

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ZEYTİNYAĞI SANAYİ ATIĞI OLAN ZEYTİN KARASUYU ÖZÜTÜNÜN BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE EKONOMİK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ALPER BABADOSTU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
BİYOKİMYA PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞEGÜL PEKSEL**

İSTANBUL, 2014

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİNYAĞI SANAYİ ATIĞI OLAN ZEYTİN KARASUYU ÖZÜTÜNÜN BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE EKONOMİK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Alper Babadostu tarafından hazırlanan tez çalışması 27 Ocak 2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Barbaros NALBANTOĞLU

Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Özlem ÖZSOY SAÇAN

İstanbul Üniversitesi

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yolculuğumda tez konumu belirleyerek engin bilgi, tecrübe ve emeğini üzerimden eksik etmeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL'e,

Çalışmam süresince benimle düşüncelerini paylaşan, laboratuvar olanaklarını kullanabilme ve çalışma şartları konusunda desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Nilay ALTAŞ KIYMAZ'a,

En sıkıntılı ve umutsuz anlarımda sabır ve anlayışla yanımda olup, yola devam etmemi sağlayan tüm dostlarıma,

Tez çalışma sürem boyunca canım arkadaşlarım ve Olympia LIASKA'ya,

Ve yaşamımın her döneminde maddi manevi desteklerini ortaya koyarak bugünlere gelmemi sağlayan, hayattaki en büyük şansım olan sevgili annem Figen BABADOSTU ve babam Bülent BABADOSTU'na,

Sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Ocak, 2014

Alper BABADOSTU

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ	vii
KISALTMA LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ	xii
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Amaç	3
1.3 Hipotez.....	3
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ	4
2.1 Zeytin ve Zeytinyağı	4
2.1.1 Dünyada Zeytin ve Zeytinyağı Sektörü	5
2.1.2 Türkiye'de Zeytin ve Zeytinyağı Sektörü	5
2.1.3 Zeytinyağı Üretim Prosesleri	6
2.1.3.1 Klasik Sistemler	7
2.1.3.2 Modern Sistemler	9
2.2 Karasuyun Yapısı, Oluşumu ve Fiziksel, Kimyasal Özellikler	10
2.2.1 Zeytin Karasuyu.....	10
2.2.2 Zeytin Karasuyunun Bileşimi	12
2.3 Serbest Radikaller	17
2.3.1 Serbest Radikallerin Oluşumu	17
2.3.2 Serbest Radikal Kaynakları	18

2.3.2.1	Endojen Kaynaklar	18
2.3.2.2	Eksojen Kaynaklar	20
2.3.3	Serbest Radikal Türleri	21
2.3.3.1	Süperoksit Radikali.....	21
2.3.3.2	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂).....	23
2.3.3.3	Hidroksil Radikali	23
2.3.3.4	Singlet Oksijen	24
2.3.3.5	Nitrit Oksit Radikali	24
2.3.4	Serbest Radikallerin Etkileri	25
2.3.4.1	Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri	25
2.3.4.2	Proteinlere Etkileri	26
2.3.4.3	Serbest Radikallerin Metabolizmadaki Etkileri	26
2.4	Antioksidanlar ve Antioksidan Aktivite.....	27
2.4.1	Antioksidanlar	27
2.4.2	Antioksidan Aktivite	27
2.4.3	Enzimatik Antioksidanlar	29
2.4.3.1	Süperoksit Dismutaz (SOD).....	29
2.4.3.2	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px).....	30
2.4.3.3	Katalaz (CAT).....	30
2.4.4	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	31
2.4.4.1	E Vitamini	31
2.4.4.2	C Vitamini.....	31
2.5	Fenoller ve Zeytin Karasuyu	31
2.5.1	Fenolik Bileşikler ve Antioksidan Etkileri	31
2.5.2	Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi	32

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR	37
3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	37
3.1.1 Kullanılan Zeytin Karasuyunun Temin Edilmesi	37
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar	37
3.1.3 Kullanılan Cihazlar.....	40
3.2 Kullanılan Metodlar	41
3.2.1 Karasu Karakterizasyonu.....	41
3.2.1.1 pH Tayini	41
3.2.1.2 Askıda Katı Madde (AKM) Tayini	41
3.2.1.3 Yağ ve Gres Tayini	41
3.2.1.4 Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Tayini	42
3.2.1.5 Toplam Organik Karbon (TOK) Tayini	43
3.2.1.6 Toplam Azot Tayini	43
3.2.1.7 Toplam Fenolik Bileşik Tayini.....	44
3.2.2 HPLC Analizleri	45
3.2.2.1 Kalitatif Analiz	45
3.2.2.2 Kantitatif Analiz.....	47
3.2.2.3 Oleuropeinin Asidik Hidrolizi	47
3.2.3 Antioksidan Aktivite Tayin Metodları	48

3.2.3.1	İndirgeme Gücü	48
3.2.3.2	DPPH Radikal Giderme Aktivitesi.....	48
3.2.3.3	ABTS Radikal Giderme Aktivitesi	49
3.2.3.4	Toplam Antioksidan Aktivite Tayin Metodu	50
BÖLÜM 4		
SONUÇ VE ÖNERİLER		51
4.1	Zeytin Karasuyu Karakterizasyonu	51
4.2	Kalitatif ve Kantitatif HPLC Analizleri.....	52
4.2.1	Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin Kantitatif HPLC ile Analizi için Hazırlanan Kalibrasyon Grafikleri	54
4.2.2	Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Tanımlanması ve Derişimlerinin Belirlenmesi	56
4.2.3	Kantitatif HPLC Analiz Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği ..	61
4.3	Antioksidan Aktivite.....	62
4.3.1	İndirgeme Gücü.....	62
4.3.2	DPPH Radikal Giderme Aktivitesi.....	63
4.3.3	ABTS Radikal Giderme Aktivitesi.....	64
4.3.4	Toplam Antioksidan Aktivite Tayin	65
4.4	Genel Değerlendirme ve Öneriler	65
KAYNAKLAR.....		70
ÖZGEÇMİŞ.....		77

SİMGE LİSTESİ

m	Ağırlık
v	Hacim
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
°C	Santigrat derece
%	Yüzde

KISALTMA LİSTESİ

A	Absorbans
Da	Dalton
dk.	Dakika
cm	Santimetre
g	Gram
L	Litre
M	Molar
μ L	Mikrolitre
kg	Kilogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
R ²	Regresyon katsayısı
rpm	Dakikadaki devir sayısı
TCA	Trikloro asetik asit
Tris	Tris (Hidroksimetil) aminometan
Tween 20	Polioksietilensorbat monolaurat
ZK	Zeytin karasuyu
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
AKM	Askıda katı madde
TOK	Toplam organik karbon
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH•	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil serbest radikali
ABTS•	2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazoline-6-sülfonik asid) radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoproteinler
mA	Miliamper

kWh	Saatteki kilowatt
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
DMPD•	N-N-dimetil-1,4-fenilendiamonyumdiklorit radikali
PVDF	Poliviniliden flor
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	Zeytin dalı 4
Şekil 2. 2	Zeytinyağı üretim prosesleri akım şeması 7
Şekil 2. 3	Pres sistemi 8
Şekil 2. 4	Sürekli sistemde örnek düzenek 9
Şekil 2. 5	Zeytin karasuyu 11
Şekil 2. 6	Araşidonik asit metabolizması sırasında serbest radikallerin sentezi..... 19
Şekil 2. 7	Canlı organizmada serbest radikal ile hasar oluşabilecek durumlar..... 26
Şekil 2. 8	Askorbik asit ve glutatyon kimyasal yapıları 28
Şekil 2. 9	Zeytin karasuyunda bulunan temel fenolik bileşikler 34
Şekil 2. 10	Oleuropein yapısı ve hidroliz ürünleri 35
Şekil 3. 1	DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin yapısı..... 49
Şekil 4. 1	0.05 mg/mL tirozolün kalitatif HPLC analizine ait kromatogram 53
Şekil 4. 2	Oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) kalitatif HPLC analizine ait kromatogram..... 53
Şekil 4. 3	Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış kateşol'e ait olan kalibrasyon grafiği.....54
Şekil 4. 4	Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış 4-metilkateşol'e ait olan kalibrasyon grafiği.....55
Şekil 4. 5	Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış tirozol'e ait olan kalibrasyon grafiği 55
Şekil 4. 6	Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış vanilik asit'e ait olan kalibrasyon eğrisi..... 56
Şekil 4. 7	Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol) eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması 57
Şekil 4. 8	Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına tirozol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması 57
Şekil 4. 9	Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına kateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması 58

Şekil 4. 10	Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına vanilik asit çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması.....	58
Şekil 4. 11	Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına 4-metilkateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması.....	59
Şekil 4. 12	Zeytin karasuyu ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram.....	59
Şekil 4. 13	HPLC analizlerinde çözücü olarak kullanılan metanole ait kromatogram.....	60
Şekil 4. 14	Zeytin karasuyunun indirgeme gücü	63
Şekil 4. 15	Zeytin karasuyunun DPPH radikal giderme aktivitesi	64
Şekil 4. 16	Zeytin karasuyunun ABTS radikal giderme aktivitesi	64
Şekil 4. 17	Zeytin karasuyunun toplam antioksidan aktivitesi.....	65

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Zeytinyağı üretiminde kullanılan proseslerin su kullanım ve atıksu özellikleri 12
Çizelge 2. 2	Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri 13
Çizelge 2. 3	Karasu kirlilik karakteristiklerine ilişkin literatür özet.....14
Çizelge 2. 4	Serbest radikal türleri..... 21
Çizelge 3. 1	Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....37
Çizelge 3. 2	Tahmini azot miktarına göre seçilecek örnek hacmi..... 44
Çizelge 3. 3	HPLC analiz koşulları46
Çizelge 3. 4	HPLC analizlerinde uygulanan gradyan program..... 46
Çizelge 4. 1	Zeytin karasuyunun karakterizasyon sonuçları..... 51
Çizelge 4. 2	Zeytin karasuyu karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması..... 52
Çizelge 4. 3	Zeytin karasuyu ekstraktının kantitatif HPLC analizine ait sonuçlar 60
Çizelge 4. 4	Zeytin karasuyu ekstraktının kantitatif HPLC sonucunun karşılaştırılması 61
Çizelge 4. 5	Kantitatif HPLC analiz yönteminde elde edilen pike ait alanın standart sapma değerinin hesaplanması 62
Çizelge 4. 6	Kantitatif HPLC analiz yönteminde kalma süresine ait standart sapma değerinin hesaplanması 62

**ZEYTİNYAĞI SANAYİ ATIĞI OLAN ZEYTİN KARASUYU ÖZÜTÜNÜN BAZI
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE EKONOMİK KULLANILABİLİRLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Alper BABADOSTU

Kimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ayşegül PEKSEL

Dünya zeytinyağı üretiminde İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi Akdeniz ülkeleri başı çekmektedir. Ancak, üretim prosesi sonrasında açığa çıkan ve yüksek kirletici özelliklerine sahip zeytin karasuyu (atıksu) bu ülkeler için ivedilikle çözülmesi gereken bir sorundur. Karasu, organik madde, katı madde, kimyasal oksijen ihtiyacı, fenolik madde içeriği çok yüksek bir atıktır ve asidik pH' ya sahiptir. Bunun yanında yüksek antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu nedenle karasuyun verimli bir biçimde değerlendirilerek çevreye en az zarar verebilecek hale getirilmesi oldukça önemlidir.

Bu çalışmada öncelikle, Ayvalık yöresinde bulunan zeytinyağı üretim tesisinden alınan zeytin karasuyunun karakteristik özellikleri incelenmiştir. pH, askıda katı madde, yağ ve gres, kimyasal oksijen ihtiyacı, toplam azot içeriği, toplam organik madde ve toplam fenolik bileşik miktarı gibi karakteristikleri belirlenmiştir. KOİ 192 g/L , askıda katı madde miktarı 9,80 g/L , yağ ve gres içeriği 13,09 g/L , pH 4,8 , toplam organik karbon miktarı 94,20 g/L , toplam N miktarı 0,623 g/L ve toplam fenolik bileşik miktarı 800 mg/L olarak bulunmuştur. Bu çalışmada kullanılan zeytinyağı karasuyu diğer çalışmalarda incelenen numuneler gibi yüksek kirlilik derecesine sahiptir.

Karakterizasyondan sonra zeytin karasuyu ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve HPLC ile zeytin karasuyu ekstraktındaki fenolik bileşiklerin ilk önce kalitatif daha sonra kantitatif

analizi yapılmıştır. Analiz sonrasında hidroksitirozol 511,6 mg/L, tirozol 79,8 mg/L, kateşol 17,1 mg/L, vanilik asit 15,4 mg/L ve 4-metilkateşol 11,3 mg/L olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak doğal antioksidan özellik gösteren fenolik bileşikleri yüksek miktarda içerdiği bulunmuştur.

Çalışmanın son aşamasında zeytin karasuyunun antioksidan kapasitesi belirlenmiştir. Bu amaçla zeytin karasuyu örneklerinde indirgeme gücü, toplam antioksidan aktivite tayini, DPPH• radikali tutucu etki ve ABTS•+ radikali tutucu etki gibi antioksidan özellikler incelenmiş ve sonuçlar bazı standart antioksidanlarla (BHT, Troloks, α-tokoferol) karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak zeytin karasuyu, standart antioksidanlar kadar yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Sonuçlar zeytin karasuyunun sahip olduğu antioksidan özelliklerin, içerdiği doğal fenolik bileşiklerden dolayı olduğunu ve bu doğal bileşiklerin izole edildiği takdirde çeşitli alanlarda kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Zeytin karasuyu, antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, zeytin karasuyu karakterizasyonu, HPLC

ABSTRACT

INVESTIGATION OF SOME FEATURES AND ECONOMIC RESEARCH OF USABILITY OF OLIVE MILL WASTEWATER IN OLIVE OIL INDUSTRY

Alper BABADOSTU

Department of Chemistry

MSc. Thesis

Adviser: Assoc.Prof.Dr. Ayşegül PEKSEL

Italy, Spain, Greece, Turkey and many other Mediterranean countries have a strong market place in the world with huge amounts of olive oil production. As a result of the olive oil production in these countries, olive mill wastewaters (OMW) are produced and represent a great environmental problem. OMW wastewaters have an organic matter matrix with a wide spectrum of organics, solid matter, oil and grease, acidity pH. Main characters of olive mill wastewaters can be defined with its high phenolic content, high suspended solids and high COD levels. On the other hand it shows that large antioxidant activity and antimicrobial effect. Therefore olive wastewater has to evaluated for least harm to the environment.

In this study, firstly, characterization of olive mill wastewater is determined which is from olive oil production facility located in the region of Ayvalık. It was found that KOİ 192 g/L, suspended solids content 9,8 g/L, oil and grease 13,09 g/L, pH 4,8, total organic carbon content 94,2 g/L, total N content 0,623 g/L and total fenol content was 800 mg/L . When other studies have investigated,olive mill wastewaters have high pollution as our study.

After characterization of olive mill wastewater, extraction was performed and qualitative and quantitative analysis of the phenolic compounds was carried out in

OMW by HPLC systems. It was found out that hydroxytyrosol 511,6 mg/L, tyrosol 79,8 mg/L, catechol 17,1 mg/L, vanilic acid 15,4 mg/L and 4-methylcatechol 11,3 mg/L. As a result high amounts of phenolic compounds was found to contain which are showing the natural antioxidant properties.

Finally, It was determined that the antioxidant effects of olive mill wastewater known to exhibit high antioxidant capacity. Antioxidative features of OMW samples such as reducing power, total antioxidant activity, DPPH radical, ABTS•+ radical scavenging activities were investigated and results were compared to some standard antioxidants (BHT, Trolox, α -tocopherol). As a result , OMW showed antioxidant activity as high as the standard antioxidants. Therefore these naturel antioxidants can isolated from OMW and can be used in various industries.

Keywords: Olive mill wastewater, phenolic compounds, antioxidant activity, characterization of olive mill wastewater, HPLC

1.1 Literatür Özeti

Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde zeytin ve zeytinyağı üretimi ekonomik anlamda oldukça önemli bir yere sahiptir. Dünya zeytinyağı üretiminin %97'si Akdeniz ülkelerinde gerçekleştirilmektedir. Dünya çapındaki zeytinyağı üretimi yılda yaklaşık 2 milyon ton olarak tahmin edilmekle birlikte, bu üretimin %80-84'ünün Avrupa Birliği tarafından gerçekleştirildiği bildirilmektedir [1]. Zeytinyağının üretimi esnasında çevre üzerinde olumsuz etkiler bırakan zeytin karasuyu oluşmaktadır. Zeytin karasuyunun yüksek derecede organik kirliliği, asidik pH'a sahip olması, yüksek miktarda polifenol içeriği, kötü kokusu ve yüksek derecede katı madde içeriği nedeniyle kirletici olması acilen çözülmesi gereken bir sorundur. Zeytincilik sektörünün çözmesi gereken bir problem haline gelen karasu; doğal suları renklendirme, sucul yaşamı tehdit etme, yüzey ve yer altı suyu kirliliğine neden olma, toprak kalitesini ve bitki büyümesini değiştirme, koku yaratma gibi çeşitli olumsuz etkilere sahiptir [2].

Karasu bilindiği üzere karmaşık bir organik yapıya sahiptir. Bu organik yükü yapısında bulunan polifenoller, pektinler, polialkoller ve lipidler oluşturur. Yapılan çeşitli analizlerde karasuda bulunan başlıca polifenoller; Hidroksitirozol, tirozol, kateşol, kafeik asit, 4-metilkateşol, vanilik asit ve para-kumarik asit olarak saptanmıştır.

Reaktif oksijen birikimi organizmada bulunan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde oksidatif stres oluşmaktadır. Oksidatif stres ile DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olabilen radikal zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Bu hasarlar kanser, koroner kalp rahatsızlığı,

hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein (LDL) oksidasyonu gibi hasarlara sebep olur. Antioksidanlar, serbest radikallerin bu gibi olumsuz etkilerini önemli ölçüde önleyen bileşiklerdir. Antioksidanlar, kendi elektronlarını serbest radikallere aktararak onları nötralize eder ve elektron verdikleri halde kararlı yapılarından dolayı serbest radikallere dönüşmezler [3]. Ancak bu savunma sistemi bütün bu hasarlardan tam olarak korunmak için yeterli gelememekte ve dolayısıyla insan vücudunun bu oksidatif hasardan korunmasında antioksidan alımları yardımcı olabilmektedir. Zeytin karasuyunun fenolik bileşiklerce zengin yapısı ve fenolik bileşiklerin de antioksidan özellik göstermesi bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler arasında hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), antioksidan özelliği nedeni ile dikkat çekici bir bileşiktir [4]. Hidroksitirozol, güçlü antioksidan aktivitesine sahiptir ve insan sağlığı için önem arz eder. *In vitro*'da yapılan çalışmalar sonucunda, hidroksitirozolün düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri bağladığı, trombositlerin bir araya gelmesini inhibe ettiği, insan nötrofilleri için lökotrien ürettiği ve hücre korumasını sağladığı görülmüştür.

Karasuda bulunan fenolik bileşikler, toksik etkiye sahip olmalarına rağmen ayrıştırılması halinde çevre için büyük tehdit oluşturan ve herhangi bir piyasa değeri olmayan zeytin karasuyundan fenolik bileşik eldesine imkân sağlayacak ve ülke ekonomisi açısından oldukça faydalı olacaktır. Bu bileşiklerin kozmetik, kimya ve ilaç sanayinde kullanımları araştırılmaktadır [5].

Bazı fiziksel ve kimyasal işlemlerle zeytin karasuyundaki bu antioksidan maddeler seyreltik çözelti olarak elde edilebilmektedir. Antioksidanlar sıcaklığa oldukça hassas maddelerdir ve geleneksel ayrıştırma yöntemleri ile ayrıştırılması mümkün değildir. Bu maddelerin düşük sıcaklıkta dondurarak kurutularak kristal toz halinde üretilmeleri mümkün olacaktır. Herhangi bir piyasa değeri olmayan ve çevre içinde tehdit oluşturan zeytin karasuyundan antioksidan üretimi ülkemiz ekonomisi açısından faydalı olacaktır. Günümüzde doğal antioksidanlara ilgi giderek artmaktadır [6].

1.2 Amaç

Günümüzde fenolik bileşiklerin üretimi ve doğal antioksidan özellik gösteren moleküllerin eldesi için birçok kaynak kullanılmaktadır. Dünya genelinde fazla miktarda üretimi olan zeytinyağının atık ürünü olan zeytin karasuyu, bertaraf edilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Zeytin karasuyunun içerdiği fenolik bileşikler ile doğal antioksidan kaynağı olarak farklı alanlarda değerlendirmeleri çevresel, sosyal, ekonomik ve sağlık açısından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada Ayvalık yöresinde bulunan zeytinyağı üretim tesisinden alınan zeytin karasuyunun karakteristik özelliklerinin ve kirlilik parametrelerinin belirlenmesi, fenolik bileşik içeriğinin incelenmesi ve antioksidan aktivite yeteneğinin belirlenmesi üzerine yapılan *in vitro* çalışmaları ele alınacaktır.

1.3 Hipotez

Çalışmamızda zeytin karasuyunun pH, askıda katı madde miktarı (AKM), yağ ve gres içeriği, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), toplam organik karbon (TOK), toplam azot miktarı ve toplam fenolik bileşik miktarı ile ilgili karakteristik özellikleri belirlenmiştir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile içerdiği fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizi gerçekleştirildikten sonra zeytin karasuyunun antioksidan aktivite yeteneği incelenmiştir. Antioksidan aktivite ölçümlerinde; indirgeme gücü, toplam antioksidan aktivite tayini, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS radikal giderme aktivitesi gibi yöntemler kullanılmış ve nasıl bir antioksidan aktivite gösterdiği standart antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİ

2.1 Zeytin ve Zeytinyağı

Zeytin (*Olea europaea*), zeytingiller (Oleaceae) familyasından, meyvesi yenen, sıcak iklimi seven, Akdeniz ve Marmara iklimine özgü, en kötü toprak koşullarında bile tabii olarak yetişebilen, doğanın ilk ağacı olarak tanımlanır. Zeytin ağacının etli ve yağlı olan meyvesi, önce yeşil olgunlaştıkça parlak siyah bir renk alır. Bu meyvenin etli kısmından ve çekirdeğinden elde edilen yağ zeytinyağı olarak adlandırılır ve diğer bitkisel yağlara göre önemli üstünlüklere sahiptir.



Şekil 2.1 Zeytin dalı

Zeytinyağı, hiçbir kimyasal işlem görmeden direk olarak zeytinin sıkılması ve hafifliği ile diğer bileşenlerden (karasu ve pirina) ayrılması ile ortaya çıkarılır. Son verilere göre yıllık zeytinyağı üretimi; dünyada 2,88 milyon ton iken ülkemizde 147 bin ton civarındadır [7].

2.1.1 Dünyada Zeytin ve Zeytinyağı Sektörü

2009/2010 sezonunda dünyada üretilen sofralık zeytin miktarı yaklaşık olarak 1.982.500 tondur. Bu üretimde en büyük pay Akdeniz ülkelerininindir. En büyük üretim değeri 678.000 ton ile Avrupa Birliği ülkelerine aittir. Bu ülkeleri, 390.000 ton ile Türkiye, 300.000 ton ile Mısır, 135.000 ton ile Suriye, 100.000 ton ile Fas ve 90.000 ton ile Cezayir izlemektedir. Avrupa birliği içerisinde en büyük üretim değerleri ise; 475.000 ton ile İspanya, 115.000 ton ile Yunanistan ve 67.000 ton ile İtalya'ya aittir [7].

Sofralık zeytin üretimine paralel olarak zeytinyağı üretiminde de Akdeniz ülkeleri başı çekmektedir. En büyük üretim ise yine Avrupa Birliği ülkelerindedir. Birlik ülkelerinde 2009/2010 dönemi verilerine göre yıllık üretim 2,15 milyon ton iken bu değeri; 150.000 ton ile Suriye, 147.000 ton ile Türkiye, 140.000 ton ile Tunus ve 95.000 ton ile Fas izlemektedir. Diğer ülkelerin zeytinyağı üretimleri ise oldukça düşük değerler almaktadır. Avrupa Birliği içerisinde en büyük üretim değerleri ise; 1.200.000 ton ile İspanya, 540.000 ton ile İtalya ve 348.000 ton ile Yunanistan'a aittir [7].

2.1.2 Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağı Sektörü

Zeytincilik Araştırma Enstitüsü verilerine göre; Türkiye’de işlenen tarım alanlarının %2,2’si zeytinliktir ve bu alan toplamı 595.000 ha’dır. Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Bursa, Manisa, Çanakkale, Tekirdağ, Hatay illeri başta olmak üzere toplam 36 ilde zeytin üretimi yapılmaktadır. Üretimde başı çeken iller; Aydın (%24), Balıkesir (%17) ve İzmir(%14) Türkiye’deki toplam üretimin yarısından fazlasını teşkil etmektedir. Türkiye’de üretilen zeytinin %70,6’sı yağlık %29,4’ü ise sofralık amacıyla kullanılmaktadır. Türkiye’de çeşitli ölçeklerde 850 civarında zeytinyağı fabrikası bulunmakta olup yaklaşık 500.000 aile geçimini zeytincilikten sağlamaktadır. Ağaç sayısı 98 milyon adet olup bu sayı giderek artmaktadır [8].

Türkiye sofralık zeytin üretiminde dünyada ikinci, zeytinyağı üretiminde ise dünyada dördüncü ülke konumundadır. 2009/2010 dönemi verilerine göre Türkiye’de yıllık sofralık zeytin ve zeytinyağı üretim değerleri sırasıyla; 390.000 ve 147.000 tondur [7].

Türkiye için zeytin üretiminde en büyük sorunlardan biri periyodisite yani üretimin bir yıl az, bir yıl çok olmasıdır. Bu durum zeytin ağacının doğasından kaynaklanmaktadır.

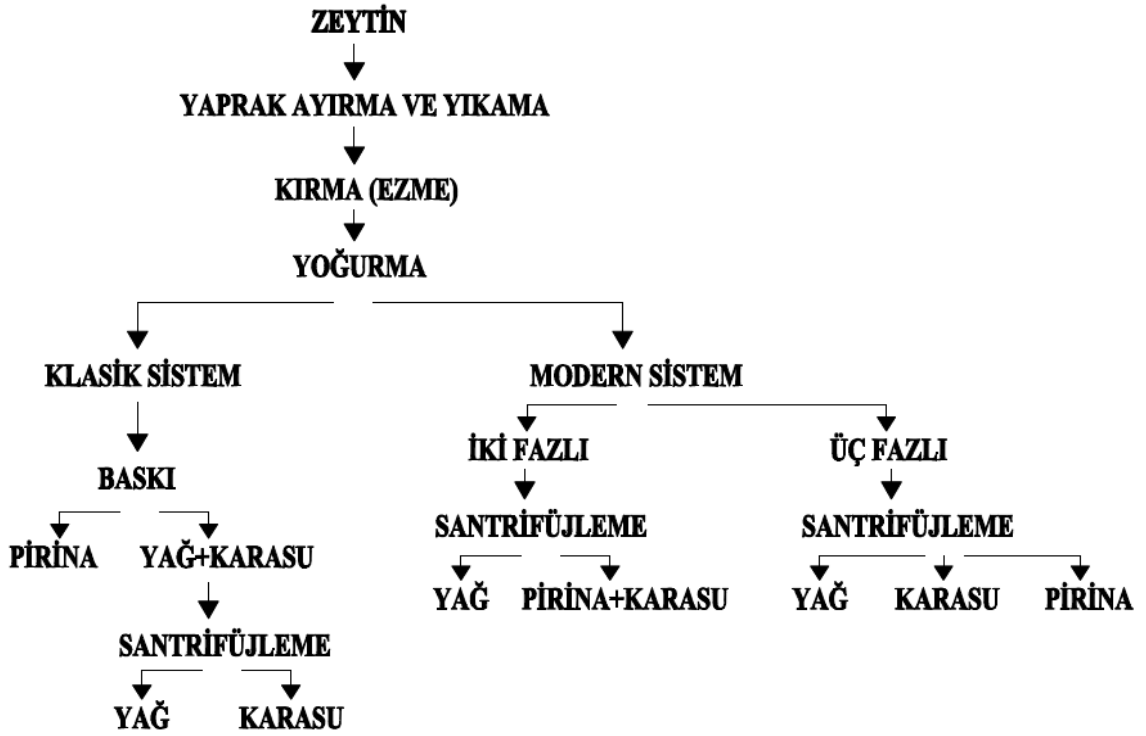
Ancak periyodisitenin etkisi, zeytinciliği gelişmiş ülkelerin çoğunda, gereken bakım işlemlerinin yapılmasıyla çok düşük düzeylere indirilmiştir. Ayrıca ülkemizdeki ağaç verimleri de zeytincilik açısından gelişmiş ülkelere göre düşük kalmaktadır. Türkiye’de ağaç başına üretim 9-10 kg iken, bu değer İspanya’da 25 kg, İtalya’da 30 kg civarındadır 2004/05 sezonu verilerine göre dünyada zeytin ihracatı 449.000 tondur ve giderek artmaktadır. Sofralık zeytin ihracatında en büyük payı %42 ile İspanya almakta, onu %12 ile Türkiye ve Fas, %11 ile Arjantin, %7 ile Suriye ve Yunanistan, %3 ile Peru, %1 ile Mısır ve %5 ile diğer ülkeler izlemektedir. İspanya ürettiği sofralık zeytinin yaklaşık %40’ını, Yunanistan %35’ini, Fas ise %75’ini ihraç edebilirken, Türkiye’de bu oran 2006 rakamlarına göre %15 gibi düşük bir değerdedir.

2.1.3 Zeytinyağı Üretim Prosesleri

Zeytin yağı üretiminde ilk olarak ön işlemler yapılır. Ön işlemler yaprakların uzaklaştırılması takibinde yıkama, zeytinlerin kırılması ve ardından zeytin hamurunun yoğrulması (malaksasyon) işlemlerini içerir [9].

Zeytinyağı üretim prosesleri prosesin işletme şekline göre ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki konvansiyonel olarak bilinen kesikli pres sistemi, diğeri ise modern sistem olarak adlandırılan sürekli (kontinü) sistemlerdir. Ayrıca zeytinyağı üretim prosesleri çıkan ürünlerin çeşitliliğine göre de ikiye ayrılırlar. Proses sonucunda zeytinyağı, karasu ve prina üretilen sistemler 3 fazlı üretim prosesleri, proses sonrasında zeytinyağı ve pirina karasu karışımı elde edilen proseslere de iki fazlı üretim prosesleri denmektedir. Tüm bu ayrımlara göre zeytinyağı üretim proses tipleri şekil 2.2’de gösterilmiştir.

Geleneksel kesikli tip proseslerde zeytin ön işlemler ile kıvamlandırılıp bir süre pres işlemine tabi tutulmaktadır. Bu sürede posa kısmından sızan yağ ve karasu katı fazdan ayrılmaktadır. Oluşan sıvı fazdaki karasu ve yağ santrifüj proseslerine verilerek karasu ve yağın birbirinden ayrılması sağlanmaktadır [10].



Şekil 2.2 Zeytinyağı üretim prosesleri akım şeması

Bu tip prosesler artan üretim kapasitelerine cevap veremediklerinden yerlerini sürekli üretim proseslerine devretmektedir.

Sürekli üretim prosesleri ise santrifüj prosesine dayanmaktadır. Bu proste sürekli olarak bir hammadde girdisi ve sürekli olarak bir zeytinyağı üretimi söz konusudur. Bu proste zeytin kırıldıktan ve ezildikten sonra faz ayrımının olabilmesi için oluşan hamura yüksek miktarda su verilmektedir. Oluşan bu karışım santrifüj dekantörler yardımıyla çeşitli fazlara ayrılmaktadır. Eğer proses olarak iki fazlı üretim prosesi seçilmiş ise santrifüj dekantör sonrasında zeytinyağı ve karasu pirina karışımı ayrı ayrı 2 faz olarak elde edilirken, üç fazlı üretim prosesi seçildiyse zeytinyağı, karasu ve pirina ayrı ayrı 3 faz olarak alınmaktadır. Ayrıca elde edilen zeytinyağı fazı bir dekantöre daha verilerek karasuyun tamamen ayrılması sağlanmaktadır [10].

2.1.3.1 Klasik Sistemler

Ön işlemlerden geçip yeterli kıvama gelen hamura pres yardımıyla baskı uygulanarak sıvı fazı oluşturan yağ ve karasuyun birbirinden ayrılması esasına dayanır [9]. Şekil 2.3’de gösterilen hidrolik presler kullanılarak çıkartılır.



Şekil 2.3 Pres sistemi

Bu üretim sistemi besleme, hammadde depolama, temizleme, kabuk kırma ve ezme, kurutma-kavurma, sıkma, filtrasyon/dekantasyon ünitelerinden oluşmaktadır. Oluşturulan hamurun birleşimi %20 yağ, %25 katı madde, %55 zeytin öz suyu biçimindedir [11]. Presleme prosesinde zeytinler su ile yıkanır ve su ilavesi ile yoğrulur, bu sebeple üretim sonrasında açığa çıkan karasu miktarı artar. Elde edilen hamur daha sonra preslenerek, yağ ve vejetasyon suyu (karasu) ayrılır, katı faz ise bir yan ürün olan prina olarak elde edilir [12].

Pres yönteminin bazı olumlu ve olumsuz yönleri mevcuttur. Olumlu yönler arasında; yatırım maliyetinin düşük, pres parçalarının basit ve sağlam olması, enerji üretiminin ve prinanın nem içeriğinin düşük olması sayılabilir. Bunun yanı sıra üretim sonrasında oluşan karasuyun çok az miktarda olması ve yağ içeriğinin düşük olması bu prosesin en önemli avantajlarından.

Olumsuz yönleri arasında ise; ekipmanın hantal olması, iş gücü gereksiniminin fazla olması sayılabilir. Oluşan karasuyun az miktarda olmasına karşın kirlilik değerlerinin daha yüksek olması ve kullanılan disklerin temizlik ve bakımının zor olması ve kolay kontamine olabilmeleri bu sistemin sakıncalarındandır. Sistemin kesikli olması da başlıca bir dezavantajdır [9].

2.1.3.2 Modern Sistemler

Zeytin hamurundaki sıvı fazın (yağ ve karasu) katı fazdan yüksek hızda dönen santrifüjler (dekantörler) yardımıyla ayrılması esasına dayanır. Bu üretim sistemi, besleme, yıkama, kırma ve hamur hazırlama ünitelerinden oluşmaktadır. Sürekli sistemlerde presin yerini santrifüj (dekantör) almıştır. Kullanılan dekantörlere örnek Şekil 2.4' te verilmiştir. Kullanılan dekantöre bağlı olarak iki farklı proses mevcuttur.

Üç fazlı Üretim Sistemi: Proses suyu gerektiren üretim sonrasında üç faz (yağ, prina ve karasu) oluşturan üç fazlı sistemdir. Önemli miktarda proses suyu eklenir. Bu sebeple klasik sisteminin 3 katı fazla hacimde karasu oluşmaktadır [13].

İki Fazlı Üretim Sistemi: Proses suyu kullanımına gerek olmayan ve üretim sonrasında sadece iki faz oluşumuna müsaade eden (yağ ve prina) iki fazlı üretim sistemidir. Üretim boyunca proses suyu eklenmez. Yağ ve prina oluşur. Ekolojik olarak cazip bir sistemdir. Bunun sebebi sıvı faz yani karasu, üretim sonucunda oluşmamaktadır. Karasuyun büyük bölümü pirina ile birlikte açığa çıkmaktadır ve oluşan katı faz %50–60 su, %2–3 oranında yağ içermektedir [13].



Şekil 2.4 Sürekli sistemde örnek düzenek

Sürekli sistemin önemli avantajları vardır. Bunlar sırasıyla:

Otomasyona uygun bir sistem olması, sürekli ya da yarı sürekli olması ve iş gücü gereksiniminin düşük olmasıdır. Bunların yanında aynı günde üretimi gerçekleştirme imkanı, daha fazla üretim olanağı, daha iyi kalite kontrolü, daha az oda ve yer

gereksinimi, geliştirilmiş proses kontrolü ve otomasyonu avantajlar olarak sıralanabilir [14].

Sürekli sistemin dezavantajları ise; yatırım maliyeti ve enerji tüketimi yüksektir. Pirina yüksek oranda su içerir. Oluşan büyük miktardaki sıvı faz bir miktar yağ kaybına neden olur [9].

2.2 Karasuyun Yapısı, Oluşumu ve Fiziksel, Kimyasal Özellikleri

2.2.1 Zeytin Karasuyu

Zeytin meyvesi birleşiminde yüksek konsantrasyonlarda hidrofilik ve lipofilik fenolik bileşikler içerir. Bu maddeler katı ağırlığın %1-3'ü kadardır [15]. Başlıca lipofilik fenoller “krezol” olarak tanımlanırlar. Hidrofilik fenoller ise fenolik asitler, fenolik alkoller, tat vericilerdir. Oleuropein, dimetiloleupein, elenolik asit, hidrokситirozol zeytinde bulunduğu bilinen önemli fenollerdir [15], [16], [17].

Kesikli sistemlerde oluşan karasu miktarı 1 ton sıkılan zeytin başına yaklaşık 0,5 – 0,8 m³'dür. Sürekli sistemlerde ise uygulanan yöntemin 2 fazlı veya 3 fazlı olmasına bağlı olarak atık su miktarı farklılık göstermektedir. 2 fazlı sürekli sistemlerde proses suyu kullanılmadığından sistemde oluşan karasu prina içinde kalmakta ve atık olarak karasu oluşmamaktadır. 3 fazlı sistemlerde ise 1 ton sıkılan zeytin başına yaklaşık 1,2-1,7 m³ karasu üretilmektedir. Türkiye'deki üretim prosesleri dikkate alındığında 3 fazlı sürekli sistem uygulamasının yaklaşık %80 oranında olduğu, üretilen 170.000 ton zeytinyağına karşılık yaklaşık 950.000 ton zeytin gerektiği ve bu çerçevede yılda yaklaşık 1.000.000 m³ karasu oluşacağı beklenmektedir.

Karasu, zeytinyağı işleminde oluşan; tamamı organik, koyu kahverenkli ve mineral maddeler bakımından zengin, asidik nitelikte, sıvı atıktır.



Şekil 2.5 Zeytin karasuyu

Karasuyun yapısı kantitatif ve kalitatif olarak aşağıdaki etkenler uyarınca farklılık gösterir:

- Zeytinin çeşitliliği
- Zeytinlerin olgunluğu
- Zeytinlerin su içeriği
- Toprağın işlenmesi
- Hasat zamanı
- Pestisitlerin ve gübrelerin çeşitliliği
- İklimsel koşullar

Bu arada zeytinyağının üretimi sırasında çok su kullanımı ise karasuyun seyrelmesine yol açarak yapısını yine önemli ölçüde değiştirir. Karasuyun arıtıma gönderilmeden önce depolanması ise karasuyun yapısında önemli ölçüde farklar yaratır. Depolama sonrasında, karasuyun asitliliği, çökme özellikleri, organik yükü ve askıda katı madde miktarı gibi kimyasal özellikleri önemli farklılıklar göstermektedir.

Ayrıca karasu aşağıdaki ayırt edici fiziksel ve kimyasal özellikleriyle hemen göze çarpmaktadır [18], [19];

- Yoğun koyu kahve- siyah rengi
- Kuvvetli spesifik (ağır) zeytinyağı kokusu

- Yüksek miktarda organik kirletici bulundurması (318 g/L KOİ kadar)
- Asidik pH'lar (3-5,5 arası)
- Yüksek elektrik iletkenliği
- Yüksek fenolik bileşik içeriği
- Yüksek katı madde içeriği

Zeytin karasuyunun toprağa doğrudan verilmesi, toprağın gözeneklilik ve pH gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerini etkiler. Ancak, karasuyun sulamada doğrudan kullanımındaki temel zorluk, fitotoksik etki gösteren ve bitki tohum gelişimini inhibe edebilen fenolik bileşenlerin yüksek derişimidir. Karasuyun koyu renkli fenollerinin yüksek derişimi, karasuların da rengini bozar; ayrıca, yüksek indirgen şeker derişimi mikroorganizmaların solunumunu stimüle eder ki bu da suda çözünmüş oksijen derişimini azaltarak canlıların yaşamını etkiler [20].

2.2.2 Zeytin Karasuyunun Bileşimi

Karasuyun bileşimi genel olarak % 83-96 su, % 3,5-15 organik maddeler, % 0,2-2,0 mineral tuzlardan oluşmaktadır. Ayrıca zeytin bitkisi özsuğu, değerli iz elementleri ve potasyum, fosfor vb. organik bileşenleri ve pektinler, şeker, fenolik bileşikler ve bitkisel yağları da yüksek miktarda içermektedir. Bu tür atıksular, içerdığı aromatik bileşikler, basit ve kompleks şekerlerden dolayı, yüksek enerji potansiyeline sahiptir. Zeytinyağlarından sızan ve elde edilen yağ içinden suyla yıkanarak alınan, organik maddece zengin karasuyun bileşimi: uygulanan teknolojiye, üretim türüne bağılı olarak farklılıklar göstermektedir. Aşağıda verilen Çizelge 2.1'de zeytinyağı üretiminde kullanılan farklı proseslerin su kullanımları ve atıksu özellikleri verilmiştir [21].

Çizelge 2.1 Zeytinyağı üretiminde kullanılan proseslerin su kullanım ve atıksu özellikleri [21].

Proses Tipi	Proses Suyu (L)	Atıksu Karakteristikleri	
		Hacim (L)	KOİ (g/kg)
Kesikli (Pres)	0-40	40-50	90-130
Sürekli (3-faz)	50-70	90-110	60-90
Sürekli (2-faz)	0	5-10	10-15

Zeytinyağı endüstrisi atıksularının yapısında bulunan organik maddeler, polifenoller, karbohidratlar, polisakkaritler, şeker, azot bileşikler, polialkoller, yağ ve gres, bu suyun önemli kirletici özellikleri arasında yer almaktadır.

Karasuyun, yüksek biyokimyasal oksijen ihtiyacı (BOİ = 50-100 g/L), kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ = 80-220 g/L) ve toplam organik karbon (TOK = 10-110 g/L), içeriği nedeniyle, arıtımı önem taşımaktadır. Zeytinyağı karasularının yapılarında bulunan tanninler, polifenoller ve polialkoller, antimikrobiyal aktiviteye ve bu nedenle de yüksek toksisiteye sahiptirler [22].

Üretim bazında çıkan karasu karakteri incelendiğinde kesikli üretim sistemlerinde daha az karasu oluşmaktadır. Ayrıca kirletici yükünün organik madde bazında 90.000 – 130.000 mg/L KOİ, 3 fazlı sürekli sistemlerde 40.000 - 220.000 mg/L KOİ ve 2 fazlı sistemlerde ise 10.000 – 15.000 mg/L KOİ arasında değiştiği görülmektedir. Bu atıksuların askıda katı madde miktarının kesikli sistemlerde ortalama olarak 4.500 mg/L, 3 fazlı sürekli sistemlerde ise 2.500 mg/L olduğu belirtilmektedir [11].

Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri [11]

Parametre	Klasik Yöntemde Atılan Karasu	Sürekli Yöntemde Atılan Karasu
pH	4,5-5	4,7-5,2
Toplam Katı Madde	%12	%3
Toplam Uçucu Katı Madde	%10,5	%2,6
Toplam Mineral Katı Madde	%1,5	%0,4
Askıda Katı Madde	%0,1	%0,9
Kimyasal Oksijen İhtiyacı (g/L)	120-200	44

Çizelge 2.2 Klasik ve sürekli yöntemle zeytinyağı üretimi yapan tesislerden çıkan karasuların bileşimleri (devamı)

Parametre	Klasik Yöntemde Atılan Karasu	Sürekli Yöntemde Atılan Karasu
Biyokimyasal Oksijen İhtiyacı (g/L)	90-140	33
Şeker	%2-8	%1
Toplam Azot	%5-2	%0,28
Organik Asitler	%0,5-1	-
Polialkoller	%1-1,5	%1
Pektin, Tanin vb.	%1	%0,37
Polifenoller	%1-2,4	%0,5
Yağ ve Gres	%0,03-10	%0,5-2,3

Ayrıca karasu kirlilik karakteristikleri ile ilgili yapılan çalışmalar Çizelge 2.3’de verilmiş, buna göre çeşitli üretim proseslerinden oluşan atıkların standart olmayıp farklılık gösterdikleri görülmüştür.

Çizelge 2.3 Karasu kirlilik karakteristiklerine ilişkin literatür özet

Parametre	[23] (1974)	[24] (1981)	[25] (1992)	[26] (1993)	[27] (1998)	[28] (2006)	[29] (2009)
pH	-	4,7	5,3	3-5,9	5,1	-	4,9
KOİ (g/L)	195	-	109	40-220	122	262-301	151,4
BOİ (g/L)	38	-	41	23-100			42,0

Çizelge 2.3 Karasu kirlilik karakteristiklerine ilişkin literatür özet (devamı)

Parametre	[23] (1974)	[24] (1981)	[25] (1992)	[26] (1993)	[27] (1998)	[28] (2006)	[29] (2009)
TKM (g/L)	-	1-3	19	1-20	102	128	66,0
TOK (g/L)	-	-	16.7		81		-
Yağ ve Gres (g/L)	-	-	2.33	1-23	9.8	3.5	15,4
Uçucu Organik Asitler (g/L)	-	5-10	0.78	10	0.96	0.95	-
Toplam Azot (g/L)	0.81	0.3	0.6	1.2	0.95	0.5	-

Bitkisel ürünler kapsamında zeytin yaprağı ve karasuyunun antioksidan etkilerini araştıran çok sayıda *in vitro* çalışma yapılmıştır. Bouaziz ve ark. [30] tarafından Tunus bölgesinde yetişen zeytin türlerinde bulunan saf flavonoidler ve düşük molekül ağırlıklı fenoller serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından kendi aralarında ve bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, BHT'e göre en yüksek antioksidan aktiviteyi hidroksitirozol'un daha sonra kafeik asitin ve kuarsetinin gösterdiği bildirilmiştir.

Bir başka çalışmada [31], hidroksitirozol'un ve oleuropein'in oksidasyona karşı BHT ve vitamin E'den çok daha etkili olduğu saptanmıştır.

Bir grup araştırmacı tarafından da [32], hidroksitirozol ve kafeik asitin -*orto* grubunda iki hidroksil grubunun bulunması yüksek antioksidan aktivite göstermelerine, tirozol, *p*-kumarik asit ve *p*-hidroksifenilasetikasidin ise tek hidroksil grubu içermeleri ise düşük

antioksidan aktivite göstermelerine neden olduğu şeklinde bir açıklama yapılmıştır. Zeytin karasuyu ile yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak ana etken maddesi hidroksitirosol üzerinde durulmakla birlikte Cardinali ve ark. [33], tarafından zeytin karasuyunun antioksidan etkiye sahip bir diğer önemli bileşeninin verbaskosid olduğu bildirilmektedir. Obied ve ark. [34], tarafından da hidroksitirosol asilohidroelenolat ve p-kumarol-6'-sekologanosid (komselogosid) olmak üzere iki yeni biofenolik bileşik tanımlanmış ve bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin hidroksitirosol ve oleuropeine göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur.

Azbar vd. [35], zeytin karasularının anaerobik arıtımından önce ön arıtma olarak çeşitli koagülantlar kullanarak kimyasal çöktürme prosesini denemişlerdir. Koagülant olarak Al_2SO_4 , $FeSO_4$ ve $FeCl_3$ kullanılmıştır. Her bir koagülant için 3 farklı dozaj değeri uygulanmış ve optimum dozaj değerleri belirlenmiştir. Kimyasal çöktürme uygulamalarından önce karasu numunesi asitle parçalama işlemine tabi tutulmuştur. Asitle parçalama işlemiyle birlikte KOİ ve fenol konsantrasyonları sırasıyla %15,0 ve %4,3'lük giderim verimleri ile 83,2 g/L ve 3,9 g/L değerlerine inmiştir. Çalışma sonunda en yüksek KOİ giderim verimi 6 g/L Al_2SO_4 dozajıyla %47 olarak, en yüksek fenol giderimi ise 6 g/L $FeSO_4$ dozajıyla %53 olarak elde edilmiştir.

Hanafi vd. [36], tarafından yapılan çalışmada zeytin karasularının elektrokoagülasyon ile arıtımında KOİ, polifenol ve renk giderim verimleri ile arıtma maliyetleri araştırılmıştır. Bunun için kullanılan karasu örneği ham karasu numunesinin 5 kat seyreltilmesi ve filtrelenmesi ile elde edilmiştir. Çalışılan karasu numunesinin KOİ konsantrasyonu 20 g/L, polifenol konsantrasyonu 0,26 g/L ve iletkenlik değeri 3,6 mS/cm'dir. Yapılan çalışmada elektrokoagülasyon süresi, akım yoğunluğu ve eklenen elektrolit çözeltisinin optimum değerleri araştırılmıştır. Buna göre en iyi sonuçların, karasuya 2 g/L NaCl çözeltisi eklenen numunede, elektrokoagülasyon süresi olarak 15 dakikada ve akım yoğunluğu olarak 25 mA/cm² değerinde elde edildiği tespit edilmiştir. Bu optimum sürelerde elde edilen KOİ, polifenol ve renk giderim verimleri %70'in üzerinde gerçekleşmiştir. Giderilen KOİ'nin kg'ı başına harcanan enerji değeri 2,63 kWh olarak bulunurken, harcanan alüminyum elektrot miktarı 85 g olarak gerçekleşmiştir. Elektrokoagülasyon işleminin maliyeti ise giderilen KOİ'nin kg'ı başına 0,27 Avro olarak tespit edilmiştir.

2.3 Serbest Radikaller

Serbest radikaller dış yörüngelerinde bir veya birden fazla çiftleşmemiş elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Bu yapıdaki maddeler çiftleşmemiş elektronlarından dolayı oldukça reaktif ve zararlıdır. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon), veya elektriksel olarak nötral olabilirler [37], [38].

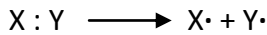
Biyolojik sistemlerdeki serbest radikallerin en önemlisi, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve geçiş metalleri iyonları anahtar roldedir [39].

2.3.1 Serbest Radikallerin Oluşumu

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hücresel koşullarda da ciddi bir miktar ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın, radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar [40].

- Kovalent bağların homolitik kırılması ile;

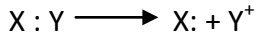
Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500-600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.



-Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile;

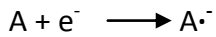
Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücresel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon (GSH)

radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali (GS) oluşur. İki tiyil radikalının birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur.



- Normal bir moleküle elektron transferi ile;

Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur. Bu mekanizma ile radikal yapımı biyolojik sistemlerde yaygın olarak gerçekleştiğinden canlılar için önemlidir [40].



2.3.2 Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal kaynakları endojen ve eksojen olmak üzere iki genel başlık altında sınıflandırılabilir.

2.3.2.1 Endojen Kaynaklar

- Mitokondriyal ve mikrozomal e^- transport zinciri;

Hücrelerdeki en büyük serbest radikal kaynağı, elektron transport zincirinden elektron sızıntısıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi de artar. Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda serbest radikal üretimi ise membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır. Membrana bağlı sitokrom P-450 ve b5, doymamış yağ asitleri ve ksenobiyotikleri redükte ederken dioksijen ve diğer substratları okside eder [39].

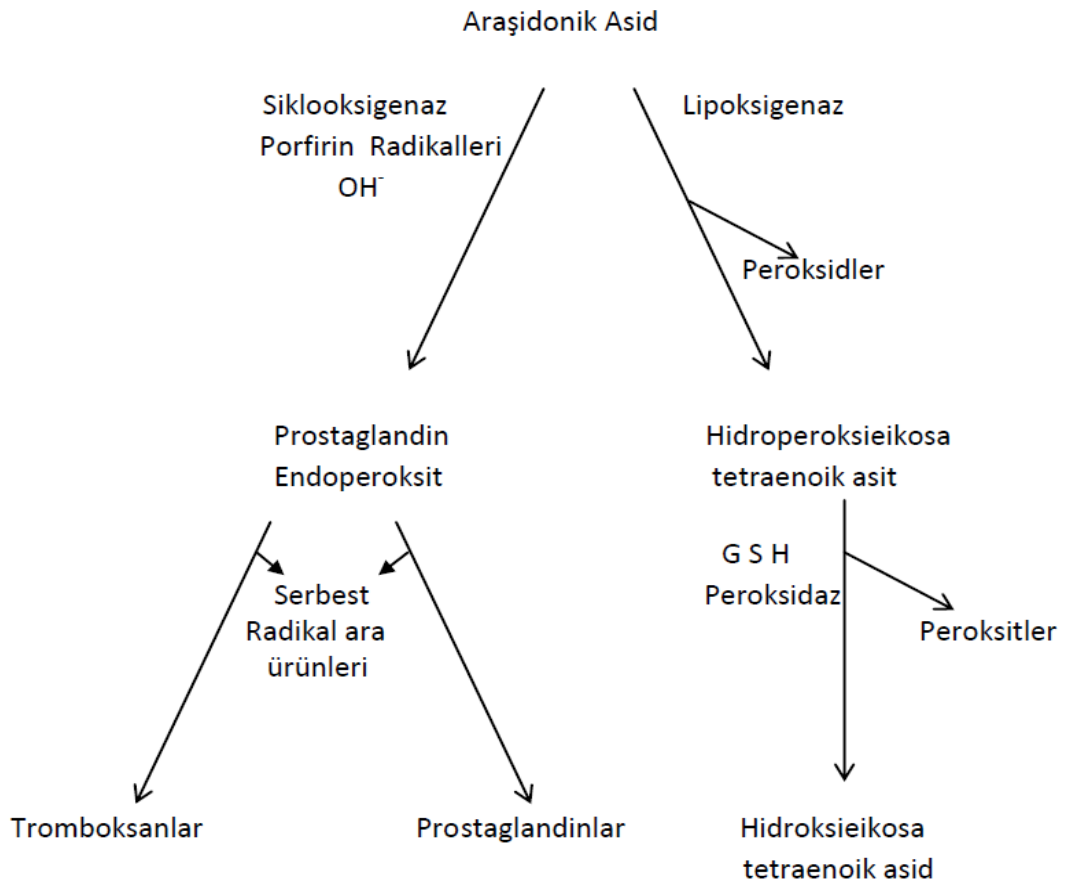
- Peroksizomlar, oksidan enzimler ve proteinler;

Peroksizomlar, güçlü hücresel hidrojen peroksit kaynağıdır. Bu yapıların içeriğinde çokca bulunan, D-amino asit oksidaz, urat oksidaz, L-alfa-hidroksi asit oksidaz ve yağ

asidi açıl KoA oksidaz gibi oksidazlar hidrojen peroksit açığa çıkarıcı özelliğe sahiptirler. Çoğu enzimin katalitik siklusları esnasında serbest radikaller oluşur. Ksantin oksidaz da bu enzimlerden biri olup normalde dehidrogenaz olarak etki eder ve herhangi bir serbest radikalin oluşumuna sebep olmaz. Ancak *in vivo* olarak oluşturulan iskemi, bu enzimin dehidrogenaz formundan oksidaz formuna dönüşmesine ve süperoksit radikali oluşmasına neden olur. Aldehid oksidaz, dihidrooratat dehidrogenaz, flavoprotein dehidrogenaz, amino asit oksidaz ve triptofan dioksigenaz gibi enzimlerde benzer şekilde radikal oluşmasına sebep olurlar [39].

- Araşidonik asit döngüsünün aktivasyonu;

Araşidonik asit metabolizması reaktif oksijen türlerinin önemli bir kaynağıdır. Fagositik hücrelerin uyarılması fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna ve plazma membranında araşidonik asidin salınımına yol açar. Araşidonik asidin enzimatik oksidasyonu da çeşitli serbest radikal ara ürünleri meydana gelir [39].



Şekil 2.6 Araşidonik asit metabolizması sırasında serbest radikallerin sentezi [39]

- Oksidatif stress yapıcı durumlar;

İskemi, bir organa gelen kan akımının, özellikle cerrahi işlemler ve organ transplantasyonu gibi çeşitli nedenlerle yetersiz hale gelmesi veya durmasıdır. İskemi sonucunda doku hipokside kalır ve hipoksik doku hasarı ortaya çıkar. İskeminin uzun sürmesi sonucunda hücrelerin bütünlüğü kaybolur, hatta hücrelölüm meydana gelir. İskemili bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda (reperfüzyon), özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleo lökosit tarafından salınan serbest oksijen radikalleri, dokudaki yıkımı arttırıcı etki yaparlar [41].

-Fagositik hücreler;

Fagositik hücreler, enfeksiyona karşı vücudun hücrel cevapını başlatan hücrelerdir. Bu hücreler: nötrofiller, monositler ve makrofajlar, eozinofiller, lenfositler, endotenyal hücrelerdir. Fagosit hücreler, fagositoz sırasında bakterileri öldürmek için hidrojen peroksid veya hipokloröz asid meydana getirirler. Bu işlemleri önemli iki tür mekanizma ile gerçekleştirirler [42]:

- Miyeloperoksidaz sistemi
- NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz sistemi
- Plazma Membranı;

Plazma membranında bulunan lipoksigenaz, prostaglandin sentetaz, fagositlerde bulunan NADPH oksidaz, lipid peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin kaynaklarıdır. Fagositoz esnasında, oksijen kullanımı arttığından oksijenden süperoksid dolayısıyla hidrojen peroksid açığa çıkışı da artar. Bu nedenle fagositik hücrelerin plazma membranları NADPH oksidazın aracılık ettiği serbest radikal üretiminde önemli bir kaynaktır [42].

2.3.2.2 Eksojen Kaynaklar

Serbest radikallerin meydana gelmesinde zararlı güneş ışınlarının (UV), X ışınlarının, sigarada bulunan zararlı maddelerin, alkollerin, yağların oluşumu ve yıkımı olaylarının, sanayi atıklarının, yükseltgeme eğilimi büyük olan metallerin, araçların egzozundan

çıkan dumanların, ozonun (O₃), kirli havanın ve pis suyun etkili olabileceği bilinmektedir [43].

2.3.3 Serbest Radikal Türleri

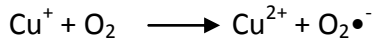
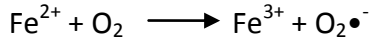
Çizelge 2.4 Serbest radikal türleri

Oksijen Merkezli Serbest Radikaller	Karbon Merkezli Serbest Radikaller
Süperoksit radikali (O₂[•]) Hidroksi radikali (HO[•]) Singlet oksijen (O₂) Peroksinitrit radikali (ONOO[•]) Alkolsil radikali Peroksil radikali	Lipid radikali (L[•]) Lipidperoksit radikali (LOO[•]) Karboksil radikali (LCOO[•]) Trikloro metil radikali ([•]CCl)
Azot Merkezli Serbest Radikaller	Demir Merkezli Serbest Radikal
Nitrik oksit (NO) Azot dioksit (NO₂)	Perferril radikali
Hidrojen Merkezli Serbest Radikal	Kükürt Merkezli Serbest Radikal
Hidrojen atomu (H)	Tiyil radikali (RS[•])
	Radikal olmayan Toksik Metabolitler
	Hidrojen peroksit (H₂O₂) Ozan (O₃) Lipid hidroperoksit (LOOH)

2.3.3.1 Süperoksit Radikali

Süperoksit radikali canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olup genel olarak 4 mekanizma ile üretilir [40].

1. İndirgeyici özellikteki biyomoleküller oksijene tek elektron verip kendileri oksitlenirken süperoksit radikali oluşur. Hidrokinonlar, flavinler, tiyoller, katekolaminler, ferrodoksinler, indirgenmiş nükleotidler gibi yüzlerce biyolojik molekül aerobik ortamda oksitlenirken süperoksit yapımına neden olurlar.



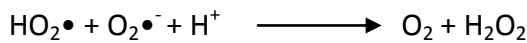
2. Başda çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere, yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında süperoksit radikali bir ürün olarak oluşabilir.

3. Mitokondrideki enerji metabolizması sırasında oksijen kullanılırken, tüketilen oksijenin %1-5 kadarı süperoksit yapımı ile sonlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni NADH dehidrogenaz ve koenzim Q gibi elektron taşıyıcılardan oksijene elektron kaçağının olmasıdır.

4. Aktive edilen fagositik lökositler bol miktarda süperoksit üreterek fagozom içine ve bulundukları ortama verirler. Antibakteriyel etki için gerekli olan bu radikal yapımı, daha reaktif türlerin oluşumunu da başlatır.

Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali ($\text{HO}\bullet_2$) oluşturmak üzere protonlanır [38].

Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir [38].



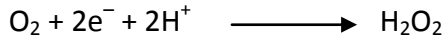
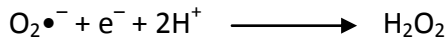
Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) tarafından katalizlenir [40].

Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit,

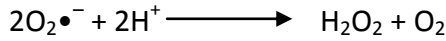
nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit ($\text{NO}_2^\bullet$), hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin ($\text{NO}^\bullet$) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur [38].

2.3.3.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

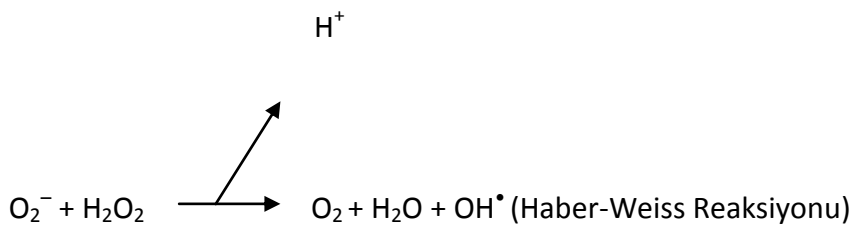
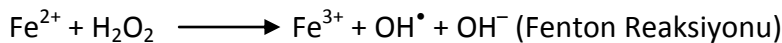
Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir [38].



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($\text{O}_2^{\bullet-}$) dismutasyonu ile olur [2].

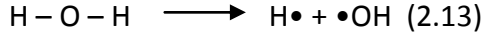


Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\bullet-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) oluşturur [38].



2.3.3.3 Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. Bir de suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.



Hidroksil radikali oldukça reaktif bir oksidan radikaldır ve yarılanma ömrü çok kısadır. Tioller ve yağ asitleri gibi moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($\text{RS}\bullet$) ve farklı yeni radikallerin oluşumunu sağlarlar [39].

Hidroksil radikali, şekerler, aminoasitler, fosfolipitler, DNA bazı ve organik asitlerde yaşayan neredeyse tüm molekül türleriyle yüksek oranda tepkimeye girerler. Örneğin metil alkol ile [37];



2.3.3.4 Singlet Oksijen

Singlet Oksijen (O_2), ortaklanmamış elektrona sahip olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Bu molekül serbest radikal reaksiyonları sonucu oluşabildiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da neden olabilir. Singlet oksijen, oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesi sonucu meydana gelir [39].

2.3.3.5 Nitrik Oksit Radikali

NO , endotel hücreler, vasküler düz kas hücreleri, nöronlar, trombosit, markofaj ve nötrofil gibi çok farklı memeli hücre tiplerinde sentezlenir. NO veya bazı ilgili reaktif nitrojen türleri, trombosit agregasyonunu önlemek için bir nörotransmitter gibi hareket eder. Ayrıca bunlar, tümör hücreleri, parazit ve bakterilere karşı bağışıklık sisteminin savunma molekülleridir. Ancak fazla miktarda NO , peroksinitrit ve diğer reaktif nitrojen türlerinin, potansiyel sitotoksik ve hücreyi çevreleyen hasarlara yol açma kabiliyetlerinin olduğu kabul edilmektedir.

Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit ($\text{O}_2\bullet^-$) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar.



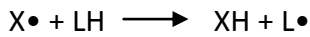
Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ($\text{NO}_2\bullet$), hidroksil radikali ($\text{OH}\bullet$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür [38].

2.3.4 Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Radikallerin bu etkilerini aşağıdaki başlıklarda incelenebilir.

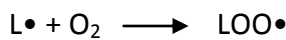
2.3.4.1 Serbest Radikallerin Membran Lipidlerine Etkileri

Biyomoleküllerin hepsi serbest radikaller tarafından etkilenir ama lipidler en hassas olanıdır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan serbest oksijen radikalın etkisiyle membran yapısında bulunan doymamış yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılmasıyla başlar. Böylece yağ asidi zinciri lipid radikali özelliği kazanmış olur. Oluşan lipid radikali dayanıksızdır ve bir dizi değişikliğe uğrar.

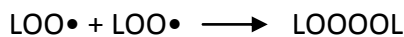


Moleküldeki çift bağların pozisyonlarının değişmesiyle dien konjugatları oluşur ve sonra lipid radikalının oksijen ile birleşmesiyle de lipid peroksid radikali ($\text{LOO}\bullet$) oluşur.

Lipid peroksil radikalleri membran yapısında bulunan diğer doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerin oluşumuna sebep olurlar. Kendileride açığa çıkan hidrojen atomlarını alıp lipid hidroperoksitlerine dönüşürler.



Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları iki lipid peroksid radikali etkileşinceye kadar devam eder ve siklik peroksid (LOOL) oluşumu ile sonlanır [44].

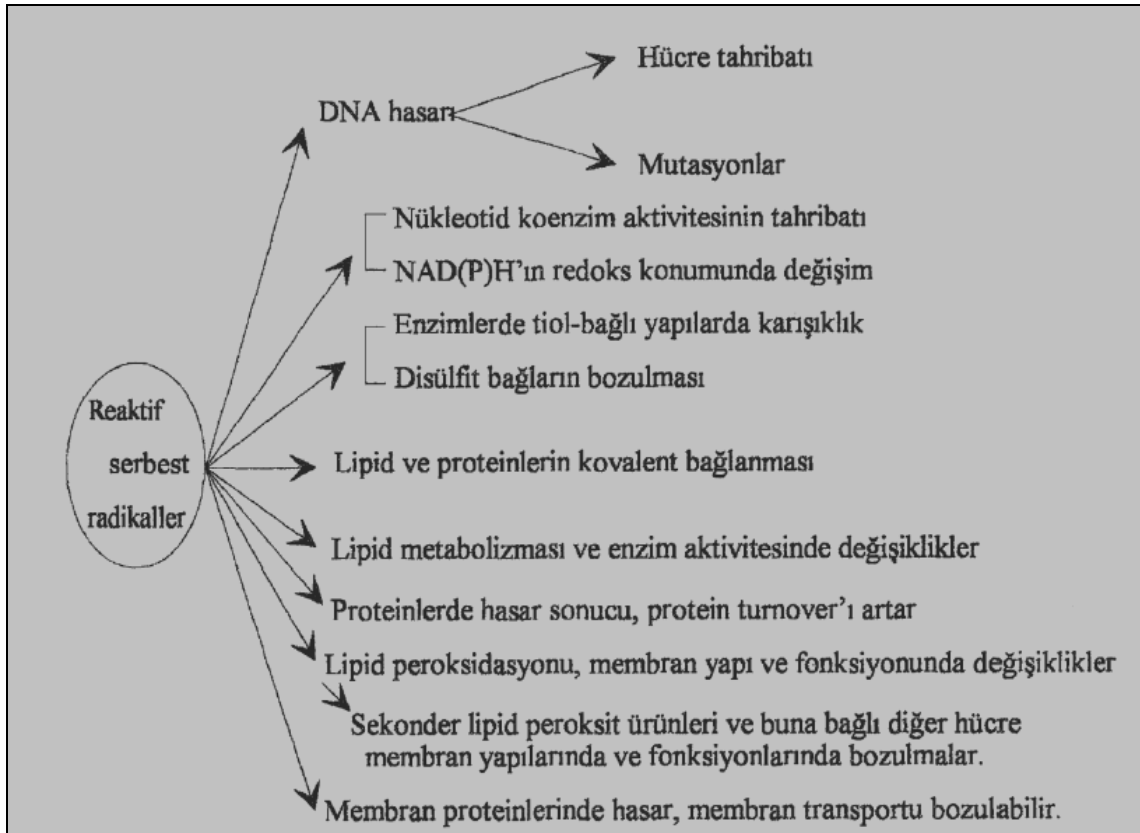


2.3.4.2 Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolayca etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu immünglobülin G ve albümin gibi fazla sayıda disülfüd bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Böylece normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. “Hem” proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler [39].

2.3.4.3 Serbest Radikallerin Metabolizmadaki Olumsuz Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin artması sonucu sağlıklı hücrelerde apoptoz, hücresel işlevlerde bozukluklar ve inflamasyon meydana gelebilir. Bu olumsuz durumlar ateroskleroz, Alzheimer, Parkinson gibi dejeneratif hastalıklara sebebiyet verir [45].



Şekil 2.7 Canlı organizmada serbest radikal ile hasar oluşabilecek durumlar [46]

DNA (deoksiribonükleik asit)' nın tüm yapısal elemanları oksidatif hasara karşı hassastırlar . DNA'nın reaktif oksijen radikalleri tarafından oksidasyona uğratılması DNA zincirinde kırılmalara ve DNA tamirinde bozulmalara yol açıp mutagenezi arttırabilir, kanser gelişimine ve hücre yaşlanmasına neden olabilir [47].

2.4 Antioksidanlar ve Antioksidan Aktivite

2.4.1 Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir [48].

Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir [49]. Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir [50].

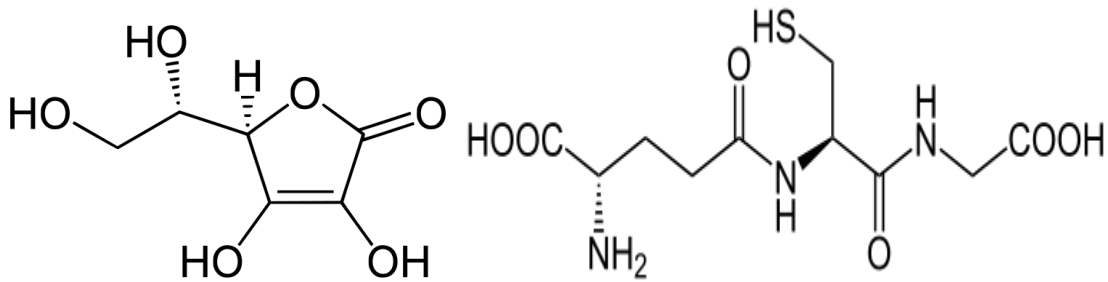
Canlı sistemlerde gerçekleşen bütün fizyolojik süreçler; enzim, hormon ve iz elementler gibi farklı ajanlar tarafından yönetilen oksidasyon ve indirgenme reaksiyonlarının kompleks kombinasyonlarını içerir. Canlılarda redoks dengesinde meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücrelerin ve doku fonksiyonlarının bozulmasına sebep olabilir. Antioksidan maddeler dokularda doğal olarak bulunur ve farklı oksidasyon reaksiyonlarını düzenler. Ayrıca, antioksidan maddeler veya antioksidan savunma sistemlerinde bulunan bazı bileşenlerin endojen sentezinde meydana gelebilecek bir yetersizlik, farklı hastalık türlerini meydana getirebilir [51].

2.4.2 Antioksidan Aktivite

Canlılar yaşamsal faaliyetleri devam ettirebilmeleri için enerjiye gereksinim duymaktadırlar. Bu enerji, glukoz ve yağ asitleri gibi moleküllerin oksidasyonu ile elde edilmektedir. Ancak, oksidasyon reaksiyonları sonucunda reaktif oksijen formları (ROS) olarak adlandırılan, aralarında kanser ve kardiyovasküler hastalıkların da bulunduğu birçok kronik hastalığın başlamasına neden olan ve yapısında oksijen içeren serbest

radikaller oluşmaktadır. Bu serbest radikaller, DNA'ların ve proteinlerin zarar görmesine neden olmaktadır.

Oksijen tüketen organizmaların tümünde; lipid, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerin oksidasyonunu önleyen enzimatik veya enzimatik olmayan çeşitli antioksidan bileşikler bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) en önemli antioksidan enzimlerdir. Enzimatik olmayan antioksidan bileşikler ise; başta askorbik asit (C vitamini), α -Tokoferol (E vitamini), karotenoidler, polifenoller olmak üzere, indirgenmiş glutatyon, albumin, seruloplazmin ve ferritinden oluşmaktadır [52].



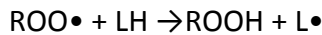
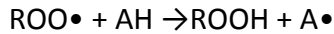
Şekil 2.8 Askorbik asit ve glutatyon kimyasal yapıları

Genel olarak, bu antioksidanlar aşağıda belirtilen bir ya da birkaç yolla oksidanları etkisiz hale getirirler;

- 1- Toplayıcı Etki (Scavenging):** Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve moleküller bu yolla etki eder.
- 2- Bastırıcı Etki (Quenching):** Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler ve flavonoidler bu şekilde etki eder.
- 3- Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (Chain Breaking):** Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır metaller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.
- 4- Onarma etkisi (Repair):** Oksidatif hasar görmüş biyomolekülleri onarırlar.

Belirtilen bu yollar arasından; polifenoller, serbest radikalleri bağlamak, metallerle kelat oluşturmak ve lipoksigenaz enzimini inaktive etmek suretiyle antioksidan etki göstermektedir [53]. Buna karşın; askorbik asit, E vitamini ile provitamin A aktivitesi gösteren β -karoten, oksijenin reaktif formlarını inaktive etmek suretiyle bu etkiyi göstermektedir.

Antioksidan aktivitenin belirlenmesi amacıyla birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin bir bölümü hidrojen atomu transferi (HAT) reaksiyonuna dayanmakta, diğer bir bölümü ise elektron transferi (ET) yöntemine dayanmaktadır. HAT'ne dayalı antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinde; antioksidan (AH) ve lipid (LH), azo bileşiklerinin parçalanması ile oluşan peroksi radikalleri için yarışmaktadır [54]. Bu reaksiyonlar eşitlik olarak aşağıda verilmiştir.



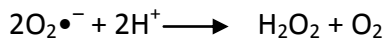
HAT'ne dayalı yöntemler arasında; oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC) ile toplam radikal tutma antioksidan parametresi (TRAP) yöntemleri bulunmaktadır.

ET'ne dayalı yöntemler ise, antioksidan tarafından indirgenen oksidanın renginde meydana gelen değişimleri ölçmektedir. Renkteki değişim ile antioksidan aktivite arasında bir bağ kurulmaktadır [54]. ET'ne dayalı yöntemler arasında; Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (ABTS/TEAC), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal tutma kapasitesi (DPPH), ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP) ve N,N-dimetil-p-fenilendiamin analizi (DMPD) yöntemleri bulunmaktadır.

2.4.3 Enzimatik Antioksidanlar

2.4.3.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksitin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir.

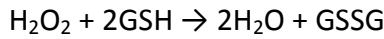


Beyinde yaygın bir şekilde bulunur ve aktivitesi yaş artışıyla orantılı olarak artar. İnsanlarda 2 tipi olan bu enzim, sitozolde bulunan dimerik Cu ve Zn ihtiva eden Cu, Zn-SOD ile mitokondride bulunan ve tetramerik Mn ihtiva eden Mn-SOD şeklinde 2 izomerdir [55]. Her iki SOD'un katalizlediği reaksiyon aynıdır. Bu enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı

etkilerine karşı korur. Ayrıca SOD fagosit edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynar [39].

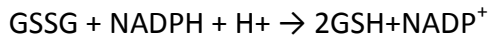
2.4.3.2 Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 ve lipid peroksitlerin indirgenmesinde görev alır. İndirgenmiş glutatyonla ihtiyaç duyar. Peroksitten su oluşumunu sağlayan tepkimeyi katalize eder:



H_2O_2 ' in düşük konsantrasyonlarında katalaz, yüksek konsantrasyonlarında glutasyon peroksidaz daha aktiftir [56].

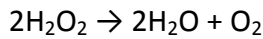
Glutasyon redüktaz esas olarak glutasyon peroksidaz katalizasyonu sonucu oluşan okside glutasyonun indirgenmesi reaksiyonunu katalizler:



Glutasyon transferaz arachidonik ve linoleik asit hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerin detoksifikasyonunda görev alır [56].

2.4.3.3 Katalaz (CAT)

Hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştüren reaksiyonu katalizler:



Katalaz organizmada tüm hücrelerde özellikle peroksizomlarda bulunur [39], [56].

Katalaz (H_2O_2 : H_2O_2 oksido-redüktaz) yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Katalaz esas olarak peroksizomlarda daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. Granümatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevi de görür. Hidrojen peroksidi (H_2O_2) ortadan kaldırarak hidroksil serbest radikali ($OH\bullet$) oluşumunu önler.

2.4.4 Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

2.4.4.1 E Vitamini

Doğada 7 farklı izomer yapısında bulunan Tokoferoller, başlıca bitkisel ürünlerde mevcuttur. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt, yumurtada bulunurlar. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Antioksidan etkileri vitamin etkilerinin tersine olarak α 'dan γ 'ya doğru artar [57].

2.4.4.2 C Vitamini

Kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan bir ketolaktondur. Yapısı karbohidratlardan heksozlara benzer. Hayvanların çoğu C vitamini sentezini kendisi yapabilirken insanlar yapamaz. C vitamini vücutta hidroksilasyon reaksiyonları ve demir emiliminde görev alır. Ayrıca sulu peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek antioksidan görevini de yerine getirir [42].

Kapiler damarların zedelenmesine bağlı petesi ve ekimozlar görülür. Çocuklarda C vitamini eksikliği sonucu Barlow hastalığı ile kurbağa ayağı pozisyonu görülür, diş etleri şişer ve kanar.

C vitamini en çok yabani gül tohumu, limongiller, kuş üzümü, taze sebze ve meyvelerde, özellikle portakal, greyfurt gibi turuncgillerde, çiğ lahana, domates ve şalgamda bulunur. Vücutta depolanmadığından, her gün düzenli olarak alınması gerekir [42].

2.5 Fenoller ve Zeytin Karasuyu

2.5.1 Fenolik Bileşikler ve Antioksidan Etkileri

Fenolik bileşikler, bir aromatik halka ve buna bağlı olarak fonksiyonel türevleri de dahil bir ya da birden fazla hidroksil grubu içeren maddeler olarak tanımlanmaktadır. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından işlevleri, tat, koku ve renk oluşumundaki etkileri, renk değişimlerine katkıları, antimikrobiyal ve antioksidan etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları ve değişik gıdalarda saflık kontrol

kriteri olmaları gibi birçok açıdan önem taşımaktadır. Antioksidan etki, fenol halkasındaki hidroksil grubu sayısı ile artmakta ve aynı bileşikte bu etki meta-, orto-, ve para- sırası ile yükselmektedir [58], [59], [60].

Fenolikler en aktif doğal antioksidanlar olup, antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallerle şelat oluşturmaları ve lipoksigenaz enzimini inaktive etmeleri ile gerçekleşmektedir [60]. Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki özelliğe sahip olması gerekmektedir. Birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, yavaşlatma veya önleme yeteneğine sahip olması, ikincisi de kendisi serbest radikale dönüştüğünde stabil bir formda kalabilmesidir [61], [62].

Birçok bitkisel kaynaklı gıda, en güçlü antioksidanlardan olan fenolik fitokimyasalları içermekte ve oksidatif zararlara karşı vücut savunmasına katkıda bulunmaktadır. Bu bileşikler hem gıdaları bozulmalara karşı korumakta hem de tüketilmeleri sonucu vücudumuza antioksidan madde sağlamaktadırlar. Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Bunlardan özellikle fenolik asitler ve flavonoidler antioksidan olarak önem taşımaktadır. Antioksidan davranışlarından dolayı flavonoidler, diyetle bulunan en önemli antikarsinojenlerden biri olarak kabul edilmektedir [15], [58], [61], [62].

Antioksidan aktivite gösteren fenolik maddelere soya fasulyesi izoflavon glikozitleri (genistein, diadzein, glisitein) ve fenolik asitleri (hidroksisinamik asitler ve p-hidroksibenzoik asitler), yer fıstığı flavonoidleri (kuarsetin ve rutin), pirinç dış kabuğu fenoliği (isoviteksin), yulaf fenoliği (avenantiramidler), buğday kepeği fenoliği (ferulik asit), susam tohumu fenoliği (sesamol), çay fenolikleri (kateşin ve türevleri) ve biberiye fenolikleri (rozmarik asit ve karnosik asit) örnek olarak verilebilir [62]. Flavanonlar genelde turuncgillerde ve nanede, flavonlar ise maydanozda bulunurlar. Kateşinler yüksek miktarda yeşil ve siyah çayda, antosiyaninler kiraz ve çilekte, izoflavonlar ise nohut ve soya gibi baklagillerde bulunur.

2.5.2 Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi

Karasu bilindiği üzere geniş spektruma yayılmış bir organik madde matrisine sahiptir. Bu organik yükü yapısında bulunan polifenoller, pektinler, polialkoller ve lipidler

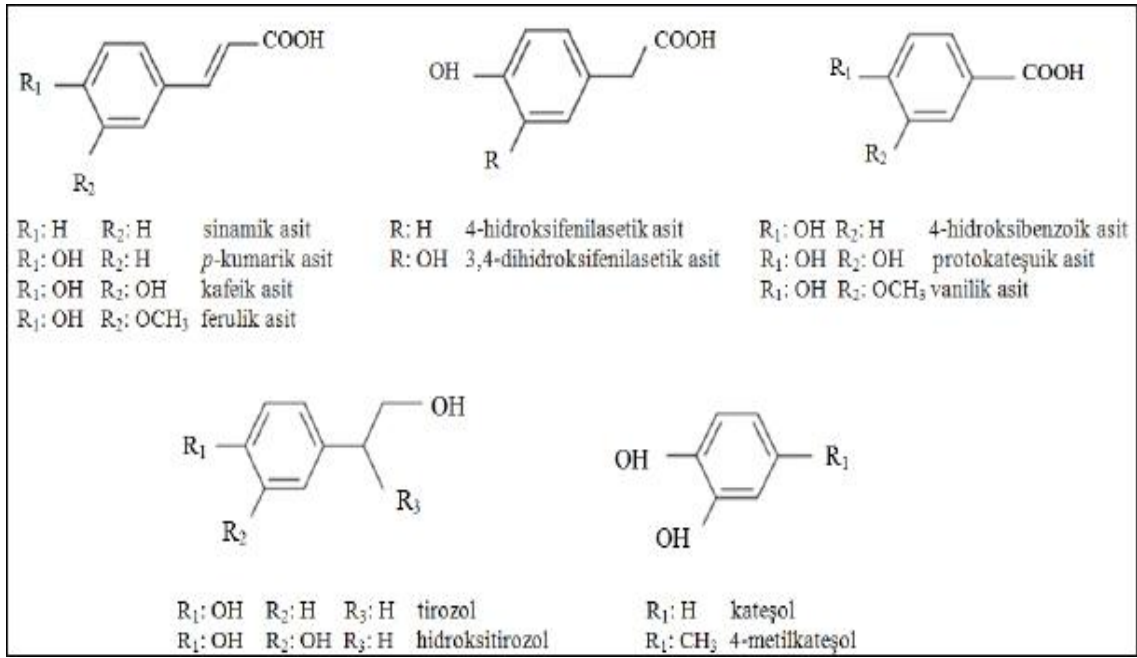
oluşturur. Bunların arasından karasuya önemli bir kirlilik yükü sağlayan bileşeni içinde bulunan fenolik bileşiklerdir. Zeytinin çekirdek ve meyve kısımları fenolik bileşikler açısından zengindir. Bu bileşikler zeytinyağı üretim prosesleri sırasında ortaya çıkarlar ve atıksu ve yağ arasında bölünürler. Bu fenolikler amfifilik yapıdadırlar ve bundan ötürü suda yağda olduklarından daha çok çözünürler, bu da atıksudaki yüksek fenol içeriğini açıklamaktadır.

Fenollerin biyolojik arıtma üstünde inhibe edici etkisinin oluşu da karasuyun biyolojik olarak arıtılabilirliğini güçleştirmektedir. Bilindiği üzere fenoller, aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun bağlandığı aromatik bileşiklerdir. Polifenoller ise her molekülde birden fazla fenol grubunun bulunduğu bileşiklerdir. Polifenoller genelde bitkilerde bulunur ve bitkilerin renklenmelerinden, örneğin sonbahardaki yaprak renklerinden sorumludurlar [90]. Antioksidan özellikleri nedeniyle insan sağlığına olan faydaları bilinmekte ve araştırılmaktadır.

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin oluşumu, meyvenin çeşidi ve olgunluğuna, iklim koşullarına, depolama süresine ve proses tekniğine bağlı olarak değişir [63].

Zeytinyağının fenolik bileşik fraksiyonu, zeytin meyvesinin toplam fenolik içeriğinin yalnızca % 2'sini içerir, kalan % 98'lik kısmı ise zeytin karasuyuna geçer [64]. Zeytin karasuyunda bulunan biyofenolikler meyvede doğal olarak oluşabilecekleri gibi, proses sırasında yağ ve atık faz arasında dağılım sırasında da oluşabilirler [63]. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler, depolama süresince, yıkımı oldukça zor olan yüksek molekül ağırlıklı polimerlere polimerize olma eğilimindedirler [65].

Zeytin karasuyunda tanımlanan ve miktarları belirlenen hidrofilik fenol bileşiklerin yaygın grupları; fenolik alkoller, fenolik asitler, fenil alkoller, sekoiridoidler, flavonoidler ve lignanlardır. Zeytin karasuyunda 30'dan fazla fenolik bileşik tanımlanmıştır. Şekil 2.9'da, literatürde bulunan zeytin karasuyunda tanımlanmış temel fenolik bileşikler yer almaktadır [64].



Şekil 2.9 Zeytin karasuyunda bulunan temel fenolik bileşikler [64]

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin bir grubu, sinamik asitten türevlenmiştir. Bu grup; *o*- ve *p*- kumarik asit (4-hidroksisinamik asit), kafeik asit (3,4-dihidroksisinamik asit) ve ferulik asitten (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit) oluşmaktadır. Zeytin karasuyunda bulunan diğer grup fenolik bileşenler ise benzoik asitten türevlenmiştir. Bu grup ise; tirozol ve hidroksitirozol gibi β-3,4-dihidroksifeniletanol türevlerinden oluşur. Zeytin karasuyunda bulunan diğer fenolikler; kateşol, 4-metilkateşol, *p*-kresol ve resorsinoldür. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler antioksidan özelliğindedir [64].

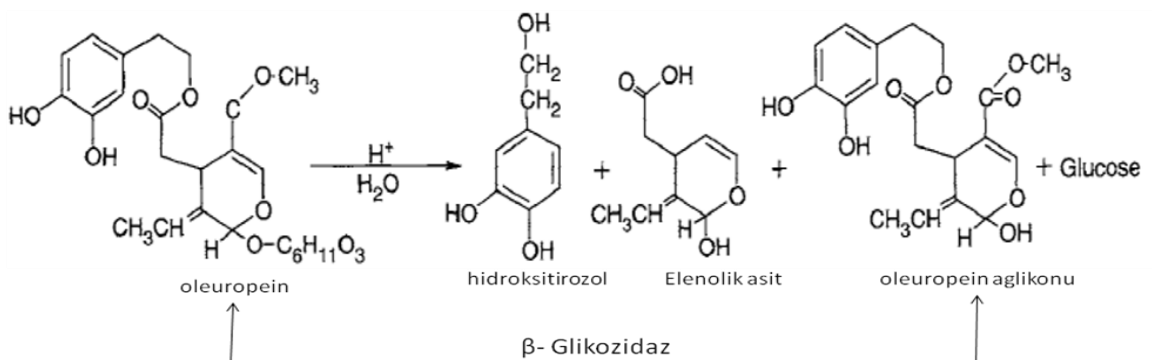
Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun toplam fenol bileşik içeriği zeytinin toplanma zamanı, olgunluk derecesi, varyetesine, yetiştiği toprak, iklim koşulları, zeytinyağı üretim prosesleri ve depolanma koşulları gibi değişik etkenlere bağlı olarak farklılık gösterir. Nitekim zeytin olgunlaştıkça elde edilen karasuyun toplam polifenol içeriğinde azalma olduğu saptanmıştır. Ancak zeytinin olgunlaşması ve işlenmesi sırasında oleuropein azalırken onun serbest komponenti olan hidroksitirozol düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir.

Hidroksitirozol, tirozol ve kateşol gibi bazı fenolik maddeler karasuyun bakteri antagonizmi fitotoksitesitesi gibi biyolojik etkilerinin sorumluları olarak gösterilebilirler.

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler arasında hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), antioksidan özelliği nedeni ile dikkat çekici bir bileşiktir. Hidroksitirozol, güçlü antioksidan aktivitesine sahiptir ve insan sağlığı için önem arz eder. *In vitro* ortamda yapılan çalışmalar sonucunda, hidroksitirozolün düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri bağladığı, trombositlerin bir araya gelmesini inhibe ettiği, insan nötrofilleri için lökotrien ürettiği ve hücre korumasını sağladığı görülmüştür. Hidroksitirozolün ayrıca, *in vitro* çalışmalar ile gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel ajan olduğu ispatlanmıştır [66].

Hidroksitirozol son zamanlara kadar ticari olarak bulunmazken, son zamanlarda araştırmalarda kullanılmak üzere ticari olarak sağlanabilmekte (1000-2000 \$/g) ve antioksidan olarak farklı markalarda piyasada bulunmaktadır [63]. Hidroksitirozol üretimi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; kimyasal sentez, oleuropeinin hidrolizi, saflaştırılmış tirozinazın biyokatalizör olarak kullanımı ile enzimatik sentez, zeytin karasuyundan laboratuvar ölçekli saflaştırma ve iki-fazlı üretim prosesinin sıvı-katı atığının hidrotermal muamelesidir [66].

Zeytin karasuyu, biyoaktif bir polifenol olan oleuropein açısından oldukça zengindir. Oleuropein, üç yapısal alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler; bir polifenol olan hidroksitirozol, bir sekoiridoid olan elenolik asit ve glukozdur. Hidroksitirozol zeytin ürünlerinde basit fenol olarak bulunabileceği gibi, elenolik asitle oleuropein oluşturmak üzere esterleşebilir ve aglikonu verbaskozid molekülünün parçası olabilir [67]. Hidroksitirozolün zeytinyağının ekstraksiyonu sırasında esteraz aktivitesi ile oleuropeinin hidrolizi sonucu oluştuğu düşünülmektedir [63].



Yapılan çeşitli HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografi) analizlerinde karasuda bulunan başlıca fenolik maddeler; 3,4-dihidroksifeniletanol; 3,4- dihidroksibenzoik asit; kateşol; 4-hidroksibenzoik asit; tirozol; kafeik asit; 4-metilkateşol; 3-hidroksifenilpropionik asit; para-kumarik asit; veratrik asit; 3,4,5-trimetoksibenzoik asit; trans-sinamik asit olarak saptanmıştır .

Fki vd. [32] tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin karasuyu ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki radikal tutma etkileri belirlenerek (EC_{50}) değerleri karşılaştırılmıştır. Buna göre; zeytin karasuyundan elde edilen *orto*-dihidroksillenmiş aromatik bileşenler, DPPH üzerinde yüksek aktivite sergilemiştir. Bu bileşiklerden hidroksitirozole ait EC_{50} değeri 0,57 $\mu\text{g/mL}$, 3,4-dihidroksifenilasetik aside ait EC_{50} değeri ise 0,64 $\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Ancak, sadece bir hidroksil fonksiyonuna sahip tirozol ve *p*-hidroksifenilasetik asite ait aktiviteler ise daha düşüktür; sırasıyla EC_{50} =10,9 ve 12 $\mu\text{g/mL}$ 'dir. Zeytin karasuyunda bulunan ferulik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit için elde edilen EC_{50} değerleri de sırasıyla 1,21, 0,87 ve 9,50 $\mu\text{g/mL}$ 'dir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Zeytin Karasuyunun Temin Edilmesi

Deneylerde kullanılan zeytin karasuyu örnekleri 02.09.2013 Balıkesir Gömeç Bölgesinde faaliyet gösteren Kozaklı Tarım Ürünleri Tic. Ltd'den temin edilerek, çalışma süresince +4 °C de saklanmıştır. Bu fabrikada, Edremit körfezi ve Ayvalık bölgesinde yetiştirilen zeytinlerin işlenmesiyle zeytinyağı elde edilmektedir. Bu üretim tesisinde zeytin karasuyu, 3-fazlı proses sistemi kullanılarak üretilen zeytin yağı işleminden elde edilmiştir.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler aşağıdaki Çizelge 3.1 ' de gösterilmiştir

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Firma / Katalog numarası
Na ₂ SO ₄	Merck / 1066432500
n-Hekzan	Merck / 1.04368
NaOH	Fluka / 71690

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (devam)

Kimyasal	Firma / Katalog numarası
$K_2Cr_2O_7$	Sigma / 207802
HCl (%37)	Riedel / 07102
Ferro Amonyum sülfat	Sigma / 215406
Feroin indikatör	Merck / 1091610100
Tween-20	Merck / 1.067657
Sülfürik asit	Merck / 1.00713
Amonyum sülfat	Merck / 1.01217
$C_4H_8O_2$	Sigma / 319902
α -tokoferol	Fluka / 95240
Troloks	Fluka / 56510
Trikloroasetik asit	Sigma / 33731
Sodyum asetat	Sigma / S-7545
K_2HPO_4	Fluka / 60356
Metanol	Riedel-de Haën / 24229
Linoleik asit	Sigma / L-1268
Kloroform	Merck / 1.02445
$K_3Fe(CN)_6$	Sigma / P-8131
$FeCl_3$	Fluka / 44943
$FeCl_2$	Fluka / 44939
Etanol	Merck / 1.00983
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma / 9252
Asetonitril	Merck / 1.00030
<i>o</i> -Fosforik asit	Merck / 1.00573

Çizelge 3. 1 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (devam)

Kimyasal	Firma / Katalog numarası
2,2-difenil-1-pikrilhidrazil	Sigma / D-9132
Bütillendirilmiş hidroksitoluen	Fluka / 34750
Amonyum tiyosiyanat	Merck / 1.01213
2,2'-Azino-bis(3 etilbenzenothiazolin-6- sülfonik asit)	Sigma / A-1888
2,5-Dihidroksibenzoik asit	Sigma / 149357
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	Sigma / 850217
Ferulik asit	Fluka / 46278
Gallik asit	Sigma / G7384
3-Hidroksi-4- metoksifenilasetik asit	Sigma / 716391
Kafeik asit	Sigma / C0625
Kateşol	Sigma / C9510
<i>p</i> -Kumarik asit	Sigma / C9008
4-Metilkateşol	Sigma / M34200
2-(4-Hidroksifenil)etanol	Fluka / 79058
Vanilik asit	Fluka / 94770
Borik asit	Merck / 1001625000
Oleuropein	Sigma / O8889
Sodyum tiyosülfat	Sigma / 217247
Potasyum sülfat	Sigma / P0772
Bakır (II) sülfat	Merck / 1027805000

3.1.3 Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

- Spektrofotometre : Shimadzu UV–2101 PC ve PERKIN ELMER LAMBDA 25 UV/VIS
- Spektrofotometrik ölçümler için : Quartz Küvet (HELLMA (45x12.5 mm))
- Membran Filtre (Schleicher&Schuell 0.45 µm): İzolasyon prosedüründe kullanıldı.
- Analitik tartımlar için : Sartorius analitik dijital terazi
- Nüve Etüv
- Zeytin karasuyunu süzmek için : Filtre kâğıdı, 1,5 mikron, Whatman
- Hach Lange Toplam Organik Karbon kiti : LCK 381 TOK test kitleri
- Etil asetatı uçurmak için : Heidolph marka evaporatör
- Çözeltileri HPLC analizine hazırlamak için : Millex-HV Filtre Millipore Durapore® membran Millipore WP6122050 vakum pompası
- Elma S30 H ultrasonik banyo
- Fenol kalitatif ve kantitatif analizleri için: Agilent HPLC sistemi
- Buzdolabı: Bosch
- Destile su cihazı : GFL 2001/4
- Manyetik karıştırıcı : Chiltern Hotplate HS31
- pH Metre: Sartorius Basic Meter PB-11
- Santrifüj cihazı: Hettich Zentrifugen EBA-20, SİGMA 3K 30
- Su banyosu: GFL 1086

3.2 Kullanılan Metodlar

3.2.1 Karasu Karakterizasyonu

3.2.1.1 pH Tayini

Zeytin karasuyu numunesinin pH değeri, pH metre (Sartorius Basic Meter PB-11) ile belirlendi.

3.2.1.2 Askıda Katı Madde (AKM) Tayini

Numunenin toplam askıda katı madde tayininde 2540 D [68] standart metodu kullanılmıştır. Çok iyi bir şekilde karıştırılmış numune, ağırlığı standart olan filtre kâğıdından (Borosilikat cam elyaf mikro fiber filtre kâğıdı, 1,5 mikron, Whatman, ingiltere) geçirildi ve tortu filtrede bırakıldı. Tortu içeren filtre 103–105°C sıcaklıkta sabit tartıma ulaşıncaya kadar kurutuldu ve filtre kâğıdının ağırlığındaki artış, toplam Whatman ,askıda katı madde kabul edildi. Ağırlık ölçümlerinde hassas terazi (Sartorius) kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

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

A = filtre ağırlığı + kurutulmuş tortu, mg

B = filtre ağırlığı, mg

3.2.1.3 Yağ ve Gres Tayini

Numunenin yağ içeriği, standart yağ ve gres tayini metodu 5520 B [68] ile belirlendi. Bu analiz metodu su-atık sularda yağ ve gres miktarı tayininde uygulanan kimyasal analiz metodunu içermektedir. Numune içerisinde çözülmüş ya da emülsiyon halindeki yağ ve gresin, ayırıcı çözücülerle sıkı teması ile sudan ayrılması esasına dayanmaktadır. Çözülmüş ya da dağılmış haldeki yağ ve gres, sudan n-hekzan yardımı ile ayrılmaktadır. Numunenin asitliği, analize hazırlanması sırasında 1 : 1 HCl (HCl %37,Merck) ile pH 2 ye indirildi. 200 ml numune cam huni kullanılarak ayırma hunisine alındı, 30 ml n-hekzan (Merck) 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 (Merck) ile birlikte filtre kâğıdından süzülerek 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 biriktirildi. 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. Numunenin yağ ve gres içeriği aşağıdaki eşitlikle hesaplandı:

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

A = cam balonun toplam ağırlığı, mg

B = cam balonun darası, mg

3.2.1.4 Kimyasal Oksijen İhtiyacı (KOİ) Tayini

Numunenin kimyasal oksijen ihtiyacı, kapalı refluks (geri akış) titrimetrik metot 5220 C [68] kullanılarak yapıldı. Pek çok organik madde kromik ve sülfürik asit karışımı ile kaynatıldığında oksitlenir. Numune güçlü asit çözeltisinde bilinen fazlalıkta potasyum dikromat (K₂Cr₂O₇) ile refluks edilir. Parçalamadan sonra kalan indirgenmemiş K₂Cr₂O₇, ferro amonyum sülfat (FAS) ile titre edilir. Böylece tüketilen K₂Cr₂O₇ 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 ftalat (KHP) standardı metotta belirtildiği gibi hazırlandı. KHP, 1.176 mg O₂/mg teorik KOİ değerine sahiptir [76]. 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 H₂SO₄ 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 erlenlere 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.

$$KOİ(mg O_2/L) = [(A-B) \times M \times 8 \times 1000 ml/L] / V_{\text{örnek}}(ml)$$

A = şahit için kullanılan FAS, ml

B = numune için kullanılan FAS, ml

M = FAS' ın molaritesi, 0,025M

8000 = oksijenin miliekivalent ağırlığı $\times$ 1000 ml/L

3.2.1.5 Toplam Organik Karbon (TOK) Tayini

Çalışılan karasu numunesine toplam organik karbon miktarının belirlenmesi için TOK analizleri yapılmıştır. Toplam organik karbon tayini, zeytin karasuyu 1:4 seyreltilerek Hach Lange Toplam Organik Karbon test kitleri ile yapılmıştır. Karasudaki toplam karbon (TK) ve toplam inorganik karbon (TIK) asitlendirme ve oksitleme aracılığıyla karbon dioksit (CO_2) dönüştürülür. Oluşan karbon dioksit membrandan indikatör solüsyona geçer. İndikatör solüsyonunun renginin değişmesi fotometrik olarak 435 nm'de belirlenir (60-735 mg/L). TOK miktarı toplam karbondan toplam inorganik karbon çıkarılarak bulunur.

3.2.1.6 Toplam Azot Tayini

Karasu örneklerinde azot belirlenmesi Kjeldahl yöntemi ile yapılmıştır. Bu yöntemin esası, organik bileşikler halindeki azotun derişik H_2SO_4 ile yaş yakılmak suretiyle amonyum azotu haline dönüştürülmesi, amonyum haline dönüştürülen azotun daha sonra kuvvetli alkalın ortamda damıtılması ve açığa çıkan amonyağın bir asit içerisinde tutularak titre edilmesi yöntemine dayanmaktadır [69].

Çizelge 3. 2 Tahmini azot miktarına göre seçilecek örnek hacmi

Tahmin edilen azot miktarı	Örnek hacmi
< 5 mg N /L	200 mL
5-10 mg N /L	100 mL
20-50 mg N /L	50 mL
50-100 mg N /L	25 mL
>100 mg N /L	10 mL

10 mL numune alınarak kjeldahl balonuna konulur. Parçalama reaktifi, 134 g K_2SO_4 ve 7,3 g $CuSO_4$ 800 mL suda çözülür ve 134 mL derişik sülfirik asit ekleyip bir litreye tamamlanarak hazırlanır. Numunenin üzerine 50 mL parçalama reaktifi eklenir. Parçalama reaktifinden sonra birkaç adet cam boncuk kjeldahl balonuna içine bırakılır. Kjeldahl balonu parçalama cihazına konulur ve parçalama fanı açılır. Cam balonun içinde yaklaşık 5 mL numune kalıncaya kadar (beyaz duman yok oluncaya kadar) parçalama işlemine devam edilir. Parçalama işlemi tamamlandıktan sonra, cam balondaki numune 300 mL' ye tamamlanır. Daha sonra 50 mL nötralizasyon ayırıcı (50g NaOH ve 25g $Na_2S_2O_3$, 1 L) çözeltisi eklenir. Cam balon distilasyon cihazına yerleştirilir. Bir erlene 50 mL borik asit konulur ve distilasyon cihazına yerleştirilir. Distilasyon işlemi başlatılır ve erlende 250-300 mL arası numune toplanana kadar distilasyona devam edilir. Oluşan distilat 0.02 N standart sülfirik asit çözeltisi ile soluk lavanta rengine dönünceye kadar titre edilir.

$$mg\ N/L = [(A-B) \times N \times 1000 \times 14] / V\ (mL)$$

A = Numune için titrasyonda harcanan H_2SO_4 titrasyon çözeltisi hacmi , ml

B = Şahit için titrasyonda harcanan H_2SO_4 titrasyon çözeltisi hacmi , ml

N = H_2SO_4 titrasyon çözeltisinin normalitesi

3.2.1.7 Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Zeytin karasuyu numunesinin toplam fenolik bileşik içeriğinin tespitinde spektrofotometrik bir metot olan Folin-Ciocalteu Yöntemi [70] kullanıldı. Metotta

belirtilen Folin-Ciocalteu reaktifi, fenolün –OH grubunu oksitlemektedir ve bu reaksiyon karakteristik mavi renge sahip bir ürün ortaya çıkarmaktadır. Hazırlanan örnek ekstraktından 1 mL alındı ve 45 mL destile su ilave edildi. Daha sonra 1 mL Folin reaktifi ve 3 mL %2'lik sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek ve 2 saat inkübasyon gerçekleştirildi. Son olarak 760 nm 'de spektrofotometik olarak absorbansı ölçüldü.

Pirokateşol ile hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki (25-50-75-100 µg/mL) standart çözeltiler de numune ile aynı şekilde analize alındı ve pirokateşol konsantrasyonuna göre artan şiddette mavi renk gözlemlendi. 1 mL zeytin karasuyu için toplam fenolik bileşik içeriği kullanılan standartın µg eşdeğeri olarak hesaplandı. Hesaplama pirokateşol standart eğrisinden elde edilen $y = 0,002x$ eşitliği kullanıldı.

3.2.2 HPLC Analizleri

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizi için hazırlanan örnekler HPLC analizi yapılmıştır.

3.2.2.1 Kalitatif Analiz

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin kalitatif analizi için kullanılan yöntem, Fki vd. [32] tarafından kullanılan HPLC analiz yöntemi esas alınarak geliştirilmiştir. Örneklerin HPLC analizlerinin yapılabilmesi için, öncelikle aşağıda belirtilen aşamalar (ekstraksiyon, evaporasyon, kalıntıların metanol fazına alınması) gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon: Zeytin karasuyu örneğinin (50 mL) pH değeri kaydedildikten sonra, pH'ı, % 9'luk HCl çözeltisi ile yaklaşık 2'ye ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan örnek, etil asetat ile 1:1 (v/v) oranı sağlanacak şekilde, 3 kez ekstrakte edilerek etil asetat fazı, susuz sodyum sülfat bulunan ortamda toplanmıştır [71].

Evaporasyon: Ekstraksiyon sonrası toplanan etil asetat fazı, susuz sodyum sülfat ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra 45°C'de 40 rpm'de beş başlıklı döner buharlaştırıcıda (Heidolph) 30 dk buharlaştırılmıştır.

Kalıntıların metanol fazına alınması: Etil asetat uzaklaştıktan sonra kalan fenol kalıntıları, örnek : metanol hacmi 1:1 oranında olacak şekilde metanol içinde çözülerek metanol fazına alınmıştır.

Sonrasında metanol fazına alınmış örnekler 0.45 µm PVDF filtreden (Millipore Millex-HV) süzülerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Analizlerde kullanılan taşıyıcı fazlar bidistile su kullanarak hazırlanmış (Millipore MilliQ Gradient) ve 0.45 µm PVDF membrandan (Millipore Durapore®) vakumlu pompa yardımı ile süzölmüştür. Son olarak taşıyıcı fazların içinde bulunan gaz kabarcıkları, 30 dk süre ile ultrasonik banyoda (Elma S 30 H) uzaklaştırılarak HPLC için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Analizler, Agilent HPLC cihazında yapılmıştır. Analiz koşulları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3. 3 HPLC analiz koşulları

DEĞİŞKEN	ÖZELLİK
Kolon Boyutu	4.6 mm x 150 mm x 5 µm
Kolon	XTerra RP18
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector
Hareketli Faz Akış hızı	0.3 mL/dk
Dalga Boyu	280 nm
Kolon Sıcaklığı	25°C
Enjeksiyon Hacmi	25 µL
Taşıyıcı Faz A	70 : 30 asetronitril : bidistile su
Taşıyıcı Faz B	% 0.1 <i>o</i> -fosforik asit (<i>o</i> -H ₃ PO ₄)

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin HPLC ile analizleri için, gradyen program kullanılarak kromatografik ayırma sağlanmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3. 4 HPLC analizlerinde uygulanan gradyen program

T(dk)	Taşıyıcı Faz A	Taşıyıcı Faz B
0	20	80
45	30	70

Çizelge 3. 4 HPLC analizlerinde uygulanan gradyen program (devamı)

T(dk)	Taşıyıcı Faz A	Taşıyıcı Faz B
52,5	50	50
80	20	80

3.2.2.2 Kantitatif Analiz

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin kantitatif analizi için, iç standart yöntemi kullanılmıştır. Tüm analizlerde iç standart olarak 0.005 mg/mL derişiminde metanolde hazırlanmış *p*-kumarik asit çözeltisi kullanılmıştır. Analizlerde metanol fazında bulunan örnek ile *p*-kumarik asit çözeltisinin hacim oranı 1:1 olarak uygulanmıştır.

Kalitativ ve kantitatif HPLC analizleri için geliştirilen yönteme ait basamaklar, Bölüm 4.2’de verilmiştir. Ayrıca kantitatif HPLC analiz yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yönteme ait standart sapma değeri hesaplanmıştır.

3.2.2.3 Oleuropeinin Asidik Hidrolizi

Hidroksitirozol, zeytin karasuyunda oldukça yüksek miktarda bulunan, ancak ticari olarak elde edilmesi zor bir fenolik bileşen olduğundan çalışmada Walter vd. [72] tarafından kullanılan oleuropein’in asidik hidroliz yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bunun için, 50 mg oleuropein ve 10 mL 1 N H₂SO₄ rodajlı balona alınarak bir geri soğutucuya bağlanmıştır. Hidroliz işleminin gerçekleşeceği balon, 100°C’de sabit sıcaklıktaki ısıtma yağı içerisinde konulmuş ve 1 saat hidroliz süresince yağ ve reaksiyon ortamı sürekli olarak karıştırılmıştır. Bu süre sonunda hidroliz sonlandırılarak hidrolizat oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra hidrolizatın pH’ı NaOH ile 2’ye getirilmiş ve üç kez 10 ml etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat, tek başlıklı döner buharlaştırıcıda 45°C’de 150 rpm’de uzaklaştırılmıştır. Buharlaştırmadan sonra kalan madde HPLC’de analizlenmek üzere 10 ml metanolde çözülmüştür.

3.2.3 Antioksidan Aktivite Tayin Metodları

3.2.3.1 İndirgeme Gücü

İndirgeme gücü tayini Oyaizu metoduna göre yapılmıştır [73]. 25-100 µg/mL'lik standart (α -tokoferol , BHT , Trolox ve zeytin karasuyu) ve numune çözeltiler hazırlandı. Bu çözeltilerden 1 mL alındı ve üzerlerine pH 6.6 olan 0,2 M fosfat tamponundan 2,5 mL ilave edildi. Daha sonra % 1'lik $K_3[Fe(CN)_6]$ ' dan 2,5 mL ilave edilerek karışım su banyosunda 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. Bu işlemde sonra reaksiyon karışımlarına 2,5 mL % 10'luk triklorasetikasit (TCA) ilave edildi. Tüpler karıştırıldı. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çözeltinin üst fazından 2,5 mL alındı. Üzerine 2,5 mL destile su ve 0,5 mL % 0,1'lik $FeCl_3$ ilave edildi. 10 dakika bekletildi. Spektrofotometrede 700 nm'de ayıraç körüne karşı absorbands değeri ölçüldü. Körün hazırlanmasında 5 mL destile su alındı ve üzerine 0,5 mL $FeCl_3$ ilave edildi. Bu yöntemde Fe^{3+} 'ün ne kadarının Fe^{2+} 'ye dönüştüğü 700 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir. 700 nm dalga boyundaki yüksek absorbands değeri ortamdaki Fe^{2+} 'nin fazlalığını göstermektedir. Örnek ve standartların indirgenme gücü eğrileri konsantrasyon ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen absorbandslar arasında çizildi.

3.2.3.2 DPPH Radikal Giderme Aktivitesi

DPPH metodu bir ürünün hangi düzeyde serbest radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil'i indirgeyebileceğini ölçen bir metoddur [82].

Ayrıca bu yöntem ürünlerin saklama süreleriyle ilişkili olarak antioksidatif kapasitesini ölçmek için sıkça kullanılan bir yöntemdir [83].

DPPH bir serbest radikaldır ve bir elektron veya hidrojen radikali ile etkileşerek stabil diyamagnetik bir molekül olma eğilimindedir.

Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH çözeltisi hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form oluşur. Antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbands azalmasına

neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilir [74].

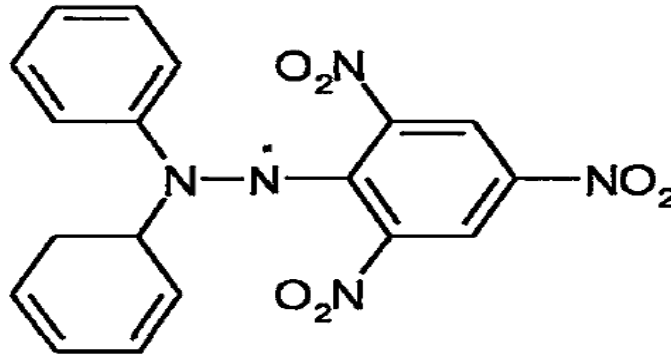
DPPH'nin 20 mg/L konsantrasyondaki çözeltisi günlük olarak hazırlandı. Bundan 1,5 mL alınarak üzerine farklı konsantrasyonlarda (α -tokoferol , BHT , Troloks ve ZK için ; 2,5-20 μ g/mL) hazırlanan numune ve standart çözeltilerden 1 mL ilave edildi. Standart olarak α -tokoferol, BHT ve Troloks kullanıldı. 5. dakikada köre karşı absorbans değeri 517 nm'de spektrofotometrede ölçüldü. Kontrol olarak 1,5 mL DPPH ve 1 mL metanol çözeltisi kullanıldı. Kör olarak sadece metanol kullanıldı. Azalan absorbans değeri geriye kalan DPPH çözelti miktarını yani DPPH radikal giderme aktivitesini vermektedir [75].

DPPH radikal giderme aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki formül yardımı ile hesaplandı :

$$\text{DPPH Radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A_0 = Kontrol absorbans değeri

A_1 = Örnek veya standartın absorbans değeri



Şekil 3.1 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalinin yapısı

3.2.3.3 ABTS Radikal Giderme Aktivitesi

ABTS radikal süpürme aktivitesi Arnao vd. [84] tarafından geliştirilen metod ile tayin edildi. 1 mL destile suda 7,4 mM ABTS $\bullet$ + [2,2'-Azino-bis (3-etilbenzenothiazolin-6-sülfonik asit)] çözülerek üzerine 1 mL 2,6 mM potasyum persülfat eklendi. Oda sıcaklığında 12-16 saat karanlıkta bekletildi. Bu karışımdan 1 mL alındı ve üzerine 60 mL metanol ilave edildi. Bu çözeltinin absorbansı 734 nm'de spektrofotometrede metanole karşı okundu. ABTS $\bullet$ + radikal katyonunun 734 nm'deki absorbansı 1.1 olacak

şekilde ayarlandı. Her deney için bu karışım taze hazırlandı. Hazırlanan metanollü ABTS•+ çözeltisinden 2,85 mL alındı. Üzerine 0,15 mL standart ve numune çözeltisi (25, 50, 75, 100 µg/mL) konuldu. 2 saat karanlıkta bekletildi. Spektrofotometrede 734 nm’de absorbens değeri okundu. Standart olarak rutin (25-100 µg/mL) , kontrol olarak ise numune yerine metanol içeren reaksiyon karışımı kullanıldı. Azalan absorbens ortamdan yok edilen ABTS•+ radikallerinin miktarını verir. % ABTS•+ radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{ABTS}\bullet\text{+ radikal giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A_0 = Kontrol absorbens değeri

A_1 = Örnek veya standartın absorbens değeri

3.2.3.4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Metodu

Toplam antioksidan aktivite tayini Osawa ve Namiki [85] tarafından geliştirilen tiyosiyanat metoduna göre yapıldı. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda ZK örnekleri ile standart çözeltiler (25-100 mg/mL) hazırlandı. Bu çözeltilerin üzerine toplam hacim 2,5 mL olacak şekilde potasyum fosfat tampon çözeltisi eklendi. Bu karışımların üzerinede 2,5 mL linoleik asit emülsiyonu ilave edilip 37 °C’de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir standart veya örnek çözelti eklenmeden 2,5ml potasyum fosfat tamponu (0,04M, pH 7,0) ve 2,5mL linoleik asit emülsiyonundan oluşan kontrol numuneleride inkübasyona bırakıldı. Linoleik asit emülsiyonu, linoleik asit (155µL) ve Tween-20’nin (175µL) potasyum fosfat tamponu (0,04M, pH 7,0) ile 50mL’ye seyreltilmesinden oluşmaktadır. 24 saat aralıklarla, inkübe edilmiş örneklerden 0,1mL alınıp üzerine 4,7mL %75’lik etanol, 0,1mL %30’luk amonyum tiyosiyanat çözeltisi ve %3,5’luk HCl ile hazırlanmış 0,1mL 0,02M FeCl₂ çözeltisi eklendi. İyice karıştırılıp 3 dk bekletildikten sonra spektrofotometrede 500 nm’de absorbens değerleri belirlendi. Lipid peroksidasyonunun % inhibisyonu aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = ((A_0 - A_1) / A_0 \times 100)$$

A_0 : kontrol reaksiyonunun absorbensı

A_1 : numune veya standardın absorbensı

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Zeytin Karasuyu Karakterizasyonu

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre; deneylerde kullanılan zeytin karasu numunesinin kimyasal özellikleri çizelge 4.1’ de verilmiştir.

Çizelge 4. 1 Zeytin karasuyu karakterizasyon sonuçları

Parametre	Değerler
pH	4,8
AKM (g/L)	9,8
Yağ ve Gres (g/L)	13,09
KOİ (g/L)	192
Toplam Organik Karbon (g/L)	94,2
Toplam N Tayini (g/L)	0,623
Toplam Fenolik Bileşik Tayini (mg/L)	800

Çizelge 4.2’ deki sonuçlar ile literatürde belirtilen zeytin karasu numunelerinin kimyasal karakteristikleri farklılık göstermektedir. Çünkü literatürdeki 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 edilış metoduna göre değişmektedir.

Çizelge 4.2 Zeytin karasuyu karakteristik özelliklerinin karşılaştırılması

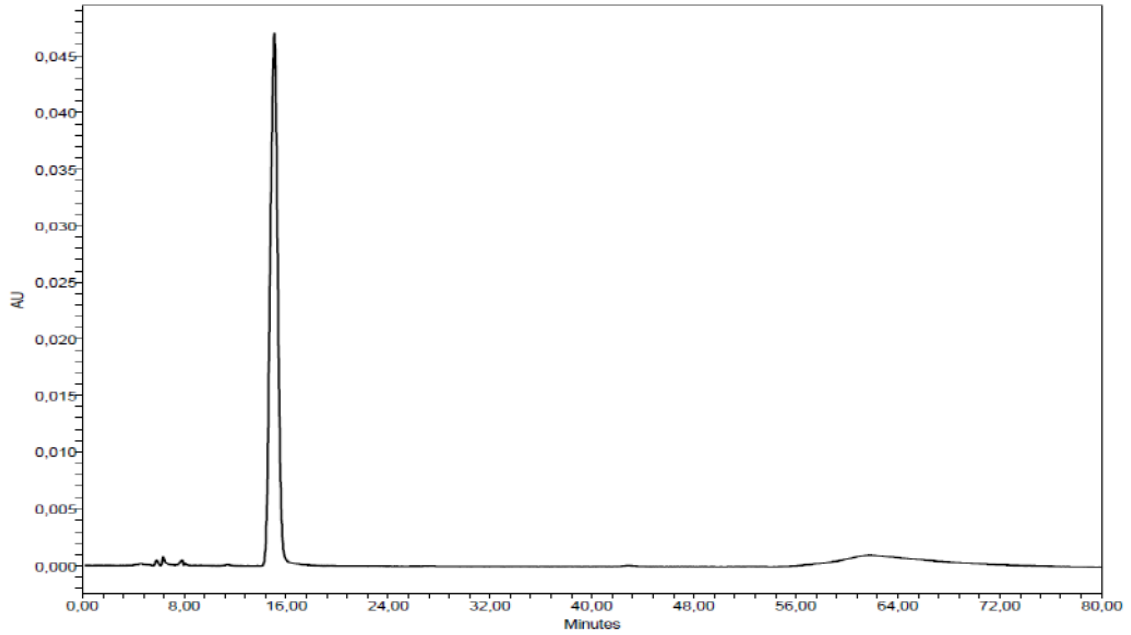
Parametre	Bu çalışma	[77] (2000) (Türkiye)	[87] (2005) (Fransa)	[29] (2009) (İspanya)	[79] (2012) (İsrail)
pH	4,8	4,5	4,7	4,9	5,0
AKM (g/L)	9,8	-	-	-	18,6
Yağ ve Gres (g/L)	13,09	12,2	-	15,4	-
KOİ (g/L)	192	103,4	161	151,4	116
Toplam Organik Karbon (g/L)	94,2	-	78	-	33,3
Toplam N Tayini (g/L)	0,62	0,12	0,59	-	0,35
Toplam Fenolik Bileşik Tayini (mg/L)	800	1800	3900	4000	-

4.2 Kalitatif ve Kantitatif HPLC Analizleri

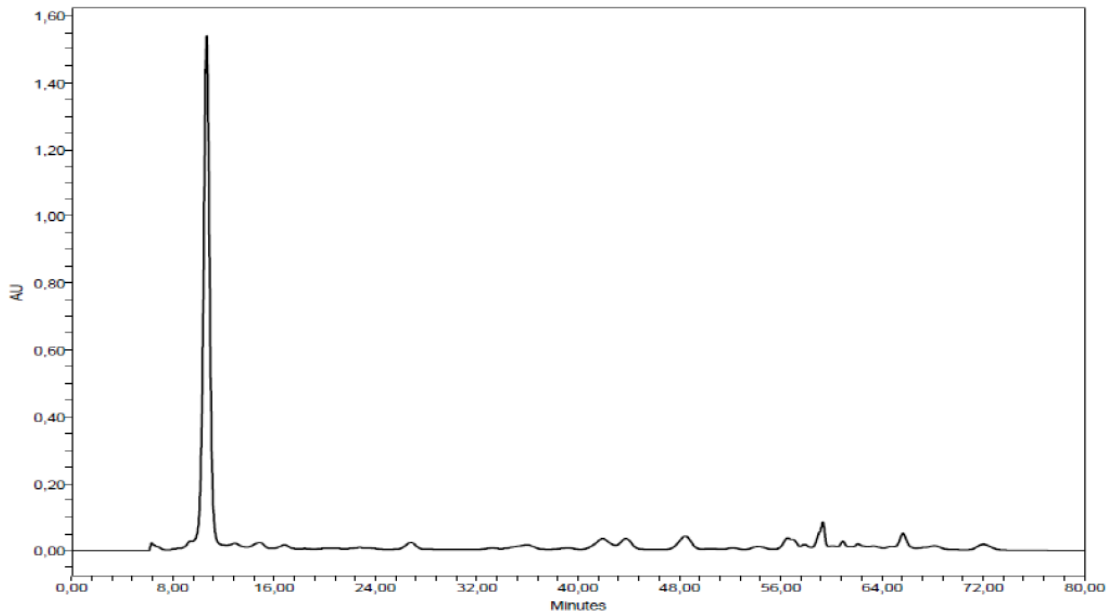
Zeytin karasuyunda HPLC analizleri için yöntem geliştirme çalışmalarında kalitatif analiz için akış hızı, enjeksiyon hacmi, dalga boyu, gradyen program; kantitatif analiz için ise iç standart değiştirilerek farklı yöntemler denenmiş, sonuç olarak Bölüm 3.2.2.1’de verilen yöntemin zeytin karasuyu için uygun olduğuna karar verilmiştir.

Yöntem geliştirme çalışmalarında, öncelikle zeytin karasuyuna ait örnekler kalitatif olarak HPLC ile analizlenmiştir. Sonrasında, bu örneklerde bulunan fenolik bileşenlere ait piklerin tanımlanabilmesi için, ticari olarak sağlanan standartlar (2,5-

dihidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, ferulik asit, gallik asit , 3-hidroksi-4-metoksifenilasetik asit, kafeik asit, kateşol, *p*-kumarik asit, 4-metilkateşol, tirozol (2-(4-hidroksifenil)etanol), vanilik asit) ile çalışmada elde edilen oleuropein hidrolizati (hidroksitirozol) HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiş, yani kolonda kalma süreleri belirlenmiştir. Örnek olarak tirozol ve oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) kalitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlar Şekil 4.1 ve 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.1 0.05 mg/mL tirozolün kalitatif HPLC analizine ait kromatogram

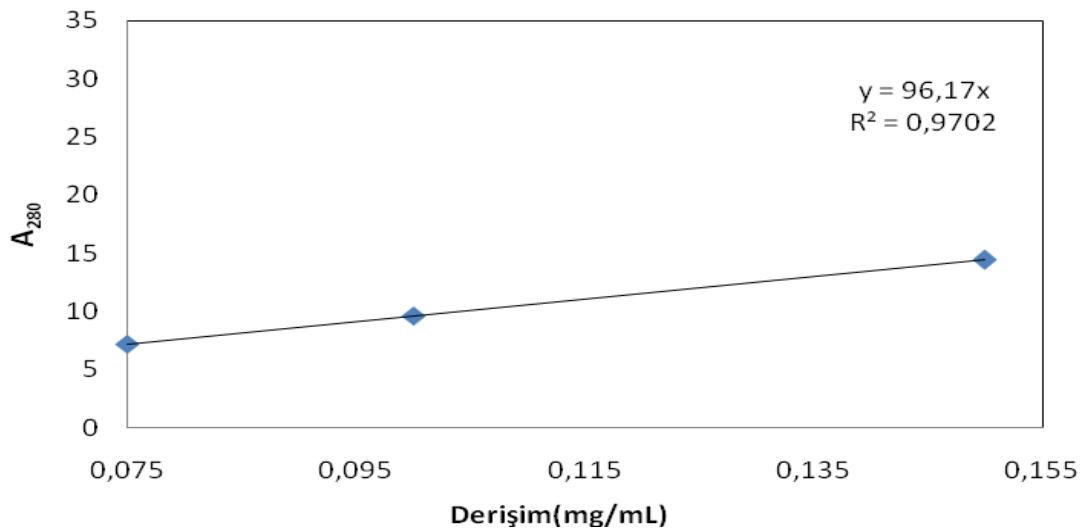


Şekil 4.2 Oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) kalitatif HPLC analizine ait kromatogram

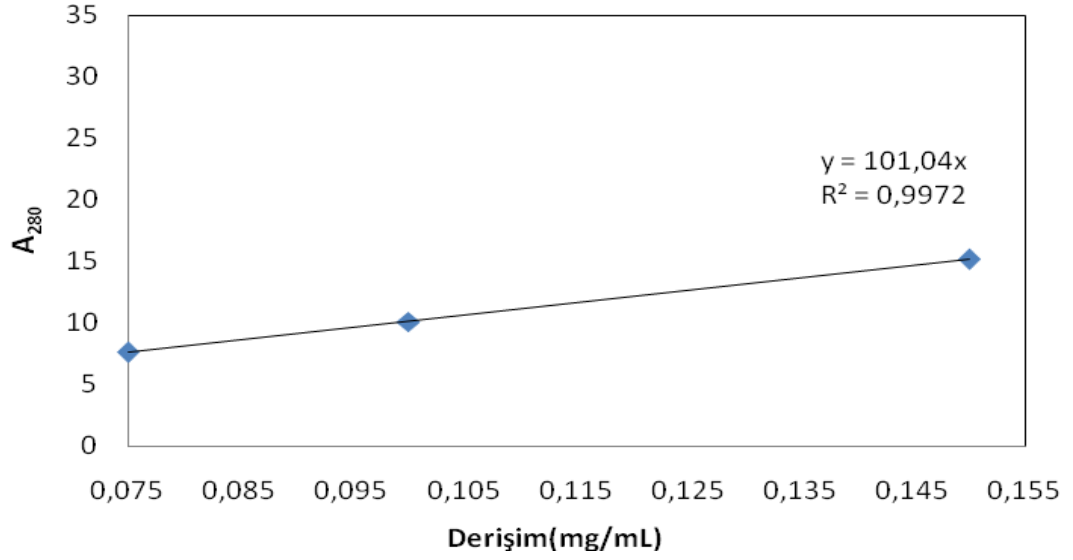
Zeytin karasuyu örneğine ait fenolik maddeler kalitatif olarak tespit edildikten sonra, tanımlanan her bir fenolik bileşen için farklı derişimlerde standart çözeltisi ile 0.005 mg/mL derişimindeki *p*-kumarik asit (iç standart) çözeltisi karıştırılarak yapılan HPLC analizleri sonucunda, standartlara ait kalibrasyon grafikleri çizilmiştir.

4.2.1 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin Kantitatif HPLC ile Analizi için Hazırlanan Kalibrasyon Grafikleri

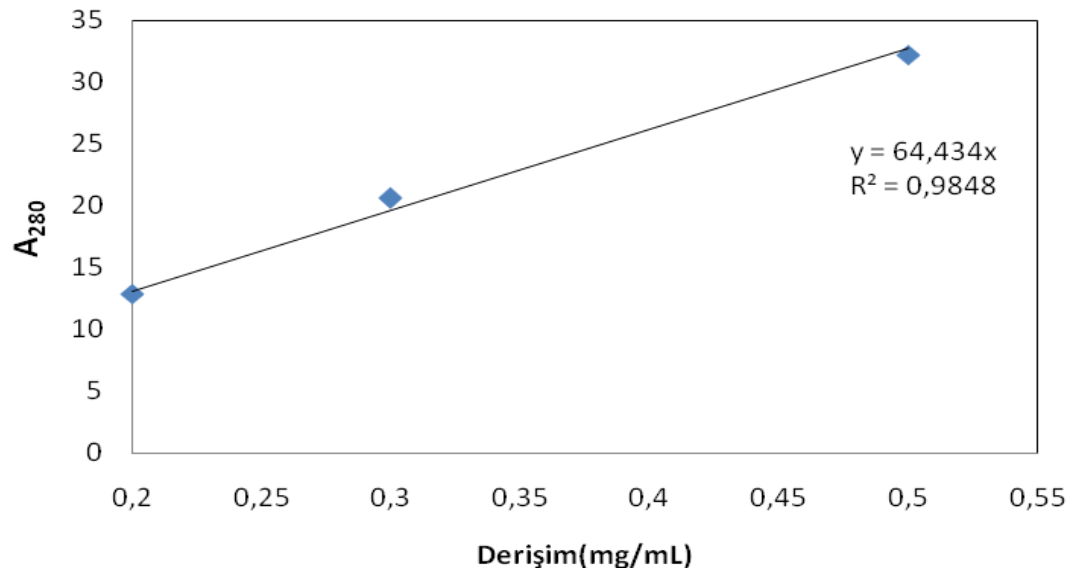
Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenler, standart katma yöntemi ile belirlendikten sonra, kantitatif HPLC analizlerinde kullanılmak üzere belirlenen her bir fenolik bileşenin ayrı ayrı kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Kateşol, 4-metilkateşol, tirozol ve vanilik asitin farklı derişimleri, aynı hacimde 0.005 mg/mL derişime sahip *p*-kumarik asit (iç standart) çözeltisi ile karıştırılarak analizlenmiştir. Her bir fenolik bileşen için üç farklı derişimde çalışılmış, yapılan HPLC analizi sonucu elde edilen kalibrasyon grafikleri aşağıda verilmiştir. Hidroksitirozol ticari olarak elde edilemediğinden ve oleuropeinin asidik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatın (hidroksitirozol) derişimi de bilinmediğinden, hidroksitirozol için kalibrasyon grafiğı çizilememiştir. Bunun yerine hesaplamalarda, kimyasal yapısı oldukça benzer olan tirozol için çizilmiş olan kalibrasyon grafiğı kullanılmıştır.



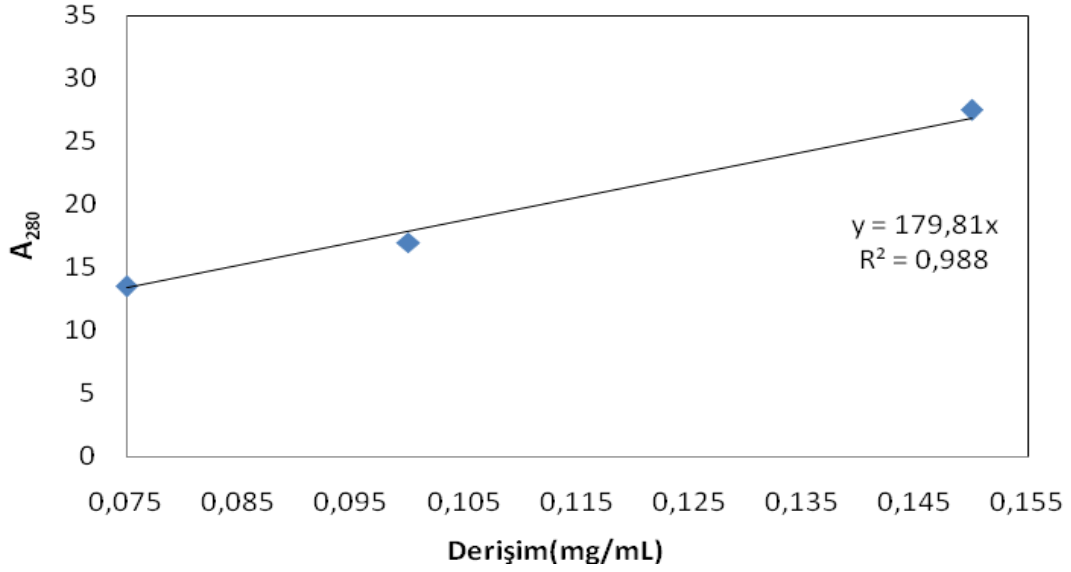
Şekil 4.3 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış kateşol'e ait olan kalibrasyon grafiğı



Şekil 4.4 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış 4-metilkateşol'e ait olan kalibrasyon grafiği



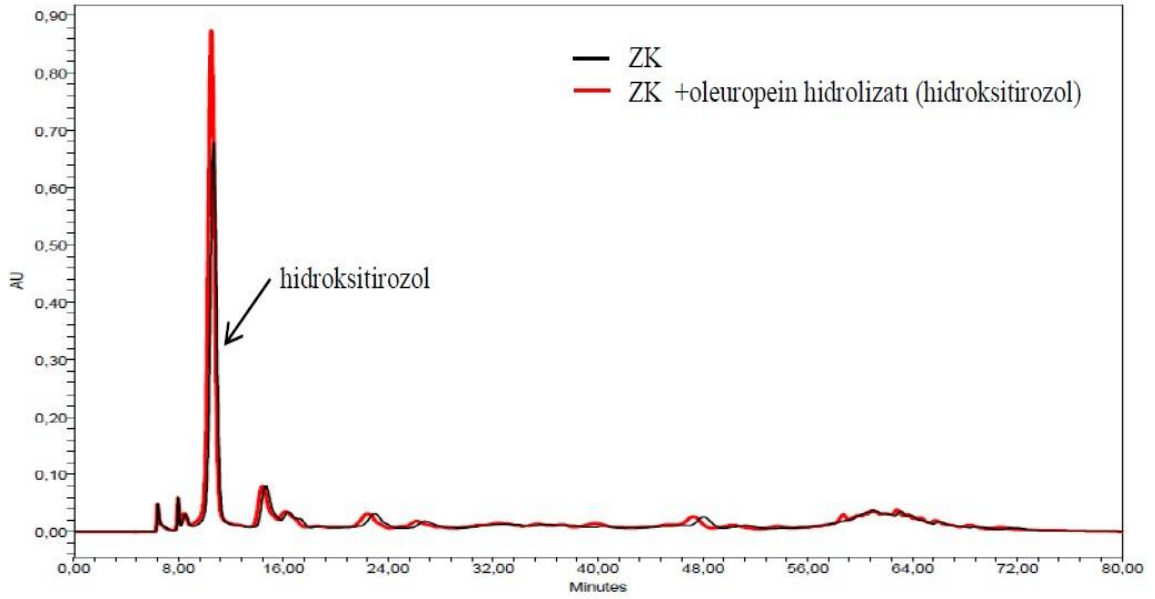
Şekil 4.5 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış tirozol'e ait olan kalibrasyon grafiği



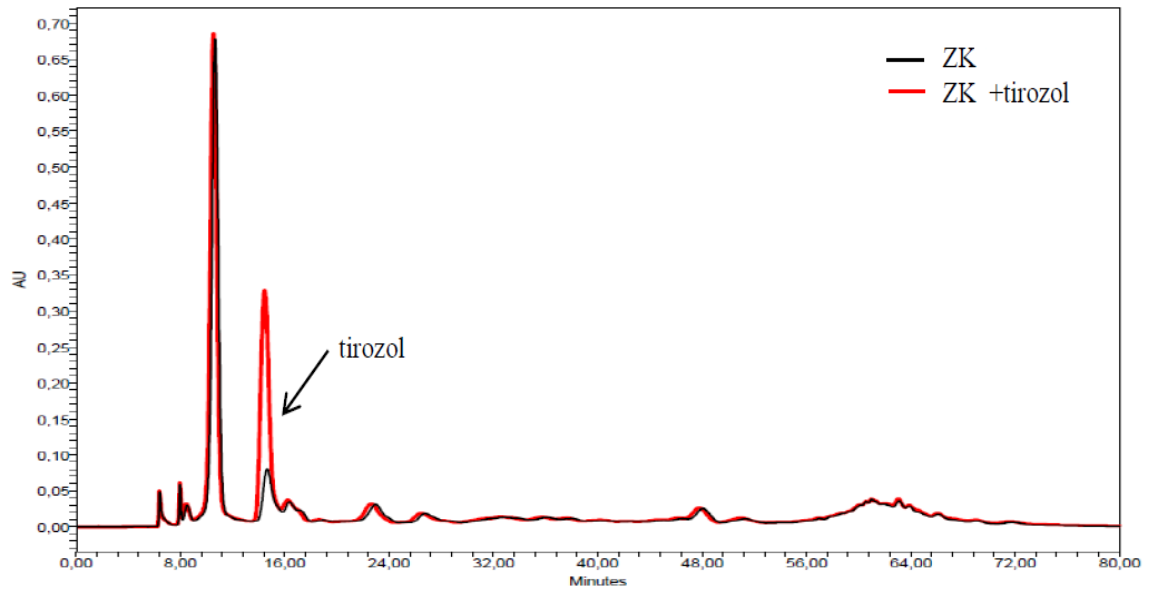
Şekil 4.6 Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış vanilik asit'e ait olan kalibrasyon grafiği

4.2.2 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin HPLC ile Tanımlanması ve Derişimlerinin Belirlenmesi

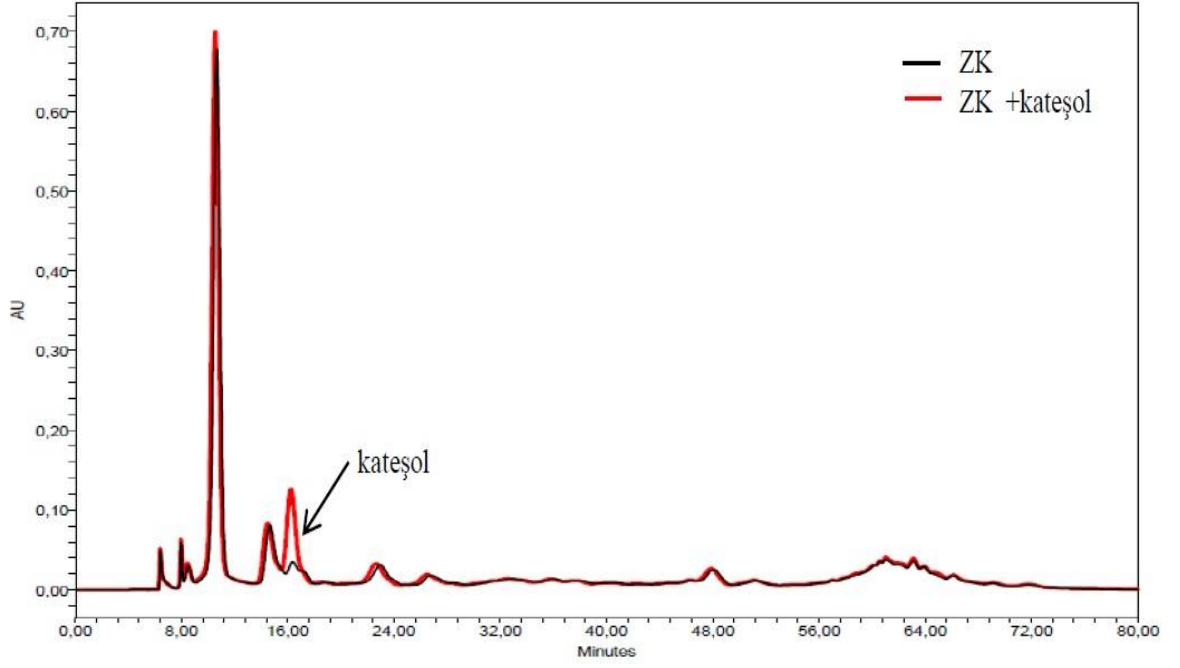
Çalışmada kullanılan zeytin karasuyuna ait ekstraktlar HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiş ve bu örneklerle ait kromatogramlarda bulunan piklerin kalma süreleri ile standartlara ait kalma süreleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonrası tanımlama yapılmak üzere, kalma süreleri örnek piklerinin kalma sürelerine yakın olan standartlar, standart katma yöntemi ile örneklerle eklenerek analizlenmiştir. Bu analizler sonucu karasuda bulunan ve $\lambda=280$ nm'de belirlenebilen fenolik bileşenler tanımlanmıştır (şekil 4.12). Kullanılan zeytin karasularında bulunan fenolik bileşenlerin tanımlanmalarına ait kromatogramlar aşağıda verilmiştir.



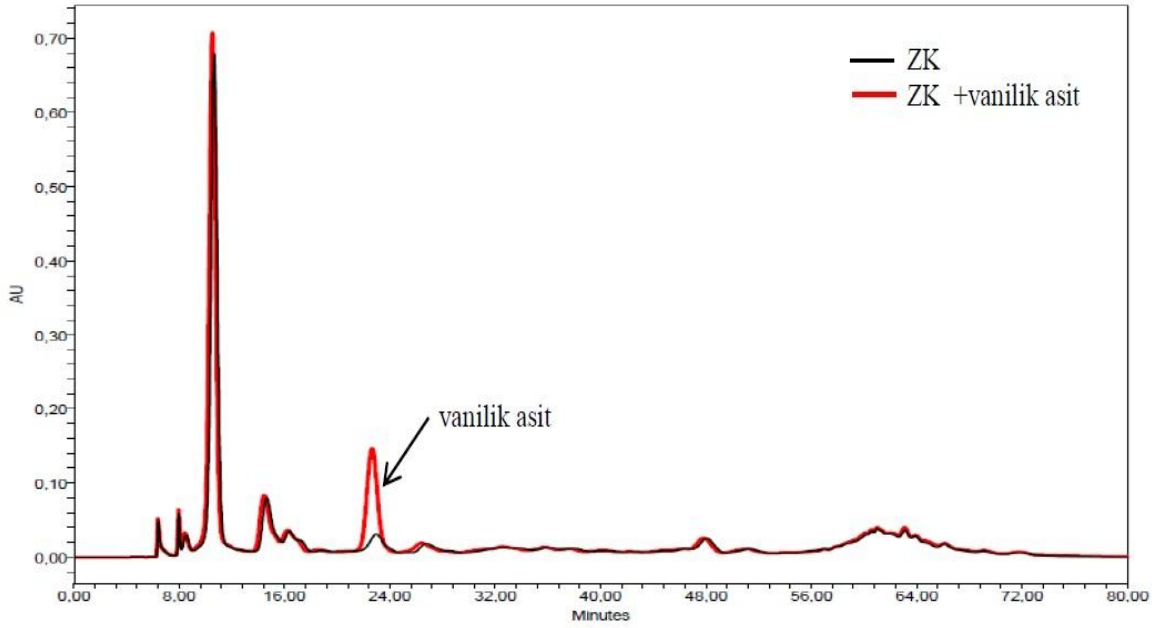
Şekil 4.7 Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol) eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



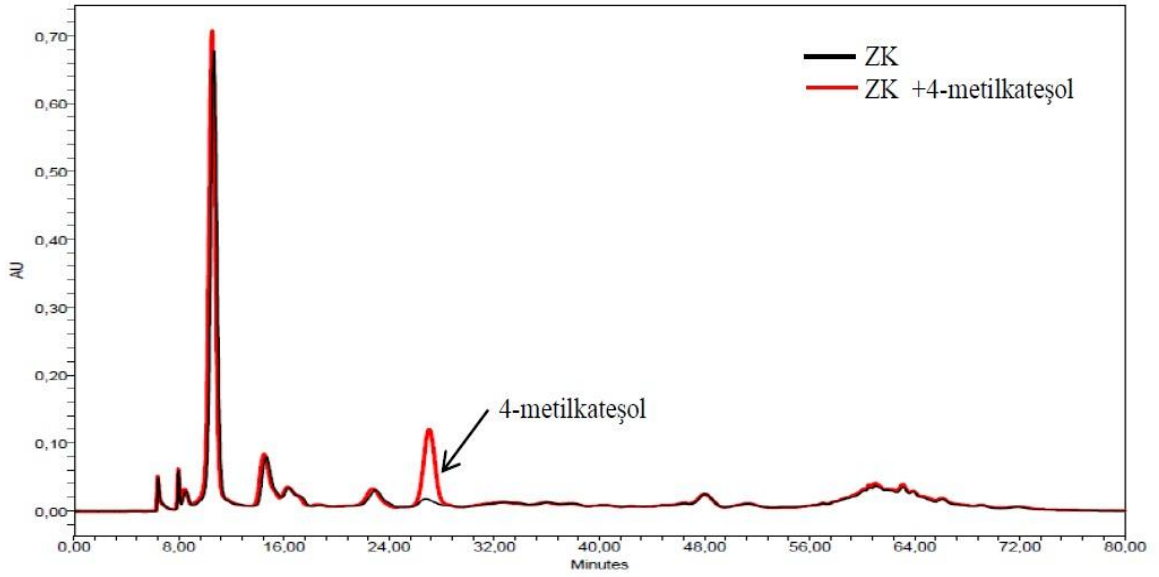
Şekil 4.8 Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına tirozol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



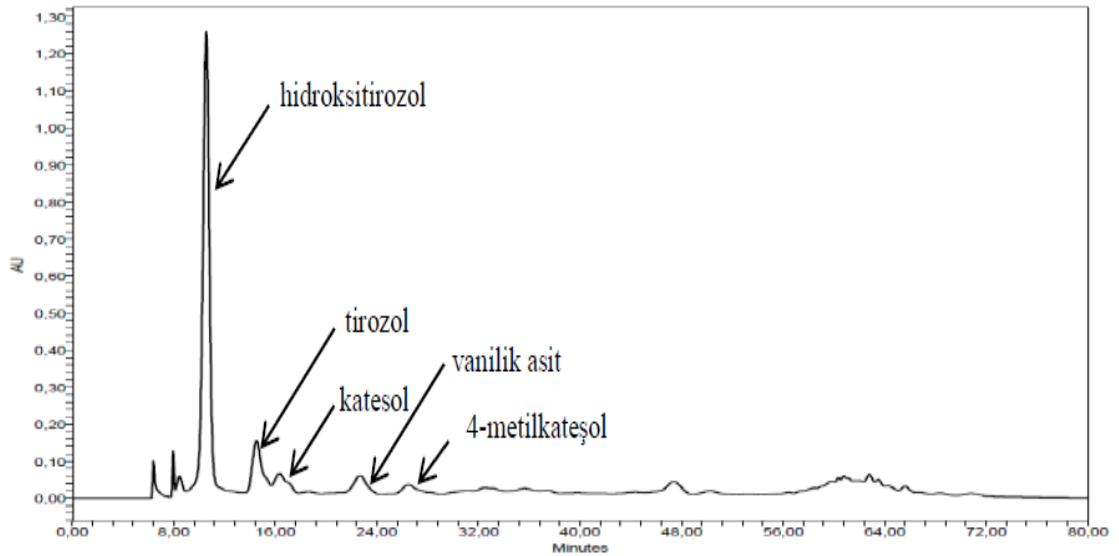
Şekil 4.9 Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına kateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



Şekil 4.10 Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına vanilik asit çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması

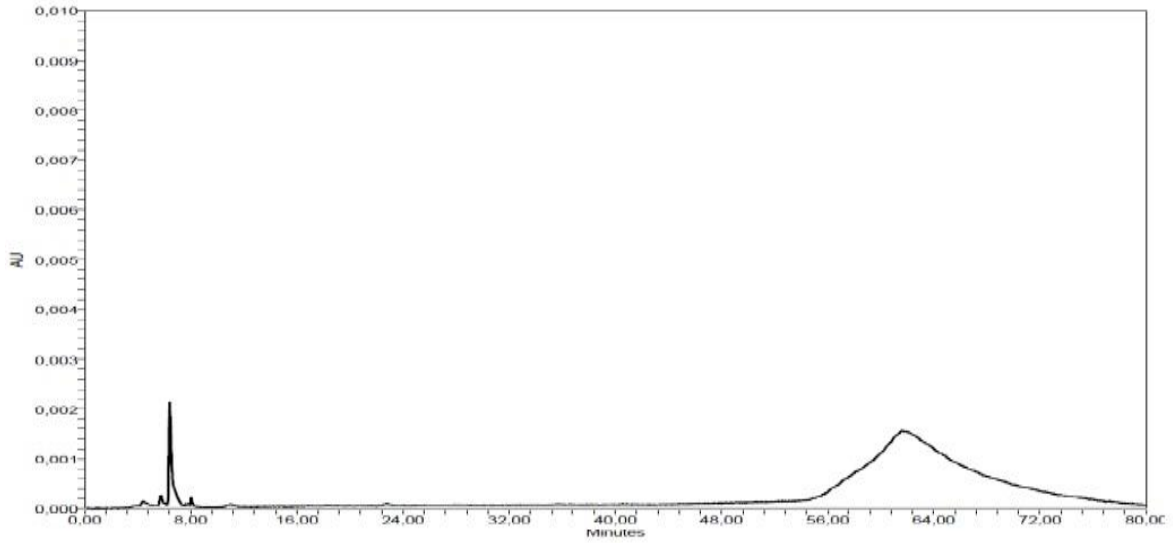


Şekil 4.11 Zeytin karasuyu ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK ekstraktına 4-metilkateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



Şekil 4.12 Zeytin karasuyu ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram

HPLC analizleri için örnek hazırlanırken çözücü olarak kullanılan metanol de kullanılan analiz programıyla analizlenmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen kromatogramlarda, analizin 10. Dk'sına kadar ve 50. Dk'sından sonra görülen tanımsız pikler, metanole ait kromatogramda da görülmüştür (şekil 4.13). Bu nedenle, tanımlanamayan bu piklerin, analizlerde kromatografik saflıkta çözücü kullanıldığı için, kolondan ileri geldiği düşünülmüştür.



Şekil 4.13 HPLC analizlerinde çözücü olarak kullanılan metanole ait kromatogram

Kullanılan zeytin karasuyu ekstraktlarında bulunan fenolik bileşenlerin derişimlerinin belirlenmesi için, örneklere iç standart (0.005 mg/mL *p*-kumarik asit) katılarak, 4.2.1’de verilen kalibrasyon grafiklerine ait denklemlerden, her bir fenolik bileşenin zeytin karasuyu ekstraktındaki derişimi hesaplanmıştır.

Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen derişimler, Çizelge 4. 3’ de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Zeytin karasuyu ekstraktının kantitatif HPLC analizine ait sonuçlar

Fenolik Bileşen	Yapısı	ZK (mg/L)
Hidroksitirozol	<chem>Oc1cc(O)ccc1CCO</chem>	511,6
Tirozol	<chem>Oc1ccc(cc1)CCO</chem>	79,8
Kateşol	<chem>Oc1ccccc1O</chem>	17,1
Vanilik Asit	<chem>COc1cc(O)cc(C(=O)O)cc1</chem>	15,4
4-Metilkateşol	<chem>Cc1ccc(O)c(O)c1</chem>	11,3

Çizelge 4.4 Zeytin karasuyu ekstraktının kantitatif HPLC sonucunun karşılaştırılması

Fenoller (mg/L)	Bu çalışma	[80] (2010) (İtalya)	[79] (2000) (İtalya)	[78] (2007) (İspanya)
Hidroksitirozol	511,6	1112	438	1224
Tirozol	79,8	223	173	145
Kateşol	17,1	-	234	-
Vanilik asit	15,4	-	-	174
4-Metilkateşol	11,3	-	39,2	-

4.2.3 Kantitatif HPLC Analiz Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Kantitatif HPLC analiz yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, çalışmada iç standart olarak kullanılan 0.005 mg/mL derişimindeki *p*-kumarik asit çözeltisi (metanolde) 5 kez HPLC ile analizlenmiştir. Analiz sonucu elde edilen *p*-kumarik aside ait pikin alan değerlerinden ve kalma sürelerinden her ikisi için de standart sapma değerleri aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{ort})^2}{n - 1}}$$

S = standart sapma

x_i = örneğe ait değer

x_{ort} = örneklere ait ortalama değer

n = örnek sayısı

Çizelge 4.5'deki veriler eşitliğe uygulandığında, kantitatif HPLC analizinde elde edilen pike ait standart sapma değeri 9341.223 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), pik alanlarına ait değerlerin ortalamasının % 0.54'üne karşılık gelmektedir.

Çizelge 4.5 Kantitatif HPLC analiz yönteminde elde edilen pike alanının standart sapma değerinin hesaplanması

x_i ($\mu V \times dk$)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
1730889	14280.6	203935536
1708476	-8132.4	66135930
1719462	2853.6	8143033
1716000	-608.4	370150.56
1708215	-8393.4	70449164

Çizelge 4.6 Kantitatif HPLC analiz yönteminde kalma süresine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (dk)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
40.902	0.2678	0.071717
40.347	-0.2872	0.082484
40.581	-0.0532	0.00283
40.678	0.0438	0.001918
40.663	0.0288	0.000829

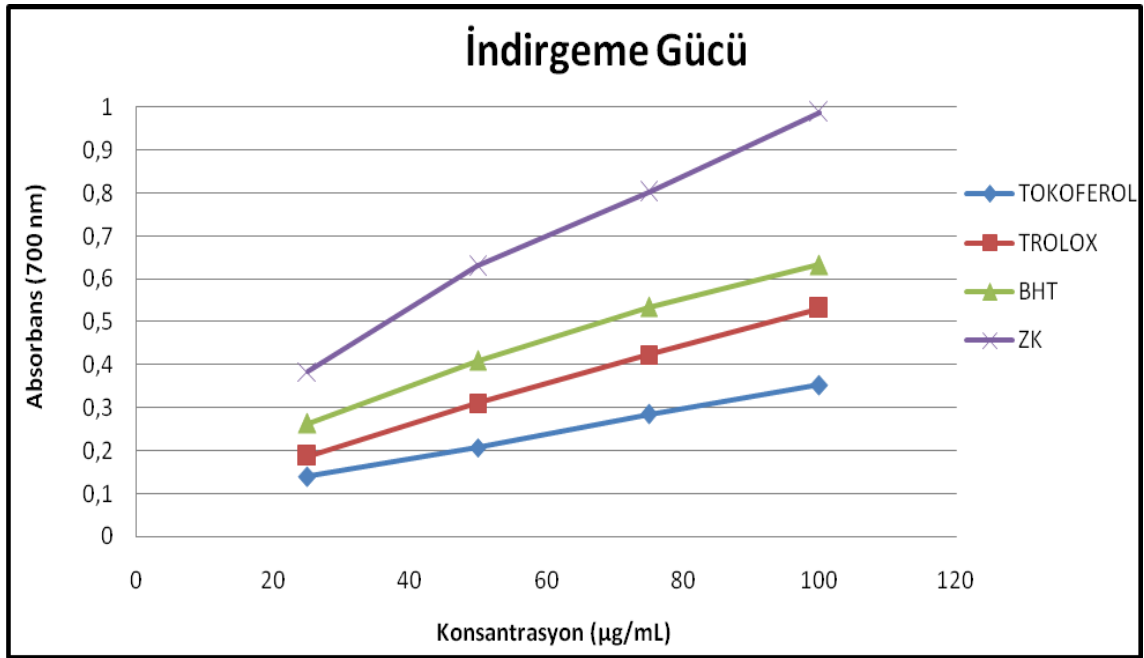
Çizelge 4.6'deki veriler eşitliğe uygulandığında, kantitatif HPLC analizinde kalma süresine ait standart sapma değeri 0.2 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), kalma sürelerine ait değerlerin ortalamasının % 0.49'una karşılık gelmektedir.

4.3 Antioksidan Aktivite

4.3.1 İndirgeme Gücü

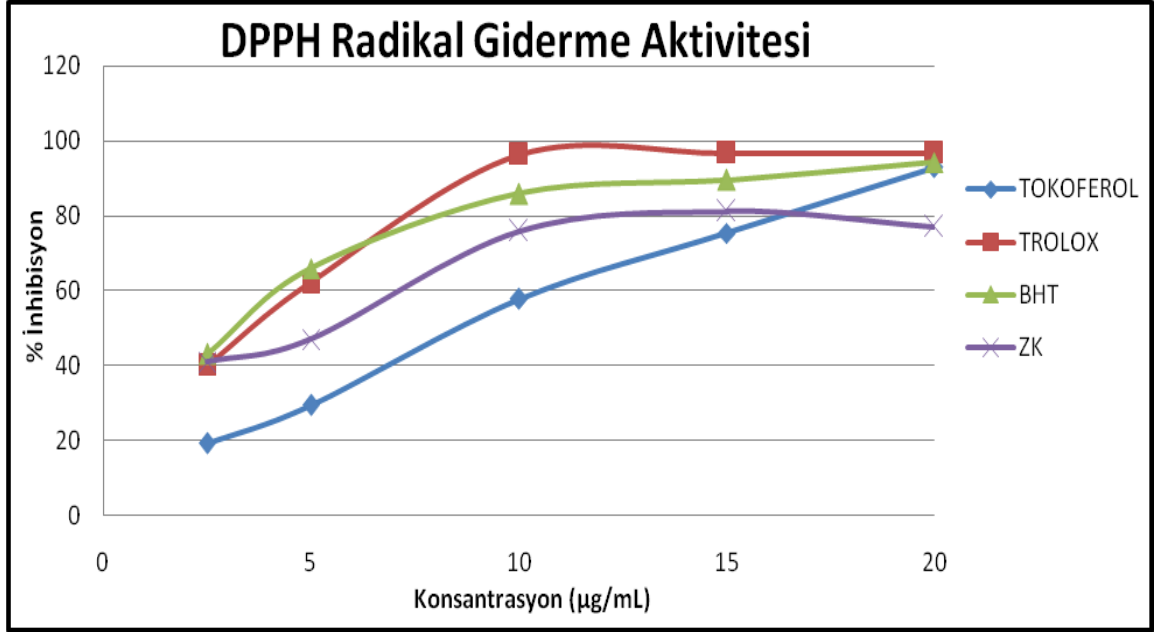
Oyaizu metodu kullanılarak [73] farklı konsantrasyondaki zeytin karasuyunun Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeme gücü kabiliyeti standart antioksidanlarla karşılaştırılarak tayin edildi. Sonuçlar Şekil 4.14' te gösterilmiştir. Absorbans değerlerindeki artış ortamdaki Fe^{+2} miktarı ile doğru orantılıdır. ZK' nun indirgeme gücü standartlara oranla ve her konsantrasyonda daha fazla bulunmuştur. Bu da zeytin karasuyu örneklerinin, elektron verici olarak, serbest radikallerle tepkimeye girdiğini ve onları daha stabil ürünlere dönüştürerek radikal zincir reaksiyonunu sonlandırdığını gösterir.



Şekil 4.14 Zeytin karasuyunun indirgeme gücü

4.3.2 DPPH Radikal Giderme Aktivitesi

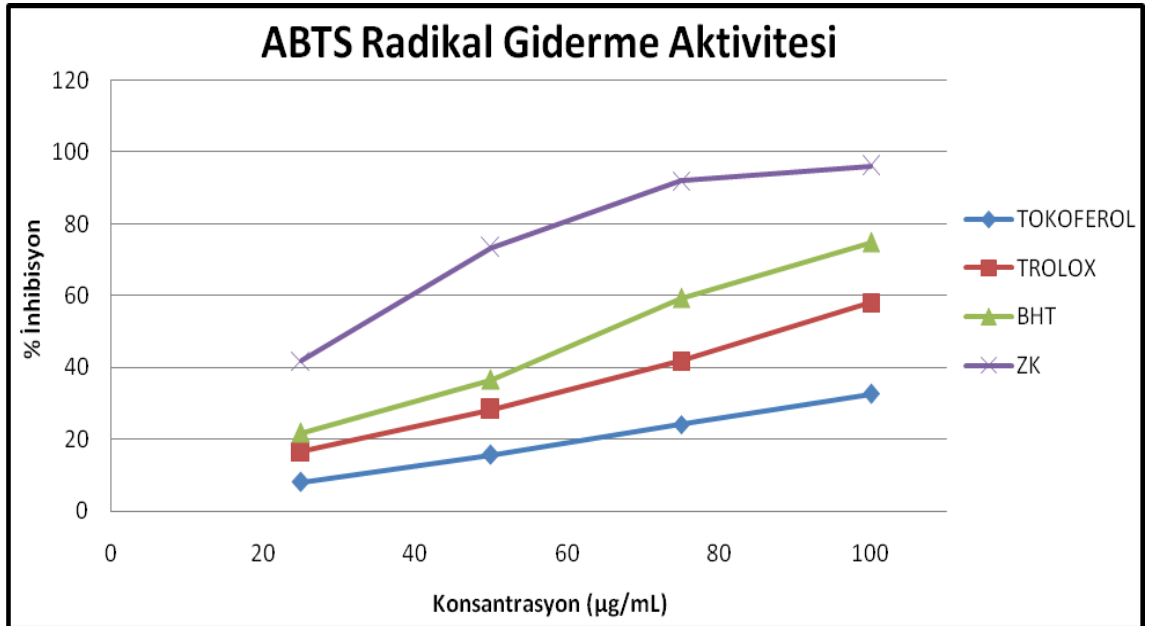
DPPH radikali süpürme aktivitesi tayininde zeytin karasuyu örnekleri ile standart antioksidanların % inhibisyon sonuçları şekil 4.15' te gösterilmiştir. 30 dakika inkübasyon işlemi sonucunda zeytin karasuyunun DPPH radikali süpürme aktiviteleri standart antioksidanlarla karşılaştırılmıştır. 2,5 µg/mL konsantrasyonda ZK'nun DPPH radikali tutucu etkisi %41 olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonda BHT, Trolox ve α -tokoferol 'un etkisi sırasıyla %43, %40 ve % 19,2 'dir. Diğer artan konsantrasyonlarda ise α -tokoferol' den yüksek ve diğer standartlara oldukça yakın sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre zeytin karasuyu oldukça yüksek DPPH radikali tutucu etkiye sahiptir. ZK için, serbest radikalleri süpürücü yeteneğe sahip olduğunu ve neredeyse yapay antioksidanlar kadar serbest radikal tutucu olduğunu ifade edebiliriz.



Şekil 4.15 Zeytin karasuyunun DPPH radikal giderme aktivitesi

4.3.3 ABTS Radikal Giderme Aktivitesi

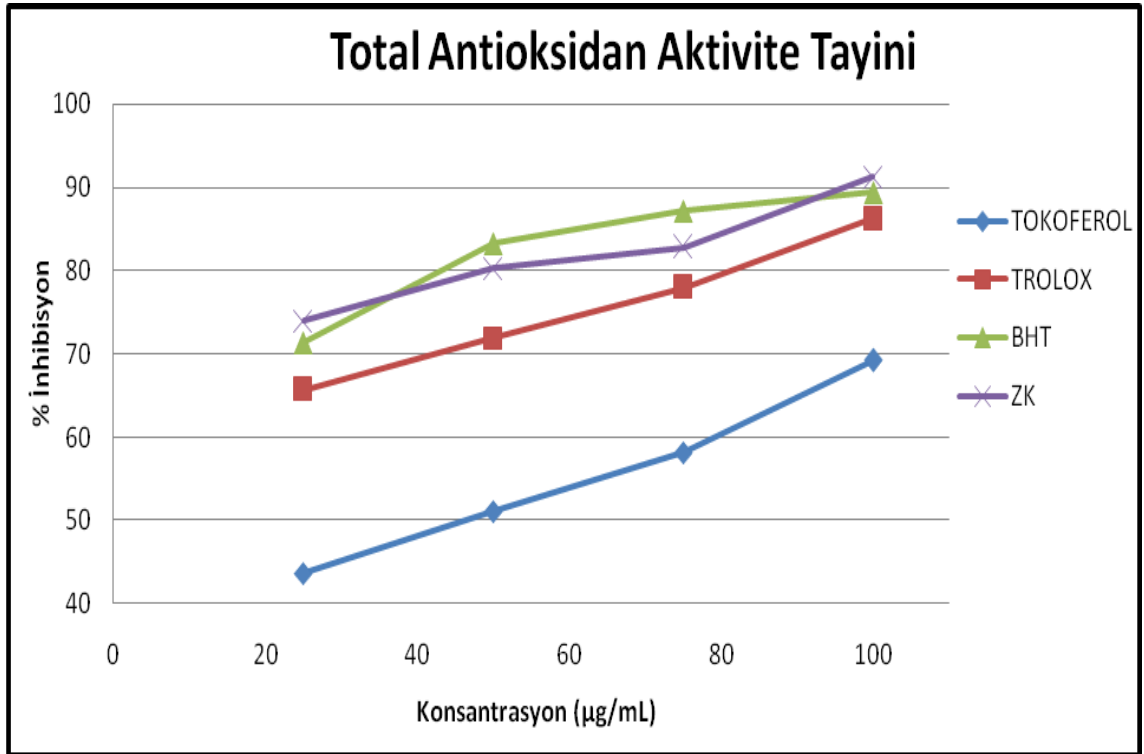
ABTS radikali süpürme aktivitesi tayininde zeytin karasuyu örneği ile standart antioksidanların % inhibisyon sonuçları şekil 4.16' da gösterilmiştir. Hesaplanan % inhibisyon sonuçlarına göre, ZK' nun ABTS radikali süpürme aktivitesi standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında çok daha fazladır. ZK her konsantrasyonda çok yüksek antioksidatif etki göstermiştir.



Şekil 4.16 Zeytin karasuyunun ABTS radikal giderme aktivitesi

4.3.4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini

Antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bu çalışmada ZK'nun toplam antioksidan aktivitesi linoleik asit emülsiyonunda tiyosiyanat metodu ile tayin edildi. Lipid oksidasyonunun ilk aşamalarındaki peroksit miktarı, 24 saat aralıklarla ölçüldü. ZK' nun ve standartların linoleik asit peroksidasyonuna etkileri şekil 4.17' de gösterilmiştir. Standart antioksidanlar ile ZK karşılaştırıldığında, 25 µg/mL ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda %74 ve %91,3 etki ile en yüksek toplam antioksidan aktiviteyi göstermiştir. 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda ise Trolox ve α-tokoferol'den fazla BHT' den biraz az bir aktivite sergilemektedir. Elde edilen sonuçlara göre ZK oldukça yüksek toplam antioksidan etkiye sahiptir.



Şekil 4.17 Zeytin karasuyunun toplam antioksidan aktivitesi

4.4 Genel Değerlendirme ve Öneriler

Akdeniz ülkeleri için önemli endüstriyel proseslerden biri olan zeytinyağı üretimi sonrasında oluşan atıksular, 'karasu' olarak tanımlanmaktadır.

Karasu yüksek organik kirlilik ve fenolik bileşik içermektedir. Bu organik kirlilik yapısında bulunan polifenoller, pektinler, polialkoller ve lipidler oluşturur. Yapılan

çeşitli analizlerde karasuda bulunan başlıca polifenoller; hidroksitirozol, tirozol, kateşol, kafeik asit, 4-metilkateşol, vanilik asit ve para-kumarik asit olarak saptanmıştır.

Bu çalışma kapsamında Ayvalık yöresinde bulunan zeytinyağı üretim tesisinden alınan zeytin karasuyunun pH, askıda katı madde miktarı (AKM), yağ ve gres içeriği, kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ), toplam organik karbon (TOK), toplam azot miktarı ve toplam fenolik bileşik miktarı gibi karakteristik özelliği incelenmiş ve farklı ülkelerdeki zeytinkarasuları ile karşılaştırılmıştır. HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizler ile fenolik bileşikler tespit edilmiş ve miktarları bulunmuştur. Farklı bölgelere göre bu sonuçlar karşılaştırılmıştır. Son olarak indirgeme gücü, toplam antioksidan aktivite tayini, DPPH radikal giderme aktivitesi, ABTS radikal giderme aktivitesi gibi yöntemlerle antioksidan aktivite yeteneği standart antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır.

Öncelikle karasuyun karakterizasyonu incelenmiş; KOİ sonucu 192 g/L , askıda katı madde miktarı 9,8 g/L , yağ ve gres içeriği 13,09 g/L , pH 4,8 , toplam organik karbon miktarı 94,2 g/L , toplam N miktarı 0,623 g/L ve toplam fenolik bileşik miktarı 800 mg/L olarak bulunmuştur. Elde edildikten bu sonuçlar, yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi zeytin karasuyunun yüksek organik içeriğe, asidik bir pH' ya ve fenolik bileşiklere sahip olduğunu göstermektedir.

Esra vd. [77], ülkemizde yaptıkları çalışma sonucu KOİ 103,4 g/L , yağ ve gres içeriği 12,2 g/L , pH 4,5, toplam N miktarı 0,12 g/L ve toplam fenolik bileşik miktarı 1800 mg/L olarak, Mohammed vd. [87] Fransa'da yaptıkları çalışma sonucu KOİ 161 g/L , TOK 78 g/L , pH 4,7, toplam N miktarı 0,59 g/L ve toplam fenolik bileşik miktarı 3900 mg/L olarak bulmuştur. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalara bakıldığında zeytin karasuyu içeriğinin, zeytinin yetiştiği bölgenin özelliklerine göre farklılık gösterdiği görülmektedir.

Zeytin karasuyunun HPLC ile kalitatif ve kantitatif analizi çalışmasında; zeytin karasuyu ekstraktında bulunan fenolik bileşenlere ait piklerin tanımlanabilmesi için, ticari olarak sağlanan standartlar (2,5-dihidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, ferulik asit, gallik asit , 3-hidroksi-4-metoksifenilasetik asit, kafeik asit, kateşol, *p*-kumarik asit, 4-metilkateşol, tirozol (2-(4-hidroksifenil)etanol), vanilik asit) ile çalışmada elde edilen oleuropein hidrolizatı HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiş, yani kolonda kalma süreleri

belirlenmiştir ve böylece fenolik bileşikler tespit edilmiştir. Kantitatif analiz için ekstraktların iç standart yöntemiyle analizi sonrası hazırlanan kalibrasyon grafiklerine ait denklemlerden, her bir fenolik bileşenin zeytin karasuyu ekstraktındaki derişimi hesaplanmıştır. Sonuç olarak hidroksitirozol 511,6 mg/L, tirozol 79,8 mg/L, kateşol 17,1 mg/L, vanilik asit 15,4 mg/L ve 4-metilkateşol 11,3 mg/L olarak tespit edilmiştir.

D'Annibale vd. [79] yaptıkları çalışmalar sonucu olarak hidroksitirozol 438 mg/L, tirozol 173 mg/L, kateşol 234 mg/L, 4-metilkateşol 39,2 mg/L olarak, De Marco vd. [78] ise hidroksitirozol 1224 mg/L, tirozol 145 mg/L ve vanilik asit 174 mg/L olarak bulmuştur.

Bulunan değerler, HPLC sonuçlarının doğruluğunu ve aynı zamanda karasu fenolik bileşik içeriğinin zeytinin yetiştiği bölgeye ait karakteristik özelliklere bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Ayrıca karasuyun yüksek antioksidan aktivite göstermesi, içerdiği hidroksitirozol, tirozol, kateşol gibi antioksidan özellik gösteren fenolik birleşiklerin varlığı ve miktarlarının fazla olmasındandır.

Antioksidan bileşiklerin aktiviteleri, radikal zincir reaksiyonları önleme, radikal giderme veya indirgeme gücü gibi temel antioksidatif özelliklerden kaynaklanmaktadır. Potansiyel antioksidan aktivitenin önemli bir göstergesi indirgeyici güçtür [73]. Zeytin karasuyunun antioksidan aktivite çalışmasında; karasuyun indirgeme gücü, çalışılan tüm konsantrasyonlarda standartlara oranla daha fazla bulunmuştur. İndirgeme gücü, yüksek fenolik bileşen içeriği ile uygunluk göstermektedir. Bunun sonucunda zeytin karasuyunun standart antioksidanlara göre daha fazla indirgeme gücü kapasitesi olduğunu söyleyebiliriz.

Zeytin karasuyunun DPPH radikali süpürme aktiviteleri standart antioksidanlarla karşılaştırılmıştır. 2,5 µg/mL konsantrasyonda zeytin karasuyunun DPPH radikali tutucu etkisi %41 olarak bulunmuştur. Aynı konsantrasyonda BHT, Trolox ve α-tokoferol 'un etkisi sırasıyla %43, %40 ve % 19,2 'dir. Karasuyun düşük konsantrasyonda en iyi DPPH radikali tutucu etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Artan konsantrasyonlarda neredeyse yapay antioksidanlar kadar serbest radikal tutucu etki göstermiştir. Sonuç olarak zeytin karasuyu yüksek derecede serbest radikalleri süpürücü yeteneğe sahiptir. Lafkaa vd. [86] yaptığı çalışmada zeytin karasuyunun DPPH radikali süpürme aktivitesini 20 mg/mL konsantrasyon için %61,1 olarak bulmuştur. Obied vd. [34] ise 5 mg/mL

konsantrasyonda %58,4 inhibisyon olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada ise yukarıdaki konsantrasyonlar karşılaştırıldığında sırasıyla %77 ve %47 olarak inhibisyon değerleri elde edilmiştir.

ABTS radikali süpürme aktivitesi standart antioksidanlarla karşılaştırıldığında; zeytin karasuyu her konsantrasyonda çok yüksek % inhibisyon göstermiştir. ABTS serbest radikali DPPH serbest radikalinden daha reaktiftir. Doğal bileşiklerin serbest radikal giderme aktivitesini belirlemek için genellikle DPPH kullanılmasına rağmen, çözünürlük ve girişim problemi oluştuğunda ABTS serbest radikali giderme etkisine bakılır. ABTS radikal yakalama aktivitesinin yüksek olması antioksidan aktivitenin de yüksek olduğunu gösterir [81]. Zeytin karasuyu doğal ve sentetik antioksidanlara göre çok daha fazla aktivite göstermiştir. Lafkaa vd. [86] ABTS radikali süpürme aktivitesi için yaptığı çalışmada 25 mg/mL konsantrasyonda %36,7 inhibisyon bulurken bu çalışmada elde edilen değer %41,8'dir.

Karasuyun toplam antioksidan aktivitesi standart antioksidanlar ile karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonda (25 µg/mL) ve yüksek konsantrasyonda (100 µg/mL) en yüksek toplam antioksidan aktiviteyi (%74 ve %91,3) göstermiştir. 50 ve 75 µg/mL konsantrasyonlarda ise Trolox ve α -tokoferol'den oldukça fazla, BHT ile hemen hemen aynı aktiviteyi sergilemiştir. Elde edilen sonuçlara göre zeytin karasuyu yüksek antioksidan etkiye sahiptir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; zeytin karasuyu asidik pH'a ve yüksek organik madde içeriğine sahiptir. Ayrıca, askıda katı madde, yağ ve fenolik bileşikleri de yüksek miktarda içermektedir.

Hidroksitirozol, tirozol, kateşol ve vanilik asit gibi antioksidan aktivite gösteren fenolik bileşikleri fazla miktarda bulundurmaktadır ve standart antioksidanlara göre daha fazla antioksidan aktivite göstermiştir. Diğer çalışmalarla da karşılaştırıldığında zeytin karasuyu antioksidan aktivite sonuçları tutarlılık göstermektedir.

Zeytinyağı üreticileri karasu arıtma sistemlerini, çok yüksek maliyete sahip olduğundan dolayı uygulamakta çekinmektedirler. Üretim sırasında zeytinyağı hammaddesi dışında herhangi bir madde kullanılmamasına rağmen, oluşan karasuyun; organik madde içeriği çok yüksektir. Bu göz önüne alınarak, zeytin karasuyu yem sektörü ile hayvan

beslemede yaygın olarak kullanılan antioksidanlara alternatif, doğal antioksidan olarak kullanımlarına yer verilebilir.

Zeytin karasuyunun içerdği fenolik bileşikleri doğal antioksidan veya antimikrobiyal madde kaynağı olarak farklı alanlarda değerlendirmek çevresel, sosyal, ekonomik ve sağlık açısından oldukça önemlidir. Bazı fiziksel ve kimyasal işlemlerle zeytin karasuyundaki antioksidan özellik gösteren maddeler izole edilip gıda, hayvancılık, ilaç vb. alanlarda kullanılabilir. Herhangi bir piyasa değeri olmayan ve çevre için tehdit oluşturan zeytin karasuyundan antioksidan üretimi ülkemiz ekonomisi açısından faydalı olacaktır. Günümüzde doğal antioksidanlara ilgi giderek artmaktadır. Bu çalışmada elde edilen verilere göre zeytin karasuyu sentetik antioksidanlardan daha fazla aktivite göstermiştir.

Karasudaki fenolik bileşiklerin konsantrasyonu 0,5 ile 24 g/L arası değişmektedir [88] ve bu değişim üretim prosesine bağlıdır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre de toplam fenolik bileşik derişimi 800 mg/L iken hidroksitirozol derişimi 511,6 mg/L bulunmuştur. Toplam fenolik bileşiğin %60'ını hidroksitirozol oluşturmaktadır [89]. Zeytinyağının ekstraksiyon işlemi sırasında tüm oleuropeinin %80'i hidroksitirozol'e hidroliz sonucu dönüşmektedir. Bu da hidroksitirozolün zeytin karasuyunda bol miktarda bulunmasını açıklamaktadır. Hidroksitirozol son zamanlara kadar ticari olarak bulunmazken, son zamanlarda araştırmalarda kullanılmak üzere ticari olarak sağlanabilmekte (1000-2000 \$/g) ve antioksidan olarak farklı markalarda piyasada bulunmaktadır [34]. Bu sonuçlar doğrultusunda hidroksitirozol üretimi zeytin karasuyundan gerçekleştirilebilir.

Sonuç olarak maliyet ve çalışma gücünün zeytin karasuyunun arıtımı için harcanması yerine çalışmamız sonucu ön gördüğümüz şekilde değerlendirilmesi çevresel, ekonomik ve sağlık alanında çok daha faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Paraskeva, P. ve Diamadopoulos, E. (2006) "Review technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: areview", Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 81: 1475-1485.
- [2] Tezcan Ün, Ü., Uğur, S. Koparal, A.S. ve Bakır Öğütveren, Ü. (2006) "Electrocoagulation of olive mill wastewaters", Separation and Purification Technology, 52: 136-141.
- [3] Halliwell, B. ve Aruoma, O. I. (1991). "DNA Damage by oxygen-derived species: Its mechanisms and measurement in mammalian systems", FEBS Letters, 281: 9-19.
- [4] Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R. ve Sayadi, S. (2004), "Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol", Applied and Environmental Microbiology, 70 :2105-2109.
- [5] Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlih, F., Riepl, H. ve Azaizeh, H. (2011) "Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater" Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 21 : 1-9.
- [6] Boskou G., Salta F. N., Chrysostomou S., Mylona A., Chiou A. ve Andrikopoulos N. K. (2006), "Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the greek market", Food Chemistry, 94 :558-564.
- [7] Abid, N. ve Sayadi, S. (2006), "Detrimental effects of olive mill wastewater on the composting process of agricultural wastes", Waste Management, 26:1099–1107.
- [8] Aggelis, G., Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V. ve Papanikolaou, S. (2003), "Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process", Water Research, 37:3897-3904.
- [9] Gümüşkesen, S. A. . Zeytinyağı Üretim Teknolojisindeki Gelişmeler. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

(<http://www.zeybir.com/modules.php?name=Forums&file=viewtopic&t=39>)
(Eriřim tarihi: 05/03/2009)

- [10] Adhoum, N. ve Monser. L. (2004), “Decolourization and removal of phenolic compounds from olive mill wastewater by electrocoagulation”, Chemical Engineering and Processing, 43:1281–1287.
- [11] şengöl, F. (1991). Endüstriyel atıksuların özellikleri ve arıtılması. Bölüm 8,Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi Basım Ünitesi,İzmir
- [12] Demcheli, M. ve Bontoux, L. (1996). “Survey current activity on the valorization of by-products from the olive oil industry”, European Comission Joint Research Center, Final Report.
- [13] Masghouni, M. ve Hassairi, M. (2010). “Energy applications of olive oil industry by-products:-1 the exhaust foot cake”, Biomass and Bioenergy, 18: 156-159
- [14] şengöl, F. ve Özer, A. (2003). Zeytin karasuyu arıtımı projesi : Ebso Projesi kapsamındaki zeytinyağı işletmeleri için durum tespiti, karasu karakterizasyonu, karasu arıtılabilirlik çalışmaları, Mühendislik Mimarlık Fakültesi Basım Ünitesi, İzmir
- [15] Garrido-Fernandez, Ruiz-Mendez MV ve Lopez, A. (2008). “Characterization and chemometric study of crude and refined oils from table olive byproducts”, European Journal of Lipid Science, 110: 537-546
- [16] Gariboldi P., Jommi G. ve Verotta I. (1986). “Secoiridoids from Olea-europaea” ,Phytochemistry, 25:865-869.
- [17] Servili M, Taticchi A ve Esposto, S. (2007). “Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil” , Journal of Agricultural and Food Chemistry ,55 :7028-7035
- [18] Vázquez Roncero A. (1978). “Les polyphenols de l’huile d’olive et leur influence surles caracteristiques de l’huile”. Corps Gras, 25: 25–26.
- [19] Lopez R, Cabrera F ve MartinezBordiu A. (1996). “Land treatment of olive oil mill wastewater”. Biodeterioration and Biodegradation 38: 215-225
- [20] McNamara J C., Anastasiou C C., O Flaherty V. ve Mitchell R. (2008). “Bioremediation of olive mill wastewater”. International Biodeterioration and Biodegradation, 61:127–134.
- [21] Bontoux, J. ve Courtois, G. (1996). “Wastewater reuse for irrigation in France”. Water Science and Technology , 33: 45-49
- [22] Paraskeva, P. ve Diamadopoulos, E. (2006), “Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review”, Journal Chemical Technology and Biotechnology, 81:1475-1485.
- [23] Pompei D. ve Rivier E. (1974). “Charge-Distribution in lines and nonhomogeneous microband couplers” , Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de L academie Des Siences Serie, 278: 755-758

- [24] Fiestas , Borja R., Martin A., Maestro R. ve Alba, J. (1992). "Enhancement of the anaerobic digestion of olive mill wastewater by the removal of phenolic inhibitors". *Process Biochemistry*, 27:231-237
- [25] Steegmans, M., Illaens, S. ve Hoebregs, H. (2004). "Enzymatic, spectrophotometric determination of glucose, fructose, sucrose, and Inulin/Oligofructose in foods". *Journal of Aoac International*, 87:1200-1207
- [26] Hamdi, M. ve Garcia, J.L. (1993) "Anaerobic digestion of olive mill wastewaters after detoxification by prior culture of *Aspergillus niger*". *Process Biochemistry*, 28: 155-159.
- [27] Andreozi R., Longo G., Majone M. ve Modesti, G. (1998). "Integrated treatment of olive oil mill effluents (OME): study of ozonation coupled with anaerobic digestion". *Water Research*, 32: 2357-2364
- [28] Bettazzi E, Morelli M ve Caffaz S. (2006). "Olive mill wastewater treatment: an experimental study". *Water Science and Technology* 54: 17-25
- [29] Hodaifa, G., Martinez, M.A. ve Sanchez, S. (2009), "Daily doses of light in relation to the growth of *scenedesmus obliquus* in diluted three-phase olive mill wastewater", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84:1550-1558.
- [30] Bouaziz, M., Grayer, R.J., Simmonds, M.S.J., Damak, M. ve Sayadi, S. (2005). "Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53: 236-241.
- [31] Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni,S., Corogiu, F. P., Dessi, M. A. ve Aeschbach, R. (1998). "Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 5181-5187.
- [32] Fki, I., Allouche, N. ve Sayadi, S. (2005). "The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants", *Food Chemistry*, 93: 197-204.
- [33] Cardinali, A., Linsalata, V., Lattanzio, V. ve Feruzzi, M.G. (2011). "Verbascosides from olive mill waste water:Assessment of their bioaccessibility and intestinal uptake using an *in vitro* digestion/Caco-2 model system". *Journal of Food Science*, 76: 48-54.
- [34] Obied, H.K., Karuso, P. ve Robards, K. (2007). "Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55: 2848-2853.
- [35] Azbar, N., Keskin, T. ve Çatalkaya, E.C. (2008), "Improvement in anaerobic degradation of olive mill effluent (OME) by chemical pretreatment using batch systems", *Biochemical Engineering Journal*, 38:379-383.

- [36] Hanafi, F., Assobhei, O. ve Mountadar, M. (2010), "Detoxification and discoloration of moroccan olive mill wastewater by electrocoagulation", Journal of Hazardous Materials, 174:807–812
- [37] Halliwell B. ve Gutteridge, J. M. C. (1984). "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease", Biochemical Journal, 219:1-14.
- [38] Altınışık M. (2000). Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın.
- [39] Akkuş, İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 5. Sağlık Dizisi, Mimoza Yayınlar, Konya.
- [40] Kılınç K. ve Kılınç A. (2002). "Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri", Hacettepe Tıp Dergisi, 33: 110-118.
- [41] Ozan, E., Koyutürk, L. ve Sapmaz, T. (2004). "Börek iskem-reperfüzyon hasarında antioksidan olarak kullanılan prostoglandin E1(PGE1) kullanımının incelenmesi", Fırat Tıp Dergisi, 9: 67-71.
- [42] Heves, M.D. (2008). Akyıldız (*Ornithogalum sigmoideum* Freyn Et Sint.)'ın Antioksidan Aktivitesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [43] Dursun, İ. (2011). *Butomus umbellatus*. L ve *Sparganium emersum* Rehmann Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitelerinin Tayini ve Fenolik Asit İçeriklerinin HPLC-UV İle Analizi, Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kars.
- [44] Islekel, S., Islekel, H., Güner, G. ve Özdamar, N. (1999). "Evaluation of lipid peroxidation, cathepsin and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia–reperfusion", Brain Research, 843: 18-24.
- [45] Golden, T., Hinerfeld, D.A. ve Melov, S. (2002). "Oxidative stress and aging:beyoncorrelation", Aging Cell, 1: 117-123.
- [46] Slater, T.F., Cheeseman, K.H., Davies, M.J., Proudfoot, K. ve Xin, W. (1987). "Free radical mechanisms in relation to tissue injury", Proceedings of The Nutrition Society, 46:1-12.
- [47] Wallace, S. (2002). "Biological consequences of free radical-damaged DNA bases", Free Radical Biology and Medicine, 33: 1-14
- [48] Nagai, T., Myoda, T. ve Nagashima, T. (2005). "Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense*". Food Chemistry, 91: 389-394.
- [49] Prior, R.L. ve Cao, G. (1999). "In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods". Free Radical Biology and Medicine, 27:1173-1181.
- [50] Kaur, C. ve Kapoor, H. C. (2001). "Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables". International Journal of Food Science and Technology. 37:153-161.

- [51] Cuttler, R.G. ve Pryor, W.A. (1984). "In free radical in biology". Free Radicals in Biology, 6: 371-423.
- [52] Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J. ve Jiang, Y. (2003). "Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay". Nutrition Research, 23:1719-1726.
- [53] Frankel, E.N. (1999). "Natural phenolic antioxidants and their impact on health. Academic Press, Antioxidant Food Supplements in Human Health", 12:385-392.
- [54] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. ve Özyurt, D. (2007). "Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay". Molecules, 12:1496-1547.
- [55] Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease, curiosity", Cause or Consequence Lancet, 344: 721-724.
- [56] McCord, J. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress", American Journal of Medicine, 108: 652-659.
- [57] Keskin, H. ve Erkmen G. (1987). Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.
- [58] Kim, D.-O. ve Lee, C.Y. (2004). "Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 44:253-273.
- [59] Dimitrios, B. (2006). "Sources of natural phenolic antioxidants". Trends in Food Science & Technology, 17: 505-512.
- [60] Nichenametla, S.N., Taruscio, T.G., Barney, D.L., ve Exon, J. H. (2006). "A review of the effects and mechanisms of polyphenolics in cancer". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 46: 161-183.
- [61] Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Révész, C., ve Jiménez, L. (2005). "Dietary polyphenols and the prevention of diseases". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45:287-306.
- [62] Anıl, M. (2006). "Antioksidan olarak tahıllar". Hububat Ürünleri Teknolojisi Kongre ve Sergisi, Gaziantep.
- [63] Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K. ve Stockmann, R. (2005). "Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste". Journal of Agriculture and Food Chemistry, 53: 823-837.
- [64] Niaounakis, M. ve Halvadakis, C.P. (2006). "Olive processing waste management literature review and patent survey". 2nd ed. Waste Management Series, 5:23-64.
- [65] Morillo, J.A., Antizar-Ladisla, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A. ve Russell, N.J. (2011). "Bioremediation and biovalorisation of

- olive-mill wastewater application". *Microbiology and Biotechnology*, 82: 25-39.
- [66] Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R. ve Sayadi, S. (2011). "Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol". *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2105-2109.
- [67] Khoufi, S., Hamza, M. ve Sayadi, S. (2011) "Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment". *Bioresource Technology*, 102: 9050-9058.
- [68] Standart methods for the examination of water and wastewater, (1998), 20th Edition, American Public Health Association, Washington, USA.
- [69] Bremner, J.M. (1965). Total nitrogen. in: C.A. Black et al. (ed). *Methods of soil analysis, Part 2*. Agronomy 9:1179-1237. American Society of Agronomy, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [70] Slinkard K. ve Singleton V.L. (1977), "Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. ", *American Journal of Enology Viticulture*. 28: 49.
- [71] Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S. ve Hamdi, M. (2005). "Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. " *Letters in Applied Microbiology*, 40: 7-11.
- [72] Walter, W. M., JR., Fleming, H. P. ve Etchells, J. L. (1973). "Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives'. *Applied Microbiology*, 26: 773-776.
- [73] Oyaizu, M. (1986). "Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine", *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- [74] Scalzo, R.L. (2008), "Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid" , *Food chemistry*, 107:40-43.
- [75] Soares, J. R., Dinis, T.C., Cunha, A.P ve Almedia, L.M. (1997), "Antioxidants activities of some extract of *Thymus zygis*", *Free Radical Research*, 26:469-478.
- [76] Pitwell, L.R. (1983). Standard COD. *Chemical in Britain* ,19: 907.
- [77] Esra S., Aktaş, Sedat, İ. ve Lale, A. "Characterization and lime treatment of olive mill wastewater" , (2000), *Water Resource*, 35:2336-2340
- [78] De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A. ve Sacchi, R. (2007), "Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters", *Food Chemistry*, 104:858–867

- [79] D'Annibale, A., Stazi, S.R. ve Vinciguerra, V. (2000) "Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater", *Journal of Biotechnology*, 54:265–273
- [80] A.Cardinali, N. Cicco, Vito Linsalata, Fiorenza Minervini ve S. Pati. (2010), "Biological Activity of High Molecular Weight Phenolics from Olive Mill Wastewater", *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58:8585–8590.
- [81] Lambeth, J.D. (2004), "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen", *Nature Reviews Immunology*, 4: 181-189.
- [82] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. ve Berset, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity", *Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- [83] Smet, K., Raes, K., Block, J.D., Herman, L., Dewettinck, K. ve Coudijzer, K. (2008). "A change in antioxidative capacity as a measure of onset to oxidation in pasteurized milk", *International Dairy Journal*, 28: 520-530.
- [84] Arnao, M.B., Cano, A. ve Acosta, M. (2001). "The Hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity", *Food Chemistry*, 73: 239-244.
- [85] Osawa, T. ve Namiki, N. (1981). "A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves", *Agricultural Biology and Chemistry*, 45: 735-739.
- [86] Lafkaa, T., Andriana, E. Lazoub ve Vassilia, J. S. (2011) "Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes", *Food Chemistry*, 125:92–98
- [87] Mohammed, H., Soumia, A. ve Jean-Claude, R. (2005), "Structural characterization of olive mill waster-water after aerobic digestion using elemental analysis", *FTIR and 13C NMR Process Biochemistry*, 40: 2615–2622
- [88] Ragazzi, E. ve Veronesse, G. (1967). "Recherche sulle fenolissidasi e sul contenuto in o-difenoli dele olive". *Annals Chimica*, 57:1456-1492.
- [89] Florin, D.D. ve Dimitris, P. M. (2013). "Removal of olive mill wastewater phenolics with the use of a polyphenol oxidase homogenate from patota peel waste ". *Journal of Waste Management* , 2013: 7-11
- [90] Lucas, M.S., Beltrán-Heredia, J., Sanchez, M.J., Garcia, J. ve Peres, J.A. (2013), " Treatment of high strength olive mill wastewater by Fenton's reagent and aerobic biological process ". *Journal of Enviromental Science and Health*, 48: 954-962

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Alper BABADOSTU
Doğum Tarihi ve Yeri : 08-05-1988 / Malatya
Yabancı Dili : İngilizce / Yunanca
E-posta : alperbabadostu@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyokimya	Ege Üniversitesi	2011
Lise	Fen/Matematik	Ayvalık Anadolu Lisesi	2006

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2011-2012	MedSanTek	Laboratuvar Analisti ve Ürün menejeri
2013	Yudum A.Ş.	Kalite Kontrol Analisti