkiye, Tunus, Suriye ve Fas gelmektedir.

Ülkemizde son verilere göre yaklaşık 600 bin hektar alan üzerinde toplam 97,7 milyon adet zeytin ağacı bulunmakta olup, bunun 87,5 milyonu meyve vermektedir. Son on yılın ortalamasına göre 1,023 milyon ton/yıl olan zeytin üretiminin %29’una tekabül eden 296 bin tonu yemekliğe, %71’ine tekabül eden 727 bin tonu yağlığa ayrılmaktadır. Yağlığa ayrılan zeytin danesinden ise ortalama 105,9 bin ton zeytinyağı elde edilmiştir. Ülkemiz son 10 yıllık ortalamalara göre 1,023 milyon ton zeytin üretimiyle Dünya zeytin üreticisi ülkeler arasında dördüncü sırada, 105,9 bin ton zeytinyağı üretimi ile de beşinci sırada yer almaktadır (Kutkan, 2002).

Zeytinin zeytinyağına işlenmesinde kesikli (geleneksel pres) ve sürekli (santrifüj) olmak üzere iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemler sonucunda karasu ve prina olmak üzere iki yan ürün ortaya çıkmaktadır. Zeytinyağı üretimi sezonluk yapılmaktadır. Bir üretim sezonu 3–4 ay sürdüğü için kısa sürede çok fazla sıvı ve katı atık oluşmaktadır. Oluşan atıklar içerdikleri yağ, organik kirlilik ve yaydıkları koku nedeniyle çevre için önemli kirlilik potansiyeli oluşturmaktadırlar.

Zeytinin işlenmesi sırasında oluşan atıklardan biri olan katı atık prina günümüzde gübre, hayvanlar için yem ve yakıt olarak kullanılmaktadır. Ayrıca prinanın yağ içeriği vardır ve çözücü kullanılarak prina yağı elde edilmektedir. Prinanın en yaygın kullanım alanı yüksek enerji içeriği nedeniyle kurutularak yakıt

amaçlı kullanımıdır. Doymaz ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada kabin tipi kurutucuda prinanın kuruma davranışını incelemişlerdir. Çaynak ve ark. (2009) çalışmalarında alternatif yakıt olarak, prina yağından yenilenebilir ve temiz metil ester üretmeyi amaçlamışlardır.

Zeytinin işlenmesi sırasında oluşan atıklardan diğeri olan sıvı atık karasu bilinçsizce göl, akarsu ve denizlere verilmekte, çevre için büyük tehdit oluşturmaktadır. Dünya üzerinde yüksek oranda zeytin ve zeytinyağı işleyen İtalya, İspanya, Yunanistan, Türkiye gibi Akdeniz ülkeleri için üretim prosesi sonrasında açığa çıkan zeytin karasuyu, yüksek kirletici özelliğinden dolayı acilen çözümü gereken bir sorundur.

Zeytinyağı sektörünün gelişmesiyle üretimin yaygın olduğu Akdeniz ülkelerinde, karasuyun içeriği, arıtımı ve değerlendirilmesi konularında yapılan çalışmalar ön plana çıkmıştır. Karasu, koyu renkli, kötü kokulu, bulanık, askıda katı madde içeriği olan, yüksek organik yüke sahip bir yapıdadır ve fenolik maddeler içermektedir (Bubba ve ark., 2004). Borsani ve Ferrando (1996) zeytinden yağ eldesi sonucu oluşan zeytin karasuyunu işlemek amacıyla, İtalya’ da kapasitesi 300 m³/gün olan bir atık su işleme tesisi üzerinde çalışmışlardır. Allouche ve ark. (2004) üç fazlı sistemlerde açığa çıkan zeytin karasuyunda bulunan yüksek katma değerli fenolik bileşiklerin geri kazanımı için etkili yöntemin geliştirilmesi üzerinde çalışmışlardır.

Karasuda bulunan polifenoller, toksik etkiye sahip olmalarına rağmen karasudan ayrıştırılması halinde çevre için büyük tehdit oluşturan ve herhangi bir piyasa değeri olmayan zeytin karasuyundan polifenollerin eldesine imkân sağlayacak ve ülke ekonomisi açısından oldukça faydalı olacaktır. Polifenollerin kozmetik, kimya ve ilaç sanayinde kullanımları araştırılmaktadır.

İnsan sağlığını etkileyen stres çeşitlerinden biri oksidatif strestir ki bir reaktif oksijen türü (ROS) organizmadaki DNA, protein ve yağ yapılarına zarar verebilmektedir. Antioksidanlar bu reaktif oksijen türlerini temizler ve kanserli bölgede hücre çoğalmasını azaltırlar (Kampa ve ark., 2000; Meyer ve ark., 2005) böylece antioksidanlar son zamanlarda büyük ilgi çekmektedirler. Antioksidanlar ayrıca kalp ve damar hastalıklardan korunmak için de tavsiye edilmektedir. Doğal ve

sentetik antioksidanların ikisi de ticari olarak temin edilebilir fakat sentetik antioksidanların yan etkileri konusunda çeşitli tartışmalar vardır. Bu nedenle doğal antioksidanlar çalışmalarda önem kazanmıştır. Zeytinde bulunan polifenoller de doğal antioksidanlardır, sofralık zeytin veya zeytinyağı tüketilerek vücuda alınmaktadır.

Karasudan antioksidan özellik gösteren polifenollerin geri kazanımına yönelik sınırlı çalışmalar bulunsa da prinanın polifenol içeriği ve prina polifenollerinin geri kazanımı konusu henüz çalışılmamıştır. Zeytinden yağ ekstrakte edildikten sonra kalan atık prinadır. Öyleyse polifenoller sadece zeytinyağında bulunmamaktadır, prinanın da bir polifenol içeriği vardır. Polifenoller zeytinde bulunuyorsa ve zeytin yoluyla tüketilebiliyorsa, prinadan da ekstrakte edilebilir ve sonra gıda ürünlerine katılabilir veya yalnız tüketilebilir. Prinadan polifenollerin ekstraksiyonuyla atık olan prinadan değerli bir son ürün elde edilebilir. Piyasa değeri olan polifenollerin zeytinyağı yan ürünlerinden geri kazanımı hem ekonomik açıdan önemlidir, hem de polifenollerin ayrıştırılması ile bu yan ürünler çevre için çok daha az zararlı bir atık olacaktır.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın hipotezi şudur; zeytinyağı üretimi sırasında açığa çıkan karasuya ek olarak prina atıkları da belirli polifenol içerirler. Antioksidan aktiviteye sahip, piyasa değeri yüksek polifenoller karasu ve prinadan ekstrakte edilerek geri kazanılabilir ve konsantre ürün eldesi gerçekleştirilebilir. Polifenol konsantrasyonu sırasında uygulanacak ısı işlemler polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktiviteye etki edebilir.

Bu çalışmanın amacı zeytinyağı fabrikası atıklarının polifenol içeriklerinin belirlenmesi, polifenol ekstraksiyonu, ısı işlem olarak buharlaştırmanın prinadan elde edilen ekstraktların polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktivitesine etkisinin hesaplanması ve buharlaştırma sırasında prina ekstraktlarındaki polifenol kayıplarının reaksiyon derecesi, hız sabiti, aktivasyon enerjisi gibi kinetik parametrelerinin hesaplanmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

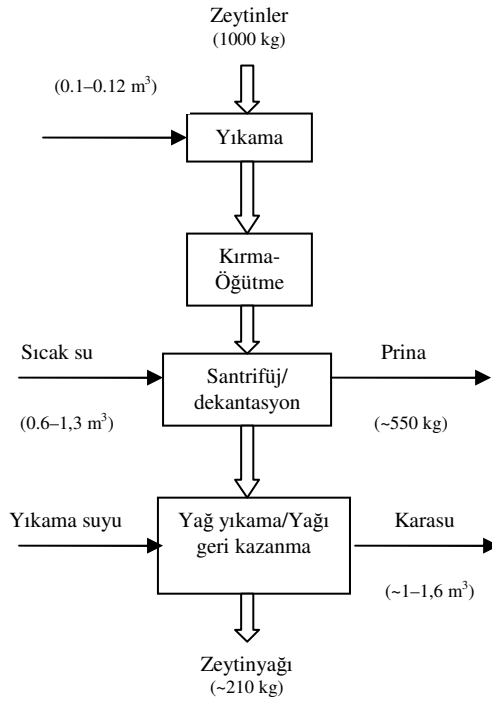
Bu bölümde zeytinyağı üretim prosesleri, zeytinyağı üretimi sırasında oluşan yan ürünler zeytin karasuyu ve prina, çoğunlukla polifenoller olarak isimlendirilen fenolik bileşikler hakkında bilgi verilmiştir. Polifenollerin ekstraksiyonu, ısıt işlemlerin polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktiviteye etkisi konularına değinilmiştir.

2.1. Zeytinyağı Üretim Prosesleri

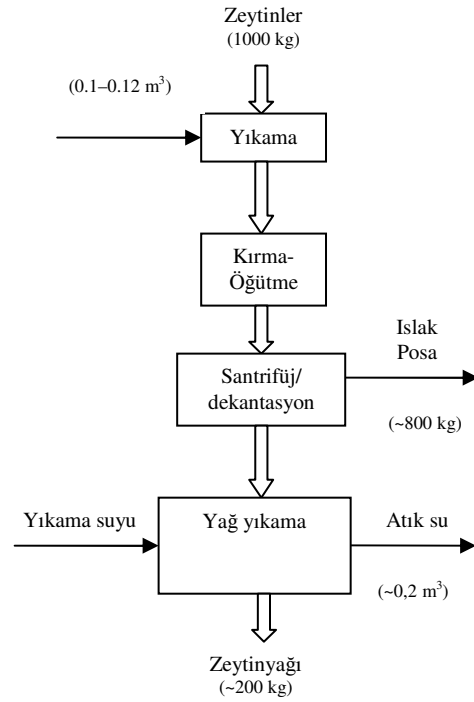
Zeytinyağı üretimi; zeytini yıkama, öğütme, kırma ve tüm prosesin ana basamağını oluşturan ekstraksiyon olmak üzere farklı işlemler içermektedir. Oluşan atığın miktarı ve kimyasal özellikleri kullanılan ekstraksiyon metoduna bağlıdır. Yağın ekstraksiyonunda iki metot kullanılmaktadır. Bunlardan ilki sadece küçük değişiklikler yapılarak yüzyıllardır kullanılmakta olan geleneksel prestir. Santrifüj, zeytinyağı endüstrisinin son yıllarda kullandığı bir işlemdir.

Geleneksel pres oldukça eski bir teknoloji olmasına rağmen, hala bazı zeytinyağı üreticileri tarafından kullanılmaktadır. Pres ile ekstraksiyon sonrası yan ürün olarak zeytin kabuğu adı verilen katı bir kısım ve zeytin karasuyundan aktarma ile ayrılan zeytinyağını içeren emülsiyon elde edilir. Diğer taraftan Şekil 2.1.' de tanımlandığı gibi üç faz ve iki faz olmak üzere iki santrifüj sistemi vardır. Üç fazlı sistemde işlem sonunda, bir katı (zeytin kabuğu veya zeytin posası) ve iki sıvı (yağ ve atık su) olmak üzere üç fraksiyon üretilmektedir. Bu sistem pres ile karşılaştırıldığında tam otomasyon, daha iyi yağ kalitesi, daha düşük alan ihtiyacı gibi avantajlara sahiptir. Aynı zamanda daha fazla su ve enerji tüketimi, yüksek atık su üretimi ve daha pahalı donanım gibi bazı dezavantajları da mevcuttur. 1991/1992 yıllarının sonunda zeytinyağı üretiminde, zeytin karasu miktarını %75 azaltan yeni bir santrifüj sistem geliştirilmiştir. İki fazlı olarak adlandırılan sistem, bir katı (ıslak posa) ve bir sıvı (zeytinyağı) olmak üzere iki faz üretmektedir (Roigh ve ark., 2006).

Üç Fazlı Sistem



İki Fazlı Sistem



Şekil 2.1. Üç ve iki fazlı santrifüj sistemleri (Albuquerque ve ark., 2004)

Zeytinyağı santrifüj işlemi ile sıvı fazdan ayrılmakta, yağ fabrikalarında üretilmek istenen zeytinyağı sınıfına göre işlenerek rafine edilmekte ve ambalajlanarak piyasaya verilmektedir. Türk Gıda Kodeksi'nin Yemeklik zeytinyağı ve yemeklik prina yağı hakkındaki tebliğine (Tebliğ no:98/7) göre zeytinyağı; sadece zeytin ağacı meyvelerinden elde edilen yağlardır ve özellikleri göz önünde bulundurularak sınıflandırılmıştır:

Natürel Zeytinyağı: Zeytin ağacı meyvesinden doğal niteliklerinde değişikliğe neden olmayacak bir ısı ortamında, sadece yıkama, sızdırma, santrifüj ve filtrasyon işlemleri gibi mekanik veya fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen berrak, yeşilden sarıya değişebilen renkte, kendine özgü tat ve kokuda olan doğal halinde gıda olarak tüketilebilen yağlardır.

a) Ekstra Natürel Sızma: Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 1,0 gramdan fazla olmayan yağlardır.

b) Natürel Birinci: Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 2,0 gramdan fazla olmayan yağlardır.

c) Natürel İkinci: Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 3,3 gramdan fazla olmayan yağlardır.

Rafine Zeytinyağı: Zeytin ham yağının doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmayan metotlarla rafine edilmeleri sonucu elde edilen, sarının değişik tonlarında rengi olan, kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır. Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 0,3 gramdan fazla olmamalıdır.

Riviera Zeytinyağı: Rafine zeytinyağı ile gıda olarak doğrudan tüketilebilecek natürel zeytinyağları karışımından oluşan, yeşilden sarıya değişen renkte, kendine özgü tat ve kokuda bir yağdır. Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gramda 1,5 gramdan fazla olmamalıdır.

Geleneksel pres yöntemi ve üç fazlı sistemin ikisinde de zeytin karasuyu açığa çıkmaktadır. Zeytinyağı üretiminde bir yan ürün olarak ortaya çıkan karasu, bilinçsiz bir şekilde yıllardır atık olarak toprağa, akarsulara bırakılmaktadır.

2.2. Zeytin Karasuyu ve Yapılan Çalışmalar

Zeytin karasuyu zeytinin çeşidine, olgunluğuna, yetiştiği bölgenin iklim ve toprak şartlarına, ekstraksiyon metoduna göre farklılık göstermektedir. Karasu koyu renkli, kötü kokulu, bulanık, askıda katı madde içeriği olan, yüksek organik yüke sahip bir yapıdadır ve fenolik maddeler içermektedir (Bubba ve ark., 2004). Zeytin karasuyu; bileşimi, içeriğindeki yağ ve etrafa yaydığı koku sebebiyle çevre açısından önemli bir kirlilik potansiyeli oluşturmaktadır. Üretim sonunda çevreye atılan yüksek kirletici özelliklere sahip zeytin karasuyunun temizliği, zeytinyağı üretiminde önde gelen diğer dünya ülkeleri ve ülkemiz için acilen çözümü gereken bir konudur.

Çevresel etkinin önlenmesi için en çok kullanılan seçeneklerden biri zeytin karasuyunun havuzlarda toplanması ve doğal olarak buharlaşmaya bırakılmasıdır. Bu işlemin tercih edilmesinin sebebi, düşük maliyeti ve Akdeniz ülkelerinin iklim şartlarının açıkta buharlaşmaya uygun olmasıdır. Bununla beraber geniş alan ihtiyacı, çevreye yayılan koku, sızıntı, haşere çoğalması gibi metodun olumsuz yönleri de vardır. Yakın zamanlarda özel atık su işleme tesisleri de geliştirilmektedir ancak bu

işletmeler zeytinyağı sektöründe ekonomik ve teknik sebeplerden yaygınlaştırılamamaktadır.

Gelişen zeytinyağı sektörü ile proses sonunda çıkan atıklardaki ani artış zeytinyağı üretiminin yaygın olduğu Akdeniz ülkeleri ve ülkemiz için bir yan ürün olan zeytin karasuyunun arıtımı ve değerlendirilmesi konularında yapılan çalışmalarını ön plana çıkarmıştır.

Borsani ve Ferrando (1996) zeytinden yağ eldesi sonucu oluşan zeytin karasuyunu işlemek amacıyla, İtalya’ da kapasitesi 300 m³/gün olan bir atık su işleme tesisi üzerinde çalışmışlardır. İşletme şu adımlar üzerine kurulmuştur: 1) Kirli su depolama, 2) Yağın uzaklaştırılması, 3) Askıda katıların çöktürülmesi, 4) Polimerik membran ile teğet filtrasyon, 5) Biyolojik işlem. Çalışmada uygulanan ultra filtrasyon işleminde çıkan süzüntünün (biyolojik işleme girmeden) kirletici konsantrasyonunun, ham atık suya göre %50 düşük olduğu vurgulanmıştır. Tüm adımlar sonunda işletmeden ayrılan atık suyun biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ₅) ve kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) değerlerinin düşük limitler olan: BOİ₅ 40 ppm, KOİ 160 ppm’ de tutulduğu belirtilmiştir.

Turano ve ark. (2002) zeytin karasuyu ile ilgili yaptıkları çalışmada, hem atıkların sebep olduğu kirliliğin azaltılmasını hem de atık suda bulunan yağ, şeker, polifenol gibi bazı yararlı ürünlerin seçici olarak ayrıştırılmasını amaçlamışlardır. Yöntem bir başlangıç adımı olarak askıda katı maddelerin uzaklaştırıldığı santrifüj işlemini içermektedir. Santrifüj sonrası elde edilen temiz üst faz, gerçek seçici ayırma işleminin gerçekteştiği ultra filtrasyon sistemine verilmektedir. Santrifüj ve ultra filtrasyon kombinasyonu KOİ değerinde %90 azalmaya izin vermektedir. Üstelik yağların membrandan geri çevrilmesiyle; tuz, şeker, polifenollerini içeren süzüntü kısımdan yağın ayrılması sağlanmıştır. Filtrasyon işlemi sonrası, süzüntü akımı organik fraksiyonunun ana olarak şeker ve polifenoldan oluştuğu, antioksidan özellikleri sebebiyle bu fenolik maddelerin eczacılık alanında ve gıda koruyucusu olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Lesage-Meessen ve ark. (2001) üç ve iki fazlı santrifüj sistemlerde oluşan zeytinyağı atıklarının içeriğinde bulunan basit fenolik bileşikleri incelemişlerdir.

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunun etil asetat ile gerçekleştirildiği çalışmada, üç ve iki fazlı sistemlerde açığa çıkan zeytinyağı atığındaki toplam fenollerin sırasıyla %28,8 ve 42,2 (kuru atıktaki ağırlıkça polifenol yüzdesi) geri kazanımının gerçekleştirildiği belirtilmiştir.

Allouche ve ark. (2004) üç fazlı sistemlerde açığa çıkan zeytin karasuyunda bulunan yüksek katma değerli fenolik bileşiklerin geri kazanımı için etkili yöntemin geliştirilmesi üzerinde çalışmışlardır. Zeytin karasuyunda bulunan ana bileşiklerden biri olan hidroksitrisolün ekstraksiyonuna ve saflaştırılmasına özel önem verilmiştir. Yapılan kesikli optimizasyon denemeleri karasudan fenolik monomerlerin geri kazanımında en etkili çözücünün etil asetat olduğu ve en iyi ekstraksiyon veriminin pH=2 değerinde alındığı vurgulanmıştır. Hidroksitrisolün en iyi geri kazanımının (%85,46) üç aşamalı sürekli karşı akım sıvı-sıvı ekstraksiyon birimi kullanılarak elde edildiği belirtilmiştir. Yapılan çalışmada bir litre karasudan 1,225 g hidroksitrisol elde edilmiş, sonrasında kromatografik sistem yoluyla litre karasudaki bir gram hidroksitrisolün saflaştırılması çalışılmıştır.

Russo ve ark. (2007) çalışmasında zeytinyağı prosesinden çıkan karasuyun, sabit proses parametreleriyle çalışan pilot tesiste, ön işlem olan santrifüj adımı kullanılmadan mikrofiltrasyon ve ultra filtrasyon işlemlerine tabi tutulmasını incelemiştir. Mikro filtrasyon ve ultra filtrasyondan çıkan süzüntüler ters ozmos ile yoğunlaştırılmış, süzüntülerin kimyasal kompozisyonları incelenmiştir. Çalışma sonuçları, yüksek kirlenme ve temizleme işlemindeki zorluklar nedeniyle mikro filtrasyon işleminin prosesin kritik bölümü olduğunu göstermiştir. Seramik 1 Kd ve polimerik 6 Kd membranlar kullanılarak yapılan ultra filtrasyon denemelerinin hidroksitrisol seçiciliği açısından bir farklılık göstermediği belirtilmiştir. Ters ozmos işlemi %96 ve %99 aralığında değişen geri çevirme değerleriyle tüm bileşenleri yoğunlaştırmaktadır. Mikro filtrasyon ve ultra filtrasyon süzüntülerinin veya ters ozmos konsantrisinin ilaç bileşimlerinde, ters ozmos süzüntüsünün içecek endüstrisinde, mikro filtrasyon ve ultra filtrasyon konsantrilerinin ise gübre veya biyogaz üretiminde kullanılabileceği belirtilmiştir.

Ülkemizde karasu üzerine yapılan çalışmalar her geçen gün önem kazanmaktadır. Zeytin karasuyunun fiziksel kimyasal ve ileri yükseltgenme

yöntemleriyle arıtımı konusunda Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada zeytin karasuyunun arıtımında kullanılan farklı yöntemlere değinilmiştir. Zeytin karasuyunun arıtımında kullanılan yöntemler:

- Fiziksel yöntemlerle arıtılması (yüzeyde tutunma, sulama ve gübre amaçlı kullanım, lagünlerde buharlaştırma, vakumlu buharlaştırma, damıtma, membran filtrasyon),
- Kimyasal yöntemlerle arıtılması (kimyasal çökeltim, kimyasal yükseltgeme),
- Biyolojik yöntemlerle arıtılması (aerobik biyolojik arıtım, anaerobik biyolojik arıtım, biyolojik değerlendirme),
- Elektroliz yöntemiyle arıtılması,
- Buharlaştırma, Hidroliz, Yükseltgeme, Ultrafiltrasyon (EHO) Yöntemi

olarak sıralanmıştır. Çalışmada zeytin karasuyunun arıtımında uygulanan yöntem, karasuyun fiziksel, kimyasal ve ileri yükseltgenme teknikleri uygulanarak arıtılması amacıyla geliştirilmiştir. Öncelikle zeytin karasuyu, pıhtılaştırma-yumaklaştırma-çöktürme işlemlerinin gerçekleştirileceği tanka alınır. Bu tankta zeytin karasuyu önce pıhtılaştırma bölmesine alınarak pH değeri toz kireç ile istenen değere getirilir ve bu değerde tutulur. Daha sonra yumaklaştırma bölmesine alınır ve atık suyun özelliğine göre belirlenen miktar ve özellikte geliştirilen toz polimer çözültisi eklenerek sudaki çözünmüş ve askıda bulunan katıların yumaklaşması sağlanır. Yumaklaşma aşamasından sonra zeytin karasuyu çöktürme bölmesine alınarak beklenir ve böylece çöktürme işlemi tamamlanır. Bu bölmede çökelen katı tankın altından alınır. Çökelen katı alındıktan sonra üstte kalan sıvı, zeolit yataktan geçirilir ve yükseltgeme tankına alınır. Yükseltgeme tankına alınan sıvı, sodyum hipoklorit çözültisi eklenerek ve havalandırma yapılarak yükseltgenir. Bu aşamadan sonra arıtılmış su önce bir zeolit yataktan sonra da bir UV/ozon sisteminden geçirilir. Bu işlem ardışık olarak veya dolaşımla yapılabilir. Son olarak arıtılmış su klor giderimi amacıyla bir aktif karbon yataktan geçirilir. Bu yöntemle, KOİ, fenolik bileşikler, BOİ₅, AKM ile yağ ve gres giderimi %98–100 gerçekleştirilmektedir. Geliştirilen yöntem Türk Patent

Enstitüsü'nde 2005-G-91726 numara ile kayıtlı bulunmaktadır (İkizoğlu ve ark., 2005).

Dokuz Eylül Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümünde Ege Bölgesi Sanayi Odası (EBSO) projesi kapsamındaki zeytinyağı işletmeleri için durum tespiti, karasu karakterizasyonu, karasu arıtılabilirlik çalışmaları ve sonuçlarını içeren Zeytin Karasuyu Arıtımı Projesi (İzmir, 2003) gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada zeytin üretim prosesleri ve üretim prosesine bağlı olarak oluşan karasuyun kirlilik karakteristiklerine, zeytinyağı üretimi atık sularının (karasuyun) arıtımında, bertaraf edilmesinde ve değerlendirilmesinde uygulanan yöntemlere ve karasu numuneleri ile yapılan arıtılabilirlik denemelerine yer verilmiştir. Zeytin yağ üretiminde oluşan atık suyun (karasu):

- Yoğun viyole-koyu kahve renkte, siyaha kadar renk,
- Kuvvetli, zeytinyağına özgü bir koku,
- Yüksek derecede organik kirlilik (220 g/L'ye kadar KOİ değerleri),
- KOİ/BOİ₅ oranı 2,5–5 aralığında (zor ayrışabilir atık),
- pH değeri 3–5,9 aralığında,
- Yüksek miktarda polifenol içeriği,
- Yüksek miktarda katı madde içeriği (20 g/L toplam katı maddeye kadar)

gibi özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Şengül ve ark., 2003).

Aktaş ve ark. (2001) yaptıkları çalışmada, geleneksel ve sürekli sistemlerden alınan toplam on yedi karasu numunesini karakterize etmişlerdir. Kireç ile muamelenin karasu numuneleri üzerindeki etkileri araştırılmış, muamele edilen numunelerin içeriklerindeki düşüş tanımlanmıştır. Kireç ile muamele işlemi sonrası presleme ve santrifüj proseslerinden çıkan karasu numunelerinin KOİ değerleri sırasıyla %41,5–46,2 azaltılmıştır. Yine bu uygulama ile presleme ve santrifüj proseslerinden çıkan karasu numunelerinin sırasıyla toplam katı içeriğinde %29,3–46,9, yağ-gres içeriğinde %94,9–95,8, polifenol içeriğinde %73,5–62,5 azalma gözlemlendiği belirtilmiştir. Karasuyun kirletici özelliğinin azaltılması için önerilen

kireç ile muamelenin, kirecin diğer kimyasallardan daha ucuz oluşu ve kolay temin edilebilmesi açısından uygulanabilir bir yöntem olduğu açıklanmıştır. Ayrıca karasuyun üzerinde bir film oluşturarak buharlaşmaya izin vermeyen yağ tabakası kireç ile büyük ölçüde uzaklaştırıldığından; işlem sonrası sıvı fazın, havuzlarda bulunan ham atık suya göre daha kolay buharlaştığı belirtilmiştir.

Sağlık ve ark. (2002) geleneksel ve sürekli sistemden aldıkları zeytin karasuyu numunelerinde kireç uygulaması ile yağın geri kazanımını çalışmışlardır. Karasu numunesi kireç ile muamele edilmiş, bez plaka kullanılarak filtre edilmiş, filtre üzerinde kalan kısım kurutularak organik bir çözücü ile ekstrakte edilmiştir. Uygulanan yöntem ile yağ % 70,6–96,4 arasında geri kazanılabilmektedir. Geri kazanılan yağ, saf yağ olarak düşünülemez ancak örneğin sabun sanayinde kullanılabilir. Karasudan yağın alınması ile atık suyun kirliliği azaltıldığı gibi ekonomik değeri olan yan ürün geri kazanılır.

2.3. Prina ve Yapılan Çalışmalar

Prina, zeytinin zeytinyağına işlenmesi sırasında oluşan katı atıktır ve zeytinin çekirdek, kabuk ve etli kısmını içermektedir. O halde prina bünyesinde yağ ve karasu ihtiva etmektedir. Prinanın içeriği zeytinin tipine, yetiştiği bölgenin iklim ve toprak şartlarına, zeytinden yağ çıkartılması sırasında kullanılan sisteme göre değişmektedir. Prina zeytinyağı üretim teknolojisine bağlı olarak %3–6 yağ içermektedir.

Santrifüj sistemlerde zeytinyağı üretimi sırasında oluşan katı yan ürün, üç fazlı ve iki fazlı sistemlerde önemli farklılıklar göstermektedir. İki fazlı sistemlerde oluşan katı yan ürünün nem içeriği (%60–70), üç fazlı sistemlerdeki katı yan ürünün nem içeriği ile kıyaslandığında (%35–40) oldukça yüksektir. Üç fazlı sistemlerin katı yan ürünü nemli bir katı olarak kabul edilirken, iki fazlı sistemlerin yan ürünü sulu çamur halindedir ve ‘alperujo’ olarak adlandırılmaktadır. Zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılan farklı sistemlere göre değişiklik gösteren yan ürünler Tablo 2.1.’de özetlenmiştir (Liebanes ve ark., 2006).

Tablo 2.1. Zeytinyağı üretim proseslerine göre oluşan yan ürünler

Üretim Prosesi	Girdiler	Çıktılar
Geleneksel pres	Zeytin (1000 kg)	Yağ (200 kg)
	Yıkama suyu (0,1–0,12 m ³)	Katı atık (400 kg: %25 su + %6 yağ)
	Enerji (40–63 kWsaat)	Atık su (0,6 m ³)
Üç fazlı dekantör	Zeytin (1000 kg)	Yağ (200 kg)
	Yıkama suyu (0,1–0,12 m ³)	Katı atık (500–600 kg: %40–50 su + %4 yağ)
	Karıştırma suyu (0,5–1 m ³)	
	Enerji (90–117 kWsaat)	Atık su (~1–1,2 m ³)
İki fazlı dekantör	Zeytin (1000 kg)	Yağ (200 kg)
	Yıkama suyu (0,1–0,12 m ³)	Katı atık (800–950 kg: %60–70 su + %3 yağ)
	Enerji (90–117 kWsaat)	

Prina günümüzde gübre, hayvanlar için yem ve yakıt olarak kullanılmaktadır. Ayrıca prinadan çözücü kullanılarak yağ elde edilmektedir. Türk Gıda Kodeksi'nin Yemeklik zeytinyağı ve yemeklik prina yağı hakkındaki tebliğine (Tebliğ no:98/7) göre: zeytinyağı, sadece zeytin ağacı (*Olea europaea sativa*) meyvelerinden elde edilen yağlardır. Solvent kullanılarak ekstrakte edilen veya reesterifikasyon işlemi görmüş (natürel trigliserit yapısı değiştirilmiş) yağlar ve diğer cins yağlarla karışımı bu tanımın dışındadır. Prina yağı ise prinanın (zeytin küspesi) solventlerle ekstraksiyonu sonucu elde edilen, reesterifikasyon işleminden geçmemiş, diğer yağlar ve karışımları ile karıştırılmamış yağlardır. Prina yağı hiçbir koşulda zeytinyağı olarak adlandırılmaz. Tebliğe göre rafine prina yağı, ham prina yağının doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmayan metotlarla rafine edilmeleri sonucu elde edilen, rengi açık sarıdan kahverengi sarıya kadar değişebilen bir yağdır. Rafine prina yağı olduğu gibi veya natürel zeytinyağları ile karıştırılarak tüketime sunulabilir.

Prinanın en yaygın kullanım alanı yüksek enerji içeriği nedeniyle yakıt amaçlı kullanımıdır. Zeytin ağaçlarının tipine, toprağın yapısına, iklim ve topraktaki

besleyicilere bağılı olarak prinanın ısıı değeri değişse de yakıt amaçlı kullanımı büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar:

- Üretilen birim enerji başına yakıt maliyetinin düşük olması
- Atığın tamamen değerlendirilerek ekolojik dengenin korunması
- Yanma sonucu oluşan emisyonların fosil yakıtlara göre daha az olması
- Yakıtın depolanmasında bir sorun olmaması
- K l içeriğinin (%1,5) düşük olması (bu değer, işlem görmemiş prinanın atık olarak kaplayacağı alan düşünüldüğünde ihmal edilebilir seviyededir)

olarak sıralanmaktadır. Dezavantajları ise:

- Üretimin yapıldığı yerlerde kullanılması gerekliliği (nakliye masraflarının enerji üretim maliyetine olumsuz etkisi)
- Yıllık rekoltenin düzensiz olması

olarak gösterilmektedir (G rel ve ark., 2003).

Prinanın başlangıç nem içeriği ağırlıkça %44,78 olmasına rağmen yüksek enerji içeriği sayesinde, güneşte kurutulduktan sonra Türkiye’de fırıncılıkta, zeytinyağı işletmelerinde direk yakılarak kullanılmaktadır. Doymaz ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada kabin tipi kurutucuda prinanın kuruma davranışını incelemişlerdir. Çalışmada ortam havasının sıcaklığı 80 ile 110 C arasındadır ve hava hızı 1,2 m/saniye olarak sabit tutulmuştur. Numune kalınlığının kurutma karakteristiği üzerine etkisi, kurutma süresi ve kuru ürünün enerji kalitesi incelenmiştir. Liebanes ve ark. (2006) ise yaptıkları çalışmada iki fazlı sistemlerde oluşan %60–70 nem içerikli katı yan ürünün akışkan yatak ile kurutulması üzerine odaklanmışlardır. İki fazlı sistemlerdeki katı yan ürünün akışkan yatakta kurutulmasının, düşük hava sıcaklıklarında ($T < 150^{\circ}\text{C}$) yüksek kurutma verimi sağlamasıyla uygun bir alternatif olduğunu göstermişlerdir.

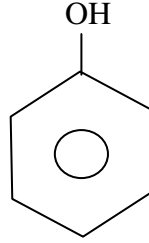
Yenilenebilir enerji kaynakları, fosil yakıtlara göre daha düşük maliyet ve daha düşük kirlilik gösterdiği için büyük ilgi çekmektedir. Çaynak ve ark. (2009) çalışmalarında alternatif yakıt olarak, prina yağından yenilenebilir ve temiz metil ester üretmeyi amaçlamışlardır. Optimum üretim koşulları deneysel olarak belirlenmiştir. En yüksek verim %30 metanol/yağ oranı kullanılarak, 60°C sıcaklıkta 60 dakika süreyle NaOH katalisti ile elde edilmiştir. Raporlanan optimum koşullar, ekonomik ve çevre dostu sonuçlarla endüstriyel proseslerde uygulama alanı bulabilir.

Stasinakis ve ark. (2008) karasudaki toplam fenollerin tarımsal yan ürün olan prina ile uzaklaştırılması üzerine bir çalışma yapmışlardır. Çalışmanın amacı karasudaki toplam fenollerin, katı yan ürün olan prina üzerine tutulmasını (sorption) araştırmaktır. Deneyler, kurutulmuş prina (OP-1), kurutulmuş ve çözücü ile ekstrakte edilmiş prina (OP-2) ve kurutulmuş, çözücü ile ekstrakte edilmiş ve yarım yakılmış prina (OP-3) olmak üzere üç farklı çeşit prina kullanılarak yürütülmüştür. Sonuçlara göre OP-3 toplam fenollerin tutulmasında yüksek performans göstermiştir. Başlangıç toplam fenol konsantrasyonu 56 mg/L olan numunede, 1 g/L OP-3 kullanıldığında toplam fenollerin %17'si uzaklaştırılırken, 50 g/L OP-3 kullanıldığında uzaklaştırılan toplam fenollerin %90'ı geçtiği belirtilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda OP-3 numunesinin, zeytin karasuyundaki toplam fenollerin uzaklaştırılmasında bir ön işlem olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır. Katı atık prinanın sorbent olarak kullanılmasıyla, çevresel sorun olan katı atık hacminin azalacağına hem de endüstriyel atık suların işlenmesinin makul maliyetlerle gerçekleştirilebileceğine dikkat çekilmiştir.

2.4. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

Fenolik bileşikler yapısal olarak, bir aromatik halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de dahil bir veya daha fazla hidroksil gruplarını içeren maddelerdir ve basit fenolik moleküllerden yüksek polimerize bileşiklere sınıflandırılmaktadır. Bu yapısal çeşitliliğe karşın, bu grup bileşikler çoğunlukla polifenoller olarak isimlendirilirler. Fenolik bileşikler ve daha yaygın olarak kullanılan ismiyle polifenoller, benzen halkası içeren maddelerdir. Hidroksibenzen çoğunlukla fenol adı ile anılır. Buna göre en basit fenolik bileşik, bir tane hidroksil

grubu içeren benzen, yani fenoldür. Diğer tüm fenolik maddeler bundan türemişlerdir. Fenoller oda sıcaklığında renksiz bir sıvı ya da beyaz bir katı halinde bulunurlar.



Hidroksibenzen (fenol)

Şekil 2.2. En basit fenolik bileşik olan fenol

Meyve ve sebzeler fenolik bileşiklerin ana kaynaklarıdır. Fenolik bileşikler, büyüme ve çoğalma, patojenlere karşı korunma gibi olaylarda önemli rol oynamalarının yanında; meyve ve sebzelerin kendilerine özgü renklerinin ve duyuşal özelliklerinin oluşumunda da etkilidirler (Balasundram ve ark., 2006). Üstelik bazı fenolik bileşiklerin antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği bilinmektedir (Chun ve ark., 2005). Şimdiye kadar pek çok bitkisel fenolik bileşik izole edilip tanımlanmıştır ve buna devamlı olarak bulunan yeni fenolikler eklenmektedir. Fenolik bileşiklerin yapısal çeşitliliği bu bileşiklerin sınıflandırılmasını güçleştirmektedir. Fenolik asitler, flavonoidler ve taninler beslenme açısından kabul edilen ana fenolik bileşik gruplarıdır (Balasundram ve ark., 2006). Polifenollerin en önemli biyolojik özellikleri ise antioksidan olarak görev yapmalarıdır.

Antioksidanlar yağların ve diğer moleküllerin oksidasyonunu, oksitleyici zincir reaksiyonunun başlayışını veya yayılmasını engelleyerek, önleyebilen veya geciktirebilen bileşikler olarak tanımlanabilir. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, serbest radikalleri yakalama, hidrojen atomu verme yeteneklerinden ileri gelmektedir (Balasundram ve ark., 2006). Fenoller hidrojen atomunu serbest radikallere bağışlama eğilimindedir bu nedenle yağ oksidasyonu sırasında yayılma zincirini durdururlar (Ranalli ve ark., 2003). İnsan sağlığını etkileyen stres çeşitlerinden biri oksidatif strestir ki bir reaktif oksijen türü (ROS) organizmadaki DNA, protein ve yağ yapılarına zarar verebilmektedir. Antioksidanlar bu reaktif

oksijen türlerini temizler ve kanserli bölgede hücre çoğalmasını azaltırlar (Kampa ve ark., 2000; Meyer ve ark., 2005) böylece antioksidanlar son zamanlarda büyük ilgi çekmektedirler. Kalp ve damar hastalıkları gibi kronik hastalıkların, kanserin, iltihaplı bağırsak sendromlarının ve Alzheimer hastalığının ilerlemesinin geciktirilmesinde, fenolik antioksidanların önemli rol oynadığı belirtilmektedir (Chun ve ark., 2005).

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, antioksidan özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedirler ve insan beslenmesinde önemli bir yer tutarlar. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, yapıya; özellikle hidroksil gruplarının sayı ve pozisyonlarına ve aromatik halka üzerinde yer alan grupların doğasına bağlıdır. Meyveler, sebzeler ve içecekler insanların beslenmesinde ana fenolik bileşik kaynaklarıdır. Gıda ve tarım ürünleri işleyen endüstriler, büyük miktarlarda doğal antioksidan kaynağı olabilecek fenoliklerce zengin yan ürünler oluşturmaktadır (Balasundram ve ark., 2006).

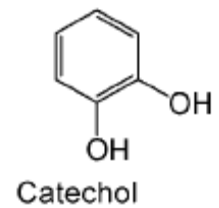
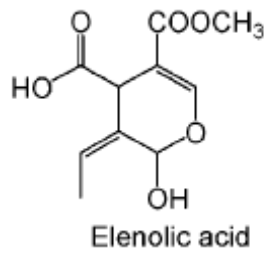
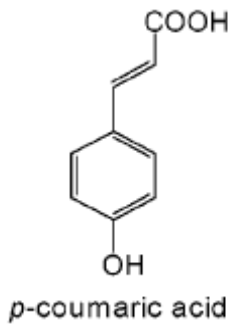
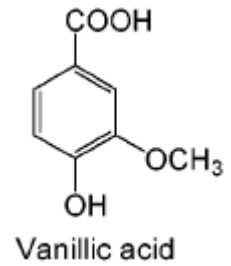
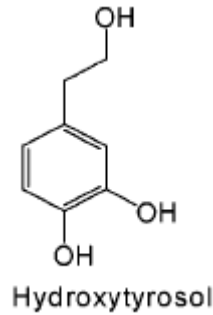
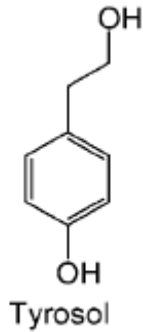
Zeytin meyvesi, yaprakları ve yağı biofenol kaynağı olarak büyük ilgi çekmektedir. Örneğin zeytin yaprağı iyi bilinen bir biofenol kaynağıdır ve marketlerde birçok ticari isim altında fonksiyonel gıda olarak satılmaktadır. Zeytinyağının biofenol fraksiyonu, zeytin meyvesinin fenolik içeriğinin sadece %2'sini içermektedir; kalan %98'i zeytin karasuyunda kaybolmaktadır (Obied ve ark., 2005). Bu oran zeytin karasuyunu önemli bir polifenol kaynağı haline getirmektedir.

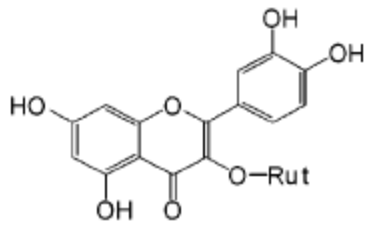
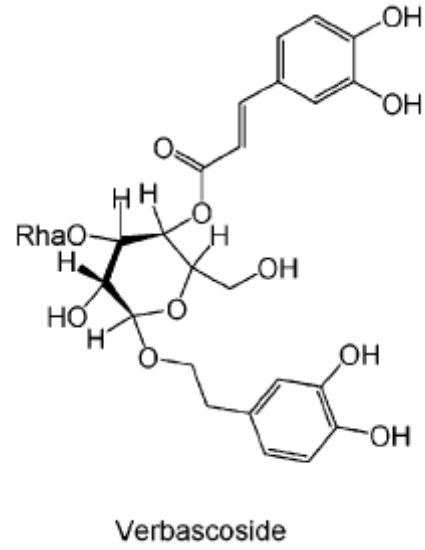
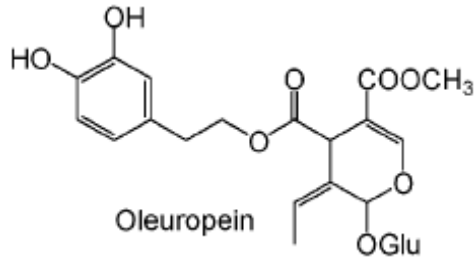
Zeytin karasuyunun fenolik profili karmaşıktır, bu zorluk henüz atığın değerlendirilmesinde tamamen aşılamamıştır. Zeytin karasuyunda bulunan başlıca biofenoller; hydroxytyrosol, oleuropein, tyrosol, caffeic acid, vanillic acid, verbascoside, elenolic acid, p-coumaric acid, catechol, rutin olarak belirtilmektedir. Karasuyun biyoaktivitesi üzerinde yapılan çoğu çalışma, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi üzerinde yoğunlaşmıştır.

2.4.1. Polifenollerin Ekstraksiyonu

Biofenollerin analizinde ekstraksiyon işlemi kullanılmaktadır; ekstraksiyonun

amacı numuneden matris bileşenlerin ekstraksiyonunu minimize ederken, tüm polifenollerin nicel olarak geri kazanımını sağlamaktır. Fenolik ekstraksiyonla ilgili problem, diğer biofenoller sitoplazmik boşluklardayken bazı biofenollerin hücre duvarına bağlı kalmasıdır. Ekstraksiyon metodunun, çözücünün, ekstraksiyon süresi ve sıcaklığının seçimi önemlidir. Etil asetat, zeytin karasuyu gibi sulu matrislerden biofenollerin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Obied ve ark., 2005). Hydroxytyrosol'ü hedef alan kapsamlı bir çalışmada, fenolik bileşiklerin geri kazanımında en uygun çözücünün etil asetat olduğu belirtilmiştir. Kullanılan tüm çözücülerin karasudan polifenollerini ekstrakte ettiği ancak ekstraksiyon güçleri arasında önemli farklılıkların olduğu bulunmuştur. Çözücülerin ekstraksiyon gücünün şu sırayla azaldığı belirtilmiştir: etil asetat > metil izobutil keton > metil etil keton > dietil eter. Bu çalışmada ayrıca jel filtrasyonu kullanılarak zeytin karasuyunda üç fenolik fraksiyonun varlığı gösterilmiştir: yüksek moleküllü kütle fraksiyonu ($M > 250$ kDa), orta moleküler kütle fraksiyonu ($M = 13$ kDa) ve monomerik fenoller ($M = 180$ Da) (Allouche et al., 2004).





Şekil 2.3. Zeytin karasuyunda bulunan başlıca fenolik bileşikler (Obied ve ark., 2005; Balasundram et al., 2006)

Fenoller, bir hidrojen atomunu serbest radikallere bağışlama eğilimindedirler, böylece yağ oksidasyonu sırasında yayılma zincirini durdururlar. Zeytin karasuyundaki fenol bileşikleri antioksidasyon potansiyeline göre farklı gruplarda sınıflandırılmaktadır. Karasuda bulunan çoğu fenol bileşikleri, az güvenli sentetik antioksidanlara kıyasla daha yüksek antioksidasyon potansiyeli gösterirler bu nedenle endüstriyel anlamda gıda maddelerinin muhafazasında sentetik antioksidanların yerini alabilirler (Ranalli ve ark., 2003).

Zeytin karasuyundan ayrılan kekteki ve prinadaki polifenoller çözücülerle ekstrakte edilebilirler. Ekstraksiyonun katı/çözücü oranı, süresi ve sıcaklığı bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonunu etkileyebilen faktörlerdir. Ekstraksiyon

süresinin, toplam polifenollerin zeytin yaprağından (Mylonaki ve ark., 2008), *Inga edulis* yaprağından (Silva ve ark., 2007), badem kabuğundan ve çam talaşından (pine saw dust) (Pinelo ve ark., 2004) geri kazanımını etkilediği raporlanmıştır fakat toplam polifenollerin çam kabuğundan (pine bark) geri kazanımını etkilememiştir (Jerez ve ark., 2006). Pinelo ve ark. (2004) ekstraksiyon sıcaklığının badem kabuğundaki ve çam talaşındaki polifenollerin geri kazanımına etkisini bulmuştur ve Silva ve ark. (2007) bunu *Inga edulis* yaprakları üzerinde yapmışlardır fakat Jerez ve ark. (2006) ekstraksiyon sıcaklığının çam kabuğu polifenollerinin geri kazanımı üzerine küçük etkilerini hesaplamışlardır. Ekstrakte edilen bitki materyali miktarı başına kullanılan çözücü miktarı değiştirilebilmektedir ve ekstrakte edilebilir polifenoller üzerine çözücü/bitki materyali oranının etkisi ayrıca çözücü çeşidi ve sıcaklığa göre de değişmektedir (Mylonaki ve ark., 2008, Pinelo ve ark., 2004, Silva ve ark., 2007). Ekstraksiyon süresinin, çözücü/çözünen oranının çeşitli ürünlerdeki polifenol ekstraksiyonuna etkisi araştırılmış fakat karasudan ayrılan kek ve prina üzerine etkisi araştırılmamıştır.

2.4.2. Isıl İşlemlerin Polifenol Konsantrasyonuna ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi

Polifenoller çözücü kullanarak ekstrakte edilebilirler ve antioksidan olarak kullanılırlar ancak çözücü içerisindeki ekstrakte edilen polifenollerin konsantre edilmesi gerekmektedir. Ekstrakte edilen polifenoller, buharlaştırma ve kurutma gibi bir ısıl işlemle konsantre edilebilirler fakat bu işlemler ekstraktlardaki polifenollerin miktarını ve aktivitesini etkileyebilir. Daud ve ark. (2007) kurutmanın kakao çekirdeğindeki polifenollerin bozunması üzerine etkisini çalışmışlardır, Archana ve ark. (1998) malt haline getirmenin ve kaynatarak ağartmanın darı bitkisinin (pearl millet) polifenol içeriği üzerine etkisini araştırmışlardır ve Brenes ve ark. (2002) ısıl işlemlerin, yağların antioksidan ve besin özellikleri üzerine etkisini raporlamışlardır. Belirtilen çalışmalarda, ısıl işlem süresince polifenoller gıda ürünlerinin içerisinde kapsüllenmiş durumdadır. Gıda ürünlerinin içerisinde kapsüllenmiş olarak bulunan antioksidanlar üzerine ısıl işlemlerin etkisi hakkında çalışmalar bulunsa da, prinanın su ekstraktlarında bulunan polifenoller üzerine ısıl işlemlerin etkisini gösteren bir çalışma yoktur.

Polifenollerin birçok fonksiyonu vardır ancak en yararlı fonksiyonu antioksidan olmalarıdır. Zeytinyağındaki polifenollerin antioksidan aktivitesi üzerine sınırlı çalışma vardır (Valanidis ve ark., 2004). Roy ve ark. (2007) ısıtma işlemlerin çeşitli sebzelerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisini incelemiştir ve 75 °C ile 100 °C sıcaklıklardaki ısıtma işleminin hem fenolik içeriği hem de anti-DPPH radikal aktiviteyi azalttığını hesaplamışlardır. Bu yüzden anti-DPPH radikal aktivitenin azalması fenolik içeriğin azalmasının sonucu olarak görülmüştür. Fakat antioksidan aktivitedeki azalmanın polifenol içeriğindeki azalmadan mı başka bir faktörden mi kaynaklandığı açık değildir ve polifenollerin antioksidan aktivitesi üzerine ısıtma işlemlerin etki mekanizması belirtilmemiştir.

Buharlaştırma ve kurutma gibi bir ısıtma işleminin modellenmesi, reaksiyon mertebesi, hız sabiti, aktivasyon enerjisi ve sıcaklığın etkisini kapsayan kinetik davranış hakkında bilgi gerektirir. Kinetik özelliklerin bilinmesi sadece ısıtma işleminin modellenmesi için gerekli değildir ayrıca bir ısıtma işlemi sırasında polifenol kayıplarının tahmin edilmesi için de gereklidir. Zeytindeki polifenollerin bozunma kinetiği sınırlı çalışmada incelenmiştir ki Campanella ve ark. (2008) 98°C sıcaklıkta bir ısıtma işlemine maruz kalan zeytinyağındaki polifenol bozunmasının kinetik analizinde model uydurma ve MacCallum metodunu kullanmışlardır fakat çalışmada polifenol kayıpları kinetiği için reaksiyon mertebesi belirtilmemiştir.

3. MATERİYAL VE METOT

Bu bölümde, çalışmada kullanılan materyallerin (zeytin karasuyu ve prina) temini ve muhafazası konularında bilgi verilmiştir. Zeytin karasuyu ve prina numunelerinde gerçekleştirilen analiz metotları ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

3.1. Materyal

Türkiye’ deki iklim şartlarında zeytinin hasat dönemi kasım, aralık, ocak aylarını kapsamaktadır. Zeytinlerin hasat edilmesi ile zeytinyağı sıkım işlemi de başlamaktadır. Çalışmada, zeytinin zeytinyağına işlenmesi prosesi sırasında sıvı atık olarak açığa çıkan zeytin karasuyunun ve katı atık olan prinanın incelenmesi hedef alındı. Karasu ve prina numuneleri Marmara Bölgesi’nde bulunan Üzden Gıda Kontini Zeytinyağı Fabrikası’ndan (İntepe, Çanakkale) 2007 yılının Kasım ayında temin edildi. İşletmede bölgeye ait Ayvalık tipi yağlık zeytinlerin sıkımı gerçekleştirilmektedir ve üç-fazlı sistem kullanılmaktadır. Zeytinin zeytinyağına işlenmesi yerinde incelendi, karasu ve prina numuneleri işlemin gerçekleştiği hattan aynı anda temin edildi. Numuneler, koyu renkli ağzı kapalı plastik bidonlarda $4\pm0,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta soğuk odada (Alarko-Carrier, Procold 2, İstanbul), karanlıkta muhafaza edildi.

3.2. Metot

3.2.1. Zeytin Karasuyunun İçeriği ve Polifenol Analizi

3.2.1.1. Toplam Katı Madde Tayini

Zeytin karasu numunesinin toplam katı tayininde 2540 B (Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998); çok iyi karıştırılmış numune, darası alınmış krozede $103\text{--}105^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta sabit tartıma ulaşana kadar kurutuldu ve boş kroze üzerindeki ağırlık artışı toplam katı kabul edildi. Analizde $2,5\text{--}200\text{ mg}$ arasında kalıntı verecek bir numune hacmi seçildi. $103\text{--}105^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki etüvde

(Ecocell 55, Gräfelting, Almanya) tutulan numuneler, etüvden alındıktan sonra desikatörde soğutuldu ve ağırlıkları tartıldı. Ağırlık ölçümlerinde hassas terazi (Mettler-Toledo, PB503-S/FACT, Greifensee, İsviçre) kullanıldı. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

$$\text{mg toplam katı/L} = (A-B) \times 1000 / \text{numune hacmi, ml}$$

A = kurutulmuş kalıntının ağırlığı + krozenin ağırlığı, mg

B = krozenin ağırlığı, mg

3.2.1.2. Askıda Katı Madde Tayini

Numunenin toplam askıda katı madde tayininde 2540 D (Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998); çok iyi bir şekilde karıştırılmış numune, ağırlığı standart olan filtre kâğıdından (Borosilikat cam elyaf mikro fiber filtre kâğıdı, 1,5 mikron, Whatman, İngiltere) geçirildi ve tortu filtrede bırakıldı. Tortu içeren filtre 103–105°C sıcaklıkta sabit tartıma ulaşıncaya kadar kurutuldu ve filtre kâğıdının ağırlığındaki artış, toplam askıda katı madde kabul edildi. Ağırlık ölçümlerinde hassas terazi (Mettler-Toledo, PB503-S/FACT, Greifensee, İsviçre) kullanıldı. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçlar aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

$$\text{mg toplam askıda katı madde/L} = (A-B) \times 1000 / \text{numune hacmi, ml}$$

A = filtre ağırlığı + kurutulmuş tortu, mg

B = filtre ağırlığı, mg

3.2.1.3. pH Tayini

Zeytin karasuyu numunenin pH değeri pH metre (Mettler Toledo-Seven Easy, Schwerzenbach, İsviçre) ile belirlendi. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı.

3.2.1.4. Yağ Tayini

Numunenin yağ içeriği, yağ ve gres tayini metodu 5520 B (Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998) ile belirlendi. Bu analiz metodu su-atık sularda yağ ve gres miktarı tayininde uygulanan kimyasal analiz metodunu içermektedir. Numune içerisinde çözölmüş ya da emölsiyon halindeki yağ ve gresin, ayırıcı çözücölerle sıkı teması ile sudan ayrılması esasına dayanmaktadır. Çözölmüş ya da dağılmış haldeki yağ ve gres, sudan n-hegzan yardımı ile ayrılmaktadır. Numunenin asitliğı, analize hazırlanması sırasında 1:1 HCl (HCl %37, Riedel-de Haën, Almanya) ile pH 2 ya da daha altına indirildi. 200 ml numune cam huni kullanılarak ayırma hunisine alındı, 30 ml n-hegzan (Riedel-de Haën, Almanya) ilave edildi ve 2 dakika kuvvetlice çalkalandı. Faz ayrımı için bekletildi ve içerisinde az miktarda organik tabaka bulunan sulu kısım orijinal numune kabına geri alındı. Çözücü fazı ise 10g susuz Na₂SO₄ (Riedel-de Haën, Almanya) ile birlikte filtre kâğıdından süzölerek temiz, darası alınmış cam balona aktarıldı. Ekstraksiyon iki kez 30 ml çözücü ilavesi ile yapıldı. Cam balona aktarılan çözücü faz, hazırlanan distilasyon düzeneğinin 85 °C sıcaklıktaki su banyosuna yerleştirildi. Geri kazanılan çözücü soğuk su banyosundaki erlen içerisinde biriktirilir. Sisteme son dakikalarda vakum uygulandı ve çözücü damlacıkları durduğunda cam balon su banyosundan alındı. En az 30 dakika desikatörde bekletilerek soğutuldu ve içerisinde yağ-gres bulunan balonun toplam ağırlığı tartıldı. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı. Numunenin yağ içeriğı aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

$$\text{mg yağ-gres} / L = (A-B) \times 1000 / \text{numune hacmi, ml}$$

A = cam balonun toplam ağırlığı, mg

B = cam balonun darası, mg

3.2.1.5. Toplam Azot Tayini

Numunede toplam azot tayini, toplam azot kiti (Total Nitrogen 14537 Cell Test, Merck, Darmstadt, Almanya) kullanılarak foto metrik olarak yapıldı. Organik ve inorganik azot bileşikleri, Koroleff metoduna göre termoreaktörde bir oksitleyici ajanla (yükseltgeyen) muamele edildiğinde nitrata dönüşmektedir. Bu nitrat,

konsantre sülfürik asitte, benzoik asit türeviyle reaksiyona girerek kırmızı renkli bir nitro bileşiği oluşturmaktadır. Analiz sonucu oluşan renk, fotometre (SQ118 Photometer, Merck, Darmstadt, Almanya) ile ölçüldü. Foto metrik ölçüm, cihaza toplam azot tayini için kullanılan 140 numaralı metod girilerek yapıldı ve numunenin toplam azot miktarı (mg/L) belirlendi. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı.

3.2.1.6. Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Analizi

Numunenin kimyasal oksijen ihtiyacı, kapalı refluks (geri akış) titrimetrik metot 5220 C (Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998) kullanılarak yapıldı. Pek çok organik madde kromik ve sülfürik asit karışımı ile kaynatıldığında oksitlenir. Numune güçlü asit çözeltisinde bilinen fazlalıkta potasyum dikromat ($K_2Cr_2O_7$) ile refluks edilir. Parçalamadan sonra kalan indirgenmemiş $K_2Cr_2O_7$, ferro amonyum sülfat (FAS) ile titre edilir. Böylece tüketilen $K_2Cr_2O_7$ miktarı belirlenir ve oksitlenebilen maddeler oksijen eşdeğeri (ekivalenti) cinsinden hesaplanır. Yüksek KOİ değerine sahip atık sular analize başlamadan önce gerekli ölçüde seyreltilmelidir. Analiz sırasında öncelikle standart potasyum dikromat parçalama çözeltisi (0,01667M), sülfürik asit reaktifi, ferroin indikatör çözeltisi, standart ferro amonyum sülfat titrantı (FAS) (0,025M) ve potasyum hidrojen fitalat (KHP) standardı metotta belirtildiği gibi hazırlandı. KHP, 1.176 mg O_2 /mg teorik KOİ değerine sahiptir (Pitwell, L.R., 1983). Bu sayede hazırlanan KHP standardının KOİ değeri bilinmektedir. Standart, numune gibi analize alındı ve KOİ değeri bilindiği için analizde kullanılan çözeltilerin ve analiz koşullarının doğrulaması gerçekleştirildi. Analiz sırasında ilk olarak numune ve reaktif hacimlerine göre seçilen cam tüpler (16×100 mm) ve kapakları %20'lik H_2SO_4 ile yıkandı. 2,5 ml numune tüpe kondu, üzerine 1,5 ml parçalama çözeltisi ve 3,5 ml sülfürik asit reaktifi dikkatlice ilave edildi. Tüplerin kapakları kapatıldı ve karıştırıldı. Daha sonra tüpler 150°C sıcaklıkta 2 saat termoreaktörde tutuldu. İki saat sonra alınan numuneler oda sıcaklığına soğutuldu. Tüpler, titrasyonun kolay yapılabilmesi için cam beherlere boşaltıldı. İçerisine 0,1 ml (2 damla) ferroin indikatörü ilave edilerek, standardize edilmiş 0,025M FAS ile titre edildi. Titrasyonun son noktası mavi-yeşilden kırmızı-kahveye döndüğü andır. Titrasyon sonunda bu renk dönüşümünün gerçekleşmesi için gerekli FAS hacimleri belirlendi. 2,5 ml saf su da şahit olarak kullanılmak üzere aynı şekilde analize alındı. Ölçümler

2 tekrarlı yapıldı. Numunenin kimyasal oksijen ihtiyacı aşağıdaki eşitlikle hesaplandı ve elde edilen sonuç numune seyreltme faktörüyle çarpıldı.

$$\text{KOİ (mg O}_2\text{/L)} = [(A-B) \times M \times 8000] / \text{numune hacmi, ml}$$

A = şahit için kullanılan FAS, ml

B = numune için kullanılan FAS, ml

M = FAS' ın molaritesi, 0,025M

8000 = oksijenin miliekivalent ağırlığı * 1000 ml/L

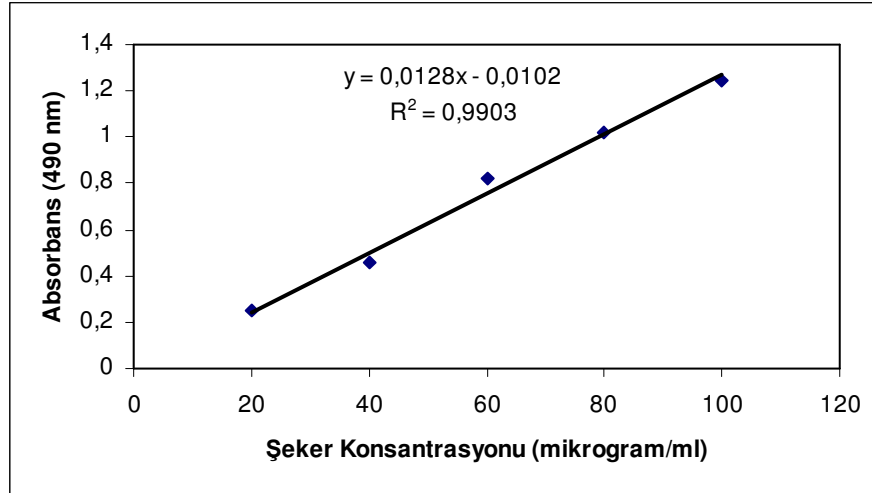
3.2.1.7. Toplam Organik Karbon (TOK) Analizi

Numunenin toplam organik karbon içeriği, TOK cihazı (Sievers 2244 AP TOC) kullanılarak ölçüldü. Cihaz çözünmüş organik karbon miktarı ölçümü yapmaktadır. Numune cihaza verilmeden filtreden geçirildi ve gerekli seyreltme yapıldı. Ölçümler 2 tekrarlı yapıldı. Cihazdan alınan sonuç seyreltme faktörüyle çarpıldı ve numunenin toplam organik karbon miktarı (ppm) bulundu.

3.2.1.8. Toplam Şeker Tayini

Numunenin toplam şeker analizi fenol-sülfürik asit (Dubois ve ark., 1956) yöntemi ile yapıldı. Basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler veya bunların türevleri, fenol ve sülfürik asit ile tepkimeye sokulduğunda, şeker konsantrasyonuyla doğru orantılı olarak artan şiddette portakal sarısı renginde bir ürün oluşturur ki bu rengin şiddeti kolorimetrik olarak ölçülerek şeker miktarı tayin edilir. Zeytin karasu numunesine analize alınmadan önce bir ön işlem (Mecozzi, 2005) uygulanarak polisakkaritlerin monosakkaritlere hidrolizi sağlandı. Uygulanan ön işlemde 100–150 mg numune, içerisinde 50 ml 1M HCl (HCl %37, Riedel-de Haën, Almanya) bulunan cam kaba kondu. Sonra çözelti 100°C su banyosunda 120–150 dakika tutuldu ve çözelti oda sıcaklığına soğutuldu. Asit çözeltisi standart çözeltiler ile aynı işleme tabi tutularak fenol-sülfürik asit yöntemi uygulandı. Standart eğriyi oluşturmak için, öncelikle %0,01'lik stok sukroz çözeltisi hazırlandı ardından da bu

Çözelti saf su ile seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda (20–100 mikrogram/ml) özeltieler elde edildi. Hazırlanan özeltieler ve örnek çözeltisinden cam deney tüplerine 1'er ml alındı, her biri üzerine 1'er ml %5'lik fenol çözeltisi (fenol saf, Riedel-de Haën, Almanya) ve 5'er ml derişik H₂SO₄ (Fluka, Almanya) ilave edilerek tüpler karıştırıldı. 10 dakika 25–30°C' ye ayarlanmış su banyosunda bekletildikten sonra tekrar karıştırılarak 20 dakika daha su banyosunda bekletildi. Örneklerin absorbans değeri UV/vis spektrometre (Lambda 35, Shelton, A.B.D) ile 490 nm'de ölçüldü. Hazırlanan standart özeltielerin, şeker konsantrasyonuna karşı absorbans grafiğı (Şekil 3.1.) çizildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisinden ($r^2=0,9903$) numunenin şeker içeriğı hesaplandı ve sonuç % ağırlık olarak verildi. Ölçümler 2 tekrarlı olarak yapıldı.

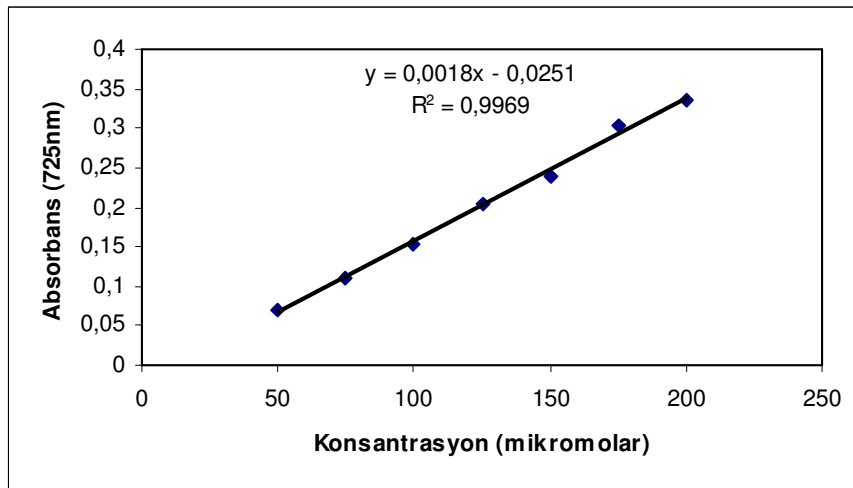


Şekil 3.1. Toplam şeker analizinde elde edilen sukroz kalibrasyon eğrisi

3.2.1.9. Toplam Polifenol Tayini

Zeytin karasuyu numunesinin toplam polifenol içeriğinin tespitinde spektrofotometrik bir metot olan Folin-Ciocalteu Yöntemi (Singleton ve ark., 1999) kullanıldı. Metotta belirtilen Folin-Ciocalteu's phenol reagent, fenolün –OH grubunu oksitlemektedir ve bu reaksiyon karakteristik mavi renge sahip bir ürün ortaya çıkarmaktadır. özeltielerin absorbans değeri UV/vis spektrometre ile 725 nm'de okunur. Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki standart özeltielerden elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak, numunenin toplam polifenol miktarı hesaplanır.

Numunedeki toplam polifenollerin analizi Bubba ve ark., (2004)' ten uyarlanarak gerçekleştirildi. Analiz için 10 ml zeytin karasuyu numunesi 1M HCl (HCl %37, Riedel-de Haën, Almanya) ile pH 2'ye asitlendirildi ve 5'er mililitre etil asetat (Riedel-de Haën, Almanya) ile üç kez $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ekstrakte edildi. Ekstraktlar birleştirildi, susuz sodyum sülfattan (Riedel-de Haën, Almanya) geçirildi. Bu temiz ekstrakt fazdan 0,8 ml alındı ve sonra 0,8 ml metanol (Riedel-de Haën, Almanya), 0,2 ml Folin-Ciocalteau's phenol reagent (Fluka, İsviçre) ve 0,4 ml doymuş sodyum karbonat (saf sodyum karbonat, Riedel-de Haën, Almanya) çözeltisi ilave edildi. Elde edilen çözelti saf su (GFL Water Stills 2008, Almanya) ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiler oda koşullarında bir saat karanlıkta bekletildikten sonra 1500 rpm'de 15 dakika santrifüj (Elektromag M4812P Santrifüj Cihazı, İstanbul, Türkiye) edildi ve 725 nm'de UV/vis spektrometre (Lambda 35, Shelton, A.B.D) kullanılarak absorbans ölçüldü. Caffeic acid (Fluka, İsviçre) ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki (50–200 μM) standart çözeltiler de numune ile aynı şekilde analize alındı ve caffeic acid konsantrasyonuna göre artan şiddette mavi renk gözlemlendi. Numunenin toplam polifenol konsantrasyonu, caffeic acid ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltilerden elde edilen Şekil 3.2.'de gösterilen kalibrasyon eğrisi ($r^2 = 0,9969$) kullanılarak hesaplandı. Numunenin toplam polifenol miktarı caffeic acid eşitliği (mg CAE/ml numune) ile ifade edildi.



Şekil 3.2. Toplam polifenol analizinde elde edilen caffeic acid kalibrasyon eğrisi

3.2.2. Karasudan Ayrılan Fazların İncelenmesi

3.2.2.1. Karasu Numunesinden Filtrasyon İle Ayrılan Katı-sıvı Fazların İncelenmesi

Karasu numunesinin polifenol içeriği ayrıntılı olarak incelendi. Orijinal zeytin karasu numunesinin toplam polifenol analizinin ardından, karasu numunesine filtre kâğıdı (MN 640 we, Macherey-Nagel, Düren, Almanya) kullanılarak filtrasyon işlemi uygulandı. Numune filtrenin üzerinde kalan, katı; filtreden geçen süzüntü, sıvı faz olmak üzere iki faza ayrıldı. Bu fazlar ayrı ayrı bölüm 3.2.1.9’da belirtildiği gibi etil asetat ile ekstraksiyona tabi tutuldu ve toplam polifenol analizleri yapıldı.

3.2.2.2. Karasu Numunesinden Santrifüj Separatör İle Ayrılan Kek Fazının İncelenmesi

Zeytin karasu numunesi (5 L) santrifüj separatöre (Sübitaş DE-225 L/saat, İstanbul, Türkiye) beslenerek katı partiküllerin karasudan ayrılması sağlandı. Separasyon çalışmaları oda koşullarında gerçekleştirildi ($23\pm2^{\circ}\text{C}$). Kek olarak adlandırılan katı faz, karasu numunesi separatörün diskleri arasından geçerken başlığın duvarlarında birikmektedir. Sıvı faz ise diskler arasından geçerken aşağı yönde hareket etmekte ve toplanarak başlığın üst kısmından sistemi terk etmektedir. Sıvı faz separatöre beş kez geri beslenerek katı faz ayırma işlemi tamamlandı. Başlığın duvarlarında biriken kek sıyrılarak kapaklı cam bir kavanoza alındı.

3.2.2.3. Kek Numunelerinden Polifenol Ekstraksiyonu

Polifenollerin kekten ekstraksiyonunda farklı çalkalama ve toplam ekstraksiyon süreleri, farklı çözücü hacimleri ve ekstraksiyon sıcaklıkları olmak üzere dört parametre incelendi. Tüm denemelerde homojen şekilde alınmış 7,5 g kek numuneleri kullanıldı. Ekstraksiyon işleminde çözücü olarak etanol (Riedel-de Haën, Avrupa) kullanıldı. Toplam ekstraksiyon süresi, çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST 402, Ankara, Türkiye) gerçekleştirilen çalkalama ve karanlıkta bekletme basamaklarını içermektedir. Temiz ekstrakt faz eldesi için ekstraksiyon işleminin

ardından numuneler kaba filtre kâğıdından (MN 640 we, Macherey-Nagel, Düren, Almanya) süzüldü.

Öncelikle 10 dakikalık çalkalama süresi sabit tutularak farklı bekletme süreleri uygulandı ve 60, 70, 80, 90, 100 110, 120 dakikalık toplam ekstraksiyon sürelerinde analizler gerçekleştirildi. 7,5 g katı faz numunesi 18,75 ml etanol (0,4 numune/çözücü oranı) ile çalkalamalı su banyosunda $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de 10 dakika tutuldu ve belirlenen farklı sürelerde $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ' de karanlıkta bekletilerek ekstrakte edildi. Ekstraktlar kaba filtre kâğıdından geçirildi ve temiz ekstrakt faz elde edildi. İkinci bölümde 70 dakikalık bekletme süresi sabit tutularak 10, 30, 50 dakikalık farklı çalkalama sürelerinde ekstraksiyon gerçekleştirildi.

Üçüncü bölümde 7,5 g ağırlığındaki kek numuneleri, tespit edilen uygun çalkalama ve toplam ekstraksiyon süreleri kullanılarak 12,5; 15; 18,75; 25; 37,5; 56,25; 75; 93,75; 112,5; 131,25; 150 ve 168,75 ml olmak üzere on iki farklı hacimde çözücü ile ekstraksiyon işlemine tabi tutuldular. Dördüncü bölümde ise belirlenen uygun çalkalama, toplam ekstraksiyon süresi ve çözücü hacmi kullanılarak ekstraksiyon işlemi 20, 30, 40, 60, 80 $^{\circ}\text{C}$ olmak üzere beş farklı sıcaklıkta gerçekleştirildi.

3.2.2.4. Toplam Polifenol Tayini

Kek numunelerinin polifenol ekstraksiyonunda elde edilen temiz ekstrakt fazdan 0,8 ml alındı ve bölüm 3.2.1.9'da belirtildiği şekilde numunenin toplam polifenol analizi gerçekleştirildi. Kek numunesinin toplam polifenol miktarı caffeic acid eşitliği (g CAE/100 g kek) ile ifade edildi ve sonuçlar % ağırlık olarak verildi.

3.2.3. Prınadan Polifenol Ekstraksiyonu ve Isıl İşlemlerin Ekstrakt Polifenol Konsantrasyonuna ve Antioksidan Aktiviteye Etkisi

3.2.3.1. Toplam Katı Madde Tayini

Prına numunelerinin toplam katı tayini, bölüm 3.2.1.1'de belirtildiği gibi yapıldı. Metottan farklı olarak kullanılan numuneler katı oldukları için kullanılan

numune miktarları ağırlıkça belirtildi ve toplam katı madde miktarı % olarak hesaplandı. Hesaplama aşağıdaki eşitlikle yapıldı:

$$\% \text{ toplam katı} = (A - B) \times 100 / \text{numune ağırlığı, g}$$

$$A = \text{kurutulmuş kalıntının ağırlığı} + \text{krozenin ağırlığı, g}$$

$$B = \text{krozenin ağırlığı, g}$$

3.2.3.2. Polifenol Ekstraksiyonu

2,37 g prina numunesi 112,5 ml saf su (GFL Water Stills 2008, Almanya) ile çalkalamalı su banyosunda (Nüve ST 402, Ankara, Türkiye) 23±2 °C sıcaklıkta 1 saat ekstrakte edildi. Ekstraksiyon sürecinde numuneler 10 dakika çalkalamanın ardından, 50 dakika sabit olarak bekletildi. Kaba partiküller, filtre kâğıdı (MN 640 we, Macherey-Nagel, Düren, Almanya) ile filtrasyon sırasında ayrıldı ve temiz ekstrakt faz elde edildi. Ekstrakt fazda kimyasal analizle polifenol varlığı tespit edildikten sonra, ekstrakt faz sonraki deneylerdeki analizler için kullanıldı.

3.2.3.3. Buharlaştırma ile Polifenol Ekstraktlarına Isıl İşlem Uygulamaları

Polifenol ekstraktları, üç farklı sıcaklıkta (50 °C, 75 °C, 100 °C) ısıl işlem uygulanarak 105 dakika süreyle buharlaştırıldı. Üzeri kapatılmış dereceli kaptaki polifenol ekstraktları, ısıtıcı manyetik karıştırıcıya (Ikamag RCT, Staufen, Almanya) yerleştirildi ve yukarıda belirtilen sıcaklıklara ısıtıldı. Ekstrakt sıcaklığı belirlenen değere ulaştığında, dereceli kabın kapağı açıldı ve ekstraktlar sabit sıcaklıkta karıştırılarak 105 dakika buharlaştırıldı. Buharlaşma sona erene kadar dereceli kaptan her 15 dakikada bir analizler için numune alındı ve buharlaştırılan numuneler konsantre olarak isimlendirildi. Buharlaşma sırasında numunelerin hacimlerindeki azalma içinde bulundukları dereceli kap ile ölçüldü.

3.2.3.4. Toplam Polifenol Tayini

Prina numunelerinin polifenol ekstraksiyonunda elde edilen temiz ekstrakt fazdan 0,8 ml alındı ve bölüm 3.2.1.9'da belirtildiği şekilde numunenin toplam

polifenol analizi gerçekleştirildi. Prina ekstraktlarının toplam polifenol miktarı caffeic acid eşitliği (mg CAE/ml numune) ile ifade edildi.

3.2.3.5. DPPH Serbest Radikal Yakalama Metodu ile Antioksidan Aktivite Tayini

Prina ekstraktlarının ve konsantrelerinin antioksidan aktivitesi, serbest radikal metoduna (Brand-Williams ve ark., 1995) göre değerlendirildi. 2,6 ml ekstrakt veya konsantre; metanol (Riedel-de Haën, Almanya) ile hazırlanan 3,9 ml 6×10^{-5} M DPPH çözeltisine ilave edildi (2,2 Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Fluka, Almanya). Numuneler iyice çalkalandı ve karanlıkta bekletildi. Reaksiyon plateauya ulaştığında (çözelti rengi mordan sarıya döndüğünde), numunelerin absorbansları 517 nm’de ölçüldü. Spektrometrede absorbansı sıfırlamak için metanol kullanıldı ve antioksidan içermeyen DPPH radikal çözeltisinin absorbansı günlük ölçüldü ve kontrol olarak kullanıldı. Bu çözelti sonraki kullanımlar için 4°C sıcaklıkta karanlıkta saklandı. Tüm spektrometrik veriler UV/vis spektrometre (Lambda 35, Shelton, A.B.D) kullanılarak elde edildi. DPPH radikali yakalama yüzdesi aşağıda verilen denkleme göre hesaplandı (Yen, G. C. ve ark., 1994):

$$\% \text{ tutma (inhibisyon)} = ((A_c - A_s) / A_c) \times 100$$

A_c = kontrolün absorbansı

A_s = numunenin plateauya ulaştığı andaki absorbansı

3.2.3.6. Kinetik Hesaplamalar

Gıda sistemlerinin gerçek reaksiyon mekanizması ve kinetiği karmaşıktır. Bu yüzden gıdalardaki reaksiyonların çoğunlukla ya sıfırıncı ya da birinci mertebeden kinetik izlediği bildirilmektedir.

Polifenol kayıplarının kinetiği şu şekilde gösterildi:

$$-r_A = -\frac{dC_A}{dt} = k \cdot C_A^a \quad (1)$$

r_A = polifenol kaybı hızı

C_A = polifenol konsantrasyonu

a = hız mertebesi

k = hız sabiti

t = zaman

Sıfırıncı mertebeden reaksiyon için, 1 numaralı eşitliğin integrali aşağıdaki eşitliği verir:

$$C_0 - C_t = k \cdot t \quad (2)$$

Birinci mertebeden reaksiyon için, 1 numaralı eşitliğin integrali aşağıdaki eşitliği verir:

$$\ln \frac{C_0}{C_t} = k \cdot t \quad (3)$$

İkinci mertebeden reaksiyon için, 1 numaralı eşitliğin integrali aşağıdaki eşitliği verir:

$$\frac{1}{C_t} - \frac{1}{C_0} = k \cdot t \quad (4)$$

C_0 = başlangıç polifenol konsantrasyonu

C_t = t (dakika) zamanındaki polifenol konsantrasyonu

Reaksiyon hızının sıcaklıkla ilişkisi Arrhenius denklemi ile nicel olarak belirtilir:

$$k = A_0 \exp(-E_A / RT) \quad (5)$$

E_A = aktivasyon enerjisi

R = evrensel gaz sabiti (1,98 cal/mol.K)

T = mutlak sıcaklık (K)

A_0 = sabit

3.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada gerçekleştirilen analizlerin sonuçları, en az iki ölçümün ortalaması alınarak standart sapma ($\pm$ SD) ile birlikte verilmiştir. Sonuçların istatistiksel analizinde Tek etken ANOVA (MS Excel) kullanılmıştır ve $p < 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İki grup arasındaki farklılıkların incelenmesinde eşleştirilmiş t-testi kullanılmıştır ve $p < 0,05$ olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Kinetik hesaplamalarında elde edilen veriler regresyon analizi ile değerlendirilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, elde edilen deneysel veriler ile hesaplanan sonuçlar tablo ve grafikler kullanılarak verilmiştir. Sonuçlar, literatürde belirtilen değerlerle karşılaştırılarak tartışılmıştır.

4.1. Zeytin Karasuyunun Kimyasal Özellikleri ve Toplam Polifenol Miktarının Hesaplanması

Deneylerde kullanılan zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri

Parametre	Birim	Değer Ortalama $\pm$ SD
Toplam katı madde	g/L	64,2 $\pm$ 0,28
Toplam askıda katı madde (AKM)	g/L	20 $\pm$ 0,35
pH		4,95 $\pm$ 0,08
Yağ-gres	g/L	1,45 $\pm$ 0,03
Toplam azot	mg/L	107,5 $\pm$ 3,53
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	g/L	98,5 $\pm$ 0,70
Toplam organik karbon (TOK)	g/L	12,73 $\pm$ 0,51
Toplam şeker	% ağırlık	1,02 $\pm$ 0,03
Toplam polifenol	g/L	2,62 $\pm$ 0,01

Literatürde karasuyla ilgili yapılan çalışmalarda, farklı zeytin karasuyu numunelerinin kimyasal içerikleri tayin edilmiştir. Literatür çalışmalarında çoğunlukla belirtilen karasuyla ilgili parametreler ve değerleri Tablo 4.2.'de toplanmış ve karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.2. Deneylerde kullanılan zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri (a) ve birçok yazar tarafından belirtilen zeytin karasuyu kimyasal karakteristiği (b) Aktaş ve ark., 2001; (c) Bubba ve ark., 2004; (d) Vlyssides ve ark., 1998; (e) Russo, 2007; (f) Borsani ve ark., 1996; (g) Dhouib ve ark., 2006; (h, i) Roig ve ark., 2006.

	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)
Toplam katı madde	64,2±0,28 g/L	78,2±13,6 g/L		63,50±24,40 g/L	5,5-17,6 %		11,4 %	6,35 %	7,1 %
Toplam askıda katı madde (AKM) (g/L)	20 ± 0,35 g/L	27,6±5,1	32,5±3,3			21,65	8,9		
pH	4,95 ± 0,08	4,8±0,3	5,24±0,19	4,80±0,80	4,5-6,0	4,74	5,46	4,8	4,93
Yağ-gres (g/L)	1,45 ± 0,03	12,2±13,3		1,64±0,64	0,3-23	6,2	9,2	1,64	8,6
Toplam azot	107,5±3,53 mg/L	78,8±39,6 mg/L			5-20 g/L		1,58 g/L		
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) (g/L)	98,5 ± 0,70	103,4±19,5	153,3±6,6	92,50±17,50	80-210	77,58	117	93	67
Toplam organik karbon (TOK) (g/L)	12,73 ± 0,51			39,82±6,47				39,8	
Toplam şeker	1,02 ± 0,03 %	4,7±1,8 g/L (indirgen şeker)		16,0±5,92 g/L	10-80 g/L		12 g/L (glikoz)	16,1 g/L	4,8 g/L
Toplam Polifenol (g/L)	2,62 ± 0,01	3,8±1,5		10,65±4,08	3-11	0,85	9,2	10,7	0,98

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi literatürde belirtilen zeytin karasu numunelerinin kimyasal karakteristikleri farklılık göstermektedir. Çünkü çalışmalarda kullanılan karasu numuneleri farklı ülkelerden ve farklı zeytinyağı işletmelerinden temin edilmiştir. Zeytin karasuyu özellikleri zeytinin çeşidine, olgunluğuna, yetiştiği bölgenin iklim ve toprak şartlarına, zeytinden yağ elde edilme metoduna göre değişmektedir. Çalışmada kullandığımız karasu numunesinin hesaplanan kimyasal değerleri literatür çalışmalarında belirtilen değerlerin arasındadır.

4.1.1. Filtrasyon İle Ayrılan Katı-sıvı Fazların Polifenol İçeriği

Tablo 4.1.'de kimyasal özellikleri verilen karasu numunesinin polifenol içeriği ayrıntılı olarak incelendi. Orijinal zeytin karasu numunesinin ve bu numune filtre kâğıdından geçirildikten sonra elde edilen katı ve sıvı fazların toplam polifenol miktarları Tablo 4.3.'te belirtildi.

Tablo 4.3. Orijinal zeytin karasu numunesinin ve katı-sıvı fazların toplam polifenol içeriği.

Numune	Toplam Polifenol Miktarı (g/L)
	Ortalama $\pm$ SD
Orijinal zeytin karasuyu	2,62 $\pm$ 0,01
Zeytin karasuyu katı fazı	2,19 $\pm$ 0,09
Zeytin karasuyu sıvı fazı	3,69 $\pm$ 0,03
Zeytin karasuyu katı ve sıvı fazları	5,88 $\pm$ 0,12

Sonuçlar incelendiğinde, sıvı fazın toplam polifenol içeriğinin (3,69 $\pm$ 0,03 g/L) katı fazdan (2,19 $\pm$ 0,09 g/L) ve orijinal karasu numunesinden (2,62 $\pm$ 0,01 g/L) yüksek olduğu görüldü. Karasu numunesinin toplam polifenol içeriği, katı ve sıvı fazlarda ayrı ayrı tayin edilen polifenol miktarları toplanarak hesaplandığında 5,88 $\pm$ 0,12 g/L bulundu.

Literatürde zeytin karasuyunda polifenol analizi, karasu numunesinden çözücü kullanarak polifenollerin ekstrakte edilmesi ve sonra ekstraktların analize

alınması ile gerçekleştirilmektedir. Etil asetat, zeytin karasuyu gibi sulu matrislerden biofenollerin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Obied ve ark., 2005). Allouche ve ark. (2004) üç fazlı sistemden çıkan taze karasu numunesini önce ayırma hunisinde çözücü ile karıştırmış sonra bekleterek oluşan fazlardaki fenolik bileşiklerini HPLC tekniği kullanarak hesaplamıştır. Çalışmada kesikli ekstraksiyonda ekstraksiyon parametrelerinin optimizasyonu çalışılmış; fenolik bileşiklerin geri kazanımında en uygun çözücünün etil asetat, en iyi karasu pH'sının pH=2 olduğu belirtilmiştir ayrıca üç basamaklı ekstraksiyonun yeterli olduğu vurgulanmıştır. Garcia ve ark. (2000) çalışmalarında kullandıkları karasu numunesinin toplam fenol analizinde; karasu numunesini HCl ile pH 2'ye asitlendirmiş ve etil asetat kullanarak ortam sıcaklığında üç kez ekstrakte etmiştir. Üç organik fraksiyon birleştirilerek susuz sodyum sülfattan geçirilmiştir ve toplam fenol içeriğinin hesaplanmasında Folin-Ciocalteu Yöntemi kullanılmıştır. Dhouib ve ark. (2006) karasu numunesinin toplam polifenol analizinde; öncelikle karasu numunesini santrifüj işlemine tabi tutmuşlar daha sonra üst fazı üç kez etil asetat ile ekstrakte etmişlerdir. Biriktirilen organik fraksiyonlar kurutularak vakum altında buharlaştırılmıştır. Polifenol analizi GC-MS tekniğiyle gerçekleştirilmiştir. Lesage-Meessen ve ark. (2001) karasu numunelerini önce etanol ile stabilize etmiş ve sonra filtrasyon ve santrifüj kullanarak temizlemiştir. Temizlenen numune HCl ile pH 3'e ayarlanıp, etil asetat ile iki kez ekstrakte edilmiştir, elde edilen ekstraktlar kullanılarak Folin-Ciocalteu Yöntemi ile numunenin fenol içeriği hesaplanmıştır.

Literatür çalışmalarında, zeytin karasuyunun toplam polifenol içeriği ya orijinal karasu numunesi kullanılarak ya da karasuya bazı ön işlemler uygulandıktan sonra elde edilen temiz sıvı faz kullanılarak tayin edilmiştir. Yaptığımız çalışmada, orijinal zeytin karasu numunesinin ve bu numune filtre kâğıdından geçirildikten sonra elde edilen katı ve sıvı fazların toplam polifenol miktarları ayrı ayrı incelendi. Tablo 4.3.'teki sonuçlara bakıldığında karasudan ayrılan katı fazın da polifenol içeriği olduğu görülmektedir. Öyleyse karasuyun toplam polifenol miktarının, sadece bazı ön işlemler uygulandıktan sonra elde edilen temiz sıvı faz analiz edilerek verilmesi orijinal karasuyun toplam polifenol içeriğini temsil etmemektedir. Diğer taraftan, karasu numunesinin toplam polifenol içeriği, katı ve sıvı fazlar ayrı ayrı polifenol analizine alınıp çıkan sonuçlar toplanarak belirtildiğinde ($5,88 \pm 0,12$ g/L), orijinal karasuya ($2,62 \pm 0,01$ g/L) göre daha yüksek toplam polifenol içeriği tespit

edilmektedir. Öyleyse karasu numunesinin orijinal haliyle analizine alınmasının, toplam polifenol miktarının tam olarak tespitini engellediği söylenebilir. Analizler doğrultusunda zeytin karasu numunesinin hem sıvı hem katı fazının bir polifenol içeriği olduğu tespit edildi öyleyse toplam polifenol miktarı tayininde, karasu numunesinin katı-sıvı fazlara ayrılarak analiz edilmesi, numunenin toplam polifenol içeriğinin daha doğru ifade edilmesini sağlayacaktır. Sonuç olarak orijinal zeytin karasu numunesinin toplam polifenol miktarının $5,88 \pm 0,12$ g/L olduğu söylenebilir.

4.1.2. Santrifüj Separasyon İle Ayrılan Fazların Özellikleri Ve Kek Fazının Polifenol İçeriğinin Belirlenen Ekstraksiyon Şartlarında Hesaplanması

Orijinal zeytin karasu numunesinin ve santrifüj separatör ile ayrılan kek ve sıvı fazların toplam katı madde içerikleri Tablo 4.4.'te verildi.

Tablo 4.4. Zeytin karasu numunesinin ve santrifüj separatörden çıkan kek-sıvı fazların toplam katı madde içerikleri

	Toplam Katı Madde (%)
	Ortalama $\pm$ SD
Zeytin karasuyu numunesi	$6,42 \pm 0,03$
Sıvı faz	$5,06 \pm 0,01$
Kek fazı	$16,85 \pm 0,05$

Zeytin karasu numunesinin santrifüj separatöre beslenmesiyle ayrılan sıvı fazın kimyasal özellikleri Tablo 4.5.'te verildi ve orijinal karasu numunesinin özellikleriyle karşılaştırıldı.

Santrifüj separasyon işlemine tabi tutulan karasu numunesinin toplam katı, askıda katı madde, KOİ, toplam şeker ve yağ-gres değerlerinde düşme gözlenirken; pH değeri ve polifenol içeriğinde artış gözlemlendi. Santrifüj separasyon işlemi sonrası numunedeki partiküllerin ve yağın büyük kısmı ayrıldı. Separasyon işlemi ile numunenin toplam katı içeriğinde %21; toplam askıda katı değerinde %69; yağ-gres

içeriğinde %75; KOİ değerinde %32; toplam şeker miktarında %30 azalma saptandı. Toplam polifenol içeriğinde ise %18 artış gözlemlendi.

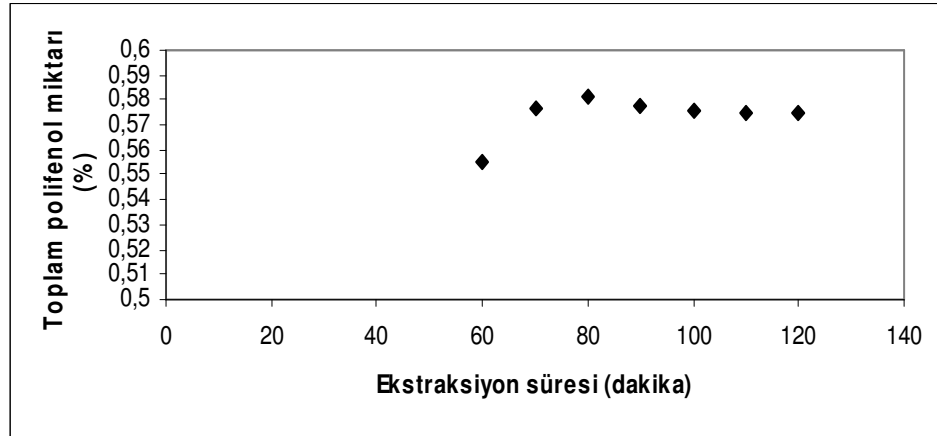
Tablo 4.5. Orijinal zeytin karasu numunesinin (a) ve santrifüj separatör ile ayrılan sıvı fazın (b) kimyasal özellikleri

Parametre	Birim	Değer (Ortalama $\pm$ SD)	
		(a)	(b)
Toplam katı madde	g/L	64,2 $\pm$ 0,28	50,62 $\pm$ 0,12
Toplam askıda katı madde (AKM)	g/L	20 $\pm$ 0,35	6,21 $\pm$ 0,29
pH		4,95 $\pm$ 0,08	5,02 $\pm$ 0,01
Yağ-gres	g/L	1,45 $\pm$ 0,03	0,36 $\pm$ 0,03
Kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ)	g/L	98,5 $\pm$ 0,70	67 $\pm$ 1,41
Toplam şeker	% ağırlık	1,02 $\pm$ 0,03	0,71 $\pm$ 0,01
Toplam polifenol	g/L	2,62 $\pm$ 0,01	3,09 $\pm$ 0,02

Santrifüj separasyon işlemi ile daha temiz faz elde edildi ancak bu sıvı fazın toplam polifenol içeriğinin (3,09 $\pm$ 0,02 g/L), orijinal karasudan daha yüksek olduğu tespit edildi. Bölüm 4.1.1.'de de filtrasyon ile ayrılan sıvı fazın polifenol içeriği (3,69 $\pm$ 0,03 g/L) karasuya (2,62 $\pm$ 0,01 g/L) göre daha yüksekti. Öyleyse karasudan katı maddelerin uzaklaştırılmasıyla, tespit edilen toplam polifenol miktarında bir artış görülmektedir. Diğer bir deyişle karasudaki katıların, toplam polifenol miktarı tayinini engellediği söylenebilir. Ayrıca separasyon işlemi ile numunenin toplam katı içeriğinde %21 azalma görülürken, toplam polifenol içeriğinde %18 artış gözlenmektedir. Bu oranların birbirine yakın olması, numunenin toplam katı içeriği ile tayin edilebilen toplam polifenol içeriği arasında bir bağlantı olabileceğini vurgulamaktadır.

Separasyon ile elde edilen kekin toplam polifenol içeriği incelendi. Polifenollerin etil asetat yerine sağlık açısından daha güvenli bir madde olan etanol ile ekstraksiyonu araştırıldı. Ekstrakte edilen polifenollerin gıda ve ilaç sanayinde kullanılması hedeflenmektedir bu yüzden kullanılan çözücünün insan sağlığına zararsız olması önemlidir. Kek numunesinden polifenollerin ekstraksiyonu için şartların belirlenmesi amacıyla; farklı çalkalama ve toplam ekstraksiyon süreleri, farklı çözücü hacimleri ve ekstraksiyon sıcaklıkları olmak üzere dört parametre incelendi. İncelenen her parametre için elde edilen ekstrakt kullanılarak numunenin toplam polifenol miktarı hesaplandı.

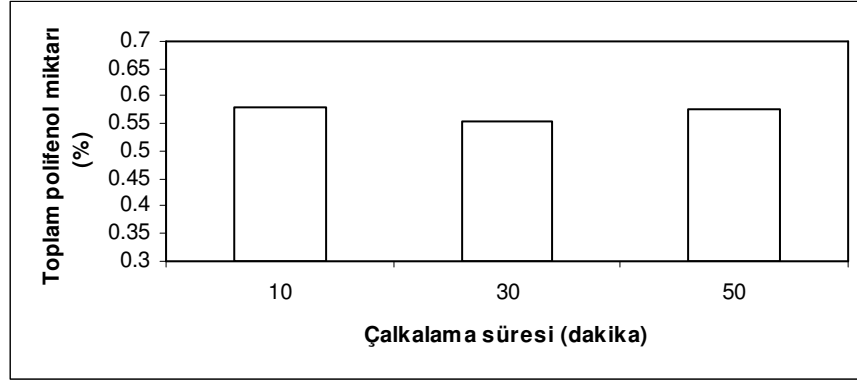
Toplam ekstraksiyon süresi, uygulanan 10 dakika çalkalama ve farklı bekletme süreleri toplamıdır. 7,5g kek ve 18,75ml etanol (0,4 numune(g)/çözücü(ml) oranı) kullanılarak farklı sürelerde gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi ile numunenin toplam polifenol miktarı tespit edildi. Numunenin % ağırlık olarak hesaplanan toplam polifenol miktarının, toplam ekstraksiyon süresiyle değişimi ($p < 0,0005$) Şekil 4.1.'de gösterildi.



Şekil 4.1. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının ekstraksiyon süresiyle değişimi

Analizler doğrultusunda 10 dak. çalkalama ve 70 dak. bekletme olmak üzere toplam 80 dakikalık ekstraksiyon süresi sonunda numunede en yüksek toplam polifenol miktarı değeri ($\% 0,5809 \pm 0,0012$) tespit edildi.

Ekstraksiyon çalışmasının ikinci bölümünde farklı çalkalama sürelerinin kek numunelerinden ekstrakte edilen toplam polifenol miktarı üzerine etkisi incelendi. Bu aşamada bekletme süresi olarak, en yüksek toplam polifenol miktarı değerinin elde edildiği 70 dakika kullanıldı. Numunenin tespit edilen toplam polifenol miktarının (%), çalkalama süresiyle değişimi Şekil 4.2.'de gösterildi.



Şekil 4.2. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının çalkalama süresiyle değişimi

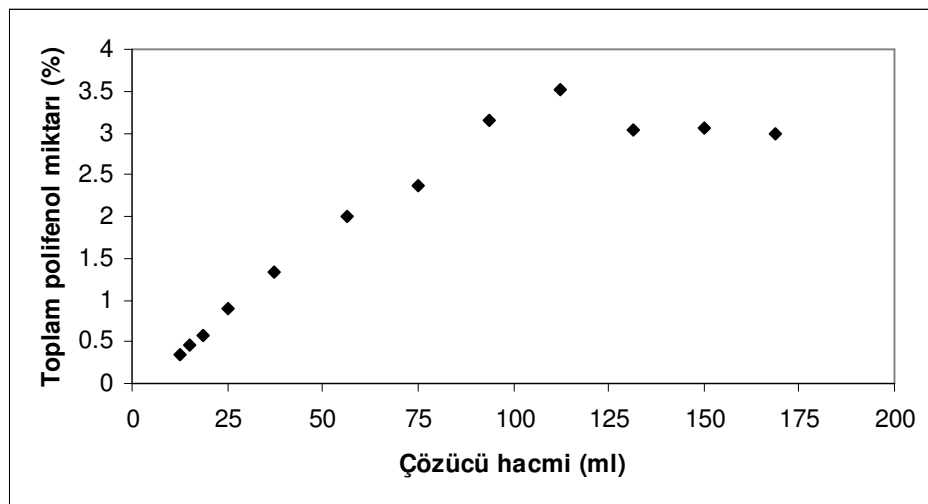
Analizler sonucunda, farklı çalkalama sürelerinin numunede tespit edilen toplam polifenol miktarında önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi. 30 ve 50 dakikalık çalkalama sürelerinin kullanılması halinde zaman ve maliyet kaybı olacağından, 10 dakikalık çalkalama süresi yeterli görüldü. Sonuçlar doğrultusunda, 10 dakikalık çalkalama ve 70 dakikalık karanlıkta bekletmeyi içeren toplam 80 dakikalık süresinin en etkili ekstraksiyon basamağı olduğu belirlendi.

Çalışmanın üçüncü bölümünde, ekstraksiyonda kullanılan farklı çözücü hacimlerinin (12,5–168,75 ml) kek numunelerinde tespit edilen toplam polifenol miktarı üzerine etkisi incelendi. Denemelerde kek numune miktarı aynı tutuldu, farklı numune/çözücü oranları (0,0444–0,6 g/ml) kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada ekstraksiyon süresi olarak, en yüksek toplam polifenol miktarının elde edildiği 80 dakika kullanıldı. Farklı numune/çözücü oranları kullanılarak belirlenen kek numunesi toplam polifenol miktarları Tablo 4.6.'da verildi.

Tablo 4.6. Ekstraksiyon işleminde farklı numune/çözücü oranları kullanılarak tespit edilen kek fazı toplam polifenol miktarları

Numune(kek)/çözücü oranı (g/ml)	Toplam polifenol miktarı (%) Ortalama $\pm$ SD
0,6	0,3371 $\pm$ 0,0069
0,5	0,4544 $\pm$ 0,0008
0,4	0,5773 $\pm$ 0,0004
0,3	0,8921 $\pm$ 0,0058
0,2	1,3411 $\pm$ 0,0039
0,1333	2,0094 $\pm$ 0,0100
0,1	2,3772 $\pm$ 0,0145
0,08	3,1434 $\pm$ 0,0146
0,0666	3,5183 $\pm$ 0,0273
0,0571	3,0410 $\pm$ 0,0382
0,05	3,0565 $\pm$ 0,0329
0,0444	2,9928 $\pm$ 0,0092

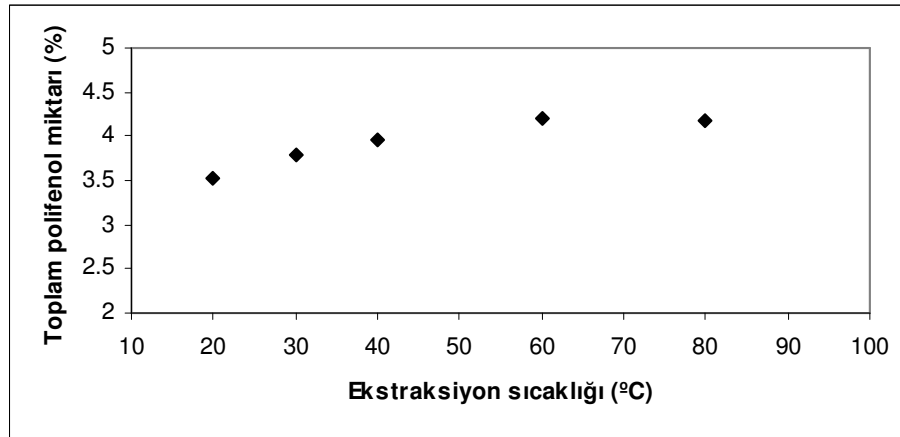
Numunenin tespit edilen toplam polifenol miktarının (%), ekstraksiyonda kullanılan farklı çözücü hacimleriyle değişimi ($p < 0,0000005$) Şekil 4.3.'te gösterildi.



Şekil 4.3. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının çözücü (etanol) hacmiyle değişimi

Ekstraksiyonda kullanılan çözücü hacmi arttıkça numunede tespit edilen toplam polifenol miktarı belirli noktaya kadar artmakta daha sonra sabit kalmaktadır. Analizler sonucunda ekstraksiyon işleminde çözücü olarak 112,5 ml etanol kullanılması ile numunede en yüksek toplam polifenol miktarı değeri ($3,5183 \pm 0,0273$) tespit edildi.

Çalışmanın dördüncü bölümünde, ekstraksiyonda uygulanan farklı sıcaklıkların kek numunelerinde tespit edilen toplam polifenol miktarı üzerine etkisi incelendi. 7,5 g kek numuneleri, en yüksek toplam polifenol miktarının elde edildiği 112,5 ml etanol ile 10 dakika çalkalama ve 70 dakika bekletme sürelerini içeren 80 dakikalık ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ekstraksiyon 20, 30, 40, 60, 80 °C olmak üzere beş farklı sıcaklıkta gerçekleştirildi. Numunenin tespit edilen toplam polifenol miktarının (%), uygulanan ekstraksiyon sıcaklığıyla değişimi ($p < 0,00005$) Şekil 4.4.'te gösterildi.



Şekil 4.4. Kekte tayin edilen toplam polifenol miktarının uygulanan farklı ekstraksiyon sıcaklıklarıyla değişimi

20 ile 60 °C arasında, sıcaklık arttıkça toplam polifenol miktarında da artış görülmekte ancak 60 ve 80 °C arasında önemli bir değişim görülmemektedir. Analizler sonucunda ekstraksiyon işleminin 60 °C’de gerçekleştirilmesiyle numunede en yüksek toplam polifenol miktarı değeri ($4,2030 \pm 0,0131$) tespit edildi.

Pinelo ve ark. (2004) ekstraksiyon sıcaklığının badem kabuğundaki ve çam talaşındaki polifenollerin geri kazanımına etkisini bulmuştur ve Silva ve ark. (2007)

bunu *Inga edulis* yaprakları üzerinde yapmışlardır fakat Jerez ve ark. (2006) ekstraksiyon sıcaklığının çam kabuğu polifenollerinin geri kazanımı üzerine küçük etkilerini hesaplamışlardır.

Karasudan separasyon ile elde edilen kek numunelerinden polifenollerin ekstraksiyonunda; toplam ekstraksiyon süresi, çalkalama süresi, kullanılan çözücü hacmi ve sıcaklık olmak üzere dört farklı parametrenin numunede tespit edilen toplam polifenol miktarı üzerine etkisi incelendi. Analizler sonucunda kek numunelerinden etanol ile polifenollerin ekstraksiyonunda uygulanabilecek şartlar; 7,5 g numuneden 112,5 ml etanol (0,0666 numune(g)/çözücü(ml) oranı) kullanılarak 60 °C’de, 10 dakika çalkalama ve 70 dakikalık karanlıkta bekletmeyi içeren toplam 80 dakikalık ekstraksiyon süresi olarak belirlendi ve bu şartlarda kekin toplam polifenol miktarı % 4,2030±0,0131 olarak hesaplandı.

Zeytin karasuyunda yapılan toplam polifenol analizleri sonucunda, karasudan ayrılan katı fazın da bir polifenol içeriği olduğu belirlendi. Öyleyse zeytinin zeytinyağına işlenmesi sırasında kullanılan üç fazlı sistemlerde açığa çıkan katı atık prinanın da polifenol içeriği incelenmelidir. Katı numune olduğu için katı-sıvı ekstraksiyonu uygulanarak prinadan polifenoller ekstrakte edilebilir.

Zeytin karasuyu doğrudan akarsulara verilmemelidir çünkü kirliliğe sebep olur ve akarsulardaki mikrobiyal hayatı etkiler bu yüzden temizlenmeli ve sonra çevreye bırakılmalıdır. Zeytin karasuyu santrifüj ile kek ve daha temiz su fazına ayrılır. Polifenoller ayrıca zeytin karasuyundan ekstrakte edilmektedir (Gortzi ve ark., 2008, Khofi ve ark., 2008, Allouche ve ark., 2004) böylece karasu, akarsulara verilirken polifenollerin toksik etkisi azaltılmaktadır. Zeytin karasuyundan polifenollerin ekstraksiyonu üzerine çalışmalar olsa da zeytin karasuyundan ayrılan kekten ve prinadan polifenollerin ekstraksiyonu hakkında çalışma bulunmamakta oysaki polifenoller sadece karasuda değil aynı zamanda zeytin karasuyundan ayrılan kekte ve prinada da bulunmaktadır. Polifenoller zeytinde bulunuyorsa ve zeytin yoluyla tüketilebiliyorsa, zeytin karasuyundan elde edilen kekten ve prinadan da ekstrakte edilebilir ve sonra gıda ürünlerine katılabilir veya yalnız tüketilebilir. Zeytin karasuyundan elde edilen kekten ve prinadan polifenollerin ekstraksiyonuyla zeytinyağı atıklarından değerli son ürün elde edilebilir.

Etil asetat, zeytin karasuyu gibi sulu matrislerden biofenollerin ekstraksiyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Obied ve ark., 2005). Hydroxytyrosolu hedef alan kapsamlı bir çalışmada, fenolik bileşiklerin geri kazanımında en uygun çözücünün etil asetat olduğu belirtilmiştir. Kullanılan tüm çözücülerin karasudan polifenollerini ekstrakte ettiği ancak ekstraksiyon güçleri arasında önemli farklılıkların olduğu bulunmuştur. Çözücülerin ekstraksiyon gücünün şu sırayla azaldığı belirtilmiştir: etil asetat > metil izobutil keton > metil etil keton > dietil eter (Allouche et al., 2004). Tüm ekstraksiyon işlemleri organik çözücüler ile gerçekleştirilmektedir. Bu ekstraksiyon yöntemleri etkindir fakat ekstraktlar, kalıntı çözücünün potansiyel toksik etkisi nedeniyle insanların tüketimi için güvenli değildir (Nawaz et al., 2006). Bu aşamada polifenollerin ekstraksiyonunda çözücü olarak etanol gibi insanlar için daha az toksik etkiye sahip maddelerin kullanımı büyük önem taşımaktadır.

4.2. Prinadan Polifenol Ekstraksiyonu

Prinadaki polifenoller çözücülerle ekstrakte edilebilirler. Ekstraksiyonun çözücü/katı oranı, süresi ve sıcaklığı bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonunu etkileyebilen faktörlerdir.

Deneylerde kullanılan, zeytinin zeytinyağına işlendiği üç fazlı sistemlerde ortaya çıkan katı atık prinanın toplam katı madde içeriği %53,18 olarak hesaplandı.

Prina hem etanol hem su ile farklı çözücü/prina oranları (5, 47 ml/g) kullanılarak ekstrakte edildi. Analizlerde, (kek numunesi için uygun ekstraksiyon koşullarının belirlendiği) en yüksek toplam polifenol miktarı değerinin tespit edildiği 10 dak. çalkalama ve 70 dak. bekletme olmak üzere toplam 80 dakikalık ekstraksiyon süresi kullanıldı.

Prina numunelerine uygulanan ekstraksiyon işleminin ardından elde edilen polifenol ekstraktlarının, polifenolce yüzde saflık değerleri şu şekilde belirlendi: Ekstraktların toplam polifenol içeriği (g/L) hesaplandı ve ekstrakt toplam katı madde miktarı (g/L) bulundu. Ardından bir litre ekstrakt baz alınarak; polifenollerin,

ekstrakt toplam katı içeriğinin yüzde kaçını oluşturduğu hesaplandı ve bu değer % saflık olarak belirtildi.

4.2.1. Çözücü/Prina Oranının Etkisi

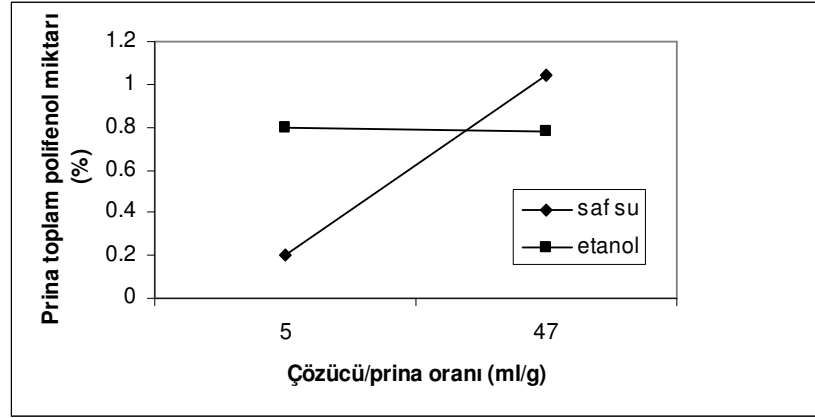
Ekstraksiyonda saf su ve etanol kullanılarak tayin edilen prina toplam polifenol miktarının; ayrıca çözücü olarak saf su ve etanol kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam polifenol miktarlarının (g/L) ve polifenolce % saflık değerlerinin farklı çözücü/prina oranlarıyla değişimi Şekil 4.5'te gösterildi.

Çözücü olarak su hacminin prinanın bir gramı için 5'ten 47 ml'ye artırılması, tespit edilen prina toplam polifenol miktarını (Şekil 4.5.a.), yani prinadan ekstrakte edilen polifenol miktarını arttırdı ($p<0,0005$) fakat artan etanol hacmi prinadan ekstrakte edilen polifenol miktarını etkilemedi ($p<0,65$).

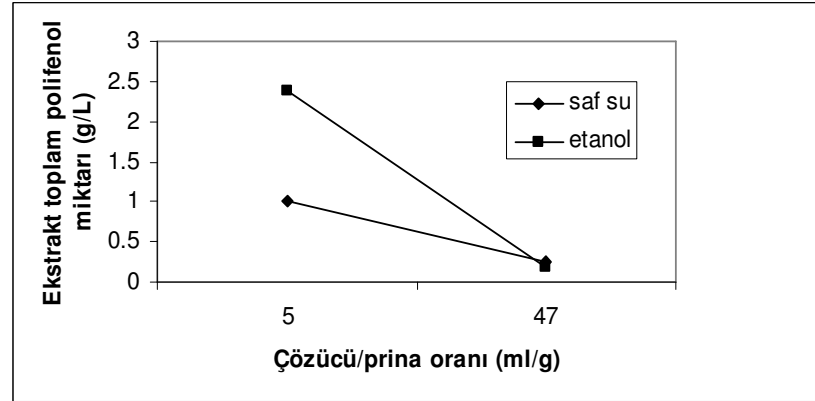
Çözücü/katı oranının yüksek tutulması çözücüdeki polifenollerin seyreltilmesini sağlar, katının içerisindeki konsantrasyon ile çözücü arasındaki konsantrasyon farkını (gradientini) artırır ve sonra difüzyonu ve polifenollerin katıdan çözücüye ekstraksiyonunu artırır. Pinelo ve ark. (2004) çözücü/katı oranını 5'ten 10'a çıkarınca, çam talaşından ve badem kabuğundan düşük sıcaklıklarda (25°C) polifenollerin ekstraksiyonunu arttırmıştır. Silva ve ark. (2007) çözücü/katı oranının 10'dan 20'ye artırılmasıyla, *Inga edulis* yapraklarından etanol-su karışımı ile polifenollerin ekstraksiyonunun arttığını belirtmişlerdir ancak çözücü/katı oranındaki daha fazla bir artış (20'den 40'a ve 80'e) *Inga adulis* yapraklarından polifenollerin ekstraksiyonunu etkilememiştir. Nawaz ve ark. (2006) katı/sıvı oranının dörtten beşe atırılmasının üzüm çekirdeğinden polifenol ekstraksiyonunu arttırdığını fakat katı/sıvı oranın ona çıkartılması gibi daha fazla bir artışın ekstrakte edilen polifenol konsantrasyonunu azalttığını belirtmişlerdir.

Çözücü hacmi düşük olduğunda etanol suya göre daha iyi polifenol ekstraksiyonu sağlamaktadır ancak çözücü hacmi artırıldığında su etanola göre daha iyi polifenol ekstraksiyonu sağlamaktadır (Şekil 4.5.c.). Prinadan çözücü olarak

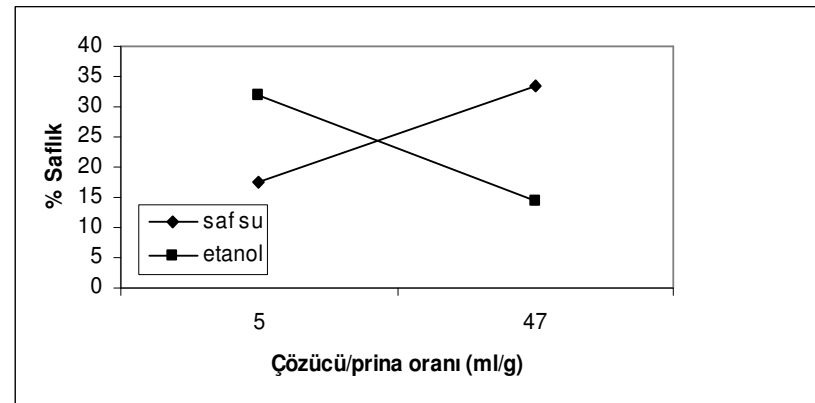
etanol kullanılarak elde edilen ekstraktların polifenol saflığı, düşük hacimde etanol kullanıldığında yüksektir ($p<0,005$).



(a)



(b)



(c)

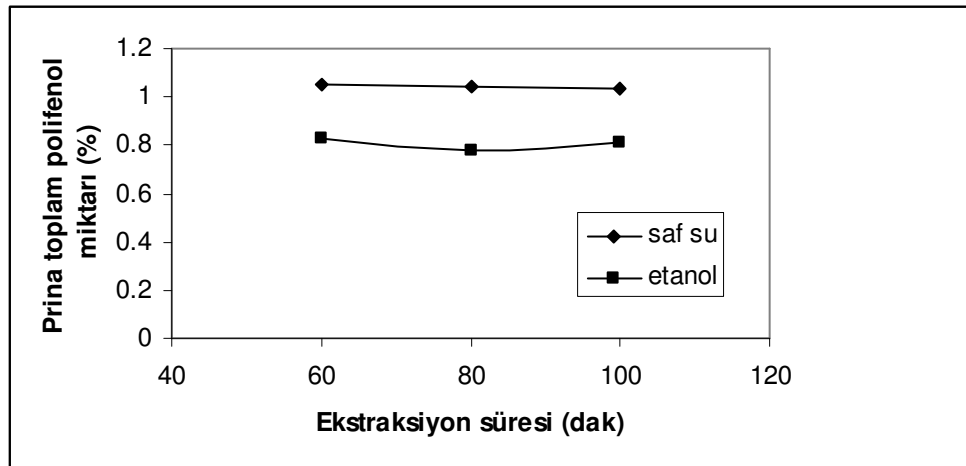
Şekil 4.5. Ekstraksiyonda çözücü olarak saf su ve etanol kullanılarak belirlenen prina toplam polifenol miktarının (a); ekstrakt toplam polifenol miktarlarının (b) ve polifenolce % saflık değerlerinin (c), farklı çözücü/prina oranıyla değişimi

Nawaz ve ark. (2006) etanolün çözünür proteinleri çöktittiğini belirtmiştir. Etanol, çözünür maddeleri çökelterek saflığı arttırabilir. Fakat çözücü olarak yüksek hacimde su kullanıldığında elde edilen ekstraktların polifenol saflığı, etanol kullanılarak elde edilen ekstraktların polifenol saflığından yüksektir.

Çözücü olarak yüksek miktarda su kullanımı, polifenol ekstraktlarının kurutulması sırasında fazla miktarda suyun buharlaştırılması nedeniyle buharlaştırma maliyetini artırır. Düşük seviyede etanol kullanımı ise numune içinde etanol kaybindan ve kayıp etanolün geri kazanımı için etanol içeren numunenin buharlaştırılması gerektiğinden toplam ekstraksiyon maliyetini artırır. Hangi çözücünün kullanılacağına belirlenmesinde ekonomik proses optimizasyonu yapmak gerekir.

4.2.2. Ekstraksiyon Zamanının Etkisi

2,37g prina ve çözücü olarak 112,5ml saf su ve etanol kullanılarak, farklı ekstraksiyon sürelerinde (60, 80, 100 dakika) prina numunesinin toplam polifenol miktarları tayin edildi (Şekil 4.6). Artan ekstraksiyon süresi, su ($p<0,85$) ve etanolün ($p<0,3$) her ikisi ile geri kazanılan polifenol miktarını etkilemedi.



Şekil 4.6. Prina toplam polifenol miktarının ekstraksiyon süresiyle değişimi

Mylonaki ve ark. (2008) artan ekstraksiyon zamanının zeytin yapraklarından polifenol ekstraksiyonunu arttırdığını bulmuşlar, Pinelo ve ark. (2004) artan

ekstraksiyon zamanının am talaşı ve badem kabuğundan polifenollerin ekstraksiyonunu arttırdığını belirtmişlerdir. Silva ve ark. (2007) artan ekstraksiyon zamanının 35 dakikaya kadar *Inga edulis* yapraklarından etanol-su karışımı ile polifenollerin ekstraksiyonunu arttırdığını fakat ekstraksiyon zamanındaki daha yüksek artışın polifenol ekstraksiyonunu etkilemediğini bildirmişlerdir. Jerez ve ark. (2006) ise ekstraksiyon süresinin toplam polifenollerin am kabuğundan geri kazanımını etkilemediğini bulmuşlardır.

4.2.3. Karasudan Ayrılan Kekten Ve Prinadan Polifenollerin Geri Kazanımının Karşılaştırılması

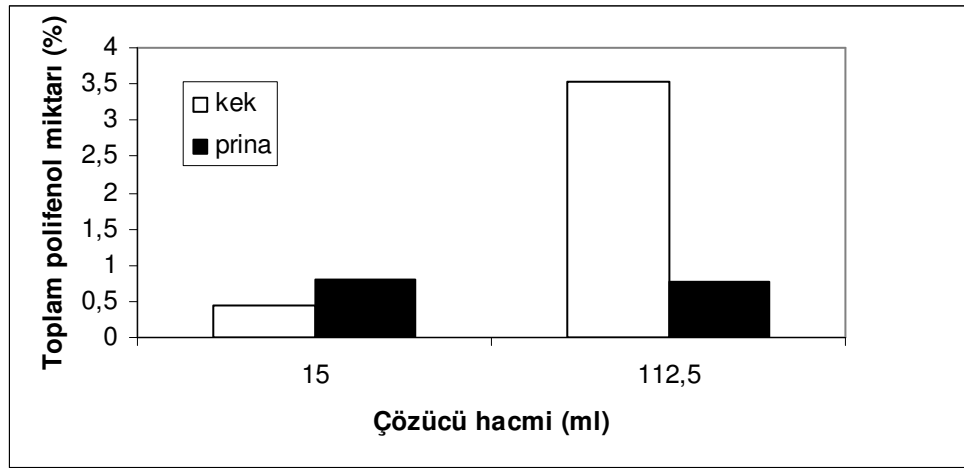
Polifenollerin ekstraksiyonunda metanol, etanol, propanol, aseton, etil asetat, dimetilformamid ve bunların kombinasyonu kullanılabilir fakat çözücü ekstrakt fazda kalabilir. Ekstrakte edilen bileşikler insan tüketimi için güvenli olmalıdır bu yüzden polifenollerin ekstraksiyonunda etanol gibi güvenilir çözücüler kullanılmalıdır. 7,5g karasudan ayrılan kek ve 3g prinadan polifenollerin ekstraksiyonu için 15'er ml etanol kullanıldı. Ekstraksiyon sonrasında her numune için eşit hacimde (10 ml) etanol ekstraktı elde edildi.

Polifenollerin ekstraksiyonu için etanol kullanıldığında, etanolün üçte biri karasudan ayrılan kekten ve prinada kalmaktadır dolayısıyla etanolün geri kazanımı için bu kaynakların buharlaştırılması gereklidir ve bu işlem ekstraksiyon maliyetini artırır. Su özücü olarak alternatiftir, ucuz çözücü olduğu için geri kazanılması gerekli değildir ve toplam ekstraksiyon maliyetini düşürür. Polifenoller prinadan su ile ekstrakte edilebilir fakat polifenoller, su içeriği yüksek olan karasudan ayrılan kekten su ile ekstrakte etmek mümkün değildir. Bu yüzden çalışma, karasudan ayrılan kekten polifenollerin su ile ekstraksiyonuna yönlendirilmedi.

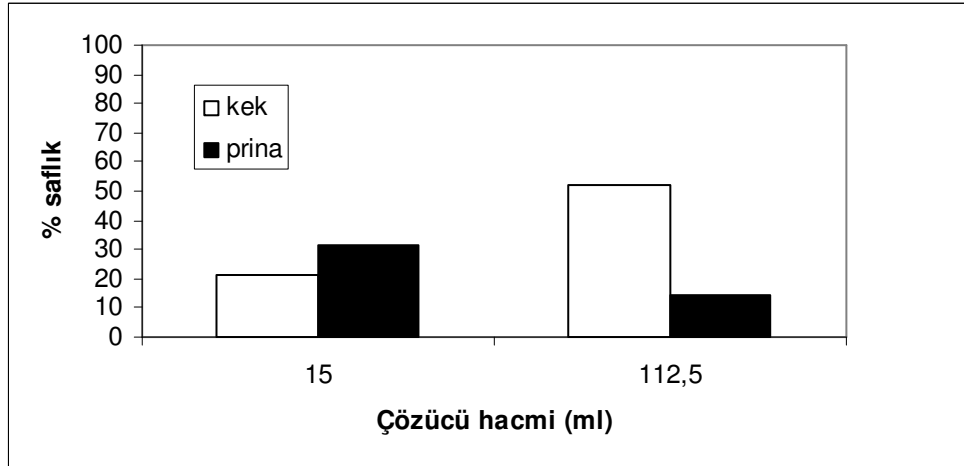
Polifenollerin özücü ile ekstraksiyonunda, çözücünün buharlaştırılması ve girişim yapan maddelerin polifenollerden uzaklaştırılması gerekir böylece ekstrakte edilen polifenollerin saflığı kaynak seçiminde önemli faktördür. Fakat polifenollerin geri kazanımı için kaynak olan karasudan ayrılan kek ve prinanın, ekstrakte edilen polifenollerin saflığına göre karşılaştırılmasını gösteren çalışma yoktur.

Polifenollerin geri kazanımı; bitki materyaline çözücü ilavesi, bitki materyalindeki polifenollerin çözünmesi ve sonra polifenollerin bitki materyalinden çözücüye difüzyonu ile gerçekleşen polifenollerin ekstraksiyonunu ve ardından çözücünün polifenollerden ayrılmasını kapsamaktadır.

Kek ve prina numunelerinin toplam polifenol miktarlarının ve elde edilen ekstraktların polifenolce % saflık değerlerinin ekstraksiyonda kullanılan çözücü hacmiyle değişimi Şekil 4.7.'de gösterildi.



(a)



(b)

Şekil 4.7. Kek ve prina numunelerinin toplam polifenol miktarlarının (a) ve elde edilen ekstraktların polifenolce % saflık değerlerinin (b) kullanılan çözücü hacmiyle değişimi

Karasudan ayrılan kekten ve prinadan polifenollerin ekstraksiyonu çözücü olarak 15 ve 112,5 ml etanol kullanılarak karşılaştırıldığında; düşük hacimli etanol kullanıldığında, prinadan keke göre daha fazla polifenol ekstrakte edildi fakat yüksek hacimli etanol kullanıldığında kekten ekstrakte edilen polifenoller prinaya göre daha fazlaydı. Ekstraksiyonda kullanılan çözücü (etanol) hacmi arttırıldığında kek numunelerinden elde edilen ekstraktın polifenolce saflığı artarak ($p<0,0005$) %52 değerine ulaştı, prina numunelerinde ise çözücü hacmindeki artışla, elde edilen ekstraktın polifenolce saflığı azaldı ($p<0,005$).

4.3. Isıl işlemlerin Prina Ekstraktlarının Polifenol Konsantrasyonuna Ve Antioksidan Aktivitesine Etkisi

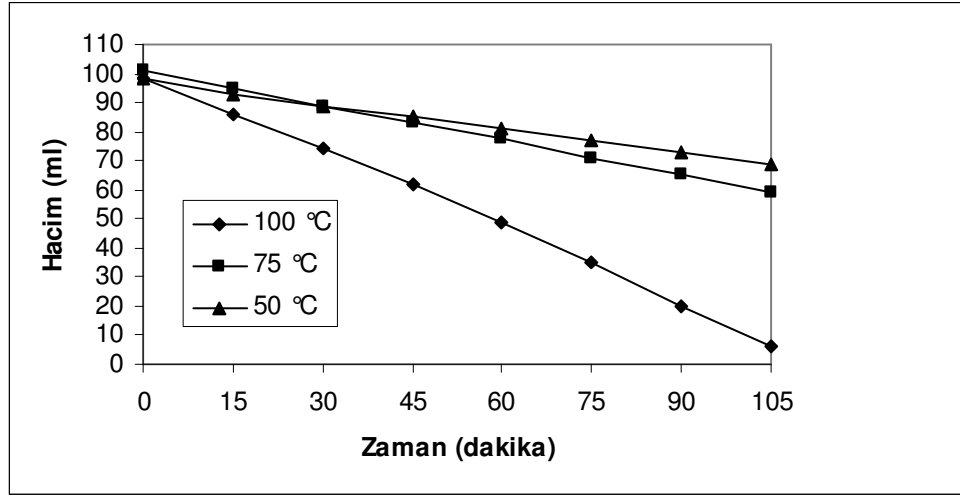
Isıl işlemlerin, ekstrakt polifenol konsantrasyonu ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisinin incelenmesinde; 2,37g prina ile çözücü olarak 112,5ml saf su kullanılarak, $23\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, bir saatte gerçekleştirilen ekstraksiyon sonunda elde edilen polifenol ekstraktları kullanıldı. Elde edilen polifenol ekstraktlarından çözücünün uzaklaştırılması ve polifenollerin konsantre halde elde edilmesi önemlidir. Ancak uygulanacak ısıl işlemin polifenol konsantrasyonu ve antioksidan aktivite üzerine etkileri bilinmelidir.

4.3.1. Isıl İşlem Olarak Buharlaştırmanın Toplam Polifenol İçeriği Üzerine Etkisi

Polifenol içeren prina ekstraktları farklı sıcaklıklarda buharlaştırıldı böylece orijinal ekstrakt hacmi ısıl işlem süresince Şekil 4.8.'de gösterildiği gibi değişti ($p<0,0005$).

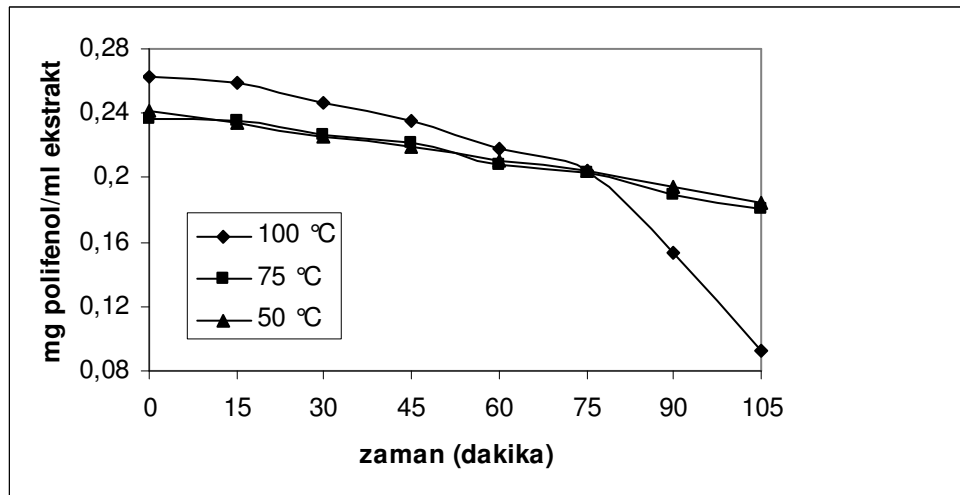
Buharlaştırma, prina ekstrakt hacminin değişmesiyle ve ekstraktta bulunan polifenollerin ısıl kaybıyla polifenol konsantrasyonunu etkileyebilir. Buharlaştırma gerçekleşirken numunelerin polifenol miktarları, her ml buharlaştırılan orijinal ekstrakt için mg polifenol olarak verildi. Böylece buharlaştırma sırasındaki hacimsel değişimin toplam polifenollerin konsantre edilmesi üzerine olan etkisi elimine

edildi ve buharlaştırma sıcaklığının polifenol kayıpları üzerine olan etkisinin anlaşılması sağlandı.



Şekil 4.8. Farklı sıcaklıklarda uygulanan buharlaştırma sırasında ekstrakt hacminin zamanla değişimi

50, 75, 100 °C sıcaklıklarda buharlaştırılan ekstraktların toplam polifenol konsantrasyonları, farklı zaman aralıkları için her ml buharlaştırılan orijinal ekstrakt başına mg polifenol olarak Şekil 4.9.'da gösterildi.



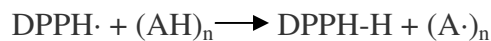
Şekil 4.9. Farklı sıcaklıklarda konsantrasyon sırasında ekstrakt polifenol içeriğinin zamanla değişimi

Ekstrakt başlangıç toplam polifenol içeriği yaklaşık 0,25 mg/ml ekstrakt olarak hesaplandı ve buharlaşma sırasında ml orijinal ekstrakt başına bulunan polifenol miktarında azalma tespit edildi ($p<0,0005$) ki bu azalma oranı sıcaklığa bağlıdır. 50 ve 75 °C sıcaklıklardaki buharlaştırmada, toplam polifenollerin konsantrasyonunda zamanla önemli bir farklılık görülmemektedir ($p<0,2$). 50 ve 75 °C sıcaklıklarda 105 dakikanın sonunda, toplam polifenol içeriği %23 azaldı ve toplam polifenoldaki azalma 105 dakikaya kadar düzgün bir şekilde devam etti. Diğer taraftan, 100 °C sıcaklıkta 105 dakika uygulanan buharlaştırma ile toplam polifenol içeriği %65 azaldı ki bu oran, 50 ve 75 °C sıcaklıklarda tespit edilen polifenol içeriğindeki azalmadan daha yüksektir. 100 °C sıcaklıkta, toplam polifenol içeriğinde 75 dakikaya kadar düzgün; bundan sonra ise 105 dakikaya kadar keskin bir azalma gözlemlendi.

Brenes ve ark. (2002) 180 °C sıcaklıkta kızartma sırasında, zeytinyağındaki spesifik polifenollerde belirgin bir azalma; mikrodalga ile 10 dakika ısıtma ve düdüklü tencerede 30 dakika su ile kaynatma sırasında da spesifik polifenollerde küçük bir azalma hesaplamışlardır. Çalışmamızda, ısıtma işlem süresini 75 dakikanın altında olduğu zamanlarda hesaplanan prina ekstraktlarındaki düşük yüzdeli toplam polifenol kayıpları; Brenes ve ark. (2002) tarafından bildirilen spesifik polifenollerdeki azalma ile benzer eğilim göstermektedir. Ayrıca Campanella ve ark. (2008) da zeytinyağının toplam polifenol içeriğinin, 98 °C sıcaklıkta 20 dakikaya kadar hafifçe azaldığını fakat 20 dakikadan sonra azalmanın keskin bir şekilde gerçekleştiğini bulmuşlardır.

4.3.2. Isıl İşlem Olarak Buharlaştırmanın Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

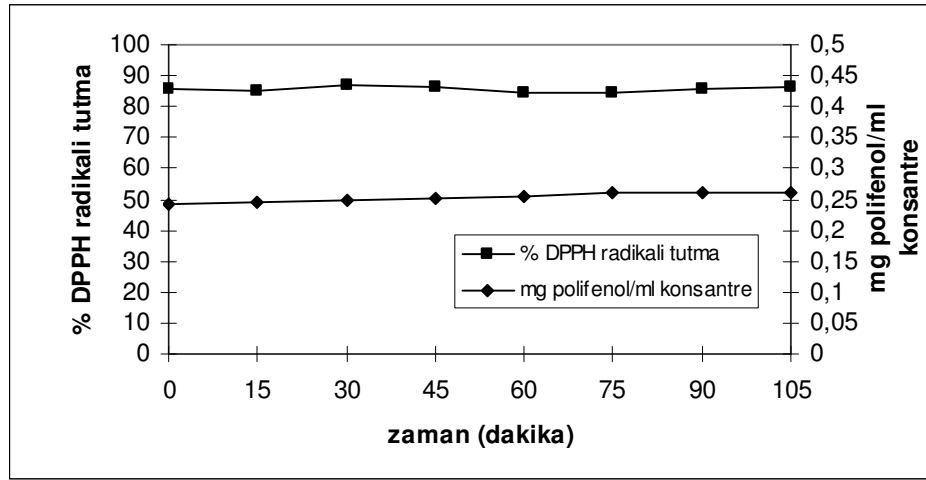
Zeytindeki fenolik bileşikler kuvvetli serbest radikal tutuculardır. Zeytinyağı fraksiyonları, DPPH gibi kararlı radikalleri yakalarlar (Valanidis ve ark., 2004; Carrasco-Pancorbo ve ark., 2007), reaksiyon DPPH ve antioksidan (AH) arasında şu şekilde gerçekleşir:



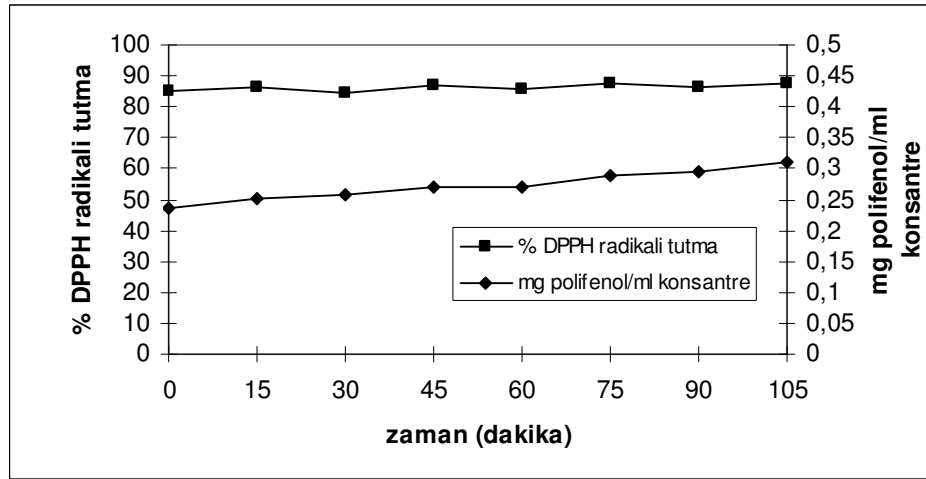
Prina ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ekstraktların buharlaştırılması sırasında değişebilmektedir. Böylece buharlaşma sıcaklığının, zamanla antioksidan aktivitesine etkisi DPPH ile test edildi ve Şekil 4.10'da %DPPH radikali tutma olarak belirtildi. Buharlaşma sırasında ekstrakt hacmi zamanla azaldı (Şekil 4.8.) ve her 15 dakikada konsantreden 3 ml numune alınarak analizler için biriktirildi. Biriktirilen 2,6 ml konsantre, %DPPH radikali tutma analizinde kullanıldı. Buharlaştırma işlemine maruz bırakılan polifenol ekstrakt konsantrelerinin DPPH radikali tutma yüzdeleri Şekil 4.10.'da gösterildi.

Isıl işlem olan buharlaştırmanın, antioksidan aktivite üzerine etkisini açıklayabilmek için polifenol ekstrakt konsantrelerindeki toplam polifenol, Şekil 4.10'da mg polifenol/ml konsantre olarak belirtildi. Konsantrenin mililitresindeki toplam polifenol miktarında, 50°C sıcaklıkta zamanla önemli bir değişiklik olmadı (Şekil 4.10.a.). Çünkü konsantrasyon işlemi ile zamanla konsantrelerin toplam polifenol miktarı artmakta ancak, polifenollerin ısı kaybından dolayı zamanla toplam polifenol miktarının azalması (Şekil 4.9.) bu artışı örtbas etmektedir. Diğer taraftan konsantrenin mililitresindeki toplam polifenol miktarı, 75°C sıcaklıktaki buharlaşma sırasında az miktarda artarken (Şekil 4.10.b.); 100°C sıcaklıkta gerçekleştirilen buharlaştırma sırasında 60 dakikadan sonra Şekil 4.10.c.'de görüldüğü gibi önemli artış gösterdi ($p < 0,0000005$). Çünkü buharlaşma süresince hacimsel azalma yüzdesi (Şekil 4.8.), polifenol azalma yüzdesinden (Şekil 4.9.) daha yüksekti.

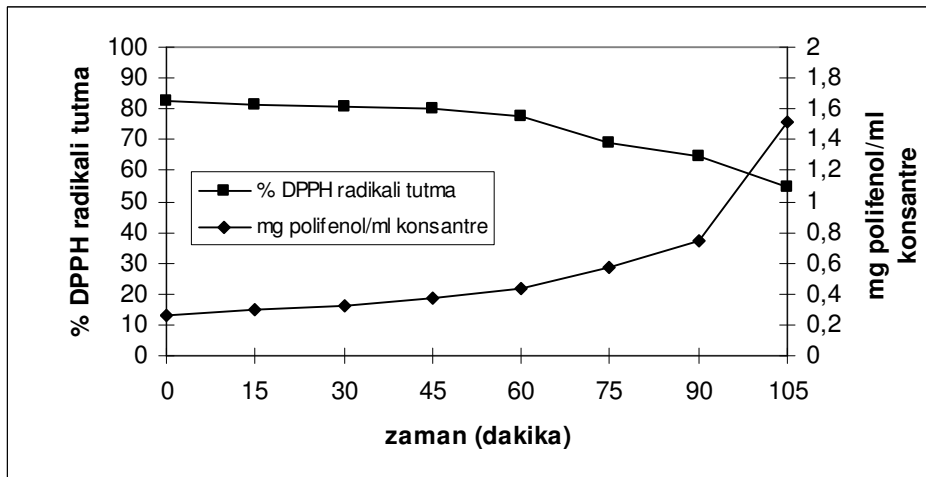
75°C sıcaklıkta zamanla DPPH radikali tutma yüzdesinde önemli değişiklik olmadı (Şekil 4.10.b.), diğer taraftan konsantrasyonun etkisinden dolayı konsantrenin mililitresindeki toplam polifenol miktarında hafif bir artış tespit edildi. Konsantrenin polifenol içeriği zamanla arttığına göre, DPPH radikali tutma yüzdesinin de zamanla artması beklenmekteydi ama artış gözlenmedi. Bu sonuç, buharlaştırma gibi bir ısıl işlemin, 75°C sıcaklıkta zamanla antioksidan aktiviteyi azalttığını gösterir. Konsantrenin polifenol içeriğinin artmasıyla, antioksidan aktivitenin de artması beklendi. Ancak buharlaştırmanın bir ısıl işlem olarak antioksidan aktiviteyi azaltmasıyla, bu beklenen artış bastırıldı. Onun için DPPH radikali tutma yüzdesindeki toplam etki değişmedi.



(a) 50 °C



(b) 75 °C



(c) 100 °C

Şekil 4.10. Konsantrelerin (a) 50 °C, (b) 75 °C, (c) 100 °C sıcaklıklarda DPPH radikali tutma aktivitesi ve polifenol içeriği kinetiği

Prina ekstraktlarının 100°C sıcaklıkta buharlaştırılması, DPPH radikali tutma yüzdesi üzerinde farklı etkilerle sonuçlandı. DPPH radikali tutma yüzdesi, 100°C sıcaklıkta buharlaştırma sırasında 60 dakikaya kadar değişmedi fakat 60 dakikadan 105 dakikaya gidildikçe Şekil 4.10.c.'de görüldüğü gibi azaldı ($p<0,000005$). Buharlaştırma işleminin 60 ve 105 dakikaları sırasında, konsantrenin hacmi azaldı fakat mililitre konsantredeki miligram polifenol miktarı arttı. 100°C sıcaklıkta buharlaştırma sırasında 60 dakikaya kadar olan DPPH radikali tutma yüzdesindeki eğilim, 75°C sıcaklıktaki eğilim ile benzerdir. 100°C sıcaklıkta buharlaştırma sırasında mililitre konsantredeki polifenol miktarı, 60 dakikadan 105 dakikaya doğru keskin şekilde arttı fakat DPPH radikali tutma yüzdesi keskin şekilde azaldı. Konsantrenin mililitresindeki polifenol miktarı arttığı için DPPH radikali tutma yüzdesinin de artması beklendi fakat bu değer 50 ve 75°C sıcaklıklarda sabit kaldı, buna karşın 100°C sıcaklıkta azaldı. 100°C sıcaklıkta gerçekleşen DPPH radikali tutma yüzdesindeki azalma, bu sıcaklıkta uygulanan buharlaştırma gibi bir ısıl işlemin polifenol miktarındaki azalmaya ek olarak polifenollerin inaktive etmesiyle antioksidan aktiviteyi azalttığını gösterdi.

Valavanidis ve ark. (2004) antioksidan kapasitesini, başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli olan numune miktarını belirten IC50 değerini kullanarak incelemiştir ve çeşitli yağların IC50 değerlerinin 160 ve 190°C sıcaklıklarda 2 saat ısıtıldığında arttığını bulmuştur. Roy ve ark. (2007) ısıl işlemlerin çeşitli sebzelerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisini incelemiştir ve 75°C ile 100°C sıcaklıklardaki ısıl işlemin hem fenolik içeriği hem de anti-DPPH radikal aktiviteyi azalttığını hesaplamışlardır. Bu yüzden anti-DPPH radikal aktivitenin azalması fenolik içeriğin azalmasının sonucu olarak görülmüştür. Çalışmamızda buharlaştırma süresince numune hacimleri sabit değildi ve bu süre içinde numunelerin toplam polifenol miktarı yoğunlaştırmanın etkisiyle arttırıldı. Buharlaştırma gibi bir ısıl işlemin prina ekstraktlarındaki polifenollerin aktivitesini etkileme mekanizması şu şekilde açıklanabilir; antioksidan aktivite, polifenol içeriğin azalmasına ek olarak polifenollerin inaktive edilmesi sonucu azalmıştır.

4.3.3. Buharlaştırma Sırasındaki Polifenol Kayıplarının Kinetik Analizi

Toplam polifenol konsantrasyonu, sıfırıncı mertebeden (zamana karşı konsantrasyon), birinci mertebeden (zamana karşı Ln konsantrasyon) ve ikinci mertebeden (zamana karşı 1/konsantrasyon) denklemlere yerleştirildi. Üç farklı sıcaklık için bağıntı (korelasyon) katsayıları hesaplandı (Tablo 4.7.) ve en büyük korelasyon katsayısının (r^2) elde edildiği denkleme bakılarak reaksiyon kinetiğinin kaçınıcı mertebeden olduğu belirlendi. Korelasyon katsayıları (r^2) incelendiğinde, toplam polifenol bozunmasının 50 ve 75 °C sıcaklıklardaki ısıt işlemlerde sıfırıncı mertebeden reaksiyon kinetiği izlediği görüldü (50 °C için $r^2=0,99$; 75 °C için $r^2=0,97$). 100 °C sıcaklıktaki ısıt işlem uygulaması sonucu görülen polifenol bozunması da sıfırıncı mertebeden reaksiyon kinetiği izlemektedir ancak r^2 değeri 50 ve 75 °C sıcaklıklardaki ısıt işlemlerde elde edilen değerden daha düşüktür ($r^2=0,85$).

Tablo 4.7. Farklı sıcaklıklarda hesaplanan korelasyon katsayısı (r^2) değerleri

Sıcaklık (°C)	r^2		
	Sıfırıncı mertebe	Birinci mertebe	İkinci mertebe
50	0,996	0,991	0,982
75	0,973	0,965	0,955
100	0,852	0,752	0,643

Gıdalardaki reaksiyonlar sıfırıncı veya birinci mertebeden karakterize edilirler. Kyi ve ark. (2005) kakao çekirdeğindeki polifenollerin enzimatik reaksiyonlarını birinci mertebeden hesaplamışlardır fakat Franzen ve ark. (1990) enzimatik olmayan reaksiyonların sıfırıncı mertebeden gerçekleştiğini raporlamışlardır. Çalışmamızda polifenoller kakao çekirdeğinde yapılan araştırmanın aksine su ekstraktlarındadır ve enzimatik reaksiyonlarla çalışılmamıştır.

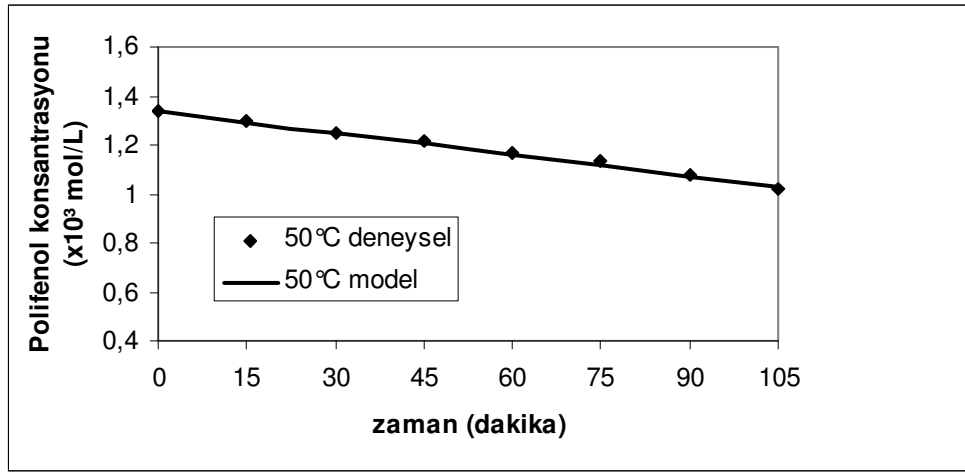
Farklı sıcaklıklardaki toplam polifenol bozunmalarının hız sabitleri (k), sıfırıncı mertebeden hız denkleminde uygun olarak hesaplandı ve Tablo 4.8.'de verildi.

Tablo 4.8. Farklı sıcaklıklardaki hız sabitleri

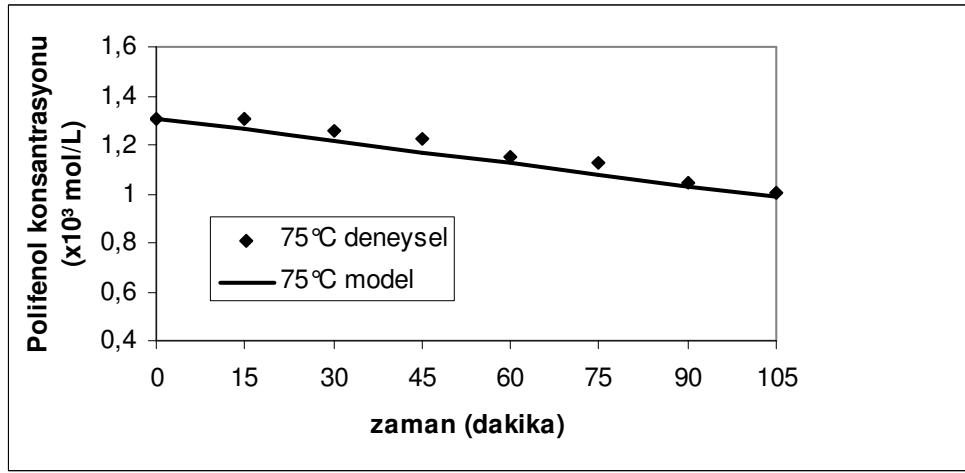
Sıcaklık (°C)	k (mol L ⁻¹ min ⁻¹)
50	2.96E-06
75	3.1E-06
100	8.17E-06

Tablo 4.8'deki sonuçlar, sıcaklığın artmasıyla polifenol bozunma hızının da arttığını göstermektedir. 100°C sıcaklıkta hesaplanan k değerinin 50°C sıcaklıktaki değerden yaklaşık üç kat büyük olduğuna dikkat edilmelidir. Düşük sıcaklıklardaki bozunma hızları daha küçük olduğu için polifenollerin 50 ve 75°C sıcaklıklara 100°C sıcaklıktan daha az duyarlı olduğu sonucuna varılabilir. Polifenollerin bozunmasıyla ilgili kinetik verilerin sınırlı olduğu göz önüne alındığında, Campanella ve ark. (2008) 98°C sıcaklıkta bir ısıtma işlemine maruz bırakılan zeytinyağındaki polifenollerin bozunması için bulunan hız sabitini 'Model uydurma' yoluyla hesaplamışlardır. Çalışmamızda toplam polifenoller için elde ettiğimiz hız sabitleri, Campanella ve ark. (2008) tarafından bildirilen hız sabitleriyle karşılaştırıldığında birbirinden farklıdır. Hız sabitlerinin hesaplanmasında farklı metodların kullanılması, polifenollerin yağ değil de su ekstraktlarında bulunması elde edilen farklı sonuçların sebepleri olabilir.

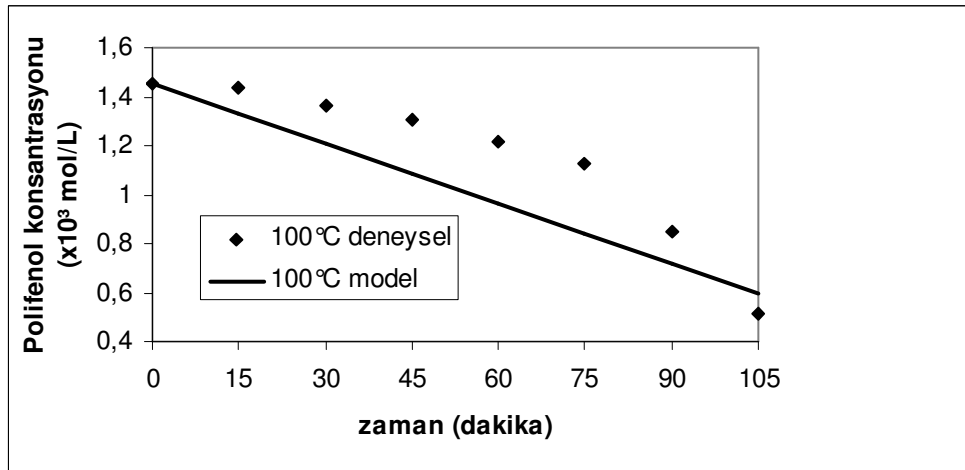
Aktivasyon enerjisi (E_A), gaz sabiti R (1,98 kal/mol.K) ve çizilen $\ln k$ 'ya karşılık $1/T$ (mutlak sıcaklık) grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı. Sıfırıncı mertebeden hız sabitine ve ilgili denklemlere uygun olarak, aktivasyon enerjisi 19,9 kJ/mol olarak hesaplandı. Campanella ve ark. (2008) 98, 120, 140, 160 ve 180°C sıcaklıklarda ısıtma işlemine maruz bırakılan zeytinyağındaki polifenollerin bozunmaları üzerine çalışmışlardır ve aktivasyon enerjisini 'Model uydurma' yoluyla 36 kJ/mol olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızda toplam polifenoller için elde edilen aktivasyon enerjisi, Campanella ve ark. (2008) tarafından raporlanan aktivasyon enerjisinden daha düşüktür. Campanella ve ark. (2008) çalışmalarında aktivasyon enerjisini hesaplamak için 100 ve 180°C arasındaki sıcaklıklarda uygulanan ısıtma işlemleri kullanmışlardır. Aktivasyon enerjisinin hesaplanmasında farklı sıcaklık aralıklarının ve metodların kullanılması elde edilen farklı sonuçların sebepleri olabilir.



(a) 50°C



(b) 75°C



(c) 100°C

Şekil 4.11. (a) 50°C, (b) 75°C, (c) 100°C sıcaklıklarda buharlaştırılan prina ekstraktlarının hesaplanan deneysel ve teorik polifenol konsantrasyonları

Deneysel kayıplar, sıfırıncı mertebeden kinetikle elde edilen teorik tahminlerle karşılaştırıldı (Şekil 4.11.). 50 ve 75°C sıcaklıklardaki buharlaştırmada tahminler deneysel değerlere oldukça yakındı ancak 100°C sıcaklıkta tahminler ve deneysel veriler arasında maksimum %25 fark bulundu.

Prina ekstraktlarının buharlaştırıldığı her sıcaklıkta toplam polifenol konsantrasyonunda bir azalma tespit edildi ve ısıtma süresinin bir fonksiyonu olarak toplam polifenol konsantrasyonunda 50 ve 75°C sıcaklıklar için önemli fark görülmedi. 50 ve 75°C sıcaklıklar arasında toplam polifenol içeriği 105 dakika sonunda %23 azaldı. Diğer taraftan 100°C sıcaklıkta 105 dakika ısıtma işlemi polifenol içeriğini %65 azalttı. 100°C sıcaklıkta ısıtma işlemi ile gerçekleşen polifenol azalması, 50 ve 75°C sıcaklıklarda görülen polifenol azalmasından daha yüksektir. Prina ekstraktlarındaki polifenoller 75°C sıcaklıkta konsantre edilmelidir çünkü polifenol kayıpları 75°C gibi düşük sıcaklıklarda 100°C sıcaklığa göre daha düşüktür ve polifenol konsantrasyonu 50 ve 75°C sıcaklıklarda benzerdir.

Prina ekstraktlarındaki polifenollerin antioksidan aktivitesi, ekstraktların buharlaştırılması sırasında polifenollerin ısıtma yıkımına ek olarak polifenollerin inaktivasyonu sonucu azaldı. Polifenoller antioksidan olarak rol oynadığına göre buharlaştırma sıcaklığının hesaplanmasında sadece polifenol içeriğine buharlaştırma sıcaklığının etkisi değil, ayrıca buharlaştırma sıcaklığının polifenollerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi de kritik faktördür.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmada elde edilen sonuçlar bu bölümde özetlenmiştir ve ileride konuyla ilgili yapılacak çalışmalar için öneriler verilmiştir.

Zeytin karasu numunesinin hem sıvı hem katı fazının bir polifenol içeriği olduğu tespit edilmiştir. Öyleyse toplam polifenol miktarı tayininde, karasu numunesinin katı-sıvı fazlara ayrılarak analiz edilmesi, numunenin toplam polifenol içeriğinin daha doğru ifade edilmesini sağlayacaktır.

Zeytin karasuyunun santrifüj separatöre beslenmesi ile elde edilen kek fazından, çözücü etanol kullanılarak polifenollerin ekstraksiyon şartları; 15 ml/g çözücü/numune oranı, 60°C ekstraksiyon sıcaklığı, 10 dakika çalkalama ve 80 dakikalık toplam ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir ve bu şartlarda kekin toplam polifenol miktarı % 4,2030±0,0131 olarak hesaplanmıştır. Belirlenen ekstraksiyon koşullarında kekten polifenollerin etanol ile geri kazanımı mümkündür.

Çalışmada katı atık prinanın da bir polifenol içeriği olduğu tespit edilmiştir. Literatürde prinanın polifenol içeriği ile ilgili çalışma olmaması, çalışmanın özgünlüğü açısından çok önemlidir. Prinadan polifenoller etanol ve su ile ekstrakte edilmiştir. Yapılan çalışmadan yola çıkılarak, prinadan polifenol geri kazanımı için proses tasarımı yapılabilir.

Ayrıca ısıl işlem olarak buharlaştırmanın prina ekstraktlarının polifenol konsantrasyonuna ve antioksidan aktivitesine etkisi de incelenmiştir. Prina ekstraktlarındaki polifenollerin antioksidan aktivitesinin, ekstraktların buharlaştırılması sırasında polifenollerin ısıl yıkımına ek olarak polifenollerin inaktivasyonu sonucu azaldı belirlenmiştir.

Polifenoller antioksidan olarak rol oynadığına göre buharlaştırma sıcaklığının hesaplanmasında sadece polifenol içeriğine buharlaştırma sıcaklığının etkisi değil, ayrıca buharlaştırma sıcaklığının polifenollerin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi

de kritik faktördür. Belirlenen bu kritik faktörler yapılan çalışmalarda göz önüne alınmalıdır.

Farklı sıcaklıklardaki toplam polifenol bozunmalarının hangi mertebeden reaksiyon kinetiği izlediği tespit edilmiştir. Korelasyon katsayısı (r^2) incelendiğinde, toplam polifenol bozunmasının 50 ve 75°C sıcaklıklardaki ısıtma işlemlerinde sıfırıncı mertebeden reaksiyon kinetiği izlediği görülmüştür. 100°C sıcaklıktaki polifenol bozunmasının da sıfırıncı mertebeden reaksiyon kinetiği izlediği bulunmuştur ancak r^2 değeri 50 ve 75°C sıcaklıklardaki ısıtma işlemlerinde elde edilen değerden daha düşüktür. 50 ve 75°C sıcaklıklardaki buharlaştırmada tahmin edilen polifenol değerleri deneysel değerlere oldukça yakındır fakat 100°C sıcaklıkta tahminler ve deneysel veriler arasında %25 fark bulunmuştur. Bundan dolayı 100°C gibi yüksek sıcaklıklarda polifenollerin bozunmasını öngörmek için farklı kinetik modeller incelenmelidir.

Çalışmada, zeytinin zeytinyağına işlenmesi sırasında oluşan karasu ve prina atıklarının polifenol içeriğe sahip olduğu belirlenmiştir. Antioksidan özelliğe sahip polifenollerin karasu ve prinadan geri kazanımı ile çevre için büyük tehdit oluşturan bu atıklardan; ekonomik değeri olan yararlı ürün eldesi ve çevre için daha az tehlikeli atık oluşumu mümkün olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Aktaş, S.E., Imre S., Ersoy L. 2001. Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 35(9): 2336-2340.
2. Albuquerque, J.A., Gonzalvez, J., Garcia, D., Cegarra, J. 2004. Agrochemical characterization of alperujo, a solid by-product of the two phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresourse Thecnology*, 91 (2): 195-200.
3. Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 267-273.
4. Archana, S.S., Kawatra A. 1998. Reduction of polyphenol and phytic acid content of pearl millet grains by malting and blanching. *Plant Foods for Human Nutrition*, 53: 93-98.
5. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99: 191-203.
6. Borsani, R., Ferrando, B. 1996. Ultrafiltration plant for olive vegetation waters by polymeric membrane batteries. *Desalination*, 108: 281-286.
7. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30.
8. Berenes, M., Garcia, A., Dobarganes, M. C., Velasco, J., Romero, C. 2002. Influence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 5962-5967.

9. Bubba, M. D., Checchini L., Pifferi C., Zanieri L. and Lepri L. 2004. Olive mill wastewater treatment by a pilot-scale subsurface horizontal flow (SSF-h) constructed wetland. *Annali di Chimica*, 94(12): 875-887.
10. Campanella, L., Nuccilli, A., Tomassetti, M., Vecchio, S. 2008. Biosensor analysis for kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. *Talanta*, 74: 1287-1298.
11. Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Lercker, G., Fernandez-Gutierrez, A. 2007. Evolution of the influence of thermal oxidation on the phenolic composition and on the antioxidant activity of extra-virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4771-4780.
12. Çaynak, S., Gürü, M., Biçer, A., Keskin, A., İçingür, Y. 2009. Biodiesel production from pomace oil and improvement of its properties with synthetic manganese additive. *Fuel*, 88: 534-538.
13. Chun, S.S., Vatter, D.A., Lin, Y.T., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40: 809-816.
14. Daud, W.R.W., Talib, M.Z.M., Kyi, T.M. 2007. Drying with chemical reaction in cacao beans. *Drying Technology*, 25: 867-875.
15. Dhouib, A., Aloui, F., Hamad, N., Sayadi, S. 2006. Plot-plant treatment of olive oil mill wastewaters by *Phanerochaete chrysosporium* coupled to anaerobic digestion and ultrafiltration. *Process Biochemistry*, 41: 159-167.
16. Doymaz, I., Gorel, O., Akgun, N.A. 2004. Drying characteristics of the solid by-product of olive oil extraction. *Biosystems Engineering*, 88(2): 213-219.
17. Dubois, N., Hamilton, J.K., Gilis, K., Rebers, P., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal.Chem.*, 28: 350-356.

18. Franzen, K., Singh, R.K., Okos, M.R. 1990. Kinetics of nonenzymatic browning in dried skim milk. *Journal of Food Engineering*, 11: 225-239.
19. Garcia, I., Jimenez, P.R., Bonilla, J.L., Martin, A., Martin, M.A., Ramos, E. 2000. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Process Biochemistry*, 35:751-758.
20. Gortzi, O., Lalas, S., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E., Papaconstandinou, S., Dourtoglou, E. 2008. Recovery of natural antioxidants from olive mill wastewater using Genapol-X080. *Journal of American Oil Chemists Society*, 85(2): 133-140.
21. Görel, Ö., Kırmacı, E., Doymaz, İ., Akgün, N.A. 2003. Zeytinyağı Fabrika Atıklarının Değerlendirilmesi. *Kimya Teknolojileri*, Sayı 26.
22. İkizoğlu, E., Haskök, S. 2005. Zeytin karasuyunun fiziksel kimyasal ve ileri yükseltgenme yöntemleriyle arıtımı. ISSN-1301-3068 TMMOB Kimya Mühendisleri Odası Yayın Organı, 167: 8-12.
23. Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. 2006. Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*, 94: 406-414.
24. Kampa, M., Hatzoglou, A., Notas, G., Damianaki, A., Bakogeorgou, E., Gemetzi, C., Kouroumalis, E., Martin, P.M., Castanas, E. 2000. Wine antioxidant polyphenols inhibit proliferation of human prostate cancer cell lines. *Nutrition and Cancer*, 37: 223-233.
25. Khoufi, S., Aloui, F., Sayadi, S. 2008. Extraction of antioxidants from olive mill wastewater and electro-coagulation of exhausted fraction to reduce its toxicity on anaerobic digestion. *Journal of Hazardous Materials*, 151: 531-539.

26. Kutkan, F. 2002. Zeytin ve zeytinyağı raporu. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Araştırma Planlama ve Koordinasyon Kurulu Başkanlığı, Ankara.
27. Kyi, T.M., Daud, W.R.W., Mohammad, A.B., Samsudin, M.W., Kadhum, A.A.H., Talib, M.Z.M. 2005. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cacao beans. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 323-331.
28. Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.L., Asther, M., Labat, M. 2001. Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75: 501-507.
29. Liebanes, M.D., Aragon, J.M., Palancar, M.C., Arevalo, G., Jimenez, D. 2006. Fluidized bed drying of 2-phase olive oil mill by-products. *Drying Technology*, 24: 1609-1618.
30. Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P. 2008. Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology. *Anal. Bioanal. Chem.*, 392: 977-985.
31. Mecozzi, M. 2005. Estimation of total carbohydrate amount in environmental samples by the phenol-sulphuric acid method assisted by multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 79: 84-90.
32. Meyer, F., Galan, P., Douville, P., Bairati, I., Kogle, P., Bertrais, S. 2005. Antioxidant vitamin and mineral supplementation and prostate cancer prevention in the SU.VI.MAX trial. *International Journal of Cancer*, 116(2): 182-186.

33. Nawaz, H., Shi, J., Mittal, G.S., Kakuda, Y. 2006. Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 48: 176-181.
34. Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stokmann, R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 823-837.
35. Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., Nunez, M.J. 2004. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). *Food Chemistry*, 85: 267-273.
36. Pitwell, L.R. 1983. Standard COD. *Chem. Brit.* 19: 907.
37. Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S. 2003. Antioxidizing potency of phenol compounds in olive oil mill wastewater. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 7636-7641.
38. Roig A., Cayuela M.L., Sanchez-Monedero M.A. 2006. An overview on olive oil mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26, 960-969.
39. Roy, M.K., Takenaka, M., Isobe, S., Tsushida, T. 2007. Antioxidant potential, anti-proliferative activities and phenolic content in water-soluble fractions of some commonly consumed vegetables: Effects of thermal treatment. *Food Chemistry*, 103: 106-114.
40. Russo, C. 2007. A new process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *Journal of Membrane Science*, 288, 239-246.
41. Sağlık, S., Ersoy, L., İmre, S. 2002. Oil recovery from lime-treated wastewater of olive mills. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104: 212-215.

42. Silva, E.M., Rogez, H., Larondelle, Y. 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 55: 381-387.
43. Şengül, F., Özer, A., Çatalkaya, Ç.E., Oktav, E., Evcil, H., Çolak, O., Sağer, Y. 2003. Zeytin Karasuyu Arıtımı Projesi, T.C. Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, İzmir.
44. Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 229: 152-178.
45. Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1998, 20th Edition, American Public Health Association, Washington, USA.
46. Stasinakis, A.S., Irena, E., Petalas, A.V., Halvadakis, C.P. 2008. Removal of total phenols from olive-mill wastewater using an agricultural by-product, olive pomace. *Journal of hazardous Materials*, 160: 408-413.
47. Turano E., Curcio S., De Paola M.G., Calabro V., Iorio G. 2002. An integrated centrifugation-ultrafiltration system in the treatment of olive mill wastewater. *Journal of Membrane Science*, 209: 519-531.
48. Valanidis, A., Nisiotou, C., Papageorgiou, Y., Kremli, I., Satravelas, N., Zinieris, N., Zygalaki, H. 2004. Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oil and other vegetable oils under normal conditions and thermal treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 2358-2365.
49. Vlyssides, A. 1998. Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods. *Fresenius Environ Bull.*, 7: 308-313.

50. Yen, G. C., Duh, P. D. 1994. Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 629-632.

ÖZGEÇMİŞ

Sevgül Tercan 1980 yılında Manisa’da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Çanakkale’de tamamladı. 2004 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nden mezun oldu. 2006 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Kimya Mühendisliği anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve araştırma görevlisi olarak görev yaptı.