



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİTKİSEL YAĞLARIN DOĞAL KATKI MADDELERİ İLE RAF
ÖMÜRLERİNİN UZATILMASININ İNCELENMESİ**

Ezgi SAYIM KARAOĞUL

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Programı

DANIŞMAN

Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

II. DANIŞMAN

Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

Haziran, 2018

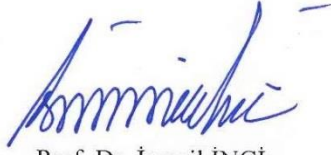
İSTANBUL

Bu çalışma, 19.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



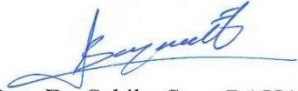
Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ(Danışman)
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa
Fakülte



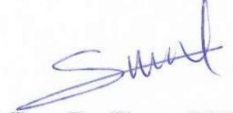
Prof. Dr. İsmail İNCİ
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Şah İsmail KIRBAŞLAR
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Şahika Sena BAYAZİT
Beykent Üniversitesi
Mühendislik - Mimarlık Fakültesi



Yrd. Doç. Dr. Sinem ORTABOY
İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, 114M728 numaralı TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi birikimi ve tecrübelerini esirgemeyen, tez çalışmalarım ve bursiyeri olduğum TÜBİTAK projesinde ekipmanlarından yararlanmamı sağlayan, tüm yoğunluğuna rağmen çalışmalarım daima vakit ayıran çok değerli danışmanım Doç. Dr. Selin Şahin Sevgili'ye en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım benden bilgi, yardım ve birikimlerini esirgemeyen ve her türlü sorunun çözümünde yardımcı olan ikinci danışmanım ve çok değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Bilgin'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini eksik etmeyen aileme, attığım her adımın destekçisi olan ve beni bilim yolunda daima teşvik eden sevgili eşime, projemize desteğinden ötürü TÜBİTAK'a ve çalışmamı destekleyen İstanbul Üniversitesi'ne teşekkürü borç bilirim.

Haziran, 2018

Ezgi SAYIM KARAOĞUL

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. BİTKİSEL YAĞLAR	3
2.2. BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDASYONU (LİPİD OKSİDASYONU) VE ANTİOKSİDAN MEKANİZMASI	4
2.3. BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ÖNEMİ.....	6
2.4. YAĞLARIN KALİTE PARAMETRELERİ	7
2.4.1. Fenolik Madde İçeriği	7
2.4.2. Antioksidan Aktivite	7
2.4.3. Peroksit Değeri	8
2.4.4. Klorofil ve Karoten Miktarları	8
2.4.5. Oksidatif Stabilite	8
2.5. KATI – SIVI EKSTRAKSİYONU	10
2.5.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon.....	11
2.5.2. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon	12
2.6. İSTATİSTİKSEL DENEYSEL TASARIM	12
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
3.1. MALZEME	13
3.2. CİHAZLAR.....	13
3.3. EKSTRAKT ELDESİ	14
3.3.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon	14
3.4. EKSTRAKT İÇERİĞİNİN İNCELENMESİ	16

3.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler.....	16
3.4.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini.....	16
3.4.1.2. ABTS Yöntemi ile AA Tayini	17
3.4.1.3. DPPH Yöntemi ile AA Tayini	17
3.4.1.4. CUPRAC Yöntemi ile AA Tayini.....	17
3.4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	18
3.5. BİTKİSEL YAĞLARIN EKSTRAKSİYON İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ	18
3.5.1. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon.....	18
3.6. BİTKİSEL YAĞLARIN STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ.....	20
3.6.1. TFM.....	20
3.6.2. AA	21
3.6.3. Peroksit Değeri	22
3.6.4. Klorofil Miktarı Tayini.....	23
3.6.5. Karoten Miktarı Tayini.....	23
3.6.6. Oksidatif Stabilitate (Ransimat Metodu).....	24
4. BULGULAR.....	26
4.1. ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON İLE EKSTRAKT İÇERİĞİNİN İNCELENMESİ	26
4.1.1. Zeytin Yaprağı.....	26
4.1.1.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	30
4.1.2. Oğul Otu	31
4.1.2.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	36
4.2. HOMOJENİZATÖR DESTEKLİ EKSTRAKSİYON İLE YAĞIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ	37
4.2.1. Zeytinyağı–Zeytin Yaprağı	37
4.2.1.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	41
4.2.2. Zeytinyağı – Oğul Otu.....	42
4.2.2.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	45
4.2.3. Ayçiçek Yağı – Zeytin Yaprağı.....	46
4.2.3.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	49
4.2.4. Ayçiçek Yağı–Oğul Otu	50
4.2.4.1. <i>YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu</i>	54
4.3. OPTİMUM ŞARTLARDAKİ METODUN ETKİNLİĞİ.....	55
4.4. HASAT DÖNEMİNİN YAĞIN KALİTESİNE ETKİSİ	58
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	61

KAYNAKLAR.....	64
EKLER	72
EK 1. Ayçiçek yağı - zeytin yaprağı ransimat sonuçları	72
EK 2. Ayçiçek yağı - oğul otu ransimat sonuçları.....	73
EK 3. Saf zeytinyağı ransimat sonuçları	74
EK 4. Zeytinyağı – zeytin yaprağı ransimat sonuçları	75
EK 5. Zeytinyağı – oğul otu ransimat sonuçları.....	76
EK 6. Saf ayçiçek yağı ransimat sonuçları	77
ÖZGEÇMİŞ	78



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Oksidatif stabilite ölçümünde kullanılan ransimat cihazının çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.	10
Şekil 3.1: Ultrason Destekli Ekstraksiyon’da kullanılan SONICS VCX 750 marka sonikatör cihazı.	15
Şekil 3.2: Toplam Fenolik Madde Tayininde kullanılan PG INSTRUMENT- T60 UV-Visible Marka Spektrofotometre.	17
Şekil 3.3: Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon’da kullanılan IKA T25 Digital-ULTRA TURRAX marka homojenizatör.	19
Şekil 3.4: Oksidatif stabilitenin ölçümünde kullanılan Metrohm marka ransimat cihazının örnek gösterimi.	24
Şekil 3.5: 130 °C’de meydana gelen lipid oksidasyon a) zeytinyağı b) zenginleştirilmiş zeytinyağı.	25
Şekil 4.1: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (EtOH konsantrasyonu=%50 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	28
Şekil 4.2: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	28
Şekil 4.3: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve EtOH konsantrasyonu=%50).	29
Şekil 4.4: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, genliğe bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	29
Şekil 4.5: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak zamanın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve genlik=%35).	30
Şekil 4.6: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (EtOH konsantrasyonu=%50 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	34

Şekil 4.7: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	34
Şekil 4.8: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve EtOH konsantrasyonu=%50).	35
Şekil 4.9: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, genliğe bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).	35
Şekil 4.10: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak zamanın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve genlik=%35).	36
Şekil 4.11: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=30 s).	39
Şekil 4.12: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1435 ppm).	39
Şekil 4.13: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=10000 rpm).	40
Şekil 4.14: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=60 s).	43
Şekil 4.15: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1250 ppm).	44
Şekil 4.16: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=7000 rpm).	44
Şekil 4.17: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=30 s).	48
Şekil 4.18: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1435 ppm).	48
Şekil 4.19: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=10000 rpm).	49

Şekil 4.20: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=60 s).....	52
Şekil 4.21: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1250 ppm).....	53
Şekil 4.22: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=7000 rpm).....	53
Şekil 4.23: Zeytin yaprağı ekstraktının içeriğindeki bileşenlere dair örnek HPLC kromatogramına ait gösterim.....	59



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Zeytin yaprağı ve oğul otunun UDE ile ekstraksiyonunda dört faktörlü MKTD’de kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, sembolleri ve seviyeleri.	15
Tablo 3.2: HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon programına ait şematik gösterim.	18
Tablo 3.3: Zeytinyağı ve ayçiçek yağının üç faktörlü MKTD’de kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, sembolleri ve seviyeleri.....	19
Tablo 4.1: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış proses şartlarında elde edilen ekstraktların TFM miktarları*.	26
Tablo 4.2: Zeytin yapraklarından UDE ile elde edilen ekstrakt içerisindeki TFM cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	31
Tablo 4.3: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış proses şartlarında elde edilen ekstraktların TFM miktarları*.	32
Tablo 4.4: Oğul otundan UDE ile elde edilen ekstrakt içerisindeki TFM cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	37
Tablo 4.5: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağının TFM miktarları*.	38
Tablo 4.6: HDE sistemi ile zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	41
Tablo 4.7: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağının TFM miktarları*.	42
Tablo 4.8: HDE sistemi ile zeytinyağının oğul otu ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	45
Tablo 4.9: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM miktarları*.	46
Tablo 4.10: HDE sistemi ile zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	50
Tablo 4.11: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM miktarları*.	51

Tablo 4.12: HDE sistemi ile ayçiçek yağının oğul otu kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.....	54
Tablo 4.13: UDE yönteminde optimum koşullarda elde edilen ekstraktların farklı parametre değerlerinin karşılaştırılması*.....	55
Tablo 4.14: Bitkisel yağların optimum HDE koşullarında, zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleşmesinden önce ve sonraki stabilite değerlerinin karşılaştırılması*.....	56
Tablo 4.15: Bitkisel yağların optimum HDE koşullarında, oğul otu ekstraktı ile zenginleşmesinden önce ve sonraki stabilite değerlerinin karşılaştırılması*.....	57
Tablo 4.16: Farklı dönemlerde toplanmış olan zeytin yapraklarının fenolik bileşenlerinin karşılaştırılması*.....	58
Tablo 4.17: Farklı dönemlerde toplanmış olan zeytin yaprağı ekstraktları ile zenginleştirilmiş olan zeytinyağlarının oksidatif stabilitelerinin karşılaştırılması*.....	59

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde Oran
~	: Yaklaşık
μ	: Mikro
°C	: Santigrat Derece
X	: Değişken Değer

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
A	: Absorbans
AA	: Antioksidan Aktivite
ABTS	: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazoline-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu
ANOVA	: One-way Analysis of Variance
AOCS	: American Oil Chemists' Society
AOM	: Aktif Oksijen Metodu
BHA	: Bütilenmiş Hidroksianisol
BHT	: Bütilenmiş Hidroksitoluen
cm	: Santimetre
CO ₂	: Karbondioksit
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
d	: Işın yolu
dak	: Dakika
dev	: Devir
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EtOH	: Etilalkol
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri

HDE	: Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IT	: Induction Time
kg	: Kilogram
KI	: Potasyum İyodür
MeOH	: Metilalkol
mEq	: Miliequivalent
mg	: Miligram
MKDT	: Merkezi Kompozit Deneysel Tasarım
ml	: Mililitre
N	: Normalite
Na₂S₂O₃	: Sodyumtiyosülfat
nm	: Nanometre
OFAT	: One-Factor At A Time
OH	: Hidrosil
PD	: Peroksit Değeri
ppm	: Part Per Million
R	: Korelasyon Katsayısı
rpm	: Revolutions Per Minute
s	: Saniye
TBHQ	: Tersiyerbütil Hidrokinon
TEAC	: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFM	: Toplam Fenolik Madde
Trolox	: 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UDE	: Ultrason Destekli Ekstraksiyon
UV	: Ultraviyole
V	: Hacim
WHO	: World Health Organisation
YYY	: Yanıt Yüzey Yöntemi

ÖZET

| |

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİTKİSEL YAĞLARIN DOĞAL KATKI MADDELERİ İLE RAF ÖMÜRLERİNİN UZATILMASININ İNCELENMESİ

|

Ezgi SAYIM KARAOĞUL

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

II. Danışman : Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

Lipid oksidasyonu, bitkisel yağların depolanma sürecinde çeşitli fiziksel özelliklerinde olumsuzlukların ortaya çıkmasına sebep olan bir kalite problemidir. Bu durum, bitkisel yağ endüstrisini ekonomik açıdan ağır zarara sokmaktadır. Dolayısıyla antioksidatif özelliklere sahip katkı maddeleri, içeriğinde yağ olan gıdalara eklenerek, lipid oksidasyonundan ileri gelen bu kalitedeki olumsuzluğun önlenmesi sağlanabilmektedir. Diğer taraftan, sentetik antioksidanların toksik etkilerinin anlaşılmasıyla, kullanımlarında sınırlamalar getirilmesi sonucu doğal antioksidanlar yoğun bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır.

Oda sıcaklığında kurutulmuş ve parçalanarak öğütülmüş olan zeytin yaprağı ve oğul otu Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UDE) yöntemi ile ekstrakte edilerek kurutulmuş ve derin dondurucu muhafaza edilmiştir. Söz konusu ekstraksiyon işlemine Design Expert (deneme sürümü) paket programı kullanılarak, Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ile 4 faktör ve 3 seviyeli Merkezi Kompozit Deneysel Tasarım (MKDT) uygulanmıştır. Ekstraktların içeriği toplam

fenolik madde (TFM) ve antioksidan aktivite (AA) açısından spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Optimum koşullarda UDE ile elde edilen bitkisel ekstraktlar, tüketim oranı çok yüksek olan iki farklı bitkisel yağ türüne (zeytin yağı ve ayçiçek yağı) ilave edilerek, ekstraktlarda mevcut olan antioksidan özelliğe sahip fenolik maddelerin Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HDE) yöntemi ile difüzyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde de deneysel tasarım, YYY ile üç faktör ve üç seviyeli MKDT aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Design Expert programı ile elde edilen optimum koşullarda zenginleşen yağların kalitesi çeşitli parametreler açısından (toplam fenolik madde, antioksidan aktivite, oksidatif stabilite, karoten ve klorofil miktarları ve peroksit değeri) değerlendirilmiştir. Ayrıca, her iki proseste (UDE ve HDE) parametrelerin etkileşimi ve sonuçlar üzerindeki etkileri yine Design Expert yazılımı ile Tek-yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ve üç boyutlu grafiklerle sunulmuştur.

Haziran,2018, 97 sayfa.

Anahtar kelimeler: Gıda güvenliği; doğal antioksidanlar; lipid oksidasyonu; oksidatif stabilite; ileri ayırma yöntemleri; optimizasyon

SUMMARY

INVESTIGATION OF SHELL-LIFE EXTENSION OF VEGETABLE OILS WITH NATURAL ADDITIVES

M.Sc. THESIS

Ezgi SAYIM KARAOĞUL

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemical Engineering

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Co-Supervisor : Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

Lipid oxidation is a quality problem that causes the vegetable oils to become unfavorable in various physical properties during the storage process. This is a huge loss for the vegetable oil industry from the economic point of view. It is possible to prevent this quality problem caused by lipid oxidation with adding additives with antioxidative properties into the fat-containing food products. On the other hand, natural antioxidants have been started to be searched extensively, since synthetic ones have been limited in their use due to their toxic effects.

After dried and ground olive leaf and lemon balm were extracted by Ultrasound Assisted Extraction (UAE) method, the extracts were dried and stored in deep freezer. Face Centered Composite Design (FCCD) through Response Surface Methodology (RSM) with 4 factors and 3 levels was applied to the related extraction process by Design Expert (trial version) software. The contents of the extracts were determined spectrophotometrically in terms of total phenolic substance (TPS) and antioxidant activity (AA). The plant extracts obtained by UDE under optimum conditions were added to the most consumed vegetable oils (olive and sunflower oils). In this way, the phenolic materials with antioxidant activity of the extracts

were diffused into the selected oils by means of Homogenizer Assisted Extraction (HAE) method. Similarly, experimental design was applied to this process by FCCD through RSM with 3 factors and 3 levels. The quality of the oils enriched at the optimum conditions by Design Expert software was evaluated in terms of various parameters (total phenolic substance, antioxidant activity, oxidative stability, carotene and chlorophyll contents, and peroxide value). Furthermore, the interaction of the parameters of the two processes (HAE and UAE) and their effects on the results were also presented by One-way Analysis of Variance (ANOVA) and three-dimensional graphs through Design Expert software.

June 2018 97 pages.

Keywords: Food safety; natural antioxidants; lipid oxidation; oxidative stability; novel separation methods; optimization.



1. GİRİŞ

Birçok gıdada ürünü oluşturan bileşikler ile havada bulunan oksijen arasında istemli olarak oksidasyon tepkimeleri gerçekleşir (Özdalyan, 1991). Ürün kalitesine daima az ya da çok etkisi bulunan bu reaksiyonlar gıda endüstrisinde istenmeyen olaylardır. Burada kalite düşmesi olarak bahsedilen etkiler tat, koku ve renk değişimleri, besin öğelerindeki parçalanmalar, toksik bileşiklerin oluşması gibi sıralanabilir (Dziezak, 1986). Yağ ve yağlı gıdalarda meydana gelen otooksidasyon olaylarının fiziksel ve teknolojik yöntemlerle engellenemediği durumlarda antioksidanlar ve sinerjistler devreye girer. Antioksidanlar, gıdalarda tatsızlığın ve oksidasyonun neden olduğu toksik bileşiklerin oluşmasının önüne geçmekte etkili katkı maddeleridir. Sinerjistler ise antioksidanların etkinliğini arttıran destekleyici maddelerdir (Keskin, 1981).

Antioksidan grubu katkıları, endüstride bitkisel ve hayvansal yağ içeren gıdaların üretimi, depolanması ve sevkiyatı sırasında gerçekleşebilecek otooksidasyon reaksiyonlarının önüne geçmek adına kullanılan en etkili maddeleridir (Lebedev ve diğ., 2001). Bu maddelerin en önemli özellikleri ortamda az miktarda bile bulunsalar oldukça etkin olmalarıdır. Sağlıklı beslenme konusunda günden güne bilinç düzeyinin artmasına bağlı olarak eskiden daha sık kullanılan yapay antioksidanlar yerini doğal antioksidanlara bırakmaya başlamıştır. Bu durum, araştırmacıları doğal antioksidanlar konusunda yoğun bir araştırma yapmaya teşvik etmiştir. Dolayısıyla bitkilerde bulunan fenolik komponentlerin tayini ve incelenmesi; antioksidan özelliklere sahip, son derece yüksek katma değerli ürünler olmalarından ötürü oldukça önemli bir hal almıştır (Sherwin, 1990; Fernandez-Lopez ve diğ., 2005).

Son yıllarda bitkisel yağlardaki sentetik gıda katkı maddelerinin kullanımını azaltmak ve/veya engelleyebilmek adına doğal bitkisel ekstraktların katkı maddesi olarak denendiği çalışmalar incelendiğinde, zeytin yaprağı, yeşil çay, susam ve diğer tıbbi bitkiler gibi düşük maliyetli kaynaklardan elde edilen çeşitli doğal antioksidanlar olduğu gözlenmiştir. Bu seçimde, söz konusu yağdaki özellikle de ısıtma işleminde oluşabilecek termal stabilite için doğru antioksidanın uygulanması önemli bir ayrıntıdır. Çeşitli yağlarda uygulanmış olan doğal katkı

maddelerinin yapay olanlardan çok daha iyi antioksidan aktivite ve termal stabilite gösterdiği kanıtlanmıştır (Taghvaei ve Jafari, 2013).

Bu tez kapsamında, ülkemiz ve dünya açısından tüketimi ve önemi yüksek olan zeytin ve ayçiçek yağları araştırma materyali olarak seçilmiştir. Doğal antioksidan kaynağı olarak ise zeytin (*Olea europea*) yaprağı ve oğul otu (*Melissa officinalis*) tercih edilmiştir. Bu tercih yapılırken zeytin yaprağının çok yüksek antioksidan aktiviteli fenolik madde profiline sahip bir kaynak olması ve budama sırasında ağaç başına 25 kg kadar elde edilen bir atık ürün olması önemli birer ayrıntı olmuştur (Eraslan, 2017). Diğer taraftan, oğul otunun antioksidan kaynağı olarak seçiminde, mevcut bitkinin ekstraksiyonu ile yapılan çalışmaların sıklığı ve benzer bir çalışmaya rastlanmamış olması etkili olmuştur (Sentkowska ve diğ., 2015; Bogdanovic ve diğ., 2016; Nicolai ve diğ., 2016; Šic Žlabur ve diğ., 2016).

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİSEL YAĞLAR

İnsan vücudu beslenmesinde mevcut olan yağı enerji kaynağı, yapısal bir bileşen ve güçlü biyolojik düzenleyici olmak üzere üç şekilde tüketmektedir (Llorent-Martinez ve diğ., 2011). Ayrıca, yağlar insan organizmasında metabolik reaksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadırlar. Özellikle de bitkisel yağlar kolesterol düşürücü etkileri nedeniyle son derece faydalı ve popülerdir. Ağırlıklı olarak doymuş olan ve diğer kimyasallarla (özellikle oksijen) kolayca reaksiyona girmeyen hayvansal yağların aksine, doymamış bitkisel yağlar daha reaktiftir (Mendil ve diğ., 2009). Bitkisel yağlar, çeşitli bitkilerin tohum veya meyve kısmından presleme, çözücü ekstraksiyonu ya da her ikisinin birlikte kullanılmasıyla elde edilmektedirler. Çeşitli kaynaklardan elde edilen birçok bitkisel yağ vardır. Bunlar arasında en çok bilinenleri zeytinyağı, ayçiçeği yağı, mısırözü yağı ve soya yağıdır.

Ayçiçeği (*Helianthus annuus*) dünyada en fazla tüketilen yağlı tohum mahsullerinden biridir. Ukrayna ve Rusya dünya ayçiçeği üretiminin neredeyse yarısını karşılamaktadır. Bu sırayı Arjantin ve diğer Avrupa ülkeleri takip etmektedir (Kaya, 2016). Dünyada ayçiçeği yağını en çok kullanan ülkelerden biri de Türkiye'dir. Ayçiçeği yağı, yemeklik kalitesi yönünden tercih edilen bitkisel yağlar arasında ilk sırayı almaktadır. Ayçiçeği yağı, içerdiği doymamış yağ asitleri oranının yüksek (%69) olması nedeniyle de beslenme değeri en yüksek olan bitkisel yağlardan birisidir. Yemekler dışında hayvan yemlerinde, çerezlerde, sabun ve boya sanayiinde kullanılmaktadır. (Anon. 2017, syf. 4)

Zeytin (*Olea europaea*) ise içeriğindeki yüksek orandaki fenolik bileşik ve tokoferol nedeniyle en çok tüketilen bitkisel yağlı tohumlardan biridir (Ballus ve diğ., 2014; Capriotti ve diğ., 2014). Üretimin büyük çoğunluğu İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye ve Tunus gibi Akdeniz ülkeleri tarafından karşılanmaktadır (Russo ve diğ., 2016; Türkekul ve diğ., 2010). Zeytin ağacının en önemli ürünü olan zeytinyağı ise insanoğlu tarafından "Sıvı Altın" olarak nitelendirilmiş, önceleri sadece yakıt olarak kullanılırken, daha sonra insan beslenmesindeki vazgeçilmez yerini almıştır (Clodoveo ve diğ., 2014). Mekanik yöntemlerle (meyvesi

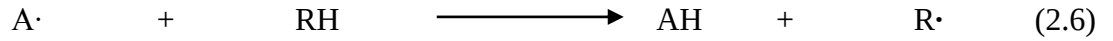
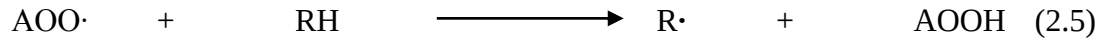
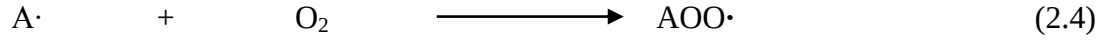
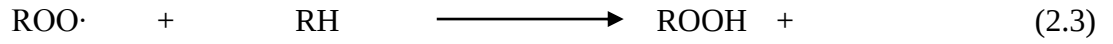
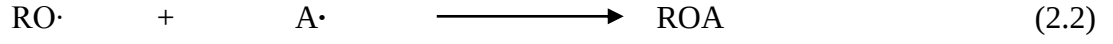
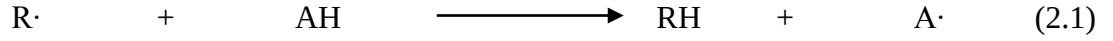
preslenerek) doğal yollardan elde edilebilen tek bitkisel yağ zeytinyağıdır. Zeytinyağı herhangi bir kimyasal işleminden geçirilmeden üretilebildiğinden tüketilirken de vitamin varlığını, temel yağ asitlerini ve diğer besleyici önemdeki naturel maddeleri yapısında tutabilmektedir (Karabina ve diğ., 2016).

2.2. BİTKİSEL YAĞLARIN OKSİDASYONU (LİPİD OKSİDASYONU) VE ANTİOKSİDAN MEKANİZMASI

Lipidler gıdaların en önemli yapısal ve fonksiyonel komponentleridir. Gıdalarda lipidler az miktarda bileşime sahip olsa bile önemli derecede etki gösterir (Frankel, 2012).

Lipid oksidasyonu, gıda sistemlerinde en önemli kalite bozulma süreçlerinden biridir ve kötü koku, alışılmadık renk ve zararlı bileşiklerin gelişimine güçlü etkileri vardır. (Yu, S.H. ve diğ., 2013). Lipid oksidasyonu; çoklu doymamış yağlarda, oksijenin çeşitli katalizörlerin etkisiyle oluşan oktet açıklarına bağlanmasıyla kendi kendini katalizleyerek devam eden bir reaksiyon zinciridir. Bu olay sonucu esansiyel yağ asitleri bozularak, gıdalarda acılaşıma olarak bilinen kötü tad, koku ve aroma oluşturur ve gıda maddesinin besin değeri olumsuz etkilenir. (Özçelik ve Evranuz, 1998) Lipid oksidasyonuna neden olan başlıca etmenler; su aktivitesi (gıda maddesinin nemi), sıcaklık, metaller, enzimler, ışık ve antioksidanlardır. Genel olarak bu etmenlerin tümü gıdaya aynı anda etki eder. Bu nedenle birbirinden ayırmak güçtür (Yu, S.H. ve diğ., 2013).

Antioksidan katkılar, bitkisel ve hayvansal yağ içeren maddelerin üretimi ve sevkiyatı sırasında oluşabilecek oto-oksidasyon kaynaklı zararları önlemede kullanılan en önemli maddelerdir. Yağ içeren gıdalarda tatsızlığın ve lipid oksidasyonundan ileri gelen toksik bileşenlerin oluşmaması için ilave edilmektedir (Bilgin ve diğ., 2013). Bu biyoaktif maddeler hidrojen verici olarak davranırlar ve toksik maddeleri daha az reaktif türlere dönüştürürler. Başlatma (1), çoğaltma (2 ve 3) ve sonlandırma (4, 5 ve 6) adımlarını içeren zincir reaksiyonu şu şekilde özetlenebilir (Aluyor ve Ori-Jesu, 2008; Yanishlieva ve Marinova, 2001):



Reaksiyon 2.1-2.6'da da görüldüğü gibi, bu şekilde oluşturulan antioksidan radikali ($A\cdot$), çiftlenmemiş elektronun, aromatik halka üzerindeki oksijen atomu ile yer değiştirmesiyle dengelenir.

Oksidasyon reaksiyonları gıdalarda vitamin ve tat kaybına neden olmanın yanı sıra serbest radikaller gibi oksitleyici ürünlerin oluşmasına da yol açmaktadır. Serbest radikaller bir veya birden fazla eşleşmemiş elektron içeren molekülerdir. Eşleşmemiş elektronları sebebiyle oldukça kararsız ve reaktiflerdir. Bu sebeple de gıdalarda istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Bu oto-oksidasyon reaksiyonlarını önlemek için doğal ve yapay antioksidanlar kullanılabilir (Şahin ve diğ., 2016). Son zamanlarda, BHA (bütilenmiş hidroksianisol), BHT (bütilenmiş hidroksitoluen) ve TBHQ (tersiyerbütil hidrokinon) gibi sentetik antioksidanların yerini alabilmek adına fitokimyasallar (fenolik maddeler, flavonoidler ve karotenoidler gibi) çok popüler olmuşlardır (Bodoira ve diğ., 2017).

2.3. BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ÖNEMİ

Bitkisel ekstraktlar, bilinen tıbbi özellikleri veya geleneksel kullanım öyküsü olan, bitkinin meyvelerinden, yapraklarından, çiçeklerinden, ağaçlarından, köklerinden, reçinelerinden veya bitki tohumlarından elde edilen karmaşık karışımlardır (Şahin ve Bilgin, 2017). İçeriklerindeki fenolik maddelerin antioksidan ve antimikrobiyal özelliklere sahip olmasından ötürü, söz konusu maddelerin elde edilmesi ve değerlendirilmesi çok değerlidir. Bu değerli biyoaktif maddeler bitkinin kendisi tarafından mikroorganizma ve radyasyona karşı bir savunma mekanizması olarak üretilmektedir. Ayrıca, virüslere, bakterilere, mantarlara ve çeşitli enfeksiyonlara karşı da etkilidirler (Balasundram ve diğ., 2006; Hayouni ve diğ., 2007; Rahaiee ve diğ., 2015). Söz konusu biyoaktif bileşenler tansiyonu düşürücü, kardiyovasküler rahatsızlıkların önlenmesi, çeşitli kanser ve virütik hastalığın durdurulması gibi pek çok sağlığa faydalı özelliğin de sorumlusudurlar. Dolayısıyla gıda, ilaç ve kozmetik endüstri dalları gibi söz konusu ekstraktları çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanmak için artan bir ilgi vardır (Lee ve diğ., 2009; Cordell, 2000).

Her kurutulmuş ve toz haline getirilmiş bitkiler veya kaynatılmış bitki suları ekstrakt değildir. Ekstrakt eldesinde en önemli husus etken maddenin bozulmamasıdır. Bu sebeple kurutma işlemi düşük ısı ve alçak basınçta yapılmalıdır (Karakaş, 2003). Ekstrakt eldesinde kullanılan başlıca yöntemler çözücü ekstraksiyonu, buhar distilasyonu, Soxhlet ekstraksiyonu, Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon, Ultrason Destekli Ekstraksiyon, Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon ve Süperkritik CO₂ Ekstraksiyonu şeklinde sıralanabilir (Bilgin ve diğ., 2013; Şahin ve diğ., 2011; Şahin ve diğ., 2017)

Bu tez içerisinde ekstrakt olarak zeytin yaprağı ve oğul otu (melisa yaprağı) kullanılmıştır. Zeytin yaprağı; üst yüzeyi koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzeyi mavimsi gümüş renginde ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplı bir bitkidir. Ekstraktında bulunan oleuropein, uzun yıllardır bilimsel çalışmalarda kullanılan yapraktaki en etkin fenolik bileşiktir. (Caruso ve diğ., 1999). Bu bileşiğin antibakteriyel etkisi oldukça güçlüdür. Zeytin ağaçları uzun süreli yaşamlarını büyük ölçüde bu bileşiğin antimikrobiyel ve antioksidan etkinliğine borçludur. Ayrıca bu özellikleri sayesinde günümüzde ilaç ve kozmetik sektöründe de kullanılmaktadır. (Coni ve diğ., 2000) Günümüzde zeytin hasadı sonrası atık olarak nitelendirilen zeytin yaprağının ekstrakt olarak kullanılması; hiçbir ekonomik değeri olmayan kaynakların değerlendirilmesi açısından önemi oldukça büyüktür.

Oğul otu ise çok dallı, beyaz çiçekli, yaprakları ince ve yumuşak tüylerle kaplı olan, limon kokulu, otsu bir bitkidir. En etken maddeleri flavonoidler, triterpenler ve fenolik bileşiklerdir.

Akdeniz kıyısında birçok şifa özelliğinden dolayı 2000 yıldan uzun bir süredir yetiştirilmektedir ve sakinleştirici, antispazmodik ve antibakteriyel olarak uzun bir kullanım öyküsüne sahiptir (Ross, 2015). Migren, baş dönmesi, uykusuzluk, sara ve sinir krizi gibi hastalıklarda yatıştırıcı ve düzenleyici etkisi vardır. Ayrıca kan şekeri ve tansiyonu da düşürür. Sindirim sistemini rahatlatmada etkilidir (Pereira, 2009).

2.4. YAĞLARIN KALİTE PARAMETRELERİ

2.4.1. Fenolik Madde İçeriği

Fenolik bileşikler veya diğer adıyla polifenoller, bitkiler aleminde en yaygın bulunan madde grubudur. Bu bileşiklerin “polifenol” olarak da bilinmesinin sebebi yapılarında fonksiyonel türevler içeren hidrosil (-OH) gruplarıyla, dallanmış aromatik benzen halkaları içermesidir. Bu yapısal durumunun neticesinde bir hidrojenini vererek hidrojen vericisi olarak görev alabilir ve bu durum onun antioksidan olarak etki göstermesini sağlar (Vermerris ve Nicholson, 2006). Söz konusu antioksidan aktivitelerinden dolayı pek çok olumsuzluğun sebebi olan serbest radikallerin giderilmesinde etkilidirler. Dolayısıyla yağ içeren gıdalarda meydana gelebilecek lipid oksidasyonundan sorumlu olan radikal reaksiyonların giderilmesiyle söz konusu ürünlerdeki bozunmaları önleyebilirler. Sonuç olarak, gıda ürününün stabilitesi, duyu ve besleyici özellikleri üzerinde çok önemli bir etkiye sahiptirler (Siger ve diğ., 2008). Bunun yanı sıra antimikrobiyal, antitrombotik ve hipoglisemik etkilerinin olduğu da gözlenmiştir. (Vermerris ve Nicholson, 2006; Şahin, 2011.)

2.4.2. Antioksidan Aktivite

Daha önceki başlığımızda da değinildiği gibi antioksidanlar yağlarda meydana gelen oto-oksidasyon reaksiyon mekanizmalarına etki ederek acılaşıma, tat, renk ve koku bozulması gibi olayların meydana gelmesini geciktirir veya tümüyle engeller. Bu sayede hem yağın kalitesi korunmuş hem ekstra bir besleyici katkı sağlanmış hem de yağın raf ömrü uzatılmış olur (Şahin ve diğ.)

2.4.3. Peroksit Değeri

Peroksitler yağın oksidasyonu sırasında meydana gelen bileşiklerdir. Bu sebeple peroksit sayısı ile yağın bozunması arasında doğru orantı bulunmaktadır. Yağlar rafta bekleme süreleri boyunca bazı doğal olaylar ile birlikte değişime uğrayabilir. Depolama ortamında bulunan oksijen miktarı, metal iyonu ve sıcaklık gibi etkiler yağın bozulmasına yol açar. İşte peroksit sayısının tayini bize bu bozunmalar hakkında bilgi alma şansı sağlar. (Bozan, 2006)

2.4.4. Klorofil ve Karoten Miktarları

Klorofil ve karotenoidler bitkilere renk veren başlıca maddelerdir. Karotenoidler bulundukları bitkilere genellikle sarı, kırmızı ve turuncu renk verir (Zeb ve Mehmood, 2004). Yeşil renkli meyve ve sebzelerde ise karotenin etkisi klorofil tarafından baskılanmıştır.

Karotenoidler çeşitli bitkisel yağlara klorofil ile birlikte yeşil-sarı renk vermektedir. Yağın rengi de tüketici beğenisini etkileyen başlıca faktörlerden biridir (Minguez-Mosquera ve diğ., 1990; Luaces ve diğ., 2005). Söz konusu biyoaktif bileşenin renk verme dışında başlıca özellikleri; ışığı absorbe edebilmesi, hidrofobik yüzeylere bağlanabilmesi ve singlet oksijen yatıştırıcı olması sebebiyle yağın stabilitesine etki edebilmesidir (Psomiadou ve Tsimidou, 2002a). Karotenler, tokoferol ve polifenollerle birlikte zeytinyağının oksidatif stabilitesinde görev alırlar ve sinerjist antioksidan etkiye sahiptirler (Luaces ve diğ., 2005). Özellikle de β -karoten, uyarılmış oksijenin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesini enerji transferi yoluyla önler ve klorofilin yol açtığı foto-oksidasyonu önemli ölçüde engeller. (Psomiadou ve Tsimidou, 2002b, Yemişçioğlu ve diğ., 2016)

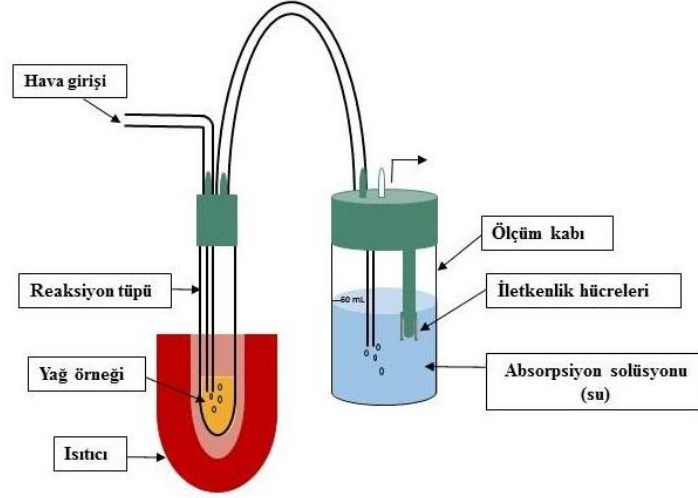
Klorofil ise bitkiye yeşil renk vermesi dışında yağın foto-oksidasyonunda uyarıcı görevi görür (Tan ve diğ., 1997). Klorofil ışın enerjisini toplayıcı ve aktarıcı özelliği dolayısıyla ışık varlığında yağın oksidasyonuna kolaylaştırır. (Aparicio ve diğ., 1999). Karanlıkta ise fenolik antioksidanlarla birlikte antioksidan aktivite göstererek zeytinyağının oksidasyonuna karşı sinerjist bir rol oynar (Psomiadou ve Tsimidou, 2001; Velasco ve Dobarganes, 2002).

2.4.5. Oksidatif Stabilit 

Oksidatif stabilit , hayvansal ve bitkisel katı ve sıvı yağların kalite değerlendirmesi için çok önemli bir parametredir. Zira oto-oksidasyon reaksiyonları atmosferik oksijen, depolama sıcaklığı, ortamdaki metal ve ışık varlığı gibi türlü faktörlerden etkilenirerek, doymamış yağ

asitlerini içeren radikal reaksiyonlarla başlatılır. Oto-oksidasyon sonucu oluşan birincil ürünler hidroperoksitler, ikincil ürünler ise alkol ve karbonil bileşikleridir. Ardından karboksilli asitlere parçalanabilirler (Läubli ve Bruttel, 1986).

Bu parametrenin Aktif Oksijen Metodu (AOM; AOCS Metodu Cd 12-57) ile saptanması, sürekli olarak peroksit değerinin tayin edilmesi nedeniyle hem çok maliyetli hem de çok vakit alıcıdır. Bu oksidasyon sorununa karşı ilgili yağın direncini ölçmek için bazı enstrümental yöntemler ortaya çıkmıştır (Ostrowska-Ligeza ve diğ., 2010; Polavka ve diğ., 2005; Farhoosh ve diğ., 2008; Velasco ve diğ., 2004). Alternatif, hızlandırılmış yöntemlerden biri de Ransimat metodudur. Ransimat, titrasyon gibi ekstra bir analitik analiz gerektirmeden ölçümlerin sürekli yapıldığı basit bir yöntemdir (Hasenhuettl ve Wan, 1992). Yağ içeren ürünün oksidatif stabilitesini tayin ederken örnek miktarı, havanın akış hızı ve sıcaklığı olmak üzere sadece üç değişkene ihtiyaç duyulmaktadır (Farhoosh, 2007). Bu yöntem uçucu bozunma ürünlerinin kondüktometrik tayinine dayanmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Oksidatif stabilite ölçümünde kullanılan ransimat cihazının çalışma prensibinin şematik olarak gösterimi.

Zamana karşı iletkenliğin otomatik olarak çizilmesini içermektedir. Değerlendirme, deneyin tamamlanmasından sonra grafiksel olarak gerçekleştirilir. Bu yöntem için gerekli olan emek, düzenli aralıklarla titrasyonların yapılması gerekli olmadığından, oldukça azdır (Läubli ve Bruttel, 1986).

2.5. KATI – SIVI EKSTRAKSİYONU

Sabit sıcaklık ve basınçta bir maddenin iki fazdaki denge derişimlerinin farklı olmasından yararlanarak yapılan ayırma işlemine ekstraksiyon adı verilir. Fazlardan birinin katı diğerinin sıvı olduğu katı-sıvı ekstraksiyonlarında; katı içinde bulunan bir madde bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir sıvı yardımıyla alınır. Fazlar ayrıldıktan sonra sıvının herhangi bir yoldan uzaklaştırılması ile katı içindeki madde ele geçer. Ekstrakte edilen madde katı; ekstrakte eden madde sıvı, ekstrakt ise elde edilen sıvı karışımdır. (Perry, 1985).

Katı – Sıvı ekstraksiyonun çalışma prensibi 4 aşamada sıralanabilir;

- Çözünen maddenin faz değişimi ile solvent faza geçmesi
- Ekstrakt fazın mekaniksel ayrımı
- Çözünen maddenin ekstrakt fazdan ayrılması
- Rafine edilmiş çözücünün sürece gönderilmesidir.

Katı – Sıvı Ekstraksiyon’da seçilecek çözücünde aranan anahtar parametre “benzer- benzeri çözer” prensibidir. Genellikle çözücülerde aşağıdaki niteliklere dikkat edilir;

- Dağılma katsayısı
- Yoğunluk ve viskozite
- Çözünürlük
- Seçicilik
- Fazlar arasındaki yüzey gerilimi
- Tekrar kullanılabilirlik

Katı – Sıvı Ekstraksiyon; bitkilerden ve tohumlarından organik çözücüler ile yağların elde edilmesinde, çay yapraklarından su kullanılarak çayın, balıktan balık yağının eldesinde kullanılan bir yöntemdir (Baysal, 2005).

Katı-sıvı ekstraksiyon teknikleri geleneksel ve yeni teknikler olarak ikiye ayrılır. Soxhlet, perkolasyon, maserasyon teknikleri geleneksel metotlar olarak bilinir. Ancak günümüzde bu metodlar hem ekstraksiyon süresinin uzun olması, hem yüksek ısıların kullanılması, hem de oransal olarak fazla çözücü gerektirdiğinden maliyetli oluşu sebebiyle yerini yeni tekniklere bırakmaktadır. Biz çalışmalarımızda bu ileri ekstraksiyon metodlarından ultrason destekli ekstraksiyon ve homojenizatör destekli ekstraksiyon yöntemlerini inceledik.

2.5.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrason destekli ekstraksiyon, geleneksel yöntemlere göre nispeten ekonomik, basit ve etkili olması sebebiyle iyi bir alternatiftir. Hızlı sonuç vermesi ve düşük sıcaklıklarda bile uygulanabilir olması sebebiyle özellikle ısıya duyarlı ve kararsız maddelerin ekstraksiyonunda da bu yöntem kullanılabilir. UDE yönteminde ultrason dalgaları, ekstrakte edilmek istenen maddenin hücrelerini partikül boyutuna parçalayarak katı yüzeyindeki ultrasonik jetin katı ve sıvı faz ile temas yüzeyini arttırır. Bu sayede çözücünün elde edilmek istenen ekstrakta difüzyonu kolaylaşır. Bu metodun bitkisel ekstrakt eldesinde kullanımında ultrasonik dalgalar bitki dokularının hücre duvarlarına etki ederek onları parçalar ve doku içerisindeki solutinin dışarı çıkmasını sağlar (Söbeli ve Kayaardı, 2014).

UDE yönteminde yüksek basınçlı bir ortama gerek duyulmamaktadır. Ancak ultrason sırasında meydana gelen ısınmadan dolayı sıcaklık ekstraksiyon süresince kontrol altında tutulmalıdır. Ayrıca ultrason süresinin ürün kalitesine zarar vermemesi açısından optimum

koşullarda çalışmalar yapılmalıdır. (Raventós ve diğ., 2002; Luque De Castro ve Jimenez-Carmona, 2000)

2.5.2. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon

Klasik çözücü ekstraksiyonunun gelişmiş bir versiyonu olan homojenizatör destekli ekstraksiyon; kısa sürede yüksek verim sağlayan yeni nesil bir metottur. Homojenizasyonda ekstrakte edilecek katı küçük boyutlara ufalandıktan sonra belirli bir miktar çözücü içine alınır ve homojenizatör ile yüksek devirde karıştırma sağlanır. Homojenizasyon sonrasında katı madde partikül boyutuna parçalanır. Bu haliyle daha homojen dağılan bir ekstrakt hazırlanırken aynı zamanda ekstraktın sıvı madde ile temas yüzeyi de arttırılarak ekstraksiyon performansı iyileştirilir. Homojenizasyon işlemi sonrası madde yüzeyindeki gözeneklerin sıvıyla teması arttığından çok kısa sürede yüksek verimde ekstraksiyon sağlanır (Bilgin ve Şahin, 2013).

2.6. İSTATİSTİKSEL DENEYSEL TASARIM

Deneysel tasarımın asıl hedefi ölçülecek olan cevap değişkenine (bağımlı değişkene) etkisi olabileceği düşünülen proses parametrelerinin (bağımsız değişkenler) dikkate alınarak deneysel hatayı en aza düşürmektir. Geleneksel deneysel tasarım yöntemi olan One-Factor At A Time (OFAT) yaklaşımın çok sayıda deneysel çalışmaya ihtiyaç duyması, maliyetin yüksek olması ve en önemlisi de parametrelerin birbiriyle etkileşimini göz ardı etmesi gibi pek çok dezavantajı bulunmaktadır. İstatistiksel deneysel tasarım yöntemleri deney sayısını azaltan ve deneylere etki eden faktörlerin tek başlarına ve en önemlisi de birbirleriyle etkileşiminin cevap değerini nasıl etkiledikleri belirleyen matematiksel ve istatistiksel bir araçtır (İlbay, Z. ve diğ., 2014). Ayrıca, bu araç ile prosesi etkileyen bağımsız değişkenlerin farklı seviyelerinin bağımlı değişkenler üzerindeki etkileri ve bu etkilerin sebeplerini belirleyerek şartları optimize etmektedir. Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY), türlü proses parametrelerinin söz konusu olduğu bir fonksiyonun ölçüm değerinin optimize edilmesi için uygulanan bir deneysel tasarım yöntemidir. Optimum noktaya ulaşmak için genelde kullanılan tasarımlar genellikle ikinci dereceden terimler içeren ikinci seviyeden modellere sahip Merkezi Kompozit Deneysel Tasarım (MKDT) ve Box-Behnken tasarımlarıdır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

Bu çalışmada kullanılan zeytinyağı örnekleri Özgün Zeytin, Zeytinyağı AŞ firmasından sağlanmıştır. Ayçiçek yağı tek seferde (tüm çalışmalarda aynı örnek üzerinden gidilmesi için) bir marketten alınmış olup ticari bir markanın ürünüdür. Zeytin ağacı yaprakları yine Özgün Zeytin, Zeytinyağı AŞ firması aracılığıyla temin edilmiş olup, kış (Kasım-2014) ve yaz dönemi (Temmuz-2014) olmak üzere iki farklı mevsimde toplanmıştır. Yapraklar oda sıcaklığında kurutulup çalışmalarımız süresince karanlık ve kapalı bir ortamda muhafaza edilmiştir. Oğul otu bitkisi ise yerel bir marketten tek seferde temin edilip zeytin yaprakları ile aynı koşullarda saklanmıştır.

Çalışmalarımızda kullanılan etanol, metanol ve asetonyitril Merck firmasından sağlanmıştır. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazoline-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (trolox), 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin), Folin-Cioacaltea reaktifi, sodyum karbonat (Na_2CO_3), galik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, oleuropein, verbaskozit ve lutein-7-glukozit Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Potasyum persülfat, sodyum nitrit ve alüminyum klorür de yine Merck'ten temin edilmiştir. Kloroform, hekzan, asetik asit ve nişasta Merck'ten; potasyum iyodür Sigma-Aldrich'ten ve β -karoten Fluko'dan temin edilmiştir.

3.2. CİHAZLAR

Tayinlerde homojenizatör destekli ekstraksiyon için IKA T25 Digital- ULTRA TURRAX marka dijital homojenizatör; ultrason destekli ekstraksiyon için SONICS VCX 750 marka sonikatör, sentrifüj işlemleri için Nüve (CN 180) marka santrifüj kullanılmıştır. Sıvı ekstraktların kurutulması için döner buharlaştırıcı (BUCHI, R-215) kullanılmıştır. Spektrofotometrik analiz sonuçlarının okunması için PG INSTRUMENT- T60 UV-Visible Spectrophotometer marka UV Spektrofotometresi kullanılmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı

Kromatografisi (HPLC) ise Agilent 1260 (Agilent, Waldbronn, USA) marka ve modeldir. HPLC'ye eşlik eden kolon ise Agilent Eclipse Plus C18 RRHD 18 (3 mm x 5 mm; 1.8 µm)'dir. Yağların stabilitesi Ransimat (Metrohm) 892 aygıtı ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tayinler esnasında kullanılan saf su için Human Power I marka su arıtma cihazı kullanılmıştır. Ayrıca örnek hazırlamak için Mettler Toledo marka pH metre, Heidolph marka vorteks ve SHIMADZU marka terazi gibi aletlerden de faydalanılmıştır.

Çalışmalarımız,

- I. Bitkilerden Ekstrakt Eldesi,
- II. Ekstrakt İçeriğinin İncelenmesi,
- III. Bitkisel Yağların Elde Edilen Ekstrakt ile Zenginleştirilmesi
- IV. Bitkisel Yağların Stabilitesinin İncelenmesi olmak üzere 4 ayrı araştırma üzerinden yürütülmüştür.

Diğer taraftan, ekstraksiyon ve zenginleştirme çalışmalarında Design Expert (deneme sürümü) yazılımı kullanılarak YYY ile 3 ve/veya 4 faktör ve 3 seviyeli MKDT uygulanmıştır. Ayrıca incelenen bağımsız değişkenlerin etkinlik derecesi ve her birinin birbiri ile etkileşimi yine Design Expert ile tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanarak yorumlanmıştır.

3.3. EKSTRAKT ELDESİ

3.3.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrasonik bir banyonun aksine, bu çalışmada UDE için kullanılan sonikatör ile ultrasonik prob doğrudan hazırlanan karışımın içine daldırılmıştır (Şekil 3.1). Bu uygulamadaki amaç enerjinin bir kayıp yaşamadan ortama aktarılabilmesi ve maksimum verimle sonikasyonun tamamlanmasıdır. Bunun yanı sıra sıcaklık kontrolünü sağlamak ve probun aşırı ısınmasının önüne geçmek için puls (3/7; açık/kapalı) uygulaması yapılmıştır. Bu şekilde sistem sürekli sonikasyona maruz kalmamış ve 3 saniye çalışıp 7 saniye dinlenmiştir.



Şekil 3.1: Ultrason Destekli Ekstraksiyon’da kullanılan SONICS VCX 750 marka sonikatör cihazı.

Çalışmalar sırasında 50 mL’lik polietilen satrifüj tüpleri içerisine bir miktar örnek alınmış ve üzerine belirlenen miktarda çözücü ilave edilmiştir. Elde edilecek ekstraktların gıda sektöründe kullanılması hedeflendiğinden çözücü olarak su ve çevre dostu alkol olarak da bilinen etil alkolün (EtOH) farklı oranlardaki karışımları kullanılmıştır. Sıcaklık, EtOH konsantrasyonu, ekstraksiyon süresi ve genlik değerleri teker teker kontrol değişkeni olarak seçilmiş, optimum sonuçlar bulunmaya çalışılmıştır. 4 faktörlü ve 3 seviyeli MKDT uygulanarak deneysel tasarım yapılmıştır. Tablo 3.1’de örneklerle uygulanan UDE metodunda kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, değişkenlerin sembolleri ve seviye değerleri sunulmuştur.

Tablo 3.1: Zeytin yaprağı ve oğul otunun UDE ile ekstraksiyonunda dört faktörlü MKTD’de kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, sembolleri ve seviyeleri.

Bağımsız Değişkenler	Birim	Değişkenlerin Sembolleri	Faktör Seviyeleri		
			-1	0	1
Sıcaklık	°C	X ₁	17	24	31
Genlik	%	X ₂	20	35	50
EtOH konsantrasyonu	%	X ₃	25	50	75
Süre	dak	X ₄	30	37.5	45

3.4. EKSTRAKT İÇERİĞİNİN İNCELENMESİ

3.4.1. Spektrofotometrik Yöntemler

UDE ile elde edilen zeytin yaprağı ve oğul otu ekstraktlarının toplam fenolik madde ve antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde spektrofotometrik yöntemler kullanılmıştır. Toplam fenolik madde (TFM) tayini (Bilgin ve Şahin, 2013) ile fenolik madde profili; 2,2 – azinobis (3-etilbenzotiazolin-sülfonik asit) (ABTS), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Şahin ve Şamlı, 2013) ve antioksidan olarak bakır (II)'nin kullanımına dayalı toplam antioksidan potansiyeli (CUPRAC) yöntemleri ile de antioksidan aktivite (AA) belirlenmiştir.

3.4.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını temel alan bir yöntemdir. Bitki ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi arasındaki ilişki doğrusaldır. Bu doğrusallıktan faydalanılarak ekstraktların antioksidan kapasitesi hakkında değerlendirme yapılabilir (Şahin, 2011).

Tayinler, sonuçların kesinliği açısından 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bunun için 3 ayrı küvete aynı örnekten alınıp 3 ayrı gözlem yapılması sağlanmıştır. Tayin sonucu olarak bu 3 değer in ortalaması kullanılmıştır. 4 mL'lik plastik küvetlere sırasıyla;

- 20 µL örnek
- 380 µL destile su
- 2000 µL %10'luk folin çözeltisi
- 1600 µL 0.1 N Na₂CO₃ çözeltisi eklenerek her küvet karıştırılmıştır. 30 dakika boyunca karanlıkta beklemeye alınıp, 765 nm'de kullanılmış olan çözücü ile sıfırlanmış UV-spektrofotometre cihazında (Şekil 3.2) okuma yapılmıştır. Sonuçlar gram kuru malzeme başına gallik asit eş değeri (mg-GAE/g-kuru yaprak) cinsinden verilmiştir.



Şekil 3.2: Toplam Fenolik Madde Tayininde kullanılan PG INSTRUMENT- T60 UV-Visible Marka Spektrofotometre.

3.4.1.2. ABTS Yöntemi ile AA Tayini

Bu yöntem ile AA tayininde, 2850 μL seyreltik ABTS çözeltisine 150 μL örnek ilave edilmiştir (RE ve diğ., 1999) 10 dakika sonra çözeltilerin absorbansı 734 nm’de okunmuştur. Absorbans ile referans olarak alınan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) bileşiğinin konsantrasyonu arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak bilinmeyen konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Sonuçlar gram kuru madde başına mg trolox eş değeri antioksidan kapasite (mg-TEAC/g-kuru yaprak) cinsinden verilmiştir.

3.4.1.3. DPPH Yöntemi ile AA Tayini

DPPH radikalinin 500 μM ’lik çözeltisi hazırlanıp, 100 μM ’a seyreltilmiştir. Bitkisel ekstraktlar seyreltik çözeltiye karıştırılıp, 30 dakika oda sıcaklığında karanlıkta muhafaza edilerek 517 nm’de ölçüm yapılmıştır (YU ve diğ., 2005). Sonuçlar yine trolox eş değeri cinsinden sunulmuştur.

3.4.1.4. CUPRAC Yöntemi ile AA Tayini

Bitkisel ekstraktların AA’nin belirlenmesinde Apak ve ark.’nın metodu da kullanılmıştır (Apak ve diğ., 2008) 1000 μL (0,02 M) Cu^{+2} çözücüsüne 1000 μL (0,0075M) neokuproin ve 1000 μL (1M) NH_4Ac ilave edilmiştir. Ardından, 25 μL elde edilen ekstrakt ve 1075 μL distile su ilave edilmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Absorbans 450 nm’de okunmuştur. Sonuçlar yine trolox eş değeri cinsinden sunulmuştur.

3.4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Zeytin yaprağı ekstraktının fenolik madde profilinin incelenmesi için HPLC metodu uygulanmıştır. Bu yöntemde kullanılan gradient elüsyon programı Tablo 3.2’de özetlenmiştir. Örnekteki fenolik bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin kolondaki alıkonma süresi ve UV-spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarının karşılaştırılması suretiyle yapılmıştır. Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanması, bileşiklerin maksimum absorbans değeri verdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle fenolik maddelerin analizi için 276 nm dalga boyu seçilmiştir. Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır.

Tablo 3.2: HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon programına ait şematik gösterim.

HPLC çalışma koşulları	Gradient elusyon program		
	<u>Süre (dak)</u>	<u>A (%)</u>	<u>B (%)</u>
Mobil faz: A= Su + % 0.1 formik asit (v/v)	0.0	100	0
B= Asetonitril + % 0.1 formik asit (v/v)	0.5	100	0
Dedeksiyon: 276 nm	7.0	60	40
Akış hızı: 1 mL/dak	7.1	0	100
Kolon sıcaklığı: 40 °C	8.6	0	100
Enjeksiyon miktarı: 20 µL	8.7	100	0
	10	100	0

3.5. BİTKİSEL YAĞLARIN EKSTRAKSİYON İLE ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

Zenginleştirme işlemlerinde yağlar; UDE ile ekstrakte edilmiş bitkilerle katı-sıvı ekstraksiyonuna tabi tutulmuştur. Kurutulup saflaştırılan bitki ekstraktları yağın içinde kısmen çözündürülmüştür. Çalışmanın bu kapsamında homojenizatörden yararlanılarak HDE yöntemi uygulanmıştır. Bahsi geçen yöntem; yüksek sıcaklık veya yüksek basınç gibi parametrelere ihtiyaç duymadığından özellikle sıcaklığa duyarlı doğal ürünlerin korunmasında etkilidir.

3.5.1. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon

Zenginleştirme işlemi, ekstrakte edilmiş bitkiler olan oğul otu ve kışın hasat edilen zeytin yaprağının zeytinyağı ve ayçiçek yağına uygulanması ile gerçekleştirilmiştir.

Bu yöntemde belirli bir miktar yağ içerisine optimum miktarda bitki eklenmiş ve optimum sürede homojenizasyona tabi tutulmuştur. Bu optimum değerler çeşitli ön denemeler yapılarak bulunmuştur. Ekstraksiyon işlemi de her bir örnek için 3 kez uygulanmış olup 3 tekrarlı ölçüm yapılması sağlanmıştır. Denemeler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Karıştırma işlemi sırasında açığa çıkacak ısının fenolik bileşikleri bozmasını engellemek için ekstraksiyon işlemi periyotlar halinde tamamlanmıştır. Oda koşullarında çalışan ve son derece basit bir cihaz olan HDE'yi etkileyecek bağımsız değişkenler karıştırma hızı, süresi ve eklenecek olan katı ekstrakt miktarı ile kısıtlıdır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon'da kullanılan IKA T25 Digital- ULTRA TURRAX marka homojenizatör.

Bağımlı değişken olarak yağın içeriğindeki TFM ölçülerek, bu değişkeni maksimum yapacak koşullara göre optimizasyon yapılmıştır. 3 faktörlü ve 3 seviyeli MKDT uygulanarak deneysel tasarım yapılmıştır. Tablo 3.3'te örneklere uygulanan HDE metodunda kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, değişkenlerin sembolleri ve seviye değerleri sunulmuştur.

Tablo 3.3: Zeytinyağı ve ayçiçek yağının üç faktörlü MKTD'de kullanılan bağımsız değişkenler, birimleri, sembolleri ve seviyeleri.

Bağımsız Değişkenler	Birim	Değişkenlerin Sembolleri	Faktör Seviyeleri		
			-1	0	1
Karıştırma hızı	rpm	X_1	4000	7000	10000
Karıştırma süresi	s	X_2	30	60	90
Katı ekstrakt miktarı	ppm	X_3	1000	1250	1500

3.6. BİTKİSEL YAĞLARIN STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

YYY aracılığıyla MKDT uygulanarak optimum koşullar bulunduğundan sonra bu koşullarda zenginleştirilmiş olan yağlara TFM, AA, perokit değeri, klorofil ve karoten miktarı ve oksidatif stabilite gibi çeşitli testler yapılarak yağlarda meydana gelen kalite iyileştirilmeleri tespit edilmiştir.

3.6.1. TFM

Tayinde kullanılacak örneğin hazırlanması için sırasıyla aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

1. 5.1 g yağ büyük santrifüj tüpüne tartılır.
2. Uygun miktarda ekstrakt eklenir.
3. Homojenizatörde uygun zaman ve devirde karıştırılır.
4. Karışımdan 2 gram alınır.
5. Üzerine belirli miktarda %100 hekzan eklenir.
6. 7000 rpm / 30 saniye boyunca homojenizatöre tabi tutulur.
7. Üzerine belirli miktarda %100 metanol (MeOH) eklenir.
8. 7000 rpm / 60 saniye boyunca homojenizatöre tabi tutulur.
9. Karışım 15 mL'lik santrifüj tüplerine alınır.
10. 3500 rpm / 15 dakika boyunca santrifüj cihazında ayrılır.
11. Fazlara ayrılmış olan karışımın üst fazı şırıngayla çekilerek temiz bir santrifüj tüpüne konur.
12. Alt faza belirli miktarda %100 MeOH eklenir.
13. 7000 rpm / 60 saniye boyunca homojenizatöre tabi tutulur.
14. 3500 dev / 15 dakika boyunca santrifüj cihazında karıştırılır.
15. Fazlara ayrılmış olan karışımın üst fazı şırıngayla çekilerek daha önceden ayırmış olduğumuz üst faza birleştirilir.
16. Birleşen üst fazlar vorteks yardımıyla karıştırılır ve filtreden geçirilerek viyallere alınır.

4 mL'lik plastik küvetlere sırasıyla;

- I. 20 µL örnek
- II. 380 µL destile su

- III. 2000 μL %10'luk folin çözeltilisi
- IV. 1600 μL 0.1 N Na_2CO_3 çözeltilisi eklenerek her küvet karıştırılmıştır. 30 dakika boyunca karanlıkta beklemeye alınıp, 765 nm'de MeOH ile sıfırlanarak spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar litre yağ başına mg gallik asit eş değeri (ppm) cinsinden verilmiştir.

3.6.2. AA

Yağların antioksidan kapasitesini tayin edilirken ABTS metodu uygulanmıştır. Örnek hazırlığı için toplam fenolik madde tayinindeki adımlar aynen izlenmiştir. Derişik ABTS çözeltilisi hazırlığı için 100 mL'lik erlene sırasıyla;

- I. 0.1920 g ABTS
- II. 50 mL destile su
- III. 0.0331 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ eklenir ve kuvvetlice çalkalanır. Alüminyum folyoya sarılan derişik ABTS deney öncesinde 1 gece (16 saat) karanlıkta bekletilir.

Tayinde seyreltik ABTS çözeltilisi kullanılmıştır. Çözeltiliyi seyreltmek için 1 gece önceden hazırlanmış derişik ABTS çözeltilisine uygun miktarda (genellikle 800 μL derişik ABTS'ye 80 mL %80'lik MeOH çözeltilisi uygun bulunmuştur.) %80'lik MeOH çözeltilisi eklenir. 734 nm'de %80 MeOH ile sıfırlanmış UV cihazında yaklaşık olarak 0.7 absorbans değerine karşılık gelen ABTS çözeltilisi kullanılır.

Deneyler yine 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. 4 mL'lik plastik küvetlere sırasıyla;

- I. 30 μL örnek
- II. 3 mL seyreltik ABTS eklenir. X_1 değeri (kontrol değeri) için kullanılacak küvetlere 30 μL örnek yerine 30 μL %100'lük MeOH konur.

Küvetler 5 saniye boyunca ultrasonik banyoda karıştırılır, ardından 5 dakika boyunca karanlıkta bekletilir. 734 nm'de %80'lik MeOH ile sıfırlanarak spektrofotometrik olarak ölçülür. Yağların antioksidan aktivitesi ABTS radikalini süpürme kabiliyeti (%inhibisyon) olarak ifade edilmiştir. Serbest radikali inhibe etme kabiliyeti aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$AA(\%inhibisyon) = \frac{A_{Kontrol} - A_{\text{örnek}}}{A_{Kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

$A_{Kontrol}$, seyreltik ABTS çözeltisinin absorbansını, $A_{\text{örnek}}$ ise örneğin absorbansını temsil etmektedir.

3.6.3. Peroksit Değeri

1 kg yağda bulunan aktif oksijenin miligram cinsinden değeri peroksit miktarını verir (mEq-O₂/kg-yag). Kloroform/asetik asit ile yağ karışımı potasyum iyodür çözeltisi ile bir süre karanlıkta reaksiyona tabi tutulur. Açığa çıkan iyot, sodyum sülfat çözeltisine karşı titre edilir (Malheiro ve diğ., 2013).

Peroksit değerinin tayininde sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. %1'lik nişasta çözeltisi hazırlanır.
2. Çözelti ısıtıcıda rengi berraklaşınca kadar kaynatılır.
3. KI çözeltisi hazırlanır.
4. N Na₂S₂O₃ çözeltisi hazırlanır.
5. 250 mL'lik erlene ekstrakt ile optimum koşullarda homojenizasyona tabi tutulmuş 1 gram yağ örneği tartılır. Tartım not edilir.
6. Örnek üzerine belirli miktarda %100'lük kloroform eklenir, çokça çalkalanır.
7. Karışıma belirli miktarda %100'lük asetik asit eklenir ve tekrar çalkalanır.
8. 1 mL KI çözeltisi eklenir. 1 dakika boyunca iyice çalkalanır.
9. Karışım bir süre karanlıkta bekletilir.
10. Bekletilen karışım üzerine belirli miktarda destile su eklenerek çalkalanır.
11. 1 mL %1'lik nişasta çözeltisi eklenir (sarıdan mora renk değişimi gözlenir.).
12. Temiz bir şırıngaya 0.01 N Na₂S₂O₃ çözeltisi çekilir. Tartı dolu şırıngayla sıfırlanır.
13. Karışım 0.01 N Na₂S₂O₃ çözeltisi ile titre edilir. Mor renkten sarıya/şeffafa ilk geçiş anında titrasyon durdurulur.
14. Sıfırlanmış tartı üzerinde şırınga yeniden tartılır ve sarfiyat not edilir.
15. Kontrol değişkeni olarak seçilen saf yağa aynı işlemler uygulanır.

Peroksit değerini hesaplariken aşağıdaki eşitlikten faydalanılmıştır:

$$PD = \frac{(V_1 - V_0) \times N}{M} \quad (3.2)$$

PD: Peroksit değeri (mEq-O₂/kg-yağ)

V₁: Örnek için harcanan sodyum tiyosülfat miktarı (mL)

V₀: Tanık için harcanan sodyum tiyosülfat miktarı (mL)

N: Sodyum tiyosülfatın normalitesi

M: Örnek miktarı (g)

3.6.4. Klorofil Miktarı Tayini

Yağlardaki klorofil miktarının tayin edilebilmesi için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. 50 mL'lik santrifüj tüpüne uygun miktarda ektsrakt ile homojenize edilmiş 7.5 gram yağ tartılır.
2. Sikloheksanla 25 g'a tamamlanır ve çözündürülür.
3. Karışım cam küvete alınarak, daha önceden 670 nm'de %100'lük sikloheksan ile sıfırlanmış spektrofotometrede absorbans değeri okunur.
4. Kontrol değişkeni olarak seçilen saf yağa aynı işlemler uygulanır (Jaber ve diğ., 2012).

Klorofil miktarı kg yağ başına mg feofitin (mg-feofitin/kg-yağ) cinsinden ifade edilir:

$$Klorofil = (A_{670} \times 106) / (613 \times 100 \times d) \quad (3.3)$$

A, absorbansı, *d* ise ışın yolunu (spektrofotometre hücre kalınlığı, 1 cm) göstermektedir.

3.6.5. Karoten Miktarı Tayini

Yağlardaki karoten miktarını belirleyebilmek için sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

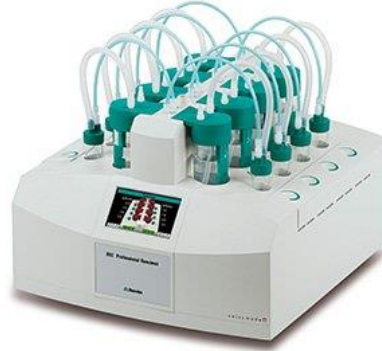
1. Küçük bir santrifüj tüpüyle tartı sıfırlanır ve tüpe 1 mL yağ alınır. Yağın gramajı tartılarak not edilir.
2. Santrifüj tüpündeki 1 mL yağ, %100 hekzan ile 10 mL'ye tamamlanır.
3. Oluşan fazlar vorteks yardımıyla iyice karıştırılır.

4. Karışım cam küvete alınarak, daha önceden 450 nm’de %100’lük hekzan ile sıfırlanmış UV’de absorbans değeri okunur (Chuang ve Brunner, 2006).

Kullanılan yağlardaki karoten miktarı, kg yağ başına mg β -karoten (mg- β -karoten/kg-yağ) şeklinde sunulmuştur.

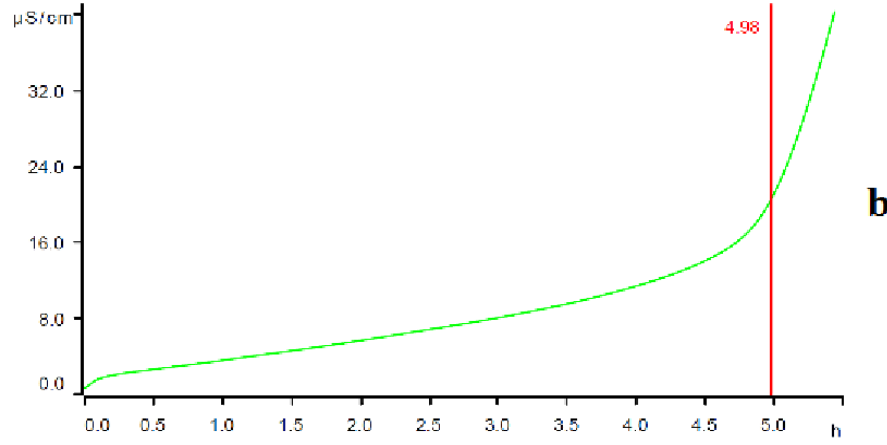
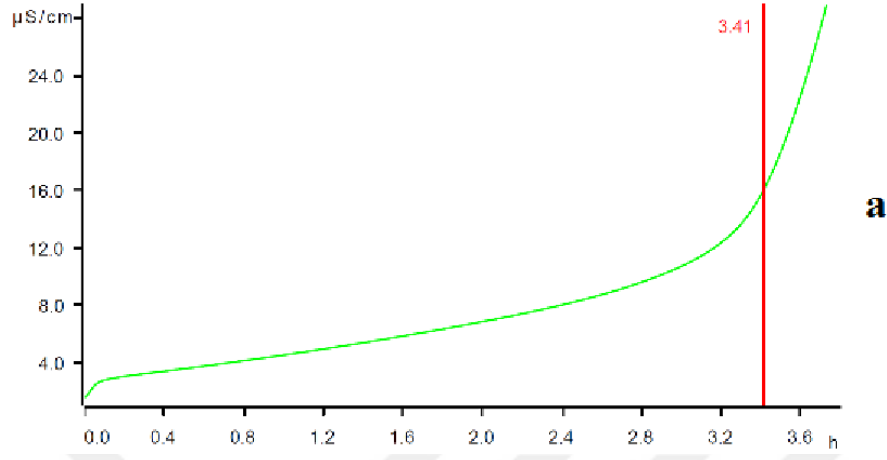
3.6.6. Oksidatif Stabilite (Ransimat Metodu)

Analiz edilecek yağların oksidasyon kararlılığı Ransimat cihazı ile ölçülür (Şekil 3.4). Cihazın tüplerine yaklaşık 3 g yağ örneklerinden alınarak, saatte 20 L hava geçirilir. Belirli sıcaklıkta tutulan yağ numunesinden hava geçirilir. Isınma sonucu yağdan ayrılan uçucu organik asitler yağ numunesinden geçen ince kapiler borular yardımıyla saf su içeren kaplara taşınır. Yağdaki oksidasyon ile suyun iletkenliği arasında doğrusal bir ilişki gözlenir (Duman ve diğ., 2015).



Şekil 3.4: Oksidatif stabilitenin ölçümünde kullanılan Metrohm marka ransimat cihazının örnek gösterimi.

Hızlandırılmış oksidasyon şartlarına (130 °C) getirilen cihazda, iletkenliğe karşı zaman grafiğindeki ani değişimin olduğu dönüm noktası otomatik olarak tayin edilir ve indüksiyon zamanı (IT) olarak kaydedilir. Şekil 3.5 a ve b saf ve zenginleştirilmiş bir yağ örneğinin ransimat grafiklerini temsil etmektedir.



Şekil 3.5: 130 °C’de meydana gelen lipid oksidasyon a) zeytinyağı b) zenginleştirilmiş zeytinyağı.

4. BULGULAR

4.1. ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON İLE EKSTRAKT İÇERİĞİNİN İNCELENMESİ

4.1.1. Zeytin Yaprığı

Tablo 4.1, zeytin yapraklarının UDE ile ekstraksiyonunda 4 faktörlü ve 3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı ve seçilen bağımsız değişkenlerin ekstrakte edilen fenolik madde miktarına etkilerini göstermektedir.

Tablo 4.1: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış proses şartlarında elde edilen ekstraktların TFM miktarları*.

Deney no	X ₁ (°C)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (dak)	TFM (mg-GAE/g-kuru yaprak)
1	24	35	50	37.5	518.30±9.05
2	24	35	50	37.5	525.8±8.25
3	24	35	50	37.5	518.29±10.00
4	24	35	75	37.5	362.52±10.12
5	17	50	25	45	241.02±8.56
6	31	35	50	37.5	436.98±7.55
7	17	35	50	37.5	399.48±9.51
8	24	35	50	37.5	488.80±10.09
9	24	35	50	37.5	529.95±11.06
10	31	50	25	30	183.04±7.03
11	24	35	25	37.5	207.03±8.26
12	17	50	75	45	418.33±11.00
13	17	50	25	30	211.30±10.56
14	17	50	75	30	295.07±10.99

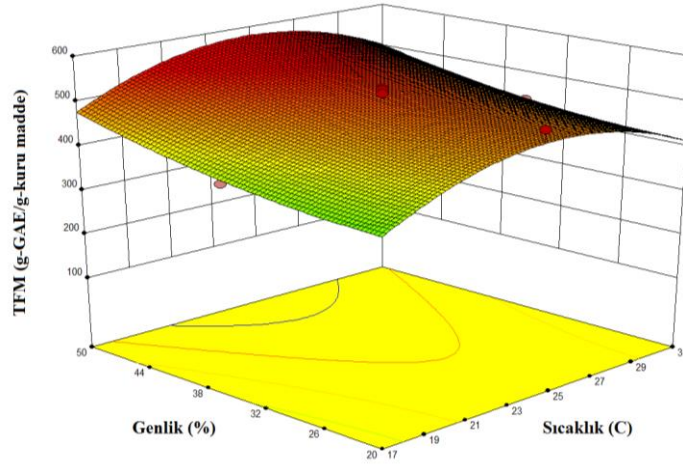
Tablo 4.1 (devam)

15	24	35	50	45	541.70±12.06
16	24	35	50	37.5	530.80±13.01
17	31	20	75	45	261.32±10.23
18	31	50	75	30	368.01±11.54
19	31	20	25	45	190.97±8.99
20	17	20	25	45	156.21±9.09
21	17	20	25	30	115.70±7.99
22	31	20	25	30	168.36±8.88
23	24	35	50	30	534.56±13.01
24	31	20	75	30	258.03±7.75
25	24	20	50	37.5	512.67±9.98
26	31	50	75	45	478.32±11.11
27	17	20	75	30	193.19±8.00
28	24	50	50	37.5	540.36±12.02
29	17	20	75	45	262.28±7.77
30	31	50	25	45	239.43±7.99

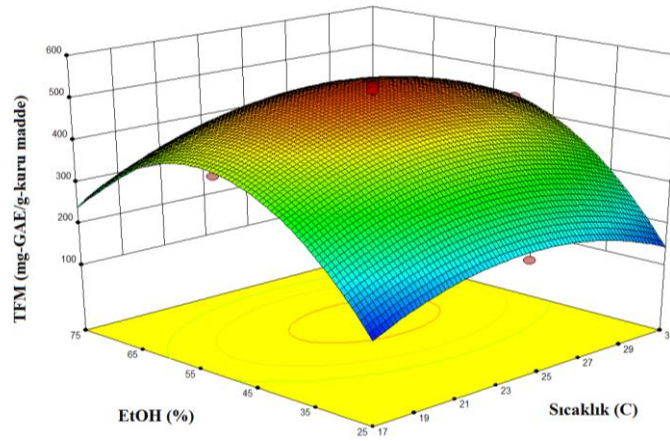
* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Tablo 4.1'e bakıldığında zeytin yapraklarında mevcut bulunan toplam fenolik madde miktarının gram kuru yaprak başına 115.70 ile 541.70 mg GAE arasında değiştiği görülmektedir.

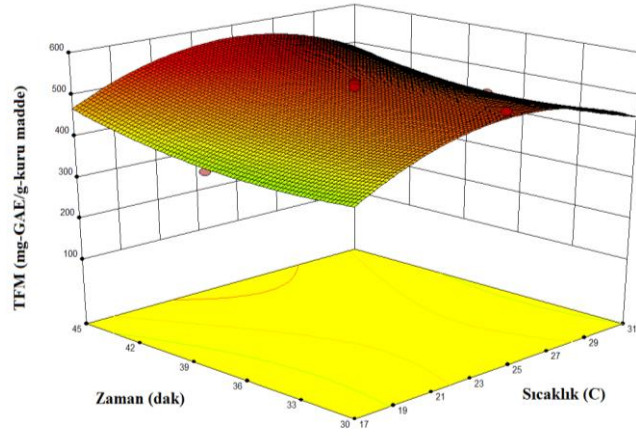
Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5'te görüldüğü üzere, proses değişkenlerinin her birinin ve birbirleri ile etkileşimlerinin görsel olarak sunulabilmesi için üç boyutlu grafiklerden faydalanılmıştır.



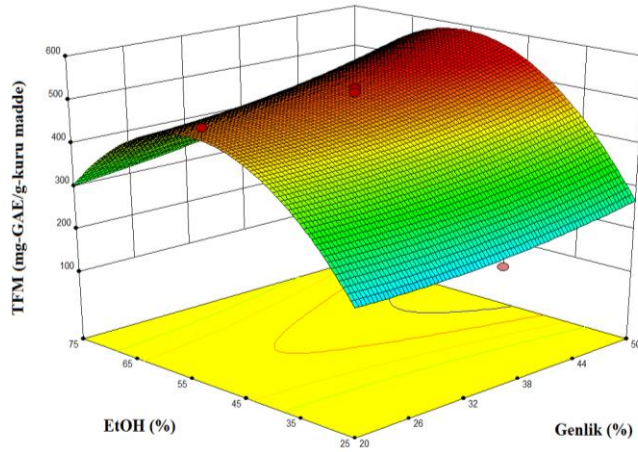
Şekil 4.1: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (EtOH konsantrasyonu=%50 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



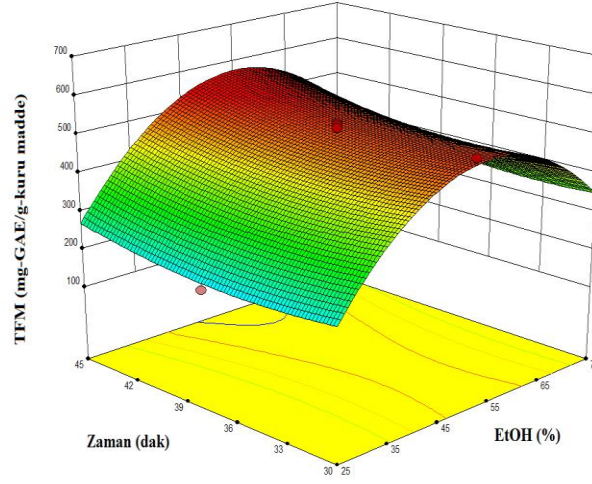
Şekil 4.2: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



Şekil 4.3: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve EtOH konsantrasyonu=%50).



Şekil 4.4: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, genliğe bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



Şekil 4.5: UDE sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak zamanın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve genlik=%35).

Şekil 4.1 incelendiğinde, ekstrakte edilen fenolik madde miktarının genliğin artması ile arttığı gözlenmektedir. Bu durum UDE prosesine aktarılan güç miktarının artması ile beraber ekstraksiyonun hızlanması ve dolayısıyla ekstrakt veriminin artması şeklinde yorumlanabilir. Suyun içerisindeki EtOH konsantrasyonu, başlangıçta verimi arttırmış, belirli bir değere ulaştığında (yaklaşık %45 EtOH) ise TFM’de keskin bir düşüş baş göstermiştir (Şekil 4.2). Şekil 4.3’e bakıldığında ise fenolik madde miktarının ekstraksiyon süresi ile keskin olmamakla beraber arttığı gözlenmektedir. Sıcaklık ile önce bir artış ardından keskin bir şekilde olmamakla beraber azalışa geçiş de görülmektedir. Enerjinin genliğinin çok belirgin bir etkisinin olmadığı da gözlenmiştir (Şekil 4.4). Şekil 4.5’te az önce bahsedildiği gibi UDE ile ekstrakt eldesinde çözücü konsantrasyonunun, TFM miktarını keskin bir şekilde etkileyen bir parametre olduğunu göstermektedir.

4.1.1.1. *YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu*

Zeytin yapraklarından UDE yöntemi ile ekstrakt eldesinde, dört faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan çalışmada oluşturulan model denklem aşağıdaki eşitlikte gösterilmiştir:

$$\begin{aligned}
 TFM = & 512.92 + 16.22X_1 + 47.56X_2 + 65.78X_3 + 25.68X_4 - 3.01X_1X_2 + \\
 & 8.70X_1X_3 - 4.37X_1X_4 + 21.34X_2X_3 + 11.51X_2X_4 + 9.79X_3X_4 - 88.96X_1^2 + \\
 & 19.33X_2^2 - 222.41X_3^2 + \\
 & 30.94X_4^2
 \end{aligned} \tag{4.1}$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve parametrelerin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayıları ANOVA tablosu ile gösterilmiştir. Söz konusu sistem için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2: Zeytin yapraklarından UDE ile elde edilen ekstrakt içerisindeki TFM cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Hammadde	Cevap	R^2	R^2_{adj}	Etkin parametreler ($p < 0.05$)
Zeytin Yapağı	TFM	0.9839	0.9689	Model denklem, X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , X_2X_3 , X_1^2 ve X_3^2

Zeytin yaprağının UDE ile ekstraksiyonunda TFM üzerinde EtOH konsantrasyonu başta olmak üzere tüm parametrelerin etkili olduğu görülmektedir. Genlik ve konsantrasyon etkileşimi ile sıcaklığın ve konsantrasyon parametrelerinin ikinci kuvvetleri de yine proses üzerinde etkili olarak bulunmuştur. Ayrıca, gerek p değeri, gerekse de korelasyon değerleri (R^2 ve R_{adj}^2) incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı cevap değerinin model uyumunun zeytin yaprağının UDE ile ekstraksiyonu için son derece iyi olduğu söylenebilir. Elde edilen sonuçlara göre maksimum miktarda TFM’nin ekstrakte edildiği şartlarda optimizasyon yapılmıştır. Optimum çözüm noktasındaki deney şartları ve elde edilen sonuçlar zeytin yaprağı için şu şekilde hesaplanmıştır:

24.3°C, %48 genlikte, %49 (v/v) oranında EtOH kullanılarak 30.5 dakika ekstraksiyon yapıldığında elde edilen en yüksek TFM gram kuru zeytin yaprağı başına 560.517 mg’dır.

4.1.2. Oğul Otu

Tablo 4.3, oğul otunun UDE ile ekstraksiyonunda 4 faktörlü ve 3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı ve seçilen bağımsız değişkenlerin ekstrakte edilen fenolik madde miktarına etkilerini göstermektedir.

Tablo 4.3: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış proses şartlarında elde edilen ekstraktların TFM miktarları*.

Deney no	X ₁ (°C)	X ₂ (%)	X ₃ (%)	X ₄ (dak)	TFM (mg-GAE/g-kuru yaprak)
1	24	35	50	37.5	25.00±0.99
2	24	35	50	37.5	26.24±0.09
3	24	35	50	37.5	26.50±0.05
4	24	35	75	37.5	19.23±0.11
5	17	50	25	45	5.46±0.05
6	31	35	50	37.5	21.96±0.05
7	17	35	50	37.5	4.58±0.02
8	24	35	50	37.5	25.89±0.06
9	24	35	50	37.5	25.80±0.10
10	31	50	25	30	25.93±0.12
11	24	35	25	37.5	22.90±0.22
12	17	50	75	45	4.57±0.05
13	17	50	25	30	5.00±0.05
14	17	50	75	30	4.00±0.01
15	24	35	50	45	27.17±0.30
16	24	35	50	37.5	24.10±1.00
17	31	20	75	45	11.92±0.05
18	31	50	75	30	23.47±1.00
19	31	20	25	45	9.00±0.99
20	17	20	25	45	11.10±0.05
21	17	20	25	30	10.00±0.01
22	31	20	25	30	24.13±1.11
23	24	35	50	30	25.20±0.99
24	31	20	75	30	23.63±0.05

Tablo 4.3 (devam)

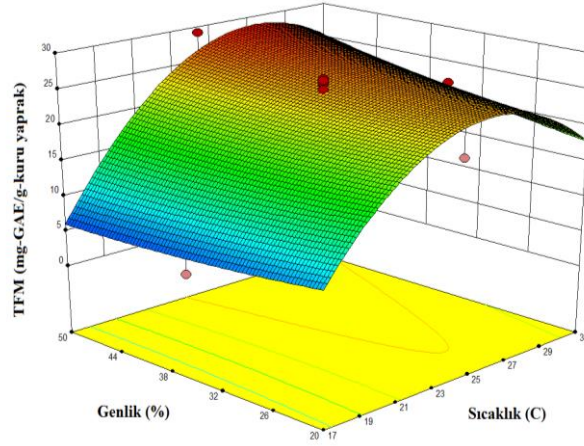
25	24	20	50	37.5	20.33±0.15
26	31	50	75	45	20.10±1.05
27	17	20	75	30	3.68±0.01
28	24	50	50	37.5	29.16±0.88
29	17	20	75	45	7.50±0.05
30	31	50	25	45	25.56±0.89

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

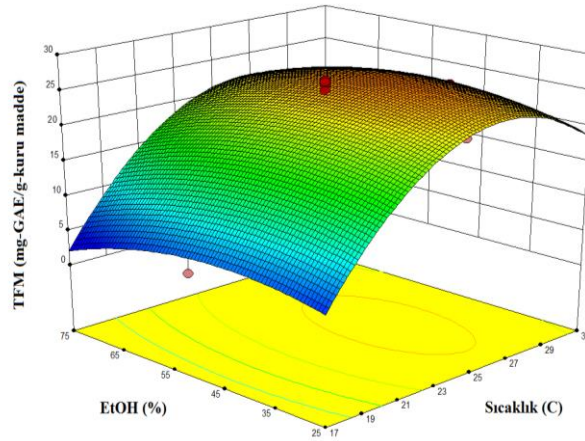
Tablo 4.3'e bakıldığında oğul otu bitkisinde bulunan toplam fenolik madde miktarının gram kuru yaprak başına 3.68 ile 29.16 mg GAE arasında değiştiği görülmektedir.

Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10'da görüldüğü üzere, UDE ile oğul otu ekstraktı eldesinde proses değişkenlerinin her birinin ve birbirleri ile etkileşimlerinin görsel olarak sunulabilmesi için yine yanı şekilde üç boyutlu grafiklerden faydalanılmıştır.

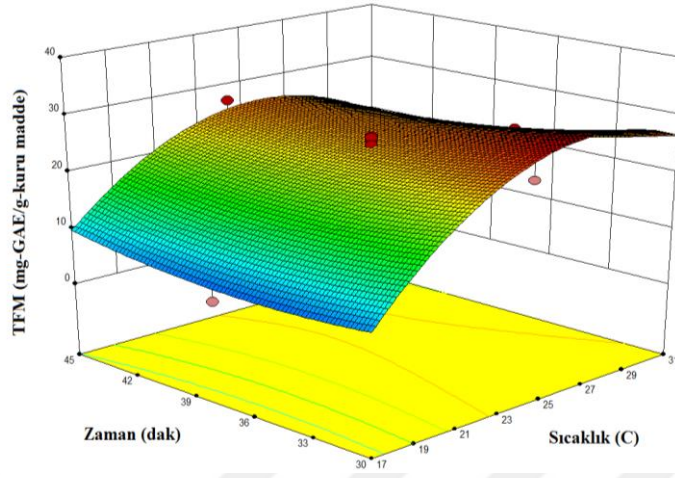
Şekil 4.6 ele alındığında, ultrason gücünün ve ekstraksiyon süresinin her ikisinin artması ile ekstraksiyon etkinliğinin dikkate değer bir şekilde arttığı görülmektedir. Söz konusu üç boyutlu görsel, TFM'ye genliğin etkisi olmadığını fakat sıcaklığın çok önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Sıcaklığın etkisine bakacak olursak 27°C'ye kadar belirgin bir artış, ardından keskin bir azalma gözlenmiştir. Sıcaklığın bu etkisi, Şekil 4.7'den de gözlenmektedir. Çözücüdeki su miktarının artması ile TFM seviyesinde ilk olarak bir yükseliş, ardından (su oranı çözücünün yaklaşık yarısına ulaştıktan sonra) bir azalma baş göstermiştir. Şekil 4.8 ise sıcaklığın yine aynı etkiyi verdiğini, diğer taraftan sonikasyon periyodunun artışı ile verimin çok keskin olmadan arttığını göstermektedir. Kullanılan enerjinin ve çözücü konsantrasyonunun UDE için çok etkili parametreler olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).



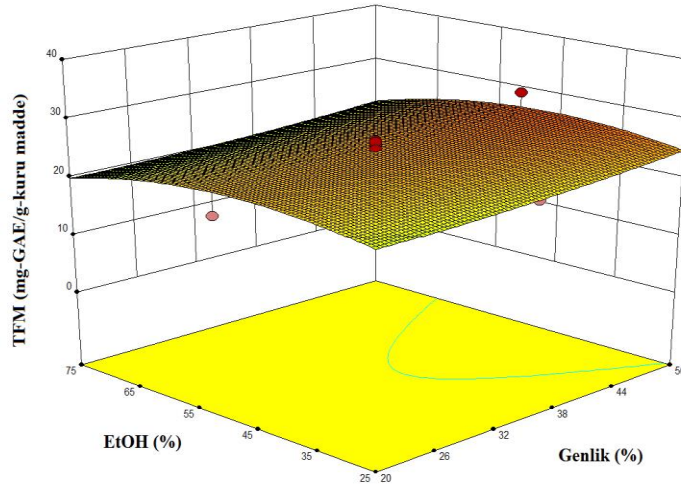
Şekil 4.6: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak genliğin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (EtOH konsantrasyonu=%50 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



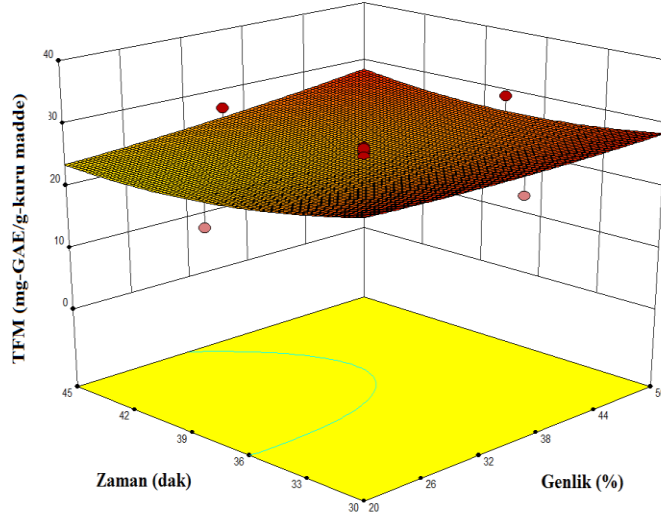
Şekil 4.7: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



Şekil 4.8: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, sıcaklığa bağlı olarak ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Genlik=%35 ve EtOH konsantrasyonu=%50).



Şekil 4.9: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, genliğe bağlı olarak çözücü konsantrasyonunun ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve ekstraksiyon süresi=37.5 dak).



Şekil 4.10: UDE sistemi ile oğul otu ekstraksiyonunda, çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak zamanın ekstrakte edilen TFM miktarına etkisi (Sıcaklık=24°C ve genlik=%35).

Şekil 4.10 incelendiğinde, ekstraksiyon süresi ve uygulanan enerji miktarının ekstraksiyon performansına yine benzer etkiler gösterdiği görülmektedir.

4.1.2.1. YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu

Oğul otu bitkisinden UDE yöntemi ile ekstrakt eldesinde, dört faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan çalışmada oluşturulan model denklem aşağıdaki eşitlikte gösterilmiştir:

$$TFM = 24.89 + 7.21X_1 + 1.22X_2 - 1.16X_3 - 1.26X_4 + 2.48X_1X_2 + 0.39X_1X_3 - 2.28X_1X_4 - 0.14X_2X_3 + 1.20X_2X_4 + 0.20X_3X_4 - 10.93X_1^2 + 0.54X_2^2 - 3.13X_3^2 + 1.99X_4^2 \quad (4.2)$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve parametrelerin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayıları ANOVA tablosu ile gösterilmiştir. Söz konusu sistem için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Oğul otundan UDE ile elde edilen ekstrakt içerisindeki TFM cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Hammadde	Cevap	R^2	R_{adj}^2	Etkin parametreler ($p < 0.05$)
Oğul Otu	TFM	0.9463	0.8961	Model denklem, X_1 , X_1X_2 , X_1X_4 ve X_1^2

Tablo 4.4'ten de görüldüğü üzere gerek p değeri, gerekse de korelasyon değerleri (R^2 ve R_{adj}^2) incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı cevap değerinin model uyumunun oğul otu bitkisinin UDE ile ekstraksiyonu için son derece iyi olduğu söylenebilir. Oğul otunun UDE ile ekstraksiyonunda TFM üzerinde en etkili parametrenin sıcaklık olduğu, bunu sıcaklığın ikinci kuvvetinin ve sıcaklık-genlik, sıcaklık-süre etkileşiminin izlediği gözlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre maksimum miktarda TFM'nin ekstrakte edildiği şartlarda optimizasyon yapılmıştır. Optimum çözüm noktasındaki deney şartları ve elde edilen sonuçlar oğul otu için şu şekilde hesaplanmıştır:

27.5°C, %42.33 genlikte, %43 (v/v) oranında EtOH kullanılarak 32 dakika ekstraksiyon yapıldığında elde edilen en yüksek TFM gram kuru oğul otu başına 29.387 mg'dır.

4.2. HOMOJENİZATÖR DESTEKLİ EKSTRAKSİYON İLE YAĞIN ZENGİNLEŞTİRİLMESİ

4.2.1. Zeytinyağı–Zeytin Yapağı

Tablo 4.5, zeytin yapağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş olan zeytinyağındaki fenolik madde miktarına seçilen bağımsız değişkenlerin etkilerini ve 3 faktör/3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı göstermektedir.

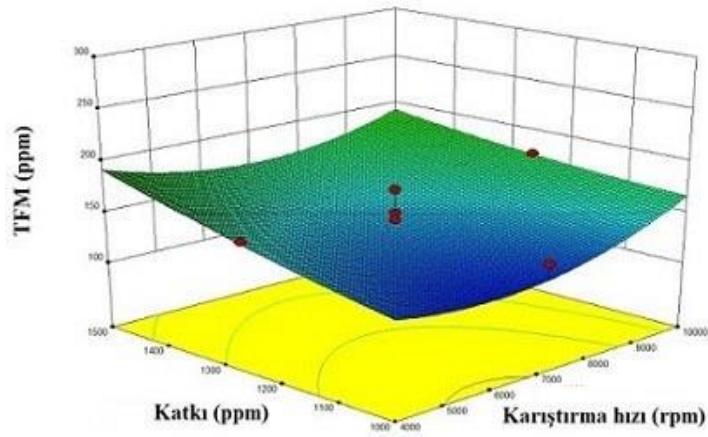
Saf zeytinyağının toplam fenolik madde miktarı litre başına 132 mg olarak ölçülmüşken, zeytin yapağı ekstraktıyla zenginleşmesi neticesinde ise litre başına 113 ile 258 mg arasında bir değişim gözlenmiştir.

Tablo 4.5: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağının TFM miktarları*.

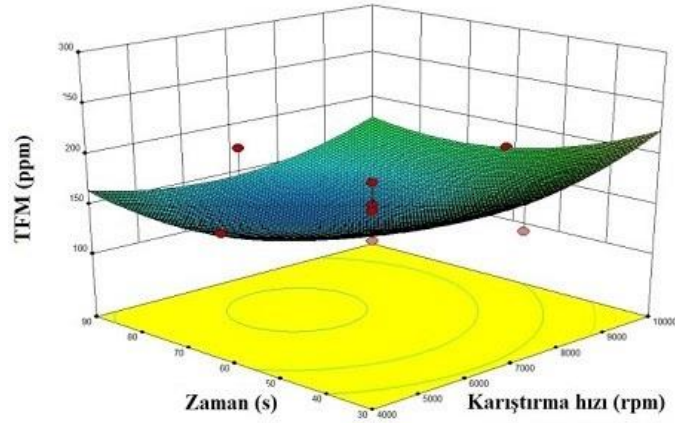
Deney no	X ₁ (rpm)	X ₂ (s)	X ₃ (ppm)	TFM (ppm)
1	10000	30	1500	249±5.19
2	4000	30	1500	258±4.29
3	7000	30	1250	160±3.09
4	4000	30	1000	158±1.25
5	7000	60	1500	156±2.01
6	7000	60	1000	137±1.01
7	10000	90	1500	196±4.44
8	7000	90	1250	176±2.98
9	7000	60	1250	173±5.00
10	10000	30	1000	221±5.02
11	4000	60	1250	158±2.21
12	7000	60	1250	150±1.14
13	10000	60	1250	177±2.91
14	7000	60	1250	143±3.33
15	7000	60	1250	133±4.01
16	4000	90	1500	184±2.81
17	10000	90	1000	157±3.03
18	7000	60	1250	113±0.98
19	4000	90	1000	139±1.15
20	7000	60	1250	128±2.17

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

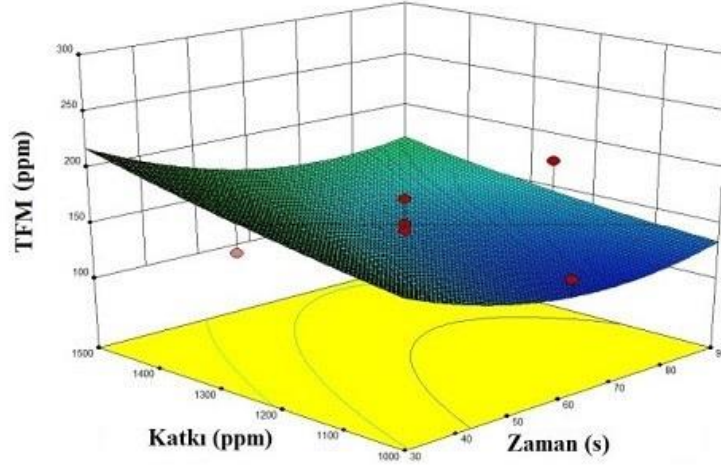
Şekil 4.11-4.13, HDE prosesinin bağımsız değişkenlerinin tek tek etkilerini ve birbirlerine olan etkileşimlerini üç boyutlu olarak göstermektedir.



Şekil 4.11: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=30 s).



Şekil 4.12: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1435 ppm).



Şekil 4.13: Zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=10000 rpm).

Beklenildiği üzere yağdaki TFM zenginleşmesi ilave edilen ekstrakt miktarı ile artış göstermiştir (Şekil 4.11). Bu sonuç, *Franco ve arkadaşlarının* (2016) patates kabuğu ekstraktını yağın oksidasyonuna karşı kullandığı çalışmanın bulguları ile uyum içindedir. Benzer şekilde, *Mei ve arkadaşları* (2014) da ayçiçek yağının stabilitesini iyileştirirken, yağ içerisindeki rambutan ekstraktının miktarının artmasının stabiletinin lehine olduğunu göstermişlerdir. Şekil 4.12'den karıştırma hızının artmasıyla beraber yağ içerisinde meydana gelen TFM zenginleşme miktarının arttığı gözlenmektedir. Yani hedef komponentlerin yağ içerisine difüzyonu karıştırma ile beraber artma eğilimi göstermiştir (Ho ve Hsieh, 2001). Söz konusu bulgu, karıştırmanın ek bir enerji desteği ile ekstraksiyon lehine olmasının yanısıra bir de homojenliğe katkıda bulunmasıyla etkinliğin artmasında etkili olması şeklinde de yorumlanabilir (Georgiev ve diğ., 2009). Diğer taraftan karıştırma süresinin yağın fenolik madde açısından zenginleştirilmesinde olumsuz bir etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.13). Bu durum uzun ekstraksiyon süresi neticesinde ısıya maruz kalma durumu ile açıklanabilir (Chan ve diğ., 2009). Elde edilen bu bulgu, zeytin yaprağının sahip olduğu fenolik bileşiklerin ısıya duyarlı olmadığını göstermektedir.

4.2.1.1. YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu

Üç faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan modelleme çalışmasında, zeytinyağının HDE ile TFM açısından zenginleşmesinde oluşturulan eşitlik aşağıda ifade edildiği gibi hesaplanmıştır:

$$TFM = 140.98 + 10.30X_1 - 19.40X_2 + 23.10X_3 - 3X_1X_2 - 9.75X_1X_3 - 5.50X_2X_3 + 25.05X_1^2 + 25.55X_2^2 + 4.05X_3^2 \quad (4.3)$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve her bir parametrenin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayısı ANOVA tabloları ile ortaya konulmuştur. Zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleşen zeytinyağı için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.6' da görülmektedir.

Tablo 4.6: HDE sistemi ile zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Bitkisel Yağ	Ekstrakt	Cevap	R ²	R ² _{adj}	Etkin parametreler (p<0.05)
Zeytinyağı	Zeytin yaprağı	TFM	0.8193	0.6566	Model denklem, X ₁ ve X ₃

Tablo 4.6' dan da görüldüğü gibi model denklem istatistiksel olarak (p<0.05) önemli bulunmuştur. Bu durum R² değeri ile de doğrulanmaktadır. Daha net bir şekilde ifade edilecek olursa bağımlı değişkendeki (TFM) toplam varyasyonun (değişimin) yaklaşık olarak %82'si, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyle Eşitlik 4.3 ile açıklanabilir. Yağın HDE ile zenginleştirilmesinde etkin parametrelerin farklı olduğu görülmüştür. Söz konusu sistem için zenginleşme sürecinde en etkin parametre ilave edilen katkı maddesinin miktarı olmuştur. Bunu karıştırma süresi takip etmiştir.

MKDT kullanılarak yapılan optimizasyon sonucu elde edilen koşullar şu şekilde bulunmuştur:

10000 rpm hızda, 30 s süre ve 1424.74 ppm ekstrakt ile karıştırma yapıldığında elde edilen en yüksek fenolik madde miktarı bir litre yağ başına 239.411 mg'dır.

4.2.2. Zeytinyağı – Oğul Otu

Tablo 4.7, oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş olan zeytinyağındaki fenolik madde miktarına seçilen bağımsız değişkenlerin etkilerini ve 3 faktör/3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı göstermektedir.

Saf zeytinyağının toplam fenolik madde miktarı litre başına 132 mg olarak ölçülmüşken, oğul otu bitkisi ekstraktıyla zenginleşmesi neticesinde ise litre başına 66.67 ile 96.67 mg arasında bir değişim gözlenmiştir.

Tablo 4.7: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytinyağının TFM miktarları*.

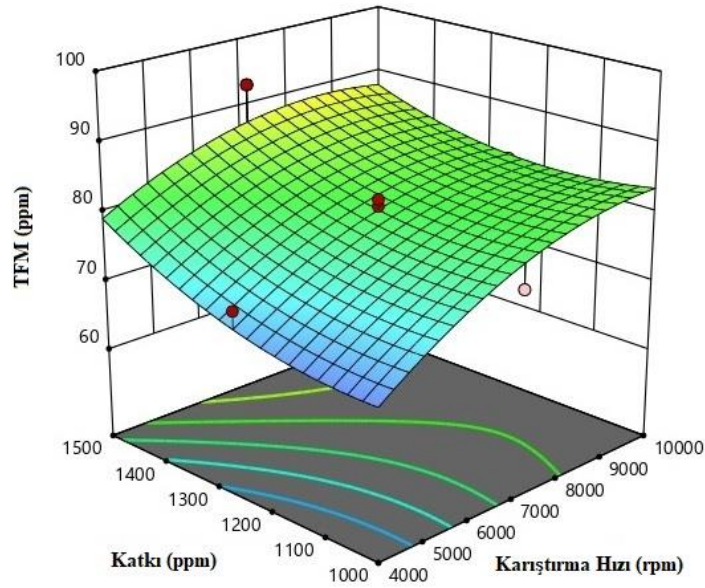
Deney no	X ₁ (rpm)	X ₂ (s)	X ₃ (ppm)	TFM (ppm)
1	10000	30	1500	96.67±0.01
2	4000	30	1500	87.33±0.03
3	7000	30	1250	93.33±0.08
4	4000	30	1000	83.33±0.01
5	7000	60	1500	93.33±0.03
6	7000	60	1000	76.00±0.03
7	10000	90	1500	90.67±0.08
8	7000	90	1250	82.67±0.04
9	7000	60	1250	81.00±0.05
10	10000	30	1000	94.67±0.08
11	4000	60	1250	73.33±0.01
12	7000	60	1250	80.67±0.01
13	10000	60	1250	82.67±0.03

Tablo 4.7 (devam)

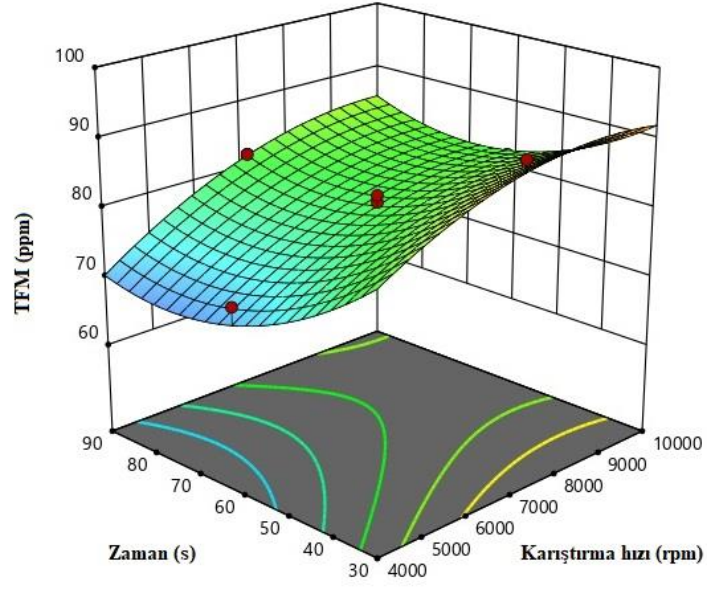
14	7000	60	1250	82.00±0.02
15	7000	60	1250	80.00±0.01
16	4000	90	1500	80.67±0.04
17	10000	90	1000	88.00±0.01
18	7000	60	1250	78.67±0.03
19	4000	90	1000	66.67±0.08
20	7000	60	1250	78.00±0.02

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

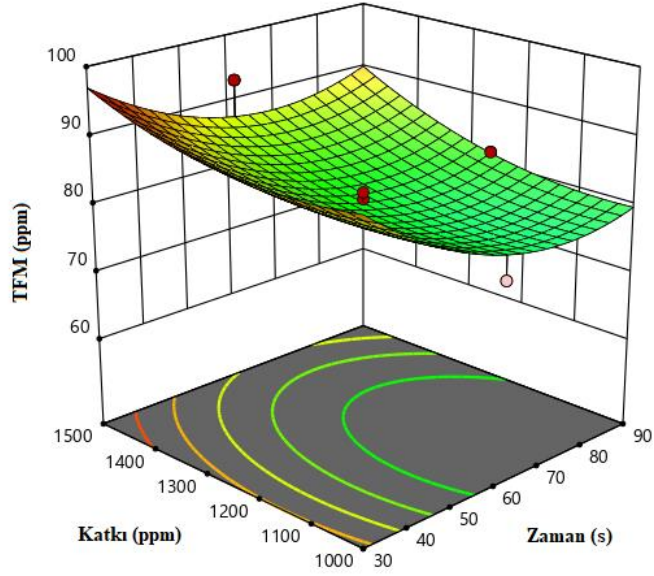
Şekil 4.14-4.16, HDE prosesinin bağımsız değişkenlerinin tek tek etkilerini ve birbirlerine olan etkileşimlerini üç boyutlu olarak göstermektedir.



Şekil 4.14: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=60 s).



Şekil 4.15: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1250 ppm).



Şekil 4.16: Zeytinyağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=7000 rpm).

Beklenildiği üzere yağdaki TFM zenginleşmesi ilave edilen ekstrakt miktarı ile artış göstermiştir (Şekil 4.14). Şekil 4.15'ten karıştırma hızının artmasıyla beraber yağ içerisinde meydana gelen TFM zenginleşme miktarının arttığı gözlenmektedir. Yani hedef komponentlerin yağ içerisine difüzyonu karıştırma ile beraber artma eğilimi göstermiştir. Söz konusu bulgu, karıştırmanın ek bir enerji desteği ile ekstraksiyon lehine olmasının yanısıra bir de homojenliğe katkıda bulunmasıyla etkinliğin artmasında etkili olması şeklinde de yorumlanabilir. Diğer taraftan karıştırma süresinin yağın fenolik madde açısından zenginleştirilmesinde olumsuz bir etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.16). Bu durum, uzun karıştırma sürelerinin ısınmaya sebebiyet vermesi ile açıklanabilir. Elde edilen bu bulgu, oğul otunun sahip olduğu fenolik bileşiklerin ısıya duyarlı olmadığına da bir sonucu olabilir.

4.2.2.1. YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu

Üç faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan modelleme çalışmasında, zeytinyağının HDE ile TFM açısından zenginleşmesinde oluşturulan eşitlik aşağıda ifade edildiği gibi hesaplanmıştır:

$$TFM = 80.46 + 6.10X_1 - 4.70X_2 + 3.90X_3 + 1.50X_1X_2 - 1.75X_1X_3 + 1.25X_2X_3 - 3.91X_1^2 + 6.09X_2^2 + 3.09X_3^2 \quad (4.4)$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve her bir parametrenin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayısı ANOVA tabloları ile ortaya konulmuştur. Oğul otu ekstraktı ile zenginleşen zeytinyağı için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.8' de görülmektedir.

Tablo 4.8: HDE sistemi ile zeytinyağının oğul otu ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Bitkisel Yağ	Ekstrakt	Cevap	R ²	R ² _{adj}	Etkin parametreler (p<0.05)
Zeytinyağı	Oğul otu	TFM	0.9143	0.8372	Model denklem, X ₁ , X ₂ , X ₃ ve X ₂ ²

Tablo 4.8' den de görüldüğü gibi model denklem istatistiksel olarak (p<0.05) önemli bulunmuştur. Bu durum R² değeri ile de doğrulanmaktadır. Daha net bir şekilde ifade

edilecek olursa bağımlı değişkendeki (TFM) toplam varyasyonun (değişimin) yaklaşık olarak %91'i, bağımlı ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyle (Eşitlik 4.4) ile açıklanabilir. Yağın HDE ile zenginleştirilmesinde her üç parametrenin de sistemi etkileyen önemli parametreler olduğu görülmektedir. Ayrıca, karıştırma süresinin ikinci dereceden kuvveti de etkin bulunmuştur.

MKDT kullanılarak yapılan optimizasyon sonucu elde edilen koşullar şu şekilde bulunmuştur:

9448 rpm hızda, 31 s süre ve 1498.22 ppm ekstrakt ile karıştırma yapıldığında elde edilen en yüksek fenolik madde miktarı bir litre yağ başına 96.178 mg'dır.

4.2.3. Ayçiçek Yağı – Zeytin Yaprağı

Tablo 4.9, zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş olan ayçiçek yağındaki fenolik madde miktarına, seçilen bağımsız değişkenlerin etkilerini ve 3 faktör/3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı göstermektedir.

Katkısız ayçiçek yağının toplam fenolik madde miktarı bir litre yağ başına 21 mg olarak ölçülmüştür. Fenolik maddelerce zengin zeytin yaprağı ekstraktı ile katkı sonucu 72 ile 150 ppm arasında bir zenginleşme gözlenmiştir.

Tablo 4.9: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM miktarları*.

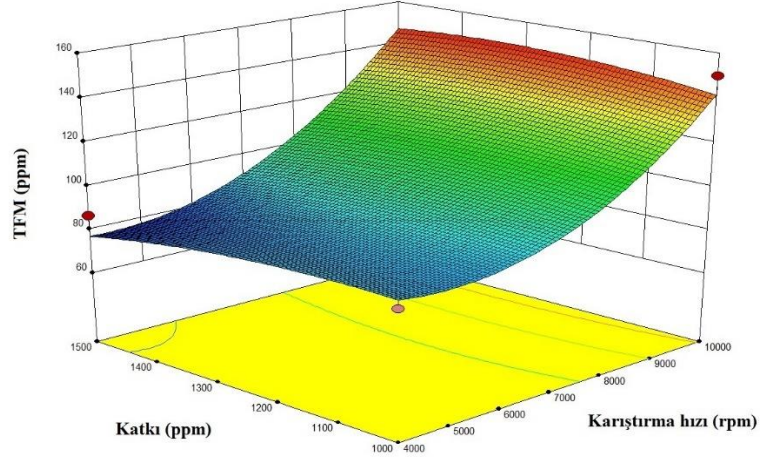
Deney no	X ₁ (rpm)	X ₂ (s)	X ₃ (ppm)	TFM (ppm)
1	10000	30	1500	139.00±0.99
2	4000	30	1500	87.16±0.11
3	7000	30	1250	92.00±0.99
4	4000	30	1000	84.14±0.05
5	7000	60	1500	88.01±0.01
6	7000	60	1000	85.11±1.00
7	10000	90	1500	124.41±1.99

Tablo 4.9 (devam)

9	7000	60	1250	101.01±0.14
10	10000	30	1000	150.44±2.89
11	4000	60	1250	80.01±1.11
12	7000	60	1250	90.02±0.90
13	10000	60	1250	139.25±0.95
14	7000	60	1250	91.56±0.05
15	7000	60	1250	90.85±0.12
16	4000	90	1500	72.00±0.78
17	10000	90	1000	105.54±0.77
18	7000	60	1250	100.78±0.45
19	4000	90	1000	99.58±0.14
20	7000	60	1250	101.87±1.88

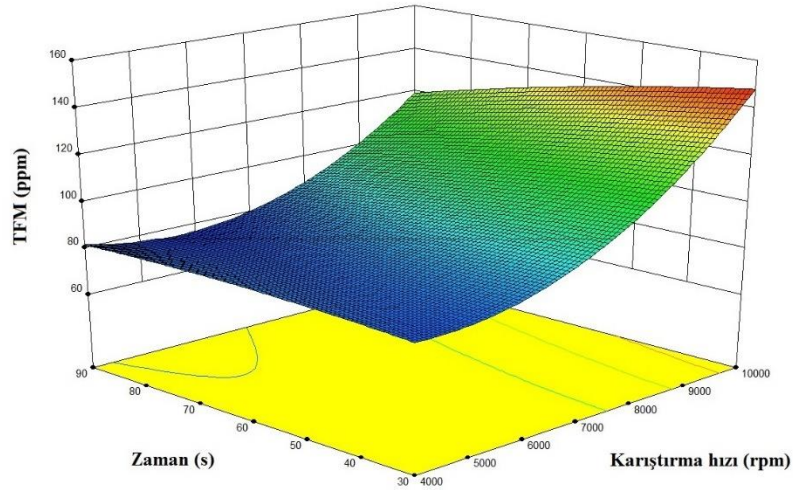
*Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19; işletme parametrelerinin etkilerini ve aynı zamanda parametrelerin etkileşimlerini görsel olarak ifade etmektedir.



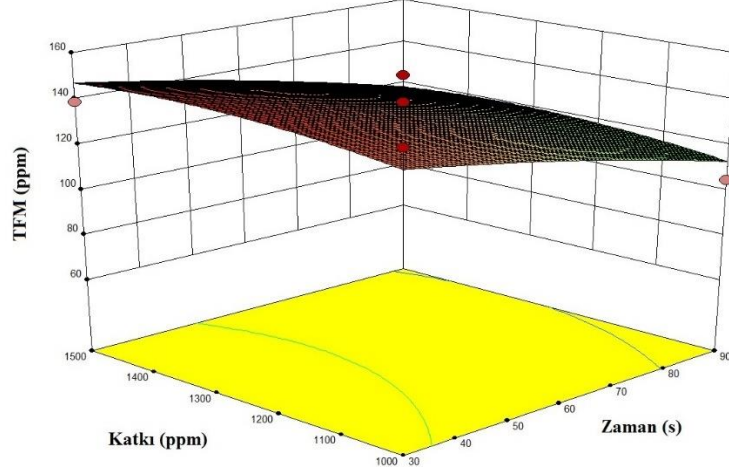
Şekil 4.17: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=30 s).

Şekil 4.17, homojenizatörün karıştırma hızının artması ile zenginleşme performansının keskin bir şekilde arttığını göstermektedir. Bu durum daha önce de bahsedildiği gibi, karıştırma hızının verdiği ekstra enerji ve homojenizatörün çok yüksek devirlerde karışarak sistem içerisinde bir homojenizasyon sağlaması ile yorumlanabilir (Şahin ve diğ., 2017).



Şekil 4.18: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1435 ppm).

Şekil 4.18’de zamanın çok etkin bir proses değişkeni olmadığı görülmektedir. Karıştırma hızının yine sistem üzerinde en etkin parametre olduğu kanıtlanmaktadır.



Şekil 4.19: Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=10000 rpm).

Karıştırma süresinin artması ile çok belirgin olmasa bile fenolik madde açısından zenginleşmede bir azalma olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.19). Bu durum da uzun karıştırma sürelerinin ısınmaya yol açması ve ekstrakt içerisindeki biyoaktif bileşenlerin ısıya duyarlı olmalarından ötürü degrade olmasının bir sonucu olabilmektedir.

4.2.3.1. YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu

Üç faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan modelleme çalışmasında, ayçiçek yağının HDE ile zeytin yaprağı ekstraktı katkısıyla TFM açısından zenginleşmesinde oluşturulan eşitlik aşağıda ifade edildiği gibi hesaplanmıştır:

$$\begin{aligned}
 TFM = & 93.48 + 23.50X_1 - 6.70X_2 - 1.30X_3 - 7.501X_1X_2 + 4X_1X_3 + 1.86 \times 10^{-14}X_2X_3 + \\
 & 19.09X_1^2 - 1.91X_2^2 - 3.91X_3^2
 \end{aligned}
 \quad (4.5)$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve her bir parametrenin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayısı ANOVA tabloları ile ortaya konulmuştur. Zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleşen ayçiçek yağı için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.10' da görülmektedir.

Tablo 4.10: HDE sistemi ile zeytinyağının zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Bitkisel Yağ	Ekstrakt	Cevap	R^2	R^2_{adj}	Etkin parametreler ($p<0.05$)
Ayçiçek Yağı	Zeytin Yaprağı	TFM	0.9041	0.8177	Model denklem, X_1 , X_2 , X_1X_2 ve X_1^2

Tablo 4.10'a bakıldığında model denklem başta olmak üzere karıştırma hızı, süresi ve ikisinin etkileşimi ile hızın karesinin yağın HDE ile zenginleşmesinde önemli parametreler olduğu görülmektedir. Ayrıca, model denklemin uyumluluğu, sonuçların toplam değişiminin %90'ı cevap ve proses parametreleri arasında oluşturulan ilişki Eşitlik 4.5 ile açıklanabilmesiyle de kanıtlanabilir.

Ayçiçek yağının zeytin yaprağı ekstraktında bulunan polifenollerce zenginleştirilmesinde MKDT kullanılarak yapılan optimizasyon sonucu elde edilen koşullar şu şekilde bulunmuştur:

Bir litre yağa 1336 mg zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilerek 10000 rpm hızda, 30 saniye karıştırılması ile elde edilen en yüksek fenolik madde miktarı 148.81 ppm olarak hesaplanmıştır.

4.2.4. Ayçiçek Yağı–Oğul Otu

Tablo 4.11, oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş olan ayçiçek yağındaki fenolik madde miktarına, seçilen bağımsız değişkenlerin etkilerini ve 3 faktör/3 seviyeli MKDT kullanılarak elde edilen deneysel tasarımı göstermektedir.

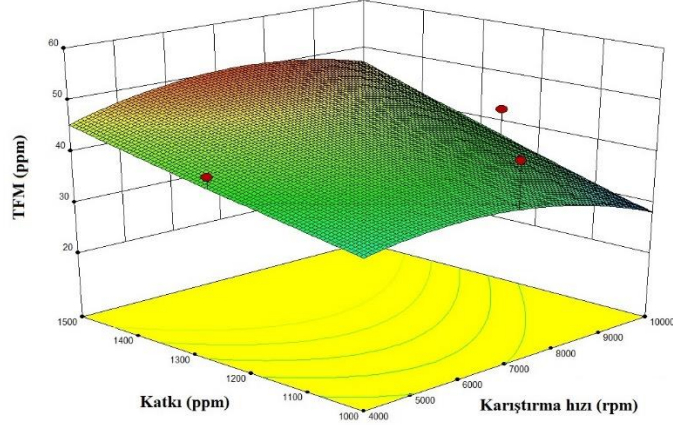
Katkısız ayçiçek yağının toplam fenolik madde miktarı bir litre yağ başına 21 mg olarak ölçülmüştür. Fenolik maddelerce zengin oğul otu ekstraktı ile katkı sonucu 25 ile 53 ppm arasında bir zenginleşme gözlenmiştir.

Tablo 4.11: YYY kullanılarak MKDT ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM miktarları*.

Deney	X ₁	X ₂	X ₃	TFM
no	(rpm)	(s)	(ppm)	(ppm)
1	10000	30	1500	53.00±0.99
2	4000	30	1500	50.05±0.05
3	7000	30	1250	46.56±0.11
4	4000	30	1000	36.44±1.00
5	7000	60	1500	49.05±0.05
6	7000	60	1000	45.41±0.01
7	10000	90	1500	42.12±0.11
8	7000	90	1250	48.02±1.00
9	7000	60	1250	41.10±0.55
10	10000	30	1000	27.05±0.05
11	4000	60	1250	42.12±1.89
12	7000	60	1250	40.00±1.99
13	10000	60	1250	42.67±0.02
14	7000	60	1250	40.55±0.02
15	7000	60	1250	42.41±0.01
16	4000	90	1500	43.23±0.03
17	10000	90	1000	24.67±0.01
18	7000	60	1250	40.05±0.99
19	4000	90	1000	30.36±1.00
20	7000	60	1250	40.44±0.05

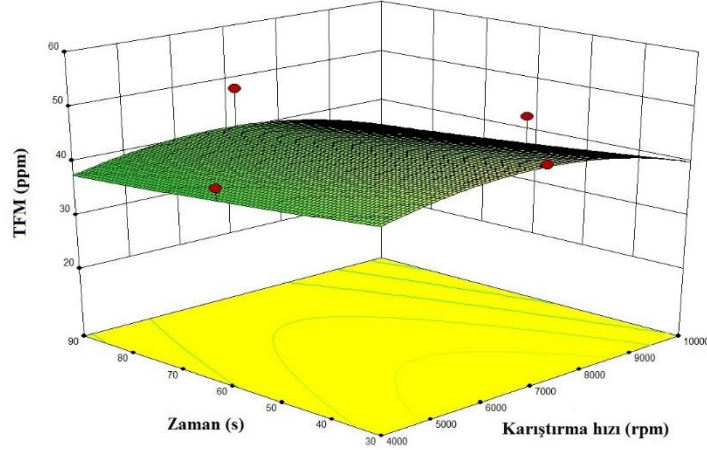
*Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Şekil 4.20 ile 4.22, işletme parametrelerinin etkilerini ve aynı zamanda parametrelerin birbiri ile etkileşimini gösteren üç boyutlu grafikleri temsil etmektedir.



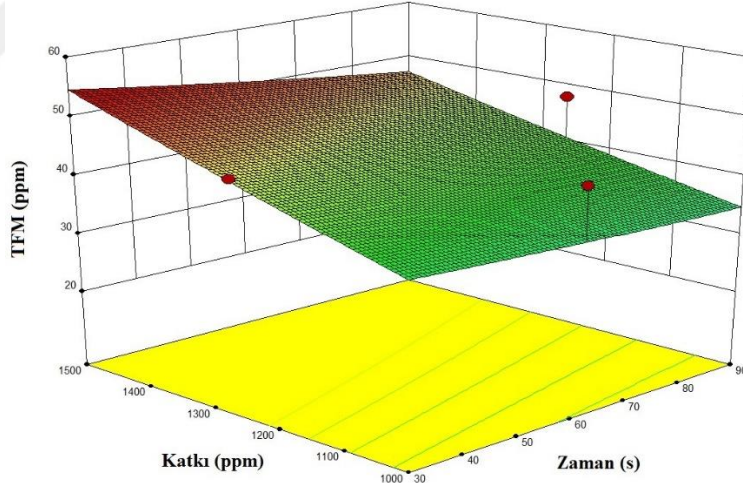
Şekil 4.20: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma hızına bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma süresi=60 s).

Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktı kullanılarak zenginleştirilmesinde ilave edilen katkı maddesi miktarının çok önemli bir parametre olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.20). Yine beklenildiği üzere, yağa ilave edilen oğul otu ekstraktı miktarı arttıkça, fenolik madde açısından zenginleşme de artmıştır.



Şekil 4.21: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak karıştırma hızının yağdaki TFM miktarına etkisi (Katkı maddesi=1250 ppm).

Şekil 4.21 incelendiğinde, karıştırma hızının zenginleşme verimini önce arttırdığı, belirli bir değerden (7000 rpm) sonra ise azalttığı görülmektedir. Karıştırma süresi çok keskin olmamakla beraber HDE verimini düşürmüştür.



Şekil 4.22: Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktıyla HDE ile zenginleştirilmesinde, karıştırma süresine bağlı olarak ilave edilen ekstrakt miktarının yağdaki TFM miktarına etkisi (Karıştırma hızı=7000 rpm).

Şekil 4.22’de yine az önce bahsedildiği şekilde katkı maddesi ve süre parametrelerinin etkilerini göstermektedir. Katkı maddesinin artması ile yağın TFM açısından zenginleşmesi artmış, zaman ise çok etkili olmamıştır.

4.2.4.1. YYY ile Hesaplanan Modelin Uyumluluğu

Üç faktör ve üç seviyeli MKDT kullanılarak yapılan modelleme çalışmasında, ayçiçek yağının HDE ile oğul otu ekstraktı katkısıyla TFM açısından zenginleşmesinde oluşturulan eşitlik aşağıda ifade edildiği gibi hesaplanmıştır:

$$TFM = 42.99 - 1.17X_1 - 2.43X_2 + 7.43X_3 - 0.042X_1X_2 + 2.04X_1X_3 - 1.21X_2X_3 - 4.39X_1^2 + 0.27X_2^2 + 0.27X_3^2 \quad (4.6)$$

İncelenen parametrelerin etkinlik derecesi ve her bir parametrenin birbiri ile etkileşimi ve korelasyon katsayısı ANOVA tabloları ile ortaya konulmuştur. Oğul otu bitkisi ekstraktı ile zenginleşen ayçiçek yağı için belirlenen istatistiksel değerlendirmelerin özeti Tablo 4.12' de görülmektedir.

Tablo 4.12: HDE sistemi ile ayçiçek yağının oğul otu kullanılarak zenginleştirilmesinde yağ içerisindeki cevap değeri için istatistiksel verilerin özeti.

Bitkisel Yağ	Ekstrakt	Cevap	R ²	R ² _{adj}	Etkin parametreler (p<0.05)
Ayçiçek Yağı	Oğul Otu	TFM	0.7526	0.5300	Model denklem ve X ₃

Ayçiçek yağının oğul otu içerisindeki polifenoller ile zenginleştirilmesinde model denklem istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 4.12). R² ve R²_{adj} değerleri incelendiğinde deneysel sonuçların model denklem ile uyumlu olduğu söylenebilir. Parametrelerin istatistiksel olarak etkinliği incelendiğinde, katkı maddesi miktarının söz konusu prosesi etkileyen tek önemli değişken olduğu görülmüştür.

Ayçiçek yağının oğul otu ekstraktında bulunan polifenollerce zenginleştirilmesinde MKDT kullanılarak yapılan optimizasyon sonucu elde edilen koşullar şu şekilde bulunmuştur:

Bir litre yağa 1478 mg oğul otu ekstraktı ilave edilerek 6660 rpm hızda, 33 saniye karıştırılması ile elde edilen en yüksek fenolik madde miktarı 53.35 ppm olarak hesaplanmıştır.

4.3. OPTİMUM ŞARTLARDAKİ METODUN ETKİNLİĞİ

Bu tez çalışmasında doğal antioksidan katkı maddesi kaynağı olarak seçilmiş olan zeytin yaprağı ve oğul otu bitkileri öncelikle UDE ile ekstrakte edilmiş, ardından bitkisel yağ örneği olarak seçilmiş zeytinyağı ve ayçiçek yağı söz konusu ekstraktlar ile HDE metodu kullanılarak zenginleştirilmiştir. Bu çalışmaların her biri YYY ile modellenmiştir.

Tablo 4.13, UDE ile elde edilen bitkisel ekstraktların biyoaktivite içeriklerini özetlemektedir. Doğal antioksidan kaynağı olarak kullandığımız her iki bitki kıyaslandığında, zeytin yaprağının antioksidanlarca zengin bir kaynak olduğunu söyleyebiliriz. Zeytin yaprağının, oğul otunun sahip olduğu fenolik madde miktarının neredeyse 20 katına sahip bir doğal kaynak olduğu içeriğindeki biyoaktif maddelerin antioksidan aktivitelerinin üç farklı yöntemle ölçülmesi ile de kanıtlanmaktadır (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: UDE yönteminde optimum koşullarda elde edilen ekstraktların farklı parametre değerlerinin karşılaştırılması*.

Bitkisel materyal	TFM (mg-GAE/g-kuru yaprak)	CUPRAC (mg-TEAC/g-kuru yaprak)	ABTS (mg-TEAC/g-kuru yaprak)	DPPH (mg-TEAC/g-kuru yaprak)
Zeytin yaprağı	550.12±9.13	114.17±5.85	36.37±0.55	3.60±0.01
Oğul otu	30.12±0.00	5.70±0.06	1.58±0.00	0.20±0.00

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

HDE metodu ile optimum koşullar bulunduktan sonra gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar ile hiçbir ekstrakt ilave etmediğimiz yağların kalite parametreleri de kıyaslanmıştır (Tablo 4.14 ve 4.15). Zeytin ve ayçiçek yağlarının zenginleştirme çalışmaları yapıldıktan sonra ve raf ömürleri ölçülürken kontrol olarak da her seferinde saf yağlar beraberinde ölçülmüştür. Bu durumda son derece güvenilir karşılaştırmalar yapılmıştır. Zira katkısız bitkisel yağların hele de hiçbir katkı yapılmamış olanların stabilitelerinin tez çalışması süresince sabit kalması beklenilemezdi.

Her iki bitkisel yağ türünün zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleşmesi sonucu kalite parametrelerinde gözlenen değişim Tablo 4.14’te verilmiştir.

Tablo 4.14: Bitkisel yağların optimum HDE koşullarında, zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleşmesinden önce ve sonraki stabilite değerlerinin karşılaştırılması*.

		IT (saat)	TFM (ppm)	ABTS (%)	β -Karoten (mg- β - karoten/kg- yağ)	Klorofil (mg- feofitin/kg- yağ)	PD (mEq-O ₂ /kg- yağ)
Zeytinyağı	Katkısız	3.41±0.17	132± 3.19	13.45±1.15	2.78±0.07	T.E.**	9.09±0.40
	Zeytin yaprağı	4.98±0.20	240± 4.29	34.09±1.05	7.89±0.52	28.17±0.22	7.07±0.54
Ayçiçek yağı	Katkısız	1.48±0.06	21.33	1.91±0.05	T.E.	T.E.	9.11±0.00
	Zeytin yaprağı	1.94±0.13	146.45±0.03	20.93±0.11	2.38±0.01	67.26±0.01	5.74±0.39

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

** Tespit edilmedi.

Tablo 4.15 ise yağların oğul otu ekstraktı ile müdahale edildikten sonra kalitesinde meydana gelen iyileşmeyi göstermektedir.

Tablo 4.15: Bitkisel yağların optimum HDE koşullarında, oğul otu ekstraktı ile zenginleşmesinden önce ve sonraki stabilite değerlerinin karşılaştırılması*.

		IT (saat)	TFM (ppm)	ABTS (%)	β -Karoten (mg- β - karoten/kg- yağ)	Klorofil (mg-feofitin/kg- yağ)	PD (mEq- O ₂ /kg-yağ)
Zeytinyağı	Katkısız	3.41±0.17	132± 3.19	13.45±1.15	2.78±0.07	T.E.**	9.09±0.40
	Oğul otu	2.78±0.09	94.06± 1.99	9.77±0.15	T.E.	T.E.	11.11±0.47
Ayçiçek yağı	Katkısız	0.71±0.01	21.33	1.91±0.05	T.E.	T.E.	9.11±0.00
	Oğul otu	0.76±0.03	56	9.19±0.10	0.30±0.01	10.40±0.00	9.91±0.43

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

** Tespit edilmedi.

Elde edilen bulgular, bu konuda daha önce yapılmış benzer sonuçlarla da karşılaştırılmıştır. *Achat ve arkadaşları* (2012) zeytinyağına UDE ve konvansiyonel olmak üzere iki yöntem ile 150000 ppm zeytin yaprağı ilave etmişlerdir. Yağın her iki yöntemle müdahalesi sonucu sırasıyla 50.7 ve 111 ppm oleuropein zenginleşmesi elde edilmiştir. *Salta ve arkadaşları* (2007) 1680 ppm oleuropein içeren zeytin yaprağı ekstraktını ayçiçek yağına uygulamışlar ve yağda 74.9 ppm'lik oleuropein zenginleşmesi gözlemişlerdir. Tez kapsamında elde edilen değerler literatürden farklı olabilmektedir. Zira kullanılan zeytin yaprağı uygulanan ekstraksiyon metodu, tür, hasat zamanı gibi parametrelerdeki farklılıklardan ötürü farklı miktarlarda oleuropein ve diğer fenolik bileşenlere sahip olabilmektedir. Diğer taraftan, FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) ve WHO (World Health Organisation) gibi otoritelerin gıda katkı maddelerinin uygulama miktarları üzerinde kısıtlamaları dikkate alınmış ve bu çalışmada 1500 ppm ekstrakt seviyesinin üzerine çıkılmamıştır. Mesela, *Japón-Luján ve arkadaşları* ayçiçek yağına 100000 ppm zeytin yaprağı uygulamış ve yağın litresi başına 10.21 mg oleuropein zenginleşmesi elde etmişlerdir (Japón-Luján ve diğ., 2008).

İndüksiyon zamanı, yağın oksidasyona karşı dayanımını gösteren bir kriterdir (Jannat ve diğ., 2010). EK 1. – EK 6. katkısız ve zenginleştirilmiş yağların Ransimat metodu ile ölçülmüş farklı sıcaklıklardaki indüksiyon sürelerini göstermektedir. Daha önce de belirtildiği gibi yağlara ilave edilen katkı maddesi miktarı arttıkça yağın okidasyona karşı stabilitesi artmıştır.

Bununla birlikte, yasal gıda ve sağlık komitelerinin gıda katkı maddeleri üzerindeki sınırlamaları dikkate alınmalıdır. Aksi takdirde, katkı ne kadar fazla olursa, indüksiyon süresi o kadar uzun olur ve yağ oksidasyona karşı daha dirençli hale gelir. Ayrıca, yağların *IT*'lerindeki farklılıklar, uygulanan katkı maddesi ve miktarı dışında yağın türüne ve kalitesine de atfedilebilmektedir (De Leonardis ve diğ., 2007).

4.4. HASAT DÖNEMİNİN YAĞIN KALİTESİNE ETKİSİ

Bitkisel kaynaklardaki fenolik madde profili (dolayısıyla da antioksidan aktiviteleri) yaprağın bitkinin olgunluk derecesi, coğrafi orijini, türü, ağaç üzerindeki dallanmaların oranı, nem içeriği, toprak ile kirlenme derecesi ve ekstraksiyon için uygulanan endüstriyel prosesler gibi pek çok tarımsal ve teknolojik faktörden etkilenmektedir. Bitkinin hasat edildiği zaman da verimi etkileyen çok önemli bir faktördür. Bu çalışmada da doğal antioksidan kaynağı olarak uyguladığımız zeytin yaprağı Kasım ve Temmuz aylarında olmak üzere iki farklı mevsimde toplanmıştır. Dönemsel olarak toplanmış zeytin yapraklarının fenolik madde profili HPLC analizi ile incelenmiş ve başlıca bileşenleri Tablo 4.16'da sunulmuştur. Zeytinin yağ elde edilmek üzere hasatlandığı dönem olan Kasım ayında toplanan yaprakların fenolik maddeleri yaz aylarında toplanan örneklerin yaklaşık olarak iki katı olduğu görülmektedir. Bu durum hasat dönemi atılacak olan yaprakların değerlendirilmesi açısından da önem arz etmektedir.

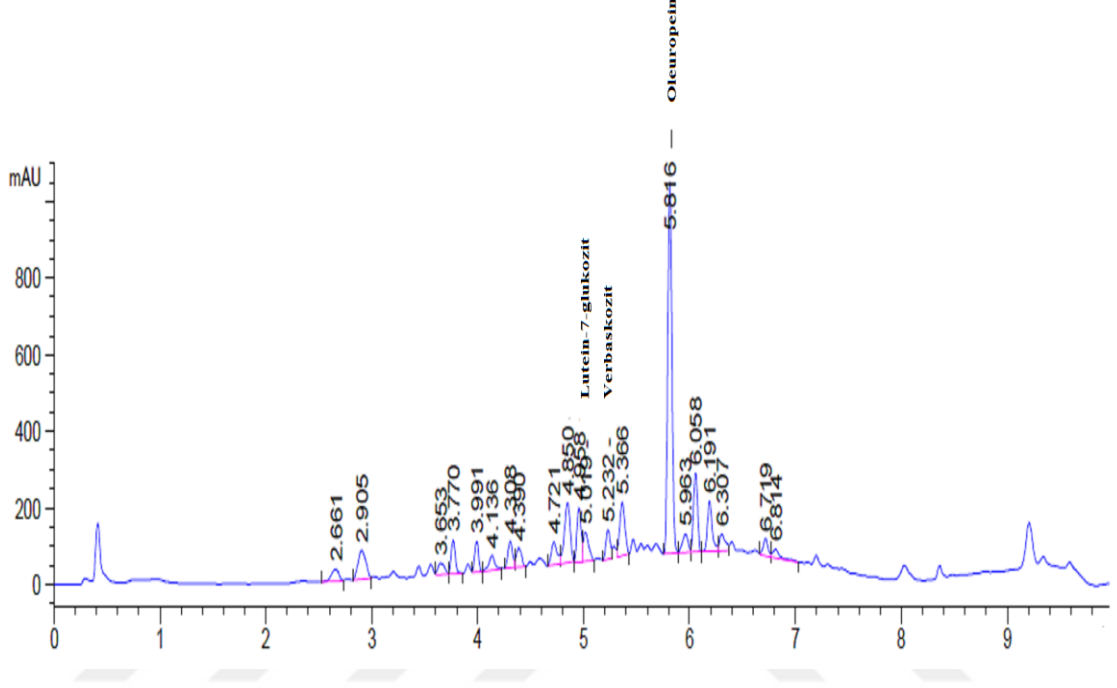
Tablo 4.16: Farklı dönemlerde toplanmış olan zeytin yapraklarının fenolik bileşenlerinin karşılaştırılması*.

Hasat dönemi	Oleuropein (ppm)	Verbaskozit (ppm)	Lutein-7-glukozit (ppm)
Kış	271.66±10.11	31.85±1.10	17.30±0.80
Yaz	133.54±5.30	18.62±1.01	13.13±0.66

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Kış döneminde toplanan örneklerin optimum UDE koşullarında elde edilen ekstraktına ait kromatogram (Şekil 4.23), zeytin yaprağının toplam fenolik ve antioksidan içeriğine en büyük katkıda bulunan, temel fenolik maddesinin oleuropein olduğunu göstermektedir. Diğer iki

bileşenin ekstrakt içerisindeki seviyesinin oleuropine oranla ihmal edilecek kadar az olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23: Zeytin yaprağı ekstraktının içeriğindeki bileşenlere dair örnek HPLC kromatogramına ait gösterim.

Tablo 4.16'dan elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, katkı maddesi olarak kullanılacak olan yaprakların kış aylarında toplanacak yapraklardan elde edilmesi gerekmektedir. Bu durumu yağın oksidatif stabilitesini ölçerek teyit etmek maksadı ile yapılan çalışmanın sonuçları da Tablo 4.17'de verilmiştir.

Tablo 4.17: Farklı dönemlerde toplanmış olan zeytin yaprağı ekstraktları ile zenginleştirilmiş olan zeytinyağlarının oksidatif stabilitelerinin karşılaştırılması*.

Zenginleştirmede kullanılan yaprak dönemi	IT (saat)	Artış (%)
Kış	4.98±0.11	46
Yaz	3.62±0.09	6

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Kış aylarında toplanan yaprak ekstraktı stabiliteyi %46 oranında artırırken diğerindeki artış %6 civarında kalmıştır. Bu sonuç bize doğal katkı maddeleri olan fenolik componentlerin zeytinyağının raf ömrünü uzatmada ne kadar başarılı olduğunu kanıtlamaktadır.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez kapsamında gerçekleştirmiş olan çalışmalar zeytin yaprağı ve oğul otu bitkilerinden doğal ekstrakt elde etmek ve bitkisel yağları (zeytinyağı ve ayçiçek yağı) elde edilen ekstraktlar ile zenginleştirmek olmak üzere iki aşamada incelenmiştir. Bu kapsamda kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarından ve oğul otundan UDE yöntemi ile ekstrakt elde edilmiş ve içeriklerindeki polifenol seviyeleri belirlenmiştir. Diğer taraftan ekstrakt örneklerinin tümüne antioksidan aktivite tayin yöntemleri uygulanmamış, optimum koşullarda elde edilen örneklere uygulanmıştır.

YYY ile hesaplanan optimum koşullarda ekstrakt elde edildikten sonra saflaştırılıp kurutulmuş ve bitkisel yağlara difüzyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstrakt oda sıcaklığına soğutulduktan sonra döner bir buharlaştırıcı ile çözücüsü ayrılmış ardından bir vakum etüvde kurutularak toz halinde ekstraktlar elde edilmiştir. Bunun için kurutulmuş ekstrakt yağ içerisinde HDE metodu ile kısmen çözüldürülmüştür (katı-sıvı ekstraksiyonu). Çalışmanın bu kısmında da TFM analizine ilave olarak zenginleşmiş yağın antioksidan kapasitesi sadece ABTS yöntemi ile analiz edilmiştir. Diğer iki antioksidan kapasite (CUPRAC ve DPPH) tayin yöntemlerinde sonuçlar arasında bir tutarlılık söz konusu olmadığından söz konusu tayin yöntemleri yağ analizlerine uygulanamamıştır.

Polifenollerce zenginleştirilmiş olan yağın kalitesindeki değişim çeşitli parametrelere (fenolik madde miktarı, antioksidan kapasite, peroksit değeri, klorofil ve karoten miktarları ve oksidatif stabilite) dayandırılarak yorumlanmıştır.

Tez kapsamında elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde:

- Doğal antioksidan kaynakları kıyaslandığında, zeytin yaprağı çok önemli bir katkı maddesi olarak bulunmuştur.
- Zeytin yapraklarındaki fenolik madde seviyesinin, sıcak yaz günlerinde azalma eğilimi gösterdiği gözlenmiştir. Dolayısıyla, ekstraktları yağlara uygularken hasat zamanı için en doğru mevsimi seçerken dikkatli olunmalıdır.

- Zeytin yaprağı ve oğul otu ekstraktlarının HDE yöntemi ile ayrı ayrı zenginleşme çalışmaları değerlendirildiğinde yağın raf ömrü hakkında bize ipuçları veren kriterlerde önemli derecede iyileşmeler elde edilmiştir.
- Zeytinyağının zeytin yaprağı katkı maddesi ile zenginleşmesinde oksidatif stabilitede yaklaşık olarak %46 oranında bir artış elde edilmiştir. Fenolik madde miktarı yaklaşık 2 katına çıkmıştır. Ağırlıkça %0.14 oranında bir doğal antioksidan katkısı antioksidan kapasite ve karoteni yaklaşık olarak 3 katına çıkarmıştır. Yağ klorofil bakımından da zenginleşmiştir. Peroksit değeri de beklenildiği üzere katkısız haline göre azalmıştır ($\approx$ %22).
- Zeytinyağının oğul otu ile müdahalesi zenginleşme açısından hiçbir olumlu katkı göstermemiştir. Oğul otu ekstraktı yağın fenolik madde seviyesini düşürerek ve bunun neticesinde de yağın oksidasyona karşı direncini azaltarak kaatesine olumsuz bir katkı yapmıştır. Ayrıca, yağın mevcut antioksidan aktivitesini de düşürmüştür. Karoten ve klorofil açısından da bir zenginleşme tespit edilmemiştir. Beklenildiği üzere, yağın peroksit değeri de yükselmiştir.
- Ayçiçek yağının oksidatif stabilitesinde yaklaşık olarak %31 oranında bir artış elde edilmiştir (zeytin yaprağı katkısı ile). TFM miktarı yaklaşık 7, antioksidan aktivitesi ise 10 katına çıkmıştır.
- Söz konusu yağa oğul otu ekstraktı kullanıldığında oksidatif stabilite %7 oranında iyileşmiştir. Katkısız yağ ile kıyaslandığında oğul otu ekstresi ile zenginleştirilmiş olan ayçiçek yağının fenolik madde seviyesi yaklaşık olarak 2.5 katına, antioksidan kapasitesi ise 5 katına çıkmıştır.
- Diğer taraftan, deneysel sonuçlara YYY ile bir modelleme uygulaması da gerçekleştirilmiştir. Bu uygulama için;
 - ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış proses şartlarında zeytin yapraklarından UDE ile elde edilen ekstraktların TFM miktarlarının
 - ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış proses şartlarında oğul otu bitkisinden UDE ile elde edilen ekstraktların TFM miktarlarının
 - ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytin yağının TFM değerlerinin
 - ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş zeytin yağının TFM değerlerinin

- ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış HDE proses şartlarında zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM değerlerinin
- ✓ YYY yöntemi ile tasarlanmış HDE proses şartlarında oğul otu ekstraktı ile zenginleştirilmiş ayçiçek yağının TFM değerlerinin modellemesini yapmak üzere toplamda 6 adet MKDT kullanılarak modeller türetilmiş ve bu modellerin her biri ile elde edilen sonuçlar, deneysel sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, türetilen modeller çok küçük hata değerleri ($\approx \%2$) ile optimal koşulları öngörmek için yeterliliklerini kanıtlamışlardır.

Sonuç olarak, bitkisel yağların doğal antioksidanlar ile stabilitesinin iyileştirilmesi ve kalitesinin artırılması için basit, hızlı ve maliyeti düşük bir yöntem olan homojenizer destekli ekstraksiyon uygulanmıştır. Ayrıca, önerilen yöntemin koşulları YYY ile optimize edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, zeytin yaprağı ve oğul otu ekstraktlarının zeytinyağı ve ayçiçek yağı için doğal antioksidan kaynağı olarak ilave edilmesinin, radikal süpürme aktivitesinin ve oksidatif stabilitenin artmasına genel olarak katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, zeytin yaprağı ekstraktı, yağların kalite parametrelerine ilişkin olarak oğul otu ekstraktlarından daha etkilidir. Son olarak, ürünün raf ömrü söz konusu olduğunda daha keskin bir yağ stabilizasyonu elde etmek için daha yüksek oranlarda bitkisel ekstrakt konsantrasyonu gereklidir.

KAYNAKLAR

- Achat, S., Tomao, V., Madani, K., et al, 2012, Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale, *Ultrason Sonochem*, 19, 777–786.
- Aluyor, E.O., Ori-Jesu, M., 2008, The use of antioxidants in vegetable oils – A review, *African Journal of Biotechnology*, 7 (25), 4836-4842.
- Anonim, 2017, T.C. Gümrük ve Tic Bakanlığı Koop. Gn. Md., 2016 Yılı Ayçiçeği Raporu, syf. 4.
- Anonim, 2017, T.C. Gümrük ve Tic Bakanlığı Koop. Gn. Md., 2016 Yılı Ayçiçeği Raporu, syf. 4.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S. E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. *Microchim Acta*, 160, 413–419.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., Gutiérrez, F., 1999, Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150–4155
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Ballus, C.A., Meinhart, A.D., de Souza Campos, F.A., et al, 2014, A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil, *Food Research International*, 62, 74–83.
- Baysal, A., 2005, *Slurry Tekniği İle Eser Elementlerin Zenginleştirilmesi Ve Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi İle Tayini*, Yüksek Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Bilgin, M., Şahin, S., 2013, Effects of Geographical Origin and Extraction Methods on Total Phenolic Yield of Olive Tree (*Olea Europaea*) Leaves, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 8-12
- Bilgin, M., Şahin, S., Dramur, U., Sevgili, L.M., 2013, Obtaining Scarlet Sage (*Salvia Coccinea*) Extract Through Homogenizer- And Ultrasound-Assisted Extraction Methods, *Chemical Engineerin Communications*, 200 (9), 1197-1209.

- Bodoira, R.M., Penci, M.C., Ribotta, P.D., Martínez, M.L., 2017, Chia (*Salvia hispanica* L.) oil stability: Study of the effect of natural antioxidants, *LWT - Food Science Technology*, 75, 107–113.
- Bogdanovic, A., Tadic, V., Arsic, I., Milovanovic, S., Petrovic, S., Skala, D., 2016, Supercritical and high pressure subcritical fluid extraction from Lemon balm (*Melissa officinalis* L., Lamiaceae), *The Journal of Supercritical Fluids*, 107, 234–242.
- Bozan, B., 2006, Kırmızı Üzüm Ekstrelerinin Lipid Peroksidasyonunu Önleyici Etkileri, *Anadolu Üniversitesi Bilim Ve Teknoloji Dergisi*, 7 (2), 337-341.
- Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., et al, 2014, Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry, *Food Chemistry*, 158, 392–400.
- Caruso, D., Berra, B., Giavarini, F., Cortesi, N., Fedeli E., and Galli, G., 1999, Effect of virgin olive oil phenolic compounds on in vitro oxidation of human low density lipoproteins, *Nutrition Metabolism Cardiovascular Diseases*, 9 (3), 102-107.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y., Wong, S.K., et al, 2009, Effects of different drying methods on the antioxidant properties of leaves and tea of ginger species, *Food Chemistry*, 113, 166–172.
- Chuang, M.H., Brunner, G., 2006, Concentration of minor components in crude palm oil, *The Journal of Supercritical Fluids*, 37, 151–156.
- Clodoveo, M.L., Camposeo, S., Gennaro, B., Pascuzzi, S., Roselli, L., 2014, In the ancient world, virgin olive oil was called “liquid gold” by Homer and “the great healer” by Hippocrates. Why has this mythic image been forgotten?, *Food Research International*, 62, 1062-1068.
- Coni, E., Benedetto, R., Pasquale, M., Masella, R., Modesti, D., Mattei, R., and Carlini, E.A., 2000, Protective effect of oleuropein, an olive oil biophenol, on low density lipoprotein oxidizability in rabbits, *Lipids*, 35 (1), 45-54.
- Cordell, G.A., 2000, Biodiversity and drug discovery — a symbiotic relationship, *Phytochemistry*, 55, 463–480.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Lembo, G., et al, 2007, Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater, *Food Chemistry*, 100, 998–1004.
- Duman, E., Türk Baydır, A., Duman, S., 2015, Ayçiçek Yağının Oksidasyon Kararlılığına Retinol Palmitat'ın Etkisinin Ransimat Metodu ile Tespiti, *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 8 (1), 33-38.
- Dziezak, J.D., 1986. *Antioxidants Food Technology*, 40 (9), 94-102.

- Eraslan, Z., 2017, *Zeytin Yaprağı Ekstrakt Kullanımının Biber Salçalarındaki Kalite Değişimi Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Farhoosh, R., 2007, The Effect of Operational Parameters of the Rancimat Method on the Determination of the Oxidative Stability Measures and Shelf-Life Prediction of Soybean Oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 205–209.
- Farhoosh, R., Niazmand, R., Rezaei, M., Sarabi, M., 2008, Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 587–592.
- Fernandez-Lopez, J., Zhi N., Aleson-Carbonell, L., Perez-Alvarez, J.A., Kuri, V., 2005, *Antioxidant and antibacterial activities of natural extract, application in beef meatballs*. Meat Sci., 69 (3), 371-380.)
- Franco, D., Pateiro, M., Amado, I.R., et al., 2016, Antioxidant ability of potato (*Solanum tuberosum*) peel extracts to inhibit soybean oil oxidation, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118 (12), 1891-1902.
- Frankel, E.N., 2012, *Woodhead Publishing Science, Technology And Nutrition*, 2nd ed., Woodhead Publishing Limited, Cambridge, ISBN: 978-09531949-8-8
- Georgiev, M.I., Weber, J., Maciuk, A., 2009, Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 809–823.
- Gros, R., Benovic, J.L., Tan, C.M., Feldman, R.D., 1997, G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension, *The Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2087-2093.
- Hasenhuettl G.L., Wan P.J., 1992, Temperature effects on the determination of oxidative stability with the metrohm rancimat, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 525–527.
- Hayouni, E.A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105, 1126–1134.
- Ho, W.H., Hsieh, S.J., 2001, Solid phase microextraction associated with microwave assisted extraction of organochlorine pesticides in medicinal plants, *Analytica Chimica Acta*, 428, 111–120.
- İlbay, Z., Şahin, S., Büyükkabasakal, K., 2014, A Novel Approach for Olive Leaf Extraction Through Ultrasound Technology: Response Surface Methodology Versus Artificial Neural Networks, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 31, 1661-1667

- Jaber, H., Ayadi, M., Makni, J., Rigane, G., Sayadi, S., M. Bouaziz, M., 2012, Stabilization of refined olive oil by enrichment with chlorophyll pigments extracted from Chemlali olive leaves, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1274–1283.
- Jannat, B., Oveisi, M., Sadeghi, N., et al, 2010, Shelf Life Prediction of Infant Formula by Using Rancidity Test, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 0, 269–273.
- Japón-Luján, R., Janeiro, P., Castro, M.D.L., 2008, Solid–Liquid Transfer of Biophenols from Olive Leaves for the Enrichment of Edible Oils by a Dynamic Ultrasound-Assisted Approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (16), 7231-7235.
- Karabina S., İflazoğlu, N., Karakuş, H., Kuvvetli, M., 2016, Mutfaktaki Kutsal Emanet, *Zeytin Bilimi*, 6 (2), 99-104.
- Karakaş, S., 2003, *Isırgan Otu Toprak Altı Ve Toprak Üstü Kısımlarından Isırgan Otu Ekstraktının Eldesi Ve Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kaya, Y., 2016, Ülkemizde Ayçiçeği Durumu ve Gelecekteki Yönü, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25, 322-327.
- Keskin, H. 1981. *Besin Kimyası*, T.C. İstanbul Üniversitesi Yayınları No:2888, Kimya Fak. No:47, Cilt: I, Fatih Yayınevi Matbaası (İstanbul)
- Kowalski, B., Ratusz, K., Kowalska, D., Bekas, W., 2004, Determination of the oxidative stability of vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat measurements, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106, 165–169.
- Läubli, M.W., Bruttel, P.A., 1986, Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the rancimat method, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63 (6), 792-795.
- Lebedev, A.V., Levitskaya, E.L., Tikhonova, E.V. and Ivanova, M.V., 2001, Antioxidant Properties, Autooxidation, and Mutagenic Activity of Echinchrome A Compared with Its Etherified Derivative, *Biochemistry (Moscow)*, 66 (8), 885-893.
- Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., et al, 2009, Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. *Bioresour Technology*, 100, 6107–6113.
- Llorent-Martínez, E.J., Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdova, M.L., Domínguez-Vidal, A., Ruiz-Medina, A., 2011, Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain, *Food Chemistry*, 127 (3), 1257-1262.
- Luaces, P., Perez, A.G., Garcia, J.M., Sanz, C., 2005, Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil, *Food Chemistry*, 90 (1-2), 169-174.
- Luque De Castro, M.D., Jimenez-Carmona, M.M., 2000, Where is Supercritical Fluid Extraction Going?, *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (4), 223-228.

- Malheiro R., Casal S., Teixeira H., Bento A., Pereira J.A., 2013, Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality, *Food Bioprocess Technology*, 6 (2), 509-521.
- Mei, W., Ismail, A., Esa, N., et al, 2014, The Effectiveness of Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) Extract in Stabilization of Sunflower Oil under Accelerated Conditions, *Antioxidants*, 3, 371–386.
- Mendil, D., Uluözölü, O.D., Tüzen, M., Soylak., M., 2009, Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (1-3), 724-728.
- Minguez-Mosquera, M., Gandul-Rojas, B., et al., 1990, Pigments Present in virgin olive oil, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (3), 192-196.
- Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R.F., Reis, C.P., Roberto, A., Rijo, P., 2016, Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants, *Measurement*, 89, 328-32
- Ostrowska-Ligeza, E., Bekas, W., Kowalska, D., et al, 2010, Kinetics of commercial olive oil oxidation: Dynamic differential scanning calorimetry and Rancimat studies, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 268–274.
- Özçelik, B., Evranuz, Ö., 1998, Yağlı Tohumlarda Lipid Oksidasyonu: Etkili Faktörler ve Ölçüm Yöntemleri, *Gıda*, 23 (3), 221-227.
- Özdalyan, B., 1991. *Doğal Antioksidant Vitaminler Gıda Sanayii* 5 (3), 27.
- Pereira, R.P., Fachinetto, R., Prestes, A.S., et al, 2009, Antioxidant Effects of Different Extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*, *Neurochemical Research*, 34, 973-983.
- Perry R.H., Green D., 1985, *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, 6th ed., Mc Graw Hill., New York
- Polavka, J., Paligová, J., Cvengroš, J., Simon, P., 2005, Oxidation stability of methyl esters studied by differential thermal analysis and rancimat, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82, 519–524.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., 2001, Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81, 640-647.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., 2002a, Stability of Virgin Olive Oil. 1. Autoxidation Studies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4), 716-721.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., et al., 2002b, Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil, *European Food Research and Technology*, 214 (4), 294-298.

- Rahaiee, S., Moini, S., Hashemi, M., Shojaosadati, S.A., 2015, Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review, *Journal of Food Science and Technology*, 52, 1881–1888.
- Raventós M., Duarte, S., Alarcón, R., 2002, Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview, *Food Science And Technology International*, 8 (5), 269-284.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10), 1231-1237
- Ross, S.M., 2015, Valerian Root and Lemon Balm Extracts: A Phytomedicine Compound Improves Symptoms of Hyperactivity, Attention Deficits, and Impulsivity in Children, *Holistic Nursing Practice*, 29 (6), 391-395.
- Russo, C., Cappelletti, G.M., Nicoletti, G.M., et al, 2016, Comparison of European olive production systems, *Sustainability*, 8 (8), 1–11
- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., et al, 2007, Oxidative Stability of Edible Vegetable Oils Enriched in Polyphenols with Olive Leaf Extract, *Food Science and Technology International*, 13, 413–421.).
- Sentkowska, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K., 2015, Polyphenolic Composition and Antioxidative Properties of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract Affected by Different Brewing Processes, *International Journal of Food Properties*, 18 (9), 2009-2014.
- Sherwin, E. R., 1990, *Food Additives*. Ed. by L. Branen, Marcel Dekker, New York, pp. 139–193.
- Šic Žlabur, J., Voća, S., Dobričević, N., Pliestić, S., Galić, A., Boričević, A., Borić, N., 2016, Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves, *International Agrophysics*, 30 (1), 95–104
- Siger, A., Nogala-Kalucka, M., Lampart-Szczapa, E., 2008, The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold- pressed plant oils, *Journal of Food Lipids*, 15, 137-149.
- Söbeli, C. ve Kayaardı, S., 2014, Et Kalitesini Belirlemede Yeni Teknikler, *Gıda*, 39 (4), 251-258.
- Şahin, S., 2011, *Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik-CO₂ Ekstrakt Eldesi ve Bileşimindeki Oleuropin Miktarının İncelenmesi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Şahin, S., Bilgin, M., 2017, Olivetree (*Olea europaea* L.) leaf as a wasteby-product of table olive and olive oil industry:a review, *Science of Food and Agriculture*, 98 (4), 1271-1279.

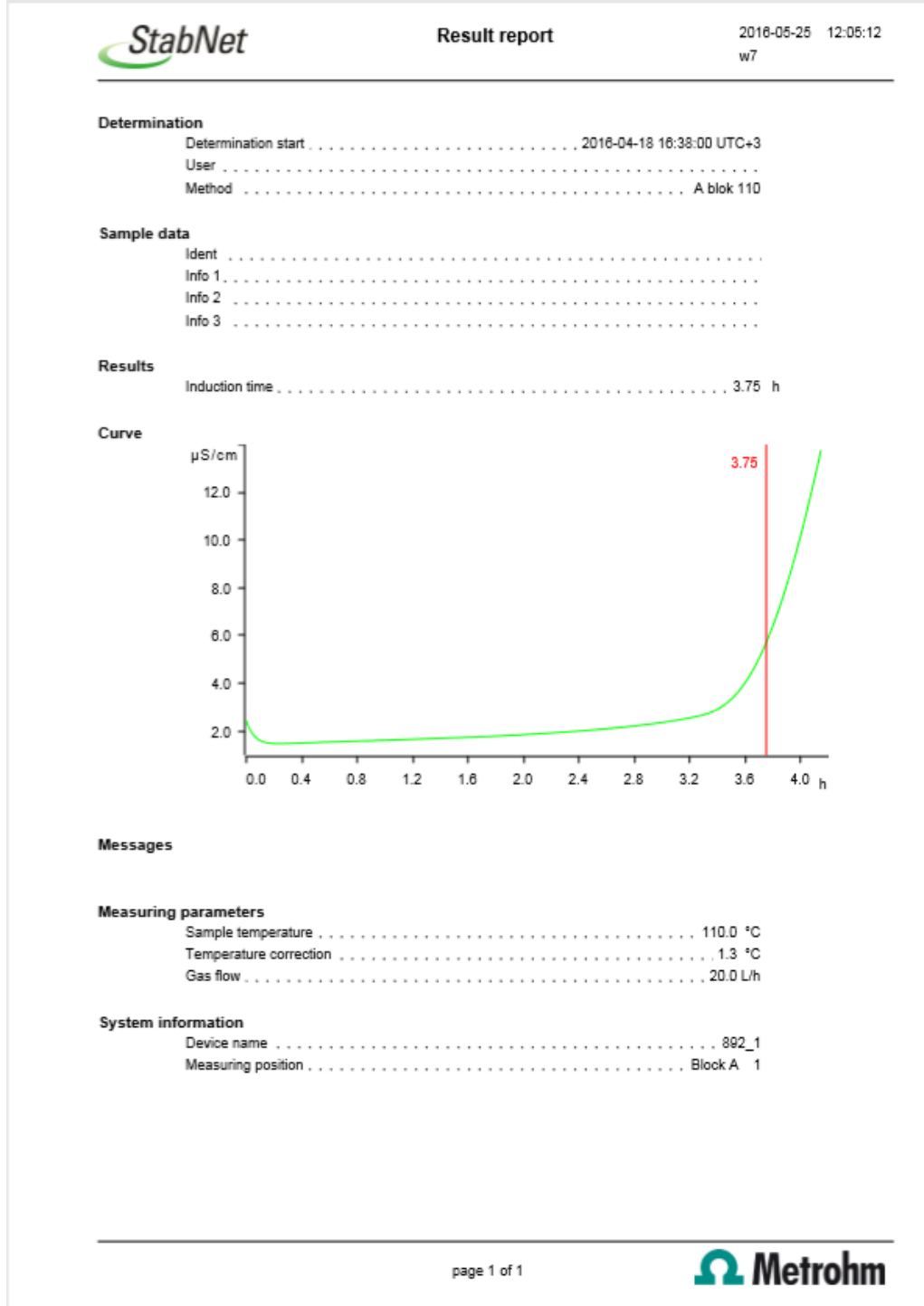
- Şahin, S., Bilgin, M., Dramur, M.U., 2011, Investigation of Oleuropein Content in Olive Leaf Extract Obtained by Supercritical Fluid Extraction and Soxhlet Methods, *Separation Science and Technology*, 46, 1829-1837.
- Şahin, S., Bilgin, M., Sayım, E., Güvenilir, B., 2016, Effects of natural antioxidants in the improvement of corn oil quality: olive leaf vs. lemon balm, *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 374-380.
- Şahin, S., Samlı, R., 2013, Optimization of Olive Leaf Extract Obtained by Ultrasound-Assisted Extraction with Response Surface Methodology, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595-602.
- Şahin, S., Samli, R., et al, 2017, Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties, *Molecules*, 22, 1056.
- Şahin, S., Sayım, E., Bilgin, M., 2017, Effect of olive leaf extract rich in oleuropein on the quality of virgin olive oil, *Journal of Food Science and Technology*, 54 (6), 1721-1728.
- Şahin, S., Sayım, E., Şamlı, R., 2017, Comparative Study of Modeling The Stability Improvement of Sunflower Oil with Olive Leaf Extract, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34, 2284-2292.
- Taghvaei M. and Jafari S.M., 2013, Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives, *Journal of Food Science and Technology*, 52 (3), 1272-1282.
- Türkekul, B., Günden, C., Abay, C., Miran, B., 2010, Competitiveness of mediterranean countries in the olive oil market, *New Medit*, 9, 41-46.
- Velasco, J., Andersen, M.L., Skibsted, L.H., 2004, Evaluation of oxidative stability of vegetable oils by monitoring the tendency to radical formation. A comparison of electron spin resonance spectroscopy with the Rancimat method and differential scanning calorimetry, *Food Chemistry*, 85, 623-632.
- Velasco, J., Dobarganes, C., 2002, Oxidative stability of virgin olive oil, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 661-676.
- Vermerris, W., Nicholson, K., 2006, Phenolic Compounds and Their Effects on Human Health, *Springer Netherlands*, 235-255.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E.M., 2001, Stabilisation of edible oils with natural antioxidants, *European Journal of Lipid Science Technology*, 103, 752-767.
- Yemişçioğlu, F., Özdikicierler, O., Gümüşkesen, A.S., 2016, Bitkisel Yağ Rafinasyonunda Yeni Bir Yaklaşım: Minimal Rafinasyon, *Akademik Gıda*, 14 (2), 172-179.
- Yu, S.H., Hsieh, H.Y., Pang, J.C., et al, 2013, Active films from water-soluble chitosan/cellulose composites incorporating releasable caffeic acid for inhibition of lipid oxidation in fish oil emulsions, *Food Hydrocolloids*, 32 (1), 9-19.

- Yu. J., Wang, L., Walzem, R.L., Miller, E.G., Pike, L.M., Patil, B.S., 2005, Antioxidant Activity of Citrus Limonoids. Flavonoids. and Coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2009-2014
- Zeb, A., Mehmood, S., 2004, Carotenoids Contents from Various Sources and Their Potential Health Applications, *Pakistan Journal of Nutrition*, 3 (3), 199-204.



EKLER

EK 1. Ayçiçek yağı - zeytin yaprağı ransimat sonuçları



EK 2. Ayçiçek yağı - oğul otu ransimat sonuçları



Result report

2018-05-25 12:10:12
w7

Determination

Determination start 2015-10-19 15:39:47 UTC+3
User
Method B Blok 130

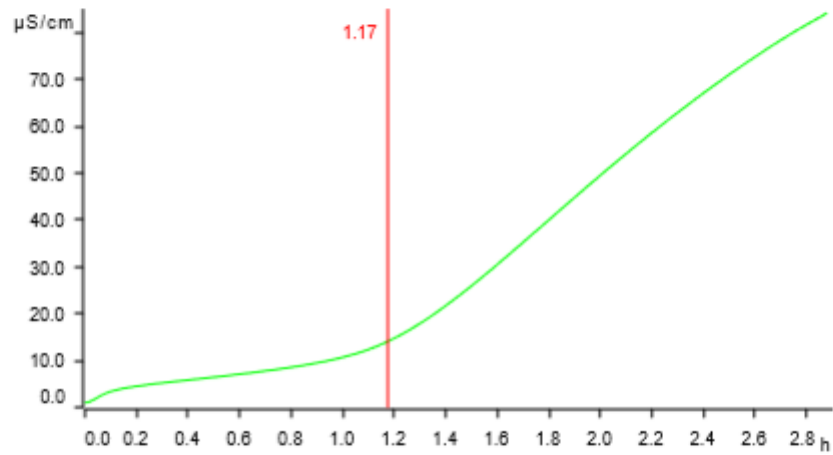
Sample data

Ident
Info 1
Info 2
Info 3

Results

Induction time 1.17 h

Curve



Messages

Measuring parameters

Sample temperature 130.0 °C
Temperature correction 1.7 °C
Gas flow 20.0 L/h

System information

Device name 892_1
Measuring position Block B 3

EK 3. Saf zeytinyağı ransimat sonuçları



Result report

2016-05-25 12:03:12

w7

Determination

Determination start 2015-11-11 15:48:19 UTC+2
 User
 Method B blok 120

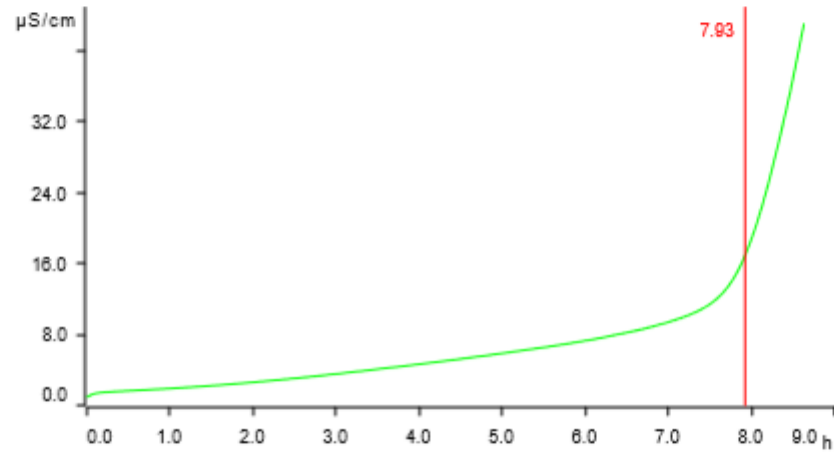
Sample data

Ident
 Info 1
 Info 2
 Info 3

Results

Induction time 7.93 h

Curve



Messages

Measuring parameters

Sample temperature 120.0 °C
 Temperature correction 1.5 °C
 Gas flow 20.0 L/h

System information

Device name 892_1
 Measuring position Block B 2

EK 4. Zeytinyağı – zeytin yaprağı ransimat sonuçları



Result report

2016-05-25 11:47:11
w7

Determination

Determination start 2016-04-12 14:38:37 UTC+3
User
Method A blok 110

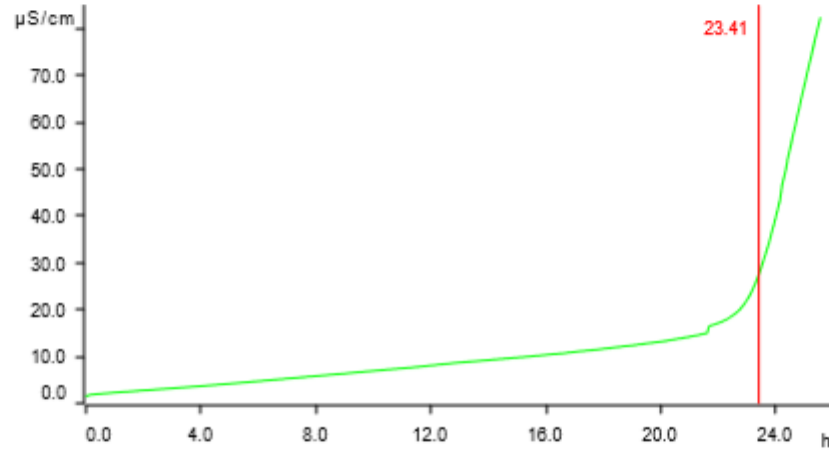
Sample data

Ident
Info 1
Info 2
Info 3

Results

Induction time 23.41 h

Curve



Messages

Measuring parameters

Sample temperature 110.0 °C
Temperature correction 1.3 °C
Gas flow 20.0 L/h

System information

Device name 892_1
Measuring position Block A 3

EK 5. Zeytinyağı – oğul otu ransimat sonuçları



Result report

2016-05-25 12:07:12
w7

Determination

Determination start 2015-12-02 11:59:06 UTC+2
User
Method A blok 130

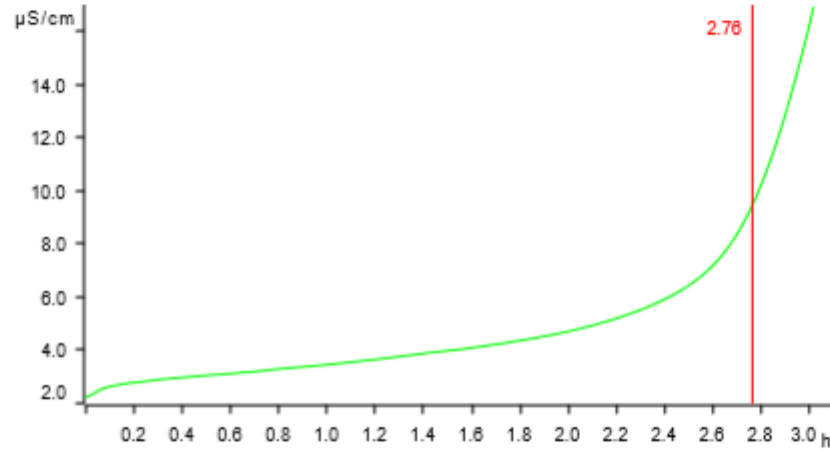
Sample data

Ident
Info 1
Info 2
Info 3

Results

Induction time 2.78 h

Curve



Messages

Measuring parameters

Sample temperature 130.0 °C
Temperature correction 1.6 °C
Gas flow 20.0 L/h

System information

Device name 892_1
Measuring position Block A 1

EK 6. Saf ayçiçek yağı ransimat sonuçları



Result report

 2016-05-25 12:09:12
w7

Determination

 Determination start 2015-12-25 11:13:41 UTC+2
 User
 Method A blok 130

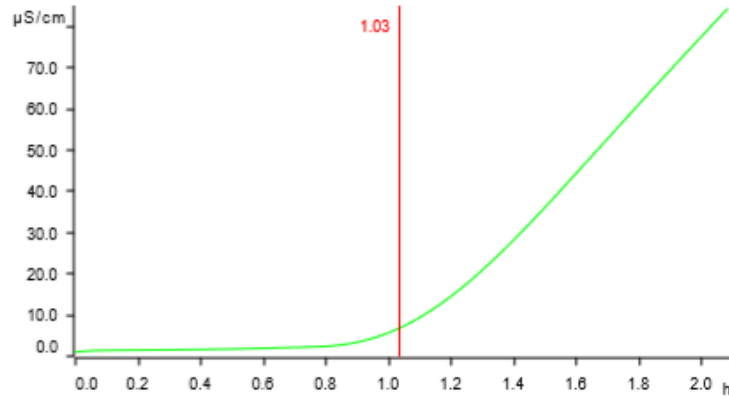
Sample data

 Ident
 Info 1
 Info 2
 Info 3

Results

Induction time 1.03 h

Curve



Messages

Measuring parameters

 Sample temperature 130.0 °C
 Temperature correction 1.6 °C
 Gas flow 20.0 L/h

System information

 Device name 892_1
 Measuring position Block A 2

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Ezgi SAYIM KARAOĞUL
Doğum Yeri	Üsküdar / İstanbul
Doğum Tarihi	15.07.1992
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0536 602 98 21
E-Posta Adresi	ezgisayimm@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Mühendislik Fakültesi
Bölümü	Kimya Mühendisliği
Mezuniyet Yılı	24.07.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Mühendisliği
Programı	Temel İşlemler ve Termodinamik

Makale ve Bildiriler
Sayım, E., Şahin, S., Bilgin, M., 2015, Optimization of Enrichment Conditions of Sunflower Oil with Natural Antioxidants Through Response Surface Technology, <i>International Congress on Natural and Engineering Sciences- Sarajevo</i>, Bosnia and Herzegovina. Sayım, E., Şahin, S., Bilgin, M., 2016, <i>Melisa Yaprağının Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu</i>, 12. Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi. Şahin, S., Bilgin, M., Sayım, E., Güvenilir, B., 2017, Effects of Natural Antioxidants in The Improvement of Corn Oil Quality: Olive Leaf vs. Lemon Balm, <i>International Journal of Food Science and Technology</i>, 52, 374-380.

Şahin, S., Sayım, E., Bilgin, M., 2016, Improvement of the Olive Oil Quality with Olive Leaf Extract Through Response Surface Technology, *Aiche-San Francisco*, USA.

Şahin, S., Sayım, E., Bilgin, M., 2017, Effect of Olive Leaf Extract Rich in Oleuropein on The Quality of Virgin Olive Oil, *Journal of Food Science and Technology*, 54, 1721-1728.

Şahin, S., Sayım, E., Şamlı, R., 2017, Comparative Study of Modeling The Stability Improvement of Sunflower Oil with Olive Leaf Extract, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 34, 2284-2292.