

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZEYTİNYAĞI FABRİKASI SIVI ATIĞININ BİYOARITIMINDA FENOL PARÇALAYICI ENZİM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Emine AKARDERE

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Serpil TAKAÇ

Bu yüksek lisans çalışmasında, zeytin karasuyunun, *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* mayaları ile ayrı ayrı biyolojik arıtımı sırasında; ortamdaki fenolik bileşenlerin parçalanmasını katalizleyen enzimlerin aktivitelerinin izlenmesi, toplam fenol derişimi ile her bir fenolik bileşenin derişimindeki değişikliğin belirlenmesi ve aynı zamanda toplam antioksidan aktivitesindeki değişikliklerin gözlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, askorbik asit ilavesi ile biyoarıtım ortamında değerli bir antioksidan olan hidroksitirozolün birikimi de incelenmiştir. Bu doğrultuda, biyoarıtımlar çalkalamalı hava banyosunda, 30°C ve 150 rpm’de gerçekleştirilerek zeytin karasuyu özelliklerinin ve derişiminin her bir maya ile gerçekleştirilen biyoarıtımlara etkisi incelenmiştir. Biyoarıtım süresince, *R. glutinis* ve *D. hansenii*’ye ait tirozinaz monofenolaz, tirozinaz difenolaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve tannaz enzimlerinin aktiviteleri ölçülmüş; zamanla tirozol, hidroksitirozol, kateşol, 4-metilkateşol ve vanilik asit derişimlerindeki değişimler belirlenmiştir. Biyoarıtım ortamlarına eklenen farklı değerleri ile askorbik asitin hidroksitirozol birikimine etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak, her iki maya da farklı enzim aktiviteleri ile zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenleri farklı miktarda kullanmışlardır. *D. hansenii* ile biyoarıtımı gerçekleştirilen ortamlara eklenen askorbik asit, hidroksitirozol birikimini sağlamamıştır; ancak *R. glutinis* ile biyoarıtım ortamına eklenen yüksek miktardaki askorbik asit ile hidroksitirozolün tamamen tüketilmesi önlenmiştir.

Ocak 2012, 153 sayfa

Anahtar kelimeler: Biyoarıtım, biyofenol, lakkaz, mangan peroksidaz, tannaz, tirozinaz, zeytin karasuyu

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF PHENOL-DEGRADING ENZYME ACTIVITIES IN BIOREMEDIATION OF OLIVE MILL WASTEWATER

Emine AKARDERE

Ankara University Biotechnology Institute

Department of Biotechnology

Supervisor: Prof.Dr. Serpil TAKAÇ

In this master thesis, it is aimed to monitor the variations in the activities of phenol-degrading enzymes, in the concentrations of total phenol and individual phenolic compounds as well as in the total antioxidant activity during bioremediation of olive mill wastewater (OMW) by *Rhodotorula glutinis* and *Debaryomyces hansenii* yeasts. The accumulation of valuable antioxidant phenolic compound hydroxytyrosol during bioremediation was also aimed by introducing ascorbic acid into the medium. Bioremediation studies were carried out in an orbital shaker at 30°C and 150 rpm conditions. The effects of characteristics and concentrations of OMW on the course of bioremediations with both yeasts were investigated. The activities of tyrosinase monophenolase, tyrosinase diphenolase, laccase, manganese peroxidase and tannase enzymes by *R. glutinis* and *D. hansenii* were measured throughout the bioremediations. The variations in tyrosol, hydroxytyrosol, catechol, 4-methylcatechol and vanillic acid concentrations with time were detected. The effect of ascorbic acid on the accumulation of hydroxytyrosol in the bioremediation medium by *R. glutinis* and *D. hansenii* was studied by changing its concentration. The results showed that the yeasts degraded phenolic compounds in OMW at different degrees by their different enzyme activities. It was also found out that the addition of ascorbic acid did not provide the accumulation of hydroxytyrosol in the medium bioremediated by *D. hansenii*; however, high concentration of ascorbic acid prevented the complete depletion of hydroxytyrosol in the medium biodegraded by *R. glutinis*.

January 2012, 153 pages

Key words: Bioremediation, biophenol, laccase, manganese peroxidase, tannase, tyrosinase, olive mill wastewater

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve desteğini eksik etmeyen, bilgileriyle önüme ışık tutan değerli hocam Prof.Dr. Serpil TAKAÇ'a,

Deneyslerimi yaparken, yaşadığım her şeyi paylaştığım Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü Reaksiyon Mühendisliği Araştırma Grubu üyelerine,

Tez çalışmamın dahil olduğu 'Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması için Biyoproses Geliştirilmesi' (109M290) isimli projeyi ve 18 ay süresince proje bursiyeri olarak beni maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a,

Çalışmada kullanılan zeytin karasuyunu temin eden Taylıeli Zeytinyağı İşletmesi'ne,

Her anımı paylaşan ve bana her daim destek veren sevgili arkadaşım Burak BEZİRCİ'ye,

Yakınımdaki tüm arkadaşlarıma,

Her zaman olduğu gibi yüksek lisans tezim süresince de arkamda olan aileme

TEŞEKKÜR EDERİM.

Emine AKARDERE

Ankara, Ocak 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1. Zeytin Karasuyu ve Zeytin Karasuyunun Arıtımı	4
2.2. Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi ve Fenol Parçalayıcı Enzimler	6
2.3. <i>Debaryomyces hansenii</i> ve <i>Rhodotorula glutinis</i>	15
2.4. Zeytin Karasuyunun Funguslarla Biyoarıtımı.....	16
2.5. Mikrobiyal Aktivite ile Hidroksitirozol Birikimi	19
2.5.1. Saflaştırılmış enzim kullanılarak hidroksitirozol üretimi	19
2.5.2. Mikroorganizmalar kullanılarak hidroksitirozol üretimi	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM	25
3.1. Materyal	25
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Ticari fenol parçalayıcı enzimler ile zeytin karasuyunun biyoarıtımının incelendiği ortamlar	25
3.2.2. Mikroorganizmaların saklanması ve çoğalma ortamları.....	26
3.2.2.1. Mikroorganizmaların saklanması	26
3.2.2.2. Ön çoğalma ortamı.....	27
3.2.2.3. Sıvı çoğalma ve biyoarıtım ortamları	27
3.2.3. Dinlenen <i>R. glutinis</i> hücreleri ile hidroksitirozol üretimi için çoğalma ve üretim ortamları.....	29
3.3. Analizler.....	29

3.3.1. pH ölçümü	29
3.3.2. Toplam fenol derişimi tayini	30
3.3.3. Toplam antioksidan aktivitesi tayini.....	31
3.3.4. Tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayini.....	32
3.3.5. Tirozinaz difenolaz enzim aktivite tayini.....	33
3.3.6. Lakkaz enzim aktivite tayini	34
3.3.7. Mangan peroksidaz enzim aktivite tayini	35
3.3.8. Tannaz enzim aktivite tayini	36
3.3.9. HPLC analizleri	38
3.3.9.1. Kalitatif analiz	38
3.3.9.2. Kantitatif analiz	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. Yöntem Geliştirme	41
4.1.1. Toplam fenol derişimi.....	41
4.1.2. Toplam antioksidan aktivitesi	41
4.1.3. Tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi	42
4.1.4. Tirozinaz difenolaz enzim aktivitesi.....	43
4.1.5. Lakkaz enzim aktivitesi	44
4.1.6. Mangan peroksidaz enzim aktivitesi.....	46
4.1.7. Tannaz enzim aktivitesi	47
4.1.8. Kalitatif ve kantitatif HPLC analizleri.....	47
4.2. Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin HPLC ile Tanımlanması ve Derişimlerinin Belirlenmesi.....	48
4.3. Ticari Fenol Parçalayıcı Enzimler ile Zeytin Karasuyunun Fenolik İçeriğinin Değişimi.....	51
4.4. <i>Debaryomyces hansenii</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı	60
4.5. <i>Debaryomyces hansenii</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı Sırasında Ortama Askorbik Asit İlavesi ile Hidroksitirozol Birikimi.....	65
4.6. <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı	76
4.7. <i>Rhodotorula glutinis</i> ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı Sırasında Hidroksitirozol Birikimi.....	88

4.7.1. Biyoarıtım ortamına askorbik asit ilavesi ile hidroksitirozol birikimi.....	88
4.7.2. Dinlenen <i>Rhodotorula glutinis</i> ile tirozolden hidroksitirozol üretimi	114
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	116
KAYNAKLAR	120
EKLER.....	125
EK 1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler	126
EK 1 (devam) Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler	127
EK 1 (devam) Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler	128
EK 2 Toplam Fenol Derişimi Hesabı.....	129
EK 3 Toplam Fenol Derişimi Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği.....	130
EK 4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği ...	132
EK 5 Tirozinaz Monofenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği	133
EK 6 Tirozinaz Difenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği	134
EK 7 Lakkaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği.....	135
EK 8 Kantitatif HPLC Analiz Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği.....	136
EK 9 Oleuropeinin Asidik Hidrolizi	138
EK 10 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin IC ₅₀ Değerlerinin Hesaplanması.	139
EK 11 Tirozol ve Oleuropein Hidrolizatının (Hidroksitirozol) Kalitatif HPLC Analizine Ait Kromatogramlar	143
EK 12 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin Kantitatif HPLC ile Analizi için Hazırlanan Kalibrasyon Grafikleri.....	144
EK 13 Zeytin Karasuyu Ekstraktlarında Bulunan Fenolik Bileşenlere Ait Piklerin Standart Katma Yöntemi ile Belirlenmesi	147
ÖZGEÇMİŞ	152

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Zeytin karasuyunda bulunan temel fenolik bileşikler (Niaounakis and Halvadakis 2006)	7
Şekil 2.2. Oleuropeinin β -galaktozidaz ve esteraz enzimleri ile hidrolizi (Khoufi et al. 2011)..	9
Şekil 2.3. Lakkaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Dwivedi et al. 2011)	11
Şekil 2.4. Lignin peroksidaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=36999&type=I&displayType=marvin. , 2010)....	12
Şekil 2.5. Mangan peroksidaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=40497&type=I&displayType=marvin. , 2010)....	12
Şekil 2.6. Tirozinaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Van Gelder et al. 1997)	13
Şekil 2.7. Tannaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Mondal et al. 2001)	14
Şekil 2.8 Tirozinaz ve askorbik asit varlığında hidroksitirozolün öncülü olan tirozolden üretimi (Espín et al. 2001).....	20
Şekil 2.9. <i>P.aeruginosa</i> tarafından tirozol metabolizması için önerilen yol izi (Bouallagui and Sayadi 2006).....	23
Şekil 4.1. Tirozinaz enziminin katalizlediği tirozin oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı	43
Şekil 4.2. Tirozinaz enziminin katalizlediği L-DOPA oksidasyonunda doğrusal absorbans azalması.....	44
Şekil 4.3. Lakkaz enziminin katalizlediği ABTS (ticari çözelti) oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı	45
Şekil 4.4. Lakkaz enziminin katalizlediği ABTS (katı formdan hazırlanan çözelti) oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı	45
Şekil 4.5. Mangan peroksidaz enziminin katalizlediği Mn^{2+} oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı	46
Şekil 4.6. Zeytin karasuyu 1 (ZK1) ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram ...	49
Şekil 4.7. Zeytin karasuyu 2 (ZK2) ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram ...	49
Şekil 4.8. HPLC analizlerinde çözücü olarak kullanılan metanole ait kromatogram.....	50

Şekil 4.9. Ticari tirozinaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	51
Şekil 4.10. Ticari lakkaz (katı ve sıvı) enzimleri ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (5.3 mg katı lakkaz ya da 3 mL sıvı lakkaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	52
Şekil 4.11. Ticari mangan peroksidaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.2 mg mangan peroksidaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	52
Şekil 4.12. Ticari tannaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (8.6 mg tannaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	53
Şekil 4.13. 2 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	54
Şekil 4.14. 5 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	55
Şekil 4.15. 10 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	55
Şekil 4.16. 2, 5, ve 10 mM askorbik asit varlığında % 100 ZK1 ortamının tirozinaz enzimi ile muamelesi sırasında zeytin karasuyunda bulunan tirozol miktarının bağıl değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	58
Şekil 4.17. 2, 5, ve 10 mM askorbik asit varlığında % 100 ZK1 ortamının tirozinaz enzimi ile muamelesi sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	58
Şekil 4.18. Enzimsiz ortamda inkübe edilen % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	59
Şekil 4.19. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 1) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	61

Şekil 4.20. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	63
Şekil 4.21. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	64
Şekil 4.22. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	66
Şekil 4.23. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=23. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	68
Şekil 4.24. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	69
Şekil 4.25. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	70
Şekil 4.26. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	72
Şekil 4.27. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	73
Şekil 4.28. % 25 ZK1 ortamı (kontrol) ile 50 ve 350 mg/L askorbik asit varlığında % 25 ZK1 ortamının <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	75
Şekil 4.29. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 5 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	77
Şekil 4.30. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 20 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	78
Şekil 4.31. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	80
Şekil 4.32. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının t=0. st ve t=47. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	81
Şekil 4.33. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	83

Şekil 4.34. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının t=0. st ve t=61. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	84
Şekil 4.35. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortam (Kontrol) için t=0. st ve t=75. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	87
Şekil 4.36. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 (Kontrol 1) ve % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	89
Şekil 4.37. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının (Kontrol 1) t=0. st ve t=67. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	91
Şekil 4.38. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=91. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	92
Şekil 4.39. % 50 ZK1 (Kontrol 1) ile % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamların <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımları sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağlı değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	94
Şekil 4.40. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	95
Şekil 4.41. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 2) t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	97
Şekil 4.42. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	97
Şekil 4.43. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 3), % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	99
Şekil 4.44. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 3) t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	104
Şekil 4.45. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	104

Şekil 4.46. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	105
Şekil 4.47. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 4) ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	107
Şekil 4.48. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 4) t=0. st ve t=75. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	110
Şekil 4.49. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=75. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm).....	110
Şekil 4.50. % 25 ZK2 (Kontrol 3), % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit, % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit, % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamların <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımları sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	113
Şekil 4.51. Dinlenen <i>R. glutinis</i> ile işlem gören, 0.1 g/L tirozol içeren ortamın t=0. st ve t=66. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması	114
Şekil 4.52. Dinlenen <i>R. glutinis</i> ile işlem gören, 1 g/L tirozol içeren ortamın t=0. st ve t=66. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması	115

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. HPLC analiz koşulları	39
Çizelge 3.2. HPLC analizlerinde uygulanan gradyen program	40
Çizelge 4.1. Zeytin karasuyu (ZK1 ve ZK2) ekstraktlarının kantitatif HPLC analizine ait sonuçlar	50
Çizelge 4.2. Ticari olarak elde edilen fenol parçalayıcı enzimlerin zeytin karasuyunda (ZK1) bulunan fenolik bileşenleri substrat olarak kullanımı (0.3 mg tirozinaz, 5.3 mg katı lakkaz, 3 mL sıvı lakkaz, 0.2 mg mangan peroksidaz ya da 8.6 mg tannaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm).....	53
Çizelge 4.3. 2 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	56
Çizelge 4.4. 5 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	56
Çizelge 4.5. 10 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	57
Çizelge 4.6. % 100 ZK1 ortamının (kontrol) enzimsiz ortamda inkübasyonu süresince içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)	60
Çizelge 4.7. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 1) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>D. hansenii</i> 'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	62
Çizelge 4.8. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>D. hansenii</i> 'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	64
Çizelge 4.9. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında (Ortam 2) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	65

Çizelge 4.10. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>D. hansenii</i> 'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm) ...	67
Çizelge 4.11. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	68
Çizelge 4.12. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>D. hansenii</i> 'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	70
Çizelge 4.13. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında (kontrol) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	71
Çizelge 4.14. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>D. hansenii</i> 'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm) ...	73
Çizelge 4.15. <i>D. hansenii</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	74
Çizelge 4.16. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 20 ZK1 ortamının biyoarıtım süresince toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	79
Çizelge 4.17. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	81
Çizelge 4.18. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (30°C, 150 rpm)	82
Çizelge 4.19. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	84
Çizelge 4.20. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamında bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (30°C, 150 rpm)	85
Çizelge 4.21. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortam (Kontrol) için inkübasyonu süresince toplam fenol ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	86
Çizelge 4.22. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortamın (Kontrol) inkübasyonu süresince içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	87

Çizelge 4.23. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 içeren ortamın (kontrol 1) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	90
Çizelge 4.24. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	91
Çizelge 4.25. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamında (Kontrol 1) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	93
Çizelge 4.26. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	93
Çizelge 4.27. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 2) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	96
Çizelge 4.28. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	96
Çizelge 4.29. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 2) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	98
Çizelge 4.30. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	98
Çizelge 4.31. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 3) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	101
Çizelge 4.32. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	102
Çizelge 4.33. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	103
Çizelge 4.34. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 3) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	106

Çizelge 4.35. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	106
Çizelge 4.36. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	106
Çizelge 4.37. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 4) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	108
Çizelge 4.38. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen <i>R. glutinis</i> 'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)	109
Çizelge 4.39. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 4) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	111
Çizelge 4.40. <i>R. glutinis</i> ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm).....	112

SİMGELER DİZİNİ

A	Absorbans
b	Spektrofotometre küvet genişliği (cm)
h	Hacim
IC ₅₀	% 50 İnhibisyon için gerekli miktar
LAMU	Laccase myceliophthora units
N	Karıştırma hızı (rpm)
T	Sıcaklık (°C)
t	Zaman (dk, st)
U	Ünite
V	Toplam hacim (L)
v	Enzim hacmi (mL)
ϵ	Molar absorptivite katsayısı ($M^{-1}cm^{-1}$)
λ	Dalga boyu (nm)

Kısaltmalar

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
BOİ	Biyolojik oksijen ihtiyacı
BSA	Bovin serum albümin
L-DOPA	3,4-Dihidroksi-L-fenil-alanin
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GC-MS	Gaz kromatografi-kütle spektrometresi
HPLC	Yüksek basınç (performans) sıvı kromatografisi
% in.	% İnhibisyon
KOİ	Kimyasal oksijen ihtiyacı
OMW	Olive mill wastewater

S	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
UV	Ultraviyole
UYM	Universal yeast medium
vvm	hacim / hacim / dakika
ZK	Zeytin karasuyu

1. GİRİŞ

Zeytinyağı üretim prosesinin sıvı atığı olan zeytin karasuyu, bir yandan toksik özellik taşıdığı için arıtılması gereken, diğer yandan da değerli antioksidanlar içeren bir cevherdir. Zeytin meyvesinde bulunan fenolik maddelerin büyük bir kısmı antioksidan özelliindedir ve zeytinyağı üretimi sırasında, bu antioksidan özelliğindeki fenolik maddelerin % 98'i zeytin karasuyuna geçmektedir (Obied et al. 2005).

Zeytin karasuyunda bulunan temel fenolik bileşenler; sinamik asit türevleri (*o*-kumarik asit, *p*-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit), benzoik asit türevleri (protokateşuik asit, tirozol ve hidroksitirozol) ile diğer fenolik bileşenler (kateşol, 4-metilkateşol, *p*-kresol ve resorsinol) olarak gruplandırılabilir. Bu fenolik bileşenler, değişen büyüklükte antioksidan aktivitelerine sahiptirler. Zeytin karasuyunun özellikleri iklime, zeytinin yetiştirildiği bölgeye ve üretim prosesine bağlı olarak değişmesine karşın, hidroksitirozol genellikle zeytin karasuyunda bol miktarda bulunan fenolik bileşenler arasındadır (Niaounakis and Halvadakis 2006).

Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek -karbohidrat, DNA, protein ve lipidler gibi substratların oksitlenmelerini önlemek veya geciktirmek suretiyle- hücrelere zarar vermelerini engelleyen moleküllerdir. Antioksidan grubu maddeler, aynı zamanda endüstriyel ürünlerde katkı maddesi olarak da kullanılmaktadırlar. Yakıtlarda ve yağlarda oksidasyonun, benzinde motorun tıkanmasına neden olan artıkları oluşturan polimerizasyonun ve kauçuk, plastik ve yapıştırıcılarda güç ve esneklik kaybına neden olan oksidatif bozulmanın engellenmesinde kullanılırlar. Ayrıca ruj ve nemlendirici gibi yağ bazlı kozmetik ürünlerde de bozulmanın önlenmesi amacıyla da kullanılmaktadırlar. En aktif antioksidanlar fenolik ve polifenolik bileşiklerdir. Ham zeytinyağındaki fenolik bileşenler arasında ise en kuvvetli antioksidan hidroksitirozoldür (Bendini et al. 2007). Hidroksitirozol, doğal besin antioksidanı olarak ve fonksiyonel gıdaların, farmasötik çözeltilerin ve kozmetiklerin hazırlanmasında

kullanılır (Fernández-Bolaños et al. 2006); aynı zamanda antimikrobiyal ve antikarsinojenik etkisi de vardır (Bouallagui and Sayadi 2006).

Zeytin karasuyunun biyoarıtımı sırasında, yapıda bulunan fenolik bileşenler mikroorganizmalar tarafından kullanılmaktadır. Fenolik bileşenlerin parçalanmasında görev yapan enzimler, mikroorganizma türüne, kullanılan substrata ve ortam koşullarına göre değişmesine karşın genellikle oksidoredüktaz grubu enzimlerdir ve zeytin karasuyundaki fenollerin parçalanmasında başlıca lakkaz, lignin peroksidaz, mangan peroksidaz ve tirozinaz enzimleri ile hidrolaz grubuna dahil olan tannaz enzimi aktivite gösterir. Zeytin karasuyundaki fenolik bileşenleri parçalayarak organik yükün azalmasını sağlayan enzimlerin katalitik etki yaptığı reaksiyon yollarının son veya ara ürünleri antioksidan özellik taşıyan fenolikler olabilir (Liebgott et al. 2008).

Çalışmada kullanılan *Debaryomyces hansenii* ve *Rhodotorula glutinis* daha önce zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmamış mayalardır. Ancak *D. hansenii*'nin fenolik yapıdaki ferulik asiti (Mathew et al. 2007), *R. glutinis*'in ise, klorofenoller, sinapik asiti ve fenolü kullandığı bilinmektedir (Walker 1973, Gupta et al. 1986, Katayama-Hirayama et al. 1995). Ayrıca, *D. hansenii*'nin tannaz (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BXU9> #section_name., 2009), *R. glutinis*'in lakkaz (<http://www.uniprot.org/uniprot/B2DFU1>., 2009) enzimi gen bölgesine sahip olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, 'Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması için Biyoproses Geliştirilmesi' (TÜBİTAK-109M290) isimli proje kapsamında, *R. glutinis* ve *D. hansenii* mayaları ile zeytin karasuyunun biyoarıtımı gerçekleştirilirken, bu mayalara ait fenol parçalayıcı enzim aktivitelerinin değişiminin ve bu enzim aktiviteleri sonucu ortamdaki fenolik bileşenlerde meydana gelen değişimin incelenmesi ile biyoarıtım ortamında değerli bir antioksidan olan hidroksitirozolün birikiminin sağlanması amaçlanmıştır. *R. glutinis* ve *D. hansenii* mayalarının zeytin karasuyu ortamında

çoğalmaları, fenolik bileşenleri parçalamaları ve ilgili enzim aktivitelerinin belirlenmesi ile ilgili bir çalışmanın literatürde henüz yer almamış olması nedeniyle çalışma konusu özgün bir nitelik taşımaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Zeytin Karasuyu ve Zeytin Karasuyunun Arıtımı

Zeytinyağı, Akdeniz tipi beslenmenin temelini oluşturan önemli bir gıda maddesidir. Akdeniz ülkelerinde, büyük miktarlarda zeytinyağı, geleneksel ve endüstriyel zeytin öğütücüleri kullanılarak sınırlı bir süre içinde (genellikle Ekim ile Aralık ayları arasında) üretilmektedir. Zeytinyağı üretimi ile eş zamanlı olarak, büyük miktarlarda (3×10^7 m³/yıl) zeytin karasuyu veya vejetasyon suyu olarak adlandırılan sıvı atık da oluşmaktadır (Iamarino et al. 2009). 2010 yılında dünyada yıllık zeytinyağı üretimi 3269249 ton olarak bildirilmiştir (<http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor.>, 2012). Bu üretimin % 45.5'i İspanya'ya, % 16.8'i İtalya'ya, % 10.8'i Yunanistan'a ait iken, % 4.9'luk kısmı Türkiye'ye aittir (<http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor.>, 2012).

Zeytinyağı üretimi için, farklı atık ürünleri olan farklı yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel üretim yöntemi olan zeytin preslemenin yerini, zaman içinde zeytinyağını katıdan santrifüj yoluyla ayıran modern yöntemler almıştır. Yaygın olarak kullanılan bu modern yöntemler, iki-fazlı ve üç-fazlı santrifüj sistemleridir (McNamara et al. 2008). Geleneksel üretim yöntemi kesikli proses olmasına karşın, iki-fazlı ve üç-fazlı santrifüj sistemleri sürekli proseslerdir.

Geleneksel üretim prosesinde, zeytinler yıkanır, ezilir ve sıcak su eklenerek yoğrulur. Elde edilen hamur preslenerek yağı süzülür. Presleme sonrası elde edilen sıvı -zeytin suyu- eklenen su ve yağ artığı içerir. Son olarak zeytinyağı sudan dikey santrifüjleme ile ya da dekantasyon ile ayrılır (Azbar 2004).

Üç-fazlı santrifüj sistemlerinde, prosese su eklenir ve üç faz (zeytinyağı, zeytin karasuyu ve pirina) oluşur. İki-fazlı sistemler ise iki faz içerirler (zeytinyağı ve sıvı-katı karışımı) (Azbar 2004).

Zeytin karasuyu, 1000 kg zeytin başına prosese bağlı olarak 0.5-1.5 m³ hacimde oluşmaktadır. Kesikli proses sonucunda oluşan zeytin karasuyu (0.5-1.0 m³/1000 kg zeytin), sürekli proses sonucunda oluşan zeytin karasuyundan (1.0-1.5 m³/1000 kg zeytin) daha az olmasına karşın daha yoğundur (Paraskeva and Diamadopulos 2006).

Sürekli proseslerde, yatay santrifüj, sürekli işleme olanak sağlar. Sürekli santrifüjün prosesinin geleneksel pres teknolojisine göre avantajları; üretimin artması, işgücü maliyetinin düşmesi, daha az alan ihtiyacı, daha yüksek kalite, gelişmiş proses kontrolü ve kolaylaştırılmış otomatizasyondur. Ancak, presleme teknolojisine göre daha fazla sermayeye gereksinim duyulur (Azbar 2004).

Zeytin karasuyu, sahip olduğu koyu mor-koyu kahverenginden siyaha kadar yoğun rengi, güçlü zeytinyağı kokusu, yüksek organik kirliliği, asidik pH'ı, yüksek elektrik iletkenliği, yüksek fenol içeriği ve yüksek katı madde içeriği ile karakterize edilir. İçerdiği yüksek organik kirliliği, 35-110 g/L arasında değişen biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ve 40-220 g/L arasında değişen kimyasal oksijen ihtiyacı (KOİ) ile ifade edilebilir. Ayrıca zeytin karasuyunun içerdiği toplam organik karbon miktarı 25-45 g/L arasında, pH'ı 4-6 arasında ve içerdiği fenolik bileşenlerin derişimi 0.5-24 g/L arasında değişmektedir (Niaounakis and Halvadakis 2006). Zeytin karasuyunun organik karbon içeriğini, kuru ağırlığının % 60'ı kadarını oluşturan şekerler (sukroz, glukoz, mannoz ve fruktoz) ile içerdiği 30'dan fazla fenolik bileşik oluşturmaktadır (McNamara et al. 2008, Niaounakis and Halvadakis 2006). Zeytin karasuyu fenolik içeriği ve içerdiği uzun zincirli yağ asitleri nedeni ile yüksek düzeyde fitotoksik ve antimikrobiyal etkilere sahiptir (McNamara et al. 2008).

Zeytin karasuyunun bileşimi sabit değildir Zeytin çeşidine, zeytinlerin olgunluğuna, su içeriğine, toprağın işlenmesine, hasat zamanına, pestisit ve gübre varlığına, iklim koşullarına, zeytinyağı ekstraksiyon prosesine ve saklama süresine bağlı olarak zeytin karasuyunun bileşimi değişir (Niaounakis and Halvadakis 2006).

Zeytin karasuyu arıtımında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; fiziksel proses, termal proses, fizikokimyasal proses, biyolojik proses ve birleştirilmiş proseslerdir. Fiziksel prosesler; seyreltme, sedimentasyon, filtrasyon, flotasyon, santrifüj teknikleri ile mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon, nanofiltrasyon ve ters osmos gibi membran teknolojilerini içerir. Termal prosesler; evaporasyon-distilasyon ve kurutma gibi fizikotermal prosesler ile yanma, piroliz ve güneş altında lagünlerde bekletme gibi geri dönüşümsüz termokimyasal prosesleri içerir. Fizikokimyasal prosesler; nötralizasyon, presipitasyon-flokulasyon, adsorbsiyon, kimyasal oksidasyon prosesi ile iyon değişimi gibi yöntemleri içerir. Biyolojik prosesler ise; anaerobik, aerobik, aerobik-anaerobik prosesler ile kompostlama, fitoremediasyon ve tarımsal alanların sulanması gibi yöntemlerdir. Bu yöntemlerin bazılarının kendi aralarında bazılarının birleştirilmesiyle de arıtım yapılır (Niaounakis and Halvadakis 2006).

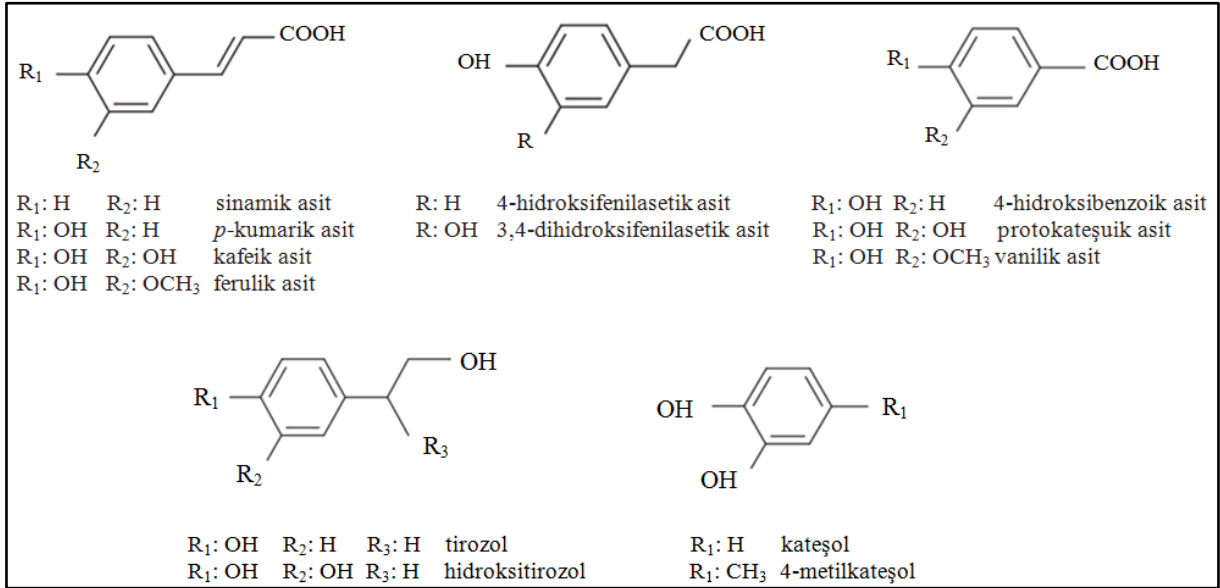
2.2. Zeytin Karasuyunun Fenolik Bileşimi ve Fenol Parçalayıcı Enzimler

Zeytin karasuyunda bulunan biyofenollerin oluşumu, meyvenin çeşidi ve olgunluğuna, iklim koşullarına, depolama süresine ve proses tekniğine bağlı olarak değişir (Obied et al. 2005).

Zeytinin hem etli kısmı hem de çekirdeği fenolik bileşikler açısından zengindir. Bu fenolik bileşikler, zeytinin işlenmesi sırasında serbest kalırlar, su ve yağ fazı arasında dağılırlar. Bir kısım fenolik bileşik ise zeytin kekinde tutulur. Serbest kalan fenolik bileşiklerin su ve yağ fazı arasındaki dağılımı, fenolik bileşenlerin bu iki fazdaki çözünürlüklerine göre değişir.

Zeytin fenolleri doğada amfililik (hem hidrofilik, hem hidrofobik) özellik gösterirler ve su fazında yağ fazından daha çok çözünürler. Zeytinyağında bulunan fenollerin derişimi 50-100 mg/g yağ arasında zeytinin çeşidine göre değişir (Niaounakis and Halvadakis 2006). Zeytinyağının biyofenolik fraksiyonu, zeytin meyvesinin toplam fenol içeriğinin yalnızca % 2'sini içerir, kalan % 98'lik kısmı ise zeytin karasuyuna geçer. Zeytin karasuyunda bulunan biyofenoller meyvede doğal olarak oluşabilecekleri gibi, proses sırasında yağ ve atık faz arasında dağılım sırasında da oluşabilirler (Obied et al. 2005). Zeytin karasuyunda bulunan fenoller, depolama süresince, yıkımı oldukça zor olan yüksek moleköl ağırlıklı polimerlere polimerize olma eğilimindedirler (Morillo et al. 2009).

Zeytin karasuyunda tanımlanan ve miktarları belirlenen hidrofilik fenollerin yaygın grupları; fenolik alkoller, fenolik asitler, fenil alkoller, sekoiridoidler, flavonoidler ve lignanlardır. Zeytin karasuyunda 30'dan fazla fenolik bileşik tanımlanmıştır. Şekil 2.1'de, literatürde bulunan zeytin karasuyunda tanımlanmış temel fenolik bileşikler yer almaktadır (Niaounakis and Halvadakis 2006).



Şekil 2.1. Zeytin karasuyunda bulunan temel fenolik bileşikler (Niaounakis and Halvadakis 2006)

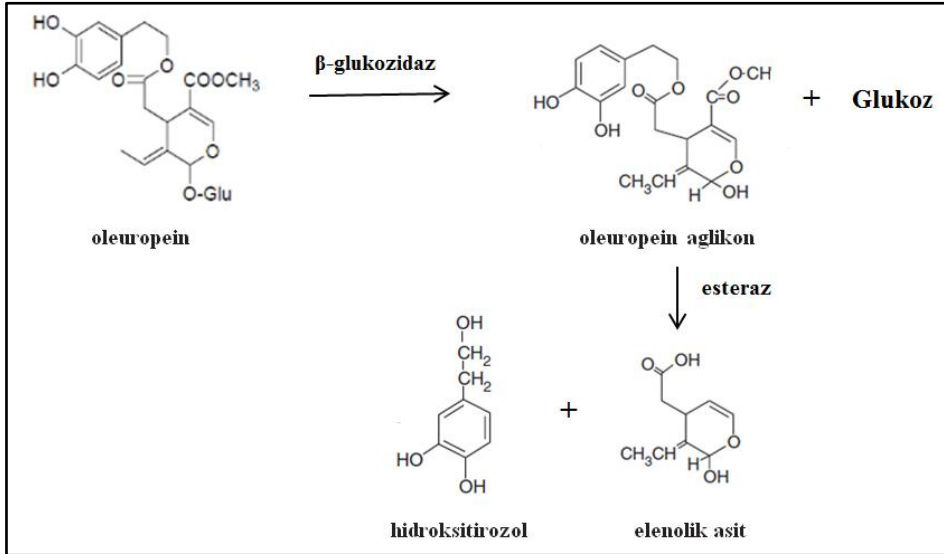
Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklerin bir grubu, sinamik asitten türevlenmiştir. Bu grup; *o*- ve *p*- kumarik asit (4-hidroksisinamik asit), kafeik asit (3,4-dihidroksisinamik asit) ve ferulik asitten (4-hidroksi-3-metoksisinamik asit) oluşmaktadır. Zeytin karasuyunda bulunan diğer grup fenolik bileşenler ise benzoik asitten türevlenmiştir. Bu grup ise; protokateşuik asit, tirozol ve hidroksitirozol gibi β -3,4-dihidroksifeniletanol türevlerinden oluşur. Zeytin karasuyunda bulunan diğer fenoller; kateşol, 4-metilkateşol, *p*-kresol ve resorsinoldür (Niaounakis and Halvadakis 2006).

Zeytin karasuyuda bulunan fenolik bileşikler antioksidan özelliğindedir. Antioksidanlar düşük derişimlerinde, yükseltgenebilen substratlar ile karşılaştırıldığında, pro-oksidanın başlattığı substratın oksidasyonunu önemli ölçüde önleyen ya da geciktiren maddelerdir. Pro-oksidanlar, lipidlerde, proteinlerde ve nükleik asitlerde oksidatif hasara neden olan ve bunu çeşitli patolojik olaylarla ve/veya hastalıklarla sonuçlandıran toksik maddelerdir. Kimyasal olarak, pro-oksidanlar patolojik öneme sahip oksidanlardır. Antioksidanlar, toksisiteye sahip olmayan ya da düşük toksisiteye sahip olan ürün oluşumu ile pro-oksidanları etkin bir şekilde indirgerler (Prior et al. 1999). Antioksidanlar, metabolizma için ve günlük hayatı kolaylaştırmada büyük bir öneme sahiptir. Canlılar için savunma sistemi olarak görev yaptıkları gibi, endüstriyel alanda özellikle gıda sektörü ve plastik sektöründe katkı maddesi olarak görev almaktadırlar.

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşikler arasında hidroksitirozol (3,4-dihidroksifeniletanol), antioksidan özelliği nedeni ile dikkat çekici bir bileşiktir. Hidroksitirozol, güçlü antioksidan aktivitesine sahiptir ve insan sağlığı için önem arz eder. *In vitro*'da yapılan çalışmalar sonucunda, hidroksitirozolün düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunu inhibe ettiği, serbest radikalleri bağladığı, trombositlerin bir araya gelmesini inhibe ettiği, insan nötrofilleri için lökotrien ürettiği ve hücre korumasını sağladığı görülmüştür. Hidroksitirozolün ayrıca, *in vitro* çalışmalar ile gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel ajan olduğu ispatlanmıştır (Allouche et al. 2004).

Hidroksitirozol son zamanlara kadar ticari olarak bulunmazken, son zamanlarda araştırmalarda kullanılmak üzere ticari olarak sağlanabilmekte (1000-2000 \$/g) ve antioksidan olarak farklı markalarda piyasada bulunmaktadır (Obied et al. 2005). Hidroksitirozol üretimi için farklı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler; kimyasal sentez, oleuropeinin hidrolizi, saflaştırılmış tirozinazın biyokatalizör olarak kullanımı ile enzimatik sentez, zeytin karasuyundan laboratuvar ölçekli saflaştırma ve iki-fazlı üretim prosesinin sıvı-katı atığının hidrotermal muamelesidir (Allouche et al. 2004).

Zeytin karasuyu, biyoaktif bir polifenol olan oleuropein aısından oldukça zengindir. Oleuropein, üç yapısal alt birimden oluşmaktadır. Bu alt birimler; bir polifenol olan hidroksitirozol, bir sekoiridoid olan elenolik asit ve glukozdur (Şekil 2.2). Hidroksitirozol zeytin ürünlerinde basit fenol olarak bulunabileceği gibi, elenolik asitle oleuropein oluşturmak üzere esterleşebilir ve aglikonu verbaskozid molekülünün parçası olabilir (Khoufi et al. 2011). Hidroksitirozolün zeytinyağının ekstraksiyonu sırasında esteraz aktivitesi ile oleuropeinin hidrolizi sonucu oluştuğu düşünölmektedir (Obied et al. 2005).

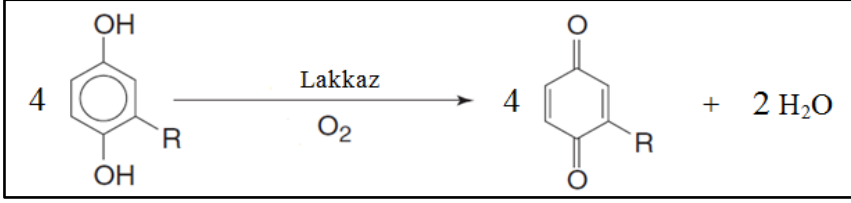


Şekil 2.2. Oleuropeinin β -galaktozidaz ve esteraz enzimleri ile hidrolizi (Khoufi et al. 2011)

Fki et al. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin karasuyu ekstraktında bulunan fenolik bileşenlerin antioksidan aktiviteleri, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki radikal tutma etkileri belirlenerek (IC₅₀) karşılaştırılmıştır. Buna göre; zeytin karasuyundan elde edilen *orto*-dihidroksillenmiş aromatik bileşenler, DPPH üzerinde yüksek aktivite sergilemiştir. Bu bileşiklerden hidroksitirozole ait IC₅₀ değeri 0.57 µg/mL, 3,4-dihidroksifenilasetik aside ait IC₅₀ değeri ise 0.64 µg/mL olarak belirlenmiştir. Ancak, sadece bir hidroksil fonksiyonuna sahip tirozol ve *p*-hidroksifenilasetik asite ait aktiviteler ise daha düşüktür; sırasıyla IC₅₀=10.9 ve 12 µg/mL'dir. Zeytin karasuyunda bulunan ferulik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit için elde edilen IC₅₀ değerleri de sırasıyla 1.21, 0.87 ve 9.50 µg/mL'dir.

Fenolik maddelerin parçalanmasında görev yapan enzimler, mikroorganizma türüne, kullanılan substrata ve koşullara göre değişmesine karşın genellikle oksidoredüktaz grubu enzimlerdir ve zeytin karasuyundaki fenollerin parçalanmasında başlıca lakkaz (EC 1.10.3.2), lignin peroksidaz (EC 1.11.1.14), mangan peroksidaz (EC 1.11.1.13) ve tirozinaz (polifenol oksidaz; monofenolaz: EC 1.14.18.1, difenolaz: EC 1.10.3.1) enzimleri aktivite gösterir. Ayrıca, hidrolaz sınıfında bulunan tannaz enzimi (EC 3.1.1.20) de zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşiklere etki edebilir.

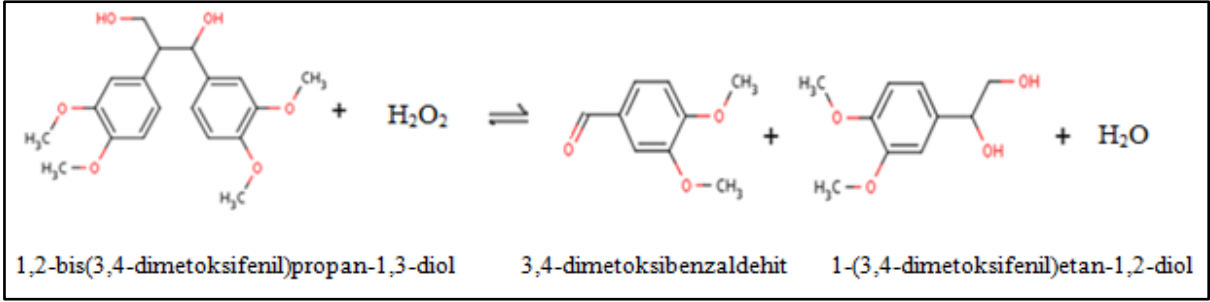
Lakkaz (benzendiol: oksijen oksidoredüktaz), katalitik merkezinde bakır atomları içeren, % 15-25'i glikoprotein olan, özellikle beyaz çürükçül funguslar ve yüksek bitkiler tarafından üretilen polifenol oksidaz grubuna ait hücre dışı bir enzimdir (Baldrian 2006, Rodriguez et al. 1997). Lakkaz, substratın oksidasyonun katalizlerken oksijenin suya indirgenmesini sağlar (Şekil 2.3). Genellikle substratı *p*-dihidroksi fenol ya da diğer fenolik bileşikler olabileceği gibi çevre kirliliğine yol açan fenolik olmayan bileşikler de olabilir. Tipik fungal lakkaz enzimi, yaklaşık 60-70 kDa ağırlığında bir proteindir, izoelektrik noktası pH 4.0 civarında ve optimum pH değeri asidik bölgededir. Aktivite gösterdiği sıcaklık 50-70°C arasında değişir (Baldrian 2006).



Şekil 2.3. Lakkaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Dwivedi et al. 2011)

Lakkazlar, biyoteknolojik uygulamalar için çeşitli avantajlar sunar; klorlanmış fenolikleri içeren ksenobiyotikleri, sentetik boyaları, pestisitleri ve polisiklik aromatik hidrokarbonları oksitleyebilirler (Baldrian 2006). Ayrıca, lakkazın olası bir fonksiyonu, funguslar için toksik olan ve ligninin yıkımı ile oluşan düşük molekül ağırlıklı kinonların ve fenollerin detoksifikasyonu olabilir (Rodriguez et al. 1997). Lakkazın düşük substrat spesifikliğı ve kirlilikleri öncelikli olarak okside edebilme yeteneğı, zeytin karasuyunun arıtımında da ilgi çekmektedir (Niaounakis and Halvadakis 2006). Lakkazlar, peroksidazlar gibi hidrojen peroksit ilavesine gerek duymadıkları için belirgin bir üstünlüğe sahiptirler ve tirozinazdan daha fazla çeşitte substrata etki ederler (D'Annibale et al. 2000).

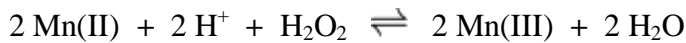
Lignin peroksidaz (1,2-bis(3,4-dimetoksifenil)propan-1,3-diol:hidrojen-peroksit oksidoredüktaz), bazı fungus türleri tarafından üretilen, lignin yıkımından sorumlu hücre dışı bir enzimdir (http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin_peroxidase., 2010). Lignin peroksidaz, lakkaz ve mangan peroksidaz enzimleri gibi düşük substrat spesifikliğine sahiptir (Crognale et al. 2006). Lignin peroksidaz enziminin katalizlediğı reaksiyon Şekil 2.4'te görülmektedir.



Şekil 2.4. Lignin peroksidaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (<http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=36999&type=I&displayType=marvin.>, 2010)

Farklı kaynaklardan elde edilen lignin peroksidaz enziminin, rekalsitrant aromatik bileşiklerin çeşitli türlerini mineralize ettiği ve fenolik bileşiklerin ve polisiklik aromatiklerin bir grubunu okside ettiği görülmüştür (Durán and Esposito 2000).

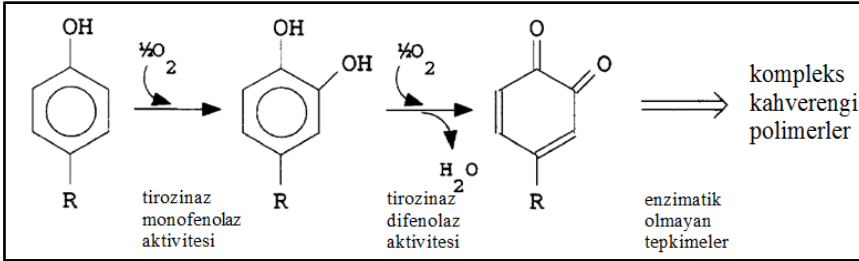
Mangan peroksidaz (Mn(II): hidrojen peroksit oksidoredüktaz), ligninolitik funguslar tarafından salgılanan, oksidoredüktaz sınıfına ait hücre dışı bir enzimdir. Hem proteininin glikozillenmesiyle oluşan bu enzimin molekül ağırlığı 40-50 kDa aralığında değişir. Mangan peroksidaz öncelikli olarak odun ve toprakta bulunan mangan (II) iyonlarını (Mn²⁺), okzalik asit gibi fungal şelatlayıcı ajanlar tarafından stabil hale getirilen oldukça reaktif Mn³⁺ iyonlarına oksitler (Şekil 2.5). Şelatlanmış Mn³⁺, düşük molekül ağırlığına sahip, difüze olabilen redoks-mediatörü gibi davranır. Bu mediatör, lignin yapısındaki fenoliklere atak yapar ve kendiliğinden parçalanmaya eğilimli kararsız serbest radikaller oluşur. Mangan peroksidaz, *in vitro* çalışmalarda tüm lignoselülozları olduğu gibi doğal ve sentetik ligninleri de okside eder ve depolimerizasyonunu sağlar (Hofrichter 2002).



Şekil 2.5. Mangan peroksidaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (<http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=40497&type=I&displayType=marvin.>, 2010)

Mangan peroksidaz enzimi, dikkat çekici bir parçalama potansiyeline sahiptir. Ligninle birlikte çeşitli organik kirlilikleri oksitler ve lignin sülfonik asitlerinin uzaklaştırılması için atık su arıtımı gibi biyoteknolojik uygulamalarda, koyun yününden bitki atıklarını uzaklaştırmada, tehlikeli kimyasalların eliminasyonunda kullanılır (Nüske et al. 2002).

Tirozinaz, monofenolaz (monofenol, L-DOPA: oksijen oksidoredüktaz) ve difenolaz (1,2-benzendiol: oksijen oksidoredüktaz) olmak üzere iki farklı enzim aktivitesine sahip, bakır içeren oksidoredüktaz sınıfı bir enzimdir. Tirozinaz, ortamda bulunan monofenollerin *o*-difenollere *orto* hidroksilasyonunu monofenolaz (krezolaz) aktivitesi ile, oluşan *o*-difenollerin *o*-kinonlara oksidasyonunu ise difenolaz (kateşolaz) aktivitesi ile katalizler (Şekil 2.6). Oluşan *o*-kinonlar kararlı değildir ve zamanla enzimatik olmayan polimerizasyon reaksiyonlarıyla kahverengi pigmentlere dönüşürler (Espín et al.2001).

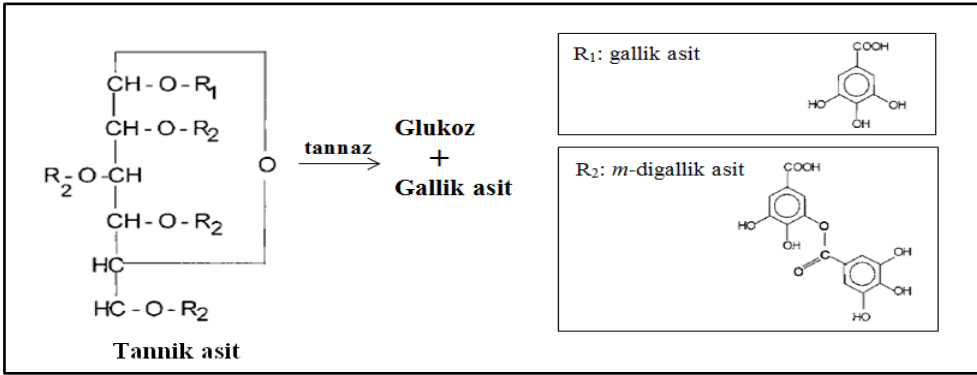


Şekil 2.6. Tirozinaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Van Gelder et al. 1997)

Son zamanlarda, endüstriyel uygulamalarda tirozinaz kullanımına ilgi artmaktadır. Çay, kahve, kakao gibi bitki türevli gıda ürünlerinde farklı organoleptik özellikler üretilmesinde geleneksel olarak tirozinazlar kullanılmaktadır. Bununla birlikte, sebze ve meyvelerde meydana gelen esmerleşme reaksiyonları tirozinaz enzimi ile ilişkili olduğundan, gıda endüstrisinde tirozinaz enzim aktivitesi kontrolü için yöntemler araştırılmaktadır. Tirozinazlar çapraz bağlama yeteneğine sahip oldukları için, gıda ve gıda dışı proseslerde ilginç

uygulamalarda kullanılabilirler. Tirozinazların peptidler, proteinler ve karbohidratlar arasında kovalent bağ oluşumunu katalizlediği gösterilmiştir (Selinheimo et al. 2007).

Tannaz (tannin açilhidrolaz); tannik asit, metil gallat, etil gallat, *n*-propil gallat ve izoamil gallat gibi hidrolizlenebilen tanninlerin yıkımını katalizleyen hidrolaz sınıfı hücre dışı bir enzimdir. Tannaz, tannik asidin ester bağlarına etki ederek, tannik asidi gallik asit ve glukoz hidrolizler (Şekil 2.7). Tannaz; bakteriler, mayalar ve funguslar tarafından üretilir (Aguilar et al. 2007).



Şekil 2.7. Tannaz enziminin genel kataliz reaksiyonu (Mondal et al. 2001)

Tannaz enzimi, farklı uygulama alanlarına sahiptir. Uygulamaların başında, çabuk çay üretiminde kullanılması gelmektedir. Yiyecek ve içecek sektöründe, tanninlerin istenilmeyen etkilerini gidermek için kullanılır. Bir diğer önemli uygulama alanı ise, gallik asit ve propilgallat üretimidir. Gallik asit, farmasötik endüstrisinde antibakteriyel ilaçların sentezi için kullanılmaktadır. Propilgallat ise gıda antioksidanı olarak önem teşkil eder (Belmares et al. 2004).

2.3. *Debaryomyces hansenii* ve *Rhodotorula glutinis*

Debaryomyces hansenii, patojenik olmayan, 4 M derişime kadar NaCl'ye dayanıklı bir maya türüdür. *D. hansenii*, ekstremofilik bir mayadır; osmotolerant, kserotolerant ve halotolerant özelliktedir ve ayrıca yağ biriktirebilme özelliğine sahiptir. Biyoteknolojik uygulama alanı çok geniş olan *D. hansenii* başlıca; süt ürünlerinin üretiminde, et fermentasyonunda, litik enzim, değerli kimyasal ve alditol üretiminde kullanılmaktadır (Breuer and Harms 2006).

Rhodotorula glutinis, 'pembe maya' olarak bilinmektedir. *R. glutinis*, karotenoid üreten (özellikle β -karoten), yağ biriktirebilme özelliğine sahip bir mayadır (Aksu ve Eren 2007).

Debaryomyces hansenii ve *Rhodotorula glutinis* mayaları, daha önce zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmamışlardır. Ancak her iki maya türünün de fenolik bileşenleri kullandığı bilgisi literatürde yer almaktadır. *D. hansenii*'nin fenolik yapıdaki maddeleri dönüşüme uğrattığı, Mathew et al. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada fenolik yapıdaki ferulik asitin yine fenolik yapıdaki guaiakol ve vanillin metabolitlerine dönüşümü yer almaktadır. Ayrıca, *D. hansenii*'nin geniş bir substrat spektrumuna ve çevre çalışmalarında kullanım potansiyeline sahip olduğu (Breuer and Harms 2006) ve tannaz enzimi içerdiği bilgilerine ulaşılmıştır (http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BXU9#section_name, 2009). *R. glutinis* için ise, Katayama-Hirayama et. al (1995) tarafından yapılan çalışmada karbon kaynağı olarak fenolü kullandığı, Gupta et al. (1986) tarafından yapılan çalışmada fenolik yapıdaki sinapik asiti parçaladığı ve Walker (1973) tarafından yapılan çalışmada ise klorofenolleri metabolize ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, lakkaz enzimi içerdiği bilgisine ulaşılmıştır (<http://www.uniprot.org/uniprot/B2DFU1>, 2009).

2.4. Zeytin Karasuyunun Funguslarla Biyoarıtımı

Zeytin karasuyunun arıtımında, farklı mikroorganizmalar (bakteriler ve funguslar) ve farklı prosesler denenmiştir. Biyolojik arıtım prosesleri, zeytin karasuyu arıtımında önemli ölçüde KOİ, fenol ve renk giderimi sağlayarak etkin bir uygulama oluşturmaktadır (McNamara et al. 2008). Funguslar ile yapılan arıtımlarda, etkin bir şekilde KOİ ve toksisite giderimi sağlandığı görülmüştür.

Zeytin karasuyunun funguslarla biyoarıtımında; beyaz çürükçül mantarlar, *Aspergillus* sp. ve farklı maya türleri olmak üzere üç tip organizma ile çalışılmıştır. Funguslar, KOİ giderimi ve basit fenoliklerin uzaklaştırılması dışında, zeytin karasuyunun renk gideriminde de etkindirler (McNamara et al. 2008).

Yeşilada vd (1995) yaptıkları çalışmada, beyaz çürükçül mantar türü olan *Funalia trogii* ile zeytin karasuyu biyoarıtımında, statik işletimde % 31 renk ve % 77 fenol giderimi; karıştırmalı işletimde % 38 renk ve % 72 fenol giderimi ile birlikte % 40 KOİ giderimi sağlamışlardır.

Sayadi and Ellouz (1995) yaptıkları çalışmada, *Phanerochaete chrysosporium* kullanarak zeytin karasuyunun renk giderimine mangan peroksidaz ve lignin peroksidaz enzimlerinin etkilerini incelemişlerdir. *P.chrysosporium* yüksek düzeyde Mn(II) derişimi içeren ortamda yüksek düzeyde mangan peroksidaz enzimi (0.65 mM) üretmesine karşın zeytin karasuyunda düşük düzeyde (% 25) renk giderimi sağlanmıştır. Bunun aksine, *P.chrysosporium* düşük düzeyde Mn(II) derişimi içeren ortamda yüksek düzeyde lignin peroksidaz enzimi (0.3 mM) üretmiş, zeytin karasuyunda yüksek düzeyde (%70'ten fazla) renk giderimi sağlanmıştır. Kültür ortamında, artan Mn(II) derişimi ile birlikte zeytin karasuyunun renk giderimi ve lignin peroksidaz aktivitesi azalmaktadır.

Tsioulpas et al. (2002) yaptıkları çalışmada, *Pleurotus* türlerinin zeytin karasuyundan fenollerini uzaklaştırabilme yeteneğini incelemişlerdir. Mikroorganizmaların, sterilizasyon dışında herhangi bir ön işlem görmemiş ve herhangi bir ek besin içermeyen zeytin karasuyunda çoğalma yetenekleri test edilmiştir. 10-14 gün sonunda çoğalma ortamlarında (% 75 ZK) ölçülen en yüksek lakkaz aktivitesi (110.3-301.7 U/L) ile başlangıçtaki fenolik bileşenlerin % 69-76'sı giderilmiş ve zeytin karasuyunun siyah rengi sarı-kahverengi olmuştur.

Literatürde, zeytin karasuyu arıtımında *Rhodotorula glutinis* ve *Debaryomyces hansenii* mayalarının kullanımına dair bilgi olmadığı gibi, tirozinaz enziminin etkisi hakkında da herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu bölümde funguslar ile zeytin karasuyunun biyoarıtımında enzimatik değişimleri inceleyen örnek bir çalışma olarak olarak *Trametes versicolor*'un kullanımı özetlenmiştir.

Ergül vd (2009), yaptıkları çalışmada beyaz çürükçül mantar türü olan *Trametes versicolor*'u zeytin karasuyu ortamına adapte ettikten sonra kullanarak, zeytin karasuyunun fenolik içeriğini azaltmayı amaçlamışlardır. Bu doğrultuda karıştırılmalı ve durağan işletimde erlenlerde ve karıştırılmalı tank reaktöründe farklı biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir.

İki kat seyreltilmiş 50 mL zeytin karasuyu ile 20 gün boyunca karıştırılmalı (200 rpm, 26°C) ve durağan (26°C) olarak erlenlerde yapılan biyoarıtımlar süresince, zamanla toplam fenol derişimi, renk, toplam şeker miktarı derişimi ile lakkaz aktivitesi ve mangan peroksidaz enzim aktivitelere ait derişimler incelenmiştir. Karıştırılmalı erlen denemelerinde, toplam fenol giderimi inkübasyonun 2. gününde, renk giderimi ise inkübasyonun 3. gününde başlamıştır. İnkübasyon periyodunun sonunda, maksimum toplam fenol giderimine (% 83.5) ve maksimum renk giderimine (% 63) ulaşılmıştır. Ayrıca, kültür ortamında lakkaz ve mangan peroksidaz enzim aktiviteği görülmüş ancak lignin peroksidaz enzim aktivitesi görülmemiştir. Lakkaz enzim aktivitesi, inkübasyonun 3. gününde saptanmış, 6. güne kadar artarak maksimum seviyeye ulaşmış ve 7. gün ile birlikte azalmaya başlamıştır. Diğer yandan

maksimum mangan peroksidaz enzim aktivitesi (88.34 ± 7.10 U/L), inkübasyonun 4. gününde ölçülmüştür.

Karıştırmalı erlen denemelerine paralel olarak yapılan durağan kültür denemelerinde, benzer sonuçlar elde edilmiştir. Toplam fenol içeriği düşerken lakkaz aktivitesi artmış ve 9. günde maksimum aktivite değerlerine ulaşılmıştır (881.60 ± 64.2 U/L). Maksimum mangan peroksidaz aktivitesi (50.10 ± 4.41 U/L) ise inkübasyonun 14. gününde görülmüştür.

Seyreltilmemiş zeytin karasuyu (50 mL) kullanılarak yapılan erlen denemelerinde, 16 gün boyunca zamanla toplam fenol derişimi, renk, toplam şeker miktarı değişimi ile lakkaz ve mangan peroksidaz aktiviteleri incelenmiştir. İki kat seyreltilmiş zeytin karasuyu ile yapılan biyoarıtım sonucu elde edilen toplam fenol giderimi % 85 iken, seyreltilmemiş zeytin karasuyu ile yapılan biyoarıtım sonrası elde edilen toplam fenol giderimi % 78'dir. Seyreltilmemiş zeytin karasuyu ortamında maksimum lakkaz enzim aktivitesi (734.12 ± 38.22 U/L) ve mangan peroksidaz enzim aktivitesi (120.05 ± 10.81 U/L) inkübasyonun 11. gününde ölçülmüştür.

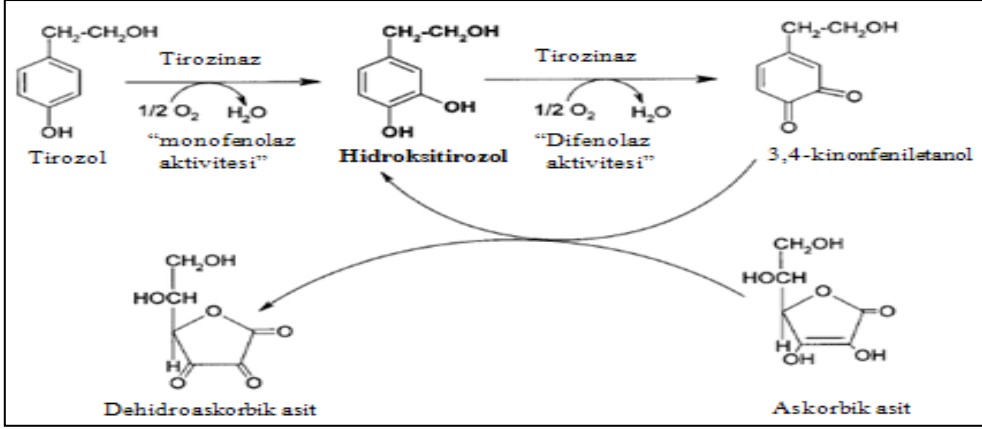
Karıştırmalı tank reaktöründe yapılan biyoarıtımlarda seyreltilmemiş zeytin karasuyu kullanılarak farklı havalandırma hızlarının (0, 0.1, 0.25, 0.5 ve 1.0 vvm) çalışmada zamanla değişimi incelenen parametrelere etkisi incelenmiştir. Bunun sonucunda, havalandırma yapılmadığı zaman toplam fenol giderimi, renk giderimi ve toplam şeker miktarı azalmasının sağlanamadığı ve lakkaz ile mangan peroksidaz enzim aktivitelerinin olmadığı görülmüştür. 0.25 vvm havalandırma hızının çok etkili olduğu görülmüştür.

2.5. Mikrobiyal Aktivite ile Hidroksitirozol Birikimi

Zeytin karasuyunda hidroksitirozol ve hidroksitirozolün öncülü olan tirozolün bulunması, zeytin karasuyunun hidroksitirozol eldesi için önemli bir kaynak olduğuna dikkati çekmektedir. Bu doğrultuda, mikrobiyal aktivite ile farklı yöntemler kullanılarak hidroksitirozol birikimi sağlanabilir.

2.5.1. Saflaştırılmış enzim kullanılarak hidroksitirozol üretimi

Espín et al. (2001), hidroksitirozolu, tirozinaz ve askorbik asit varlığında, monofenolik öncül tirozolden elde etmişlerdir. Çalışmada ticari olarak sağlanan tirozinaz enzimi, bir monofenol olan tirozolün bir *o*-difenol olan hidroksitirozole *orto*-hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) ve hidroksitirozolün bir *o*-kinon olan 3,4-kinonfeniletanole oksidasyonunu (difenolaz aktivitesi) katalizlemektedir (Şekil 2.8). Oluşan *o*-kinon kararlı değildir ve zamanla enzimatik olmayan reaksiyonla kahverengi pigmentlere dönüşür. Bu dönüşümü engellemek için reaksiyona askorbik asit eklenmiştir. Bu koşullar altında reaksiyon ilerlememiş ve *o*-kinon hidroksitirozole indirgenmiştir; böylece sistemde oluşan denge ile tirozol ve askorbik asit derişimleri azalırken hidroksitirozol birikmiştir (Şekil 2.8). Ortamda askorbik asit olduğu sürece hidroksitirozol birikimi devam etmiştir.



Şekil 2.8 Tirozinaz ve askorbik asit varlığında hidroksitirozolün öncülü olan tirozolden üretimi (Espín et al. 2001)

2.5.2. Mikroorganizmalar kullanılarak hidroksitirozol üretimi

Allouche et al. (2004), *Pseudomonas aeruginosa* bakterisi ile öncül olarak sentetik tirozol kullanarak hidroksitirozol sentezini gerçekleştirmiştir. *P.aeruginosa* tarafından hidroksitirozol üretimi, daha önceden durağan faza kadar çoğaltılmış hücreleri içeren kültür ortamına tirozol eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hidroksitirozol verimini yükseltmek ve sonrasında hücreler tarafından yıkımını önlemek için, dinlenen hücreler kullanılmıştır. Çoğalma süresince tirozolu kullanan hücreler, önemli miktarda hidroksitirozol, az miktarda *p*-hidroksifenilasetik asit ve 3,4-dihidroksifenilasetik asit oluşumu gerçekleştirmişlerdir. Ön çoğalma ortamından reaksiyon ortamına aktarılan *P. aeruginosa* hücrelerinin aktarım sırasındaki çoğalma evrelerinin, üretim ortamına eklenen karbon kaynağının (glukoz, tirozol, kateşol, *p*-hidroksibenzoik asit, *p*-hidroksifenilasetik asit, *p*-kumarik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit), reaksiyon ortamına eklenen tirozol derişiminin ve üretim ortamına eklenen biyokütle derişiminin hidroksitirozol üretimine etkileri incelenmiştir. Çoğalma evrelerinin etkisi incelendiğinde, maksimum düzeyde hidroksitirozol birikimi (1.4 g/L) logaritmik artış fazının sonunda bulunan hücrelerin kullanıldığı ortamda, % 70 biyodönüşüm verimi ile elde edilmiştir. Üretim ortamındaki karbon kaynaklarının etkisi incelendiğinde, maksimum düzeyde hidroksitirozol birikimi % 70 biyodönüşüm verimi ile tirozol varlığında elde edilmiştir. Tirozol derişiminin etkisi

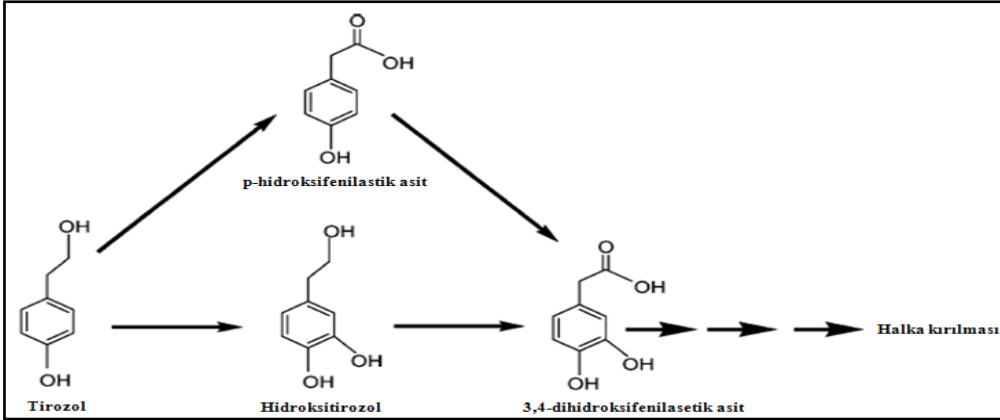
incelendiğinde ise maksimum biyodönüşüm verimi (% 82) 4 g/L tirozol derişimde elde edilmiştir. Maksimum hidroksitirozol veriminin 4 g/L'ye kadar olan tirozol ile arttığı, tirozol miktarının fazlasının (>4 g/L) ise toksik etki yaptığı görülmüştür. 5 g/L yaş ağırlığa sahip biyokütle ile çalışıldığında, % 96 biyodönüşüm verimi elde edilmiştir. Çalışmada, *P. aeruginosa* bakterileri ile yüksek verimle hidroksitirozol üretimi gerçekleştirilmiştir. Hidroksitirozol, bu bakteriler tarafından kolayca yıkılabileceğinden, dinlenen hücreler kullanılmış ve böylece yüksek verim elde edilmiştir.

Brooks et al. (2006), tirozinaz aktivitesine sahip *Pseudomonas putida* F6 hücre özütlerini kullanarak, hücre özütlerini kalsiyum aljinat matrise immobilize etmişlerdir. *P.putida*'ya ait immobilize hücre özütleri, immobilize olmayan hücre özütlerinden tirozolu substrat olarak % 21 daha fazla tüketmişlerdir; ancak, yaklaşık aynı düzeyde hidroksitirozol birikimi gözlenmiştir. Tirozolün substrat olarak kullanılarak tamamının uzaklaştırılması ve maksimum hidroksitirozol birikiminin sağlanması için farklı yaklaşımlar denenmiştir. Bu yaklaşımlar; askorbik asit ilavesi, immobilize hücre özütlerinin yıkanması ve tekrar kullanılması, biyolojik olarak dönüşümün sağlanması için taze immobilize hücre özütlerinin eklenmesi ve başlangıç tirozol derişiminin değişimidir. Çalışmada kullanılan *P.putida* F6, topraktan izole edilmiş ve *P.putida* F6, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece fenilasetik asit bulunan kesikli kültürde çoğaltılarak üretim için serbest ve kalsiyum aljinat boncuklara tutuklanarak içerisinde tirozol bulunan ortama aktarılmıştır. İmmobilize bakteriyel tirozinaz aktivitesi ile tirozol dönüşümünün optimizasyonu, substratın tamamının uzaklaştırılması ve askorbik asit varlığında toplam % 77 verim ile sonuçlanmıştır. Hidroksitirozolün üretim ortamından geri kazanımı, basit katı faz ekstraksiyonu ile sağlanmıştır.

Bouallagui and Sayadi (2006) yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa*'yı kalsiyum aljinat boncuklara immobilize ederek, immobilize hücrelerle tirozol üzerinden hidroksitirozol üretimini gerçekleştirmişlerdir. Tirozolün hidroksitirozole biyodönüşümü, *P. aeruginosa*'ya ait dinlenen hücrelerin kalsiyum aljinat boncuklara immobilize edilmesiyle başarılmıştır. İmmobilizasyon, hücrelere serbest hücrelere göre daha fazla tirozol tolere edebilme avantajı

sağlamaktadır. Kesikli sistemde, 5 g/L tirozol varlığında, kalsiyum aljinat boncuklara immobilize edilen hücreler ile % 86 biyodönüşüm verimine ulaşılmıştır. Çalışmada, *P.aeruginosa*, 5 sene boyunca zeytin karasuyu ile sulanan (100 m³/st) topraktan izole edilmiş, karbon ve enerji kaynağı olarak sadece tirozol kullanılmıştır. Tirozol hidroksilasyonu, tirozol bulunan minimal ortamda logaritmik fazın sonuna kadar çoğalan hücreler tarafından gerçekleştirilmiştir. Serbest hücreler ortamdan alınıp üretim ortamına aktarıldığında, 4 g/L tirozol varlığında 7 st inkübasyon sonunda % 86 hidroksitirozol verimi elde edilmiştir. Logaritmik fazın sonunda kalsiyum aljinata immobilize edilmiş hücreler ile 2 g/L tirozol varlığında 20 st inkübasyon sonunda % 70 hidroksitirozol verimine ulaşılmıştır. Hidroksitirozol oluşumuna inokulum miktarının etkisini incelemek için, biyodönüşüm ortamına farklı oranlarda (% 10, 20 ve 30 (h/h)) kalsiyum aljinat boncukları ortama verilmiştir. Sonuçlar, hidroksitirozol veriminin boncuk inokulum miktarı ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Maksimum hidroksitirozol verimi, % 20 (h/h) inokulum miktarı ile elde edilmiştir. Hidroksitirozol üretimi ve tirozol derişimi arasındaki ilişki, 2-6 g/L arasında değişen tirozol derişimleri denenerek incelenmiştir. Biyodönüşüm ortamının tirozol derişimi arttıkça, hidroksitirozol veriminin de arttığı görülmüştür. Ancak en yüksek hidroksitirozol verimi (% 86), 5 g/L derişiminde tirozol varlığında immobilize hücreler kullanılarak elde edilmiştir. Bu derişimin üzerinde, hidroksitirozol ciddi bir şekilde azalmaktadır.

Bouallagui and Sayadi (2006) tarafından yapılan bu çalışmada, tirozolün biyodönüşümü üzerinden hidroksitirozol üretimi için serbest ve immobilize hücreler kullanılmıştır. Hidroksitirozol, tirozol yıkımı yol izinin bir ara ürünü olarak tanımlanmaktadır. Çalışmanın deney şartları altında, hidroksitirozolün 3,4-dihidroksifenilasetik asit vermek üzere daha ileri okside olduğu bulunmuştur. *P.aeruginosa*'da aromatik bileşiklerin metabolik yolizi incelenebilir. Ancak, reaksiyona oksijen ilavesi yapıldığında, tirozol *p*-hidroksifenilasetik asite ve 3,4-dihidroksifenilasetik asite dönüşür (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. *P.aeruginosa* tarafından tirozol metabolizması için önerilen yol izi (Bouallagui and Sayadi 2006)

Allouche and Sayadi (2005) yaptıkları bir çalışmada, tirozol izomerlerinin *Serratia marcescens* bakterileri tarafından dönüşümü ile yüksek katma değere sahip fenolik bileşiklerin üretimi için etkili bir yöntem araştırmışlardır. *S.marcescens*, bir toprak bakterisi grubudur ve *p*-tirozolu (4-hidroksifeniletanol) tek karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak çoğalmalarına göre izole edilmiştir. *S.marcescens* suşunun *p*-tirozol varlığında çoğalması, hidroksitirozol oluşumunun artması ile sonuçlanabilir. Hidroksitirozolün optimum verimi (%80), 1 g/L *p*-tirozol bulunan ön çoğalma ortamına, logaritmik artış fazının sonunda 2 g/L *p*-tirozol eklenmesiyle 7 st inkübasyon sonunda elde edilmiştir. Ayrıca substrat spesifikliği, *m*-tirozolün (3-hidroksifeniletanol) ve *o*-tirozolün (2-hidroksifeniletanol) substrat olarak kullanılmasıyla incelenmiştir. *S.marcescens* suşu, *m*-tirozol ve *o*-tirozolu, kullanılan substratın yan zincirindeki karbonlarını oksitleyerek 3-hidroksifenilasetik asite ve 2-hidroksifenilasetik asite tamamen dönüştürmüştür. Yapılan bu çalışmada, öncül olarak *p*-tirozol (4-hidroksifeniletanol), *m*-tirozol (3-hidroksifenilasetik asit) ve *o*-tirozol (2-hidroksifeniletanol) kullanılarak; hidroksitirozolün, 2-hidroksifenilasetik asitin ve 3-hidroksifenilasetik asitin basit mikrobiyal dönüşüm ile sentezlenmesiyle ilgilenilmiştir. *S.marcescens* suşu tarafından gerçekleştirilen hidroksilasyon reaksiyonunun substrat spesifikliğini görmek için, *m*-tirozolün (3-hidroksifeniletanol) ve *o*-tirozolün (2-hidroksifeniletanol) biyodönüşümü incelenmiştir. GC-MS analizleri ile *m*-tirozolün ve *o*-tirozolün *S.marcescens* tarafından 3-hidroksifenilasetik asit ve 2-hidroksifenilasetik asite dönüştürüldüğü görülmüştür. Bu sonuç, *S.marcescens*'in, var

olan hidroksil grubu sadece *para* pozisyonunda olduğunda (*p*-tirozol) aromatik halkayı hidroksillediğini göstermektedir. Diğer iki izomer ile (*m*-tirozol ve *o*-tirozol), yan zincirdeki karbon atomu asetik asite okside olur. *S.marcescens* suğu tarafından *p*-tirozolün hidroksilasyonu, substrat spesifik bir reaksiyondur. *S.marcescens* suğu, bütünüyle *m*-tirozol ve *o*-tirozölü 3-hidroksifenilasetik asit ve 2-hidroksifenilasetik asite aromatik bileşikleri kullanmadan dönüştürmüştür. Maksimum 3-hidroksifenilasetik asit ve 2-hidroksifenilasetik asit derişimleri (1.1 g/L), 4.5 st sonrasında % 100 molar verime ulaşmıştır. Ayrıca, *m*-tirozolde başlangıçta ve *o*-tirozolde 4 st sonrasında biyodönüşüm reaksiyonları başlamıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, ticari olarak sağlanan farklı maya türleri *Rhodotorula glutinis* (DSM 70398) ve *Debaryomyces hansenii* (NRRL Y-7426) kullanılmıştır. Ortam hazırlama ve analizlerde kullanılan kimyasallar analitik saflıkta, biyokimyasallar mikrobiyolojik saflıkta, HPLC analizlerinde kullanılan çözücüler ise kromatografik saflıktadır (EK 1). Zeytin karasuyu, Biyolojik Bilimler Araştırma Geliştirme ve Üretim A.Ş. tarafından Taylıeli Zeytin ve Zeytinyağı İşletmesi'nden (Burhaniye/Balıkesir) (iki ve üç fazlı üretim) sağlanmıştır. Çalışmada ZK1 (pH 4.33, toplam fenol derişimi: 400 mg/L) ve ZK2 (pH 4.30, toplam fenol derişimi: 1810 mg/L) olarak adlandırılan farklı üretim dönemlerine ait zeytin karasuları kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ticari fenol parçalayıcı enzimler ile zeytin karasuyunun biyoarıtımının incelendiği ortamlar

Fenol parçalayıcı özellikteki enzimlerden tirozinaz, lakkaz (katı ve sıvı formda), mangan peroksidaz ve tannaz enzimlerinin, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlere etkisini belirleyebilmek amacıyla, zeytin karasuyu ile bu enzimlerin ticari formları muamele edilmiştir. Bu doğrultuda, 100 mL'lik erlenlerde, 20 mL'lik biyoarıtım ortamları, +4°C'de 12000xg'de (10000 rpm) santrifüjlenmiş (Hettich Rotina 35 R) zeytin karasuyuna farklı aktivitelere sahip enzimler (etiketteki aktivitelere göre; tirozinaz: 564 U (0.3 mg), lakkaz

(katı form): 3.5 U (5.3 mg), lakkaz (sıvı form): 3150 LAMU (3 mL), mangan peroksidaz: 0.02 U (0.2 mg) ve tannaz: 3.2 U (8.6 mg)) eklenerek hazırlanmıştır.

Tirozinaz enziminin zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlere etkisi belirlendikten sonra biyoyarıtım ortamlarına askorbik asit eklenerek, ortamda hidrokstirozol birikimi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 20 mL zeytin karasuyuna tirozinaz (564 U) ve farklı derişimlerde askorbik asit (2, 5 ve 10 mM) eklenerek paralel deneyler yapılmıştır.

Enzimatik reaksiyonların tümü, 30°C'de 150 rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda (Edmund Bühler TH 30 ve Shel Lab S16/S16R) 24 st süre ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Mikroorganizmaların saklanması ve çoğalma ortamları

3.2.2.1. Mikroorganizmaların saklanması

Mikroorganizmaların uzun süre aktivitelerini kaybetmeden saklanabilmesi için, zeytin karasuyu ile hazırlanan, agar içeren katı besi ortamları (10 g/L glukoz, 5 g/L pepton (soybean), 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü ve 20 g/L agar) ile ticari olarak sağlanan boncuklar (Pro-Lab Diagnostics Microbank™) kullanılmıştır. Belirli periyodlar ile agar içeren besi ortamında bulunan mikroorganizmalar, agar içeren yeni besi ortamlarına aktararak tazelenmiştir. Agar içeren katı besi ortamında bulunan mikroorganizmalar +4°C'de, mikroorganizmaların tutuklandığı boncuklar -30°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.2. Ön çoğalma ortamı

Ön çoğalma ortamı, mikroorganizmaların biyoarıtım ortamına aktarılmadan önce aktif hale geçirilmesi ve sayıca arttırılması için kullanılan ortamdır. *R. glutinis* için katı ve sıvı olmak üzere iki farklı ön çoğalma ortamı, *D. hansenii* için ise yalnızca katı ön çoğalma ortamı kullanılmıştır. Her iki maya türü için katı ön çoğalma ortamı olarak, agar içeren katı besin ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan katı ortamlar, 10 g/L glukoz, 5 g/L pepton (soybean), 3 g/L maya özütü, 3 g/L malt özütü ve 15 g/L agar içeren UYM'den (Universal Yeast Medium) farklı olarak, 20 g/L agar içerecek şekilde, distile su yerine, +4°C'de 12000xg'de (10000 rpm) santrifüjlenmiş zeytin karasuyu ile hazırlanmıştır. Ortamlar 121°C'de 20 dk süreyle otoklavda (ALP CL-40M Sterilizatör) sterilize edilerek, laminer akış kabininde (BIOLAB Faster BHG 2004) tüplere dökülmüştür. Tüpler eğik konuma getirilerek oda sıcaklığında agarın donması beklenmiştir. Hazırlanan eğik agarlar donduktan sonra laminer akış kabininde, daha önceden çoğaltılmış olan mikroorganizmalar +4°C'den alınarak agarlara ekilmiştir. 30°C'de 24 st süre ile inkübe edilen (Friocell 222) mikroorganizmaların ön çoğalması tamamlanmıştır.

R. glutinis için ayrıca, % 50 ZK içeren biyoarıtım ortamına aktarılmak üzere bir sıvı ön çoğalma ortamı hazırlanmıştır. Sıvı ön çoğalma ortamı, 2 g/L amonyum sülfat ve 1 g/L maya özütü ile % 50 ZK içerecek şekilde hazırlanmıştır. Katı ön çoğalma ortamında 24 st inkübe edilen *R. glutinis* hücreleri, hazırlanan sıvı ön çoğalma ortamına aktarılarak 30°C'de 150 rpm karıştırma hızında 16 st inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ön çoğalma ortamından alınan 20 mL örnek,% 50 ZK içeren 180 mL biyoarıtım ortamına aktarılmıştır.

3.2.2.3. Sıvı çoğalma ve biyoarıtım ortamları

Sıvı ortamlar, iki farklı amaç doğrultusunda hazırlanmıştır. Birinci amaç, mikroorganizmaların çoğalması ile biyoarıtım gerçekleşirken, mikroorganizmaların gösterdiği fenol parçalayıcı

enzim aktivitelerini ve bu aktivitelerin sonucu ortamda meydana gelen fenolik değişimleri incelemeye yöneliktir. İkinci amaç ise, mikroorganizmalar ile biyoarıtım gerçekleştirilirken, ortama askorbik asit ilave edilmesi ile ortamda hidroksitirozol birikimini sağlamaya yöneliktir.

Birinci amaç doğrultusunda, *D. hansenii* için 1 g/L maya özütü, 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve % 25 zeytin karasuyu içeren sıvı ortamlar hazırlanmıştır. *R. glutinis* için ise 1 g/L maya özütü, 2 ya da 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ile farklı derişimlerde zeytin karasuyu içeren (% 5, 20, 25 ve 50) sıvı ortamlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ortamlar 121°C’de 20 dk otoklav ile sterilize edilmiş, ön çoğalmasını tamamlamış mikroorganizmalar laminar akış kabininde steril ortamlara inoküle edilmiştir.

İkinci amaç doğrultusunda, *D. hansenii* için 1 g/L maya özütü, 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve % 25 ZK içeren sıvı ortamlar hazırlanıp 121°C’de 20 dk sterilize edildikten sonra, ortamlara 30 dk süre ile UV ışık altında sterilize edilmiş farklı derişimlerde (50 ve 350 mg/L) askorbik asit eklenerek ön çoğalmasını tamamlamış mikroorganizmalar laminar akış kabininde steril ortamlara inoküle edilmiştir. *R. glutinis* için ise 1 g/L maya özütü, 2 ya da 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve farklı derişimlerde zeytin karasuyu (% 25, 50) içeren sıvı ortamlar hazırlanıp 121°C’de 20 dk sterilize edildikten sonra, ortamlara 30 dk süre ile UV ışık altında sterilize edilmiş farklı derişimlerde (50, 100, 200, 400 ve 1000 mg/L) askorbik asit eklenerek ön çoğalmasını tamamlamış mikroorganizmalar laminar akış kabininde steril ortamlara inoküle edilmiştir.

Biyoarıtımların tümü, 200 mL’lik ortamlar hazırlanarak 500 mL’lik erlenlerde, 30°C’de 150 rpm karıştırma hızında, çalkalamalı hava banyosunda gerçekleştirilmiştir. Zeytin karasuyu ortamlara aktarılmadan önce, +4°C’de 12000xg’de (10000 rpm) santrifüjlenmiştir.

3.2.3. Dinlenen *R. glutinis* hücreleri ile hidrokstirozol üretimi için çoğalma ve üretim ortamları

Dinlenen hücre, çoğalma periyodunu tamamlamış, aktif olarak çoğalmayan hücrelerdir. *R. glutinis* ön çoğalma ortamından (katı) sıvı çoğalma ve biyoarıtım ortamlarına (% 25 ZK, 1 g/L maya özütü, 5 g/L (NH₄)₂SO₄) aktarılıp logaritmik artış fazının sonuna değin çoğaltıldıktan sonra (t=44. st) hücreler, 500xg'de (417 rpm) 10 dk 3 kez santrifüjlenip 50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponu ile yıkanmış, iki farklı derişimde tirozol (1 ve 0.1 g/L) ve zeytin karasuyu (%100) ekstraktı içeren 50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponuna alınmıştır. Ayrıca, 0.1 g/L tirozol içeren ortama 30 dk süre ile UV ışık altında sterilize edilmiş askorbik asit (4000 mg/L) eklenerek ortamda hidrokstirozol birikimine yönelik paralel bir deney daha yapılmıştır. Hazırlanan 25 mL'lik ortamlar, 30°C'de 150 rpm karıştırma hızında çalkalamalı hava banyosunda inkübe edilmiştir.

3.3. Analizler

3.3.1. pH ölçümü

Biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örnekler, +4°C'de 12000xg'de (10000 rpm) santrifüjlendikten sonra, örneklere ait süpernatantların pH'ı ölçülerek (Sartorius PP-25) zamanla pH değışimi izlenmiştir.

3.3.2. Toplam fenol derişimi tayini

Biyoarıtım ortamlarından farklı zamanlarda alınan örnekler belirli aşamalardan geçirildikten sonra toplam fenol derişimleri ölçülmüştür. Bu aşamalar sırası ile aşağıda verildiği gibidir:

Ekstraksiyon: Farklı zamanlarda alınan örneklerin pH değerleri kaydedildikten sonra, örneklerin pH'ı, % 9'luk HCl çözeltisi ile yaklaşık 2'ye ayarlanmıştır. pH'ı ayarlanan örnekler, etil asetat ile 1:1 (h/h) oranı sağlanacak şekilde, 3 kez ekstrakte edilerek etil asetat fazı, susuz sodyum sülfat bulunan ortamda toplanmıştır (Ayed et al. 2005).

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

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

Bu aşamalar tamamlandıktan sonra, Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenol tayini yapılmıştır (Ayed et al. 2005). Yöntem uygulanırken, cam bir tüpe 20 µL örnek, 1580 µL distile su ve 100 µL Folin reaktifi koyularak vorteks ile iyi bir karıştırma sağlanmıştır. 8 dk bekleme süresinin ardından 300 µL doygun sodyum karbonat çözeltisi eklenip iyi bir karıştırma sağlandıktan sonra ağzı kapalı tüpler 40°C su banyosunda 30 dk bekletilmiştir. Bu süre sonunda örneklerin absorbansları $\lambda=765$ nm'de okunarak kaydedilmiştir (Shimadzu UV-1601).

Kaydedilen absorbans değerleri ile önceden hazırlanmış olan kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak örneklere ait toplam fenol derişim değerleri hesaplanmıştır. Hesaplama da kullanılan kalibrasyon grafiği EK 2’de verilmiştir.

Toplam fenol derişimi yöntem geliştirme çalışmaları Bölüm 4.1.1’de verilmiştir.

Toplam fenol tayini yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yöntem e ait standart sapma değeri hesaplanmıştır (EK 3).

3.3.3. Toplam antioksidan aktivitesi tayini

Biyoarıtım ortamlarından farklı zamanlarda alınan örneklere ait toplam antioksidan aktivitesi, örneklerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal tutma etkisi belirlenerek hesaplanmıştır. Bunun için öncelikle Bölüm 3.3.2’de belirtilen aşamalar (ekstraksiyon, evaporasyon, kalıntıların metanol fazına alınması) gerçekleştirilmiş, metanol fazına alınmış örneklere toplam antioksidan aktivite tayini yapılmıştır. Çalışmada, Fki et al. (2005) tarafından kullanılmış olan yöntem modifiye edilip örneklere uygulanarak toplam antioksidan aktivite tayini gerçekleştirilmiştir. Buna göre, 4 mL metanol fazında bulunan örnek ile 10 mL 1.5×10^{-4} M derişimine sahip DPPH çözeltisi (metanol içinde) bir tüpte iyice karıştırılarak ağız kapalı bir şekilde oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Eş zamanlı olarak, 4 mL metanol ve 10 mL 1.5×10^{-4} M DPPH çözeltisi karıştırılıp kontrol olarak oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından örneğe ve kontrole ait absorbans değerleri $\lambda=520$ nm’de ölçülerek Eş.(3.1)’den toplam antioksidan aktivitesi % inhibisyon olarak hesaplanmıştır (Obied et al. 2007).

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.1)$$

Toplam antioksidan aktivite tayini için geliştirilen bu yönteme ait basamaklar, Bölüm 4.1.2’de verilmiştir. Ayrıca toplam antioksidan aktivite tayin yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yönteme ait standart sapma değeri hesaplanmıştır (EK 4).

3.3.4. Tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayini

Tirozinaz monofenolaz aktivite tayin yöntemi, enzimin substratlarından biri olan tirozinin, tirozinaz enziminin monofenolaz aktivitesi ile dihidroksifenilalanine (DOPA) oksitlemesi temeline dayanmaktadır. Bu çalışmada, tirozinaz monofenolaz aktivite tayin yöntemi Worthington Enzyme Manual referans alınarak geliştirilmiştir (<http://www.worthingtonbiochem.com/TY/assay.html>, 2010). Uygulanan yönteme göre, oda sıcaklığında, 1080 µL 0.5 M pH 6.5 fosfat tamponu, 1000 µL 0.01 M L-tirozin çözeltisi (0.5 M pH 6.5 fosfat tamponunda) ve 900 µL distile su bir cam tüpe alınıp vorteks ile karıştırılmıştır. Cam tüp içerisinde hazırlanmış olan ortamdan 5 dk süre ile oksijen gazı geçirilmiştir. Oksijene doyan ortama, 20 µL ortamdan alınan örnek eklenerek, vorteks ile karıştırıldıktan sonra reaksiyon ortamı spektrofotometre küvetine alınmıştır. Örneğin eklenmesiyle başlayan reaksiyonda meydana gelen absorbans değişimi 30 dk süresince $\lambda=280$ nm’de izlenmiştir. Kör olarak, içerisinde ortamdan alınan örnek yerine aynı hacimde işlem görmemiş, aynı ortamın $t=0$. st anına ait ortamını bulunduran reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Aktivite hesabı yapılırken 1 Ünite (U), oda sıcaklığında, pH 6.5’te, 1 dakikada, $\lambda=280$ nm dalga boyunda 0.001 birimlik absorbans değişimi olarak tanımlanmıştır. Absorbans değişiminin doğrusal olarak artış gösterdiği bölge (t_1-t_2), aktivite tayini hesaplanırken esas alınmış, hesaplama Eş.(3.2) kullanılarak yapılmıştır.

$$\frac{A_{280}(t_2) - A_{280}(t_1)}{t_2 - t_1} \times 1000 = \text{Ünite} \quad (3.2)$$

Tirozinaz monofenolaz aktivite tayini için geliştirilen bu yönteme ait basamaklar, Bölüm 4.1.3'te verilmiştir. Ayrıca, tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yönteme ait standart sapma değeri hesaplanmıştır (EK 5).

3.3.5. Tirozinaz difenolaz enzim aktivite tayini

Tirozinaz difenolaz aktivite tayin yöntemi, substrat olarak kullanılan L-DOPA'nın tirozinaz enziminin difenolaz aktivitesi ile L-DOPA-kinona dönüşümünün spektrofotometrik olarak izlenmesine dayanmaktadır. Bu çalışmada, tirozinaz difenolaz aktivite tayin yöntemi, Sigma-Aldrich'te bulunan enzim aktivite tayin yöntemi referans alınarak geliştirilmiştir (http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/2/tyrosinase.Par.0001.File.dat/tyrosinase.pdf, 2011). Buna göre, oda sıcaklığında, 2600 µL 50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponu, 100 µL 5 mM L-DOPA çözeltisi (50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponunda), 100 µL 2,1 mM askorbik asit çözeltisi (50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponunda), 100 µL 0,065 mM EDTA çözeltisi (50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponunda) ve 100 µL ortamdan alınan örnek karıştırılarak spektrofotometre küvetine alınmıştır. Ortamdan alınan örneğin eklenmesiyle başlayan reaksiyonda meydana gelen absorbans değişimi, 10 dk süresince $\lambda=265$ nm'de izlenmiştir. Kör hazırlanırken örnekten farklı olarak, 2700 µL 50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponu ve 100 µL işlem görmemiş, aynı ortamın $t=0$. st anına ait ortam konulmuş, askorbik asit ve ortamdan alınan örnek konulmamıştır. Aktivite hesabı yapılırken; 1 Ünite (U), oda sıcaklığında, pH 6.5'te, 1 dakikada, $\lambda=265$ nm dalga boyunda 0.001 birimlik absorbans değişimi olarak tanımlanmıştır. Absorbans değişimi izlendiği süre boyunca doğrusal olarak azalma gösterdiğinden, aktivite hesaplanırken 10 dakikalık absorbans değişimi esas alınıp, hesaplama Eşit.(3.3) kullanılarak yapılmıştır.

$$\frac{A_{265}(t_2) - A_{265}(t_1)}{t_2 - t_1} \times 1000 = \ddot{U}nite \quad (3.3)$$

Tirozinaz difenolaz aktivite tayini için geliştirilen bu yönteme ait basamaklar, Bölüm 4.1.4'te verilmiştir. Ayrıca, tirozinaz difenolaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yönteme ait standart sapma değerini hesaplanmıştır (EK 6).

3.3.6. Lakkaz enzim aktivite tayini

Lakkaz enzim aktivite tayini, substrat olarak kullanılan 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in lakkaz tarafından oksitlenmesiyle oluşan renk değişiminin, spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanarak yapılmıştır. ABTS'nin oksitlenmesiyle absorbansta artış meydana gelmektedir. Bu alışmada, Palmieri et al. (1997) tarafından kullanılan lakkaz aktivite tayin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre, oda sıcaklığında, 20 µL ortamdan alınan rnek, 880 µL 0.1 M pH 3.0 fosfat-sitrat tamponu ve 100 µL 1 mM ABTS zeltisi (0.1 M pH 3.0 fosfat-sitrat tamponunda hazırlanmış ya da ticari ABTS zeltisi) karıştırılarak reaksiyon ortamı hazırlanmış ve ortamda meydana gelen renk değişimi spektrofotometrede $\lambda=420$ nm'de 20 dk süresince izlenmiştir. Kr olarak, içerisinde ortamdan alınan örnek yerine işlem görmemiş, aynı ortamın $t=0$. st anına ait ortamını bulunduran reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Aktivite hesabı yapılırken 1 nite (U), 1 dakikada 1 µmol ürün oluşturana enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Absorbans değişiminin doğrusal olarak artış gösterdiği bölge (t_1-t_2), aktivite tayini hesaplanırken esas alınmış, hesaplama Eşt.(3.4) kullanılarak yapılmıştır.

$$\ddot{U}nite = \frac{\mu mol\ddot{u}rn}{dk} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon(M^{-1}cm^{-1})} \times \frac{1}{b(cm)} \times \frac{10^6 \mu M}{M} \times V(L) \quad (3.4)$$

Eşt.(3.4) için:

ΔA	=	absorbanstaki değişim
Δt	=	zaman aralığı (dk) (t_2-t_1)
ϵ	=	oksitlenmiş ABTS için molar absorptivite katsayısı 36000 M ⁻¹ cm ⁻¹ (Solís-Oba et al. 2005)
b	=	spektrofotometre küvet genişliği (1 cm)
V	=	toplam reaksiyon hacmi (L)

Lakkaz aktivite tayini için geliştirilen bu yöntemle ait basamaklar, Bölüm 4.1.5'te verilmiştir. Ayrıca, lakkaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yöntemle ait standart sapma değeri hesaplanmıştır (EK 7).

3.3.7. Mangan peroksidaz enzim aktivite tayini

Mangan peroksidaz aktivite tayin yöntemi, oda sıcaklığında H₂O₂ varlığında guaiakolün oksidasyonunun spektrofotometrik olarak izlenmesi temeline dayanmaktadır. Bu çalışmada, Ergül et al. (2009) tarafından, Paszcyński et al. (1988) tarafından kullanıldığı bildirilen, mangan peroksidaz aktivite tayin yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Yöntemde, 50 µL ortamdaki alınan örnek, 650 µL 0.5 M pH 5.0 sodyum tartarat tamponu, 100 µL 1 mM MnSO₄ çözeltisi, 100 µL 1 mM guaiakol çözeltisi ve 100 µL 1 mM H₂O₂ çözeltisinden oluşan reaksiyon ortamı vortekslenerek karıştırılmış ve spektrofotometreye alınan ortamın absorbansındaki değişim $\lambda=465$ nm'de 20 dk süresince izlenmiştir. Reaksiyon H₂O₂'nin eklenmesiyle başlamaktadır. Kör olarak, içerisinde ortamdaki alınan örnek yerine işlem görmemiş aynı ortamın t=0. st anına ait ortamını bulunduran reaksiyon ortamı kullanılmıştır. Aktivite hesabı yapılırken 1 Ünite (U), 1 dakikada 1 µmol guaiakolü oksitleyen enzim miktarı

olarak tanımlanmıştır. Absorbans değişiminin doğrusal olarak artış gösterdiği bölge (t_1-t_2), aktivite tayini hesaplanırken esas alınmış, hesaplama Eş.(3.5) kullanılarak yapılmıştır.

$$\dot{U}nite = \frac{\mu molürün}{dk} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{\varepsilon (M^{-1}cm^{-1})} \times \frac{1}{b(cm)} \times \frac{10^6 \mu M}{M} \times V(L) \quad (3.5)$$

Eş.(3.5) için:

- ΔA = absorbanstaki değişim
 Δt = zaman aralığı (dk) (t_2-t_1)
 ε = oksitlenmiş guaiakol için molar absorptivite katsayısı
61000 $M^{-1} cm^{-1}$ (Kwon et al. 2001)
 b = spektrofotometre küvet genişliği (1 cm)
 V = toplam reaksiyon hacmi (L)

Mangan peroksidaz aktivite tayini için geliştirilen bu yönteme ait basamaklar, Bölüm 4.1.6'da verilmiştir.

3.3.8. Tannaz enzim aktivite tayini

Tannaz aktivite tayin yöntemi, tannik asitte enzimatik reaksiyon sonrası meydana gelen değişimlerin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Tannik asit, tannaz tarafından hidrolize edilmekte, hidroliz sonucu glukoz ve gallik asit oluşmaktadır. Hidrolize uğramayan tannik asit ise BSA ile çöktürülmektedir. Bu çalışmada kullanılan tannaz aktivite tayin yöntemi, Mondal et al. (2001) ve Kanberoğlu (2006) tarafından kullanılan tannaz aktivite tayin

yöntemlerinin modifiye edilmesi ile geliştirilmiştir. Reaksiyon, 0.3 mL % 0.5'lik tannik asit çözeltisi (0.2 M pH 5.0 asetat tamponunda) ve 0.05 mL ortamdan alınan örneğin vorteks ile karıştırılarak 40°C su banyosunda 30 dk inkübasyonu ile gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 0.3 mL 1 mg/mL BSA çözeltisi (0.2 M pH 5.0 asetat tampon ile hazırlanmış 0.17 M NaCl çözeltisinde) eklenerek reaksiyon sonlandırılmıştır. BSA eklenmesi ile tannik asit BSA'ya bağlanır ve birlikte çökerler. BSA çözeltisinin eklenmesinden sonra tüpler vorteks ile karıştırılıp, 5000xg'de (6240 rpm) 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası üst sıvı atılmış, BSA-tannik asit kompleksi içeren pellete 3 mL % 1'lik SDS çözeltisi (% 5'lik trietanolamin çözeltisinde) eklenerek pellet iyice çözünene kadar karıştırılmış, son olarak 1 mL 0.01 M FeCl₃ çözeltisi (0.01 N HCl çözeltisinde) eklendikten sonra tekrar karıştırılmıştır. Tannik asit FeCl₃ ile kahverengi renk oluşturmaktadır. 15 dk renk oluşumunun kararlı hale gelmesi için oda koşullarında beklenilmiş, bu süre sonunda λ=530 nm'de absorbands ölçülmüştür. Aktivite hesabı için ise denatüre enzim kullanılarak, denatüre örnek hazırlanmıştır. Denatüre enzim, 0.05 mL enzim çözeltisinin 100°C'de 10 dk inkübasyonu ile gerçekleştirilmiş, diğer basamaklar örneğe uygulanan basamaklar ile aynı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Kör çözelti için ise 0.3 mL tannik asit çözeltisi yerine 0.2 M pH 5.0 asetat tamponu kullanılarak aynı basamaklar izlenmiştir. Spektrofotometre kör çözeltiye karşı sıfırlanmış, denatüre örnek ve örneğe ait absorbands değerleri "A₀" "A_D" olacak şekilde okunmuştur. Bir dakikada 1 L hacimde 1 µmol tannik asiti hidroliz eden enzim miktarı olarak tanımlanan tannaz aktivitesi Eş.(3.6) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$U/L = \frac{(A_D - A_0) \times 10^3}{t(\text{dk}) \times v(\text{ml}) \times \epsilon} \quad (3.6)$$

Eşit.(3.6) için:

A_D	=	denatüre örneğe ait absorptivite değeri
A_0	=	örneğe ait absorptivite değeri
t	=	reaksiyon süresi (30 dk)
v	=	enzim hacmi (0.05 mL)
ϵ	=	tannik asit için $\lambda=530$ nm'deki molar absorptivite katsayısı $0.577 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Mondal et al. 2001)

Tannaz aktivite tayini için geliştirilen bu yöntemle ait basamaklar, Bölüm 4.1.7'de verilmiştir.

3.3.9. HPLC analizleri

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin, biyotransformasyon süresince değişimlerini kalitatif ve kantitatif olarak izlemek amacıyla, farklı zamanlarda alınan örneklerin HPLC analizi yapılmıştır.

3.3.9.1. Kalitatif analiz

Zeytin karasuyunda bulunan fenollerin kalitatif analizi için kullanılan yöntem, Fki et al. (2005) tarafından kullanılan HPLC analiz yöntemi esas alınarak geliştirilmiştir. Örneklerin HPLC analizlerinin yapılabilmesi için, öncelikle Bölüm 3.3.2'de belirtilen aşamalar (ekstraksiyon, evaporasyon, kalıntıların metanol fazına alınması) gerçekleştirilmiştir. Sonrasında metanol fazına alınmış örnekler $0.45 \mu\text{m}$ PVDF filtreden (Millipore Millex-HV) süzülerek HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir. Analizlerde kullanılan taşıyıcı fazlar bidistile su kullanarak

hazırlanmış (Millipore MilliQ Gradient) ve 0.45 µm PVDF membrandan (Millipore Durapore®) vakumlu pompa (Millipore WP6122050) yardımı ile süzölmüştür. Son olarak taşıyıcı fazların içinde bulunan gaz kabarcıkları, 30 dk süre ile ultrasonik banyoda (Elma S 30 H) uzaklaştırılarak HPLC için kullanıma hazır hale getirilmiştir. Analizler, Waters Alliance 2695 cihazında yapılmıştır. Analiz koşulları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC analiz koşulları

Değişken	Özellik
Kolon	XTerra RP ₁₈ (Waters)
Kolon boyutu	4.6 mm x 150 mm x 5 µm
Hareketli faz akış hızı	0.3 mL/dk
Kolon sıcaklığı	25°C
Dedektör	UV-VIS Dual Absorbance Detector (Waters 2487)
Dalga boyu	280 nm
Taşıyıcı faz A	% 70 : % 30 asetonitril (ACN) : bidistile su (H ₂ O)
Taşıyıcı faz B	% 0.1 <i>o</i> -fosforik asit (<i>o</i> -H ₃ PO ₄)
Enjeksiyon hacmi	20 µL

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin HPLC ile analizleri için, gradyen program kullanılarak kromatografik ayırma sağlanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. HPLC analizlerinde uygulanan gradyen program

t (dk)	Taşıyıcı faz A (70:30, ACN:H₂O)	Taşıyıcı faz B (% 0.1 <i>o</i>-H₃PO₄)
0	20	80
45	30	70
52.5	50	50
80	20	80

3.3.9.2. Kantitatif analiz

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

Kalitatif ve kantitatif HPLC analizleri için geliştirilen yöntemle ait basamaklar, Bölüm 4.1.8'de verilmiştir. Ayrıca kantitatif HPLC analizyönteminin doğruluğunu ve tekrarlanabilirliğini belirlemek için, tekrarlı analizler yapılarak yöntemle ait standart sapma değeri hesaplanmıştır (EK 8).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Yöntem Geliştirme

4.1.1. Toplam fenol derişimi

Biyoarıtım ortamlarından farklı zamanlarda alınan örneklere ait toplam fenol derişimi tayini için yöntem geliştirilirken, evaporasyon sonrası kalıntıların toplandığı farklı çözücü türleri denenmiştir. Ayed et al. (2005) tarafından kullanılan toplam fenol derişimi tayin yöntemi, metanol ve etanol fazına alınmış örnekler için ayrı ayrı denenmiştir. Bu denemeler sonucunda, örneklerin etanol ya da metanol çözücüsünde bulunmasının toplam fenol derişimi sonucunu değiştirmedığı görülmüştür. Toplam antioksidan aktivitesi tayininde kullanılan DPPH radikalinin en iyi metanolde çözüdüğü göz önüne alınarak, analizlerde aynı örnekleri kullanabilmek için örneklerin metanol fazına alınmasına karar verilmiş, tüm çalışmada çözücü olarak metanol kullanılmıştır.

4.1.2. Toplam antioksidan aktivitesi

Zeytin karasuyunda DPPH ile toplam antioksidan aktivitesi tayini için yöntem geliştirme çalışmalarında, çözücü tür ve miktarı, DPPH derişimi, toplam reaksiyon hacmi ve inkübasyon koşulları değiştirilerek antioksidan aktivite değeri (IC_{50}) bilinen standartlar ile tekrarlanabilir sonuçlar alınan en uygun değerler seçilmiştir.

IC_{50} , başlangıç DPPH derişimini % 50 azaltmak (inhibe etmek) için gereken antioksidan miktarıdır. Düşük IC_{50} değeri yüksek antioksidan aktivitenin varlığını göstermektedir.

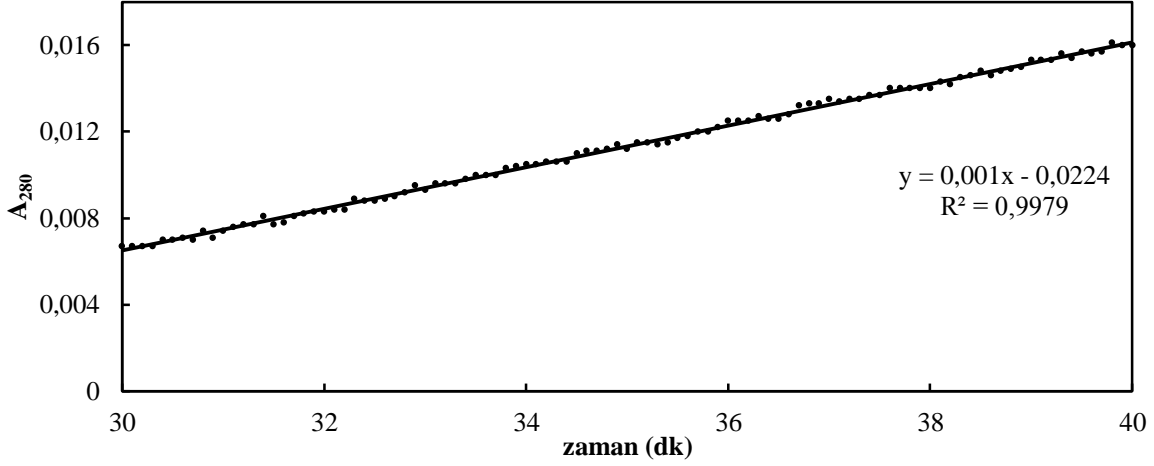
Zeytin karasuyunun antioksidan aktivite değerini ifade etmek ve bilinen antioksidanlar (standartlar) ile karşılaştırmak amacıyla IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada antioksidan standartları olarak 3,4-dihidroksifenilasetik asit, ferulik asit, kafeik asit, kateşol, 4-metilkateşol, oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol), tirozol ve vanilik asit kullanılmıştır. Hidroksitirozolün ticari olarak sağlanması zor olduğu için, çalışmada hidroksitirozol, ticari olarak sağlanan oleuropeinin asidik hidrolizi ile elde edilmiştir (Walter et al. 1973). Oleuropeinin asidik hidrolizine ilişkin bilgiler EK 9’da verilmiştir. Sözü edilen standartlar ile ZK1 ve ZK2 ekstraktlarına ait IC₅₀ değerlerini hesaplamak amacıyla, örnekerin farklı derişimleri için DPPH ile reaksiyon gerçekleştirilmiş ve Bölüm 3.3.3’te verilen Eşt.(3.1) yardımı ile % inhibisyon değerleri hesaplandıktan sonra inhibisyon eğrileri (log-doz) izilmiştir. Eğrilere ait denklemlerden, inhibisyon değeri %50’ye karşılık gelen derişim IC₅₀ değeri olarak belirlenmiştir (EK 10).

4.1.3. Tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi

Tirozinaz monofenolaz aktivitesi tayini için yöntem geliştirme çalışmalarında, öncelikle Atlow et al. (1984) tarafından kullanılan tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayin yöntemi denenmiştir. Ancak bu yöntem zeytin karasuyuna uygulandığında sonuç elde edilemediği için, bileşenlerin derişimi ve hacimleri değiştirilerek modifiye edilmiş, sonuç olarak enzim derişimi azaltılarak tekrarlanabilir ve zeytin karasuyuna uygulanabilir olan ve Bölüm 3.3.4’te anlatılan tayin yöntemi oluşturulmuştur.

Tirozinaz monofenolaz aktivitesi için kontrol amaçlı yapılan deneylerde ticari enzim preparatı (Sigma T3824) kullanılmıştır. Ticari enzim preparatının etiketinde enzimin aktivitesi 1881 U/mg katı (substrat: L-tirozin, pH 6.5, 25°C, λ=280 nm) olarak verilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntem kullanılarak, Bölüm 3.3.4’te verilen Eşt.(3.2)’den hesaplanan aktivite değeri ise 4750 U/mg katı’dır. şekil 4.1’de ticari enzim ile aktivite ölçümünde elde edilen tirozin oksidasyon grafiği yer almaktadır. Yöntemde başlangıç gecikme fazından sonra elde

edilen doğrunun eğimi (30-40 dk) kullanılarak aktivite hesabı yapılmıştır. Yapılan denemeler ile yöntemin zeytin karasuyu için kullanılabilceği de belirlenmiştir.

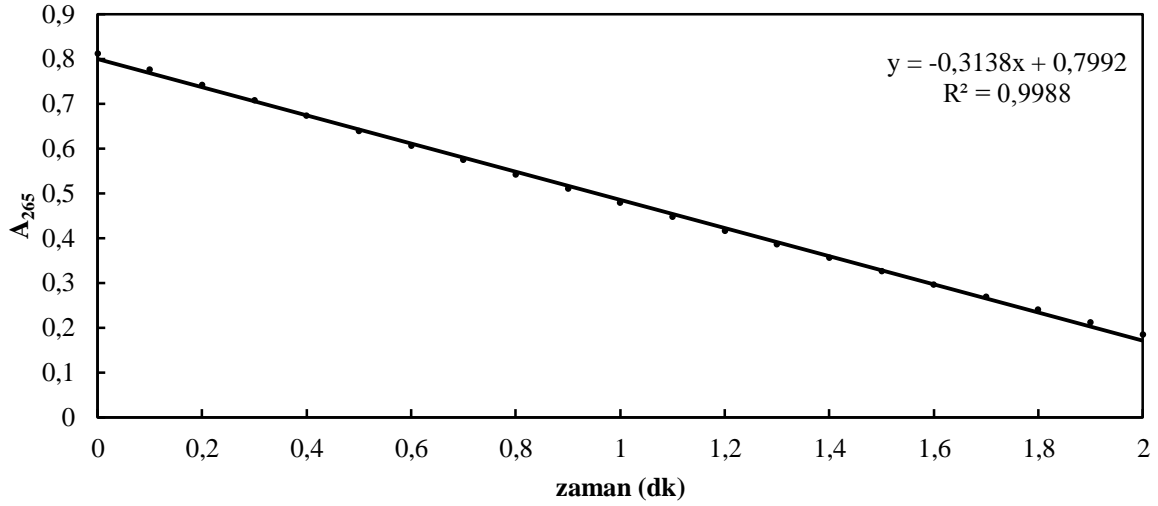


Şekil 4.1. Tirozinaz enziminin katalizlediği tirozin oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı

4.1.4. Tirozinaz difenolaz enzim aktivitesi

Tirozinaz difenolaz aktivitesi tayini için yöntem geliştirme çalışmalarında, Bölüm 3.3.5'te anlatılan tayin yöntemi, zeytin karasuyuna uygulanabilir olacak şekilde oluşturulmuştur.

Tirozinaz difenolaz aktivitesi için kontrol amaçlı yapılan deneylerde ticari enzim preparatı (Sigma T3824) kullanılmıştır. Ticari enzim preparatının etiketinde enzimin aktivitesi 1881 U/mg katı (substrat: L-tirozin, pH 6.5, 25°C, $\lambda=280$ nm) olarak verilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntem kullanılarak, Bölüm 3.3.5'te verilen Eş.(3.3)'ten hesaplanan aktivite değeri ise 78450 U/mg katı'dır. Şekil 4.2'de ticari enzim ile aktivite ölçümünde elde edilen L-DOPA oksidasyon grafiği yer almaktadır. Yöntemde 10 dakika süresince izlenen absorbans değişiminin, doğrusal olduğu 2 dakikalık zaman dilimine ait bölgenin eğimi kullanılmıştır. Yapılan denemeler ile yöntemin zeytin karasuyu için kullanılabilceği de belirlenmiştir.



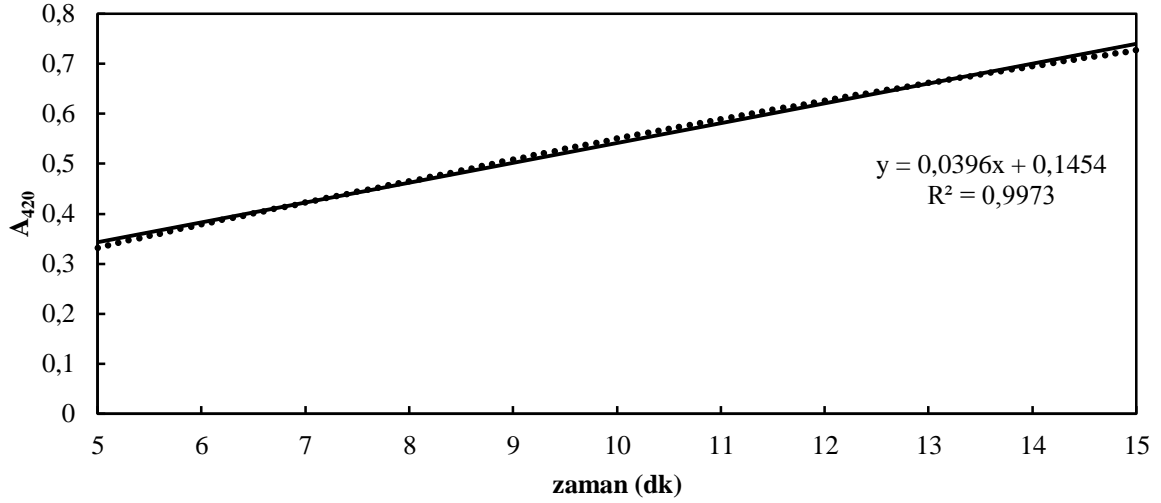
Şekil 4.2. Tirozinaz enziminin katalizlediği L-DOPA oksidasyonunda doğrusal absorbans azalması

4.1.5. Lakkaz enzim aktivitesi

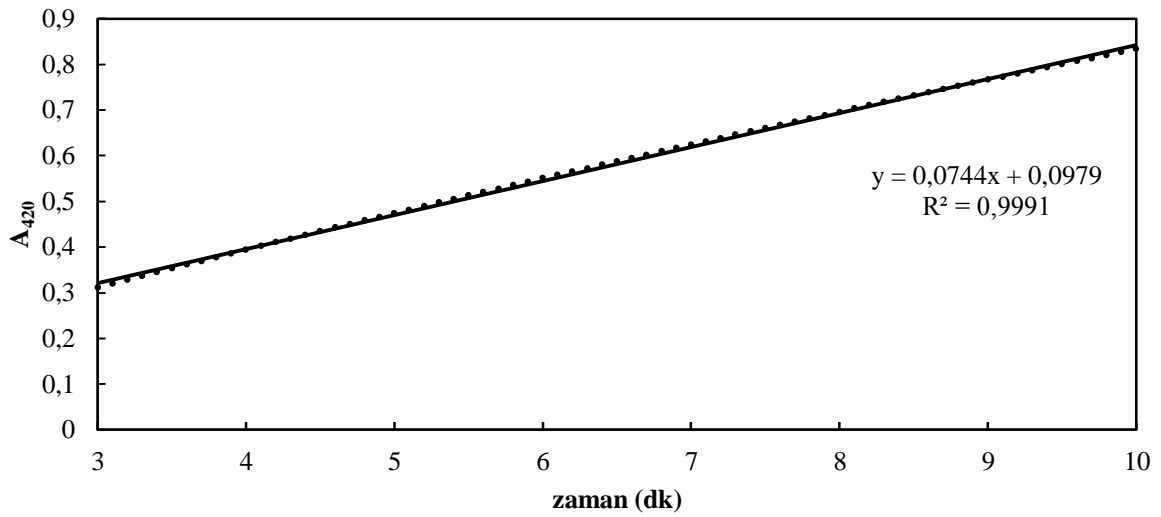
Lakkaz aktivitesi tayini için yöntem geliştirme çalışmalarında, literatürde yer alan farklı substratların kullanıldığı yöntemler denenmiştir. Ancak, bazı yöntemler tekrarlanabilir sonuç vermemiş, bazı yöntemler ise zeytin karasuyuna uygulanamamıştır. Bölüm 3.3.6’da anlatılan yöntem ise tekrarlanabilir ve zeytin karasuyuna en uygulanabilir yöntem olarak belirlendiğinden, çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

Lakkaz aktivitesi için kontrol amaçlı yapılan deneylerde ticari enzim preparatı (Sigma 38429) kullanılmıştır. Ticari enzim preparatının etiketinde enzimin aktivitesi 0.66 U/mg (substrat: kateşol, pH 6, 25°C) olarak verilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntem ile substratın (ABTS) ticari çözeltisi ve katı formundan hazırlanan çözeltisi kullanılarak iki şekilde aktivite hesaplanmıştır. Bölüm 3.3.6’da verilen Eş.(3.4)’ten hesaplanan aktivite değerleri, 0.55 U/mg katı (substrat: ticari ABTS çözeltisi) ve 1.03 U/mg katı’dır (substrat: katı formdan hazırlanan ABTS çözeltisi). Şekil 4.3 ve Şekil 4.4’te ticari enzimler ile aktivite ölçümünde elde edilen

ABTS oksidasyon grafikleri yer almaktadır. Yöntemde 20 dakika süresince izlenen absorbans değişiminin, Şekil 4.3'te doğrusal olduğu 10 dakikalık zaman dilimine (5-15 dk), Şekil 4.4'te doğrusal olduğu 7 dakikalık zaman dilimine (3-10) ait bölgenin eğimi kullanılmıştır. Yapılan denemeler ile her iki yöntemin de zeytin karasuyu için kullanılabileceği de belirlenmiştir.



Şekil 4.3. Lakkaz enziminin katalizlediği ABTS (ticari çözelti) oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı

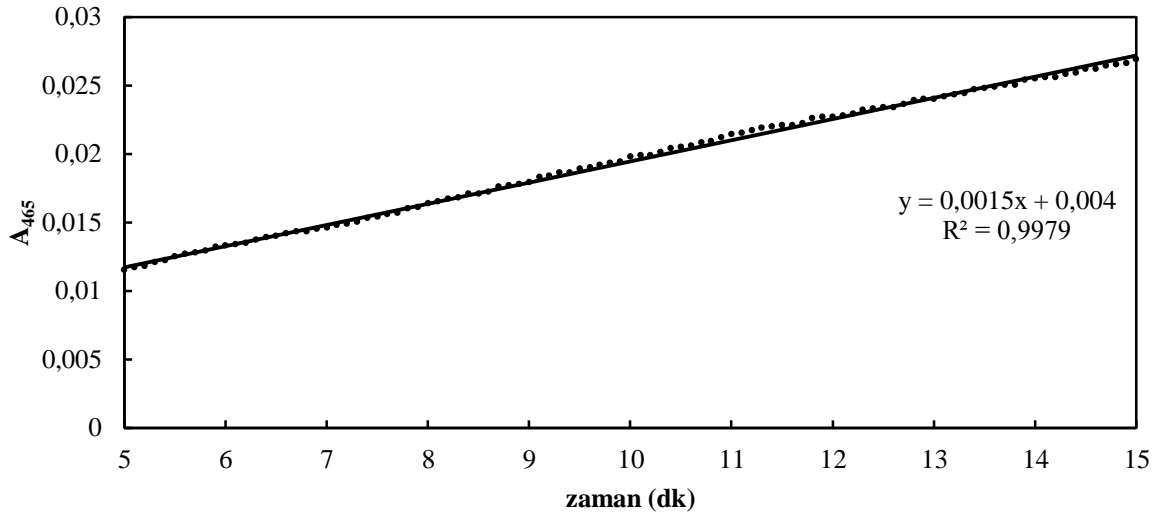


Şekil 4.4. Lakkaz enziminin katalizlediği ABTS (katı formdan hazırlanan çözelti) oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı

4.1.6. Mangan peroksidaz enzim aktivitesi

Mangan peroksidaz aktivitesi tayini için yöntem geliştirme çalışmalarında, Bölüm 3.3.7'de anlatılan tayin yöntemi zeytin karasuyuna uygulanabilir olacak şekilde oluşturulmuştur.

Mangan peroksidaz aktivitesi için kontrol amaçlı yapılan denemelerde ticari enzim preparatı (Sigma 93014) kullanılmıştır. Ticari enzim preparatının etiketinde enzimin aktivitesi 98.4 U/g (substrat: Mn^{2+} , pH 4.5, 25°C) olarak verilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntem kullanılarak, Bölüm 3.3.7'de verilen Eş.(3.5)'ten hesaplanan aktivite değeri ise 7030 U/g katı'dır. Şekil 4.5'te ticari enzim ile aktivite ölçümünde elde edilen guaiakol oksidasyon grafiği yer almaktadır. Yöntemde 20 dk süresince izlenen absorbans değişiminin, doğrusal olduğu zaman dilimine (5-15 dk) ait bölgenin eğimi kullanılmıştır. Yapılan denemeler ile yöntemin zeytin karasuyu için kullanılabilirliği de belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Mangan peroksidaz enziminin katalizlediği Mn^{2+} oksidasyonunda doğrusal absorbans artışı

4.1.7. Tannaz enzim aktivitesi

Tannaz aktivitesi için yöntem geliştirme çalışmalarında, literatürde önerilen, substratı aynı ancak aktivite tayininde kullanılan diğer bileşenlerin farklılık gösterdiği yöntemler denenmiştir. Ancak, bazı yöntemler, ticari enzim ile tekrarlanabilir sonuç vermemiştir. Bölüm 3.3.8'de anlatılan yöntem ise tekrarlanabilir ve zeytin karasuyuna en uygulanabilir yöntem olarak belirlenmiş ve çalışmada kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tannaz aktivitesi için kontrol amaçlı yapılan deneylerde ticari enzim preparatı (Sigma 42395) kullanılmıştır. Ticari enzim preparatının etiketinde enzimin aktivitesi 369 U/g (substrat: tannik asit, pH 4.7, 30°C, $\lambda=310$ nm) olarak verilmektedir. Bu çalışmada geliştirilen yöntem kullanılarak, deneysel veriler ile Bölüm 3.3.8'de verilen Eş.(3.6)'dan hesaplanan aktivite değeri ise 190 U/g katı'dır. Yapılan denemeler ile yöntemin zeytin karasuyu için kullanılabilmesi de belirlenmiştir.

4.1.8. Kalitatif ve kantitatif HPLC analizleri

Zeytin karasuyunda HPLC analizleri için yöntem geliştirme çalışmalarında kalitatif analiz için akış hızı, enjeksiyon hacmi, dalga boyu, gradyan program; kantitatif analiz için ise iç standart değiştirilerek farklı yöntemler denenmiş, sonuç olarak Bölüm 3.3.9'da verilen yöntemin zeytin karasuyu için uygun olduğuna karar verilmiştir.

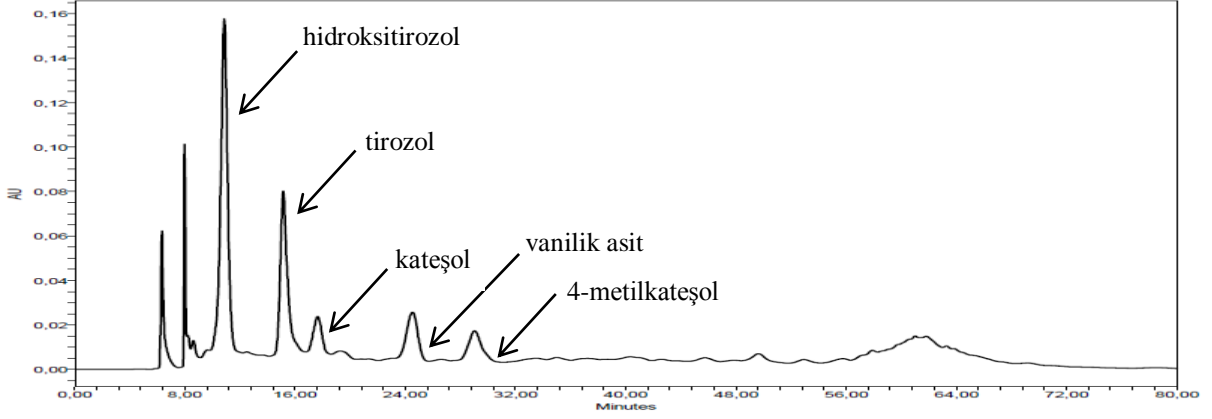
Yöntem geliştirme çalışmalarında, öncelikle zeytin karasuyuna ait örnekler kalitatif olarak HPLC ile analizlenmiştir. Sonrasında, bu örneklerde bulunan fenolik bileşenlere ait piklerin tanımlanabilmesi için, ticari olarak sağlanan standartlar (2,5-dihidroksibenzoik asit, 3,4-dihidroksifenilasetik asit, ferulik asit, gallik asit, 3-hidroksifenilasetik asit, 4-

hidroksifenilasetik asit, 3-hidroksi-4-metoksifenilasetik asit, kafeik asit, kateşol, *p*-kumarik asit, 4-metilkateşol, *t*-sinamik asit, sinapik asit, şirincik asit, tirozol (2-(4-hidroksifenil)etanol), vanilik asit) ile çalışmada elde edilen oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol) HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiş, yani kolonda kalma süreleri belirlenmiştir. Örnek olarak tirozol ve oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) kalitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlar EK 11’de verilmiştir.

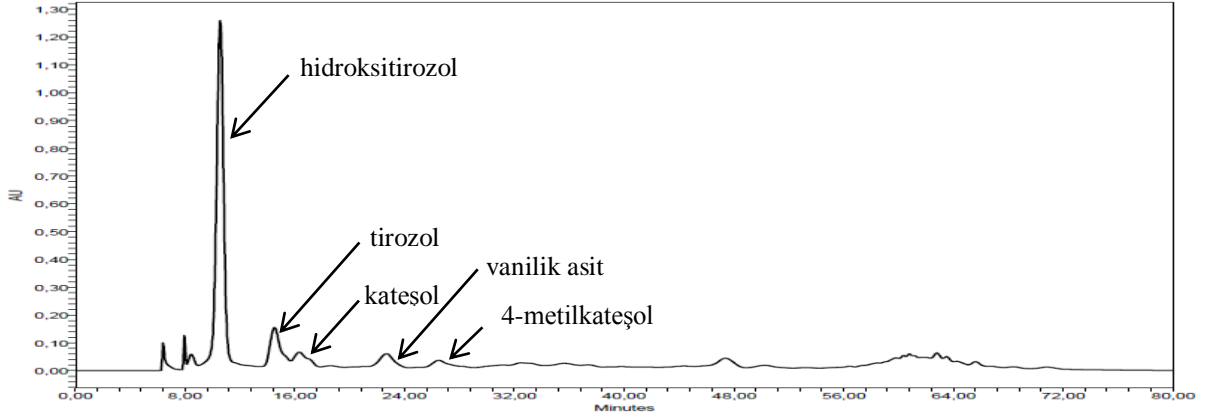
Zeytin karasuyu örneklerine ait fenolik maddeler kalitatif olarak tespit edildikten sonra, tanımlanan her bir fenolik bileşen için farklı derişimlerde standart çözeltisi ile 0.005 mg/mL derişimindeki *p*-kumarik asit (iç standart) çözeltisi karıştırılarak yapılan HPLC analizleri sonucunda, standartlara ait kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Çizilen kalibrasyon grafikleri EK 12’de verilmiştir.

4.2. Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin HPLC ile Tanımlanması ve Derişimlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan, ZK1 ve ZK2 olarak isimlendirilen zeytin karasularına ait ekstraktlar HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiş ve bu örneklere ait kromatogramlarda bulunan piklerin kalma süreleri ile standartlara ait kalma süreleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonrası tanımlama yapılmak üzere, kalma süreleri örnek piklerinin kalma sürelerine yakın olan standartlar, standart katma yöntemi ile örneklere eklenerek analizlenmiştir. Bu analizler sonucu ZK1 ve ZK2’de bulunan ve $\lambda=280$ nm’de belirlenebilen fenolik bileşenler tanımlanmıştır (Şekil 4.6 ve 4.7). Kullanılan zeytin karasularında bulunan fenolik bileşenlerin tanımlanmalarına ait kromatogramlar EK 13’te verilmiştir.

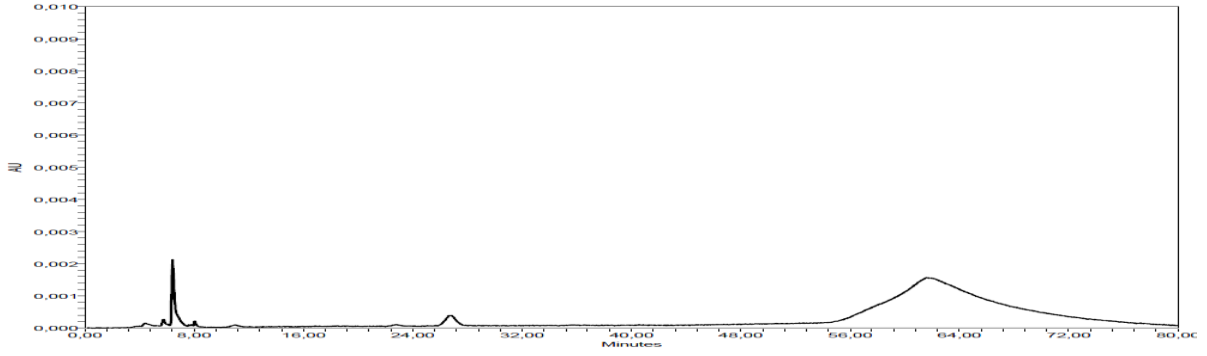


Şekil 4.6. Zeytin karasuyu 1 (ZK1) ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram



Şekil 4.7. Zeytin karasuyu 2 (ZK2) ekstraktının kalitatif HPLC analizine ait kromatogram

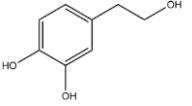
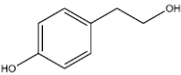

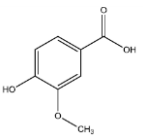
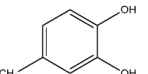
HPLC analizleri için örnek hazırlanırken çözücü olarak kullanılan metanol de kullanılan analiz programıyla analizlenmiştir. Yapılan analizler sonucu elde edilen kromatogramlarda, analizin 10. dk'sına kadar ve 50. dk'sından sonra görülen tanımsız pikler, metanole ait kromatogramda da görülmüştür (Şekil 4.8). Bu nedenle, tanımlamayan bu piklerin, analizlerde kromatografik saflıkta çözücü kullanıldığı için, kolondan ileri geldiği düşünülmüştür.



Şekil 4.8. HPLC analizlerinde çözücü olarak kullanılan metanole ait kromatogram

Kullanılan zeytin karasuyu (ZK1 ve ZK2) ekstraktlarında bulunan fenolik bileşenlerin derişimlerinin belirlenmesi için, örneklere iç standart (0.005 mg/mL *p*-kumarik asit) katılarak, EK 12’de verilen kalibrasyon grafiklerine ait denklemlerden, her bir fenolik bileşenin her bir zeytin karasuyu ekstraktındaki derişimi hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen derişimler, Çizelge 4. 1’de verilmiştir.

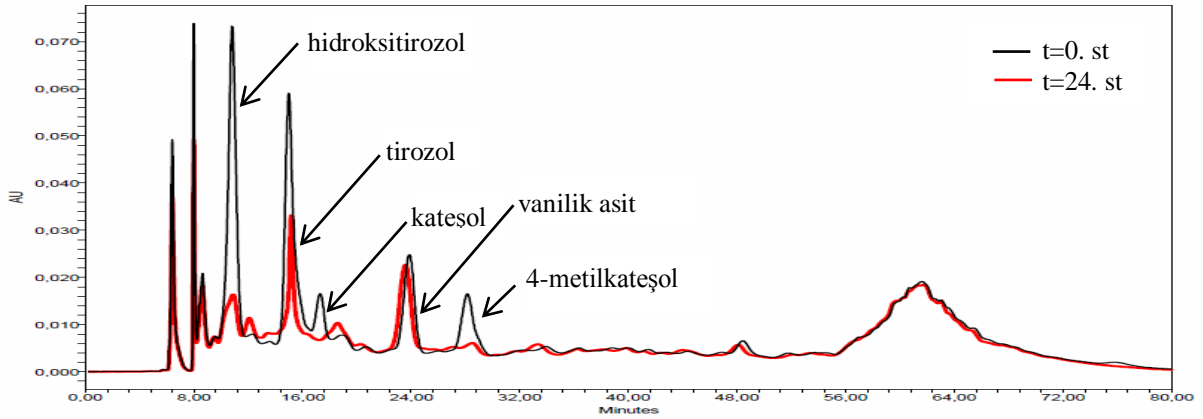
Çizelge 4.1. Zeytin karasuyu (ZK1 ve ZK2) ekstraktlarının kantitatif HPLC analizine ait sonuçlar

Fenolik bileşen	Yapısı	ZK1 (mg/L)	ZK2 (mg/L)
Hidroksitirozol		115.9	559.9
Tirozol		50.3	78.2
Kateşol		8.2	16.3
Vanilik asit		9.5	16
4-Metilkateşol		10.3	12.3

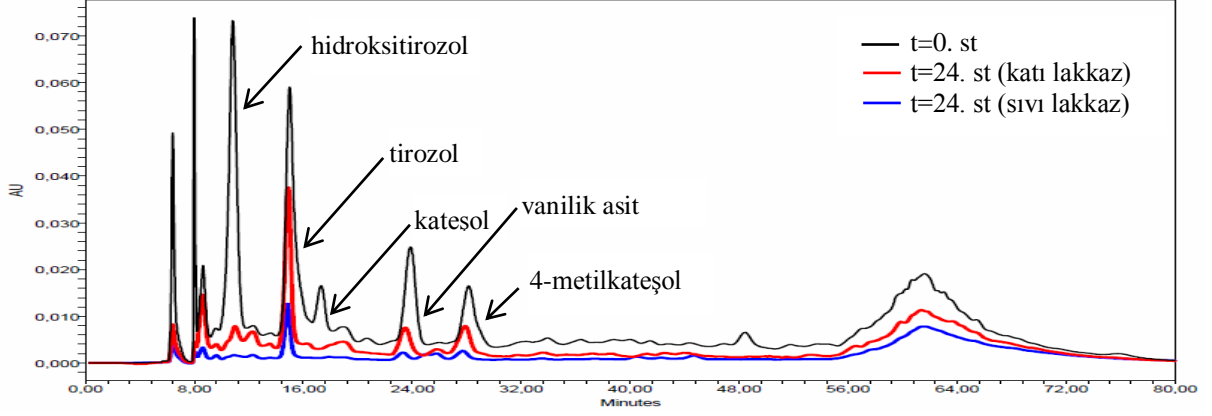
4.3. Ticari Fenol Parçalayıcı Enzimler ile Zeytin Karasuyunun Fenolik İçeriğinin Değişimi

Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin fenol parçalayıcı enzimler ile değişimini ve ortama askorbik asit eklendiğinde ortamda hidroksitirozol birikimini incelemek için ticari olarak sağlanan fenol parçalayıcı enzimlerle yapılan denemelerin sonuçları, kalitatif ve kantitatif HPLC analizleri ile elde edilmiştir.

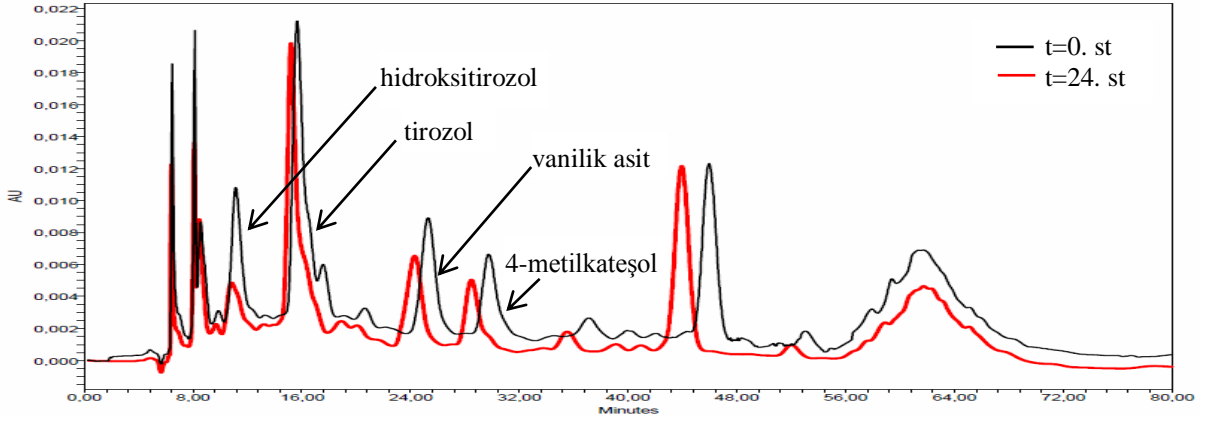
Ticari tirozinaz, lakkaz (katı ve sıvı), mangan peroksidaz ve tannaz enzimleri ile Bölüm 3.2.1'de verilen koşullarda 24 st muamele edilen zeytin karasuyu (ZK1) ortamlarından t=0, 0.5, 1, 3, 5 ve 24. st anlarında alınan örnekler, HPLC ile kalitatif olarak analizlenmiştir. Kalitatif HPLC analiz sonuçlarına göre, ticari olarak sağlanan her bir enzimin, zeytin karasuyunda tanımlanmış olan fenolik bileşenlerden hangilerini substrat olarak kullandığı belirlenmiştir. Örnek kromatogramlar Şekil 4.9-4.12'de verilmiştir.



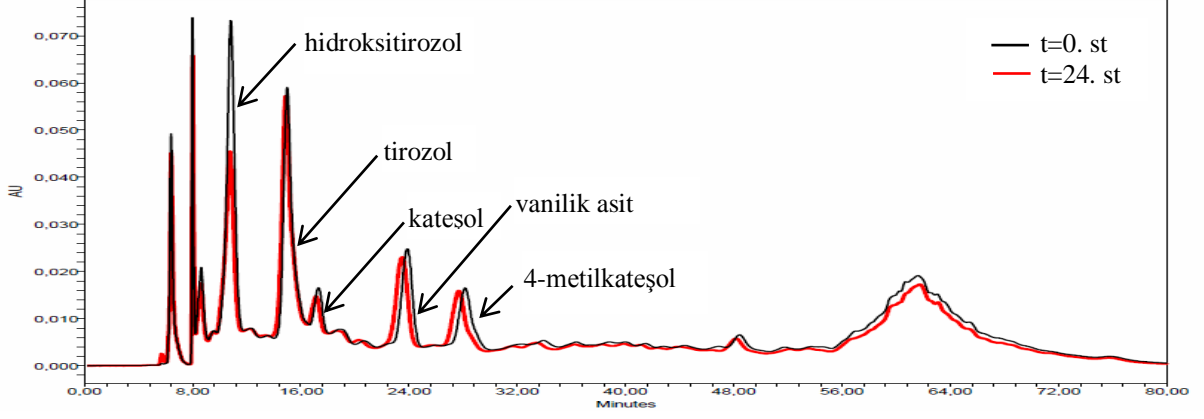
Şekil 4.9. Ticari tirozinaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.10. Ticari lakkaz (katı ve sıvı) enzimleri ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (5.3 mg katı lakkaz ya da 3 mL sıvı lakkaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.11. Ticari mangan peroksidaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.2 mg mangan peroksidaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.12. Ticari tannaz enzimi ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (8.6 mg tannaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

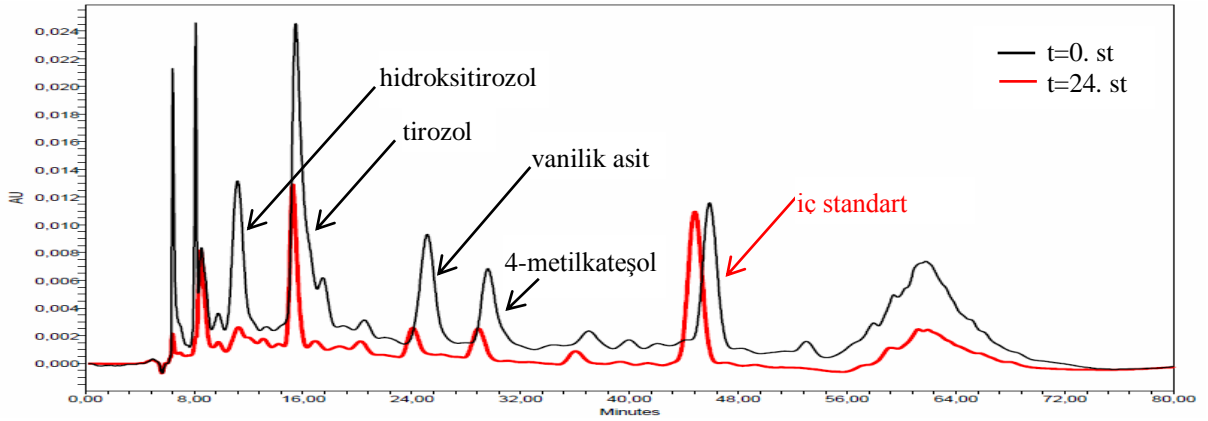
Şekil 4.9-4.12’de verilen kromatogramlardan elde edilen nitel sonuçlar, Çizelge 4.2’de verilmiştir. Buna göre; hidroksitirozol, tirozol, kateşol ve 4-metilkateşolün tirozinaz ile lakkaz enzimleri (katı ve sıvı) tarafından, hidroksitirozolün aynı zamanda mangan peroksidaz enzimi tarafından ve vanilik asitin ise yalnızca lakkaz enzimleri (katı ve sıvı) tarafından kullanılmış olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Ticari olarak elde edilen fenol parçalayıcı enzimlerin zeytin karasuyunda (ZK1) bulunan fenolik bileşenleri substrat olarak kullanımı (0.3 mg tirozinaz, 5.3 mg katı lakkaz, 3 mL sıvı lakkaz, 0.2 mg mangan peroksidaz ya da 8.6 mg tannaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

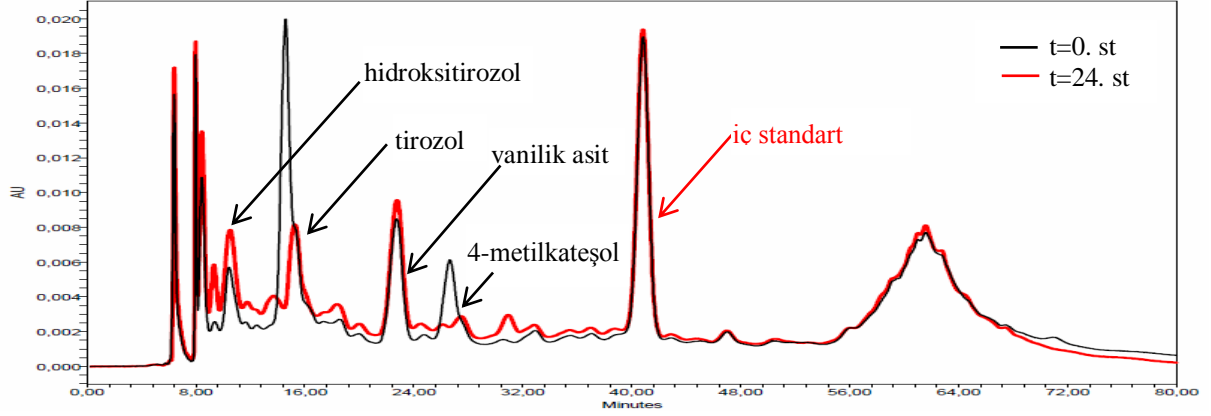
Fenolik Bileşen	Tirozinaz	Lakkaz (katı)	Lakkaz (sıvı)	Mangan peroksidaz	Tannaz
Hidroksitirozol	+	+	+	+	-
Tirozol	+	+	+	-	-
Kateşol	+	+	+	-	-
Vanilik asit	-	+	+	-	-
4-Metilkateşol	+	+	+	-	-

Tirozinaz enziminin zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden hidroksitirozol ve tirozole etki ettiği belirlendikten sonra, literatürde yer alan bilgiler doğrultusunda (Bölüm 2.4.2), ortama farklı derişimlerde askorbik asit eklenerek hidroksitirozol birikimi amaçlanmıştır.

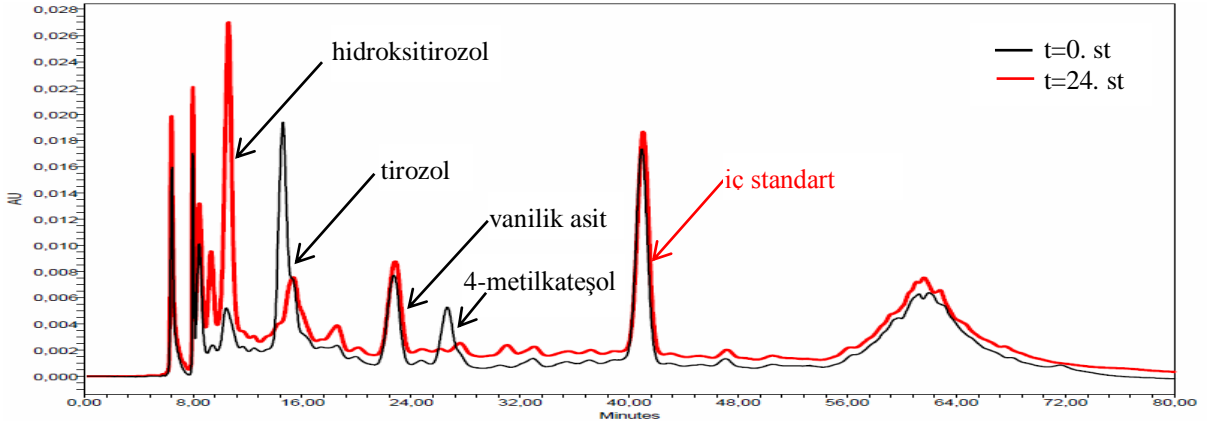
2, 5 ve 10 mM (35, 88 ve 176 mg/L) askorbik asit içeren zeytin karasuyu ortamları, ticari tirozinaz enzimi ile Bölüm 3.2.1’de verilen koşullarda ayrı ayrı 24 st muamele edilerek, t=0, 0.5, 1, 3, 5 ve 24. st anlarında alınan örnekler HPLC ile analizlenmiştir. Kantitatif HPLC analizi sonucu, askorbik asit derişiminin hidroksitirozol birikimi üzerine etkisi belirlenmiştir. Her bir ortama ait örnek kromatogramlar Şekil 4.13-4.15’te verilmiştir.



Şekil 4.13. 2 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.14. 5 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.15. 10 mM askorbik asit varlığında ticari tirozinaz ile işlem gören % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

24 st süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan 2, 5 ve 10 mM askorbik asit içeren ve ticari tirozinaz ile muamele edilen % 100 ZK1 ortamlarında bulunan fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak Çizelge 4.3-4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. 2 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	2 mM askorbik asit					
	t=0. st	t=0.5 st	t=1. st	t=3.st	t=5. st	t=24. st
Hidroksitirozol	22.9	46.7	37.7	21.6	12.0	11.4
Tirozol	60.2	14.2	12.5	11.7	12.8	11.5
Vanilik asit	9.1	7.4	7.5	7.4	7.1	7.5
4-Metilkateşol	10.9	3.3	3.6	3.5	2.5	2.6

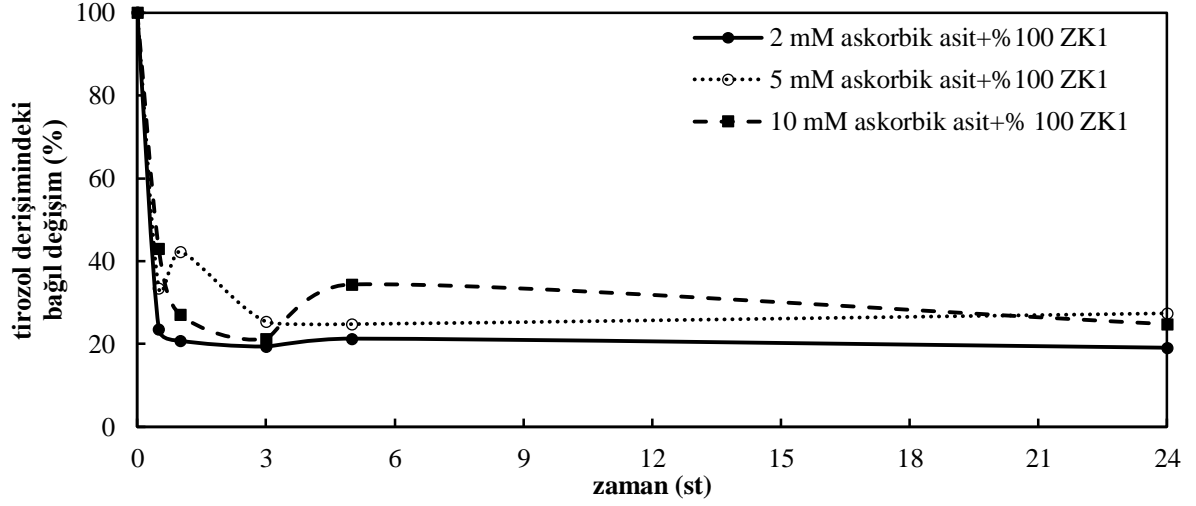
Çizelge 4.4. 5 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	5 mM askorbik asit					
	t=0. st	t=0.5 st	t=1. st	t=3.st	t=5. st	t=24. st
Hidroksitirozol	4.6	37.0	28.9	10.5	6.8	6.6
Tirozol	30.7	10.3	13.0	7.8	7.6	8.4
Vanilik asit	4.7	5.3	4.7	4.7	4.4	4.9
4-Metilkateşol	6.0	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8

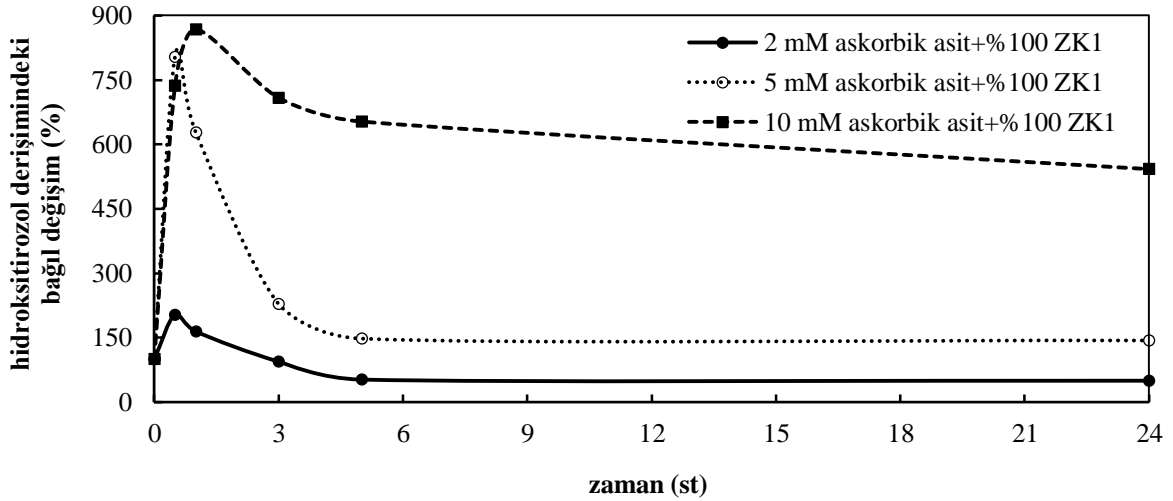
Çizelge 4.5. 10 mM askorbik asit içeren % 100 ZK1 ortamının tirozinaz ile muamelesi sonucu zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	10 mM askorbik asit					
	t=0. st	t=0.5 st	t=1. st	t=3.st	t=5. st	t=24. st
Hidroksitirozol	4.7	34.6	40.8	33.3	30.7	25.5
Tirozol	31.4	13.4	8.5	6.7	10.8	7.8
Vanilik asit	4.9	5.8	5.1	4.7	5.0	4.8
4-Metilkateşol	5.9	0	0	0	0	0

Hidroksitirozol birikiminde önemli rol oynayan, 2, 5 ve 10 mM askorbik asit varlığında % 100 ZK1’de bulunan tirozol ve hidroksitirozolün derişimlerinin zamanla değişimi Şekil 4.16 ve 4.17’de verilmiştir. Buna göre, her üç askorbik asit derişiminde de azalan tirozol derişimi ile birlikte hidroksitirozol derişimi artmaktadır. Ancak, zaman ilerledikçe ortamda biriken hidroksitirozolün ileri tepkimeler ile parçalandığı gözlenmiştir. Bu artış ve azalış, tirozinaz enziminin difenolaz aktivitesi ile tirozolden hidroksitirozol oluşum mekanizması (Bölüm 2.4.2) ile örtüşmektedir.



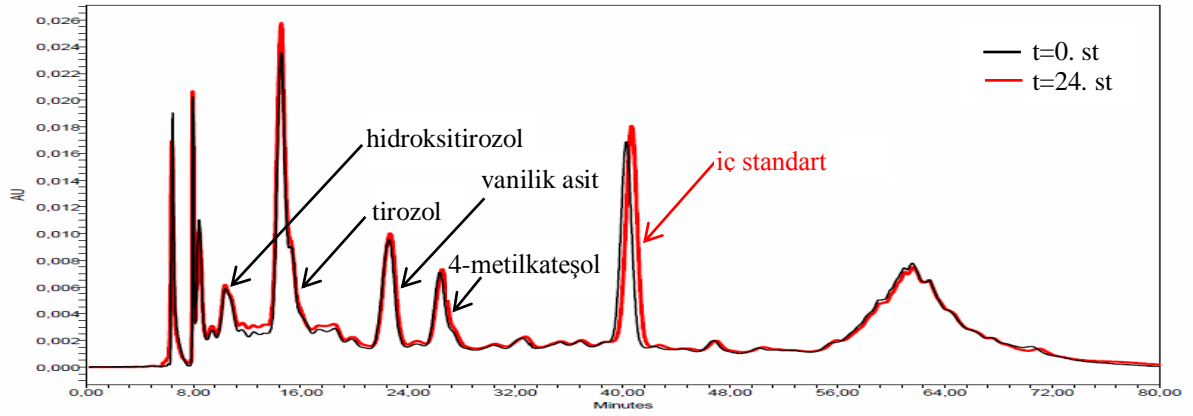
Şekil 4.16. 2, 5, ve 10 mM askorbik asit varlığında % 100 ZK1 ortamının tirozinaz enzimi ile muamelesi sırasında zeytin karasuyunda bulunan tirozol miktarının bağıl değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.17. 2, 5, ve 10 mM askorbik asit varlığında % 100 ZK1 ortamının tirozinaz enzimi ile muamelesi sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (0.3 mg tirozinaz / 20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Elde edilen sonuçlara göre, 2 mM askorbik asitin çalışılan koşullarda ortamda hidroksitirozol birikimini sağlamaya yeterli değildir. Ancak askorbik asit derişimi 5 ve 10 mM'a arttırıldığında, ortamda hidroksitirozol birikiminin artan askorbik asit derişimi ile birlikte arttığı görülmüştür.

Ticari enzimlerle yapılan denemeler için, kontrol grubu oluşturularak içerisinde enzim bulunmayan zeytin karasuyu ortamı, enzim içeren ortamlarla aynı koşullarda inkübe edilerek farklı zamanlarda alınan örnekler kantitatif olarak HPLC ile analizlenmiştir. Kontrol grubuna ait kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogram, Şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Enzimsiz ortamda inkübe edilen % 100 ZK1 için t=0. st ve t=24. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Şekil 4.18'de verilen, işlem görmemiş zeytin karasuyunun inkübasyonunun t=0. st ve t= 24. st anlarına ait kromatogramlarda, enzim bulunmayan ortamda zeytin karasuyunun hava ile oksidasyonu sonucu, fenolik maddelerin derişimlerinde değişiklik meydana gelip gelmediği incelenmiştir. Kantitatif HPLC sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. % 100 ZK1 ortamının (kontrol) enzimsiz ortamda inkübasyonu süresince içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (20 mL ZK1, T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	% 100 ZK1 (kontrol)					
	t=0. st	t=0.5 st	t=1. st	t=3.st	t=5. st	t=24. st
Hidroksitirozol	6.0	6.3	5.1	5.4	5.4	5.4
Tirozol	39.8	35.9	33.1	34.9	34.7	38.7
Vanilik asit	6.5	6.5	5.3	5.5	5.5	6.0
4-Metilkateşol	7.7	7.7	6.4	6.7	6.8	7.7

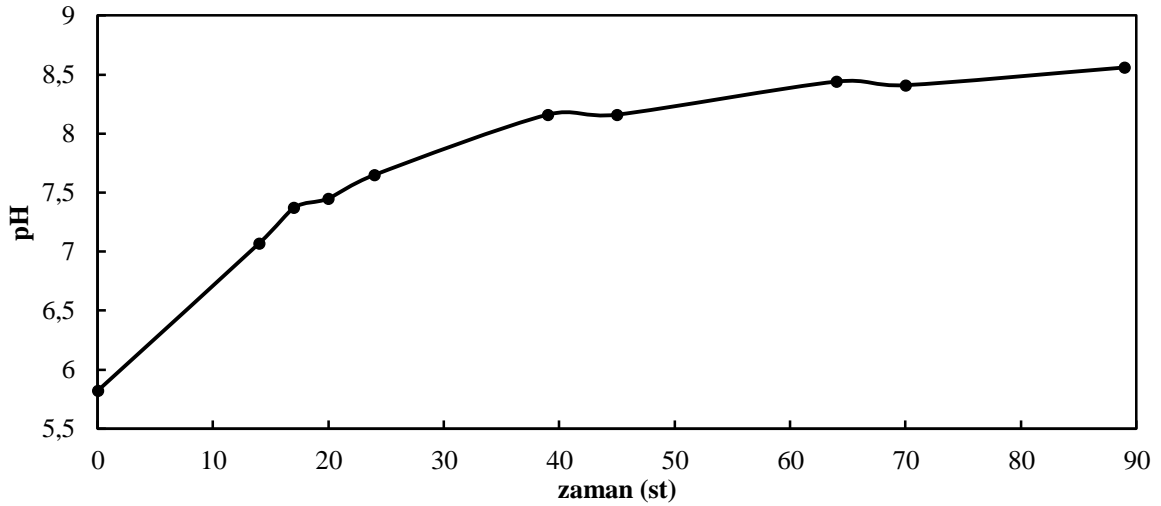
Çizelge 4.6'da verilen sonuçlara göre, hidroksitirozol, tirozol ve vanilik asit enzimsiz ortamda 24 st sonunda hava ile belli miktarlarda okside olmuşlardır. Bu değer, hidroksitirozol için % 10, tirozol için % 2.8 ve vanilik asit için % 7.7'dir.

Ticari enzimlerle yapılan denemeler sonucunda, fenol parçalayıcı enzimlerden tirozinaz enziminin, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin büyük çoğunluğunu etkin bir şekilde substrat olarak kullandığı görülmüştür. Çalışılan koşullarda ortamda hidroksitirozol birikimini sağlamak üzere, ortama 10 mM askorbik asit eklenmesi ile 1 st inkübasyon sonrası 9 kat hidroksitirozol birikimi sağlanmıştır.

4.4. *Debaryomyces hansenii* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı

Debaryomyces hansenii ile zeytin karasuyu içeren iki farklı ortamda, biyoarıtım süresince meydana gelen enzimatik değişimleri görmek amacıyla, iki farklı biyoarıtım yapılmıştır. Her iki ortam da % 25 ZK1, 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/L maya özütü içeriğine sahip olacak şekilde hazırlanmıştır.

Birinci ortamın (Ortam 1) 89 st süre ile *D. hansenii* tarafından biyoarıtımı sağlanmış, farklı zamanlarda alınan örnekler ile bu süre zarfında meydana gelen pH değişimi, tirozinaz monofenolaz, tirozinaz difenolaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve tannaz enzim aktiviteleri değişimi, toplam fenol derişimi değişimi ile toplam antioksidan aktivitesi değişimi incelenmiştir. Şekil 4.19'da, biyoarıtım ortamının zamanla pH değişimi görülmektedir. Çalışmada, pH değişimi hücre çoğalmasına ve toplam fenol giderimine karşılık gelmektedir. Bu nedenle pH değişimine ait grafiklerden, mikroorganizmanın büyüme evrelerine ait çıkarım yapılabilir. Şekil 4.19'a göre, ilk 14 st örnek alınmadığı için *D. hansenii*'nin uyum fazının belirlenemediği, ancak t=39. st'te logaritmik fazı tamamlayarak durağan faza girdiği söylenebilir.



Şekil 4.19. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 1) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Ortam 1'e ait toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.7'de verilmiştir. Biyoarıtım süresince, toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi zamanla azalmaktadır. 89 st biyoarıtım sonunda toplam fenol giderimi % 34 iken, zeytin karasuyunun toplam antioksidan aktivitesinde % 65 azalma belirlenmiştir. Çizelge 4.7'de verilen tirozinaz difenolaz enzim

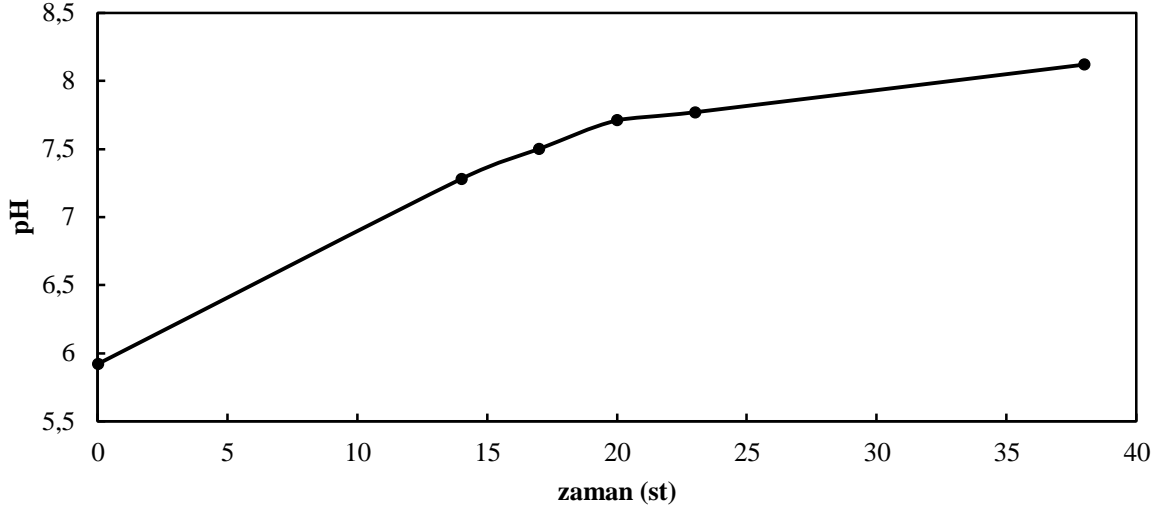
aktivitesinin dışında, tirozinaz monofenolaz, lakkaz, mangan peroksidaz ve tannaz enzim aktivitelerinin de zamanla değişimi incelenmiş; ancak bu enzimlere ait aktiviteler gözlenmemiştir. Aktivitesi gözlenen tek enzim olan tirozinaz difenolaz enziminin aktivitesinin ise zamanla azaldığı görülmüştür.

Çizelge 4.7. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 1) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	82.50	85.64	-
t=14	76.79	73.21	39
t=17	72.14	66.51	39
t=20	65.24	62.68	27
t=24	63.57	58.85	29
t=39	60.71	48.80	32
t=45	64.64	40.57	30
t=64	58.57	37.70	31
t=70	60.71	33.30	30
t=89	54.29	29.66	29

Ortam 1'e ait deney sonuçlarından, *D. hansenii*'nin % 25 ZK1 ortamındaki davranışı belirlenmiştir. Ortam 2, Ortam 1 ile özdeş olarak hazırlanmış; ancak bu kez 38 st süren biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerde pH değişimi, tirozinaz monofenolaz, tirozinaz difenolaz, lakkaz ve tannaz enzim aktiviteleri değişimi, toplam fenol derişimi değişimi ile toplam antioksidan aktivitesi değişimi yanında kantitatif HPLC analizi ile zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin derişimlerinin de değişimi incelenmiştir. Şekil

4.20’de, biyoarıtım ortamının zamanla pH değişimi görülmektedir. Şekil 4.20’ye göre, Ortam 2’nin biyoarıtımı, logaritmik fazın sonlarında sonlandırılmıştır.



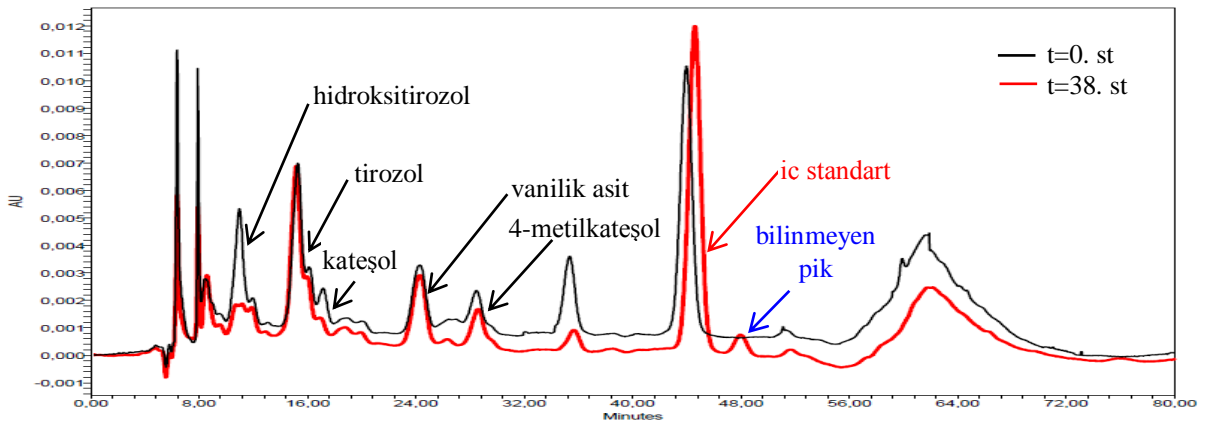
Şekil 4.20. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

İkinci ortama (Ortam 2) ait toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *D. hansenii*’ye ait enzim aktivitelerinin değişimi izelge 4.8’de verilmiştir. Biyoarıtım süresince, toplam fenol derişimi ile toplam antioksidan aktivitesi zamanla azalmaktadır. 38 st biyoarıtım sonunda toplam fenol gideriminde ve toplam antioksidan aktivitesinde % 39 azalma belirlenmiştir. Çizelge 4.8’de verilen enzim aktivitelerinin dışında, tirozinaz monofenolaz ve lakkaz enzim aktivitelerinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimlerin aktivitesi gözlenmemiştir. Ölçülen enzim aktivitelerinin değişiminin çok düzenli olmadığı görülmektedir. Literatürde *D. hansenii*’de tanımlanmış olan tannaz enziminin aktivitesi ([http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BXU9#section_name.](http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BXU9#section_name), 2009), düşük de olsa bu kez gözlenebilmiştir.

Çizelge 4.8. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görölen *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	82.14	78.74	-	-
t=14	72.14	67.23	27	0.12
t=17	60.71	62.47	24	0
t=20	64.64	62.83	22	0.07
t=23	60.36	59.62	22	0
t=38	50.00	47.96	32	0

Ortam 2'de meydana gelen zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.21'de, biyoarıtımın başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.21. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (Ortam 2) t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 9'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre *D. hansenii*, zeytin karasuyunda bulunan fenolik sadece hidroksitirozolü kullanmıştır. Ayrıca, ilk olarak t=23. st'e ait kromatogramda görülen, kalma süresi yaklaşık olarak 48. dk'ya karşılık gelen ve mevcut olan ticari özellikteki fenolik bileşenlerin kalma süreleri ile yakınlık göstermediğinden bilinmeyen yeni bir pik de gözlenmektedir.

Çizelge 4.9. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında (Ortam 2) bulunan fenolik bileşenlerin değışimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=14. st	t=17. st	t=20. st	t=23. st	t=38. st
Hidroksitirozol	7.3	9.2	7.5	3.1	2.4	0
Tirozol	15.0	15.8	15.1	14.0	14.0	8.0
Kateşol	0.9	0.7	0.5	0.5	0.3	0.3
Vanilik asit	2.7	3.0	2.8	2.6	2.7	2.6
4-Metilkateşol	1.9	2.7	2.0	2.7	1.9	1.6

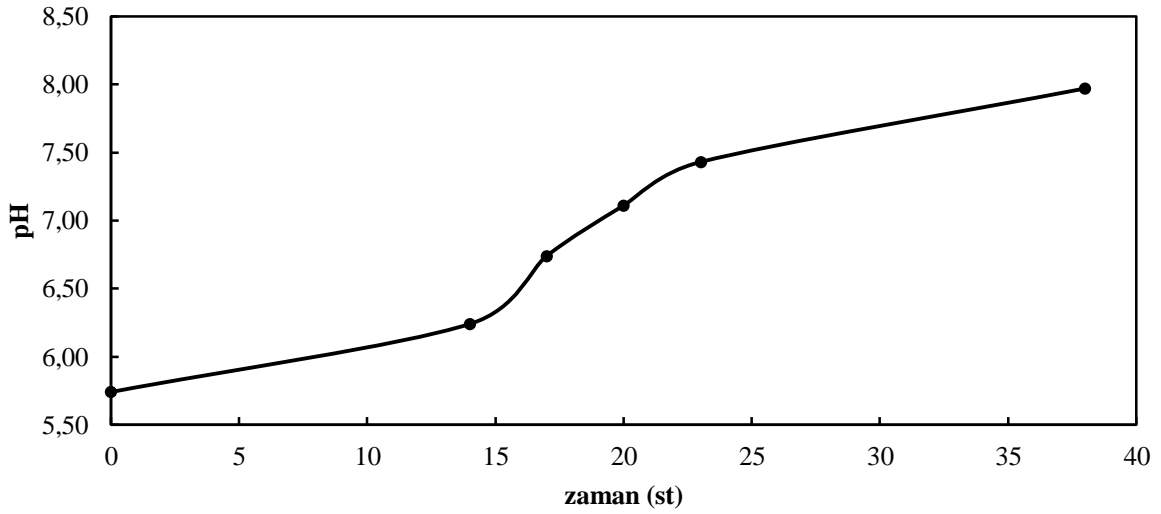
D. hansenii ile % 25 ZK1 ortamlarında yapılan biyoarıtımlar sonucunda, *D. hansenii*'nin zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden hidroksitirozolü tirozinaz difenolaz enziminin substratı olarak kullandığı görülmüştür. Tannaz enziminin etki ettiği substrat ve oluşturduğu ürün yapılan HPLC analizleri ile takip edilememiştir.

4.5. *Debaryomyces hansenii* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı Sırasında Ortama Askorbik Asit İlavesi ile Hidroksitirozol Birikimi

% 25 ZK1 ortamlarında, *D. hansenii*'ye ait tirozinaz difenolaz aktivitesi görülmesi ve kantitatif HPLC sonuçları, ortamda bulunan hidroksitirozolün tüketildiğini göstermektedir. Hidroksitirozol, biyoarıtım ortamında tirozinaz difenolaz enzim aktivitesi ile ilgili kinona

dönüşmektedir. Çalışmanın bu bölümünde, ortama askorbik asit ilave edilerek, oluşan kinondan hidroksitirozol oluşumunun sağlanması amaçlanmıştır (Bölüm 2.4.2). Bu doğrultuda, Bölüm 4.4'te içeriği verilen ortamlardan farklı olarak % 25 ZK1 içeren ortama, ortamdaki derişimi 50 ve 350 mg/L olacak şekilde askorbik asit eklenerek *D. hansenii* ile biyoarıtımlar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, 50 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamı ile eş zamanlı olarak askorbik asit içermeyen % 25 ZK1 ortamının da biyoarıtımı sağlanarak, kontrol grubu oluşturulmuştur.

İlk olarak, 50 mg/L askorbik asit derişimi varlığında % 25 ZK1 ortamının *D. hansenii* ile 38 st süresince biyoarıtımı gerçekleştirilmiştir. Mikroorganizma logaritmik artış fazını büyük ölçüde ilk 23 st'te tamamladığı için, pH değişimi dışındaki değişimler 23 st süresince izlenmiştir. Şekil 4.22'de, 50 mg/L askorbik asit varlığında % 25 ZK1 ortamının pH değişimi yer almaktadır.



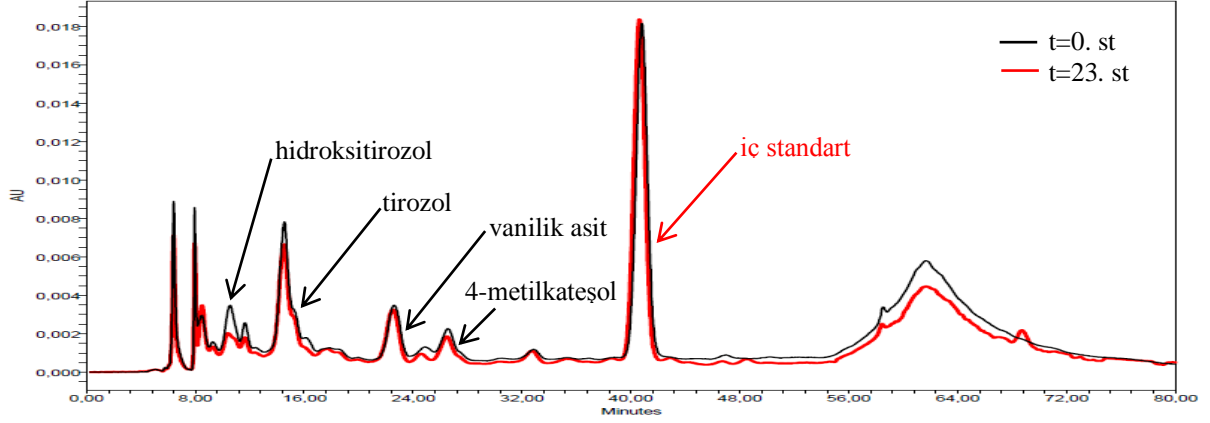
Şekil 4.22. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

50 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.10'da verilmiştir. 23 st sonunda ortamda toplam fenol derişimi % 33 ve toplam antioksidan aktivitesi % 16 azalmıştır. Çizelge 4.10'da verilen enzim aktivitelerinin dışında, lakkaz enzim aktivitesinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimin aktivitesi gözlenmemiştir. Bu ortamda düşük de olsa tirozinaz monofenolaz aktivitesi gözlenmiştir. Tirozinaz difenolaz aktivitesi zamanla düzenli bir değişim göstermemekle birlikte, genelde azalma göstermektedir.

Çizelge 4.10. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	68.21	62.89	-	-	-
t=14	47.14	57.98	3	27	0.06
t=17	56.07	56.44	0	32	0
t=23	45.71	52.99	0	23	0

50 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK1 ortamında meydana gelen fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.23'te, biyoarıtımın t=0. st ve t= 23. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



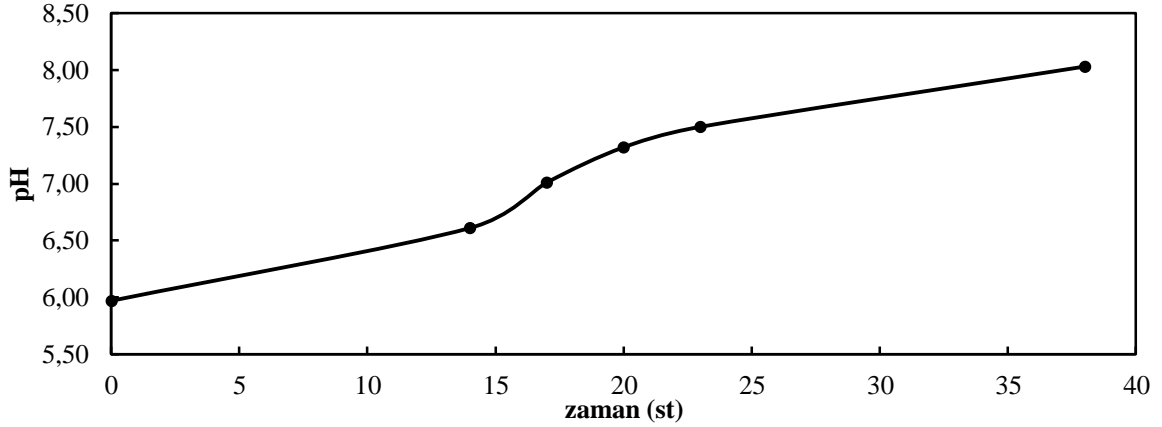
Şekil 4.23. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=23. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 11’de verilmiştir. Buna göre, ortamda sadece hidroksitirozolün kullanıldığı görülmüştür.

Çizelge 4.11. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=14. st	t=17. st	t=23. st
Hidroksitirozol	2.7	2.4	2.3	1.4
Tirozol	9.8	8.1	10.4	10.5
Vanilik asit	1.8	1.7	1.7	1.8
4-Metilkateşol	1.5	1.7	1.7	1.5

50 mg/L askorbik asit varlığında yapılan biyoarıtımla eş zamanlı olarak, askorbik asit içermeyen % 25 ZK1 ortamının (kontrol) 38 st süre ile biyoarıtımı yapılmış, bu ortama ait zamanla pH değişimi Şekil 4.24’te verilmiştir. 50 mg/L askorbik asit içeren ortamın pH değişimi ile karşılaştırıldığında, askorbik asitin pH artışını yavaşlattığı görülmüştür.



Şekil 4.24. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

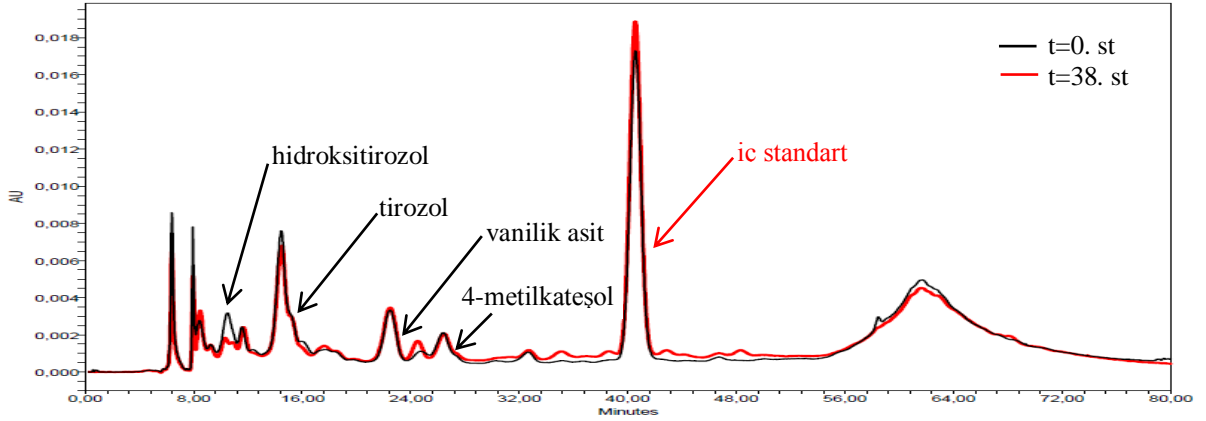
Kontrol ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.12'de verilmiştir. 38 st sonunda % 23 fenol giderimi sağlanırken toplam antioksidan aktivitesi % 24 azalmıştır. Çizelge 4.12'de verilen enzim aktivitelerinin dışında, lakkaz enzim aktivitesinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimin aktivitesi gözlenmemiştir. Enzim aktivitelerinin zamanla değişimine bakıldığında, genel olarak zamanla azaldıkları görülmektedir.

50 mg/L askorbik asit içeren ortamın 23. st'ine ait toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi sonuçları (Çizelge 4.10) ile kontrol ortamının 23. st'ine ait toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi sonuçları (Çizelge 4.12) karşılaştırıldığında, askorbik asit içeren ortamda toplam fenol giderimi ve toplam antioksidan aktivite azalmasının daha fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.12. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	57.86	59.89	-	-	-
t=14	60.71	57.53	4.5	20	0.05
t=17	53.21	55.17	3	75	0.13
t=20	57.14	54.17	0	24	0.05
t=23	54.76	54.45	0	19	0.09
t=38	44.64	45.28	0	20	0

Kontrol ortamında meydana gelen fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.25'te, biyoarıtımın t=0. st ve t= 38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması yer almaktadır.



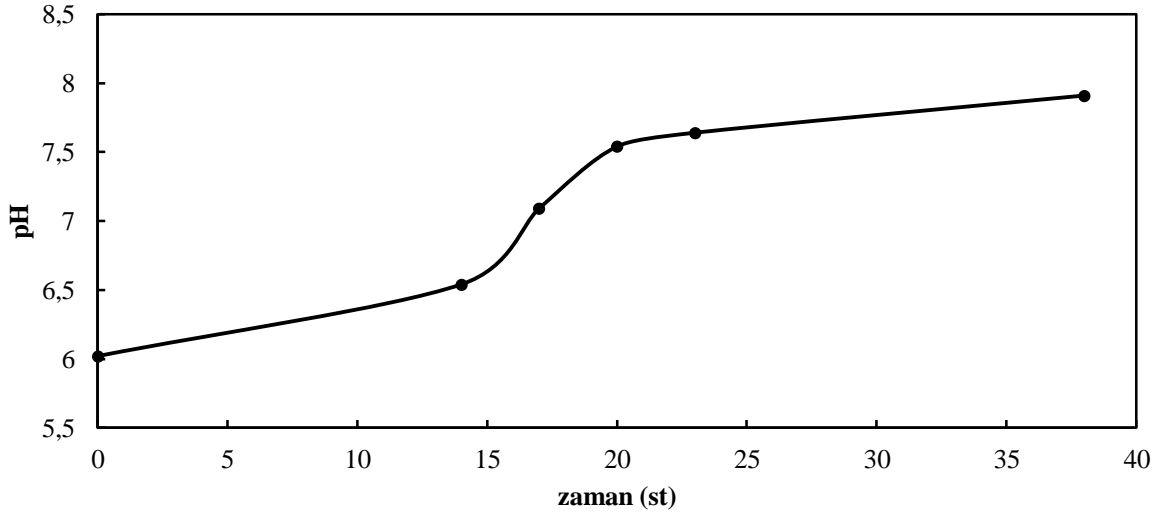
Şekil 4.25. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının (kontrol) t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 13'te verilmiştir. 50 mg/L askorbik asit varlığında gerçekleştirilen biyoarıtım sonrası ortamda bulunan hidroksitirozol miktarı ile kontrol ortamında gerçekleştirilen biyoarıtım sonrası ortamda bulunan hidroksitirozol miktarı birbiri ile özdeştir (Çizelge 4.11 ve 4.13). Biyoarıtım süresince sadece hidroksitirozol kullanılmış, diğer fenolik bileşenler parçalanamamıştır. Sonuç olarak, % 25 ZK1 ortamının *D. hansenii* ile biyoarıtımı sırasında ortamda 50 mg/L askorbik asit bulunmasının, ortamda hidroksitirozol birikimini sağlayamadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.13. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında (kontrol) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=14. st	t=17. st	t=20. st	t=23. st	t=38. st
Hidroksitirozol	2.5	2.8	2.2	1.4	1.3	1.2
Tirozol	9.9	9.5	9.3	10.5	10.9	10.6
Vanilik asit	1.9	1.9	1.8	1.8	1.9	1.9
4-Metilkateşol	1.2	1.7	1.6	1.6	1.6	1.6

Son olarak, 350 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK1 ortamının, farklı zamanlarda alınan örnekler ile 38 st biyoarıtımı incelenmiştir. Şekil 4.26'da, 350 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamının zamanla pH değişimi görülmektedir.



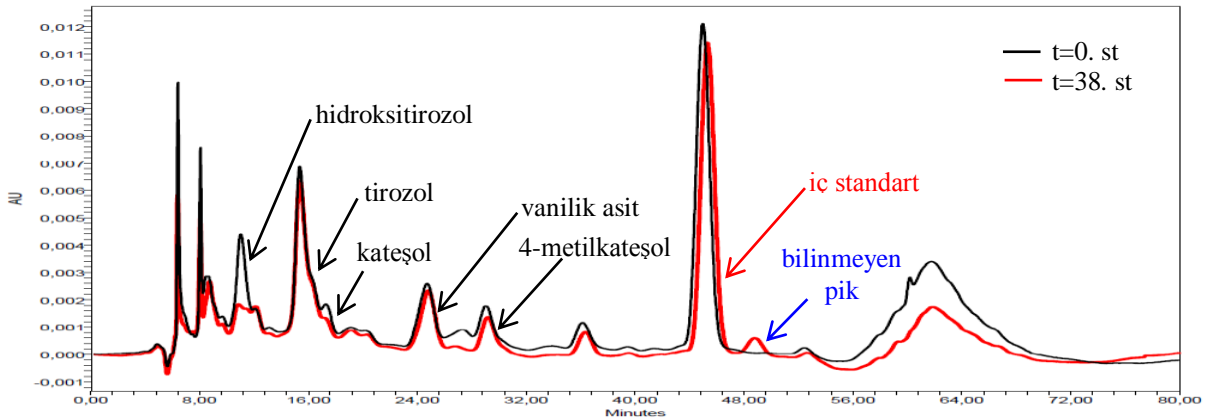
Şekil 4.26. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

350 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.14'te verilmiştir. Çizelge 4.14'te verilen enzim aktivitelerinin dışında, tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimin aktivitesi görülmemiştir. 38 st sonunda % 25 toplam fenol giderimi sağlanırken toplam antioksidan aktivitesi % 40 azalmıştır. Biyoarıtım süresince toplam fenol derişiminin, askorbik asit içermeyen Ortam 1 ve Ortam 2'de meydana gelen değişime göre daha az olduğu, toplam antioksidan aktivitesi değişiminin ise benzer olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Enzim aktiviteleri incelendiğinde ise, tirozinaz difenolaz aktivitesinin zamanla azaldığı, tannaz enziminin ise logaritmik fazın sonlarına doğru aktivite gösterdiği görülmektedir.

Çizelge 4.14. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *D. hansenii*'ye ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	61.07	63.41	-	-
t=14	59.29	57.86	26	0
t=17	52.86	52.88	17	0
t=20	51.43	51.05	18	0.085
t=23	45.71	40.03	16	0.062
t=38	46.07	38.00	19	0.051

350 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK1 ortamında meydana gelen fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.27'de, biyoarıtımın başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.27. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=38. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4. 15'te verilmiştir. *D. hansenii*, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden sadece hidroksitirozolü kullanmıştır. Hidroksitirozol miktarı, askorbik asit içermeyen ikinci ortamda bulunan miktardan (Çizelge 4. 9) daha az olmasına karşın (Çizelge 4.11 ve Çizelge 4.15), askorbik asit varlığında ortamdaki hidroksitirozol tamamen tüketilmemiştir. Buna göre, ortama eklenen askorbik asitin az da olsa hidroksitirozol birikimine etki ettiği söylenebilir.

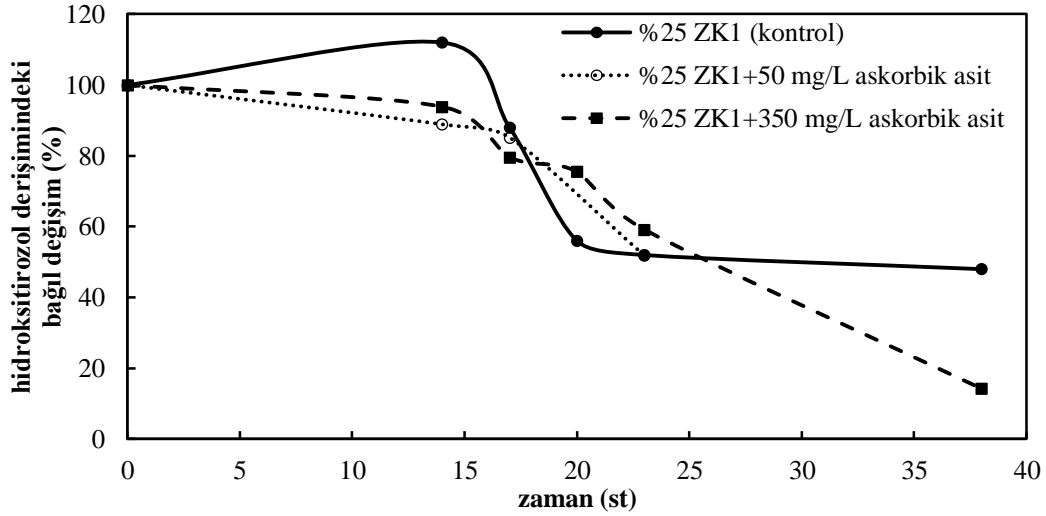
350 mg/L varlığında yapılan biyoarıtıma ait sonuçları (Çizelge 4.15), 50 mg/L varlığında gerçekleştirilen biyoarıtımın sonuçları (Çizelge 4.11) ve askorbik asit içermeyen kontrol ortamına ait sonuçlar (Çizelge 4.13) ile karşılaştırıldığında, biyoarıtım süresince yaklaşık olarak aynı oranda hidroksitirozol tüketildiği görülmüştür. Ayrıca, Şekil 4.27'de görüldüğü gibi kalma süresi yaklaşık olarak 48. dk'ya karşılık gelen, ilk olarak 38. st'e ait kromatogramda görülen ve mevcut olan ticari özellikteki fenolik bileşenlerin kalma süreleri ile yakınlık göstermediğinden tanımlanamayan yeni bir pik gözlenmektedir.

Çizelge 4.15. *D. hansenii* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1+350 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=14. st	t=17. st	t=20. st	t=23. st	t=38. st
Hidroksitirozol	4.9	4.6	3.9	3.7	2.9	0.7
Tirozol	11.4	10.8	10.7	11.4	9.2	11.2
Kateşol	0.5	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2
Vanilik asit	2.1	2.0	2.0	2.2	1.8	2.2
4-Metilkateşol	1.6	1.5	1.4	1.6	1.5	1.7

Çalışmanın bu bölümünde, biyoarıtım ortamlarına farklı derişimlerde askorbik asit eklenerek, ortamda bulunan hidroksitirozolün derişiminin azalmaması amaçlanmıştır. Şekil 4.28'de, 50 ve 350 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamları ile % 25 ZK2 ortamında (kontrol)

zamanla hidrokstirozol derişiminde meydana gelen bağıl değişim yer almaktadır. % 25 ZK2 (kontrol) ortamı askorbik asit içermemesine karşın hidrokstirozol derişimi 14. st'e kadar artmıştır, bunun nedeni *D. hansenii*'nin tirozinaz monofenolaz aktivitesi ile tirozolden hidrokstirozol oluşumunu katalizlemesi ya da oleuropeinin parçalanması ile oluşan hidrokstirozol olabilir. Zeytin karasuyu ortamı kompleks bir ortam olduğundan, enzim mekanizmalarını ortaya koyabilmek oldukça zordur, çünkü zeytin karasuyu fenol parçalayıcı enzimlere substrat olabilecek geniş bir aralıkta fenolik bileşen içermektedir. Askorbik asit varlığında ticari formdaki tirozinaz enzimi ile muamele edilen zeytin karasuyu ortamlarında ise ortama eklenen enzim saf olduğu için aktivitesi oldukça yüksektir ve etki mekanizması oldukça net olarak görülmektedir (Şekil 4.15 ve 4.16). Şekil 4.28'e bakıldığında, 350 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında zamanla hidrokstirozolün azalması, 50 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamına göre daha yavaştır. Ancak biyoarıtım ortamlarına askorbik asit ilavesi ile beklenildiği gibi ortamda hidrokstirozol birikimi sağlanamamış, yalnızca hidrokstirozolün daha yavaş tüketilmesi başarılabilmiştir.



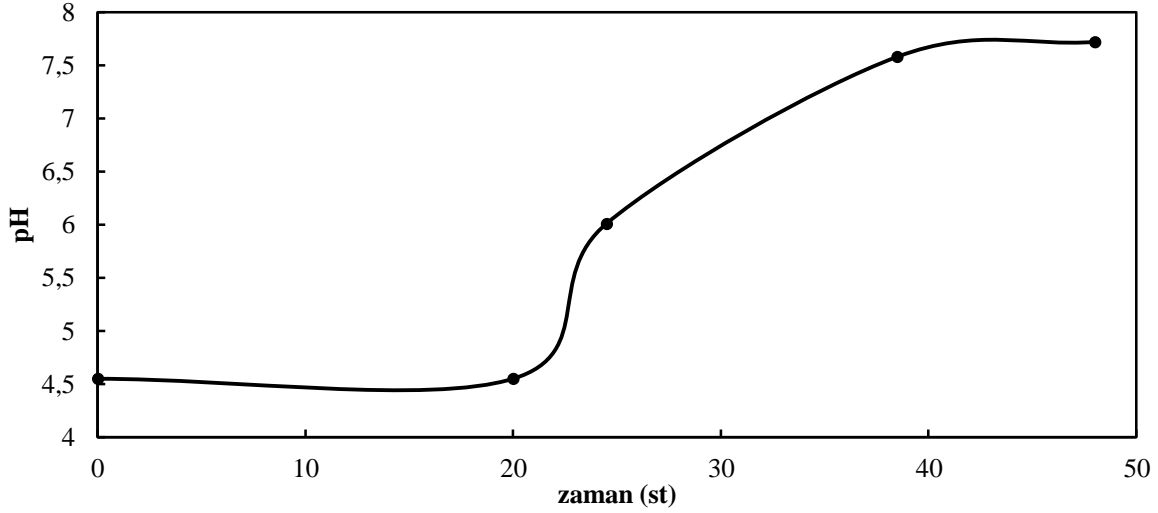
Şekil 4.28. % 25 ZK1 ortamı (kontrol) ile 50 ve 350 mg/L askorbik asit varlığında % 25 ZK1 ortamının *D. hansenii* ile biyoarıtımı sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidrokstirozol miktarının bağıl değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Çalışma süresince zeytin karasuyu +4°C’de muhafaza edilmiştir. Ancak saklama sırasında içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin derişimin azaldığı, örneklerin t=0. st’ine ait kantitatif HPLC analizi sonuçları karşılaştırıldığında görülmüştür (Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.11). Ayrıca, başlangıçta ZK1’in yapısında bulunan kateşol (Şekil 4.21), sonraki analizlerde (Şekil 4.23 ve Şekil 4.25) saklama süresince muhtemelen hava ile okside olduğu için görülmemiştir. Bu nedenle ileri deneylerde yapısı değişmeden kullanılmak üzere zeytin karasuyu, küçük hacimlere bölünerek -30°C’de saklanmış, deneyde kullanılacak miktarı oda sıcaklığına getirilerek kullanılmıştır.

4.6. *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı

Rhodotorula glutinis ile 2 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L maya özütü ile % 5, 20, 25 ve 50 zeytin karasuyu (ZK1) içeren dört farklı ortamda dört farklı biyoarıtım gerçekleştirilmiştir.

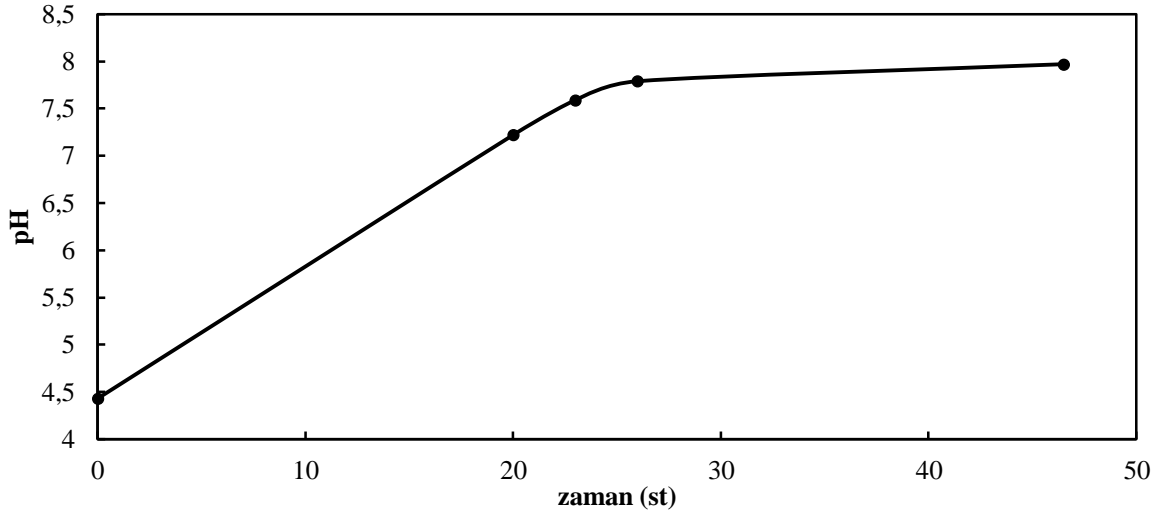
İlk olarak % 5 ZK1 içeren ortamda 48 st süresince pH değişimi ile lakkaz, mangan peroksidaz ve tannaz enzim aktivitelerinin değişimi izlenmiştir. Şekil 4.29’da, % 5 ZK1 ortamının 48 st süresince pH değişimi görülmektedir. Şekil 4.29’a göre, ilk 20 st uyum fazında olan *R. glutinis*, 38. st sonunda logaritmik artış fazını tamamlayarak durağan faza girmiştir.



Şekil 4.29. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 5 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Farklı zamanlarda alınan örneklerde lakkaz (t=24, 38 ve 48. st), mangan peroksidaz (t=38 ve 48. st) ve tannaz (t=38 ve 48. st) enzim aktivitelerine bakılmış, ancak hiçbir enzim aktivitesi gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, % 5 ZK1 ortamının zeytin karasuyu derişimi düşük olduğu için *R. glutinis* tarafından kullanılacak fenolik bileşenlerin de derişimi düşük olmasından dolayı enzimlerin indüklenememesi olduğu düşünülmüştür.

İkinci olarak, % 5 ZK1 derişimi % 20'ye arttırılıp diğer koşullar aynı olacak şekilde *R. glutinis* ile 46 st süreli bir biyoarıtım gerçekleştirilmiştir. Biyoarıtım süresince pH, enzim aktiviteleri, toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimleri incelenmiştir. Şekil 4.30'da % 20 ZK1 ortamının biyoarıtım süresince pH değişimi görülmektedir. Şekil 4.30'da, ilk 20 st örnek alınmadığı için mikroorganizmanın uyum fazı ve logaritmik çoğalma fazına girdiği zaman dilimi görülmemekte; ancak 26. st sonunda logaritmik fazı tamamlayarak durağan faza girdiği görülmektedir.



Şekil 4.30. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 20 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

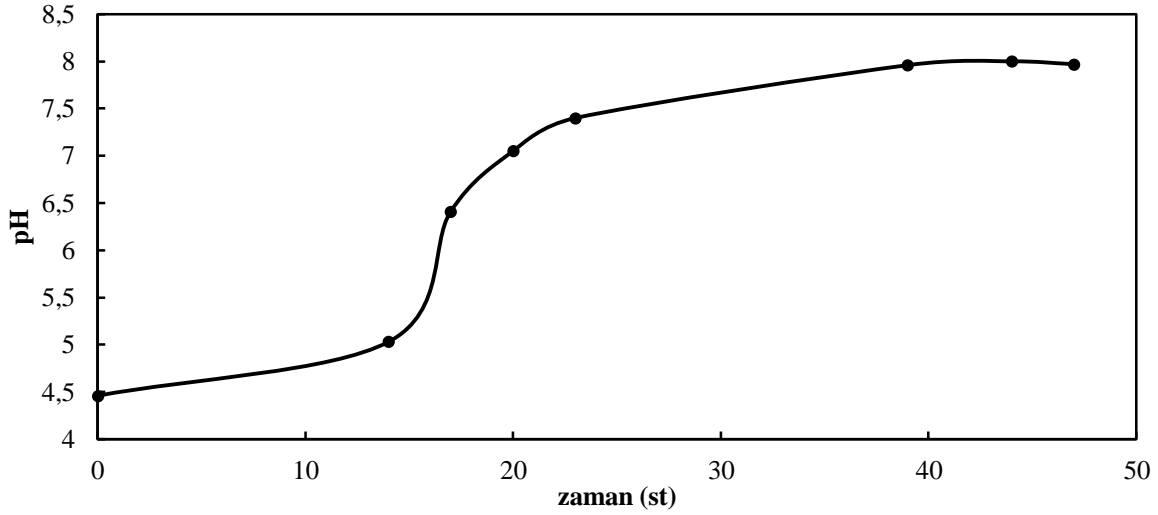
% 20 ZK1 ortamının biyoarıtımında 47 st süresince meydana gelen toplam fenol derişimi ile toplam antioksidan aktivitesi değişimi Çizelge 4.16’da verilmiştir. 47 st sonunda % 61 toplam fenol giderimi sağlanırken toplam antioksidan aktivitesi % 65 azalmıştır. Çizelge 4.16’ya göre, logaritmik çoğalma fazında toplam fenol tüketiminin büyük bir kısmı tamamlanarak ortamın toplam antioksidan aktivitesi de büyük ölçüde düşmüş, logaritmik fazın sonlarında ve sonrasında toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi fazla değişmemiştir. Farklı zamanlarda (t= 20, 23, 26 ve 47. st) alınan örneklerde lakkaz, tirozinaz monofenolaz, mangan peroksidaz ve tannaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. t=23. st anına ait örnekte 76 U/mL aktiviteye sahip tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi ile 0.1 U/mL aktiviteye sahip tannaz enzim aktivitesi görülmüş; bunların dışında enzim aktivitesi gözlenmemiştir.

Çizelge 4.16. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 20 ZK1 ortamının biyoarıtım süresince toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (% in.)
t=0	87.14	80.23
t=23	36.43	31.50
t=26	38.54	28.75
t=47	34.29	28.31

Zeytin karasuyu derişimi % 5'ten % 20'ye arttırıldığında, *R. glutinis* için ortamda bulunan fenolik bileşenlerin derişimi artmış, dolayısı ile fenol parçalayıcı enzimlerin substrat bulması kolaylaşmış olduğundan % 20 ZK1 ortamında *R. glutinis*'e ait fenol parçalayıcı enzim aktiviteleri gözlenmiştir.

Zeytin karasuyu derişimi % 25'e arttırılıp diğer koşullar sabit tutularak üçüncü biyoarıtım ortamı hazırlanmıştır. *R. glutinis* ile 47 st süresince % 25 ZK1 ortamının biyoarıtımı gerçekleştirilmiş, biyoarıtım süresince pH, enzim aktiviteleri, toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimleri ile zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi incelenmiştir. Şekil 4.31'de % 25 ZK1 ortamının biyoarıtım süresince pH değişimi görülmektedir. Buna göre, % 25 ZK1 ortamında *R. glutinis* 14 st sonunda uyum fazını tamamlayarak logaritmik artış fazına girdiği, 23. st'ten sonra ise durağan faza girdiği görülmektedir.



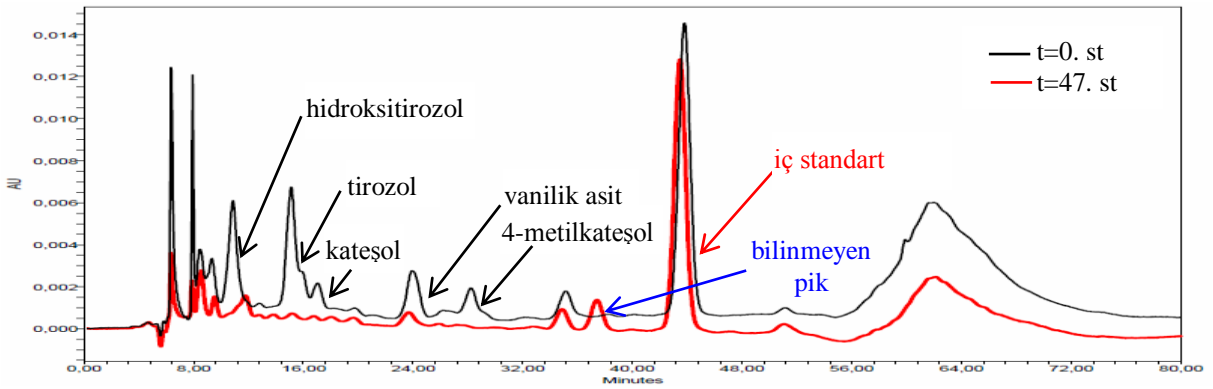
Şekil 4.31. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 25 ZK1 ortamının biyoarıtımında 47 st süresince meydana gelen toplam fenol derişimi, toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.17'de yer almaktadır. 47 st sonunda % 61 toplam fenol giderimi sağlanırken toplam antioksidan aktivitesi % 60 azalmıştır. Çizelge 4.17'de yer alan enzim aktivitelerinin dışında, lakkaz ve mangan peroksidaz enzim aktivitelerinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimlerin aktivitesi görülmemiştir. % 25 ZK1 ortamında, *R. glutinis*'e ait fenol parçalayıcı enzim aktivitelerinin genel olarak önce artma, sonrasında azalma eğiliminde oldukları görülmektedir. Çizelge 4.17'de görülen enzim aktiviteleri, % 5 ZK1 ve % 20 ZK1 ortamlarında görülen aktiviteler ile karşılaştırıldığında, artan zeytin karasuyu derişimi ile fenol parçalayıcı enzim aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. Ayrıca artan zeytin karasuyu derişimi ile substrat miktarının artması, diğer ortamlarda görülen aktivitelerden farklı olarak tannaz enzim aktivitesinin de görülmesini sağlamıştır.

Çizelge 4.17. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	81.79	77.05	-	-	-
t=14	80.00	74.48	4	19	0.075
t=17	73.21	73.03	30	33	0.086
t=20	57.14	52.97	0	-	0.051
t=23	49.64	46.23	25	12	0
t=39	39.29	30.02	0	16	0
t=44	36.79	34.83	0	18	-
t=47	31.79	30.50	10	25	0.063

% 25 ZK1 ortamının *R. glutinis* ile biyoarıtımı sırasında zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.32'de örnek olarak biyoarıtımın başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.32. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamının t=0. st ve t=47. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre *R. glutinis*, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden tanımlı olanların tümünü kullanmış, vanilik asit dışında ortamda bulunan fenolik bileşenlerin tümünü tüketmiştir. Ayrıca, Şekil 4.32’de görüldüğü gibi kalma süresi yaklaşık olarak 37. dk’ya karşılık gelen, ilk olarak 20 st’e ait kromatogramda görülen ve mevcut olan ticari özellikteki fenolik bileşenlerin kalma süreleri ile yakınlık göstermediğinden tanımlanamayan yeni bir pik gözlenmektedir.

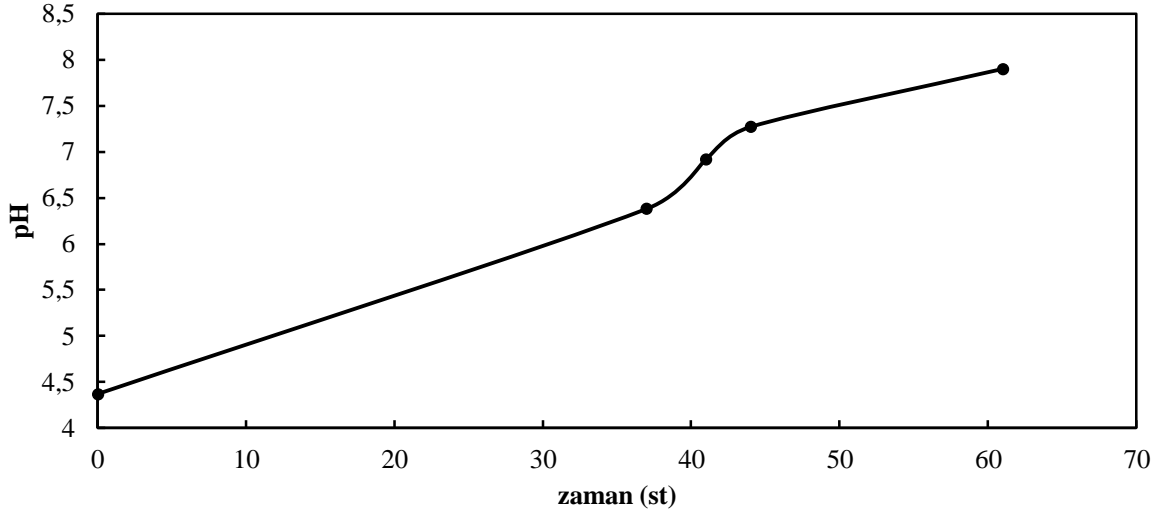
Çizelge 4.18. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK1 ortamında bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (30°C, 150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=14. st	t=17. st	t=20. st	t=23. st	t=39. st	t=44. st	t=47. st
Hidroksitirozol	8.8	10.2	9.4	3.1	0	0	0	0
Tirozol	10.4	9.7	9.5	3.6	0	0	0	0
Kateşol	0.9	0.3	0.1	0.1	0	0	0	0
Vanilik asit	1.9	0.7	1.0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
4-Metilkateşol	1.4	0.4	0	0	0	0	0	0

R. glutinis ile % 25 ZK1 ortamında yapılan biyoarıtım sonucunda, *R. glutinis*’in zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenleri etkin bir şekilde kullandığı görülmüştür. *R. glutinis* logaritmik artış fazını tamamlamadan, ortamda bulunan hidroksitirozol, tirozol, kateşol ve 4-metilkateşolün tamamını tüketmiştir.

Son olarak zeytin karasuyu derişimi % 50’ye artırılıp diğer koşullar sabit tutularak dördüncü biyoarıtım ortamı hazırlanmıştır. *R. glutinis* ile 61 st süresince gerçekleştirilen biyoarıtım sırasında pH, enzim aktiviteleri, toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimleri ile zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi farklı zamanlarda

alınan örnekler ile incelenmiştir. Şekil 4.33'te biyoarıtım süresince meydana gelen pH değişimi görülmektedir. *R. glutinis*'in % 50 ZK1 ortamına uyumu, ortamın zeytin karasuyu içeriği yüksek olduğu için uzun sürmüştür. Örnek alma süreleri, büyüme evresinin net olarak belirlenmesi için uygun olmadığından, sadece *R. glutinis*'in 37-44. st zaman aralığında logaritmik artış fazında olduğu söylenebilir.



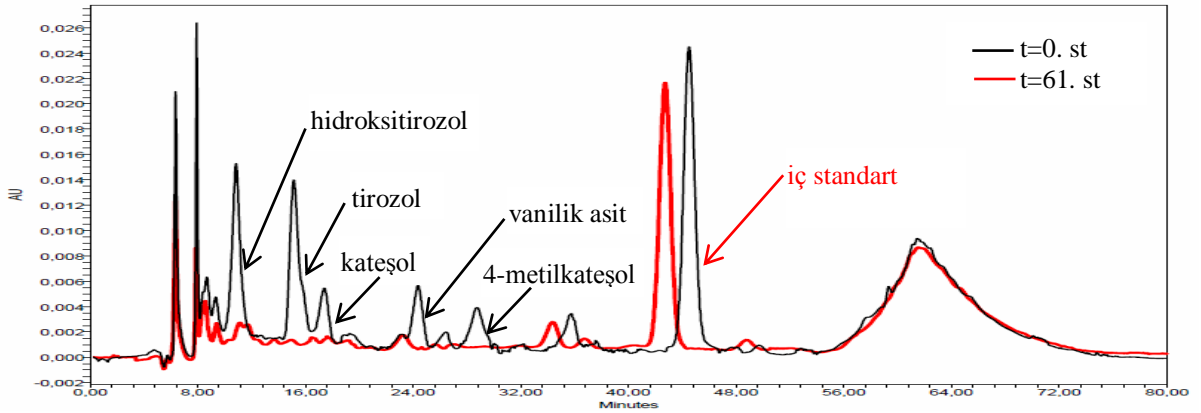
Şekil 4.33. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 50 ZK1 ortamının biyoarıtımında 61 st süresince meydana gelen toplam fenol derişimi, toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.19'da verilmiştir. 61 st sonunda % 63 toplam fenol giderimi sağlanırken toplam antioksidan aktivitesi % 47 azalmıştır. Çizelge 4.19'da verilen enzim aktivitelerinin dışında, lakkaz ve mangan peroksidaz enzim aktivitelerinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimlerin aktivitesi gözlenmemiştir. % 50 ZK1 ortamında, *R. glutinis*'e ait fenol parçalayıcı enzim aktiviteleri zamanla düzenli bir değişim göstermemekle birlikte, tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi ile tirozinaz difenolaz ve tannaz enzim aktiviteleri ilk belirlendikleri andan sonra zamanla azalma eğilimi göstermişlerdir.

Çizelge 4.19. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	137.50	93.73	-	-	-
t=37	123.21	91.54	50	45	0.08
t=41	81.43	78.84	15	46	0.07
t=44	60.48	66.38	-	40	0
t=61	51.19	50.00	0	25	0

% 50 ZK1 ortamının *R. glutinis* ile biyoarıtımı sırasında zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.34'te örnek olarak biyoarıtımın başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.34. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının t=0. st ve t=61. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre *R. glutinis*, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden tanımlı olanların tümünü kullanmıştır. Çizelge 4.20’de verilen sonuçlar, % 25 ZK1 ortamında meydana gelen değişimler (Çizelge 4.18) ile karşılaştırıldığında, ortamda bulunan fenolik bileşenlerin tüketiminin daha ileri saatlerde olduğu ve % 50 ZK1 ortamında % 25 ZK1 ortamından farklı olarak ortamdaki vanilik asitin de tüketildiği görülmektedir.

Çizelge 4.20. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamında bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (30°C, 150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=37. st	t=41. st	t=44. st	t=61. st
Hidroksitirozol	17.1	58.1	10.4	0	0
Tirozol	16.9	27.6	10.0	0	0
Kateşol	2.8	0	0	0	0
Vanilik asit	3.0	1.7	0	0	0
4-Metilkateşol	2.1	0	0	0	0

R. glutinis ile % 50 ZK1 ortamında yapılan biyoarıtım sonucunda, yüksek zeytin karasuyu derişiminde *R. glutinis*’in fenol parçalayıcı enzim aktivitelerinin de yüksek olduğu ve ortamda bulunan tüm fenolik bileşenleri tükettiği görülmüştür.

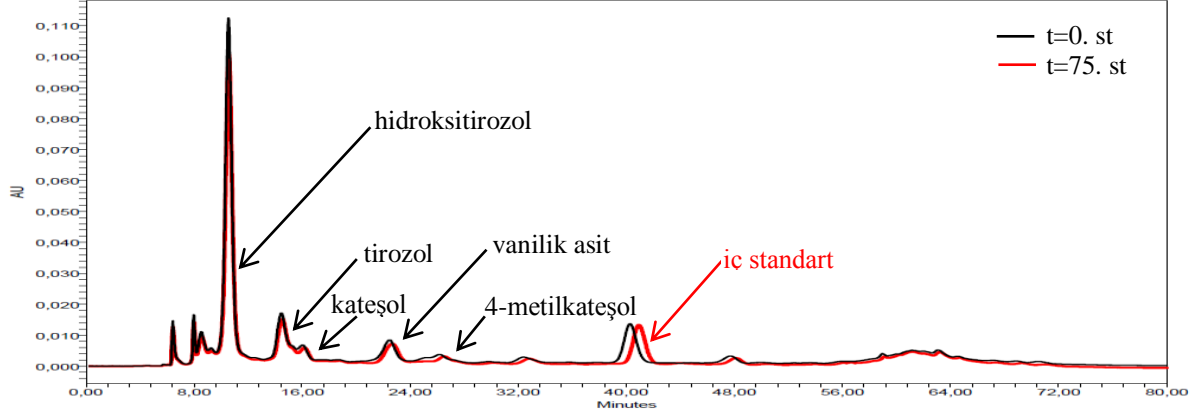
D. hansenii ve *R. glutinis* mayalarıyla yapılan biyoarıtımlar için, kontrol grubu oluşturularak içerisinde mikroorganizma bulunmayan % 25 ZK2 ve 5 g/L amonyum sülfat ile 1 g/L maya özütü içeren ortam, mikroorganizmalarla biyoarıtımı gerçekleştirilen ortamlarla aynı koşullarda inkübe edilerek farklı zamanlarda alınan örneklere ait toplam fenol derişimi, toplam antioksidan aktivitesi ve kantitatif HPLC analizleri yapılmıştır. Kontrol grubuna ait toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi tayini sonuçları Çizelge 4.21’de verilmiştir. Buna göre, 75 st inkübasyon sonunda toplam fenol derişimi % 7.7 kadar azalırken, toplam

antioksidan aktivitesi değişmemiştir. Bu doğrultuda, zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin hava ile teması sonucu fenolik bileşenlerin az da olsa okside olarak toplam fenol derişimini azalttığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 4.21. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortam (Kontrol) için inkübasyonu süresince toplam fenol ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)
t=0	237.50	95.78
t=21	227.50	-
t=24	227.50	-
t=27	228.93	-
t=30	223.93	-
t=45	231.79	96.11
t=48	233.57	96.11
t=51	237.14	96.03
t=54	247.50	96.03
t=57	219.64	96.19
t=70	220.36	96.27
t=75	219.29	-

Kontrol ortamının inkübasyonu süresince zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi, farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.35'te örnek olarak inkübasyonun başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması verilmiştir.



Şekil 4.35. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortam (Kontrol) için t=0. st ve t=75. st anlarına ait HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

HPLC kantitatif analizlerinden, mikroorganizma bulunmayan ortamda zeytin karasuyunun hava ile oksidasyonu sonucu fenolik maddelerin derişimlerinde değişiklik meydana gelip gelmediği hesaplanmıştır. Kantitatif HPLC sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.22’de verilmiştir.

Çizelge 4.22. % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortamın (Kontrol) inkübasyonu süresince içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=21. st	t=24. st	t=27. st	t=30. st	t=45. st
Hidroksitirozol	142.2	131.0	129.2	133.1	136.0	137.7
Tirozol	17.9	15.2	14.6	15.5	16.0	17.3
Kateşol	2.4	1.9	1.8	2.6	2.6	2.7
Vanilik asit	5.8	5.4	5.3	5.4	5.3	5.5
4-Metilkateşol	1.9	1.8	1.7	1.6	1.6	1.7

Çizelge 4.22. (devam) % 25 ZK2 içeren mikroorganizmasız ortamın (Kontrol) inkübasyonu süresince içerisinde bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=48. st	t=51. st	t=54. st	t=57. st	t=70. st	t=75. st
Hidroksitirozol	144.7	138.5	154.5	140.2	140.9	132.4
Tirozol	17.3	16.3	17.9	17.6	17.5	16.8
Kateşol	2.8	2.8	3.1	2.8	2.9	2.6
Vanilik asit	5.7	5.6	6.4	5.8	5.8	5.6
4-Metilkateşol	1.8	1.8	2.0	1.8	1.7	1.8

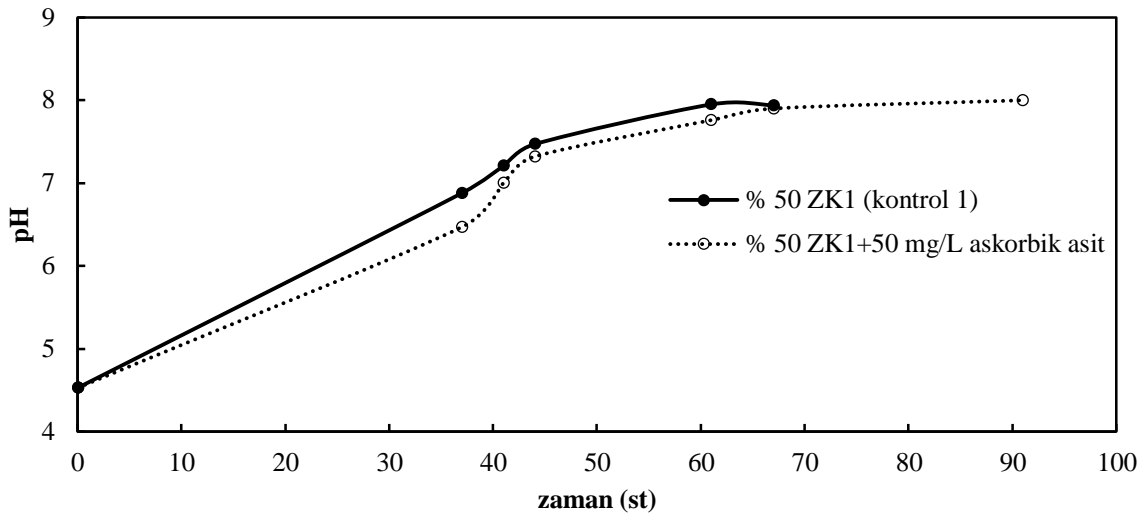
Çizelge 4.22'ye göre, hidroksitirozol, tirozol, vanilik asit ve 4-metilkateşol mikroorganizma bulunmayan ortamda 75 st sonunda hava ile belli miktarlarda oksitlenmişlerdir. Bu değer, hidroksitirozol için % 7, tirozol için % 6, vanilik asit için % 3 ve 4-metilkateşol için % 5'tir. Kateşol ise 75 st inkübasyon sonunda % 8'lik bir artış göstermiştir. Bu artışın sebebi, bazı fenolik bileşenlerin hava ile oksidasyonu sonucu kateşole dönüşmesi düşünülmüştür.

4.7. *Rhodotorula glutinis* ile Zeytin Karasuyu Biyoarıtımı Sırasında Hidroksitirozol Birikimi

4.7.1. Biyoarıtım ortamına askorbik asit ilavesi ile hidroksitirozol birikimi

Bölüm 2.4.2'de verilen bilgiler doğrultusunda, *R. glutinis* ile biyoarıtım sırasında ortamda değerli bir antioksidan olan hidroksitirozolün birikimini sağlayabilmek için, beş farklı derişimde askorbik asit (50, 100, 200, 400 ve 1000 mg/L), 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/L maya özütü içeren % 50 ZK1 ya da % 25 ZK2 ortamlarına eklenerek beş farklı biyoarıtım gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak, 50 mg/L askorbik asit içeren % 50 ZK1 ortamının *R. glutinis* ile 91 st biyoarıtımı gerçekleştirilmiştir. Ayrıca askorbik asit içermeyen % 50 ZK1 ortamının, % 50 ZK1+ 50 mg/L askorbik asit ortamı ile eş zamanlı olarak *R. glutinis* ile 67 st biyoarıtımı sağlanarak kontrol grubu oluşturulmuştur. Şekil 4.35'te % 50 ZK1 ve % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamların *R. glutinis* ile biyoarıtımı sırasında meydana gelen pH değişimi görülmektedir. Şekil 4.36'da, biyoarıtım ortamına askorbik asit eklenmesinin pH artışını yavaşlattığı görülmektedir.



Şekil 4.36. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 (Kontrol 1) ve % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 50 ZK1 ortamının (Kontrol 1) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.23'te, % 50 ZK1+ 50 mg/L askorbik asit içeren ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.24'te verilmiştir. % 50 ZK1 ortamında (Kontrol 1) 67 st sonunda toplam fenol derişiminde % 73 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 51 azalma görülmüştür. Buna karşın % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamda 91 st sonunda toplam fenol derişiminde % 67 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 59 azalma görülmüştür. % 50 ZK1 (Kontrol 1) ve % 50ZK1+50

mg/L askorbik asit içeren ortamların toplam fenol derişiminde ve toplam antioksidan aktivitesinde meydana gelen azalmalar birbirine yakındır. Çizelge 4.23'te verilen enzim aktivitesinin dışında, tannaz enzim aktivitesinin de zamanla değişimi incelenmiş, ancak bu enzimin aktivitesi gözlenmemiştir. % 50 ZK1 (Kontrol 1) ve % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarında gözlenen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitei karşılaştırıldığında, her iki ortamda da düşük lakkaz aktivitesi ve tirozinaz monofenolaz aktivitesi görüldüğü, tirozinaz difenolaz aktivitesinin her iki ortamda da benzer değişim göstererek önce artıp sonra azalma eğiliminde olduğu söylenebilir. Ancak, biyoarıtım ortamına 50 mg/L askorbik asit eklenmesi enzimlerin aktivite değerlerinin büyüklüklerinde önemli bir değişim yapmamıştır.

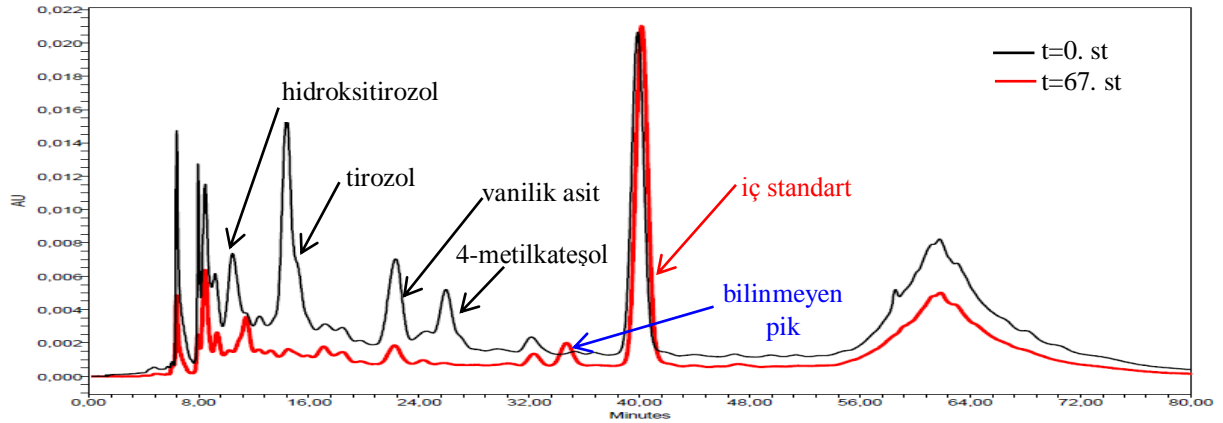
Çizelge 4.23. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 içeren ortamın (Kontrol 1) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitesinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	101.43	82.99	-	-	-
t=37	51.43	61.62	0	0	36
t=41	36.79	46.68	5.5x10 ⁻⁴	0	45
t=44	30.48	44.09	0	0	37
t=61	27.14	33.61	0	25	36
t=67	27.50	40.46	0	0	34

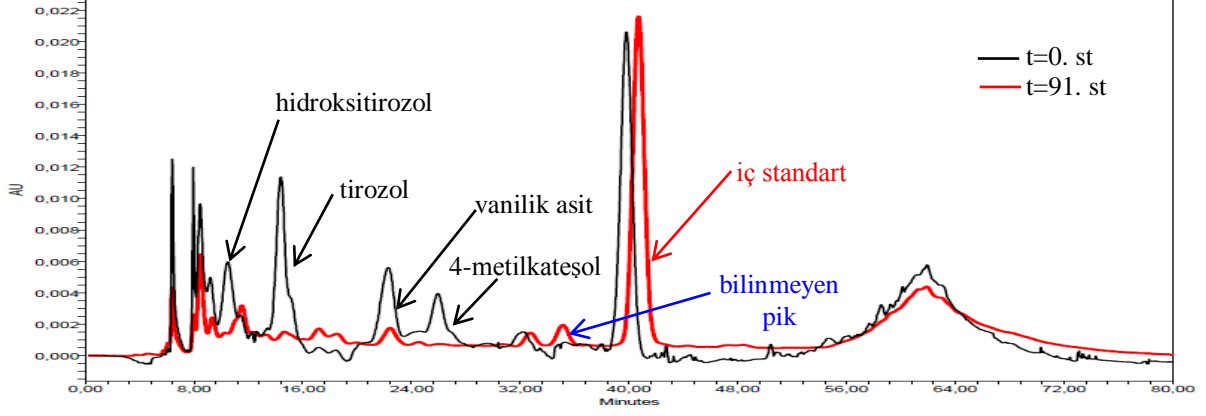
Çizelge 4.24. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)	Tannaz aktivitesi (U/mL)
t=0	92.14	88.59	-	-	-	-
t=37	75.36	72.30	1.1x10 ⁻³	20	31	0
t=41	60.36	71.78	0	0	50	0
t=44	40.71	58.51	0	0	44	0
t=61	31.67	47.09	0	0	21	0.05
t=67	28.93	42.01	0	5	26	0.11
t=91	30.00	36.51	-	-	-	-

% 50 ZK1 (Kontrol 1) ve 50 mg/L askorbik asit içeren % 50 ZK1 ortamlarında meydana gelen fenolik bileşen değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.37 ve 4. 38'de, biyoarıtımın başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması yer almaktadır.



Şekil 4.37. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamının (Kontrol 1) t=0. st ve t=67. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.38. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=91. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25 ve 4.26'da verilmiştir. 50 mg/L askorbik asit içeren % 50 ZK1 ortamında hidroksitirozolün zamanla azalması, % 50 ZK1 ortamına göre (Kontrol 1) daha yavaştır; ancak sonuç olarak her iki ortamda da hidroksitirozol tamamen tüketildiğinden, ortama eklenen 50 mg/L askorbik asitin hidroksitirozol birikimine etki etmediği belirlenmiştir. Bunun yanında, ilk olarak t=37. st'e ait kromatogramda görülen ve biyoarıtım sonuna kadar ortamda bulunan, kalma süresi yaklaşık olarak 35. dk'ya karşılık gelen ve mevcut olan ticari özellikteki fenolik bileşenlerin kalma süreleri ile yakınlık göstermediğinden tanımlanamayan yeni bir pik gözlenmektedir.

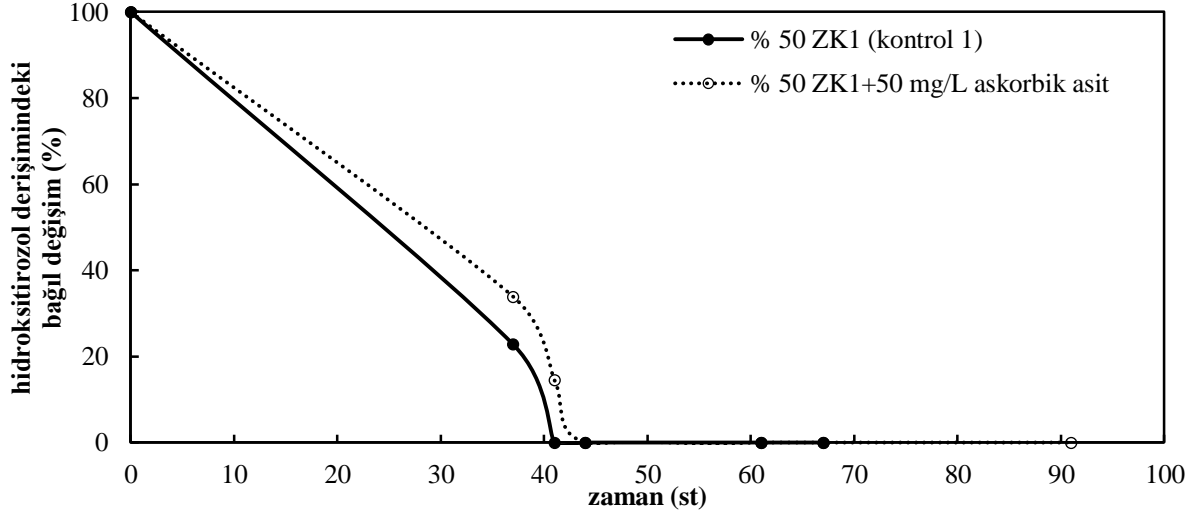
Çizelge 4.25. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1 ortamında (Kontrol 1) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=37. st	t=41. st	t=44. St	t=61. st	t=67. st
Hidroksitirozol	5.7	1.3	0	0	0	0
Tirozol	19.2	8.0	1.7	0.5	0.4	0.5
Vanilik asit	3.1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.6
4-Metilkateşol	3.0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.26. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

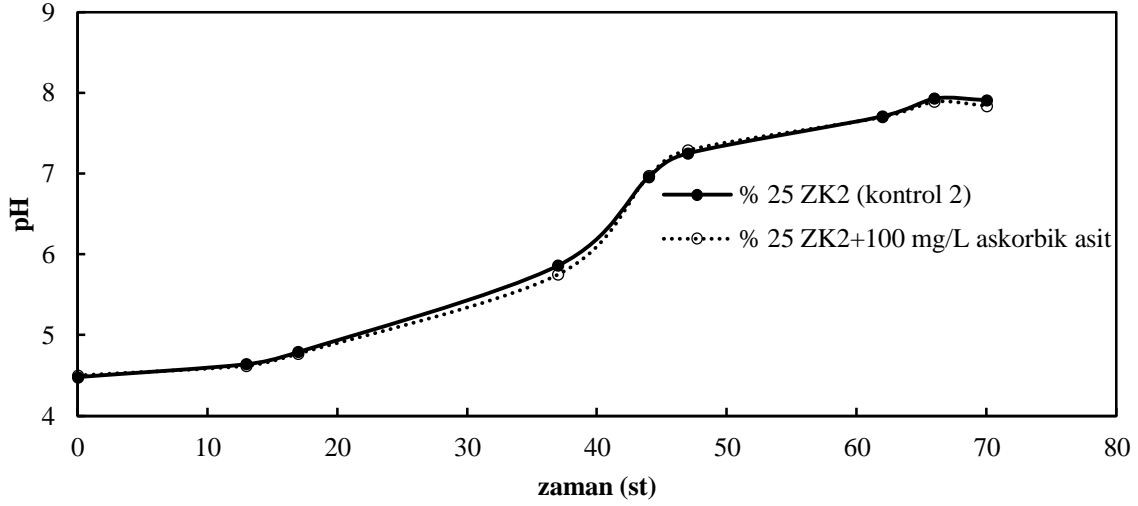
Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=37. st	t=41. st	t=44. st	t=61. st	t=67. St	t=91. st
Hidroksitirozol	6.2	2.1	0.9	0	0	0	0
Tirozol	15.2	10.2	6.0	0.6	0.4	0.6	0.7
Vanilik asit	2.7	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5
4-Metilkateşol	2.5	0	0	0	0	0	0

Biyoarıtım ortamına askorbik asit eklenmesi ile zamanla hidroksitirozol derişiminin değişmemesi ya da tirozinaz monofenolaz aktivitesi ve askorbik asit varlığına bağlı olarak hidroksitirozol derişiminde artış beklenmektedir. % 50 ZK1 (Kontrol 1) ile % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarında hidroksitirozol derişiminin zamanla bağlı olarak değişimi Şekil 4.39'da verilmiştir. Şekil 4.39'da, hidroksitirozol derişiminin her iki ortamda da zamanla azaldığı, ancak 50 mg/L askorbik asit içeren % 50 ZK1 ortamında azalmanın daha yavaş olduğu görülmektedir. Buna karşın, ortama eklenen 50 mg/L askorbik asitin hidroksitirozol birikiminde yeterli olmadığından beklenen sonuç görülememiştir.



Şekil 4.39. % 50 ZK1 (Kontrol 1) ile % 50 ZK1+50 mg/L askorbik asit içeren ortamların *R. glutinis* ile biyoarıtımları sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

İkinci olarak, 50 mg/L askorbik asit derişimi 100 mg/L'e artırılıp diğer koşullar aynı tutularak % 25 ZK2 ortamında *R. glutinis* ile 70 st biyoarıtım gerçekleştirilirken eş zamanlı olarak da askorbik asit içermeyen % 25 ZK2 ortamı hazırlanıp 70 st *R. glutinis* ile biyoarıtımı yapılarak kontrol grubu oluşturulmuştur. Şekil 4.40'ta % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamların *R. glutinis* ile biyoarıtımı sırasında meydana gelen pH değişimi görülmektedir. Şekil 4.40'a bakıldığında 100 mg/L askorbik asit varlığının pH değişimine etki etmediği görülmektedir. Her iki ortam için de *R. glutinis*'in, 20-62. st aralığında logaritmik fazda olduğu, sonrasında durağan faza girdiği söylenebilir.



Şekil 4.40. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 25 ZK2 ortamının (Kontrol 2) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.27'te, 100 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.28'de verilmiştir. % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 2) 70 st sonunda toplam fenol derişiminde % 78 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 37 azalma görülmüştür. Buna karşın 100 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamında 70 st sonunda toplam fenol derişiminde % 85 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 42 azalma görülmüştür. % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamların biyoarıtım sonunda toplam fenol giderimleri ve toplam antioksidan aktivitelerindeki azalma birbirine oldukça yakındır. % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve 100 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamlarında gözlenen *R. glutinis*'e ait enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında, her iki ortamda da durağan fazın başlarında düşük lakkaz aktivitesi görüldüğü, tirozinaz monofenolaz aktivitesinin düzenli bir değişim göstermediği ve tirozinaz difenolaz aktivitesinin önce artıp sonra sabit kaldığı söylenebilir.

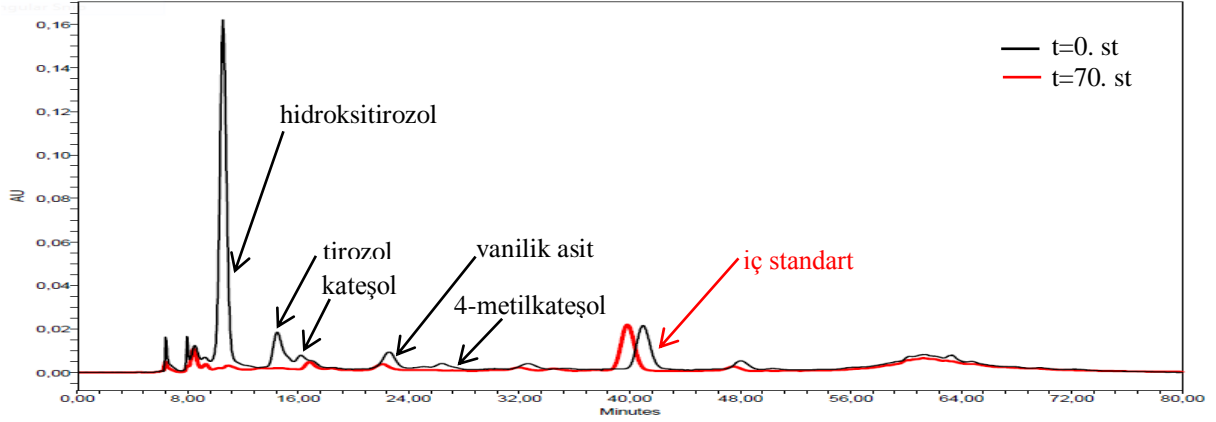
Çizelge 4.27. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 2) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	335.71	95.48	-	-	-
t=13	312.50	94.50	-	-	-
t=17	296.07	94.89	-	-	-
t=37	272.50	95.38	-	-	-
t=44	251.43	95.58	0	0	53
t=47	230.36	95.00	0	0	45
t=62	74.29	74.16	0	0	39
t=66	80.00	63.56	1.4x10 ⁻⁴	5	40
t=70	74.64	60.22	0	0	38

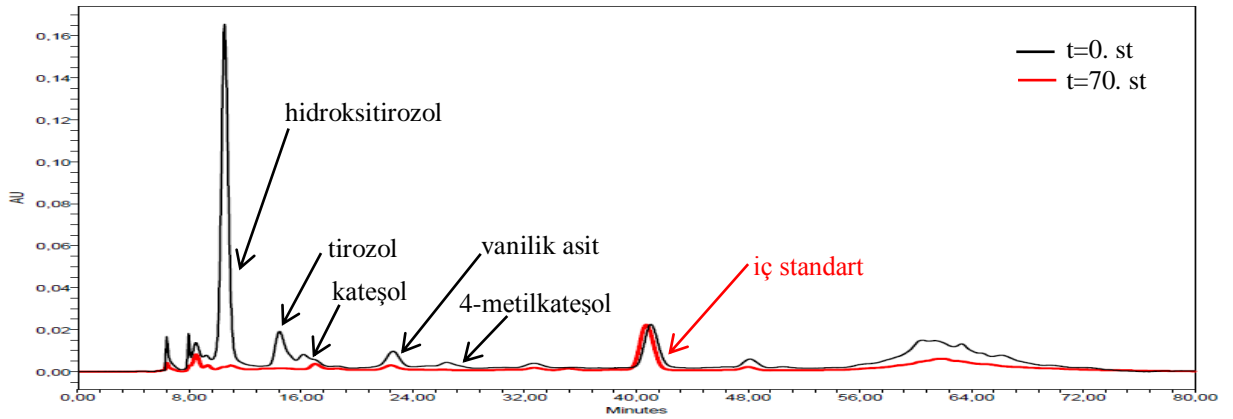
Çizelge 4.28. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	326.43	94.89	-	-	-
t=13	301.07	95.78	-	-	-
t=17	271.07	95.09	-	-	-
t=37	254.64	95.19	-	-	-
t=44	222.14	95.58	0	10	45
t=47	199.29	94.69	0	0	35
t=62	47.86	69.74	0	0	37
t=66	38.93	61.98	1.4x10 ⁻⁴	0	38
t=70	47.86	54.71	0	0	30

% 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarında meydana gelen fenolik bileşenlerin zamanla değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.41 ve 4. 42’de biyoarıtımların başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması yer almaktadır.



Şekil 4.41. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 2) t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.42. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.29 ve 4.30'da verilmiştir. % 25 ZK2 (Kontrol 2) ve % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarında zamanla fenolik bileşenlerin derişimlerinin zamanla değişimleri benzer davranış göstermiştir.

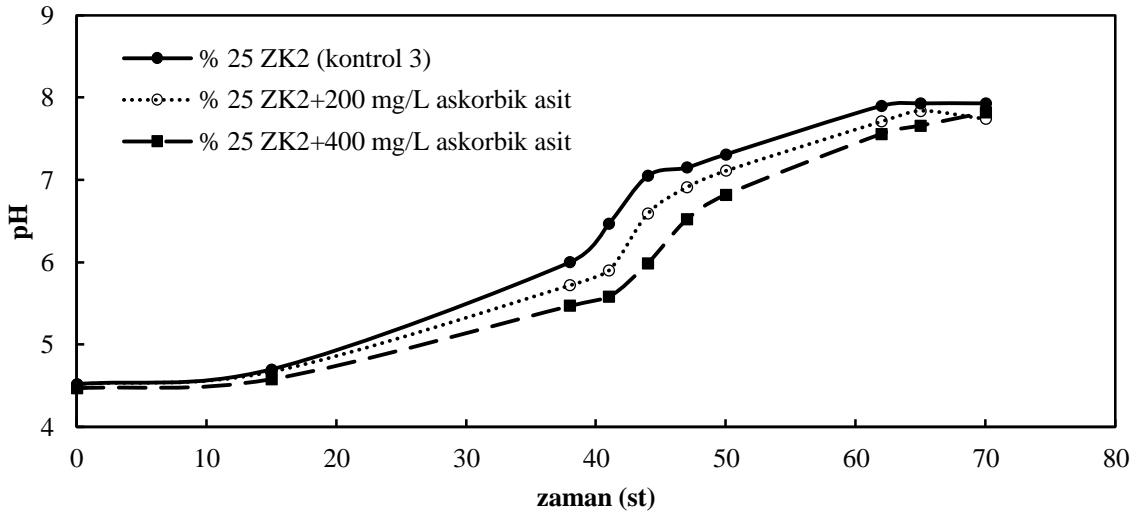
Çizelge 4.29. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 2) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=13. st	t=17. st	t=37. st	t=44. st	t=47. st	t=62. st	t=66. st	t=70. st
Hidroksitirozol	132.9	193.6	177.6	209.3	118.0	95.3	0.9	0.1	0.1
Tirozol	17.2	26.9	24.8	26.7	11.2	9.3	0	0	0
Kateşol	3.5	1.8	2.3	2.7	1.8	1.9	2.2	2.2	2.1
Vanilik asit	3.8	2.9	2.6	2.0	1.2	1.1	1.5	1.4	1.4
4-Metilkateşol	2.1	2.6	1.4	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.30. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=13. st	t=17. st	t=37. st	t=44. st	t=47. st	t=62. st	t=66. st	t=70. st
Hidroksitirozol	125.4	133.3	119.8	121.3	103.7	85.7	0.1	0.2	0.1
Tirozol	16.7	19.0	17.7	16.0	10.0	7.5	0	0	0
Kateşol	3.3	1.6	1.5	1.4	1.7	1.5	1.9	1.8	1.5
Vanilik asit	3.7	1.9	1.8	1.4	1.1	0.7	1.3	1.3	1.0
4-Metilkateşol	1.3	1.3	1.1	0	0	0	0	0	0

100 mg/L askorbik asit derişiminin hidroksitirozol birikimine etkisi denendikten sonra, 200 ve 400 mg/L askorbik asit derişimlerinin etkisi, % 25 ZK2 ortamına 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/L maya özütü eklenerek *R. glutinis* ile iki farklı biyoarıtım gerçekleştirilerek aynı deney setinde incelenmiştir. Aynı zamanda askorbik asit içermeyen % 25 ZK2 ortamı da aynı koşullarda *R. glutinis* ile arıtılarak bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Her üç ortamın 70 st süren biyoarıtımı süresince, pH, toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivite değişimi ile fenolik bileşenlerinin değişimi incelenmesine karşın, yalnızca % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarının zamanla enzim aktivitelerinde meydana gelen değişim izlenmiştir. Şekil 4.43'te askorbik asit olmadığında (Kontrol 3) ve 200 mg/L ile 400 mg/L askorbik asit varlığında *R. glutinis* ile % 25 ZK2 ortamının biyoarıtımı sırasında zamanla meydana gelen pH değişimleri görölmektedir. Şekil 4.43'te görüldüğü gibi askorbik asit derişimi 200 mg/L'den 400 mg/L'e arttırıldığında pH daha düşük değerlerde olmakla beraber zamanla artmaktadır.



Şekil 4.43. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 3), % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 25 ZK2 ortamının (Kontrol 3) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.31'de; % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.32'de ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.33'te verilmiştir. % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 3) 70 st sonunda toplam fenol derişiminde % 81 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 44 azalma görülmüştür. Buna karşın % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında 70 st sonunda toplam fenol derişiminde % 79 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 40 azalma; % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında 70 st sonunda toplam fenol derişiminde % 80 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 48 azalma görülmüştür. Çizelge 4.31-4.33'te verildiği üzere, % 25 ZK2 (Kontrol 3) ile 200 ve 400 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamlarında biyoarıtım sonunda hemen hemen eşit miktarda toplam fenol giderimi sağlanmış ve eşit miktarda antioksidan aktivitesinde azalma görülmüştür. Enzim aktivite değişimleri 200 ve 400 mg/L askorbik asit içeren ZK2 ortamlarında benzer özellik göstermiş olmakla birlikte, lakkaz enzim aktivitesi hemen hemen örnek alınan her saatte gözlenmiş, tirozinaz monofenolaz aktivitesi dalgalanmalı değişim göstermiş ve tirozinaz difenolaz aktivitesi genellenecek olursa azalma eğilimi göstermiştir.

Çizelge 4.31. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 3) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)
t=0	332.14	95.25
t=15	280.00	-
t=38	325.71	95.49
t=41	323.21	95.57
t=44	284.64	95.41
t=47	227.14	95.57
t=50	202.50	95.41
t=62	70.00	61.64
t=65	60.71	54.63
t=70	64.29	52.94

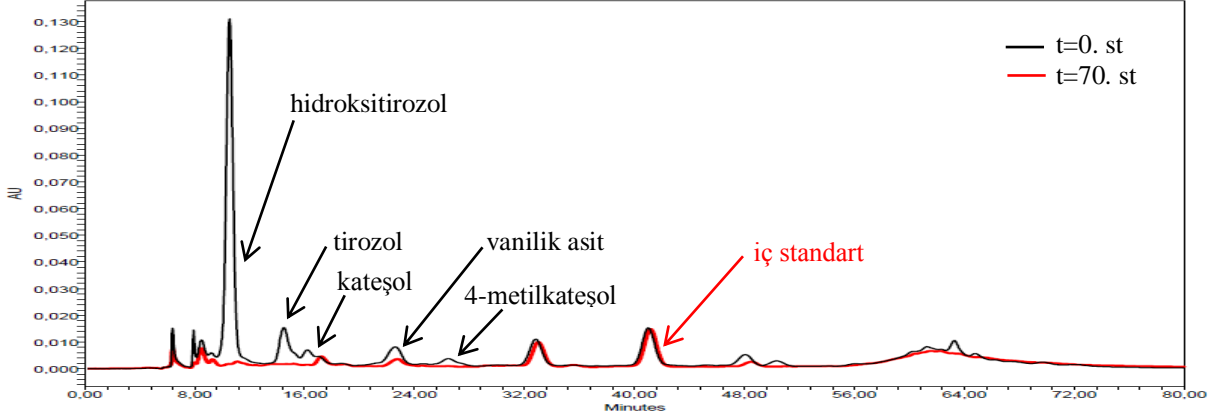
Çizelge 4.32. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görölen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	364.29	95.54	-	-	-
t=15	267.50	-	-	-	-
t=38	342.86	95.62	1.4x10 ⁻⁴	0	38
t=41	315.36	95.62	4.2x10 ⁻⁴	0	43
t=44	289.29	95.62	1.4x10 ⁻⁴	10	45
t=47	266.79	95.70	0	0	32
t=50	218.93	95.70	-	-	35
t=62	85.71	62.02	1.4x10 ⁻⁴	0	27
t=65	80.00	56.37	1.4x10 ⁻⁴	0	28
t=70	75.24	57.01	-	-	-

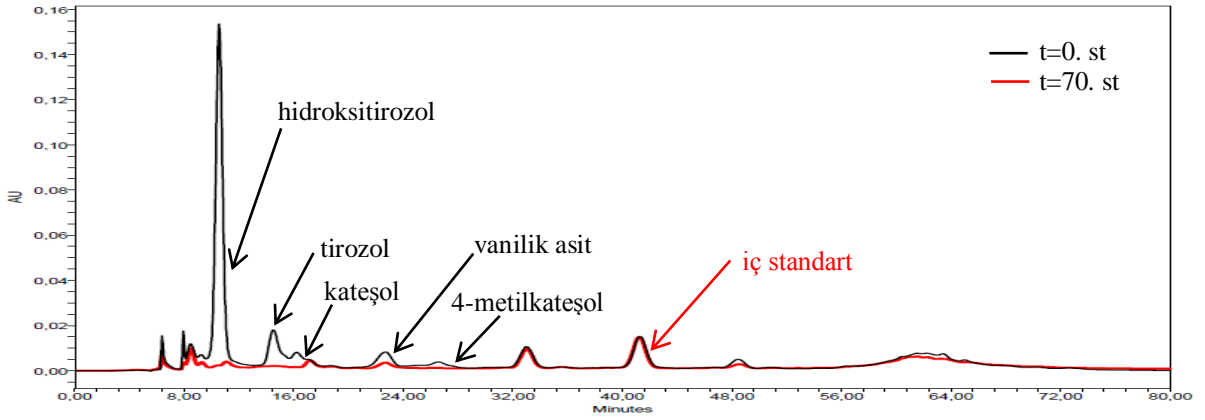
Çizelge 4.33. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görölen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	368.57	95.71	-	-	-
t=15	296.79	-	-	-	-
t=38	345.36	95.78	1.4x10 ⁻⁴	0	35
t=41	323.93	95.71	2.8x10 ⁻⁴	10	31
t=44	311.43	95.71	1.4x10 ⁻⁴	10	56
t=47	295.71	95.78	1.4x10 ⁻⁴	5	32
t=50	292.50	95.86	-	-	36
t=62	103.33	70.65	1.4x10 ⁻⁴	5	18
t=65	87.14	60.19	1.4x10 ⁻⁴	-	-
t=70	74.05	49.26	-	-	-

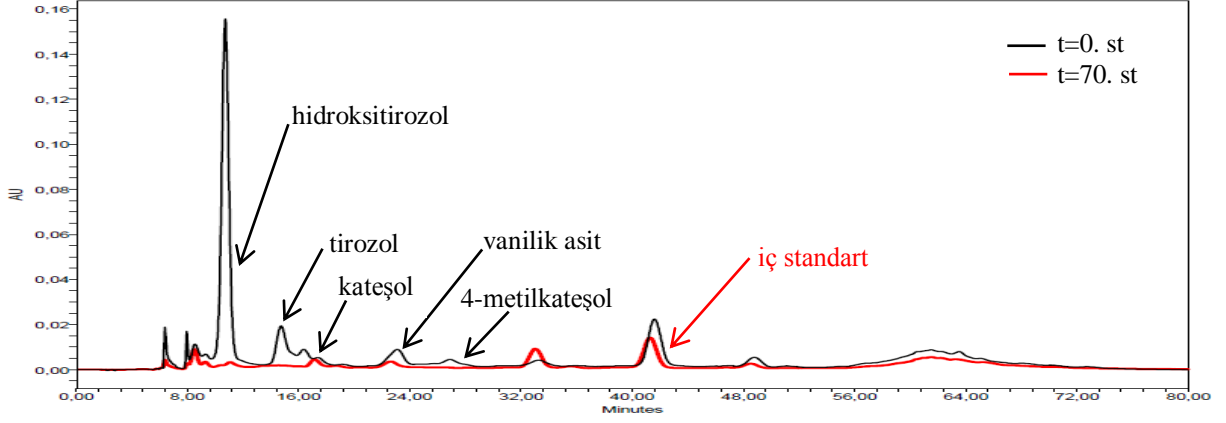
% 25 ZK2 (Kontrol 3) ile 200 ve 400 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamlarında meydana gelen fenolik bileşenlerin değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizi ile izlenmiştir. Şekil 4.44-4.46'da, biyoarıtımların başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması yer almaktadır.



Şekil 4.44. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 3) t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.45. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.46. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=70. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.34-4.36'da verilmiştir. % 25 ZK2 (Kontrol 3) ile 200 ve 400 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 biyoarıtım ortamlarında zamanla fenolik bileşenlerin derişimlerinin değişimi benzer davranış göstermesine karşın artan askorbik asit derişimi ile birlikte ortamdaki hidroksitirozolün tüketim hızında azalma olduğu görülmektedir. % 25 ZK2 (Kontrol 3) ortamında 62. st sonunda başlangıçta ortamda bulunan hidroksitirozolün tamamına yakını (\approx % 99.9) tükenirken, % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında yaklaşık olarak % 99.6'sı ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında % 91.2'si tüketilmiştir.

Çizelge 4.34. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 3) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=15. st	t=38. st	t=41. st	t=44. st	t=47. st	t=50. st	t=62. st	t=65. st	t=70. st
Hidroksitirozol	155.0	157.0	210.6	189.9	171.1	139.8	105.7	0.3	0.1	0.1
Tirozol	20.7	21.5	27.6	20.8	15.5	10.0	7.3	0	0	0
Kateşol	4.7	1.7	2.9	2.9	3.3	3.3	3.4	3.1	3.0	3.1
Vanilik asit	4.9	2.3	1.9	1.9	1.9	2.0	2.1	2.0	2.0	2.1
4-Metilkateşol	3.5	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0

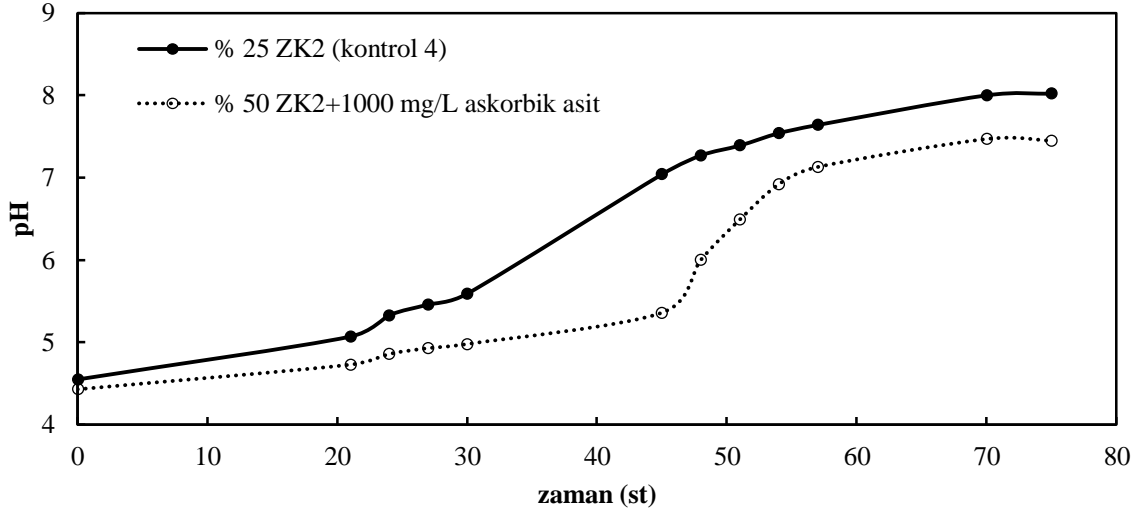
Çizelge 4.35. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=15. st	t=38. st	t=41. st	t=44. st	t=47. st	t=50. st	t=62. st	t=65. st	t=70. st
Hidroksitirozol	185.6	155.0	200.7	185.3	157.8	166.0	124.8	0.8	0.2	0.2
Tirozol	24.3	21.2	25.6	22.1	13.7	11.0	6.7	0	0	0
Kateşol	0.2	1.6	2.5	2.7	2.6	3.4	3.0	3.0	3.1	2.9
Vanilik asit	5.7	2.0	1.7	1.6	1.3	1.9	1.8	2.1	2.1	1.9
4-Metilkateşol	1.7	1.2	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.36. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=15. st	t=38. st	t=41. st	t=44. st	t=47. st	t=50. st	t=62. st	t=65. st	t=70. st
Hidroksitirozol	130.9	161.7	204.6	207.5	115.4	99.9	88.7	11.5	0.3	0.2
Tirozol	13.9	22.5	27.2	26.3	10.8	7.4	5.4	0	0	0
Kateşol	1.8	1.6	2.6	2.7	1.7	1.7	1.8	1.9	4.2	2.8
Vanilik asit	4.0	2.8	1.8	1.3	0.9	0.9	0.8	1.3	1.9	2.0
4-Metilkateşol	1.4	1.3	0	0	0	0	0	0	0	0

Son olarak, askorbik asit derişimi 1000 mg/L'e arttırılıp, % 25 ZK2 ortamına 5 g/L (NH₄)₂SO₄ ve 1 g/L maya özütü eklenerek *R. glutinis* ile 75 st biyoarıtım gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda askorbik asit içermeyen % 25 ZK2 ortamının aynı koşullarda *R. glutinis* ile biyoarıtımı gerçekleştirilerek bir kontrol grubu oluşturulmuştur. Biyoarıtımlar süresince ortamların pH, toplam fenol derişimi, toplam antioksidan aktivitesi, *R. glutinis*'e ait fenol parçalayıcı enzim aktivitelerinin değişimi ile ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi farklı zamanlarda alınan örnekler ile incelenmiştir. Şekil 4.47'de % 25 ZK2 (Kontrol 4) ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamların *R. glutinis* ile biyoarıtımı sırasında meydana gelen pH değişimi görölmektedir. Şekil 4.47'ye göre, ortama eklenen askorbik asit, pH artışı yavaşlatmıştır.



Şekil 4.47. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 (Kontrol 4) ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamların zamanla pH değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

% 25 ZK2 ortamının (Kontrol 4) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.37'de, 1000 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamının toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi Çizelge 4.38'de verilmiştir. % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 4) 75 st sonunda toplam fenol derişiminde % 78 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 47 azalma görölmeye karşın; 1000 mg/L askorbik asit

içeren % 25 ZK2 ortamında 75 st sonunda toplam fenol derişiminde % 75 ve toplam antioksidan aktivitesinde % 32 azalma görülmüştür. Çizelge 4.37 ve 4.38’de verildiği üzere, % 25 ZK2 (Kontrol 4) ile 1000 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamlarında biyoarıtım sonunda hemen hemen eşit değerde fenol giderimi sağlanmış olmasına karşın, 1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda toplam antioksidan aktivitesindeki azalma daha azdır. Bunun nedeni, ortamda yüksek miktarda bulunan antioksidan özelliğindeki askorbik asit olabilir. İki ortama ait enzim aktivitelerinin değişimi incelendiğinde, % 25 ZK1+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi dışında görülen enzim aktiviteleri, % 25 ZK2 ortamında görülen enzim aktivitelerinin değerlerinden daha düşüktür. Ancak tirozinaz monofenolaz % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda oldukça yüksek aktivite değerleri göstermiştir.

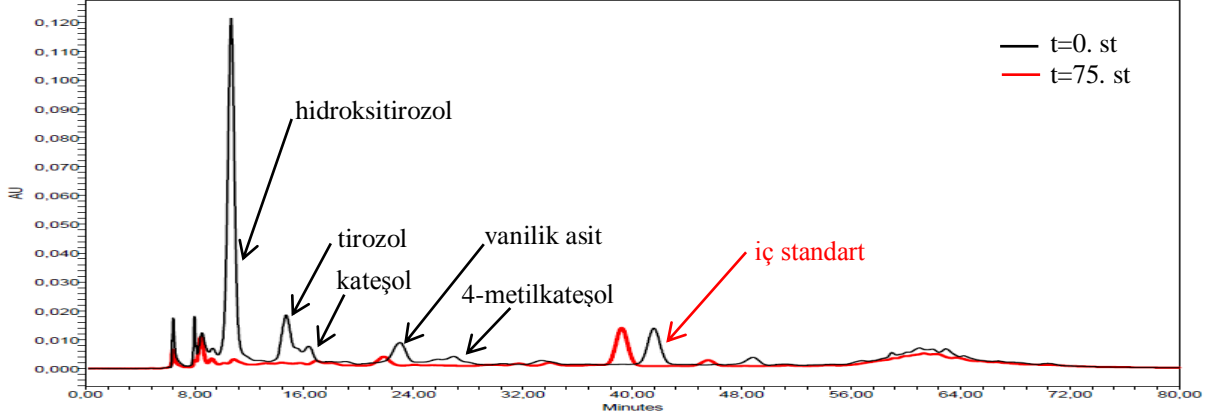
Çizelge 4.37. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 4) toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*’e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	293.21	94.69	-	-	-
t=21	182.50	-	-	-	-
t=24	224.64	-	-	-	-
t=27	235.00	-	-	-	-
t=30	239.29	-	-	-	-
t=45	220.00	95.15	4.2x10 ⁻⁴	10	35
t=48	199.64	95.15	0	0	31
t=51	159.29	94.88	2.8x10 ⁻⁴	0	35
t=54	117.50	94.14	0	0	33
t=57	94.29	80.15	1.4x10 ⁻⁴	0	24
t=70	77.62	58.37	1.4x10 ⁻⁴	-	24
t=75	65.48	50.59	2.8x10 ⁻⁴	10	30

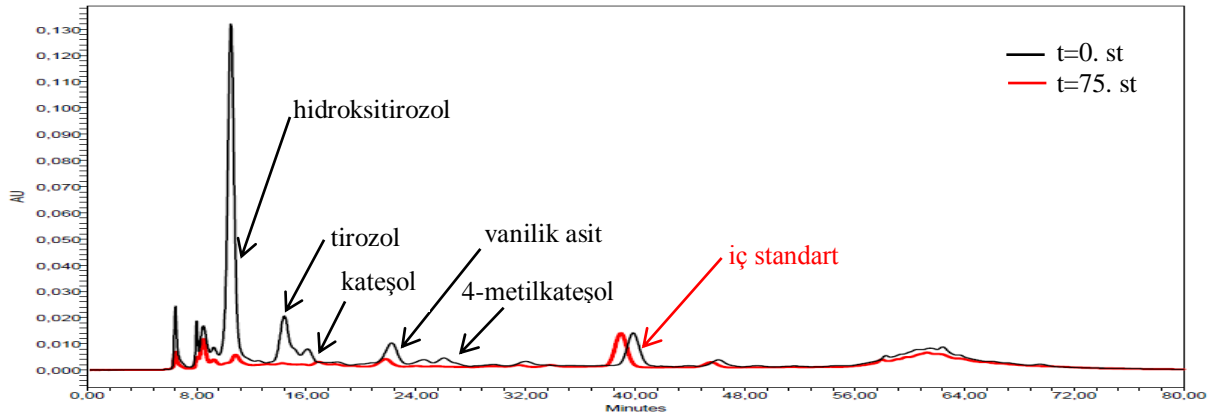
Çizelge 4.38. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamın toplam fenol derişimi ve toplam antioksidan aktivitesi değişimi ile biyoarıtım süresince görülen *R. glutinis*'e ait enzim aktivitelerinin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Zaman (st)	Toplam fenol derişimi (mg/L)	Toplam antioksidan aktivitesi (%in.)	Lakkaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz monofenolaz aktivitesi (U/mL)	Tirozinaz difenolaz aktivitesi (U/mL)
t=0	320.36	95.60	-	-	-
t=21	226.67	-	-	-	-
t=24	246.43	-	-	-	-
t=27	240.00	-	-	-	-
t=30	226.43	-	-	-	-
t=45	256.42	95.52	0	55	10
t=48	257.50	95.43	0	45	12
t=51	234.29	95.43	0	20	34
t=54	202.86	95.18	4.2x10 ⁻³	15	33
t=57	155.71	93.40	0	0	33
t=70	80.00	66.07	0	0	28
t=75	80.71	64.80	0	0	23

% 25 ZK2 (Kontrol 4) ve 1000 mg/L askorbik asit içeren % 25 ZK2 ortamlarında meydana gelen fenolik bileşenlerin zamanla değişimi, biyoarıtım süresince farklı zamanlarda alınan örneklerin kantitatif HPLC analizleri ile izlenmiştir. Örnek olarak Şekil 4.48 ve 4. 49'da biyoarıtımların başlangıç ve son anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması yer almaktadır.



Şekil 4.48. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamının (Kontrol 4) t=0. st ve t=75. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)



Şekil 4.49. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamın t=0. st ve t=75. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması (T=30°C, N=150 rpm)

Biyoarıtım süresince yapılan kantitatif HPLC analizi sonucu elde edilen kromatogramlardan, fenolik bileşenlerin derişimi hesaplanarak elde edilen sonuçlar Çizelge 4.39 ve 4.40'ta verilmiştir. % 25 ZK2 (Kontrol 4) ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamlarında zamanla fenolik bileşenlerin derişimlerinin değişimi benzer davranış göstermesine karşın, % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamında bulunan hidroksitirozolün derişimi zamanla daha yavaş azalmış, biyoarıtım sonunda % 25 ZK2

(Kontrol 4) ortamında başlangıçtaki % 1.5'i kadar hidroksitirozol bulunurken, % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda başlangıçtaki % 3.5'i kadar hidroksitirozol bulunmaktadır.

Çizelge 4.39. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 4) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=21. st	t=24. st	t=27. st	t=30. st	t=45. St
Hidroksitirozol	157.6	109.3	137.6	151.1	165.0	137.0
Tirozol	25.1	23.5	28.2	25.6	32.7	18.9
Kateşol	2.8	0.3	0.5	0.5	0.6	1.0
Vanilik asit	6.3	1.7	1.9	1.6	1.9	2.5
4-Metilkateşol	1.6	1.3	1.7	0.5	0.9	0

Çizelge 4.39. (devam) *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 4) bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=48. st	t=51. st	t=54. st	t=57. st	t=70. st	t=75. St
Hidroksitirozol	110.3	88.6	48.0	21.7	2.7	2.3
Tirozol	13.8	10.5	5.9	1.0	0.1	0.5
Kateşol	1.2	1.0	1.0	1.1	1.3	1.1
Vanilik asit	2.5	2.6	2.5	2.7	3.0	2.7
4-Metilkateşol	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.40. *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

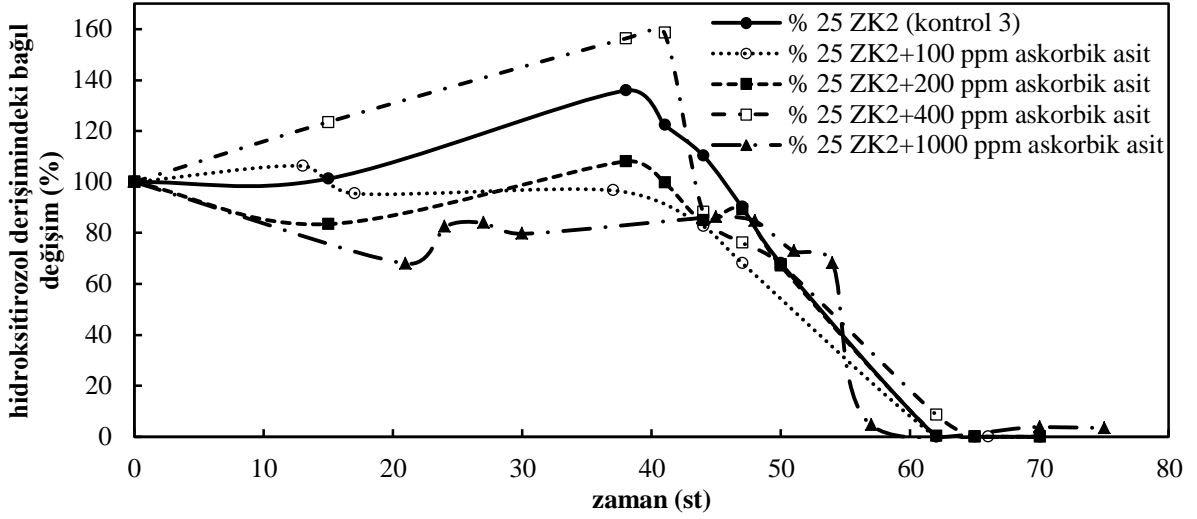
Fenolik bileşen (mg/L)	t=0. st	t=21. st	t=24. st	t=27. st	t=30. st	t=45. St
Hidroksitirozol	172.9	117.1	141.9	144.6	137.3	148.6
Tirozol	30.8	23.1	28.4	24.8	22.7	18.6
Kateşol	3.2	0.4	0.7	0.5	0.6	0.9
Vanilik asit	6.5	1.8	1.9	1.7	1.5	1.6
4-Metilkateşol	2.1	1.5	1.7	0.4	0.5	0

Çizelge 4.40. (devam) *R. glutinis* ile biyoarıtımı sağlanan % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

Fenolik bileşen (mg/L)	t=48. st	t=51. st	t=54. st	t=57. st	t=70. st	t=75. St
Hidroksitirozol	145.9	125.5	117.5	75.9	6.7	6.1
Tirozol	17.7	14.8	14.0	6.3	0.6	0.5
Kateşol	1.1	0.9	1.1	1.0	1.1	1.1
Vanilik asit	1.8	1.7	2.1	2.1	2.4	2.4
4-Metilkateşol	0	0	0	0	0	0

Çalışmanın bu bölümünde, biyoarıtım ortamlarına farklı derişimlerde askorbik asit eklenerek, ortamda bulunan hidroksitirozolün derişiminin azalmaması amaçlanmıştır. Şekil 4.49'da; 100, 200, 400 ve 1000 mg/L askorbik asit içeren biyoarıtım ortamları ile % 25 ZK2 ortamında (Kontrol 3) zamanla hidroksitirozol derişiminde meydana gelen bağıl derişimler birlikte yer almaktadır. % 25 ZK2 (Kontrol 3) ortamı askorbik asit içermemesine karşın hidroksitirozol derişimi 38. st'e kadar artmıştır. Bunun nedeni *R. glutinis*'in tirozinaz monofenolaz aktivitesi ile tirozolden hidroksitirozol oluşumunu katalizlemesi ya da oleuropeinin parçalanması ile oluşan hidroksitirozol olabilir. 100 mg/L ve 200 mg/L askorbik asit varlığında, ortamda hidroksitirozol birikiminin % 25 ZK2 (Kontrol 3) ortamındakine göre daha az olduğu Şekil 4.50'de görülmektedir. Dolayısı ile 100 ve 200 mg/L askorbik asit çalışılan ortam koşullarında

hidroksitirozol birikimi için yeterli olmamıştır. 400 mg/L askorbik asit varlığında ise 41. st'de başlangıçtaki hidroksitirozolün % 158'i kadar hidroksitirozol bulunmaktadır; yani 400 mg/L askorbik asit varlığında % 25 ZK2 ortamında hidroksitirozol birikimi sağlanmıştır. 1000 mg/L askorbik asit varlığında ise ortamda hidroksitirozol birikimi mümkün olmamış; ancak hidroksitirozolün tüketimi daha yavaş olmakla birlikte biyoarıtım sonunda ortamda hala hidroksitirozol bulunmaktadır. Şekil 4.50'de askorbik asit içeren ortamlarla kıyaslamak amacı ile üç farklı kontrol grubunu temsilen % 25 ZK2 (Kontrol 3) ortamına ait veriler kullanılmıştır. Kontrol ortamlarına ait biyoarıtımlar eş zamanlı yapılmadığı için, bu ortamlara ait veriler birebir eş değildir, ancak birbirlerine oldukça yakındır. % 25 ZK2 ortamı (Kontrol 3), iki farklı biyoarıtım ortamına (% 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit) ait kontrol grubu olduğundan, Şekil 4.50'de bu ortama ait veriler kullanılmıştır.

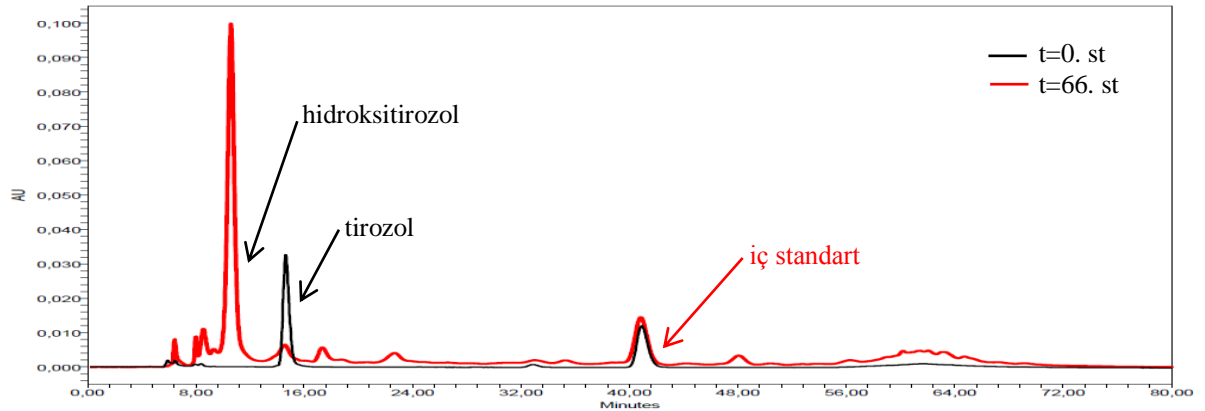


Şekil 4.50. % 25 ZK2 (Kontrol 3), % 25 ZK2+100 mg/L askorbik asit, % 25 ZK2+200 mg/L askorbik asit, % 25 ZK2+400 mg/L askorbik asit ve % 25 ZK2+1000 mg/L askorbik asit içeren ortamların *R. glutinis* ile biyoarıtımları sırasında zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozol miktarının bağıl değişimi (T=30°C, N=150 rpm)

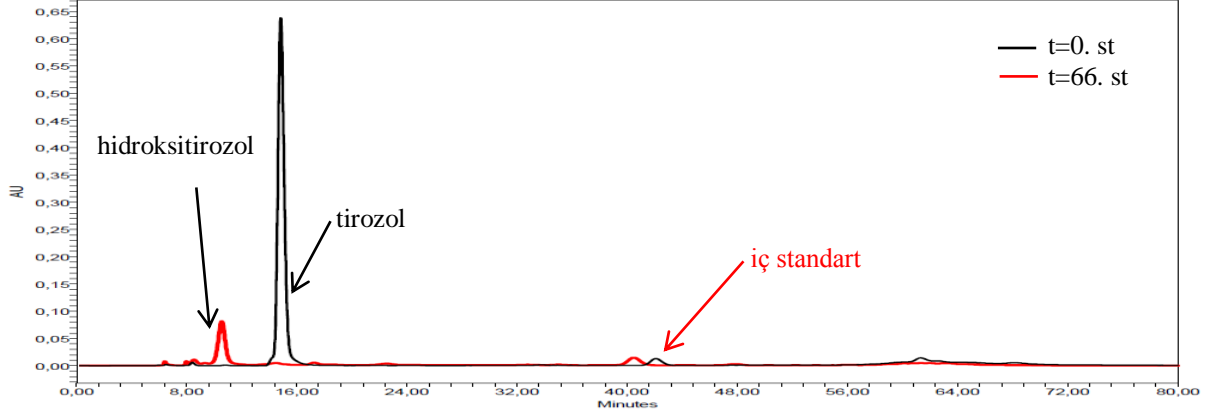
4.7.2. Dinlenen *Rhodotorula glutinis* ile tirozolden hidroksitirozol üretimi

Bölüm 2.4.2’de verilen bilgiler doğrultusunda, aktif çoğalmasını 5 g/L amonyum sülfat ve 1 g/L maya özütü içeren % 25 ZK2 ortamında tamamlamış *R. glutinis*, 44. st sonunda, hidroksitirozolün öncülü olan tirozol içeren üretim ortamlarına (50 mM pH 6.5 potasyum fosfat tamponunda 0.1 ya da 1 g/L tirozol ile % 100 ZK2 ekstraktı) aktarılarak hidroksitirozol üretimi amaçlanmıştır. Ayrıca, 0.1 g/L tirozol içeren üretim ortamına askorbik asit eklenerek (4000 mg/L) ortamda hidroksitirozol birikimi amacıyla bir deneme daha yapılmıştır.

0.1 ve 1 g/L tirozol içeren ortamlara paralel olarak, 0.1 g/L tirozol içeren ortam hazırlanarak hücre aktarılmamış bir kontrol grubu oluşturulmuştur. 0.1 ve 1 g/L tirozol içeren ortamlar 66 st süreyle inkübe edilmiş, t=0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 30 ve 66. st’de alınan örnekler kantitatif olarak HPLC ile analizlenmiştir. Her iki ortam için de elde edilen sonuçlar, *R. glutinis*’in etkin bir şekilde tirozölü kullandığını göstermektedir. İnkübasyonun 1. st’i sonunda ortamda bulunan tirozölün tamamına yakını tüketilmiştir. Ancak t=66. st’e kadar ürün (hidroksitirozol) oluşumu gözlenmemiş; t=66. st’te alınan örneklere ait analizlerde ise, hidroksitirozole ait pik oluşmuştur (Şekil 4.51-4.52). Kontrol grubunda ise inkübasyon süresince değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.51. Dinlenen *R. glutinis* ile işlem gören, 0.1 g/L tirozol içeren ortamın t=0. st ve t=66. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması



Şekil 4.52. Dinlenen *R. glutinis* ile işlem gören, 1 g/L tirozol içeren ortamın t=0. st ve t=66. st anlarına ait kromatogramların karşılaştırılması

0.1 g/L tirozol bulunan ortama derişimi 4000 g/L olacak şekilde askorbik asit eklenerek 80 st süresince yapılan denemenin sonucunda, beklenen hidroksitirozol birikimi gözlenmemiş, tirozol yine 1. st'in sonunda tamamen tüketilmiştir.

Zeytin karasuyu ekstraktı içeren ortamda ise hüresel aktivite görülmemiş, 80 st süresince fenolik bileşenlerde bir değişiklik gözlenmemiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, farklı zeytinyağı üretim dönemlerinde aynı işletmeden sağlanan iki farklı zeytin karasuyu (ZK1 ve ZK2) kullanılmıştır. Her iki zeytin karasuyu da aynı fenolik bileşen dağılımına sahip olmasına karşın, toplam fenol derişimleri birbirinden farklıdır. Bu nedenle çalışma süresince, kullanılan zeytin karasuyu türüne bağlı olarak mikroorganizmanın çoğalmasında, biyoarıtımın sağlanmasında ve enzim aktivitelerinde kontrol edilemeyen değişimler gözlenmiştir. Kullanılan ZK1'in toplam fenol derişimi ZK2'ye göre daha düşük olduğu için *Rhodotorula glutinis* ile %50 ZK1 derişimine kadar olan ortamlarda çoğalma ve biyoarıtım sağlanırken, ZK2 kullanıldığı zaman % 25'ten daha derişik ortamlarda hücre aktivitesi gözlenmemiştir. *Debaryomyces hansenii* ile ise en yüksek %25 ZK1 ortamında biyoarıtım yapılmıştır.

Çalışma süresince, zeytin karasuyu saklama koşullarına göre de yapısal değişim göstermiştir. Farklı zamanlarda yapılan biyoarıtımların başlangıç anlarına ait toplam fenol derişimleri farklıdır. Çalışmanın başlangıcında kullanılan ZK1, +4°C'de saklanmasına karşın toplam fenol miktarının zamanla azaldığı belirlenmiştir. Bunun nedeni, yapıda bulunan fenolik bileşenlerin saklama sırasında hava ile oksidasyonudur. Bu oksidasyonun önüne geçebilmek için, daha sonra kullanılan ZK2 -30°C'de saklanmış ve kullanım süresi içinde yapılan analizlerde toplam fenol derişiminde önemli bir değişim saptanmamıştır.

Çalışmada kullanılan *R. glutinis* ve *D. hansenii* mayaları daha önce zeytin karasuyu biyoarıtımında kullanılmadıkları için, karasuda bulunan fenollerini parçalayıcı enzimleri hakkında literatürde herhangi bir bilgi yer almamaktadır. *R. glutinis* ve *D. hansenii* ile yapılan biyoarıtımlardaki enzimatik mekanizmayı aydınlatmasına yardımcı olmak amacıyla ticari enzimlerle yapılan denemelerde, zeytin karasuyuna fenol parçalayıcı enzimler tek tek katılarak bu enzimler ile zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerin değişimi incelenmiştir. Ticari lakkaz enziminin zeytin karasuyunda bulunan ve analizlenen tüm fenolik bileşenlere etki

etmesi ancak tirozinaz enziminin vanilik asit dışındaki bileşenlere etki etmesi sonucunda, D'Annibale et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada da belirtildiği gibi lakkaz enziminin tirozinaza göre daha geniş substrat spektrumuna sahip olduğu belirlenmiştir. Canfora et al. (2008) da çalışmalarında, zeytin karasuyunda bulunan fenolik maddelerin sentetik ve doğal karışımlarının, lakkaz enzimi tarafından oksidasyonunu incelemişlerdir. Bu çalışmaya göre fenolik bileşenler ayrı ayrı çözeltilerde bulunduğu, sentetik karışımları hazırlandığında ve zeytin karasuyu ekstraktında lakkaz enzimi tarafından dönüşüm yüzdeleri birbirinden farklıdır. Buna göre, bu yüksek lisans çalışmasında ticari lakkaz enzimi ile yapılan çalışmalarda, ortamdaki fenolik bileşenlerin tüketiminin birbiriyle ilintili olarak değiştiği düşünülebilir. Elektron verici gruplara (-CH₃ -CH₂CH₃) sahip fenoliklerin (örneğin; 4-metilkateşol) elektronu bırakması daha kolay olduğundan, öncelikle bu fenolikler kullanılır. Elektronu alan gruplara (-NO₂, -Cl, -COOH) sahip bileşenler (örneğin; vanilik asit) ise daha zor katalizlenir (Canfora et al. 2008). Ayrıca, bir karışımda bulunan fenolik maddelerin sayısı arttıkça, fenolik maddelerin davranışının daha karışık bir hal aldığı bilinmektedir (Gianfreda et al. 2003).

Bu çalışmada mayalar ile yapılan biyoarıtımlarda, *D. hansenii*'nin zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden balıca hidroksitirozolü ve bir miktar da tirozolü, *R. glutinis*'in ise zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlerden hidroksitirozol, tirozol, kateşol, vanilik asit ve 4-metilkateşolü kullandığı belirlenmiştir.

R. glutinis ve *D. hansenii* mayalarının zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenleri kullanırken, ortama fenol parçalayıcı enzim salgıladıkları düşünülmektedir. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenler göz önüne alındığında, bu enzimler oksidoredüktaz sınıfına dahil olan tirozinaz monofenolaz, tirozinaz difenolaz, lakkaz, lignin peroksidaz ve mangan peroksidaz enzimleri ile hidrolaz sınıfına dahil olan tannaz enzimi olabileceği öngörülmüştür. Çalışma süresince, her iki maya türü için de biyoarıtım ortamlarından alınan örneklerde lignin peroksidaz dışındaki fenol parçalayıcı enzimlerin aktiviteleri ölçülmüştür. Biyoarıtım ortamlarında *D. hansenii*'ye ait, tirozinaz difenolaz ve tannaz enzim aktiviteleri görülmüştür. Tirozinaz difenolaz enziminin zeytin karasuyunda bulunan hidroksitirozole etki

ederek kinon oluşturması beklenmektedir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon, oluşan kinon HPLC analizi ile takip edilemediği için sadece substrat teketimi takibine bağlı olarak yapılmıştır. Enzim aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenirken, substrat teketimi kantitatif HPLC analizi ile yapılmıştır. Tirozinaz difenolaz aktivitesi görülürken ortamdaki hidroksitirozol derişiminin azalması, *D. hansenii*'nin tirozinaz difenolaz aktivitesine sahip olduğunu desteklemektedir. Bunu yanısıra, görülen tannaz enzim aktivitesi, veri tabanlarından elde edilen *D. hansenii*'nin tannaz enzimine ait gen bölgesini taşıdığı bilgisi ile rtmektedir. Tannaz enziminin katalizlediği tepkimenin substrat ve ürünün HPLC analizi ile takip edilememesi, bu enzim üzerinde ileri çalışmalarda durulmamasının sebebidir.

Çalışmada, *R. glutinis* ile biyoarıtımı gerçekleştirilen ortamlardan alınan örneklerde ise tirozinaz monofenolaz, tirozinaz difenolaz, lakkaz ve tannaz enzimlere ait aktiviteler görülmüştür. *R. glutinis* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlarda, *D. hansenii* ile gerçekleştirilen biyoarıtımlara göre daha yüksek toplam fenol giderimi sağlanmıştır. *R. glutinis*'in sahip olduğu fenol parçalayıcı enzimlerin sayısının *D. hansenii*'ye göre daha fazla olması bunu açıklamaktadır.

Her iki maya türü için de biyoarıtım ortamlarına askorbik asit eklenerek hidroksitirozol birikimi sağlanmaya çalışılmıştır. *D. hansenii*'nin tirozinaz enziminin yalnızca difenolaz aktivitesine sahip olması, *R. glutinis*'in ise hem tirozinaz monofenolaz hem de tirozinaz difenolaz aktivitelerini taşıması, *R. glutinis*'i hidroksitirozol birikiminde daha avantajlı kılmıştır. Çünkü, *R. glutinis*'in sahip olduğu tirozinaz monofenolaz enzim aktivitesi ile ortamdaki tirozol moleküllerinin hidroksitirozol moleküllerine dönüştürmesi de beklenmektedir. Ortamda bulunan hidroksitirozol ve ayrıca tirozinaz monofenolaz enziminin tirozolu hidroksillemesi ile oluşan hidroksitirozol, tirozinaz difenolaz aktivitesi ile kinona dnşirken; ortamda bulunan askorbik asit kinondan tekrar hidroksitirozol oluşumunu sağlamaktadır. Bu alışmada, *D. hansenii* ile askorbik asit varlığında gerçekleştirilen biyoarıtımlarda ortamda hidroksitirozol birikimi sağlanamazken; *R. glutinis* ile askorbik asit varlığında yapılan biyoarıtımlarda ortamdaki hidroksitirozolün tamamen tükenmesi nlenmiş

ve hidrokstirozolün askorbik asit içermeyen ortamlara nazaran daha zamanla daha yavaş azalması sağlanmıştır. Ticari enzimler ile yapılan denemeler sonucunda ise, zeytin karasuyuna eklenen tirozinaz enzimi varlığında, artan askorbik asit derişimi ile birlikte artan hidrokstirozol birikimi sağlanmış, 10 mM askorbik asit varlığında 1 st sonunda maksimum değer olan 9 kat hidrokstirozol birikimi elde edilmiştir. Saf enzimle çalışıldığı durumda beklenen sonuca ulaşmak mümkün olmuştur. Mikroorganizmalar kullanıldığında ise metabolizmada yer alan çok sayıda enzimin kontrolü sağlanamadığı için hidrokstirozol birikimi mümkün olmamıştır.

Dinlenen *R. glutinis* hücreleri ile yapılan denemelerde, zeytin karasuyu içeren ortamlarda ön çoğalma gerçekleştirilerek, mikroorganizmanın enzimlerinin indüklenmesi ve ortamda bulunan tirozol hücre çoğalması için değil de sekonder metabolit üretiminde kullanması amaçlanmıştır. Bu denemelerin sonucunda, tirozolün *R. glutinis* tarafından metabolize edildiği gözlenmiş, ancak hidrokstirozol oluşumu yalnızca sınırlı sayıda örnekte görülmüş ve zamanla derişimi izlenememiştir. Zeytin karasuyu ekstraktı ile yapılan denemede ise hücresel aktivite görülmemiştir. Bunun nedeni, hücrelerin ön çoğalma ortamında yeterince çoğalamadan üretim ortamına aktarılmış olması olabilir. Ayrıca, tirozol içeren ortama askorbik asit eklenmesi, hidrokstirozol birikimini sağlayamamıştır. Bunun nedeni ise, uygun askorbik asit derişiminin yakalanamamış olması olabileceği gibi mikroorganizmanın askorbik asiti de metabolize etmiş olması olabilir.

Değerli bir antioksidan olan hidrokstirozolün tarımsal bir atık olan zeytin karasuyundan elde edilebilmesi büyük bir kazançtır. Bu doğrultuda, *R. glutinis* ile ileri çalışmalarla biyoarıtım sırasında hidrokstirozol birikimi için optimizasyon yapılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aguilar, C. N., Rodríguez, R., Gutiérrez–Sánchez, G., Augur, C., Favela–Torres, E., Prado–Arragan, L.A., Ramírez–Coronel, A., Contreras–Esquivel, J.C. 2007. Microbial tannases: advances and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76; 47-59.
- Aksu, Z., Eren, A.T. 2007. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. *Biochemical Engineering Journal*, 35; 107-113.
- Allouche, N., Damak, M., Ellouz, R., Sayadi, S. 2004. Use of whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* for synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol via conversion of tyrosol. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4); 2105-2109.
- Allouche, N., Sayadi, S. 2005. Synthesis of hydroxytyrosol, 2-hydroxyphenylacetic acid, and 3-hydroxyphenylacetic acid by differential conversion of tyrosol isomers using *Serratia marcescens* strain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53; 6525-6530.
- Anonim 2009a, http://www.uniprot.org/uniprot/Q6BXU9#section_name.
- Anonim 2009b, <http://www.uniprot.org/uniprot/B2DFU1>.
- Anonim 2010a, <http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reaction-popup.php4?id=36999&type=I&displayType=marvin>.
- Anonim 2010b, <http://www.brenda-enzymes.info/Mol/reactionpopup.php4?id=40497&type=I&displayType=marvin>.
- Anonim 2010c, http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin_peroxidase.
- Anonim 2010d, <http://www.worthington-biochem.com/TY/assay.html>.
- Anonim 2011, http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/2/tyrosinase.Par.0001.File.dat/tyrosinase.pdf.
- Anonim 2012, <http://faostat.fao.org/site/636/DesktopDefault.aspx?PageID=636#ancor>.
- Atlow, S.C., Bonadonna-Aparo, L., Klivanov, A.M., 1984. Dephenolization of industrial wastewaters catalyzed by polyphenol oxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 26(6); 599-603.
- Ayed, L., Assas, N., Sayadi, S., Hamdi, M. 2005. Involvement of lignin peroxidase in the decolourization of black olive mill wastewaters by *Geotrichum candidum*. *Letters in Applied Microbiology*, 40(1); 7-11.

- Azbar, N. 2004. A review of waste management options in olive oil productions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34; 209-247.
- Baldrian, P. 2006. Fungal laccases-occurrence and properties. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30; 215-242.
- Belmares, R., Conteras-Esquivel, J.C., Rodríguez-Herrera, R., Coronel, R., Aguilar, C.N. 2004. Microbial production of tannase: an enzyme with potential use in food industry. *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* 37; 857-864.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. 2007. Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade *Molecules*, 12; 1679-1719.
- Bouallagui Z., Sayadi S. 2006. Production of high hydroxytyrosol yields via tyrosol conversion by *Pseudomonas aeruginosa* immobilized resting cells. *J. Agric. Food Chem.*, 54; 9906-9911.
- Breuer U., Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23; 415-437.
- Brooks, S.J., Doyle, E.M., O'Connor, K.E. 2006. Tyrosol to hydroxytyrosol biotransformation by immobilised cell extracts of *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 39; 19 1-196.
- Canfora, L., Iamarino, G., Antonietta Roa, M., Gianfreda, L. 2008. Oxidative transformation of natural and synthetic phenolic mixtures by *Trametes versicolor* laccase. *J. Agric. Food Chem.*, 56(4); 1398-1407.
- Crognale, S., D'Annibale, A., Federici, F., Fenice, M., Quarantino, D., Petruccioli, M. 2006. Olive oil mill wastewater valorisation by fungi. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 8; 1547-1555.
- D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Sermanni, G.G. 2000. Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*, 77; 265-273.
- Durán, N., Esposito, E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28; 83-99.
- Dwivedi, U.N., Singh, P., Pandey, V.P., Kumar, A. 2011. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68; 117-128.

- Ergül, F.E., Sargin S., Öngen, G., Sukan, F., 2009. Dephenolisation of olive mill wastewater using adapted *Trametes versicolor*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63; 1–6.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F.A., Wichers, H.J. 2001. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49; 1187-1193.
- Fernández-Bolaños J., Rodríguez G., Rodríguez R., Guillén R., Jiménez A. 2006. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *GRASAS Y ACEITES*, 57(1); 95-106.
- Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93; 197-204.
- Gienfreda, L., Sannino, F., Rao, M.A., Bollag, J.-M. 2003. Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Research*, 37; 3205-3215.
- Gupta, J.K., Jebson, S., Kneifel, H. 1986. Sinapic acid degradation by the yeast *Rhodotorula glutinis*. *Journal of General Microbiology*, 132: 2793-2799.
- Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4); 454-466.
- Iamarino, G., Rao, M.A., Gienfreda, L. 2009. Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. *Chemosphere*, 74; 216-223.
- Kanberoğlu, B. 2006. Zeytin karasuyunun biyolojik yolla iyileştirilmesinde tannaz enziminin etkisi. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 277 sayfa.
- Karakaya, A. 2011. Zeytinyağı fabrikası sıvı atığının *Debaryomyces hansenii* ve *Rhodotorula glutinis* mayaları ile biyoarıtımının incelenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87 sayfa.
- Katayama-Hirayama K., Tobita S., Hirayama K. 1995. Biodegradation of phenol and monochlorophenols by yeast *Rhodotorula glutinis*. *Water Science and Technology*, 30(9); 59–66.
- Khoufi, S., Hamza, M., Sayadi, S. 2011. Enzymatic hydrolysis of olive wastewater for hydroxytyrosol enrichment. *Bioresource Technology*, 102(19); 9050-9058.
- Kwon, S., Anderson, A.J., 2001. Catalase activities of *Phanerochaete chrysosporium* are not coordinately produced with ligninolytic metabolism: Catalases from a white-rot fungus. *Current Microbiology*, 42; 8-11.

- Liebgoth, P.-P., Labat, M., Amouric A., Tholozan, J.-L., Lorquin, J. 2008. Tyrosol degradation via the homogentisic acid pathway in a newly isolated *Halomonas* strain from olive processing effluents. *Journal of Applied Microbiology*, 105(6); 2084-2095.
- Mathew, S., Abraham, T.E., Sudheesh, S. 2007. Rapid conversion of ferulic acid to 4-vinyl guaiacol and vanillin metabolites by *Debaryomyces hansenii*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 44; 48-52.
- Magalhaes, D., Luis, N.D.P.M., Dos, C., Luis, S.J., Matias, F., Alexandra, A., Marques, M., Vital, N.A., Duarte, M., Maria, C., Goulao, S., Paulo, C.J. 2008. US Patent Application 20080179246.
- McNamara J.C., Anastasiou C.C., O’Flaherty V., Mitchell R. 2008. Bioremediation of olive mill wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61;127–134.
- Mondal, K.C., Banerjee, D., Jana, M., Pati, B.R. 2001. Colorimetric assay method for determination of the tannin acyl hydrolase (EC 3.1.1.20) activity. *Analytical Biochemistry*, 295; 168-171.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N.J. 2009. Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 82; 25-39.
- Niaounakis M., Halvadakis, C.P. 2006. *Olive Processing Waste Management Literature Review and Patent Survey*. Elsevier, 517, Amsterdam.
- Nüske, J., Scheibner, K., Dornberger, U., Ullrich, R., Hofrichter, M. 2002. Large scale of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(4); 556-561.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R. 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.*, 53; 823-837.
- Obied, H. K., Bedgood Jr. D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., 2007. Bioscreening of Australian olive mill waste extracts: Biophenol content, antioxidant, antimicrobial and molluscicidal activities. *Food and Chemical Toxicology*, 45; 1238-1248.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Scaloni, A., Capasso, A., Sanna, G. 1997. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(50); 31301-31307.
- Paraskeva, P., Diamadopoulos, E. 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81; 1475-1485.

- Paszczyński, A., Crawford, R.L., Huynh, V.B., 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* purification. *Methods in Enzymology*, 161(B); 264-270.
- Prior, R.L., Cao, G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27; 1173-1181.
- Rodríguez, C.S., Santoro, R., Cameselle, C., Sanromán, A. 1997. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters*, 19(10); 995-998.
- Sayadi, S., Ellouz, R. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3); 1098-1103.
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O'Beirne, D., Buchert, J., Kruus, K. 2007. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology*, 130(4); 471-480.
- Singh, H. 2006. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*, Wiley Interscience, 573, USA.
- Solís-Oba, M., Ugalde-Saldivar, V.M., Gonzáles, I., Viniegra- Gonzáles, G., 2005. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,20-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 579; 59-66.
- Tsioulpas, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G. 2002. Phenolic removal in olive mill wastewater by strains of *Pleurotus* pp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Biosource Technology*, 84; 251-257.
- Van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichrs, H.J. 1997. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7); 1309-1997.
- Villanova, L., Villanova, L., Fasiello, G., Alessandro, M. 2009. US Patent Application 20090023815.
- Walker, N. 1973. Metabolism of chlorophenols by *Rhodotorula glutinis*. *Soil Biol. Biochem.*, 5; 525-530.
- Walter, W. M., JR., Fleming, H. P., Etchells, J. L. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Applied Microbiology*, Nov. ;773-776.
- Yeşilada, Ö., Fışkın, K., Yeşilada, E. 1995. The use of rot fungus *Funalia trogii* (Malatya) for the decolorization and phenol removal olive mill wastewater. *Environmental Technology*, 16; 95-100.

EKLER

EK 1 Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

EK 2 Toplam Fenol Derişimi Hesabı

EK 3 Toplam Fenol Derişimi Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 5 Tirozinaz Monofenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve
Tekrarlanabilirliği

EK 6 Tirozinaz Dİfenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve
Tekrarlanabilirliği

EK 7 Lakkaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 8 Kantitatif HPLC Analiz Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

EK 9 Oleuropeinin Asidik Hidrolizi

EK 10 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin IC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

EK 11 Tirozol ve Oleuropein Hidrolizatının (Hidroksitirozol) Kalitatif HPLC Analizine Ait
Örnek Kromatogramlar

EK 12 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin Kantitatif HPLC ile Analizi için
Hazırlanan Kalibrasyon Grafikleri

EK 13 Zeytin Karasuyu Ekstraktlarında Bulunan Fenolik Bileşenlere Ait Piklerin Standart
Katma Yöntemi ile Belirlenmesi

EK 1 DeneYlerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

Kimyasal/Biyokimyasal Madde	Firma	Katalog no
ABTS	Sigma	A1888
ABTS	Sigma	A3219
Agar	Scharlau	07-004
Amonyum sülfat	Merck	1.01217
Asetik asit	Riedel-de Haën	27225
Asetonitril	Merck	1.00030
L-Askorbik asit	Sigma-Aldrich	A92902
BSA	Sigma	A9647
Demir (III) klorür hegzahidrat	Merck	1.03943
2,5-Dihidroksibenzoik asit	Aldrich	149357
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	Aldrich	850217
Dipotasyum hidrojen fosfat	Merck	1.05104
Disodyumtartarat-dihidrat	Merck	1.06663
L-DOPA	Sigma	D9628
DPPH	Aldrich	D913-2
EDTA	Sigma-Aldrich	E9884
Etil asetat	Sigma	27227
Ferulik asit	Fluka	46278
Folin-Ciocalteu reaktifi	Sigma	9252
<i>o</i> -Fosforik asit	Merck	1.00573
Gallik asit	Sigma	G7384
Glukoz	Applichem	A1349
Guaiakol	Sigma	G5502
Hidrojen peroksit	Merck	1.07209
Hidroklorik asit	Sigma	07102
3-Hidroksifenilasetik asit	Aldrich	H4990
4-Hidroksifenilasetik asit	Fluka	56140

EK 1 (devam) Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

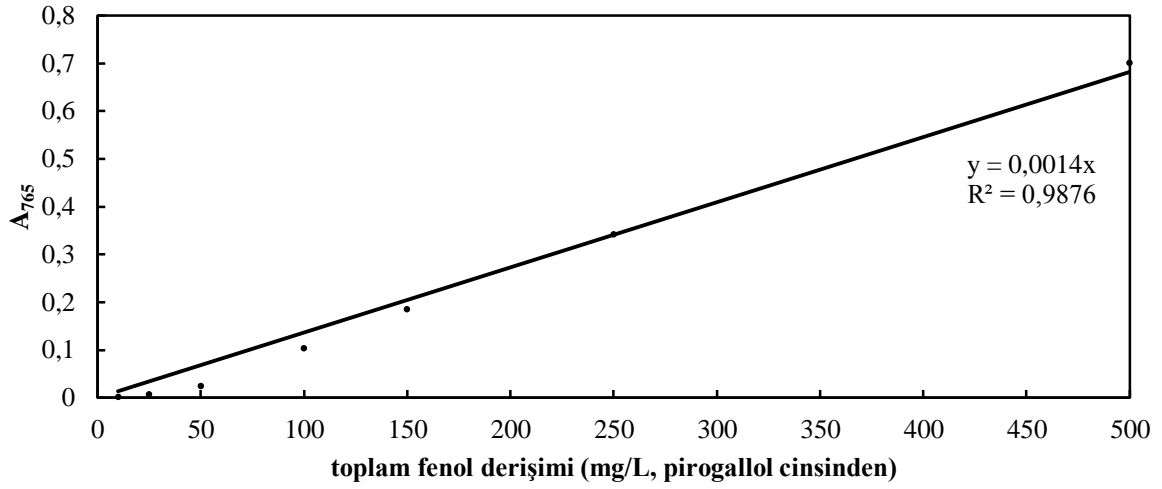
2-(4-Hidroksifenil)etanol	Fluka	79058
3-Hidroksi-4-metoksifenilasetik asit	Aldrich	716391
Kafeik asit	Sigma	C0625
Kateşol	Sigma-Aldrich	C9510
<i>p</i> -Kumarik asit	Sigma	C9008
Malt özütü	Scharlau	07-080
Lakkaz	Novozym	51003
Lakkaz	Sigma	38429
Mangan peroksidaz	Sigma	93014
Mangan sülfat monohidrat	Sigma-Aldrich	M8179
Maya özütü	Fluka	70161
Metanol	Merck	1.06007
4-Metilkateşol	Aldrich	M34200
Oleuropein	Sigma	O8889
Pepton	Fluka	70171
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck	1.04873
Potasyum fosfat monobazik	Riedel-de Haën	30407
SDS	Merck	8.22050
Sinapik asit	Aldrich	D7927
<i>t</i> -Sinamik asit	Aldrich	C80857
Sodyum asetat	Merck	1.06268
Sodyum fosfat dibazik heptahidrat	Riedel-de Haën	04274
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich	06203
Sodyum klorür	Applichem	A2942
Sülfürik asit	Merck	1.00713
Şirincik asit	Sigma	S6881
Tannaz	Sigma	42395
Tannik asit	Sigma-Aldrich	40304

EK 1 (devam) Deneylerde Kullanılan Kimyasal ve Biyokimyasal Maddeler

L-Tartarik asit	Sigma-Aldrich	33801
L-Tirozin	Sigma-Aldrich	T3754
Tirozinaz	Sigma	T3824
Trietanolamin	Merck	1.08379
Vanilik asit	Fluka	94770

EK 2 Toplam Fenol Derişimi Hesabı

Zeytin karasuyu örneklerine ait toplam fenol derişimleri hesaplanırken, Şekil Ek-2.1’de verilen grafiğe ait denklem kullanılarak sonuçlar pirogallol eşiti (mg/L) cinsinden hesaplanmıştır (Karakaya 2011). Her örnek için üç paralel fenol tayini yapılmış, ölçülen üç absorbans değerinin ortalaması alınarak Şekil Ek-1’de yer alan denklemden toplam fenol derişimi hesaplanmıştır.



Şekil Ek-2.1. Toplam fenol derişimi hesabında kullanılan kalibrasyon grafiği

EK 3 Toplam Fenol Derişimi Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Toplam fenol derişimi tayini yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, aynı *p*-kumarik asit çözeltisi için 5 kez toplam fenol derişimi tayini yapılarak, yönteme ait standart sapma değeri Eşť.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{ort})^2}{n-1}} \quad (\text{EK 3.1})$$

Eşť.(EK-3.1) için:

S	=	standart sapma
x_i	=	örneğe ait değer
x_{ort}	=	örneklere ait ortalama değer
n	=	örnek sayısı

Çizelge Ek-3.1'deki veriler Eşť.(Ek-3.1)'e uygulandığında, toplam fenol tayini yönteminin standart sapması 0.594 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), toplam fenol derişimine ait değerlerin ortalamasının % 0.41'ine karşılık gelmektedir.

Çizelge Ek-3.1. Toplam fenol tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (mg/L)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
145.00	-0.142	0.020164
145.71	0.568	0.322624
145.00	-0.142	0.020164
144.29	-0.852	0.725904
145.71	0.568	0.322364

EK 4 Toplam Antioksidan Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Toplam antioksidan aktivite tayini yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, aynı 4-metilkateşol çözeltilisi için 5 kez toplam antioksidan aktivite tayini yapılarak, yönteme ait standart sapma değeri Eş.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge Ek-4.1'deki veriler Eş.(Ek-3.1)'e uygulandığında, toplam antioksidan aktivite tayini yönteminin standart sapması 0.538 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), toplam antioksidan aktivitesine ait değerlerin ortalamasının % 0.6'sına karşılık gelmektedir.

Çizelge Ek-4.1. Toplam antioksidan aktivite tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (% in.)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
89.60	0.482	0.232324
89.77	0.652	0.425104
88.85	-0.268	0.071824
88.85	-0.268	0.071824
88.52	-0.598	0.357604

EK 5 Tirozinaz Monofenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, aynı ticari enzim preparatının aktivitesine 5 kez bakılarak, yonteme ait standart sapma değeri Eş.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge Ek-5.1'deki veriler Eş.(Ek-3.1)'e uygulandığında, tirozinaz monofenolaz enzim aktivite tayin yönteminin standart sapması 20.736 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), tirozinaz monofenolaz aktivitesine ait değerlerin ortalamasının % 12.12'sine karşılık gelmektedir.

Çizelge Ek-5.1. Toplam antioksidan aktivite tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (U/mL)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
155	-16	256
205	34	1156
165	-6	36
175	4	16
155	-16	256

EK 6 Tirozinaz Difenolaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Tirozinaz difenolaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, aynı ticari enzim preparatının aktivitesine 5 kez bakılarak, yönteme ait standart sapma değeri Eş.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge Ek-6.1'deki veriler Eş.(Ek-3.1)'e uygulandığında, tirozinaz difenolaz enzim aktivite tayin yönteminin standart sapması 392.587 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), tirozinaz difenolaz aktivitesine ait değerlerin ortalamasının % 5.11'ine karşılık gelmektedir.

Çizelge Ek-6.1. Toplam antioksidan aktivite tayini yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (U/mL)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
7803	123.4	15227.56
8047	367.4	134982.8
7248	-431.6	186278.6
7277	-402.6	162086.8
8023	343.4	117923.6

EK 7 Lakkaz Enzim Aktivite Tayini Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Lakkaz enzim aktivite tayin yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, aynı ticari enzim preparatının aktivitesine (substrat: katı ABTS) 5 kez bakılarak, yöntemle ait standart sapma değeri Eşit.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge Ek-7.1'deki veriler Eşit.(Ek-3.1)'e uygulandığında, lakkaz enzim aktivite tayin yönteminin standart sapması 0.006 olarak bulunmuştur.

Bulunan standart sapma değeri (S), lakkaz aktivitesine ait değerlerin ortalamasının % 5.35'ine karşılık gelmektedir.

Çizelge Ek-7.1. Lakkaz aktivite tayin yöntemine ait standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (U/mL)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
0.121	0.0088	0.00007744
0.112	-0.0002	4×10^{-8}
0.105	-0.0072	0.00005184
0.109	-0.0032	0.00001024
0.114	0.0018	3.24×10^{-6}

EK 8 Kantitatif HPLC Analiz Yönteminin Doğruluğu ve Tekrarlanabilirliği

Kantitatif HPLC analiz yönteminin doğruluğu ve tekrarlanabilirliğini belirleyebilmek için, çalışmada iç standart olarak kullanılan 0.005 mg/mL derişimindeki *p*-kumarik asit çözeltisi (metanolde) 5 kez HPLC ile analizlenmiştir. Analiz sonucu elde edilen *p*-kumarik aside ait pikin alan değerlerinden ve kalma sürelerinden her ikisi için de standart sapma değerleri Eş.(Ek 3.1) kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge Ek-8.1'deki veriler Eş.(Ek-3.1)'e uygulandığında, kantitatif HPLC analizinde elde edilen pike ait standart sapma değeri 9341.223 olarak bulunmuştur.

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

Çizelge Ek-8.1. Kantitatif HPLC analiz yönteminde elde edilen pike ait alanın standart sapma değerinin hesaplanması

x_i (μ Vxdk)	$x_i - x_{ort}$	$(x_i - x_{ort})^2$
1730889	14280.6	203935536
1708476	-8132.4	66135930
1719462	2853.6	8143033
1716000	-608.4	370150.56
1708215	-8393.4	70449164

Çizelge Ek-8.2. Kantitatif HPLC analiz yönteminde kalma süresine ait standart sapma değerinin hesaplanması

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

Çizelge Ek-8.2'deki veriler Eşit.(Ek-3.1)'e uygulandığında, kantitatif HPLC analizinde kalma süresine ait standart sapma değeri 0.2 olarak bulunmuştur.

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

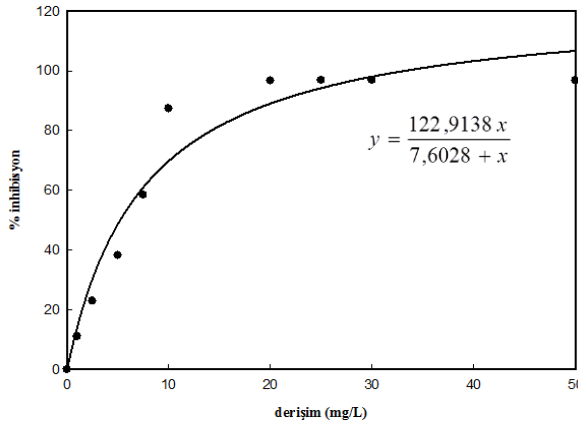
EK 9 Oleuropeinin Asidik Hidrolizi

Hidroksitirozol, zeytin karasuyunda oldukça yüksek miktarda bulunan, ancak ticari olarak elde edilmesi zor bir fenolik bileşen olduğundan çalışmada Walter et al. (1973) tarafından kullanılan oleuropeinin asidik hidroliz yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bunun için, 50 mg oleuropein ve 10 mL 1 N H₂SO₄ rodajlı balona alınarak bir geri soğutucuya bağlanmıştır. Hidroliz işleminin gerçekleşeceği balon, 100°C'de sabit sıcaklıktaki ısıtma yağı içerisine konulmuş ve 1 st hidroliz süresince yağ ve reaksiyon ortamı sürekli olarak karıştırılmıştır. Bu süre sonunda hidroliz sonlandırılarak hidrolizat oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra hidrolizatın pH'ı NaOH ile 2'ye getirilmiş ve üç kez 10 ml etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Etil asetat, tek başlıklı döner buharlaştırıcıda 45°C'de 150 rpm'de uzaklaştırılmıştır. Buharlandırmadan sonra kalan madde HPLC'de analizlenmek üzere 10 ml metanolde çözülmüştür.

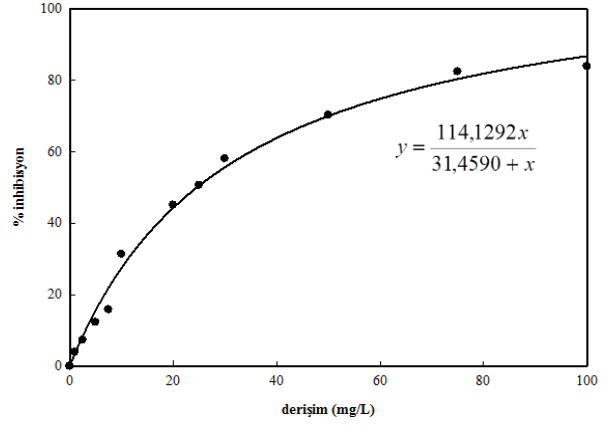
EK 10 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin IC₅₀ Değerlerinin Hesaplanması

Zeytin karasuyunda var olduğu literatürde ve HPLC analizleri ile yapılan çalışmada belirlenen fenolik bileşenlerden; 3,4-dihidroksifenilasetik asit, ferulik asit, kafeik asit, kateşol, 4-metilkateşol, oleuropein, oleuropein hidrolizati, tirozol, vanilik asit ve bilinen bir antioksidan olan askorbik asitin IC₅₀ değerleri ile ZK1 ve ZK2 ekstraktlarına ait IC₅₀ değerleri Şekil Ek-10.1’de verilen grafiklerden hesaplanmıştır.

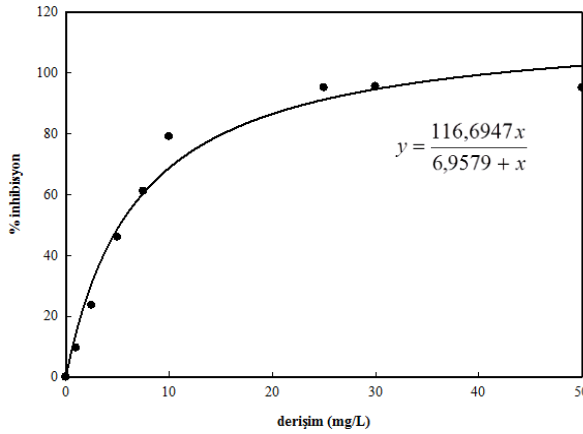
3,4-Dihidroksifenilasetik asit



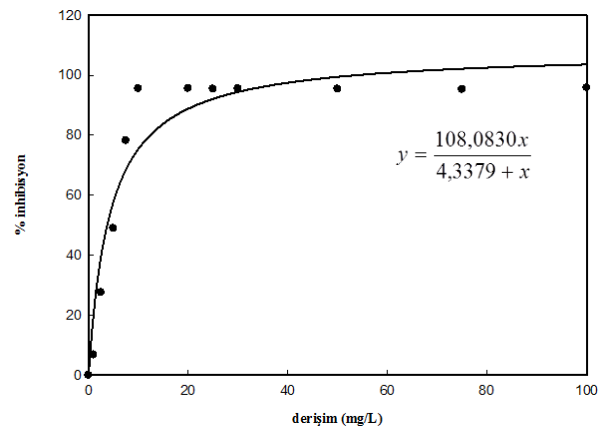
Ferulik asit



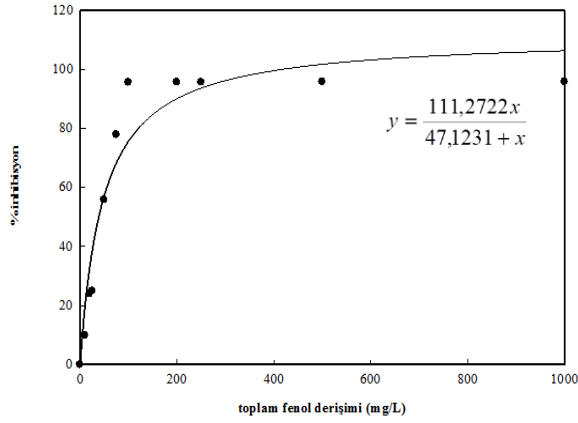
Kafeik asit



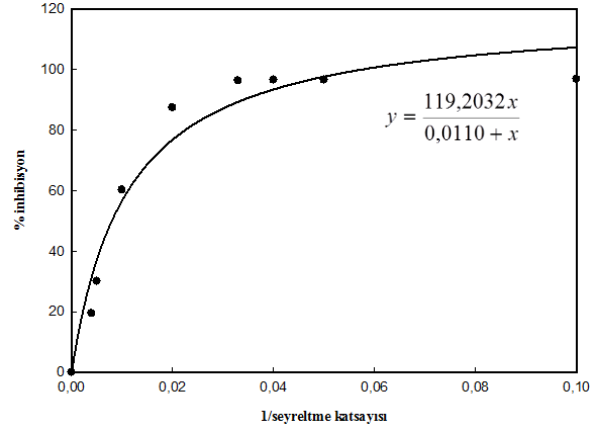
Kateşol



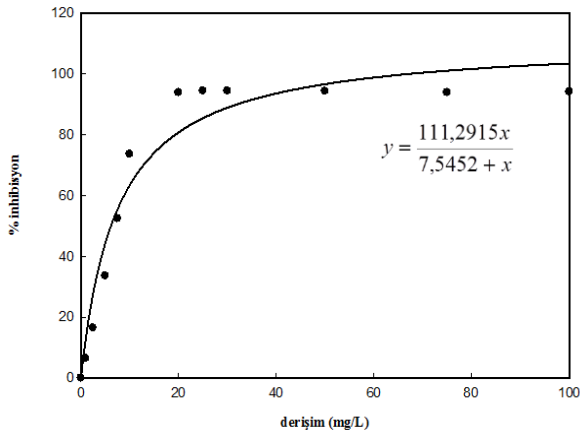
Oleuropein



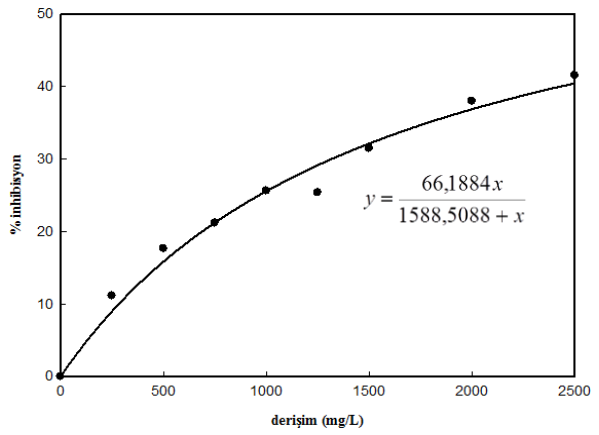
Oleuropein hidrolizatı



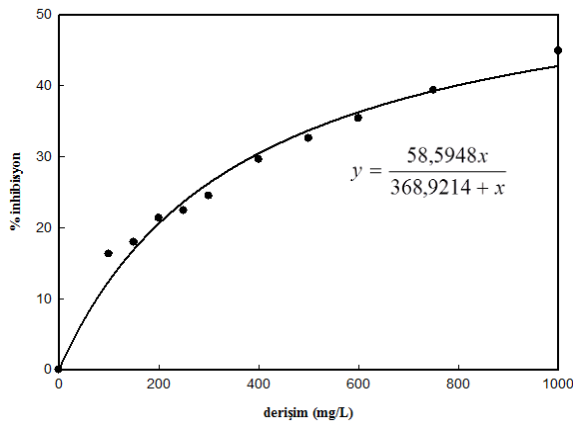
4-Metilkateşol



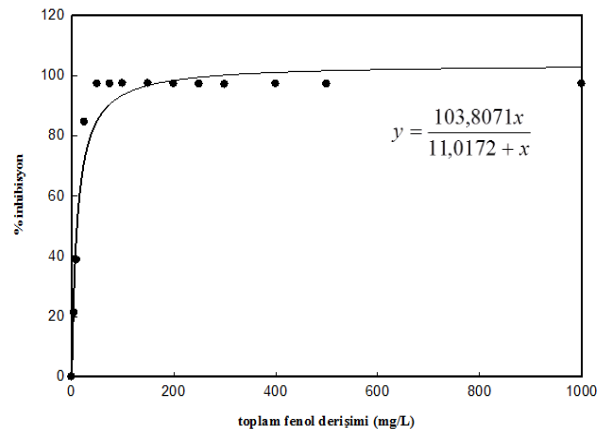
Tirozol

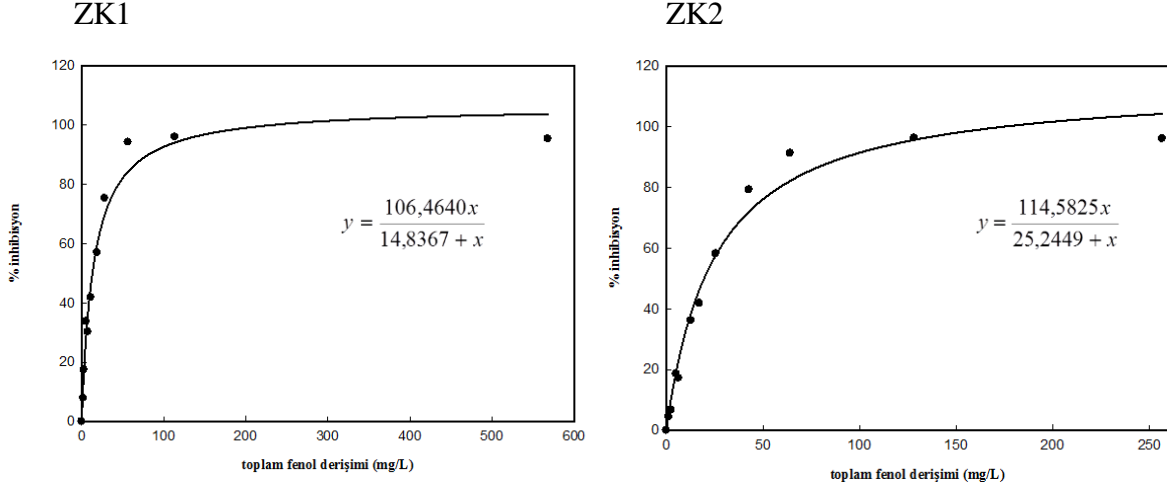


Vanilik asit



Askorbik asit





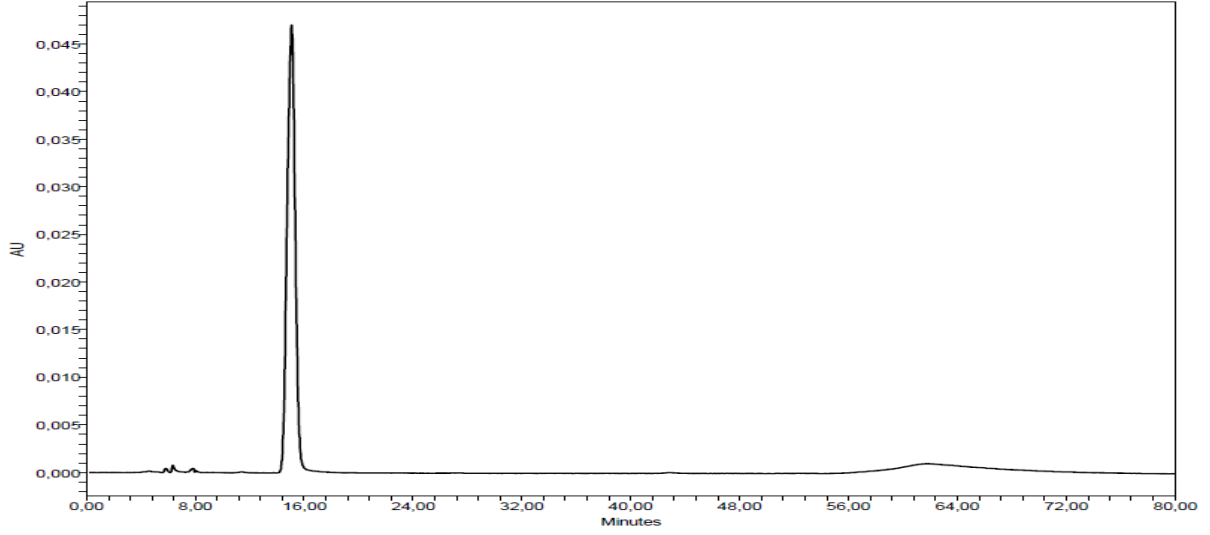
Şekil Ek-10.1. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlere ait % inhibisyon grafikleri

Verilen grafiklere ait denklemlerden, “ $y=50$ ” için hesaplanan “ x ” değerleri IC_{50} değerlerini vermiştir. Oleuropein hidrolizatına ait hidroksitirozol derişimi bilinmediğinden, apsisde “1/seyreltme katsayısı” kullanılmıştır. Örneğın, grafikte 5 kat seyreltilmiş oleuropein hidrolizatına ait apsis değeri “ $1/5=0.2$ ” değeriine karşılık gelmektedir. Zeytin karasuyu ekstratlarına ait grafiklerde ise, zeytin karasuyu ekstratlarından seyreltmeler yapılmış, yapılan seyreltmeler sonucu elde edilen örneklerin toplam fenol derişimi, başlangıç toplam fenol derişimi esas alınarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucu elde edilen IC_{50} değeri, Çizelge Ek-10.1’de verilmiştir.

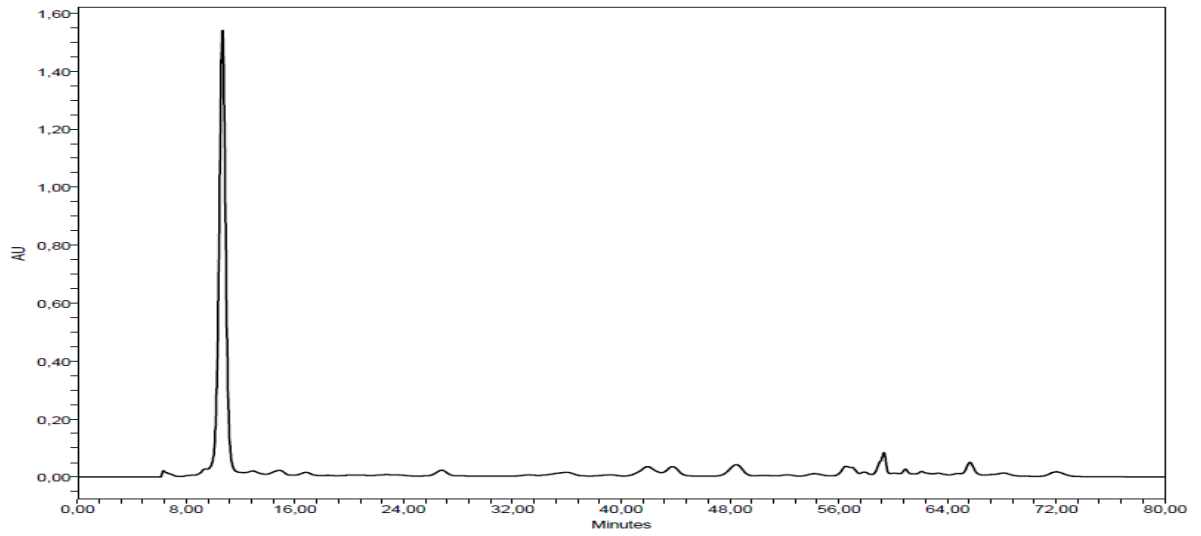
Çizelge Ek-10.1. Zeytin karasuyunda bulunan fenolik bileşenlere ait IC₅₀ değerleri

Bileşen	IC₅₀(mg/L)
Askorbik asit	10.24
Fenolik bileşen	IC₅₀ (mg/L)
3,4-Dihidroksifenilasetik asit	5.21
Ferulik asit	24.53
Kafeik asit	5.22
Kateşol	3.73
4-Metilkateşol	6.15
Oleuropein	38.45
Tirozol	4906.32
Vanilik asit	2146.19
Zeytin karasuyu	IC₅₀ (mg/L)
ZK1	13.14
ZK2	19.54
Fenolik bileşen	IC₅₀ (1/seyreltme katsayısı)
Oleuropein hidrolizatı (Hidroksitirozol)	7.95x10 ⁻³

EK 11 Tirozol ve Oleuropein Hidrolizatının (Hidroksitirozol) Kalitatif HPLC Analizine Ait Kromatogramlar



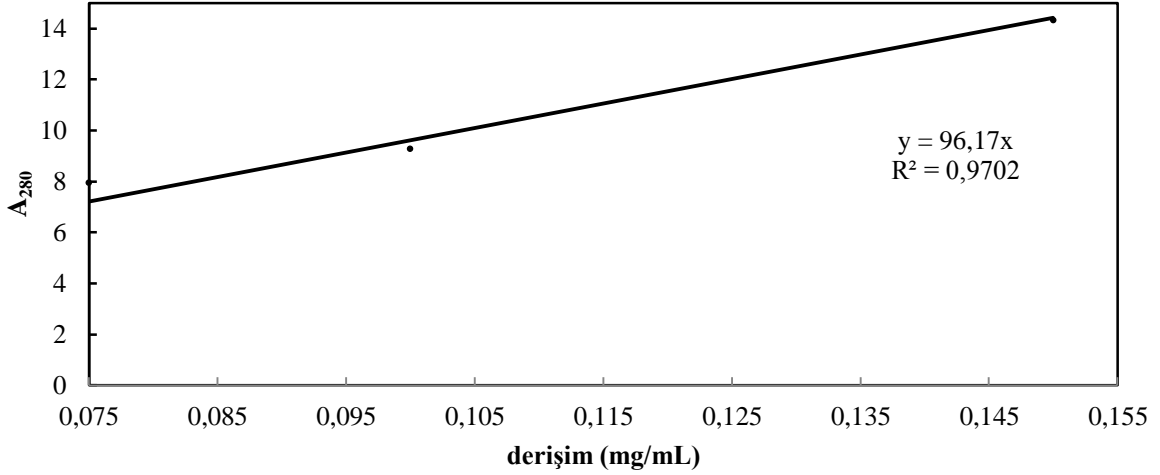
Şekil Ek-11.1. 0.05 mg/mL tirozolün kalitatif HPLC analizine ait kromatogram



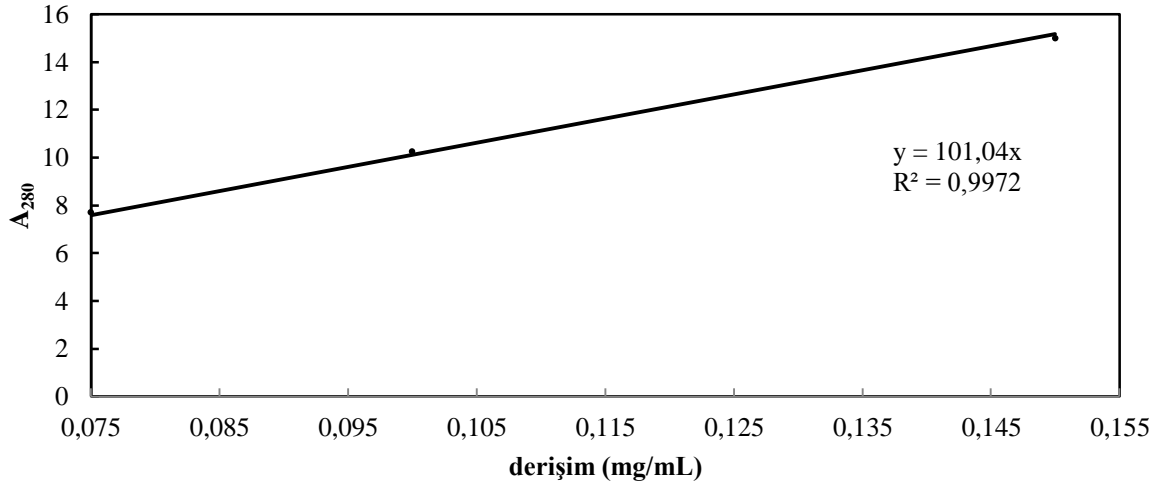
Şekil Ek-11.2. Oleuropein hidrolizatının (hidroksitirozol) kalitatif HPLC analizine ait kromatogram

EK 12 Zeytin Karasuyunda Bulunan Fenolik Bileşenlerin Kantitatif HPLC ile Analizi için Hazırlanan Kalibrasyon Grafikleri

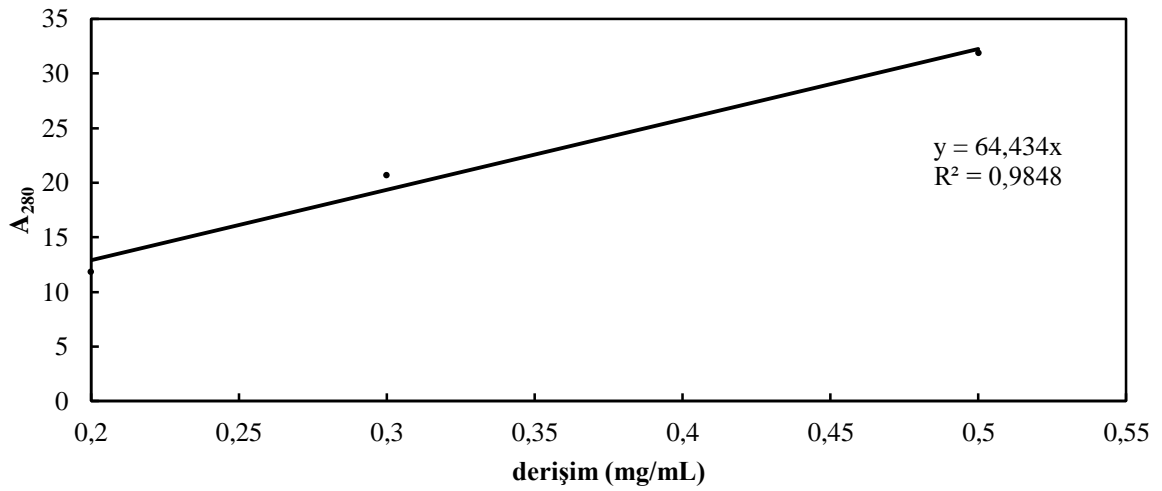
Zeytin karasuyunda (ZK1 ve ZK2) bulunan fenolik bileşenler, standart katma yöntemi ile belirlendikten sonra, kantitatif HPLC analizlerinde kullanılmak üzere belirlenen her bir fenolik bileşenin ayrı ayrı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Kateşol, 4-metilkateşol, tirozol ve vanilik asitin farklı derişimleri, aynı hacimde 0.005 mg/mL derişime sahip *p*-kumarik asit (iç standart) çözeltisi ile karıştırılarak analizlenmiştir. Her bir fenolik bileşen için üç farklı derişimde çalışılmış, yapılan HPLC analizi sonucu elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil Ek-12.1-12.4'te verilmiştir. Hidroksitirozol ticari olarak elde edilemediğinden ve oleuropeinin asidik hidrolizi sonucu elde edilen hidrolizatın (hidroksitirozol) derişimi de bilinmediğinden, hidroksitirozol için kalibrasyon grafiği çizilememiştir. Bunun yerine hesaplamalarda, kimyasal yapısı oldukça benzer olan tirozol için çizilmiş olan kalibrasyon grafiği kullanılmıştır (Şekil Ek-12.3).



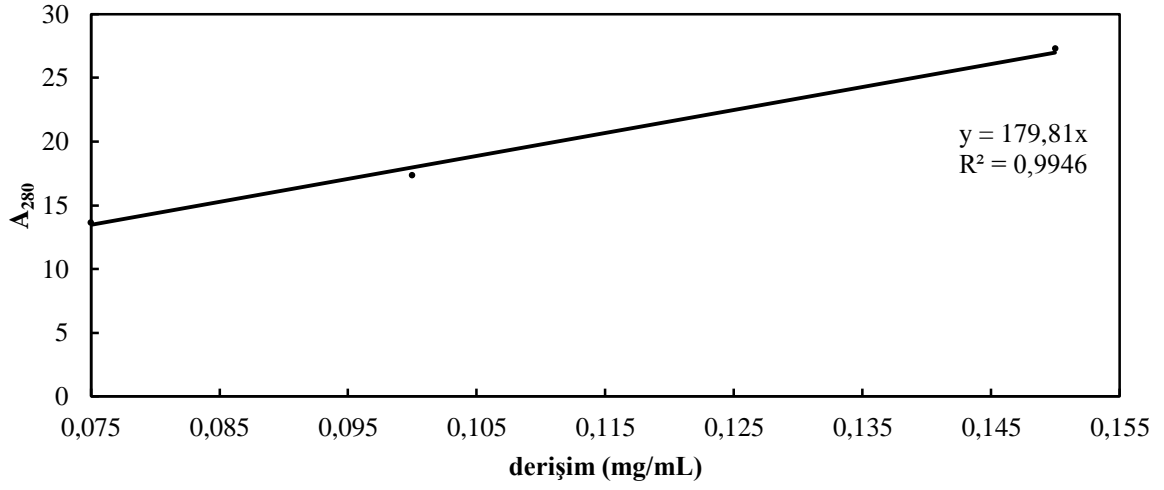
Şekil Ek-12.1. Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış kateşole ait olan kalibrasyon grafiği



Şekil Ek-12.2. Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış 4-metilkateşole ait olan kalibrasyon grafiği

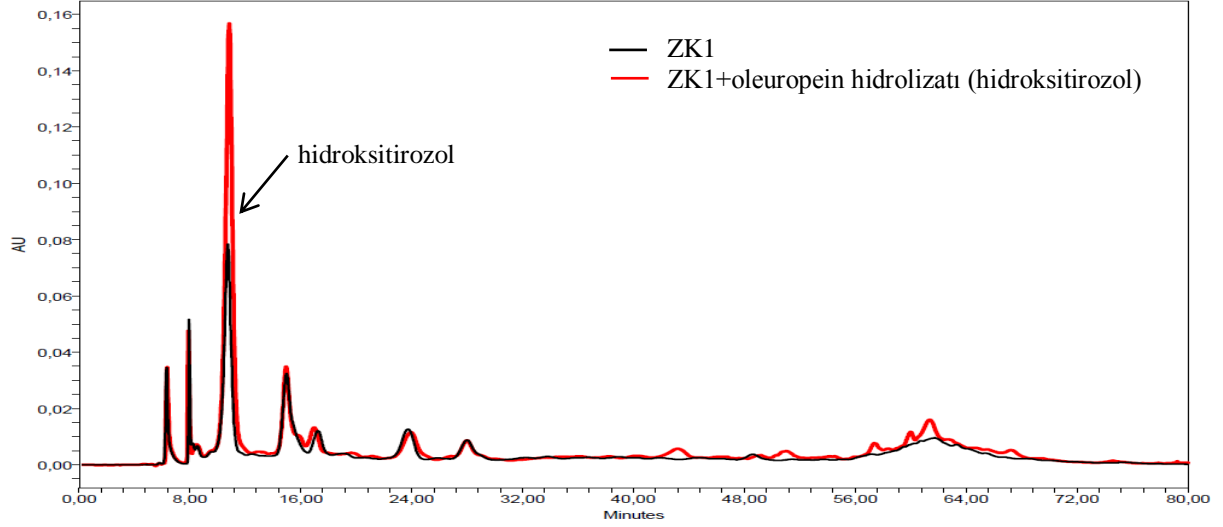


Şekil Ek-12.3. Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış tirozole ait olan kalibrasyon grafiği

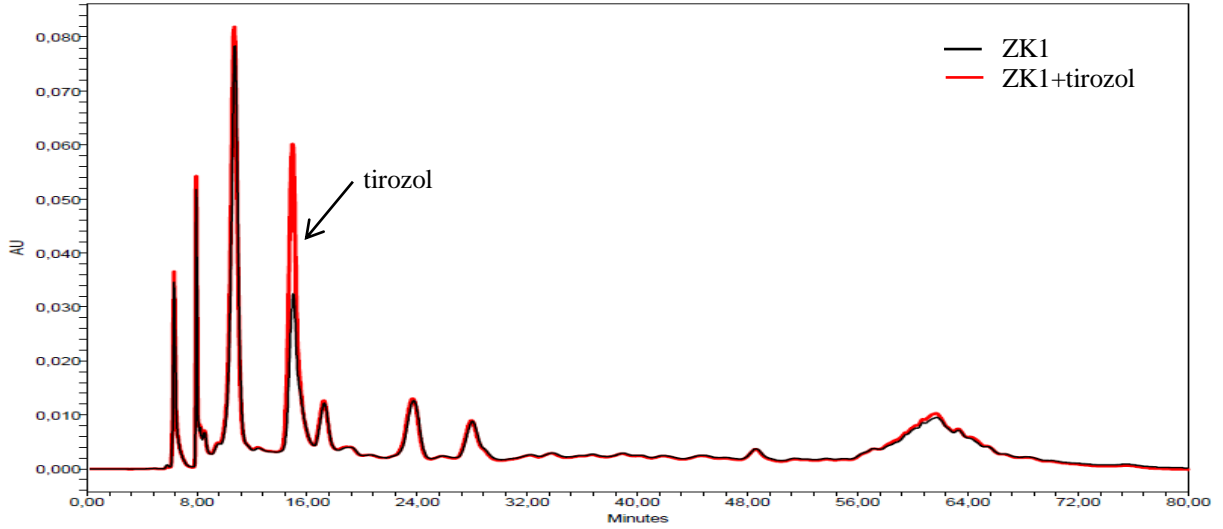


Şekil Ek-12.4. Kantitatif HPLC analizinde kullanılmak üzere hazırlanmış vanilik asite ait olan kalibrasyon grafiği

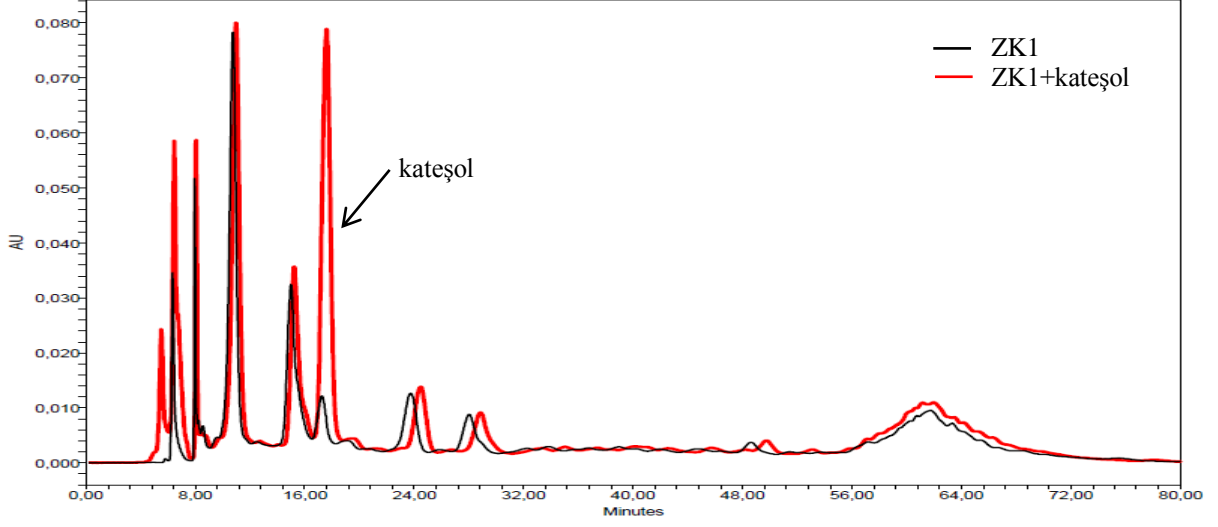
EK 13 Zeytin Karasuyu Ekstraktlarında Bulunan Fenolik Bileşenlere Ait Piklerin Standart Katma Yöntemi ile Belirlenmesi



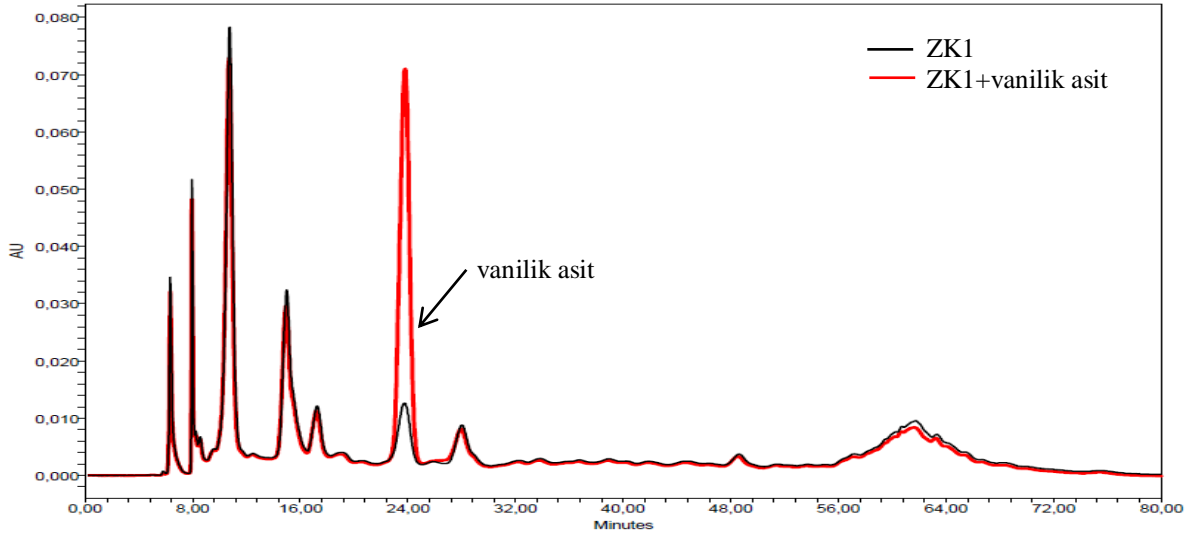
Şekil Ek-13.1. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK1 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK1 ekstraktına 10 kat seyreltilmiş oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol) eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



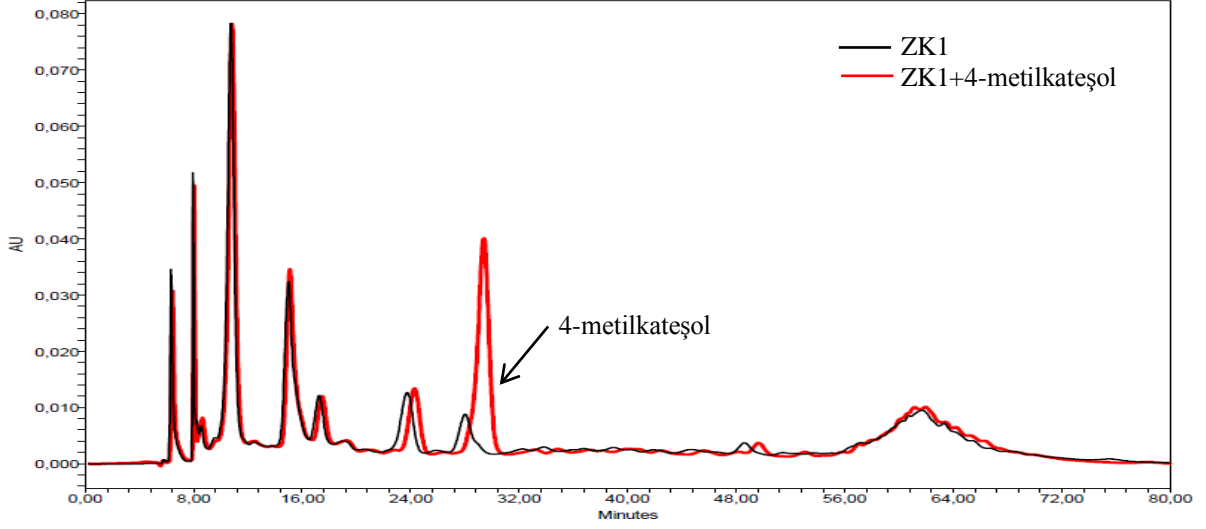
Şekil Ek-13.2. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK1 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK1 ekstraktına tirozol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



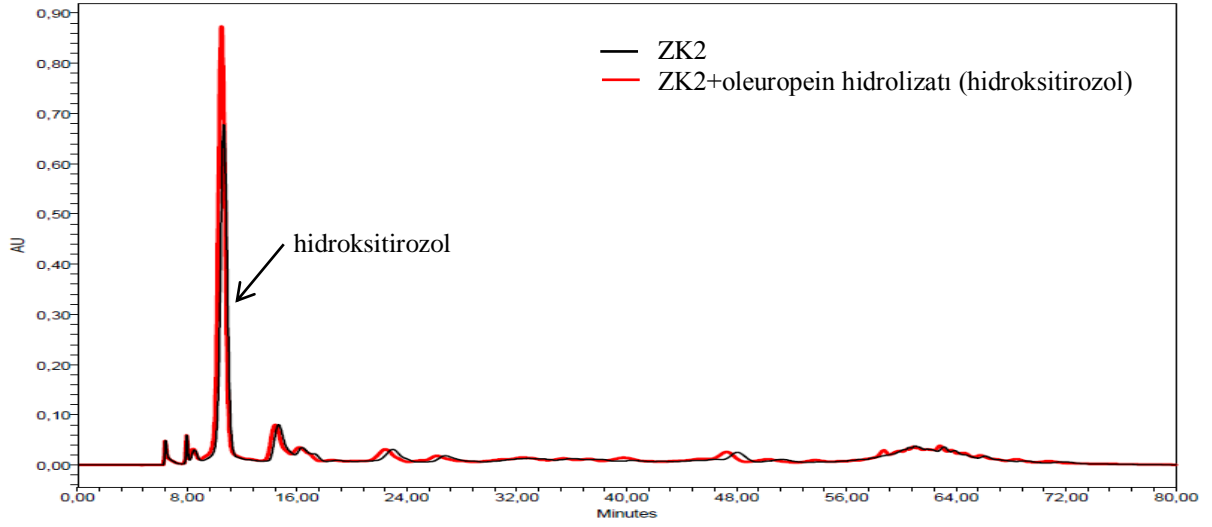
Şekil Ek-13.3. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK1 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK1 ekstraktına kateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



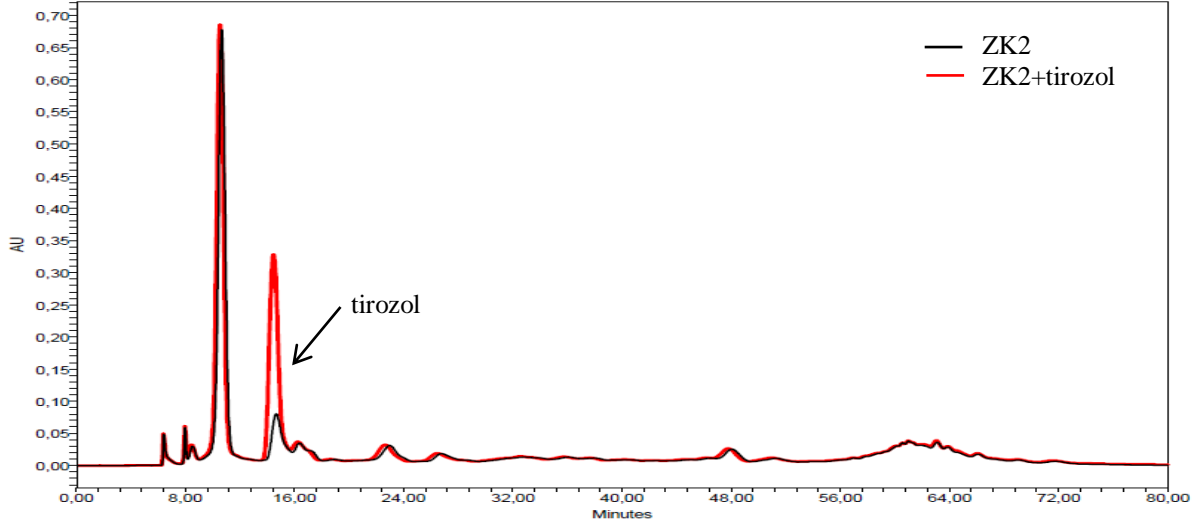
Şekil Ek-13.4. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK1 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK1 ekstraktına vanilik asit çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



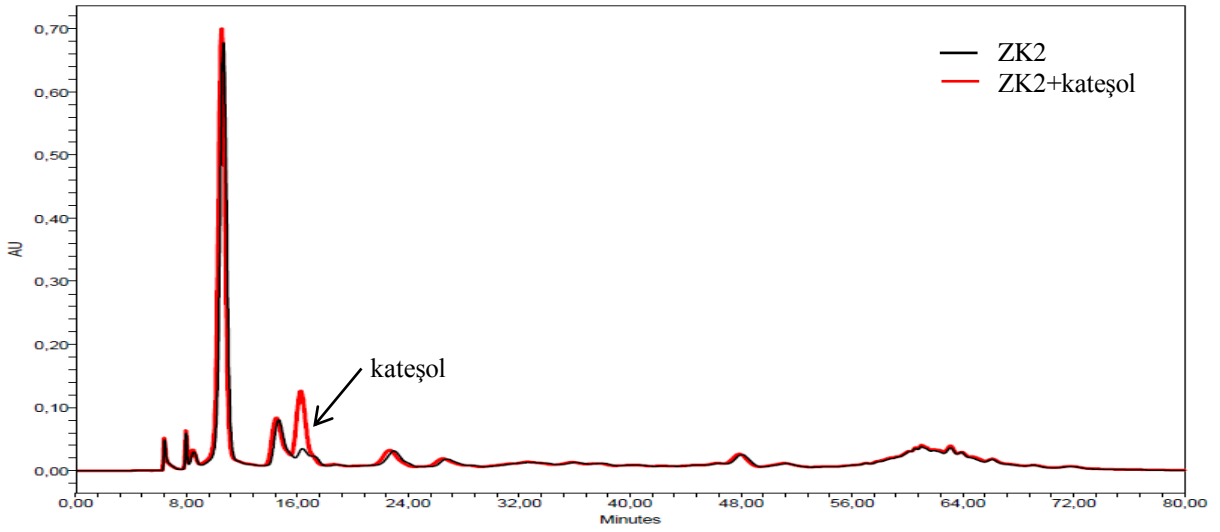
Şekil Ek-13.5. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK1 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK1 ekstraktına 4-metilkateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



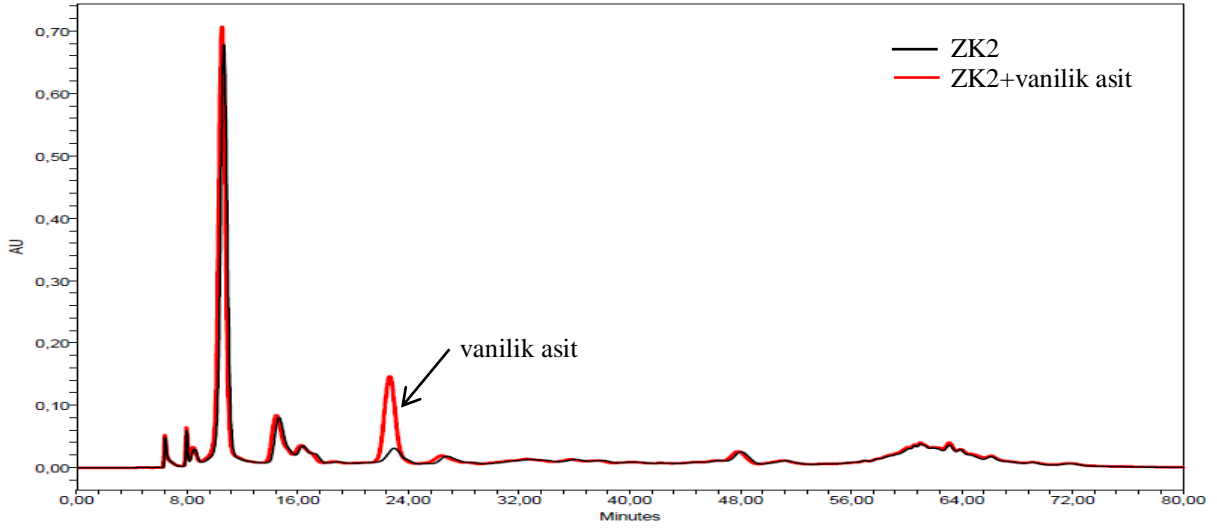
Şekil Ek-13.6. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK2 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK2 ekstraktına 10 kat seyreltilmiş oleuropein hidrolizatı (hidroksitirozol) eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



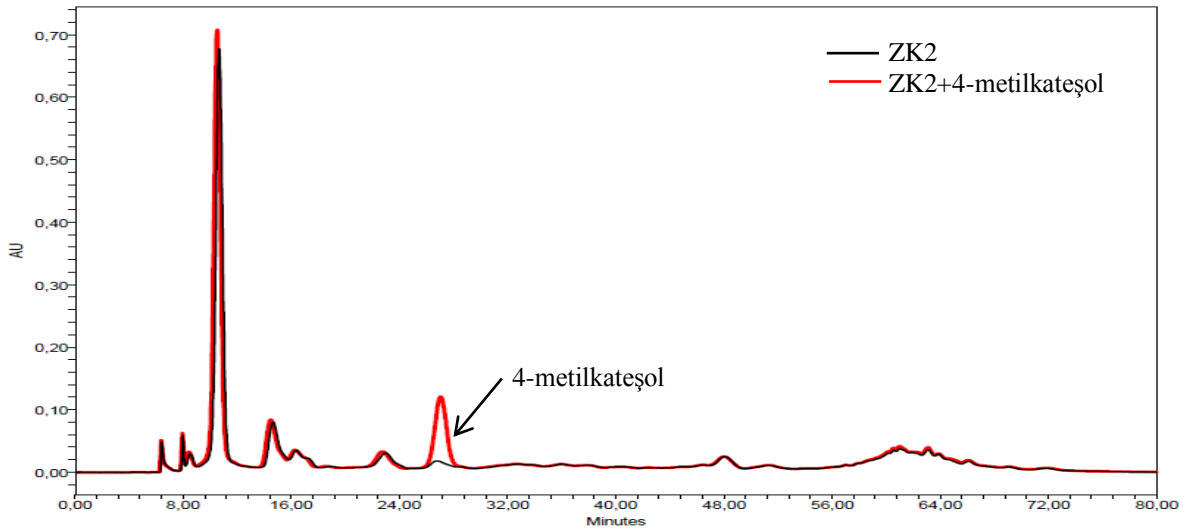
Şekil Ek-13.7. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK2 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK2 ekstraktına tirozol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



Şekil Ek-13.8. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK2 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK2 ekstraktına kateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



Şekil Ek-13.9. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK2 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK2 ekstraktına vanilik asit çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması



Şekil Ek-13.10. Metanol ile 2 kat seyreltilmiş ZK2 ekstraktına ait HPLC kromatogramı ile ZK2 ekstraktına 4-metilkateşol çözeltisi eklenmesiyle elde edilen karışıma ait HPLC kromatogramının karşılaştırılması

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine AKARDERE
Doğum Yeri : Bursa
Doğum Tarihi : 05.05.1987
Medeni Durumu : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
Temel Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı (2012)
Lisans : Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyokimya Bölümü (Örgün Öğretim) (2009)
Lise : Bursa Cumhuriyet Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (2005)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

1. TÜBİTAK, ‘Zeytinyağı Fabrikası Sıvı Atığının Özelliklerinin İyileştirilmesi ve Antioksidan Üretiminde Kullanılması için Biyoproses Geliştirilmesi’ (109M290), Proje Bursiyeri (2010-2011).
2. TÜBİTAK-ATAL, Katkı-Kalıntı-Bulaşan Laboratuvarı, Stajyer (2008).
3. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Merkez Laboratuvarı-Proteombilim, Stajyer (2008).

Yayımları (SCI ve diğer)

Makaleler:

1. Akardere, E., Özer, B., Çelem, E.B., Önal, S. 2010. "Three-phase partitioning of invertase from Baker's yeast". *Separation and Purification Technology*,72; 335-339.
2. Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B., Önal, S. 2010. "Three-phase partitioning as a rapid and efficient method for purification of invertase from tomato". *Biochemical Engineering Journal*, 50; 110-115.

Sözlü Sunumlar:

1. Takaç, S., Akardere, E., Karakaya, A., Laleli, Y. 2011. 'Mikrobiyal Dönüşüm ile Endüstriyel Atıktan Değerli Kimyasal Antioksidan Üretimi'. 9. Biyoteknoloji Günleri, Bildiri Özetleri, 87-90, Ankara, Türkiye.
2. Akardere, E., Karakaya, A., Laleli, Y., Takaç, S. 2011. "Variations in phenolic compounds during biodegradation of olive mill wastewater by *Debaryomyces hansenii*". European Biotechnology Congress 2011, Current Opinion in Biotechnology, Volume 22, Supplement 1, September 2011, Page S34, İstanbul, Türkiye.
3. Akardere, E., Takaç, S. 2011. "Variation of phenolic compounds composition in olive mill wastewater during treatment with phenoloxidize enzymes". 1st International Symposium on Secondary Metabolites: Chemical, Biological and Biotechnological Properties, Book of Abstracts, 4, Pamukkale, Denizli, Türkiye.
4. Akardere, E., Takaç, S. 2011. "Biodegradation profile of phenolic compounds in olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*". 5th European Bioremediation Conference, Book of Abstracts, 220, Chania, Girit, Yunanistan.
5. Karakaya, A., Akardere, E., Laleli, Y., Takaç, S. 2010. "Phenolic antioxidant production during bioremediation of olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*". COST ACTION CM0903 UBIOCHEM, Book of Abstracts, 57, Cordoba, İspanya.

Poster Sunumları:

1. Akardere, E., Özer, B., Çelem, E.B., Önal, S. 2009. "Maya (*Saccharomyces cerevisiae*) invertazının saflaştırılması için üçlü-faz ayırma sistemlerinin geliştirilmesi ve karakterizasyonu". XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, 22 P-BB10, Antalya, Türkiye.
2. Özer, B., Akardere, E., Çelem, E.B., Önal, S. 2009. "Üçlü-faz ayırma tekniği ile invertaz enziminin domatesten (*Lycopersicon esculentum*) ekstraksiyonu, saflaştırılması ve karakterizasyonu". XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Bildiri Kitabı, 66 P-NB16, Antalya, Türkiye.