

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL YAĞLARIN OZONLANMASI
VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Evren ERDEM

**Anabilim Dalı : Kimya
Program : Organik Kimya**

MANİSA 2010

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİTKİSEL YAĞLARIN OZONLANMASI
VE
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Evren ERDEM

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27.06. 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 16.08. 2010

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Kadir ARISOY

Diğer Jüri Üyeleri : Yrd. Doç. Dr. M.Sabih ÖZER

: Yrd. Doç. Dr. Şerafettin DEMİÇ

MANİSA 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. ÇALIŞMANIN AMACI	2
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	3
2.1. OZON	3
2.1.1. Fiziksel Özellikleri.....	5
2.1.2. Kimyasal Özellikleri	6
2.1.2.1. İnorganik Bileşikler İle Reaksiyonları	7
2.1.2.2. Organik Bileşikler İle Reaksiyonları	8
2.2. OZONLAMA	9
2.2.1. Bitkisel Yağların Ozonlanması	10
2.2.2. Ozonun Bitkisel Yağlar İle Reaksiyonu – Criegee Mekanizması	11
2.2.3. Ozonlanmış Bitkisel Yağlar İle İlgili Çalışmalar.....	13
2.3. KULLANILAN BİTKİSEL YAĞLAR.....	15
2.3.1. Pirinç Ve Pirinç Kepeği.....	15
2.3.1.1. Pirinç	15
2.3.1.1.a. Pirincin Kullanım Alanları	16
2.3.1.1.b. Dünya’ da Ve Türkiye’ de Pirinç Üretimi	16
2.3.1.2. Pirinç Kepeği	17
2.3.1.2.a. Pirinç Kepeğinin Kimyasal Bileşimi	17
2.3.1.2.b. Pirinç Kepeğinin Faydaları	18

2.3.2. Piriñ Kepeği Yağı.....	18
2.3.2.1. Piriñ Kepeği Yağının Bileşimi.....	19
2.3.2.1.a. γ -Oryzanol Ve Vitamin E.....	19
2.3.2.2. Piriñ Kepeği Yağının Ekstraksiyonu Ve Rafinasyonu	21
2.3.3. Fındık Ve Fındık Yağı	23
2.3.3.1. Fındığın Ve Fındık Yağının Kimyasal Bileşimi.....	24
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. MATERYAL	25
3.2. METOT	25
3.2.1. İşlemler.....	25
3.2.1.1. Piriñ Kepeği Yağı Ekstraksiyonu	25
3.2.1.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıların Giderilmesi	26
3.2.1.3. Bitkisel Yağların Ozonlanması İşlemi.....	26
3.2.2. Analizler	27
3.2.2.1. Kimyasal Özellikleri	27
3.2.2.1.a. Asit Sayısı	27
3.2.2.1.b. İyot Sayısı	28
3.2.2.1.c. Peroksit Sayısı	28
3.2.2.2. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi.....	29
3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi.....	29
3.2.3.1. Agar Difüzyon Yöntemi	29
3.2.3.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC)' ların Belirlenmesi	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	33
4.1. İŞLEMLER.....	33
4.1.1. Piriñ Kepeği Yağı (RBO) Ekstraksiyonu Bulguları Ve Tartışması	33
4.1.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıların Giderilmesi Bulguları Ve Tartışması.....	33
4.1.3. Ozonlama İşlemi Bulguları Ve Tartışması.....	34
4.2. ANALİZLER.....	44

	Sayfa
4.2.1. Peroksit, Asit Ve İyot Sayıları Analiz Bulguları Ve Tartışması	44
4.2.2. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi Bulguları Ve Tartışması	44
4.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi Bulguları Ve Tartışması	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	51
5.1. SONUÇ	51
5.2. ÖNERİLER	52
6. KAYNAKLAR	53
7. ÖZGEÇMİŞ	58

ÖZET

Bu çalışmada kullanılan pirinç kepeği yağı % 37 oleik asit (C18:1) ve % 42 linoleik asit (C18:2), fındık yağı ise % 79 oleik asit (C18:1) ve %13 linoleik asit (C18:2) içermesi yönünden doymamış yağ asitlerince oldukça zengin bitkisel yağlardır.

Bu çalışmada, bitkisel yağların ozonlanarak yapılarının modifiye edilmesi ile antimikrobiyal aktiviteleri incelendi. Fındık yağının ozonlanması sonucu kayda değer bir değişme gözlenmedi. Pirinç kepeği yağının ozonlanması sonucu elde edilen, ozonlanmış pirinç kepeği yağı (ORBO)'nın peroksit sayısı 10,21 mmol-equiv.Kg⁻¹'den 972,71 mmol-equiv.Kg⁻¹'e çıkmıştır. ORBO'nun minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerleri 0,73 – 1,88 mg/mL arasında kullanılan test mikroorganizmasına göre değişmiştir. Böylece, en iyi MIC değerinin Enterobacter aerogenes üzerinde (0,73 mg/mL) olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Pirinç Kepeği Yağı, Fındık Yağı, Ozon, Ozonlama, Antimikrobiyal Aktivite, RBO, HO.

ABSTRACT

In this study in used; rice bran oil (RBO) containing 37% oleic acid (C18:1) and 42% linoleic acid (C18:2) and hazelnut oil (HO) containing 79% oleic acid (C18:1) and 13% linoleic acid (C18:2) are quite great vegetable oils owing to the unsaturated fatty acid.

Antimicrobial activities has been examined by modifying to ozonize the structure of these oils. Any appreciable variation has not been observed, considering to ozonize the hazelnut oil (OHO). Also peroxide value of ozonized rice bran oil (ORBO) has increased from 10,21 mmol-equiv.kg⁻¹ to 972,71 mmol-equiv.kg⁻¹, considering to the conclusion of ozonation of the rice bran oil. It has observed that minimum inhibition concentration (MIC) values of ORBO has changed by test microorganism whose value is between 0.73 and 1.88 mg/ml, so optimum MIC value has been observed on *Enterobacter aerogenes* (0.73 mg/ml).

Keywords: Rice Bran Oil, Hazelnut Oil, Ozone, Ozonize, Antimicrobial activity, RBO, HO.

TEŞEKKÜR

Çalışmaların sırasında yardımını ve bilgilerini benden esirgemeyen, yol göstericim olan çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Kadir ARISOY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Özellikle antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi çalışmalarında bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen, bana ikinci bir danışman hoca gibi davranan Sayın Dr. Mustafa OSKAY'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Mustafa ESKİCİ, Sayın Dr. Kadir AY ve Sayın Arş. Gör. Cengiz SARIKÜRKÇÜ başta olmak üzere, üzerimde emeği olan tüm Kimya Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar sırasında, ozonlama işlemleri hakkında verdikleri teorik ve pratik bilgilerin yanı sıra, bana kapılarını açan, deneysel çalışmalarım sırasında gerekli teknik donanımı koşulsuz sağlayan Ozon Marine (*İzmir – Türkiye*) firmasına ve tüm çalışanlarına çok teşekkür ederim.

En son olarak da kuşkusuz ki, hem maddi hem manevi desteklerini hiç bir konuda esirgememiş olan ve beni bugünlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Haziran – 2010

Evren ERDEM

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Ozon Molekülü	3
Şekil 2.2. Atmosfer Tabakaları	3
Şekil 2.3. Ozonun Atmosferde Oluşumu	4
Şekil 2.4. Ozonun Oluşum Reaksiyonu	4
Şekil 2.5. Corona Deşarj Sistemi	5
Şekil 2.6. Ozonun Kimyasal Formülü Ve Bağ Açısı	6
Şekil 2.7. Ozonun Lewis Yapısı	7
Şekil 2.8. Ozonun Doymamış Yağ Asitleri İle Reaksiyonu, Criegee Mekanizması	11
Şekil 2.9. Ozonun Metil Linoat İle Reaksiyonu Sonucu Oluşan Oksijenlenmiş Bileşikler.....	12
Şekil 2.10. Çeltik Bitkisi	15
Şekil 2.11. Yağlı Ve Yağı Alınmış Pirinç Kepeği	17
Şekil 2.12. Rafine Edilmiş Pirinç Kepeği Yağı.....	19
Şekil 2.13. γ -Oryzanolun Kimyasal Yapıları.....	20
Şekil 2.14. Vitamin E' nin Kimyasal Yapısı	21
Şekil 4.1. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağının (dRBO) 3 Saat Ozonlanmasının Görsel Takibi (ORBO3h).....	35
Şekil 4.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağının (dRBO) 40 Dakika Ozonlanmasının Görsel Takibi (ORBO30min).....	40
Şekil 4.3. ORBO' nun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	49
Şekil 4.4. ORBO' nun Bazı Mikroorganizmalar Üzerine İnhibisyon Etkisi.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Ozonlanmış Ayçiçeği Ve Zeytinyağının Antimikrobiyal Aktiviteleri	14
Çizelge 2.2. Türkiye' de Yıllara Göre Çeltik Ve Pirinç Üretimi	16
Çizelge 2.3. Farklı Çözücü Oranlarında Ve Farklı Sıcaklıklarda Ekstrakte Edilen Ham Yağı, Vitamin E Ve Oryzanol Miktarları	22
Çizelge 2.4. Pirinç Kepeği Yağının Kimyasal Rafinasyonu Sırasında Sabunlaşmayan Bileşenlerdeki Değişim	23
Çizelge 2.5. Pirinç Kepeği Yağının Kimyasal Rafinasyonu Sırasında Tokoferollerin Yüzdesel Bileşimi	23
Çizelge 2.6. Türkiye' de Yıllara Göre Fındık Üretimi.....	23
Çizelge 2.7. Fındık Yağının Tokol Bileşimi	24
Çizelge 3.1. Ozon Jeneratörünün Özellikleri.....	27
Çizelge 3.2. Beklenen İyot Sayısına Göre Kullanılacak Numune Miktarı	28
Çizelge 3.3. Gaz Kromatografisinin Çalışma Şartları.....	29
Çizelge 4.1. Ham Pirinç Kepeği Yağı Miktarı Ve Verimi	33
Çizelge 4.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağının Miktarı Ve Verimi	34
Çizelge 4.3. Peroksit, Asit Ve İyot Sayıları.....	44
Çizelge 4.4. Pirinç Kepeği Yağı Ve Fındık Yağının Yağ Asidi Kompozisyonları	45
Çizelge 4.5. Ozonlanmış Yağ Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivite	47
Çizelge 4.6. Ozonlanmış Yağ Örneklerinin Ve Standart Antibiyotiklerin MIC Değerleri	48

1. GİRİŞ

Ozon kimyası, 1840 yılında Schönbein'in ozon gazını elektrikli makinelerin elektrotlarının yanında, kokusundan dolayı farketmesi sonucu keşfetmesi ile başlamıştır. Schönbein bu gaza, Yunanca' da "Tanrının nefesi" anlamına gelen ozon ismini vermiştir. Çok reaktif bir gaz olan ozon, oksijen gazının allotropik modifiyesi halinde üç oksijen atomlu bir moleküldür. Ozonun etilen ile reaksiyona sokulması sonucu, ozonun ilk reaksiyonu bulunmuştur ve bu, ozonun çift bağlarla reaksiyona girdiğini ve onları parçaladığını göstermiştir [1].

Ozon; oksidatif, antibakteriyel ve antiviral etkilerinden dolayı içme suyu dezenfeksiyonu, doğal tedavi, atık su artımı, havuz dezenfeksiyonu, atık gazların ve kirli toprakların arıtılması, insan tedavisi, sterilizasyon gibi pek çok alanda kullanılmaktadır [1].

200 yılı aşkın bir zamandır bitkisel yağların karakteristik yapıları akademik araştırmaların ana konularından olmuştur. Özellikle son yüzyılın son yarısından itibaren kimya ve biyokimya alanlarında elde edilen yeni bulgular sayesinde, çok çeşitli olan doğal ürünler ve onların fonksiyonları ile ilgili mekanizmalar anlaşılmaya başlamıştır [2]. Bitkisel yağların %97–98'i trigliserit yapısındadır. Yağların doğal yapıları ve karakterleri, içerisinde barındırdıkları doymuş ve doymamış yağ asitlerine bağlıdır [3]. Bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritler yağa birçok olumlu özellik katmaktadır [4].

Ozonun bitkisel yağlarla olan reaksiyonları, bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitlerinde bulunan karbon – karbon çift bağları ile meydana gelmektedir [2]. Ozonlanmış bitkisel yağlar, doğal bitkisel yağlara göre çok daha karmaşık yapılara sahiptir [3]. Günümüzde ozonun çift bağlarla olan reaksiyonu, bütün bilim dünyası tarafından kabul görmüş bir mekanizma olan Criegee mekanizması ile açıklanır [1]. Ozonun bitkisel yağlarla etkileşimi sonucunda hidroperoksitler, ozonidler, aldehitler, peroksitler, diperoksitler ve poliperoksitler gibi oksijenlenmiş bileşikler meydana gelir [2,3].

Ozonlanan bitkisel yağlar farklı farklı birçok kullanım alanına sahiptir [4]. Ozonlanmış bitkisel yağların, bakterilere ve mantarlara karşı etkileri; gıda, kozmetik, farmakoloji sanayi gibi alanlarda kullanılması ile de yakından ilgilidir [4]. Özellikle ozonidler ve peroksitler antiseptik etkileri nedenleriyle tıbbi alanda büyük yarar sağlamaktadır [3].

Pirinç kepeği yağı, içerdiği tokoferoller, tokotrienoller, γ -oryzanol ve birçok sabunlaşmayan bileşenlerin yanı sıra lesitin, karotenoidler gibi düşük konsantrasyonlarda bulunan diğer bileşenleri de içeren önemli bir kaynaktır [5]. Ayrıca pirinç kepeği yağı, doymamış yağ

asitlerince de oldukça zengindir. İçerisinde % 37–43 oleik (C18:1), %31–37 linoleik (C18:2) asit barındırır [6,7]. Fındık yağı da, pirinç kepeği yağı gibi, tokoferoller ve sabunlaşmayan bileşenler yönünden zengin bir bitkisel yağ türüdür ve doymamış yağ asitlerince de oldukça zengindir. İçerisinde % 55 – 78 oleik (C18:1), % 4 – 21 linoleik (C18:2) asit barındırır [8,9].

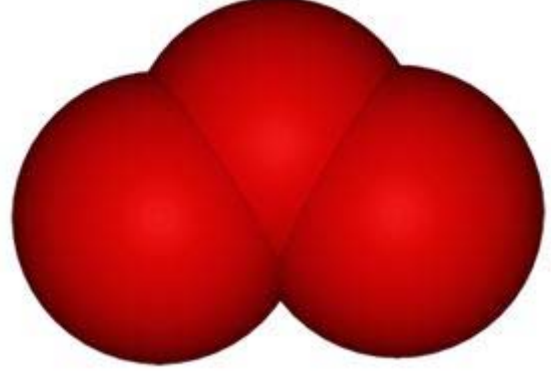
1.1. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmanın amacı, içerisinde barındırdığı zengin bileşenlerden dolayı tercih edilmiş olan pirinç kepeği yağı ile fındık yağının ozonlanmasıdır. Ozonlama sonucu elde edilen ürünlerdeki kimyasal değişimlerin peroksit, asit, iyot sayılarındaki değişim ile saptanması ve de antimikrobiyal aktivitelerin belirlenmesidir.

2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. OZON

Ozon (O_3), üç tane oksijen atomunun birleşmesi ile oluşan gaz halinde bir moleküldür. Ozon, renksizdir ve keskin, karakteristik bir kokuya sahiptir [10]. Bu koku çoğunlukla, ilkbaharda gök gürültülü sağanak yağmur sonrasında hissedilen kokuya benzetilerek tanımlanır [11].



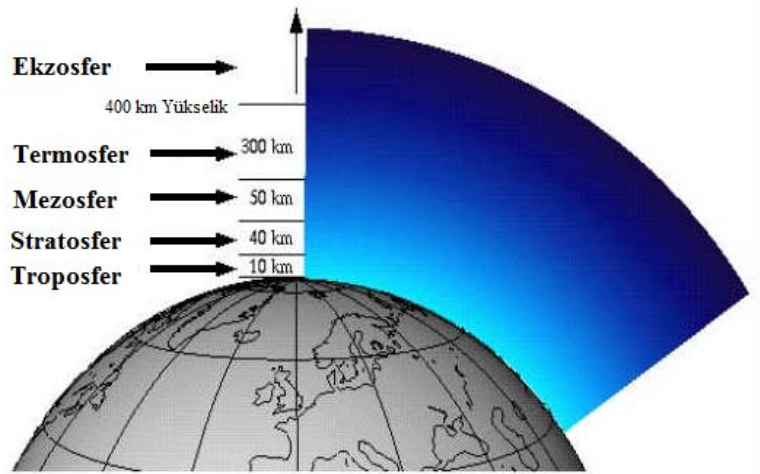
Şekil 2.1. Ozon molekülü

Ozon, çok eskilerden beri bilinmekte olan bir gazdır. Ozon ismi, sahip olduğu karakteristik kokusuna istinaden, Yunanca “Tanrının Nefesi” anlamına gelen “Ozein” kelimesinden gelmektedir [10].

Ozon kelimesi, ilk kez 1840 yılında laboratuvar ortamında bu gazı sentezleyen Alman Kimyager Christian Friedrich Schönbein tarafından kullanılmıştır [12]. Bu da aynı zamandan ozon gazının tarihteki ilk keşfi olarak kabul edilmektedir. Ozon gazının etkileri ise daha sonraları bilimsel araştırmalar neticesinde saptanmıştır. Bu etkilerden ilerleyen bölümlerde bahsedeceğiz.

Atmosferdeki ozonun % 90'ına yakını, yer yüzeyinden itibaren 20 – 50 km seviyeleri arasında bulunan Stratosfer tabakası içinde yer alır. Maksimum ozon yoğunluğu ise 10 ppm ile 19 – 23. km' ler civarındadır. Geri kalan %10'luk ozon miktarı ise yerden 10 – 15. km'ye kadar uzanan Troposfer tabakası içinde bulunmaktadır [10].

Ozon tabakası dünya çevresinde eşit olarak dağılmamıştır. Dünya yüzeyi üzerinde herhangi bir yerdeki ozon miktarı; doğal olarak



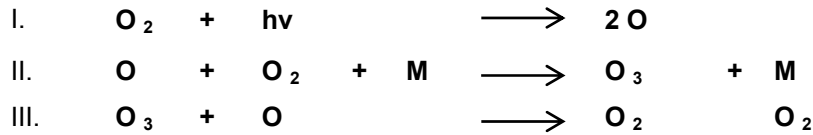
Şekil 2.2. Atmosfer tabakaları

enlemle, mevsimlerle ve günden güne değişim gösterir. Genelde normal şartlar altında ozon tabakası kutuplar üzerinde en kalın ve ekvator etrafında en incedir [11].

Güneş radyasyonu çok daha dolaysız ve buna bağlı olarak da çok daha şiddetli olduğundan, stratosferik ozon ekvator üzerinde yüksek miktarlarda üretilir. Buna karşılık stratosferik rüzgârlar ve farklı stratosferik basınçlar, ozonun ekvator'dan kutuplara doğru hareket etmesine neden olurlar [11].

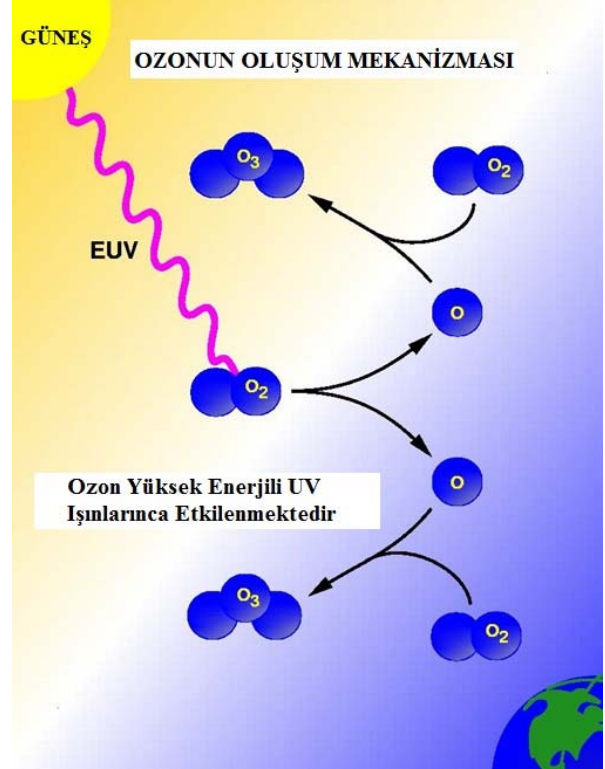
Daha öncede bahsettiğimiz gibi ozon (O_3), üç tane oksijen atomunun (O) birleşmesi ile oluşur. Bu oluşum; oksijen molekülünün (O_2) atomik oksijene (O) ayrılmasından sonra, başka bir oksijen molekülü (O_2) ile çarpışması ile meydana gelir. Oksijen molekülünün ayrışması için gerekli olan enerji doğal olarak ya da ticari amaçla üretilerek, oksijen atomu elde edilebilir [11].

Ozonun doğal olarak oluşumunda, güneşten gelen ultra-violet ışınlar ile gök gürültülü sağanak yağmur sırasındaki yıldırımlar bulunur [11]. Doğal yolla ozon oluşumunda ilk etapta, atmosferden güneşten gelen yüksek enerjili ultraviyole radyasyonunun (görünür ve uzun dalga boylu) etkisiyle oksijen molekülü (O_2) parçalanarak, serbest oksijen atomu haline dönüşmektedir (I). Daha sonra bu serbest haldeki oksijen atomları (O) yine ultraviyole radyasyonunun etkisiyle, oksijen molekülüne (O_2) çarpışması sonucu, oksijen molekülü ile birleşerek ozon molekülünü (O_3) oluşturmaktadır (II) [10].



M: Reaksiyon esnasında açığa çıkan enerjiyi taşıyan üçüncü bir moleküldür (N_2 , O_2) [10].

Şekil 2.4. Ozonun oluşum reaksiyonu

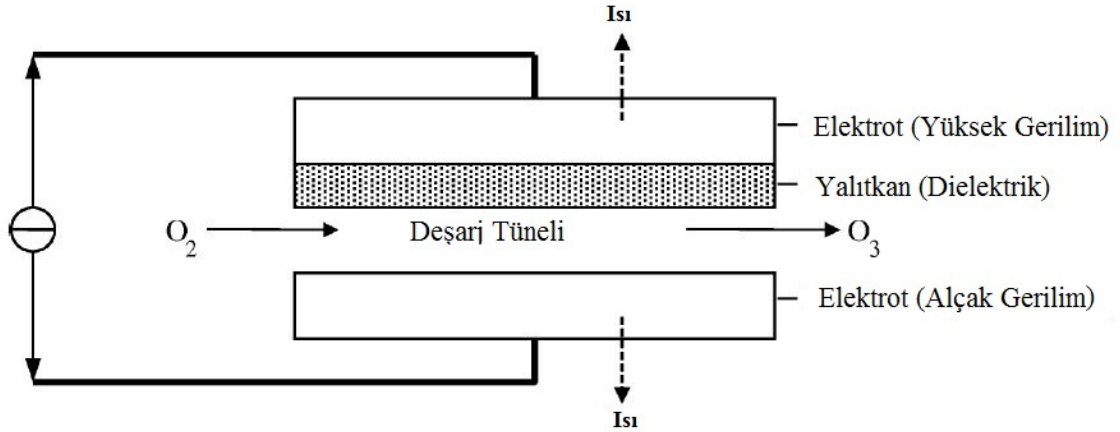


Şekil 2.3. Ozonun atmosferde oluşumu

Ayrıca ozon, elektroliz, fotokimyasal reaksiyon, radyokimyasal reaksiyon ya da elektrik boşalımı ile oksijen içeren bir gazdan üretilir. Elektrik boşalımı sistemi çoğunlukla su ve atık-su dezenfeksiyonu uygulamalarında kullanılan ticari bir uygulamadır [11].

Ozon, endüstriyel olarak ozon jeneratörleri yardımıyla oksijen molekülünden üretilir. Genel olarak, ozon jeneratörleri öncelikle oksijen molekülünü parçalar. Bunun sonucunda oluşan serbest oksijen radikali çift atomlu bir oksijen molekülüne çarparak üç atomlu ozon molekülünü oluşturur. O – O bağı kırılmak için yüksek miktarda enerji gereklidir. Bu enerji ultraviyole radyasyon (188 nm dalga boyunda) ya da Corona-Deşarj metodu kullanılarak ozon jeneratöründe üretilir ve serbest oksijen radikali oluşturulabilir. Ticari jeneratörlerde çoğunlukla Corona deşarj metodu kullanılır [13].

Corona deşarj sisteminde iki adet elektrot vardır, bunlardan biri yüksek diğeri alçak gerilimlidir. Bu elektrotlar, seramik bir yalıtkanla ayrılmıştır ve aralarında dar bir deşarj tüneli vardır (Şekil 2.5.). Elektronlar yeterli miktarda kinetik enerjiye ulaştığında (6 - 7 ev) oksijen molekülü atomlarına ayrılır ve oksijen molekülleri ile çarpışmalar neticesinde, her bir oksijen atomu ozon formuna dönüşür. Jeneratör hava pompalarsa % 1 – 3 oranında ozon üretilir. Eğer jeneratör saf oksijen ile beslenirse bu durumda % 6 oranında ozon üretilir. Üretilen ozon gazı, kısa bir süre içinde tekrar bozunarak oksijen atomu oluşturduğundan depolanamaz [13].



Şekil 2.5. Corona-Deşarj sistemi

2.1.1. Fiziksel Özellikleri

Ozon (O_3) kararsız bir gazdır. Normal koşullarda ozon mavi renkte bir gazdır ama bu renk, yoğunlaşmış bir halde olduğu zaman görülebilmektedir. Ozonun havadaki kararlılığı sudaki kararlılığından daha iyidir ama her iki durumda da bu kararlılık çok uzun sürmez. Suda

çözünmüş ozonun yarı ömrü, sudaki fosfatların ve karbonatların konsantrasyonuna bağlı olarak 8 dakika ile 14 saat arası olduğu saptanmıştır [11].

Sıcaklık çoğu zaman havada çözünmüş ozonun ya da oksijenin kararlılığını önemli ölçüde etkiler. Oda sıcaklığında, temiz bir kap içerisinde ozonun yarı ömrü 20 saat ile 100 saat arasında değişmektedir. 120 °C' de ozonun yarı ömrü sadece 11 – 112 dakika, 250 °C' de ise 0,04 – 0,4 saniye olarak saptanmıştır. Ozonun bu karakteristik özelliği, ozon jeneratörü tasarımında soğutma sisteminin ne kadar gerekli olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca, olası ozon gazı sızıntılarından dolayı ozon üretimi yapılan odada iyi bir havalandırma sistemi de şarttır [11].

Gaz ozon, havadaki konsantrasyonu 240 g/m³'e (havanın ağırlıkça % 20'si) ulaştığında patlayıcıdır. Neyse ki ozon gazının su ya da atık-su dezenfeksiyon sistemlerindeki maksimum konsantrasyonunun 50 g/m³ derişimi geçmediği saptanmıştır (havanın ağırlıkça % 4,1'i) [11].

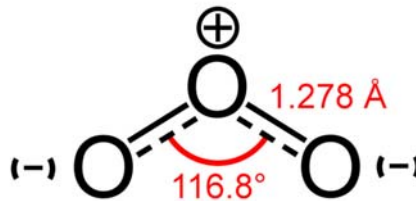
Ozonun sıvılardaki çözünürlüğü önemlidir. Özellikle ozon dezenfeksiyon sistemlerinde dezenfeksiyon suya transfer edilen ozonun konsantrasyonuna bağlıdır. Henry yasasına göre ozon sistemlerinde, sıvıda çözünen ozon gazının miktarı, sabit sıcaklıkta, ozon gazının sıvı üzerindeki kısmi basıncı arttıkça artar. Matematiksel olarak Henry Yasası şu şekilde açıklanır;

$$H = P / C \quad \text{ya da} \quad P = H \times C$$

P = Gazın sıvı üzerindeki kısmi basıncı (atm),
C = Sıvı ile dengede bulunan, sıvı içindeki gazın mol fraksiyonu,
H = Henry yasası sabiti (Sıcaklıkla değişir.) (atm / mol fraksiyonu) [11].

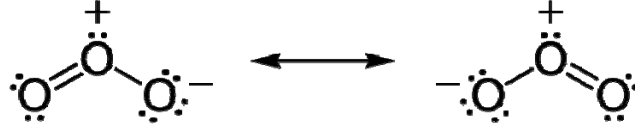
2.1.2. Kimyasal Özellikler

Ozon çok kuvvetli bir oksidan ajandır, 2,07 V'luk oksidasyon potansiyeline sahiptir [11]. Ozon kimyasal yapısı itibariyle oksijenin kimyasal bir kuzenidir ve radikal özelliği taşımaktadır. Bununla birlikte, florin ve persülfattan sonra, bilinen üçüncü en güçlü oksidan maddedir ve çok etkili bir dezenfektandır [10,11].



Şekil 2.6. Ozonun kimyasal formülü ve bağ açısı

Oksijen atmosferde; oksijen atomu (O), oksijen molekülü (O₂) ve ozon molekülü (O₃) olarak üç ayrı formda bulunmaktadır [10]. Ozon birçok organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girebilir. Çoğunlukla oksidasyon reaksiyonları sonucunda elde edilen ürün, ilk bileşene göre daha az toksik etkiye sahiptir.



Şekil 2.7. Ozonun lewis yapısı

Yapılan birçok çalışmada ozonun organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyonları tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları şu şekildedir;

2.1.2.1. İnorganik Bileşikler İle Reaksiyonları

İnorganik bileşenlerin ozonla reaksiyonları çoğunlukla atık-su dezenfeksiyonunda meydana gelmekte olup, ozonla reaksiyona giren bu bileşenler çoğunlukla; sülfite, nitrit, ferrolar, manganlar ve amonyum iyonlarıdır [11].

Sülfür: Sülfürün oksidasyon derecesi kullanılan ozonun miktarına ve temas süresine bağlıdır. Organik sülfürler, sülfonlar, sülfoksitler ve sülfonik asitlere okside olmaktadır. Sülfür iyonu ise sülfüre, sülfide ve sülfata okside olmaktadır [11].

Azot Bileşikleri: Organik nitrürler, nitroso bileşikleri ve hidroksil aminlerin oksidasyonu kullanılan ozonun miktarına ve temas süresine bağlıdır. Amonyumun oksidasyon reaksiyonu, amonyağın konsantrasyona bir etki olarak HO⁻ katalitik etkisi ile pH değerinin 7 – 9 aralığına gelmesi ile olur. Başlangıçtaki amonyum konsantrasyonu azot cinsinden 28 mg/L, pH 7.0 ve temas süresi 30 dakika iken % 8 amonyum redüksiyonu olduğu saptanmıştır. Nitrür iyonu çok hızlı bir şekilde nitrat iyonuna okside olmaktadır. 1 mg/L nitrürün nitrata okside olabilmesi için 2mg/L ozon gerekli olduğu saptanmıştır [11].

Demir ve Manganez: Ozonun demir ve manganez iyonları ile reaksiyonu çözünmez bir tortu oluşturur. Demir iyonu HO⁻ ile çözünmez bir tortu halinde ferrike okside olur. Benzer şekilde manganez iyonları da HO⁻ ile çözünmez bir tortu oluşturarak manganik iyon okside olur [11].

Siyanür: Toksik siyanür iyonu ozonla çok kolay yükseltgenir ve siyanat iyonundan daha az toksiktir. Düşük pH değerinde siyanat iyonu hidroliz sonucu karbon dioksit ve azot oluşturur [11].

2.1.2.2. Organik Bileşikler İle Reaksiyonları

Çeşitli araştırmacılar ozonun farklı organik bileşiklerle reaksiyonlarını derinlemesine araştırmıştır. Bu reaksiyonlardan bazıları şu şekildedir;

Aromatik Bileşikler: Fenol, sulu çözeltisinde kolayca ozonla reaksiyona girer. Oksalik ve asetik asidin ozonlanması, bir UV ışığı ya da hidrojen peroksit gibi bir katalizörün yokluğunda nispeten daha karardır. Krezoller ve ksilenollerin ozon ile oksidasyonu fenollere göre daha hızlıdır. Piren, fenantren ve naftalin halka kısmından okside olur. Klorobenzenin ozonla reaksiyonu fenole göre daha yavaş gerçekleşir [11].

Alifatik Bileşikler: Doymuş alifatik hidrokarbonların ozon ile reaksiyonuna ilişkin bir bulgu bulunmamaktadır. Aynı şekilde trihalometanın ozonla oksidasyonuna dair bir bulgu bulunmamaktadır. Ozonun UV radyasyon ile kombine bir şekilde kloroformu oksidasyona uğratması sonucu klorür iyonu oluşur fakat organik oksidasyon ürünü tespit edilmemiştir. Doymamış alifatik ve alisiklik bileşikler ozonla reaksiyon verirler [11].

Pestisitler: Paratyon ve malatyonun ozonlanması ise orta dereceli para okzon ve başlangıç maddesinden daha toksik olan mala okzon ürünleri oluşur. Ozonlama işleminin devamı okzonu azaltır fakat ilk duruma göre daha fazla ozon gerekir. Heptaklorün ozonlanması ile kararlı bir ürün elde edilmemiştir. Aldrin ve 2,4,5-T kolayca ozon ile okside olur fakat dieldrin, klordan, lindan, DDT ve endosülfan ozon tarafından çok az etkilenir [11].

Hümkik Asit: Hümkik maddeler ozonlama karşı dayanıklıdır, uzun süreli ozonlama işlemi sonucu küçük miktarda asetik, oksalik, formik ve tereftalik asit ile karbon dioksit ve fenolik bileşikler oluşur. Hümkik maddelerin, ozonlanmasını takiben klorlama işlemi sonucu (8 dakika kadar) trihalometan formuna indirgendiği saptanmıştır. Ozonlanmış organik maddeler genellikle okside olmamış başlangıç bileşiklerine göre daha kolay biyolojik bozunma uğrarlar [11].

2.2. OZONLAMA

Ozonlama, yaklaşık olarak yüz yılı aşkın bir süredir bilinen bir işlem olmasına karşın, kimyanın ve teknolojinin ilerlemesine bağlı olarak kıymeti yeni anlaşılmış bir işlemdir [10].

İlk olarak 1840 yılında Schönbein tarafından keşfedilen ozon, 1886 yılında havanın ozonlanmış havanın kirlenmiş suyu sterilize etmesinde kullanılmıştır. İlk ozon gazı kullanılan içme suyu tesisi 1893 yılında Oudshoorn, Hollanda'da yapılmıştır. Fransızların Oudshoorn tesisinde çalışmaları ve pilot testleri sonrasında 1906 yılında Nice, Fransa' da ozonlu su tesisi yapılmıştır. Nice, ozonun ilk kullanıldığı 1906 yılından beri "Ozonlanmış içme suyu tesisinin doğum yeri" olarak anılmaktadır [10,11].

1903 - 1906 yılları arasında ABD' de bitkiler için su arıtımı alanında kullanıldı. Bu zaman aralığı aynı zamanda, klorun ilk defa kullanım zamanına da denk gelir. 1940' larda Ozon, içme suyu arıtımında kullanılır hale gelmiştir. Ancak, o sırada ozon üretimi hala çok zor ve pahalı bir yöntemdi [11]. Bu sebepten dolayı o dönemlerde ozonun kullanımı yani ozonlama işlemi pek tercih edilen bir işlem değildi.

1980'lere gelindiğinde ise ozon kullanımı, teknolojinin gelişmesiyle, daha da yayıldı ve kullanım alanları çoğaldı. Ozon artık havuzlarda, soğutma sistemlerinde, kaplıcalarda dezenfektan olarak kullanılıyordu. Ozon, çeşitli endüstrilere girerek buralarda kullanım alanlarını arttırdı. Suyun arıtılması, siyanürlü gazların yok edilmesi gibi hem maddi açıdan kar, hem de sağlık açısından yarar sağlayan alanlarda kullanıldı. Ozonun büyük ölçekte ilk kullanımı ise, ABD' nin Los Angeles şehrinde, şehir suyunun arıtmasında kullanılmaya başlanmış olmasıdır [11].

Ozonla yapılan çeşitli çalışmaları ve deneyler sonucunda, ozonun güçlü bir oksitleyici olması sayesinde suda ve havada koku giderici, mikrop kırıcı, ortamı kirleten pek çok organik molekülün yok edicisi olarak kullanılabileceği anlaşılmış ve kabul görmüştür. Ozonlu havanın dezenfeksiyon amacıyla kullanılması, ozonun yüksek oksitleyici etkisi ile ilgilidir. Ozon, ortamdaki hava kirliliği ve kötü kokuları yok etmesi sayesinde, insanlara ferahlık ve zindelik hissi verir; daha iyi düşüncelerini ve konsantrasyonlarının devamlılığını sağlamaktadır [11].

Ozonun gıda sektöründe dezenfektan olarak yaygın kullanım alanı bulunmaktadır. Ozon hiçbir kalıntı bırakmaz; gıda maddesinin kendisiyle herhangi bir reaksiyona girmesi söz konusu olmadığı için ozonlama, dezenfeksiyon için kullanılabilecek en sağlıklı ve en çevreci yöntem olmaktadır [11].

Ozonlama işlemi bahsettiğimiz gibi içme suyu ve atık su dezenfeksiyonunda kullanılmaktayken günümüzde, çoğunlukla medikal uygulamalar için kullanılmaktadır [14].

2.2.1. Bitkisel Yağların Ozonlanması

200 yılı aşkın bir zamandır bitkisel yağların karakteristik yapıları akademik araştırmaların ana konularından olmuştur. Özellikle son yüzyılın son yarısından itibaren kimya ve biyokimya alanlarında elde edilen yeni bulgular sayesinde, çok çeşitli olan doğal ürünler ve onların fonksiyonları ile ilgili mekanizmalar anlaşılmağa başlamıştır [2].

Bitkisel yağların % 97 – 98'i trigliserid yapısındadır. Yağların doğal yapıları ve karakterleri, içerisinde barındırdıkları doymuş ve doymamış yağ asitlerine bağlıdır. Oleik, stearik, palmitik, linoleik, laurik, mistirik ve linolenik asit bu yağ asitlerindendir ve bunların hepsinin bağ yapıları gliserol yapısının türevleri şeklindedir [3].

Bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritler yağa birçok olumlu özellik katmaktadır. Çift bağlar, hidrojenasyonda da olduğu gibi sıklıkla yağların kimyasal modifikasyonlar için kullanılmaktadır. Trigliseritlerin ozonlanması bir diğer reaksiyon türüdür ve son zamanlarda oldukça ilgi çekmektedir [4].

Ozonun bitkisel yağlarla olan reaksiyonları, bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitlerinde bulunan karbon–karbon çift bağları ile meydana gelmektedir [2]. Ozonlanmış bitkisel yağlar, doğal bitkisel yağlara göre çok daha karmaşık yapılara sahiptir [3]. Ozonun bitkisel yağlarla etkileşimi sonucunda hidroperoksitler, ozonidler, aldehitler, peroksitler, diperoksitler ve poliperoksitler gibi oksijenlenmiş bileşikler meydana gelir [2,3]. Bu oksijenlenmiş ürünler birçok biyolojik aktiviteye duyarlıdır.

Doymamış yağlardan elde edilen oksijenlenmiş ürünler, koşulsuz olarak reaksiyonun gerçekleştiği şartlara bağlıdır. Bu şartlar arasında; reaksiyonun nerede gerçekleştirildiği, reaksiyon sıcaklığı, reaktör tipi, reaksiyon karışımının karıştırılması, ayarlan ozon dozu gibi şartlar bulunur [2].

Ozonlanan bitkisel yağlar farklı farklı birçok kullanım alanına sahiptir. Örneğin; modifiyeli biyodizel gibi. Ozonlanmış bitkisel yağların, bakterilere ve mantarlara karşı etkileri; gıda, kozmetik, farmakoloji sanayi gibi alanlarda kullanılması ile de yakından ilgilidir [4]. Özellikle ozonidler ve peroksitler antiseptik etkileri nedenleriyle tıp alanında büyük yarar sağlamaktadır [4].

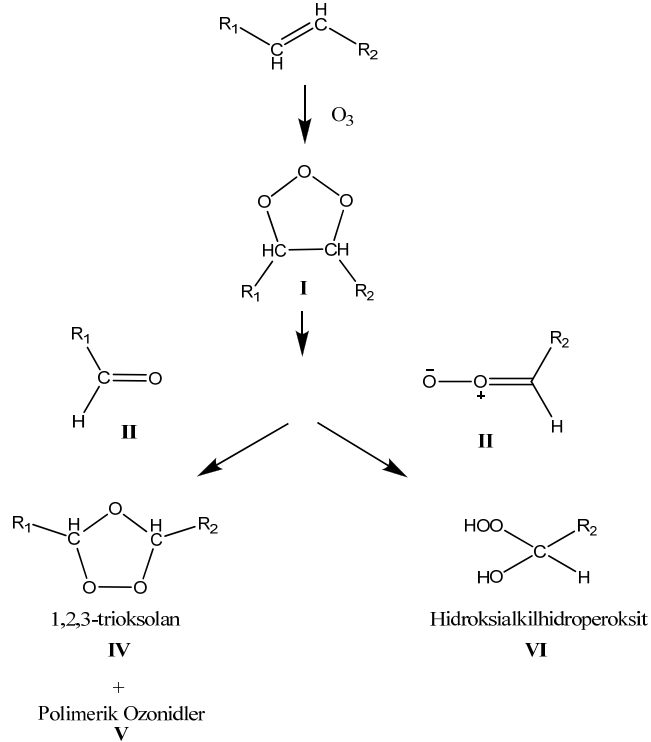
Ozonlanmış bitkisel yağların tedavi edici olarak kullanılması hala bir tartışma konusu durumundadır. Ozon ve ozonlanmış bitkisel yağlar tedavi yönünden birçok olumlu etkiye sahiptir fakat kullanımı halen Ortodoks tıbbında tam olarak kabul görmemiştir [4].

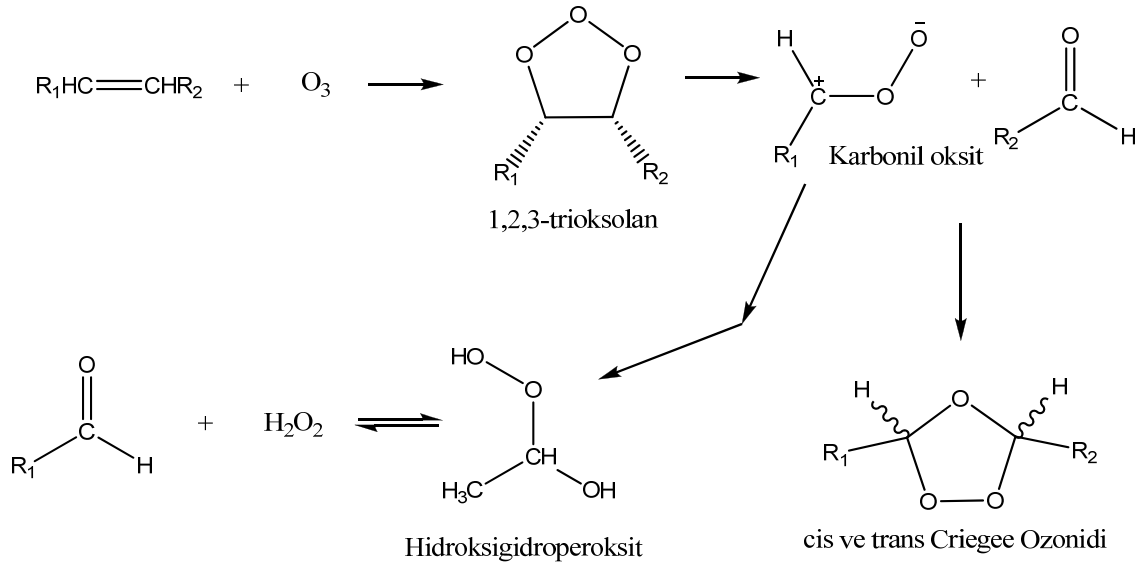
Ozonlanmış bitkisel yağların fizikokimyasal özelliklerinin bilinmesi, onların karakterleri ve özellikleri açısından oldukça önemlidir. Ozonlanmış bitkisel yağların kalitelerinin tanımlanmasında ve ozonlama işleminin takibinin de peroksit, asit ve iyot sayılarının saptanması gibi analitik metotlar kullanılır [2].

2.2.2. Ozonun Bitkisel Yağlar İle Reaksiyonu – Criegee Mekanizması

Ozonun bitkisel yağlar ve lipitlerle olan reaksiyonu, bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritlerdeki karbon – karbon çift bağları ile meydana gelir. Bu reaksiyon mekanizması Criegee mekanizması olarak bilinir [15].

Criegee mekanizmasına göre, ozonun karbon – karbon çift bağına katılması sonucu, kararsız ozonid bileşiği olan 1,2,3-tri-oxolane (I) ürünü oluşur ve hızlı bir şekilde aldehit (II) ve karbonil oksit (III) bileşiklerine bozunur. Su ve herhangi bir çözücünün bulunmadığı ortamda II ve III tekrardan düzenlenerek 1,2,4-trioksolan (Cis ve Trans Criegee Ozonidi) (IV) ana ürünü ile polimerik ozonid (V) ürünlerine dönüşür. Eğer ortamda su bulunuyorsa, bu durumda karbonil ozonid (III) bileşiği hidroksialkilhidroperoksit (VI) ürününe dönüşür [1,16,17].

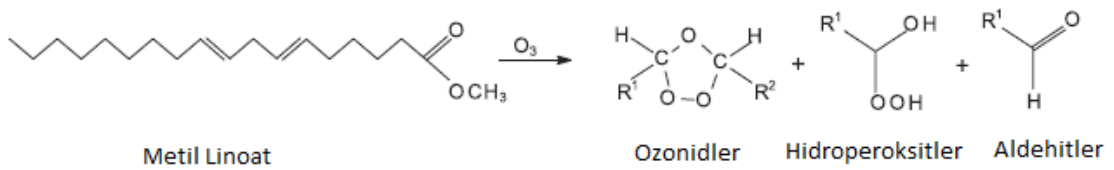




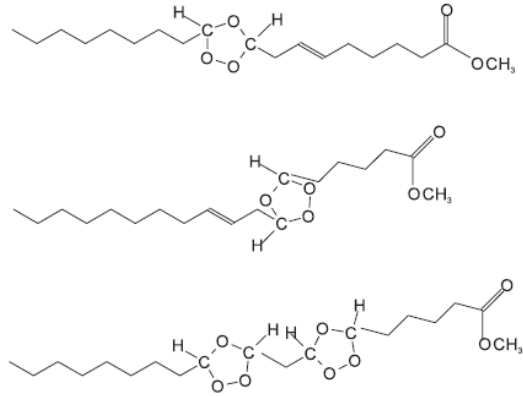
Şekil 2.8. Ozonun doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu, Criegee Mekanizması [15,17]

Yukarıda açıkladığımız gibi, ozonun bitkisel yağlardaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyonu sonucunda oksijenlemiş ürünler olarak hidroperoksitler, ozonidler ve aldehitler oluşur.

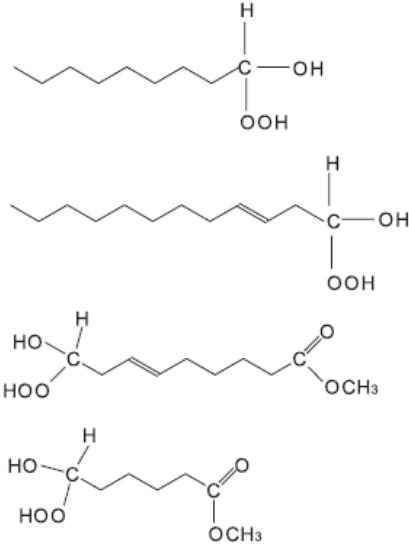
Diaz ve Gavin (2007), ozonun bitkisel yağlardaki doymamış trigliseritler ile reaksiyonu sonucu oluşan ürünleri tespit edebilmek amacıyla, doğal yağ asitlerinden biri olan ve hemen hemen bütün bitkisel yağlarda ve lipitlerde bulunan linoleik asidi baz alarak, metil linoatı ozonlamışlardır ve de ozonlanmış metil linoatın 1H ve ^{13}C NMR spektrumlarını inceleyerek oluşan oksijenlenmiş ürünler olan ozonidler, hidroperoksitler ve aldehitleri (Şekil 2.9.) tespit etmişlerdir ¹⁹.



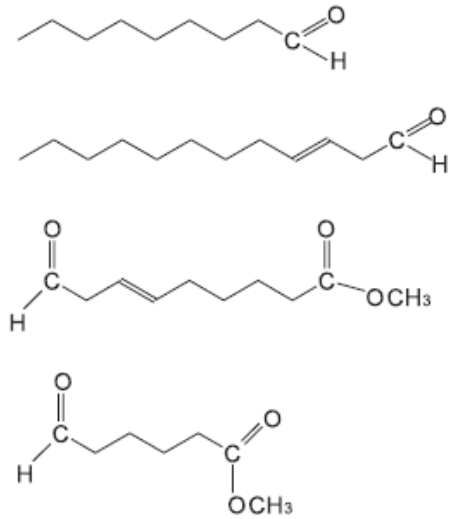
Ozonidler;



Hidroperoksitler;



Aldehitler;



Şekil 2.9. Ozonun metil linoat ile reaksiyonu sonucu oluşan oksijenlenmiş bileşikler [15]

2.2.3. Ozonlanmış Bitkisel Yağlar İle İlgili Çalışmalar

Ozonlanmış bitkisel yağlar virüsler, bakteriler ve mantarlar üzerinde antimikrobiyal etki göstermektedir [18].

Zeytinyağı ve ayçiçeği yağı farklı yağ asidi bileşenlerini yüksek miktarda içermektedir. Zeytinyağı oleik asit (% 65 – 85) yönünden, ay çiçeği yağı linoleik asit (% 48 – 74) yönünden zengindir. Bu yağların doymamış yağ asitlerince zengin olması, bileşimlerinde yüksek miktarda vitamin E gibi antioksidan maddeler bulunmasından ve ozonun güçlü bir dezenfektan ve de

antimikrobiyal etkiye sahip olmasından dolayı, doymamış yağ asitleri içeren bitkisel yağların ozonlanması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda antimikrobiyal ve anti bakteriyel etkilere sahip tıbbi ve kozmetik amaçlı ürünler elde edinmesi planlanmıştır [2].

Diaz, M.F., vd. (2006) yaptıkları çalışmada ozonlanmış zeytin yağı ile ozonlanmış ayçiçeği yağının kimyasal ve antimikrobiyal yönden kıyaslamışlar. Yaptıkları çalışmalar sonucunda ozonlanmış bitkisel yağların antimikrobiyal etki gösterdiklerini saptamıştır [2].

Çizelge 2.1. Ozonlanmış ayçiçeği ve zeytin yağının antimikrobiyal aktiviteleri (mg/ml) [2]

Yağlar I_P^a	Ozonlanmış Ayçiçeği Yağı				Ozonlanmış Zeytin Yağı			
	862		2.506		735		2.439	
	MICs ^b	MBCs ^b	MICs ^b	MBCs ^b	MICs ^b	MBCs ^b	MICs ^b	MBCs ^b
S.a ^c	4,5	22,25	0,95	11,12	4,5	22,25	0,95	11,12
E.c ^c	9,5	22,25	0,95	11,12	9,5	22,25	0,95	11,12
P.a ^c	14,25	22,25	0,95	22,25	14,25	44,5	0,95	11,12
B.s. ^c	14,25	44,5	0,95	22,25	14,25	44,5	0,95	22,25

^aPeroksit sayısı (mmol-equiv/kg).

^bMICs: Minimum inhibisyon konsantrasyonu; MBCs: Minimum bakteriyel konsantrasyonu.

^cS.a: Staphylococcus aureus ATCC 6538; Esheria coli ATCC 10536; Pseudomona aeruginosa ATCC 27853; Bacillus subtilis ATCC 6633.

2.3.KULLANILAN BİTKİSEL YAĞLAR

2.3.1. Pirinç Ve Pirinç Kepeği

2.3.1.1. Pirinç

Dünya nüfusunun yarısının başlıca kalori kaynağı olan pirinç (*Oryza Sativa*), tahıl bitkileri içinde buğdaydan sonra en çok yetiştirilen, dünyadaki en önemli bitkisel besin kaynaklarından biridir [19,20]. Aslında dünyanın batı bölümünden çok doğusunda önem taşıyan bu değerli tahıl, özellikle Asya' nın Çin, Japonya, Hindistan gibi fazla nüfuslu ülkeleri ile Malezya ve Filipinler gibi sıcak yörelerinde halkın temel besinini oluşturur [20]. Çok çeşitli iklim koşullarına uyum sağlamış ve yaklaşık 6.000 türü olan pirincin yayılma alanı, 53° kuzey ve 40° güney enlemleri arasında bulunur [19].

Hasadı yapılan pirinç, yani *çeltik* tam anlamıyla, kapçık ve kavuzlarla kaplı buğdaysı bir tanedir. Pirinç, bu çok sert kabuk çıkarılarak yenabilir hale gelir [19,20]. Kabuğu çıkarıldıktan sonra elde edilen taneye *esmer pirinç* veya *kargo* denilir ve başlangıçtaki ağırlığının ancak % 60 – 70'i kadardır. Fakat bu esmer pirinç tohum kılıfının çok sert olan tabakalarını korumaya devam eder; bu tabakalarda başlıca vitaminler ve madensel tuzlar bulunur. Bu tabakaları parçalayan mekanik ağartma işlemi, parlatma ve cilalama, - *beyaz pirinç*- elde etmeyi ve gerekirse alt ürünleri almayı sağlar [19].



Şekil 2.10. Çeltik bitkisi.

Çeltiğin işlemlerinden çıkan ürünlerin en büyük bileşenini % 70 ile pirinç (endosperm) oluşturur ve % 20 oranında kabuk açığa çıkar. Geri kalan % 10'luk kısmın % 8'ini pirinç kepeği, % 2'sini ise pirinç tohumu oluşturur [7].

2.3.1.1.a. Pirincin Kullanım Alanları

İnsan beslenmesinde pirinç, suda, buharda veya yağlı bir madde içinde pişirildikten sonra tüketilir. Ayrıca, lapaların, hamurların, kuru pastanın ve alkolün (pirinç rakısı) hazırlanmasında kullanılır [19]. Pirinç taneleri öğütülerek un ve nişasta da elde edilir. Pirinç unundan yapılan hamur maya tutmadığı, yani kabarmadığı için ekmek yapımında kullanılmaz. Ama gene de Asya' nın doğusundaki bazı bölgelerde pirinç unundan gözleme gibi bazı yassı hamur ürünleri yapılır. Pirinç unu ve nişasta en çok sütlü tatlı yapımında ve pastacılıkta kullanılır [20].

Japonya' da pirinçten mayalandırılarak *saki* denen bir çeşit bira yapılır. Çin ve Hindistan' da da buna benzer alkollü içkiler hazırlanır. Pirinç hasatından sonra arta kalan saplar, pirinç kepeği ve tanelerin parlatılmasında kalan un hayvanlara yedirilir. Ayrıca saplarından şapka, yer yaygısı, çanta ve ayakkabı gibi bazı hasır eşya yapılır [20]. Pirinç samanı ve çeltik kabuğu da evlerde enerji kaynağı olabilir [19]. Pirinç köklerinin yakılmasıyla elde edilen küller ise pirinç tarlalarının toprağına gübre olarak katılır [20].

2.3.1.1.b. Dünya'da ve Türkiye'de Pirinç Üretimi

Pirincin başlıca üretim alanı, anayurdu olan Asya' nın nemli ve tropikal bölgeleridir ve dünyadaki toplam pirinç üretiminin % 90' ı Asya' da gerçekleşir [19,20]. Asya' da kişi başına 70 – 100 kg' dır; 1980' li yıllarda Japonya ve Tayland' da bu oranda bir azalma olmuştur; aksine Afrika' da çok fazla artmış ve 40 – 70 kg' a ulaşmıştır; ithal edilen pirinç, bu ülkelerdeki darı gibi yerel ürünlerin neredeyse yarısı kadar daha ucuzdur. Pirinç tüketimi, Latin Amerika' da 50 – 80 kg' dır; Avrupa' da ve ABD' de ise 5 – 6 kg' ı bulur [19].

Türkiye' de pirinç tarımının en büyük bölümü Marmara, Karadeniz ve Ege bölgelerinde yapılır [20]. Türkiye' de 2008 yılı itibari ile çeltik ekimi yapılan toplam 995 bin dekarlık alandan alınan çeltik (kabuklu pirinç) ürünü toplam 753 bin ton olup, bu çeltikten 452 bin ton pirinç üretilmiştir [21].

Çizelge 2.2. Türkiye' de yıllara göre çeltik ve pirinç üretimi [22]

	(Ton – Tons)				
	2004	2005	2006	2007	2008
Çeltik – Rice in the husk	490.000	600.000	696.000	648.000	735.325
Pirinç – Rice	294.000	360.000	417.600	388.800	451.995

2.3.1.2. Pirinç Kepeği

Pirinç kepeği, pirincin işlenmesi sırasında, esmer pirinçten beyaz pirinç üretilirken açığa çıkan, esmer pirinçteki dış tabaka (kepek) olup bünyesinde bir miktar tohum da bulundurur [22].

Pirinç kepeğinin iki ana kullanım alanı mevcuttur. Bu kullanım alanları; hayvan yemlerine karıştırılmak suretiyle yem olarak kullanılması ve pirinç kepeği yağı kaynağı olarak kullanılmasıdır [23].

Pirinç kepeği bazı fitokimyasalları yüksek miktarda içermektedir ki bunlar antioksidan özelliğe sahiptirler [24]. Yapılan kimyasal çalışmalar sonucunda pirinç kepeğinin özellikle γ -oryzanol ve vitamin E tarafından oldukça zengin olduğunu ortaya koymuştur [22].



Yağlı pirinç kepeği



Yağı alınmış pirinç kepeği

Şekil 2.11. Yağlı ve yağı alınmış pirinç kepeği

Pirinç kepeği, önemli sabunlaşmayan bileşenlerin en önemli kaynaklarından biri olduğu için, son yıllarda, kimyasal bileşimi ve bu bileşenlerin saflaştırılması konusunda büyük ilgi odağı olmuştur.

2.3.1.2.a. Pirinç Kepeğinin Kimyasal Bileşimi

Pirinç kepeği içerisinde barındırdığı lipitler, mineraller ve vitaminlerden dolayı oldukça besleyicidir. Pirinç kepeğinde bulunan bu bileşenler, pirinç türüne ve iklim şartlarına bağlı olarak değişmektedir [25]. Pirinç kepeği içerisinde % 12 – 25 pirinç kepeği yağı % 6 – 14 ham lif

içermektedir [23,25]. Pirinç kepeğinin içerisinde bulunan bu yağ % 98 oranında ekstrakte edilebilir [25].

Pirinç kepeğinin içerisinde doğal halde sekiz çeşit vitamin E bulunmaktadır; bunlardan dördü (α , β , γ , δ) tokoferol, diğer dördü ise (α , β , γ , δ) tokotrienoldür. γ -oryzanol ise ferulik asit esterleri ile sterollerin bir karışımıdır ^{11, 48}. Pirinç kepeğindeki γ -oryzanol' ün miktarı, tokoferol ve tokotrienol miktarından ağırlıkça 13 – 20 kat daha fazladır [24].

Amissah, J.G.N. vd (2003) yaptıkları çalışmada, on altı çeşit pirinç kepeğinin (BETA, B189, GK 88, GRUG 7, IR 64, IR 66, IR 68, ITA 72, ITA 222, ITA 304, ITA 334, ITA 402, ITA 406, Mr. More, TOX 3108, WAR 100) türlerine göre içerisinde barındırdıkları besleyici bileşenleri incelemişlerdir. Bu araştırmanın sonucunda, incelenen pirinç kepeği türlerinde, % 7,63 – 13,03 nem, % 13,85 – 19,85 ham yağ, % 7,33 – 13,40 ham lif, % 11,53 – 15,35 ham protein, % 8,47 – 22,18 kül, % 26,61 – 46,34 karbonhidrat, 26,30 – 51,00 mg/100g fosfor, 48,20 – 74,00 mg/100g potasyum, 5,55 – 9,53 mg/100g kalsiyum içerdiği tespit edilmiş ve 100 g pirinç kepeğinin 43,76 – 380,39 Kcal enerji içerdiği saptanmıştır [23].

2.3.1.2.b. Pirinç Kepeğinin Faydaları

Pirinç kepeği yağı içerisindeki antioksidan bileşenler, insanlardaki ve hayvanlardaki düşük yoğunluktaki lipoproteinleri ve kolesterolü düşürür [26]. Pirinç kepeği üzerine; kanser, karaciğerdeki yağ, böbrek taşı, kalp hastalığı, hiperlipidemia, hypercalciuria gibi hastalıklara karşı savaşçı etkisi ve antioksidatif etkisi nedenleriyle oldukça fazla çalışma yapılmıştır [22].

Pirinç kepeği çoğunlukla tarım, gıda ve kozmetik–medikal sektöründe kullanılır. Pirinç fitokimyasallarının önemli fizyolojik ve farmakolojik özellikleri sayesinde hastalıkları önleme ve sağlığa faydalarını daha iyi anlayabilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaya halen devam etmektedir [22].

2.3.2. Pirinç Kepeği Yağı

Pirinç kepeği yağı, gıda ve endüstriyel amaçlı kullanılmak için pirinç kepeğinden ekstrakte edilen bir yağdır [27]. Pirinç kepeği yağı (Rice Bran Oil - RBO) Japonya, Çin, Kore, Tayvan, Tayland ve Pakistan gibi özellikle Asya ülkelerinde yemeklik yağ olarak kullanılmaktadır [6]. Bu yağ, batı ülkelerinde ise, giderek artan bir potansiyel ile besleyici bir doğal gıda olarak görülmektedir.

Pirinç kepeği yağı, özellikle içerisinde barındırdığı sabunlaşmayan maddelerden dolayı, sağlık için eşsiz bir fayda sağlamaktadır. Bu bileşenlerden en önemlisi, pirinç kepeğinde de bulunan ve ferulat esterlerinin bir karışımı olan γ -oryzanol' dır [6].

Aslında pirinç kepeği yağının ülkemizde ve batı ülkelerinde az üretilmesinin ana sebebi, zor bir işleme sürecine sahip olmasına bağlanabilir [6].



Resim 2.12. Rafine edilmiş pirinç kepeği yağı.

2.3.2.1. Pirinç Kepeği Yağının Bileşimi

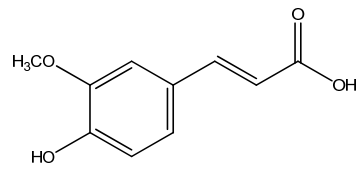
Ham pirinç kepeği yağı, % 88 – 89 doğal lipitler, % 3 – 4 mumsu yapılar, % 2 – 4 serbest yağ asitleri ve yaklaşık olarak % 4 sabunlaşmayan bileşenlerden oluşur [26].

Pirinç kepeği yağı, bir çok bitkisel yağ ile kıyaslandığı zaman, içerisinde farklı miktarlarda bulunan birçok minör bileşene sahip olduğu görülmektedir [7]. Pirinç kepeği ve pirinç kepeği yağı, çok az yağ türünde bulunan γ -oryzanol' ün en iyi kaynaklarından birisidir [7,27]. Pirinç kepeği yağı bünyesinde, yüksek miktarda serbest yağ asidi (FFA), sakızimsı ve mumsu yapılar, sabunlaşmayan bileşenler ve pigmentler gibi bir çok bileşenin yanı sıra, tokoferol, tokotrienol (tokoller) ve fitosteroller de içermektedir [27]. Ayrıca, pirinç kepeği yağı, yüksek miktarda diyabetik lifler ile B-kompleks vitaminleri de içermektedir [28].

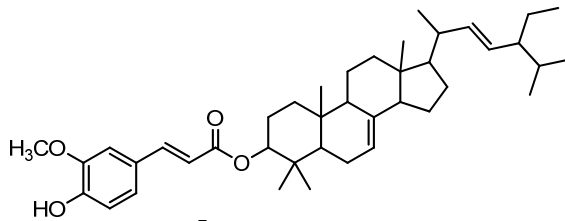
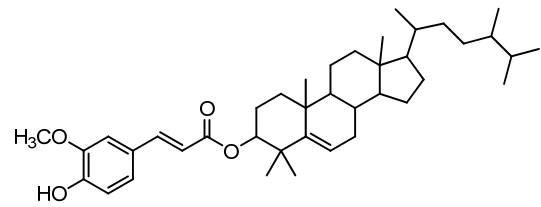
2.3.2.1.a. γ -Oryzanol Ve Vitamin E

γ -oryzanol, 10 tane triterpen alkolünün ferulat esterlerinin karışımıdır ve kandaki kolesterol seviyesini düşürmektedir, sinir sistemini korumakta olan bir karışımdır [29]. γ -Oryzanol bileşikleri ferulik asit türevleri içerdiğinden çok güçlü bir antioksidan etkiye sahiptir [30]. Pirinç kepeği yağında bulunan en önemli bileşen olan γ -oryzanol'ün dört ana bileşeni 24-metilensikloartanl ferulat, kampesterol ferulat, sikloartenol ferulat ve sitosterol ferulattır. Ham yağların çoğu 1 – 5 g/kg fitosterol içerirken, pirinç kepeği yağı 30 g/kg'a kadar fitosterol içerebilmektedir [7].

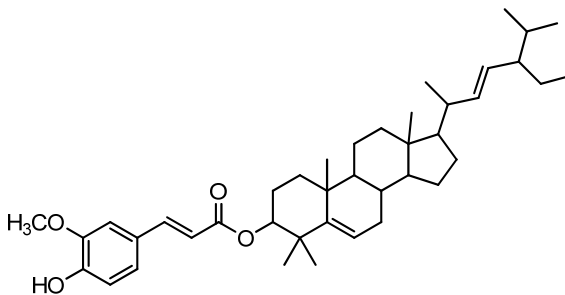
Pirinç kepeği yağı (RBO) içerisinde bulunan γ -oryzanol bileşikleri Şekil 2.13.'de verilmiştir.



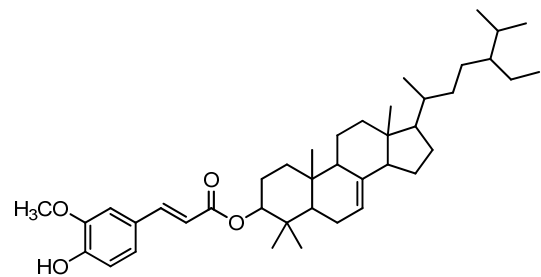
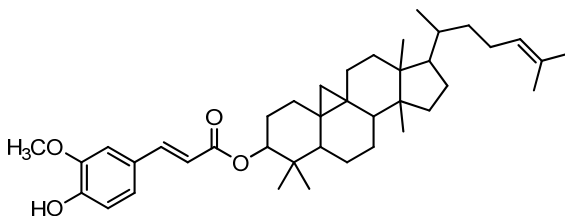
Ferulik Asit

 Δ^7 -Stigmasterol ferulat

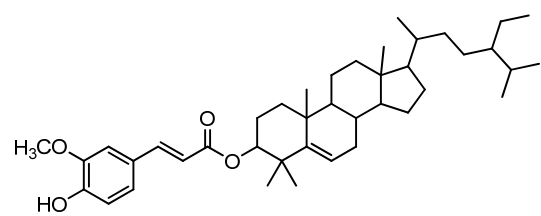
Kampesteril ferulat



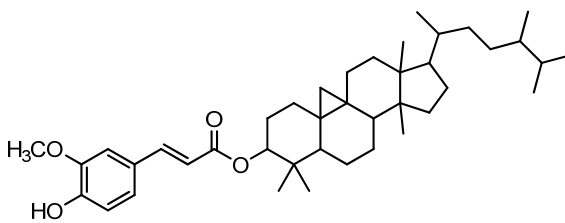
Stigmasteril ferulat

 Δ^7 -Sitostenil ferulat

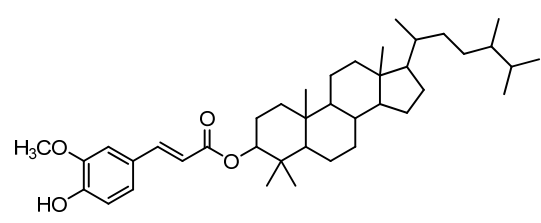
Sikloartenil ferulat



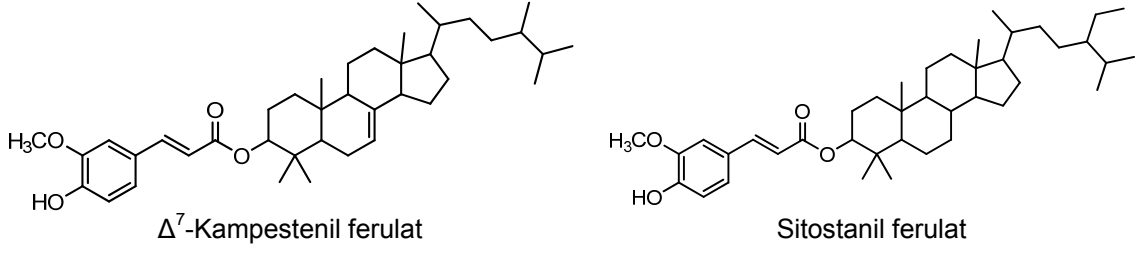
Sitosteril ferulat



24-Metilen sikloartenil ferulat

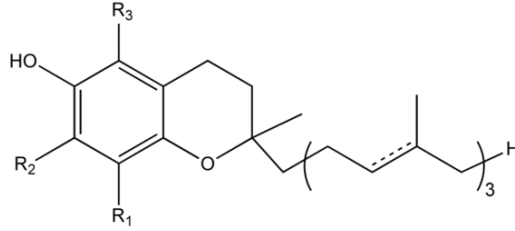


Kampestanil ferulat



Şekil 2.13. γ -Oryzanol'un kimyasal yapıları [29]

Vitamin E farklı antioksidan ve biyolojik aktiviteye sahip 8 kimyasal bileşikten meydana gelmektedir: α -(alfa), β -(beta), γ (gama), δ (delta) tokoferoller ve α -(alfa), β -(beta), γ (gama), δ (delta) tokotrienoller.



α -tokoferol, $R_1=R_2=R_3=CH_3$
 α -tokotrienol, $R_1=R_2=R_3=CH_3$

γ -tokoferol, $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=H$
 γ -tokotrienol, $R_1=R_2=CH_3$; $R_3=H$

β -tokoferol, $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=H$
 β -tokotrienol, $R_1=R_3=CH_3$; $R_2=H$

δ -tokoferol, $R_1=R_2=R_3=H$
 δ -tokotrienol, $R_1=R_2=R_3=H$

Şekil 2.14. Vitamin E' nin Kimyasal Yapısı.

Tokoferoller, 3 izoprenoid birimlerinden meydana gelen bir doymuş yan zincirlerle karakterize edilmektedir ve doymamış tokotrienollere benzemektedir (α , β , γ , δ). Tokoferoller, fitol ve trimetilhidrokinondan türemiş bir alkoldür ve organik çözücülerde çözünür. Esterifiye olmamış formu, kolaylıkla okside olabilir. Başlıca dört tokoferol vardır: α , β , γ ve δ . Ancak aktivite olarak en fazla tanınanı α - tokoferoldür.

2.3.2.2. Pirinç Kepeği Yağının Ekstraksiyonu Ve Rafinasyonu

Ticari olarak pirinç kepeği yağının ekstraksiyonu organik çözücüler kullanılarak yapılır. Birçok araştırmada ve endüstriyel çalışmada pirinç kepeği yağı ekstraksiyonu sırasında, yüksek miktarda yağ ekstraksiyonu yapması ve de kolay uygulanabilir olması nedenleriyle çözücü olarak n-hekzan kullanılması tercih edilir [28].

Hekzan kullanımı aynı zamanda bazı problemleri de ne yazık ki beraberinde getirir. Hekzan ile ekstrakte edilmiş pirinç kepeği yağı yüksek miktarda serbest yağ asidi (FFA) içeriğinin yanı sıra, sakızimsı ve mumsu yapılar ile sabunlaşmayan bileşenlere de sahiptir. Ayrıca, koyu yeşil–kahverengi bir renkten açık sarıya çalan bir renge sahip olur. Bu sebeplerden dolayı, rafinasyona ihtiyaç vardır [28]. Ayrıca hekzan, alev alma potansiyeline sahiptir ve de insan ve çevre için tehlikelidir [26].

Etanol ve izopropanol gibi kısa zincirli alkoller, daha güvenli olma ve kontrol edilebilmesi bakımından ekstraksiyon için alternatif çözücülerdir. Alkol ile ekstraksiyon yapılmış yağda daha çok fosfatit ve sabunlaşmayan bileşen bulunur. İzopropanol ile ekstraksiyon yapılmış pirinç kepeği yağı B-vitaminlerince daha zengindir, etanolla ekstraksiyon yapılmış pirinç kepeği yağı ise tokoferoller ve B-vitaminlerince oldukça zengindir [26].

Çizelge 2.3.' de görüldüğü gibi çözücü türünü, çözücü oranının ve sıcaklığın değiştirilmesi, hem ekstrakte edilen yağ miktarında hem de yağın içerisindeki bileşenlerin miktarlarında önemli ölçüde değişim meydana getirmektedir.

Çizelge 2.3. Farklı çözücü oranlarında ve farklı sıcaklıklarda ekstrakte edilen ham yağ, Vitamin E ve Oryzanol miktarları [26]

	Hekzan İle Ekstraksiyon			İzopropanol İle Ekstraksiyon		
	Ham Yağ ^a	Vitamin E ^b	Oryzanol ^b	Ham Yağ ^a	Vitamin E ^b	Oryzanol ^b
Oran (w / w) ^c						
2:1	186,2	133,4	2510	170,5	145,9	2452
3:1	206,3	150,7	2815	186,5	160,5	2657
Sıcaklık (°C)						
40	192,8	137,2	2615	173,0	148,5	2471
60	199,7	146,9	2709	184,1	157,9	2638

^aDeğerler, g / kg Pirinç Kepeği.

^bDeğerler, mg / kg Pirinç Kepeği.

^cg Çözücü / g Pirinç kepeği.

Pirinç kepeği yağı da, yemeklik hale getirilirken, diğer yağlarda olduğu gibi nötralizasyon, ağartma, mumsu yapıların giderilmesi ve deodorizasyon işlemlerine tabi tutulur. Pirinç kepeği yağının içerisinde barındırdığı minör bileşenler, pirinç kepeği yağının rafinasyonunu diğer bitkisel yağlara göre daha karmaşık ve zor bir hale sokar [7]. Ham pirinç kepeği yağının rafinasyonu sırasında, içerisindeki sabunlaşmayan bileşenlerin (Çizelge 2.4.) değişimi ve tokollerin değişimi (Çizelge 2.5.) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 2.4. Pirinç kepeği yağının kimyasal rafinasyonu sırasında sabunlaşmayan bileşenlerdeki değişimi

Parametre (g/100 g)	Ham RBO ^a	Nötralize RBO ^a	Ağartılmış RBO ^a	Mumsu yapıları giderilmiş RBO ^a	Deodorizasyon sonrası RBO ^a
Sab. Bil. ^b	5,4	4,2	3,8	3,6	2,7
Squalene	0,028	0,022	0,021	0,019	0,008
T. Sterol ^c	2,94	2,15	1,92	1,91	1,83
T. Tokol ^d	0,078	0,080	0,078	0,078	0,062

^aRBO, Pirinç Kepeği Yağı.^bSab. Bil., Sabunlaşmayan Bileşenler.^cT. Sterol, Toplam Sterol.^dT. Tokol, Toplam Tokoferol ve Tokotrienol.**Çizelge 2.5.** Pirinç kepeği yağının kimyasal rafinasyonu sırasında tokoferollerin yüzdesel bileşimi.

Tokoller (%)	Ham RBO ^a	Nötralize RBO ^a	Ağartılmış RBO ^a	Mumsu yapıları giderilmiş RBO ^a	Deodorizasyon sonrası RBO ^a
α-Tokoferol	11,7	12,9	16,6	17,0	17,2
γ-Tokoferol	15,6	15,5	15,1	15,2	15,2
α-Tokotrienol	3,7	4,2	4,4	4,5	5,3
γ-Tokotrienol	66,7	65,4	62,6	62,5	61,8
δ-Tokotrienol	2,2	2,0	1,3	0,9	0,5

^aRBO, Pirinç Kepeği Yağı.

2.3.3. Fındık Ve Fındık Yağı

Fındık, sert kabuklu meyvelerden, *Betulaceae* familyası, *Corylus* cinsi içerisinde *Corylus vellana* olarak yer almaktadır. Ağaç üzerinde gelişmekte ve sert kabuk tarafından korunmaktadır. Dünyada Türkiye' nin karadeniz kıyılarında, Avrupa' nın güneyinde (İtalya, İspanya, Portekiz ve Fransa) ve Amerika Birleşik Devletleri' nin bazı bölgelerinde (Oregon, Washington) yetişmektedir [31]. Fındık ürünlerinde tat, lezzet ve aroma verici olarak da kullanılmaktadır. Kabuksuz fındıkların % 80'i çikolata üretiminde, % 15'i şeker, bisküvi ve pastacılık ürünlerinde; kalan % 5'i de herhangi bir işlem görmeden doğal olarak tüketilmektedir. Uygunsuz depo koşullarında küflenmiş ya da hasat ve taşıma sırasında ve mekanik çarpmalar sonucunda zarar görmüş fındıklar yağ endüstrisinde kullanılmaktadır. Fındıktan ayrılan sert kabuk yakacak olarak değerlendirildiği gibi boya endüstrisinde de kullanılmaktadır. Bunun yanında suni tahta, kontrplak ve döşemelik mantarlı muşamba yapımında da kullanılmaktadır [31,32].

Çizelge 2.6. Türkiye' de yıllara göre fındık üretimi [33]

	Ton - Tons				
	2004	2005	2006	2007	2008
Fındık - Hazelnut	350.000	530.000	661.000	530.000	800.791

2.3.3.1. Fındığın Ve Fındık Yağının Kimyasal Bileşimi

Fındığın kimyasal bileşimi türden türe değişmekte, iklim ve yetiştirme koşulları, yükseklik ve toprağın durumu (jeolojik koşullar) gibi diğer koşullar da bunu etkilemektedir [34]. Farklı coğrafik bölgelerde hasat edilen bazı fındık çeşitlerinin yağ asit kompozisyonlarının çeşitler arasında önemli farklılıklar bulunmasına rağmen α - tokoferol ve sterol içeriklerinin coğrafi orijinlerine bağlı önemli değişiklik göstermemektedir [35].

Fındığın en önemli besin öğeleri yağ, protein, karbonhidrat, vitaminler ve minerallerdir. Tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri yönünden iyi bir kaynak olduğu için fındığın tüketimi, Toplam kolesterol değişiminde LDL (low density lipoprotein) seviyesini düşürdüğü bilinmektedir [36]. Diyetle fındık tüketiminin sağlıklı olduğunu ve plazma kolesterol seviyesini azalttığını ve aynı zamanda kolesterole dayalı kalp damar hastalıklarını önlediğini de bilinmektedir. Buna ek olarak vitamin E (α - tokoferol) yönünden iyi bir kaynak olduğu belirtilen fındığın tüketim miktarının artmasıyla kalp rahatsızlıklarından kaynaklanan ölümlerin ve ani ölümlerin azaldığı belirtilmiştir [36].

Fındıkta, bu yararlı bileşenlerin yanı sıra % 57 – 63 oranında ham yağ bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, ham protein açısından da oldukça zengin olan fındık, % 18 – 22 oranında protein içerir [31].

Çizelge 2.7. Fındık yağının tokol bileşimi [35]

Tokoller	Değerler ^a (mg/100g)
α - Tokoferol	21,40 – 34,50
β - Tokoferol	0,75 – 1,42
γ - Tokoferol	7,26 – 22,00
δ - Tokoferol	0,18 – 0,93
α - Tokoferol	0 – 0,27
β - Tokoferol	0,08 – 0,11
γ - Tokoferol	0,16 – 0,31
Toplam Tokol	41,40 – 46,90
Vitamin E	23,90 – 36,10

^aDeğerler Farklı Fındık Türlerinin Değer Aralığıdır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. MATERYAL

Bu çalışmada RBO kaynağı olarak kullanılan pirinç kepeği Manisa' da yerel bir pirinç üreticiden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan fındık yağı ise, maliyeti düşürmek amacıyla hazır alınmış olup, Kardelen Tarım Ürünleri Gıda Maddeleri Temizlik Malz. Ve Konf. Kozmetik İtiryat Toptan Pazarlama İth. İhr. Ltd. Şti. (*Ankara, Türkiye*) firmasının ürettiği, rafinasyon işlemine tabi tutulmuş bir son üründür ve yerel satıcıdan temin edilmiştir.

Ozonlama sırasında kullanılan ozon jeneratörü Ozon Marine Ozon Jeneratörü İmalat ve Teknik Servis Ltd. Şti. (*İzmir, Türkiye*) firması tarafından temin edilmiş olup, ozonlama işlemi de Ozon Marine firmasında yapılmıştır.

Ayrıca, ozonlanmış yağların antimikrobiyal etkileri yönünden kıyaslanması sırasında kullanılan ozonlanmış zeytinyağı (OLIO), Ozon Marine firması tarafından hazır olarak temin edilmiştir ve OLIO, 21 gün süre ile gece gündüz 24 saat devamlı olarak 10 litre zeytinyağının ozonlanması ile üretilmiştir.

3.2. METOT

3.2.1. İşlemler

3.2.1.1. Pirinç Kepeği Yağı Ekstraksiyonu

Pirinç kepeğinden (RB) pirinç kepeği yağı (RBO) ekstraksiyonu Soxhlet ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak yapıldı.

Ekstraksiyon, karşılaştırmalı verim analizi yapılabilmesi amacıyla paralel çalışan birbirinden bağımsız iki ayrı soxhlet ekstraksiyonu düzeneği kurularak gerçekleştirildi.

Ekstraksiyon, 500 ml' lik yuvarlak dipli cam balona, 350 ml çözücü konulması suretiyle, soxhlet aparatına her seferinde, süzgeç kâğıdına sarılmış olan 40 g pirinç kepeği numunesi konularak ve 60 °C'de, 3 saat süreyle sirkülasyon yapması sağlanacak şekilde gerçekleştirildi. Bu süre zarfında 6 – 7 defa sirkülasyon meydana geldi. İlk seferde, çözücünden üç adet 40 g'lık RB ekstraksiyonu yapılmış olup, diğer ekstraksiyonda ise dört sefer 40 g'lık pirinç kepeğinin ekstraksiyonu yapılmıştır. Tek seferde konulmuş olan çözücünden, dört sefer 40,00 g'lık kepeğin

ekstraksiyonu yapılırken, toplamda her bir partide ortalama 160 g'lık pirinç kepeği kullanılmıştır. 160 g pirinç kepeği kullanımı sonucunda, çözücü–yağ karışımı alınıp, 500 ml'lik cam balona yeni çözücü konularak çözücü yenilendi. Ekstraksiyon sırasında çözücü olarak n-hekzan (*Merck, Darmstadt, Almanya*) kullanıldı.

Ekstraksiyon sonucu, 500 ml'lik cam balondaki karışım, döner evaporatöre bağlandı. Çözücü, 45 °C'de 150 devir/dakika'da vakum altında 30 dakika boyunca uçuruldu. Elde edilen işlenmemiş –ham– pirinç kepeği yağı (CRBO – Crude Rice Bran Oil), kombine edilmiş sakızımsı ve mumsu yapıları giderme (Dewaxing & Degumming) işlemine tabi tutuldu.

Fındık yağı hazır olarak temin edildiği için, ekstraksiyon işlemi fındık yağında gerçekleştirilmemiştir.

3.2.1.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıların Giderilmesi

Ham RBO (100 g) 250 ml' lik behere konuldu ve üzerine ağırlıkça % 5 oranında saf su eklendi. 32 °C' de 1 saat boyunca devamlı olarak karıştırıldı. 30 dakikalık süre dolduğunda, karışıma 30 dakika boyunca dakikada 6000 devir gerçekleştirecek şekilde santrifüj işlemi yapıldı [15]. Üstteki faz, mumsu ve sakızımsı yapılardan arındırılmış yağ kısmı olup, alt faz ise mumsu ve sakızımsı yapıları içeren sulu kısımdır.

Üst faz olan mumsu ve sakızımsı yapılardan arındırılmış RBO (dRBO–dewaxing & degumming RBO) alınarak diğer işlemlere tabi tutuldu.

Fındık yağı hazır olarak temin edildiği için, sakızımsı ve mumsu yapıların giderilmesi işlemi fındık yağında gerçekleştirilmemiştir.

3.2.1.3. Bitkisel Yağların Ozonlanması İşlemi

Ozonlama işlemi sırasında endüstriyel ozon jeneratörü kullanıldı. Kullanılan jeneratör, elektrik akımı ile O₂ gazının O₃ gazına dönüştürülmesi prensibine dayanarak çalışmaktadır. Kullanılan ozon jeneratörünün özellikleri Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ozon jeneratörünün özellikleri.

Jeneratör Elektrot Tipi	Corona Deşarj (LLC)
Sabit Çalışma Voltajı (Şebeke) (V)	220
Çalışma Frekansı (Hz)	50
Trafo Voltajı (V)	16.000
Enerji Tüketimi (Watt/h)	800 – 1000
Gaz Debisi (lt/h)	1050 – 2500
Ozon Üretimi (g/h)	10
Ozon / Oksijen Yoğunluğu (%)	4 – 6

Sistemden dışarıya bir hortum vasıtasıyla alınan O_3 gazı, hortum ucuna, küçük ve yuvarlak bir akvaryum difüzörü takılması ve bu difüzörün yağ içerisine daldırılması suretiyle gerçekleştirildi.

Ozonlanacak olan yağdan, 45 g alınarak 5 cm'lik ebatlarındaki ağzı kapaklı cam kavonoza konuldu. Önceden, kapağa açılmış olan delikten, jeneratörden gelen hortum geçirilerek hortum, akvaryum difüzörüne bağlandı ve difüzör yağ içerisine daldırıldı. Cam kavanozun ağzı kapatılarak, ozon gazının yağ içerisinden geçmesi suretiyle yağın ozonlanması sağlandı. Akvaryum difüzörü, hortumdan gelen ozon gazının yağ ile tam etkileşmeden dışarı çıkışını önlemek amacıyla kullanılmıştır.

Ozonlama işlemi, pirinç kepeği yağı ve fındık yağının, her biri için 3 saat ve 5 saat olmak üzere iki ayrı numune üzerinde çalışılması ile gerçekleştirildi.

Ozonlanmış bitkisel yağlar (pirinç kepeği yağı, fındık yağı ve zeytinyağı) diğer işlemlere tabi tutuldu.

3.2.2. Analizler

3.2.2.1. Kimyasal Analizler

3.2.2.1.a. Asit Sayısı

Asit sayısı I_A , 1 gram numunenin içinde bulunan serbest asitleri nötralleştirmek için gerekli olan potasyum hidroksit miktarının miligram cinsinden ifadesidir. [38].

10,00 gram numunenin (m g) eşit hacimde karıştırılmış ve 0,1 M potasyum hidroksit, 0,5 ml fenolftaleyn indikatörü eşliğinde nötrleştirilmiş 50 ml' lik etil alkol – eter karışımında çözülür.

Numune çözündükten sonra 0,1 M potasyum hidroksit 15 saniye boyunca değişmeyen pembe renk görününceye dek titre edilir (n , ml cinsinden 0,1 M potasyum hidroksit miktarı) [38].

$$I_A = \frac{5,610 \times n}{m}$$

3.2.2.1.b. İyot Sayısı

İyot sayısı I_i , 100 gram numuneye gram cinsinden bağlanabilen holojen miktarının, iyot cinsinden hesaplanmasıdır [39].

Çizelge 3.2. Beklenen iyot sayısına göre kullanılacak numune miktarı [40]

Beklenen I_i Değeri	Numune Miktarı (g)
20' den az	1,0
20 – 60	0,5 – 0,25
60 – 100	0,25 - 0,15
100' den fazla	0,15 - 0,10

Beklenen iyot sayısına göre çizelge 3.2.'de tanımlanmış olan miktarda (m g) numune, iyice kurutulmuş ya da *glasiyal asetik asit R* ile çalkalanmış 250 ml'lik cam kapaklı balona konulur ve 15 ml *kloroform* ile çözülür. Yavaşça 25,0 ml *iyodin bromür çözeltisi* ilave edilir. Kapak kapatılır ve belli aralıklarla çalkalanarak 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilir. 100 g/l' lik *potasyum iyodür* 10 ml ve 100 ml' de *saf su* ilave edilir. 0,1 M *sodyum tiyosülfat* ile sarı renk kaybolana dek çalkalanarak titre edilir. 5 ml *nişasta çözeltisi R* ilave edilir ve 0,1 M *sodyum tiyosülfat* ile renk değişimi kalıcı olana dek titre edilir (n_1 , ml cinsinden 0,1 M *sodyum tiyosülfat* miktarı). Aynı koşullarda kör analiz yapılır (n_2 , ml cinsinden 0,1 M *sodyum tiyosülfat* miktarı) [39].

$$I_i = \frac{1,269 \times (n_2 - n_1)}{m}$$

3.2.2.1.c. Peroksit Sayısı

Peroksit sayısı I_p , tanımlanan metoda göre tespit edilen, 1000 g numune içerisinde bulunan peroksitlerdeki aktif oksijenin miliequivalent cinsinden sayısal bir değeridir [40].

5,00 g numune (m g) 250 ml'lik cam kapaklı erlene konulur. Üzerine, 2 hacim *kloroform* ve 3 hacim *glasiyal asetik asit* içeren 30 ml karışım eklenir. Karıştırılarak numune çözülür ve 0,5 ml *doymuş potasyum iyodür çözeltisi R* eklenir. 1 dakika boyunca çalkalanır ve ardından 30 ml *saf*

su ilave edilir. Kalıcı sarı renk görüne dek devamlı karıştırılarak 0,01 M sodyum tiyosülfat ile titre edilir. 5 ml nişasta çözeltisi R ilave edilir ve renk değişimi durana dek, devamlı çalkalanarak titrasyona devam edilir (n_1 , ml cinsinden 0,01 M sodyum tiyosülfat miktarı). Aynı koşullarda kör analiz yapılır (n_2 , ml cinsinden 0,01 M sodyum tiyosülfat miktarı). Kör analiz sırasında kullanılan 0,01 M sodyum tiyosülfat' ın hacmi 0,1 ml' den fazla olmamalıdır [40].

$$I_P = \frac{10 \times (n_1 - n_2)}{m}$$

3.2.2.2. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi

Analiz AOAC International'ın standart metodundan faydalanılarak yapılmıştır. AOAC (996.06) metoduna göre gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. 20 mikrolitre yağ alınıp, üzerine 500 mikrolitre Metanol – İzooktan (Merck, Darmstad, Almanya) (80:20) içinde hazırlanan sodyum metilat (Merck, Darmstad, Almanya) içeren çözeltiden ilave edilerek bir gece türevlenmesi için beklenilmiştir. Üzerine 500 µL izooktan (Merck, Darmstad, Almanya) ilave edilerek üst faz alınıp sisteme verilmiştir. Kullanılan GC/MS 'in özellikleri: QP 5050 GC/MS GC: Shimadzu 17 A MS: Quadrapole Dedektör dür. GC' nin çalışma şartları Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Gaz kromatografisinin çalışma şartları.

Enjeksiyon Bloğu Sıcaklığı	230 °C
Detektör Sıcaklığı	230 °C
Akış Hızı	14 psi
FID Detektör Akımı	70 eV
İyonlaşma Türü	EI
Kullanılan Gaz	Helyum
Kullanılan Kolon	FFAP 50m * 0,32 mm, 0,25 µm
Sıcaklık Programı	120 °C' de 1 dakika, 230 °C' ye kadar 6 °C/dk' lık artış ve 230 °C' de 30 dakika bekleme

3.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

3.2.3.1. Agar Difüzyon Yöntemi

Antimikrobiyal aktivite tespiti çalışmalarında aşağıdaki test mikroorganizmaları kullanılmıştır.

1. *Escherichia coli* ATCC 39628
2. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P

3. *Sarcina lutea* ATCC 9341NA
4. *Bacillus subtilis* ATCC 6633
5. *Salmonella typhimurium* CCM 5445
6. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
7. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
8. *Enterobacter cloacae* ATCC 13047D
9. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
10. *Candida albicans* ATCC 10231

Bu test mikroorganizmalarından dokuz tanesi bakteri ve bir tanesi de (*Candida albicans*) mikrofungustur. Test mikroorganizmaları Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan alınmıştır. Ozonlanmış Pirinç Kepeği Yağına (Ozonized Rice Bran Oil, ORBO) ait örnekler 250 mg/ml olacak şekilde etanolde çözülerek, antimikrobiyal aktivite taramaları agar difüzyon yöntemi ile yapılmıştır [41]. Bu yöntemde besi yeri olarak bakteriler için Mueller Hinton Agar (MHA), mikrofungus için ise Patates Dekstroz Agar (PDA) kullanılmıştır. Kullanılan yağ örneklerinin besi yerinde difüzyonunu sağlamak için 100 ml besi yerine 2 ml Tween 80 ilavesi yapılmıştır. Test mikroorganizmalarından bakteriler Mueller Hinton Broth, maya ise Patates Dekstroz Broth içine aşılansak uygun sıcaklık derecesinde bir gece (maya 2 gece) bekletilmişlerdir. Uzun süredir soğuk koşullarda bekletilen mikroorganizmalar bu şekilde aktif hale getirilmiş ve sayıca artış sağlanmıştır. Daha sonra test mikroorganizmalarının yoğunluğu McFarland yoğunluk çizelgesi No: 0.5 yardımıyla 1.0×10^6 koloni oluşturan birim (kob)/ml'ye (*C. albicans* ise 1.0×10^4 kob/mL) ayarlanmış ve içerisinde 25 mL uygun steril besi yeri bulunan Petri kaplarına 50 µl aktararak steril pamuklu çubuk yardımıyla tüm besi yeri yüzeyine dağıtılmıştır. 30 dakika beklenerek besi yerinin aktarılan test organizmasını emmesi sağlanmış, ardından steril koşullarda agar yüzeyinde 6 mm çapında 4'er adet kuyucuk açılmıştır. Bu kuyucuklara her bir ozonlanmış örneklerden elde edilen etanol süspansiyonlarından 60 µl (2 mg/çukur) steril koşullarda aktarılmıştır. Ayrıca aynı miktarda kullanılan çözücüde negatif kontrol amacıyla kuyucuklara aktarılmıştır. Bunların yanı sıra karşılaştırma yapabilmek amacı ile bazı standart ticari antibiyotiklere [Nalidiksik asit (30 µg/disk); Novobiyosin (30 µg/disk); Ampisilin (10 µg/disk); Penisilin G (10 i.u./disk); Eritromisin (15 µg/disk); Imipenem (10 µg/disk); Vankomisin (30 µg/disk); Kloramfenikol (30 µg/disk) ve Nistatin (10 µg/disk)] ait diskler de Petri kaplarına yerleştirilmişlerdir (pozitif kontrol). Daha sonra Petri kapları uygun sıcaklık değerlerinde 24 – 48 saat süre ile inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucukların etrafında görülen inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülerek kaydedilmiştir. Tüm antimikrobiyal aktivite tespiti çalışmaları üç tekrarlı olarak yapılmıştır [41,42].

3.2.3.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MIC)' ların Belirlenmesi

Test bakterileri için çift kuvvetli Mueller Hinton Broth (MHB, Oxoid), *Candida albicans* için yine çift kuvvetli Patates Dekstroz Broth (PDB, Oxoid) hazırlanmıştır. Bu besi yerlerinin sterilizasyon öncesi ve sonrası pH' ları kontrol edilerek doğrulanmıştır. Kullanılan indikatör 2,3–5 Trifenil Tetrazolium Klorür' dür (2,3–5 Triphenyl Tetrazolium Chloride; TTC, Merck K35881980). TTC, 0.018 g/L olacak biçimde steril distile su ile hazırlanarak filtrasyon ile sterilize edilmiştir. Pozitif kontrol için kullanılan antibiyotikler Neomisin, Gentamisin ve Nistatindir. Bütün besi yerleri ve kimyasallar taze hazırlandıktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir [14,42].

Ozonlanmış örneklerimiz 10 mg/mL olacak şekilde saf etanolde homojen karıştırılmış (aktarmadan önce vortex ile tüplerin karıştırılması daha uygun olmaktadır) antibiyotikler ise steril distile su ile 150 µg/mL konsantrasyonda hazırlanarak filtrasyon ile sterilize edilerek stok sıvıları oluşturulmuştur. Nistatinin suda çözünürlüğünü artırmak için az miktarda etanolde hazırlandıktan sonra uygun konsantrasyonu yakalamak için steril distile su ilave edilmiştir. Ozonlanmış örneklerin denenen konsantrasyonları 10 – 0.0196 mg/mL; antibiyotiklerin ise 150 – 0.293 µg/mL aralığındadır. Stok sıvılar kullanılıncaya kadar +4°C' de saklanmıştır.

İlk denemelerin doğrultusunda, ozonlanmış numunelerin etkili olduğu mikroorganizmalardan; *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *E. aerogenes* ve *C. albicans* MIC belirlenmesi için seçilmişlerdir. Bakteriler MHB' da 37°C' de 18–24 saat; maya ise PDB' da 30 °C' de 48 saat büyütülerek aktive edilmiştir. Test organizmalarının uygun yoğunluğa ayarlanabilmesi için CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003 ve 2006) standartları göz önünde bulundurularak 0.5 ya da 1.0 McFarland yoğunluk çizelgesi hazırlanmıştır. Ancak bu mikroorganizmaların optik yoğunlukları değişkenlik gösterdiğinden uygun besi yerlerinde kültürleri yapılarak yoğunlukları doğrulanmıştır. Uygun seyreltmeleri aseptik şartlar altında canlılık değerleri göz önünde bulundurularak yapılmıştır; MIC değerlerinin tespiti için son yoğunluk bakteriler için 5×10^6 koloni oluşturan birim (kob)/mL, maya için ise 5×10^5 kob/mL dir [14,42,44].

Mikro seyreltme yönteminde 96'lı çukur içeren steril mikro seyreltme plakaları aseptik koşullarda hazırlanmıştır. Ozonlanmış veya kontrol antibiyotiklerinin her birinden 100 µL alınarak 12'li yatay çukur sıralarının soldan birincisine aktarılmıştır. Diğer çukurlara ise öncelikle seyreltme sıvısı olarak 50'şer µL, bakteriler için MHB maya için ise PDB (çift kuvvetli) aktarılmıştır. Daha sonra, test materyalinin (ozonlanmış örnek veya antibiyotik) aktarıldığı ilk çukurdan 50 µL alınarak yanındaki 2. çukura ilave edilmiştir. Homojen karışım sağlandıktan sonra 2. çukurdan yine 50 µL alınarak yanındaki 3. çukura aktarılmış ve bu işlem onuncu yatay çukura kadar gerçekleştirilerek test materyallerinin azalan konsantrasyonlarda seri seyreltmeleri

hazırlanmıştır. En son olarak mikro pipette kalan 50 µL test materyali atılmıştır. Bu işlemlerin ardından, daha önceden yoğunluğu ayarlanmış mikroorganizma kültürlerinden 50'şer µL alınarak yatay çukur sırasında 1'den 11'e kadar sırasıyla aktarılmış, 12. çukurcuğa ise sadece 100 µL steril sıvı besi yerinden ilave edilmiştir. Bu şekilde çalışılan her bir mikroseyreltme plakasında azalan miktarlarda ozonlanmış numune içeren 10 adet çukur (1–10. çukurlar), büyüme kontrolü için sadece mikroorganizma aşılana çukur (11. çukur) ve besi yeri sterilite kontrolü için ayrılan bir adet çukur (12. çukur) bulunmaktadır. Paralel denemelerle pozitif kontrol için seçilen antibiyotiklerde aynı işlemlere tabi tutulmuştur. Bu şekilde hazırlanan plakalar aseptik koşullarda dehidrasyonu engellemek için ince naylon filmlerle dikkatlice sarılarak, bakteriler için 37 °C'de 18 – 24 saat, maya için ise 30 °C'de 24 – 36 saat inkübasyona alınmıştır. Teste tabi tutulan örnekler ve pozitif kontrol antibiyotikleri için tüm denemeler 3 tekrarlı yürütülmüş ve ortalama değerleri hesaplanmıştır.

TTC ile mikro seyreltme plakalarında sonuçlar şu şekilde değerlendirilmiştir. İnkübasyon sonrasında her bir çukura daha önceden hazırlanan TTC' den 15 µl aktararak 37 °C'de 1 saat reaksiyona bırakılmıştır. Süre sonunda renk değişiminin görülmediği ilk çukurdaki en düşük örnek ya da antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak değerlendirilmiştir. Renklenme (menekşe-pembe ya da bazı durumlarda tuğla kırmızısı) mikrobiyal büyümeyle beraber gerçekleşmektedir. Çünkü metabolik olarak aktif mikroorganizmalar dehidrogenaz enzimiyle TTC'yi formazan (pembe-kırmızı) adı verilen intrasellüler maddeye indirger. Yukarıda açıklandığı üzere büyüme kontrolü ve sterilite kontrolü için ayrılan çukurcuklardaki reaksiyonlarla beraber değerlendirmelerin yapılması daha yararlı olmaktadır. Aynı zamanda plakalar kuvvetli ışık altında büyümenin göstergesi olan bulanıklık açısından da değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. İŞLEMLER

4.1.1. Pirinç Kepeği Yağı (RBO) Ekstraksiyonu Bulguları Ve Tartışması

Ekstraksiyon sonu elde edilen ham pirinç kepeği yağının miktarı ve verimi Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Ham pirinç kepeği yağı miktarı ve verimi.

Parti No.	RB ^a miktarı (g)	CRBO ^a miktarı (g)	Verim (%)
1	130,10	24,15	18,56
2	155,36	29,23	18,81
3	162,54	30,76	18,92
4	160,25	30,11	18,79
5	161,84	30,46	18,82
6	160,81	30,22	18,79
Toplam	930,90	174,93	18,78

^aRB, Pirinç Kepeği (Rice Bran); CRBO, Ham Pirinç Kepeği Yağı (Crude Rice Bran Oil).

Pirinç kepeğinin % 13 – 23 aralığında yağ içerdiği bilinmektedir. Bazı çalışmalarda ise pirinç kepeğindeki yağın, türüne göre değişiklik göstermekle birlikte yüzdesel olarak % 10,1 – 22,4 ve % 13,3 – 19,8 aralıklarında değiştiği şeklinde farklı bulgular da mevcuttur [23].

Çizelge 4.1.' de görüldüğü gibi, çalışmamız sırasında yaptığımız ekstraksiyonda, ortalama % 18,78' luk bir verim ile 930,90 g pirinç kepeğinden, 174,93 g ham pirinç kepeği yağı elde edildi. Bu verimi, pirinç kepeği yağı ekstraksiyonu ile ilgili diğer çalışmalarla kıyasladığımız zaman, ekstraksiyon verimimizin oldukça iyi bir değere sahip olduğu görülmektedir.

4.1.2. Sakızımsı Ve Mumsu Yapıların Giderilmesi Bulguları Ve Tartışması

Ham pirinç kepeği yağındaki (CRBO) sakızımsı ve mumsu yapıların giderilmesi işleminin sonuçları ve verimi Çizelge 4.2. de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. Sakızimsı ve mumsu yapıları giderilmiş pirinç kepeği yağı (dRBO)'nın miktarı ve verimi

Parti No.	CRBO ^a miktarı (g)	dRBO ^a miktarı (g)	Verim (%)
1	40,02	32,90	82,21
2	40,05	32,95	82,27
3	40,03	32,93	82,26
4	40,07	32,96	82,26
Toplam	160,17	131,74	82,25

^aCRBO, Ham Pirinç Kepeği Yağı (Crude Rice Bran Oil); dRBO, Sakızimsı ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağı (Dewaxing & Degumming Rice Bran Oil).

Günümüzde genellikle, sakızım ve mumsu yapıları giderme işlemleri, ayrı ayrı iki basamak halinde yapılır. Bu işlemlerden özellikle sakızimsı yapıları giderme işlemi sırasında ağırlıkça % 2 oranında fosforik asit kullanılır [37,45]. Kimyasal rafinasyon sırasında doğal yağda azalma ve γ -oryzanol ile diğer bioaktif bileşiklerde de kayıp meydana gelir. Ayrıca fosforik asit, fosfatitleri gideremez ve yağın rengi koyu olur. Bundan dolayı da yüksek kaliteli bir yağ elde edilemez [45].

Bu sebeplerden dolayı, sakızimsı ve mumsu yapıları giderebilmek için bir çok kimyasal yöntem olmasına karşın, bizim bu yapıları su ile gidermemizin nedeni, hem ekonomik, hem uygulanması kolay, hem de etkili bir yöntem olmasıdır.

Uygulanan işlem sonucu 160,17 g ham pirinç kepeği yağından (CRBO) % 82,25'lik bir verim ile 131,74 g sakızimsı ve mumsu yapıları giderilmiş pirinç kepeği yağı (dRBO) elde edilmiştir.

4.1.3. Ozonlama İşlemi Bulguları Ve Tartışması

Ozonlama işlemi, her iki yağ türü için de 3 saat ve 5 saat olmak üzere ikişer numune üzerinde yapılması planlandı. Ozonlama işlemi gerçekleştirilirken meydana gelen değişikliklerin takibi ise belli periyotlarla fotoğraflanarak görsel olarak gerçekleştirildi.

Ozonlama işleminin bitkisel yağlar üzerinde meydana getirdiği kimyasal değişiklerin takibi ise, asit, iyot ve peroksit sayılarının tayin edilmesi ile gerçekleştirildi. Ozonlama yapılan yağ miktarının düşük olması ve ozon jeneratörünün, laboratuvar tipi değil de, endüstriyel tipte bir jeneratör olması ve ozonlama işleminin laboratuvar ortamı dışında yapılması nedenleriyle, belli periyotlarla asit, iyot, peroksit değerlerinin analizi yapılmamış olup, sadece başlangıçtaki ve ozonlama işlemi sonundaki numunelerin asit, iyot, peroksit değerleri analizleri yapılmıştır.

Ham pirinç kepeği yağı (CRBO)'nın ozonlanmasının görsel takibine ilişkin fotoğraflar şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de verilmiştir;



Reaksiyon Başlangıcı (0. Dakika)



5. Dakika



10. Dakika



15. Dakika



20. Dakika



25. Dakika



30. Dakika



35. Dakika



40. Dakika



45. Dakika



50. Dakika



1. Saat



1 Saat 15 Dakika



1 Saat 30 Dakika



1 Saat 45 Dakika



2 Saat



2 Saat 30 Dakika



3 Saat (Reaksiyon Sonu)

Şekil 4.1. Sakızımsı ve mumsu yapıları giderilmiş pirinç kepeği yağı (dRBO)'nın üç saat ozonlanmasının görsel takibi (ORBO3h).

Şekil 4.1.'de görüleceği gibi, ozonlama sırasında renk, özellikle ilk yarım saatte hızlı bir şekilde açılmış ve ilk saatin sonuna kadar da açılmaya devam etmiştir. Aynı zamanda yağın akışkanlığında da bir katılaşma gözlemlenmiştir Daha sonrasında ise renk değişimi çok fazla gözlenmemiş olup, kıvamdaki koyulaşma –katılaşma– devam etmiştir. Yağın kıvamındaki bu katılaşma, yağın akışkanlığını durdurmamıştır, sadece azaltmıştır. Üç saatlik süre sonunda, sistem kapatılmış olup ve ozonlanmış pirinç kepeği yağı (ORBO3h) diğer analizler için işleme alınmak için +4 °C'de saklanmıştır.

Ozonlama işlemi, oda sıcaklığında yapılmış olup, ozonlama esnasında, ısı artışı gözlenmemiş olup, bu sebepten dolayı da, herhangi bir soğutma sistemi kullanılmasına ihtiyaç duyulmamıştır.



Reaksiyon Başlangıcı (0.Dakika)



5. Dakika



10. Dakika



15. Dakika



20. Dakika



25. Dakika



30. Dakika



35. Dakika



37. Dakika



38. Dakika



38. Dakika



39. Dakika



40. Dakika

Şekil 4.2. Sakızımsı ve mumsu yapıları giderilmiş pirinç kepeği yağı (dRBO)'nın 40 Dakika Ozonlanmasının Görsel Takibi (ORBO30min).

Pirinç kepeği yağının ozonlaması sırasında, 5 saat boyunca ozon gazına tabi tutularak ozonlanacak olan numune üzerinde çalışılırken, ilk yarım saatlik süre sonrasında yağın renginde, yağdaki ani bir ısı artışına paralel olarak açılma meydana geldi. Bu renk açılmasını takiben, ani bir köpürme ve arkasından da yağın renginde ani bir kararma – koyulaşma meydana geldi (Şekil 4.2.). Bunun sebebinin ne olabileceği konusunda yapılan teorik araştırma sonucu nedenin; aşırı ısınmaya bağlı olarak yağın ozon/oksijen gazı karışımındaki oksijen molekülü ile reaksiyonuna girmiş olabileceği ve bunun sonucunda da, yağın yanması neticesinde yağın kararmış olması durumu ağır basmaktadır.

Fındık yağının ozonlanması işlemi, pirinç kepeği yağının ozonlanması ile aynı koşullarda gerçekleştirildi. Fakat ozonlama işlemi sırasında görsel olarak renk değişimi ya da kıvamda – viskozitede– görsel olarak herhangi bir değişim gözlemlenmedi. Bu sebepten fındık yağının ozonlanma işlemine ait görsel fotoğraflar eklenmedi.

4.2. ANALİZLER

4.2.1. Peroksit, Asit Ve İyot Sayıları Analiz Bulguları

Pirinç kepeği yağının ve fındık yağının, ozonlamadan önce ve sonraki durumlarına ait asit, iyot ve peroksit sayıları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Peroksit, Asit Ve İyot Sayıları.

Peroksit Sayısı (mmol-equiv. kg ⁻¹)			
	İşlem Görmemiş Yağ	Ozonlanmış Yağ (3 saat)	Ozonlanmış Yağ (5 Saat)
dRBO ^a	10,21 ± 0,28 ^c	972,71 ± 13,56 ^c	-
HO ^a	1,32 ± 0,11 ^c	4,22 ± 0,16 ^c	8,74 ± 0,62 ^c
Asit Sayısı (mg KOH g ⁻¹)			
	İşlem Görmemiş Yağ	Ozonlanmış Yağ (3 saat)	Ozonlanmış Yağ (5 Saat)
dRBO ^a	64,52 ^b ± 1,46 ^c	83,07 ^b ± 1,37 ^c	-
HO ^a	44,25 ^b ± 1,18 ^c	47,32 ^b ± 1,56 ^c	53,84 ^b ± 1,38 ^c
İyot Sayısı (g İyot / 100 g)			
	İşlem Görmemiş Yağ	Ozonlanmış Yağ (3 saat)	Ozonlanmış Yağ (5 Saat)
dRBO ^a	102,23 ^b ± 1,17 ^c	42,32 ^b ± 1,43 ^c	-
HO ^a	88,43 ± 1,12	81,86 ± 1,14	76,13 ± 1,29

^adRBO, Sakızımsı Ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağı; HO, Fındık Yağı.

^b Değerler üç analizin ortalamasıdır.

^cStandart Sapma.

4.2.2. Yağ Asidi Kompozisyonu Analizi Bulguları

Pirinç kepeği yağının ve fındık yağının yağ asidi kompozisyonları Çizelge 4.4.' da verilmiştir.

Çizelge 4.4. Pirinç Kepeği Yağı ve Fındık Yağının Yağ Asidi Kompozisyonları.

Yağ Asitleri	dRBO ^a (%)	HO ^a (%)
Mistirik Asit (C14:0)	0,27	0,03
Palmitik Asit (C16:0)	15,67	5,09
Palmitoleik Asit (C16:1)	0,12	0,16
Stearik Asit (18:0)	1,25	2,22
Oleik Asit (C18:1)	37,34	79,11
Linoleik Asit (C18:2)	41,95	12,80
Linolenik Asit (C18:3)	1,38	0,12
Arasidik Asit (C20:0)	0,43	0,00
Gadoleik Asit (C20:1)	0,42	0,17

^adRBO, sakızimsı ve mumsu yapıları giderilmiş pirinç kepeği yağı; HO, fındık yağı.

4.2.3. Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi Bulguları Ve Tartışması

Ozonlanmış yağ örneklerinin etanolla elde edilen solüsyonlarının inhibisyon zon çapı değerleri Çizelge 4.5. 'de verilmiş ve test mikroorganizmaları üzerindeki etkileri Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.' de gösterilmiştir. İnhibisyon zon çapının değeri standart antibiyotiklerin zon çapı değerleri ile kıyaslanarak aynı mikroorganizma üzerinde standart antibiyotiğe göre daha etkin, aynı etkinlikte ve daha az etkili sonuçlarına ulaşılmaktadır. Böylece standart antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara karşı etkili ozonlanmış örneklerin olup olmadığı ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamız neticesinde kullanılan ozonlanmış pirinç kepeği yağının oldukça yüksek değerlerde test edilen mikroorganizmalar üzerine etkili oldukları tespit edilmiştir. Genellikle 3 saat süreyle ozonlanan RBO; 15 – 34 mm arasında değişen değerlerde mikroorganizmalar üzerine etkili olmuştur. Bu değerler pozitif kontrol olarak kullanılan standart antibiyotiklerin inhibisyon değerleriyle karşılaştırılabilecek niteliktedir. Negatif kontrol olarak kullandığımız ozonlanmamış pirinç kepeği yağı (Dewaxed & Degummed Rice Bran Oil, dRBO)' nın mikroorganizmalar üzerine hiçbir inhibisyon etkisi bulunmamaktadır. 30 dakika süreyle ozonlanan RBO' da ise yine antimikrobiyal aktivite görülmüş ancak daha düşük sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla 3 saatlik sürenin ozonlamada yeterli olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmada tespit ettiğimiz diğer önemli bir noktanın ORBO' nun mikroorganizmalar arasında ayırım gözetmeden hepsine etkili olabileceğidir. Diğer bir deyişle, hem Gram (+), hem Gram (-) bakteriler hem de mayalar üzerine oldukça yüksek değerlerde inhibisyon etkisi görülmüştür.

Ön denemelerle elde ettiğimiz bilgiler ışığında, ORBO' nun 5 farklı mikroorganizmaya karşı MIC değerleri mikro seyreltme yöntemiyle tespit edilmiştir (Çizelge 4.6.). Bu yöntem hızlı ve hassas

olması ve az miktarda materyalin kullanılmasına olanak sağlamasıyla makro broth seyreltme ve agar difüzyon yöntemlerine göre oldukça avantajlıdır. Diğer taraftan mikrobiyal büyümeyle beraber metabolizmaya dayalı olarak reaksiyon verebilen indikatör boyaların ya da reaktiflerin belli oranlarda testlere ilave edilmesiyle sonuçlar daha doğru ve kolay okunabilir olmaktadır ⁴. Bu yöntemin günümüzde farklı organizmalara, doğal ürünlere, bitki ya da fungus ekstraktlarının farklılığına ve izole edilen aktif metaboliklerin saflık derecesi ve tipine göre değişik modifikasyonları yapılmaktadır. Ancak metodun temel prensibi aynı olmakla beraber mikroorganizmaların bu tür maddelere karşı hassasiyetlerinin belirlenmesinde uluslararası standartlara (CLSI) uyma mecburiyeti vardır. Günümüzde bu metotla beraber kullanılabilen bazı indikatörler Fenol Red (FR), Rezazurin, Tetrazolium Klorit (TTC), Bromcresol Purple gibi maddelerdir.

ORBO' nun MIC değerleri 0.73 – 1.88 mg/mL arasında kullanılan test mikroorganizmasına göre değişmekle beraber en iyi MIC değeri *Enterobacter aerogenes* üzerinedir (0.73 mg/mL). MIC değerlerine göre test edilen mikroorganizmaların ORBO' ya karşı hassasiyetleri en hassastan en dirençliye doğru; *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* şeklindedir. Çizelge 4.5.' den kullandığımız test mikroorganizmalarının tedavide kullanılan çoğu antibiyotiğe dirençli olduklarını görmekteyiz.

Çizelge 4.5. Ozonlanmış Yağ Örneklerinin Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları (zon çapı / mm)

<i>Test Mikroorganizmaları^a (İnhibisyon zonu, mm)^b</i>										
Örnek	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>S.l</i>	<i>B.s</i>	<i>S.t</i>	<i>S.e</i>	<i>E.a</i>	<i>E.f</i>	<i>E.cl</i>	<i>C.a</i>
ORBO3h	24	22	16	26	15	24	34	16	22	25
ORBO30min	14	18	12	18	16	14	30	10	16	16
OLIO	0	12	0	10	0	0	20	0	10	10
dRBO	0	0	8	0	8	0	0	0	0	0
HO	0	0	12	0	10	0	12	0	0	0
OHO3h	0	0	0	10	0	8	12	0	0	0
OHO5h	0	10	0	10	0	0	12	0	0	10
NK ^d	6	4	4	6	4	8	6	6	6	8
AMP ^e	15 ^R	0	26	10 ^R	0	0	6 ^R	16	16	ND
P	24	0	20 ^R	8 ^R	0	0	6 ^R	24	12 ^R	ND
ERY	20	12 ^R	26	15	28	28	24	30	15 ^R	ND
IPM	34	30	40	34	30	24	30	40	30	ND
VA	12	0	15	0	28	0	6 ^R	16	16	ND
CLH	20	26	30	30	40	12 ^R	12 ^R	30	26	ND
NV	32	0	28	13 ^R	40	20	17 ^R	28	22	ND
NA	20	26	10	32	0 ^R	30	26	30	12 ^R	ND
NYS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22

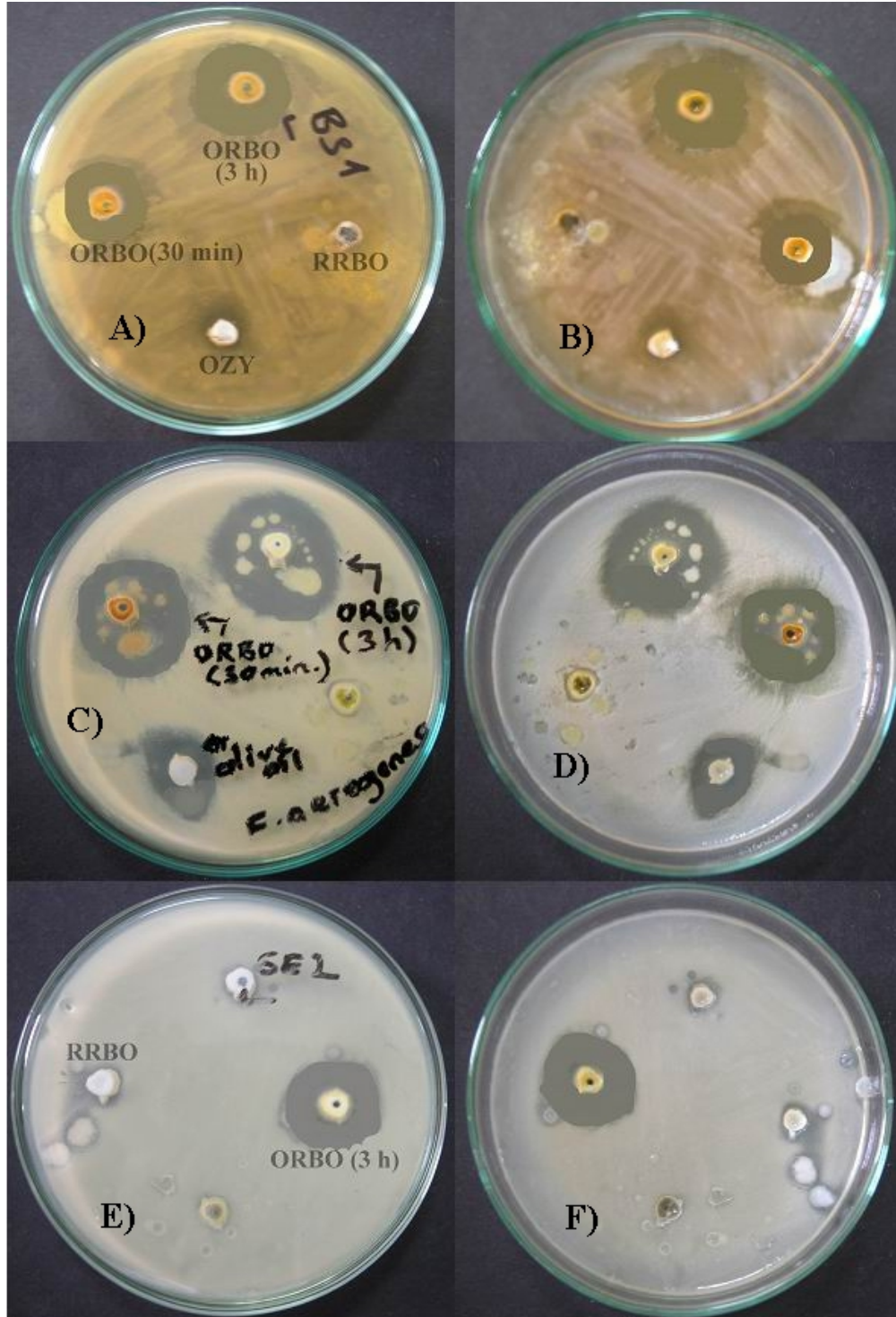
^a*S.a* - *Staphylococcus aureus*; *E.c* - *Escherichia coli*; *S.l* - *Sarcina lutea*; *B.s* - *Bacillus subtilis*; *S.t* - *Salmonella typhimurium*; *S.e* - *Staphylococcus epidermidis*; *E.a* - *Enterobacter aerogenes*; *E.f* - *Enterococcus faecalis*; *E.cl* - *Enterobacter cloacae*; *C.a* - *Candida albicans*. ^bİnhibisyon zon çapı mm cinsinden olup, çukur çaplarını (6 mm) kapsamaktadır, negatif kontrol inhibisyonuna eşit ya da altındaki değerler 0 olarak belirtilmiştir; ortalama değer hesaplaması için, n = 3; 0 – inhibisyon yok; ^dNK – negatif kontrol. R: dirençli, ND: belirlenmedi, Bakteriler MHA, maya PDA ortamında test edilmiştir. ^eNA - Nalidiksik asit(30 µg/disk); NV - Novobiyosin (30 µg/disk); AMP - Ampisillin (10 µg/disk); P - Penisilin G (10 i.u./disk); ERY - Eritromisin (15 µg/disk); IPM - Imipenem (10 µg/disk); VA - Vankomisin (30 µg/disk); CHL - Kloramfenikol (30 µg/disk); NYS - Nistatin (10 µg/disk). ORBO3h - Ozonized Rice Bran Oil 3 hour, 3 saat Ozonlanmış Pirinç Kepeği Yağı; ORBO30min – 30 Ozonized Rice Bran Oil 30 min, 30 dakika Ozonlanmış Pirinç Kepeği Yağı; dRBO – Dewaxed & Degummed Rice Bran Oil, Sakızimsı ve Mumsu Yapıları Giderilmiş Pirinç Kepeği Yağı; OLIO – Ozonized Olive Oil, Ozonlanmış Zeytin Yağı, HO – Hazelnut Oil, Fındık Yağı, OHO3h – Ozonized Hazelnut Oil 3 hours, 3 saat Ozonlanmış Fındık Yağı; OHO5h – Ozonized Hazelnut Oil 5 hours, 5 saat Ozonlanmış Fındık Yağı.

Çizelge 4.6. Ozonlanmış Yağ Örneklerinin (mg/mL) Ve Standart Antibiyotiklerin ($\mu\text{g/mL}$) MIC Değerleri.

	<i>Mikroorganizmalar^a</i>				
	<i>S.a</i>	<i>E.c</i>	<i>B.s</i>	<i>E.a</i>	<i>C.a</i>
ORBO ^b	1.15 $\pm$ 0.25	1.67 $\pm$ 0.65	1.05 $\pm$ 0.32	0.73 $\pm$ 0.25	1.88 $\pm$ 0.68
<i>Neomisin</i>	27.08 $\pm$ 9.88	5.73 $\pm$ 2.07	7.81 $\pm$ 2.34	6.25 $\pm$ 2.34	ND
<i>Gentamisin</i>	3.91 $\pm$ 1.17	6.25 $\pm$ 2.34	5.21 $\pm$ 1.56	4.43 $\pm$ 0.78	ND
<i>Nistatin</i>	ND	ND	ND	ND	0.49 $\pm$ 0.29

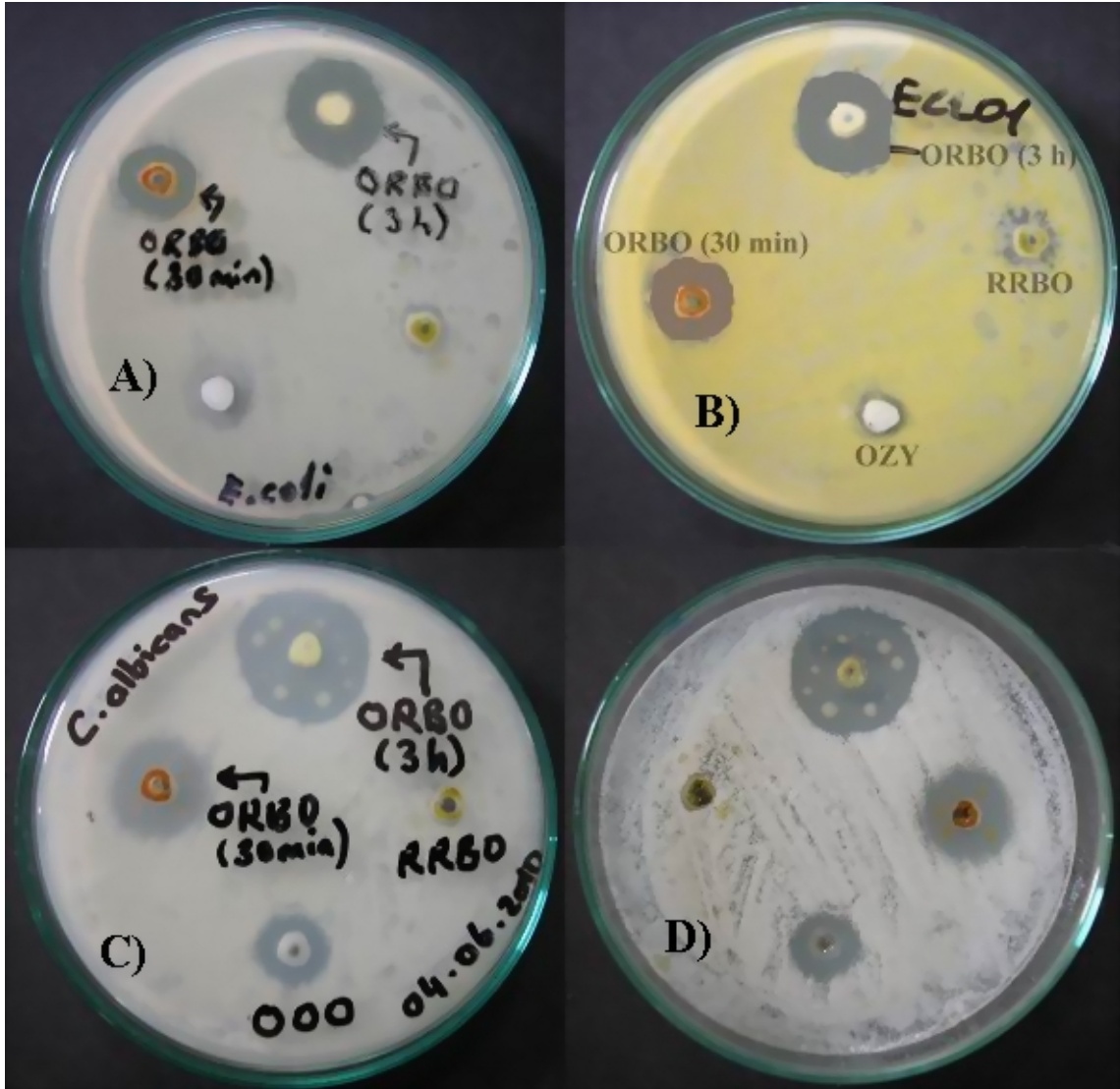
^a*S.a* - *Staphylococcus aureus*; *E.c* - *Escherichia coli*; *B.s* - *Bacillus subtilis*; *E.a* - *Enterobacter aerogenes*; *C.a* - *Candida albicans*. ND – belirlenmedi. Bakteriler için test ortamı: MHB; Maya için test ortamı: PDB.

^bORBO MIC değeri 6 test ortalaması $\pm$ standart sapması, antibiyotiklerin ise 6 test ortalaması $\pm$ standart sapmasıdır.



A) *B. subtilis* (tersten görünüş), B) *B. subtilis* (önden görünüş), C) *E. aerogenes* (tersten görünüş), D) *E. aerogenes* (önden görünüş), E) *S. epidermidis* (tersten görünüş), F) *S. epidermidis* (önden görünüş). ORBO – Ozonized Rice Bran Oil, Ozonlanmış Pirinç Kepeği Yağı; dRBO – Dewaxed & Degummed Rice Bran Oil, Ozonlanmamış, Ham Pirinç Kepeği Yağı; OZY – Ozonlanmış Zeytin Yağı

Şekil 4.3. ORBO'nun bazı mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi



A) *E. coli* (tersten görünüş), B) *E. cloacae* (tersten görünüş), C) *C. albicans* (tersten görünüş), D) *C. albicans* (önden görünüş). ORBO – Ozonized Rice Bran Oil, Ozonlanmış Piriç Kepeği Yağı; RRBO (dRBO) – Dewaxed & Degummed Rice Bran Oil, Ozonlanmamış Piriç Kepeği Yağı; OZY ve OOO – Ozonlanmış Zeytin Yağı, Ozonized Olive Oil.

Şekil 4.4. ORBO'nun bazı mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1.SONUÇ

Bölüm 2.'de sunulmuş olan literatür çalışmaları baz alınarak gerçekleştirilmiş olan bu çalışmada, içerisinde birçok yararlı bileşeni barındıran fakat özellikle içerisindeki zengin γ -oryzanol ile ilgi odağı olmuş olan pirinç kepeği yağı ve yine aynı şekilde içerisindeki birçok yararlı bileşen barındırmasıyla ilgi odağı olmuş fakat yağı ile o kadar ilgi görememiş olan fındık meyvesinin yağı üzerine, dünyada son yıllarda popüler olan ozonlanmış bitkisel yağlarla ilgili araştırmaları uyguladık. Bu araştırmalar sonucunda insan beslenmesinde çok önemli bir yeri olan fındık yağının, ozonlanması sonucu elde edilmiş olan üründe kayda değer bir değişim olmadığı saptanmıştır. Bunun nedeni, oleik asit (% 79) yönünden zengin olan fındık yağının, içeriğinde yüzde olarak az miktarda çift bağ bulunduruyor olması olabilir ya da ozon gazı ile daha verimli bir tepkimeye girebilmesi için daha uzun ozonlama süresine ihtiyaç duyuyor olabilir.

Pirinç kepeğinin % 13 – 23 oranında yağ içerdiği ve bu yağın % 98 oranında ekstrakte edilebildiği bilinmektedir. Yaptığımız çalışmada yağı kendimiz ekstrakte ettik ve % 18,28 oranında yağ elde ettik. Ham pirinç kepeği yağı sakızımsı ve mumsu yapıları giderildikten sonra elde edilen yağın sahip olduğu iyot indeksi oldukça yüksekti. Ayrıca içerisinde % 37 oleik asit (C:18:1) ve % 42 linoleik asit (C:18:2) içermesinden dolayı da, doymamış yağ asitleri yönünden oldukça zengin olmasının yanı sıra, fındık yağına ile kıyaslandığı zaman neredeyse yaklaşık 2 kat daha fazla karbon – karbon çift bağ içerdiği saptandı. Pirinç kepeğinin 3 saat ozonlanması ile elde edilmiş olan nihai ürün ORBO, oldukça yüksek peroksit değerine sahip olmakla birlikte, çift bağların sayısında, yapılan iyot sayısı analizi neticesinde ciddi bir azalma olduğu gözlemlendi. Buradan pirinç kepeği yağının ozon gazı ile oldukça verimli bir tepkime verdiği anlaşılmaktadır.

Pirinç kepeği yağının daha iyi ozonlanması ve de antimikrobiyal aktivite de daha etkili olmasının bir diğer nedeni de, içerisinde barındırdığı ve hiç bir kaynakta bulunmayan γ -Oryzanol yapısı olabilir. γ -Oryzanol, bilindiği gibi antimikrobiyal, anti bakteriyel gibi bir çok olumlu etkiye sahip olan ferulik asit türevlerinin oluşturduğu bir yapılar bütünüdür. γ -Oryzanol yapısı gereği antioksidan etki de göstermekte olup bünyesinde de oldukça fazla çift bağ içermektedir.

Yapılan antimikrobiyal aktivite belirleme çalışmalarından önce, yapılan ön denemelerde hazır olarak temin edilmiş olan ozonlanmış zeytin yağı (OLIO), OHO ile kıyaslandığı zaman neredeyse OHO ile aynı aktiviteyi gösterdiği saptanmıştır. OLIO' nun 21 gün, gece-gündüz devamlı ozonlama işlemine tabi tutulduğu göz önüne alındığında, en etkin antimikrobiyal aktivite belirtisi OLIO' da beklenmekte iken OLIO' nun OHO ile neredeyse aynı zon çaplarına sahip olduğu

görülmüştür. OLIO, OHO ve ORBO' nun kıyaslanmasında ise ORBO' nun çok daha etkili olduğu görülmüş ve ORBO, MIC değerlerinin belirlenmesinde ilgi odağı olmuştur.

Genellikle 3 saat süreyle ozonlanan dRBO; 15 – 34 mm arasında değişen değerlerde mikroorganizmalar üzerine etkili olmuştur. ORBO' nun MIC değerleri 0.73 – 1.88 mg/mL arasında kullanılan test mikroorganizmasına göre değişmekle beraber en iyi MIC değeri *Enterobacter aerogenes* üzerinedir (0.73 mg/mL). MIC değerlerine göre test edilen mikroorganizmaların ORBO' ya karşı hassasiyetleri en hassastan en dirençliye doğru; *E. aerogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* ve *C. albicans* şeklindedir. Çizelge 4.5.' den kullandığımız test mikroorganizmalarının tedavide kullanılan çoğu antibiyotiğe dirençli olduklarını görülmektedir.

Hatta bu organizmalardan bazıları çoğul direnç göstermektedir. Diğer taraftan MIC değerlerinin düşük olması da göz önünde bulundurulursa 3 saat süreyle ozonlanan RBO günümüzde bazı hastalıkların özellikle yüzeysel bakteriyel deri enfeksiyonları ile mantar hastalıklarını (mikozların) tedavisinde kullanılabilir. Yaralanmaların üzeri ozonlanmış pirinç kepeği yağıyla kaplanarak, mikrobiyal enfeksiyonlardan korunulabilir. Ayrıca günümüzde ameliyat sonrası sonucu hastane enfeksiyonlarının (sekonder enfeksiyon) önüne ORBO ile geçilebilir.

5.2.ÖNERİLER

Öncelikli olarak çalışmamızın temelini ülkemizde zengin olarak bulunan pirincin, işleme süreci sonundaki atığı olan ve hayvansal gıda amaçlı kullanılan pirinç kepeğinin nasıl değerlendirilebileceği ve de ülkemizde bol miktarda bulunan fındık meyvesinden nasıl daha verimli yararlanabileceğimiz oluşturduğun, çalışmamız çok geniş kapsamlı gerçekleştirilmemiş olup, bu çalışma bir ön çalışma niteliğinde gerçekleşmiştir. Bu sebeple öncelikli olarak, pirinç kepeği yağının farklı ozonlama süreleri ve farklı ozon dozları kullanılarak çeşitli numuneler üretilmesi, akabinde bunların gaz kromatografisi yöntemi ile yağ asitlerindeki yüzdesel değişimler ile iyot ve peroksit sayılarının takibinin yapılması gerekmektedir. Böylelikle ideal ozonlama süresi belirlenecektir.

Bu işlemleri takiben ORBO' nun tedavi ve korunma yöntemlerini uygulamadan önce ORBO' nun insan vücuduna toksik etkisinin bulunup bulunmadığını en azından uygulanabilecek dozunun hayvan denemeleriyle başlanarak belirlenmesi, ilave çalışmalarla antioksidan ve sitotoksik etkilerinin tespit edilerek bizim bulgularımızın desteklenmesi gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Zaikov, E.G., ve Rakovsky, S.K., *Ozonation of Organic & Polymer Compounds*, Shawbury, Shrewsbury, Shropshire, SY4 4NR, United Kingdom, iSmithers, 2009.
2. Diaz, M.F., Hernandez, R., Martinez, G., Vidal, G., Gomez, M., Fernandez, H. Ve Garces, R., Comparative Study of Ozonized Olive Oil and Ozonized Sunflower Oil, *J. Braz. Chem. Soc.*, 17(2), 403-407, 2006.
3. Diaz, M.F., Sazatornil, J.A.G., Ledea, O., Hernandez, F., Alaiz, M., ve Garces, R., Spectroscopic Characterization of Ozonized Sunflower Oil, *Ozone: Science and Engineering*, 27, 247-253, 2005.
4. Sadowska, J., Johansson, B., Johannessen, E., Friman, R., Broniarz-Press, L., ve Rosenholm, J.B., Characterization of Ozonated Vegetable Oils by Spectroscopic and Chromatographic Methods, *Chemistry and Physics of Lipids*, 151, 85-91, 2008.
5. Lerma-Garcia, M.J., Herrero-Martinez, J.M., Simo-Alfonso, E.F., Mendonça, C.R.B., Ramis-Ramos, G., Composition, Industrial Processing and Applications of Rice Bran γ -Oryzanol, *Food Chemistry*, 115, 389-404, 2009.
6. Rodrigues, C.E.C., Onoyama, M.M. ve Meirelles, A.J.A., Optimization of the Rice Bran Oil Deacidification Process by Liquid-Liquid Extraction, *Journal of Food Engineering*, 73, 370-378, 2006.
7. Van Hoed, V., Depaemelaere, G., Vila Ayala, J., Santiwattana, P., Verhe, R. Ve De Greyt, W., Influence of Chemical Refinin on the Major and Minor Components of Rice Bran Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83, 315-321, 2006.
8. Fraser, G.E., Nut Consumption, Lipids, And Risk Of A Coronary Event, *Asla Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 9, 28, 2000.
9. Parcerisa, J., Richardson, D., Rafecas, M., Condony, R., Boatella, J., Fatty acid, tocopherol and sterol content of some hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) harvested in Oregon (USA), *Journal of Chromatography A*, 805, 259-268, 1998.

10. Özler, M., Öter, Ş., Korkmaz, A., Ozon Gazının Tıbbi Amaçlı Kullanılması, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 8(1), 59-64, 2009.
11. Shamas, N.K., Hung, Y.-T., Wang, L.K., *Handbook of Environmental Engineering, Volume 3: Physicochemical Treatment Processes*, 315-357, The Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005.
12. Letter To The Editor, Ozone Application In Dentistry, *Archives of Medical Research*, 40, 136-137, 2009.
13. Güzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C., Use Of Ozone In Food Industry, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 37, 453-460, 2004.
14. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*, Approved Standard M27-A2. Second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA., 2002.
15. Diaz, M.F., ve Gavin, J.A., Characterization by NMR Ozonized Methly Linoleate, *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(3), 513-518, 2007.
16. Diaz, M., Lezcano, I., Molerio, J., Hernandez, F., Spectroscopic Characterization of Ozonides with Biological Activity, *Ozone: Science and Engineering*, 23, 35-40, 2001.
17. Sorino, N.U.Jr., Migo, V.P., ve Matsumura, M., Ozonation of Sunflower Oil: Spectroscopic Monitoring of the Degree of Unsaturation, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, 997-1001, 2003.
18. Lezcano, I., Nunez, N., Espino, M., ve Gomez, M., Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil, Oleozon, Against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, *Ozone: Science and Engineering*, 22, 207-214, 2000.
19. *AXİS 2000 Büyük Ansiklopedi*, 9, 406-407, Doğan Kitapçılık, İstanbul, 1999.
20. *Temel Britanica*, 14, 76-78, Ana Yayıncılık A.Ş., Hürriyet Ofset, İstanbul, 2003.

21. Türkiye İstatistik Kurumu,
http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13 (Erişim 02.06.2010).
22. Yu, S., Nehus, Z.T., Badger, T.M., Fang, N., Quantification of Vitamin E and γ -Oryzanol Components in Rice Germ and Bran, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 55(18), 7308-7313, 2007.
23. Amissah, J.G.N., Ellis, W.O., Oduro, I., ve Manful J.T., Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana, *Food Control*, 14, 21-24, 2003.
24. Chen, M.-H. ve Bergman, C.J., A Rapid Procedure for Analysing Rice Bran Tocopherol, Tocotrienol and γ -Oryzanol Contents, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, 139-151, 2005.
25. Amarasinghe, B.M.W.P.K., ve Gangodavilage, N.C., Rice Bran Oil Extraction in Sri Lanka, *Food and Bioproducts Processing*, 82(C1), 54-59, 2004.
26. Hu, W., Wells, J.H., Shin, T.-S., Godber, S., Comparison of Isopropanol and Hexane for Extraction of Vitamin E and Oryzanol from Stabilized Rice Bran, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 7653-1656, 1996.
27. Zullaikah, S., Melwita, E., ve Ju, Y.-H., Isolation of Oryzanol from Crude Rice Bran Oil, *Bioresource Technology*, 100, 299-302, 2009.
28. Amarasinghe, B.M.W.P.K., Kumarasiri, M.P.M., ve Gangodavilage, N.C., Effect of Method of Stabilization on Aqueous Extraction of Rice Bran Oil, *Food and Bioproducts Processing*, 87(2), 108-114, 2009.
29. Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pomgamphai, S., Douglas, S., ve Douglas, P.L., Extraction of α -Tokopherol and γ -Oryzanol from Rice Bran, *LWT – Food Science and Technology*, 41, 1417-1424, 2008.
30. Xu, Z., Hua, N., ve Godber, J.S., Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienols, and γ -Oryzanol Components from Rice Bran against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(4), 2077-2081, 2001.

31. Özdemir, F., ve Akıncı, I., Physical and Nutritional Properties of Four Major Commercial Turkish Hazelnut Varieties, *Journal of Food Engineering*, 63, 341-347, 2004.
32. Özdemir, M., Türk Fındık Çeşitlerinin Özelliklerinin Kalite Açısından Değerlendirilmesi, *Gıda Teknolojisi*, 2(10), 46-52, 1999.
33. Sarker, S.D., Nahar, L., Kumarasamy, Y., *Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin As An Indicator Of Cell Growth, And Its Application In The In Vitro Antibacterial Screening Of Phytochemicals*, *Methods* 42, 321-4, 2007.
34. Baş, F., Ömeroğlu, S., Türdü, S., Aktaş, S., Önemli Türk Fındık Çeşitlerinin Bileşim Özelliklerinin Saptanması. *Gıda Teknolojisi*, 11(4), 195-201, 1986.
35. Alasalvar, C., Amaral, J.S., Satır, G., Shaidi, F., Lipid Characteristic and Essential Mineral of Native Turkish Hazelnut Varieties (*Corylus avellana* L.), *Food Chemistry*, 113, 919-925, 2009.
36. Bada, J. C., León-Camacho, M., Prieto, M., Alanso, L., Characterization of oils of hazelnuts from Austrias, Spain. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 106, 294-300, 2004.
37. De, B.K. ve Bhattacharyya, D.K., Physical Refinin of Rice Bran Oil in Relation to Degumming and Dewaxing, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(11), 1683-1686, 1998.
38. *British Pharmacopoeia*, Appendix XB, IA, IB. Acid Value, 2000.
39. *British Pharmacopoeia*, Appendix XE, IA, IB. Iodine Value, 2000.
40. *British Pharmacopoeia*, Appendix XF, IA, IB. Peroxide Value, 2000.
41. Oskay, M., Sari, D., Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*; 45(3), 176-181, 2007.
42. Perez, C., Pauli, M., Bazerque, P., An Antibiotic Assay By The Agar-Well Diffusion Method, *Acta Biol Med Exp*, 15, 113-115, 1990.

43. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*, Approved Standard M7-A6, 6th edn. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA., 2003.
44. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 16th Informational Supplement M100-S16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA., 2006.
45. Rajam, L., Soban Kumar, D.R., Sundaresan, A. ve Arumughan, C., A Novel Process for Physically Refining Rice Bran Oil Through Simultaneous Degumming and Dewaxing, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 213-220, 2005.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Evren Erdem

Dağum Yeri - Tarihi : Keşan - 1986

Eğitim Bilgileri : 2000 – 2003 V.Vecdi Gönül Lisesi – İzmir

2004 – 2008 Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü – Manisa

2008 – 2010 Anadolu Üniversitesi, Açık Öğretim Fakültesi,
Halkla İlişkiler ve Tanıtım – Eskişehir

2008 – 2010 Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,
Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya – Manisa

Adres : Yeşilyurt – Karabağlar – İzmir, 35370

Telefon : +90 555 297 15 29
+90 533 416 56 80

E-Posta : erdem_evren@hotmail.com