



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ZEYTİN AĞACI YAPRAKLARINDAN SÜPERKRİTİK-CO₂
İLE EKSTRAKT ELDESİ VE BİLEŞİMİNDEKİ
OLEUROPEİN MİKTARININ İNCELENMESİ**

Selin ŞAHİN

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Temel İşlemler ve Termodinamik Programı**

Danışman

Doç Dr. Mehmet BİLGİN

Şubat, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ZEYTİN AĞACI YAPRAKLARINDAN SÜPERKRİTİK-CO₂
İLE EKSTRAKT ELDESİ VE BİLEŞİMİNDEKİ
OLEUROPEİN MİKTARININ İNCELENMESİ**

Selin ŞAHİN

**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Temel İşlemler ve Termodinamik Programı**

Danışman

Doç Dr. Mehmet BİLGİN

Şubat, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 22/02/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Doç. Dr. Mehmet BİLGİN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Umur DRAMUR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Salih DİNÇER
Yıldız Teknik Üniversitesi
Kimya-Metalurji Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut BAYRAMOĞLU
Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 3009 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bana yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mehmet BİLGİN'ne en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Özellikle tez konumun belirlenmesi aşamasında vermiş olduğu değerli fikirlerinden dolayı Prof. Dr. M. Umur DRAMUR'a, desteklerinden dolayı Prof. Dr. Ş. İsmail KIRBAŞLAR'a ve çalışmamın enstrümental analiz aşamasında değerli tecrübelerinden faydalandığım Dr. İrfan ÜNLÜSAYIN'a teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam kapsamında “Doktora Araştırma Bursu” ile Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan “United States Department of Agriculture, Research, Education and Economics, Agricultural Research Service (USDA-ARS)” isimli araştırma merkezinde çalışma yapmamı sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na sonsuz teşekkür ederim. İlgili araştırma merkezinde sunmuş oldukları imkanlar ve göstermiş oldukları misafirperverlikten dolayı özellikle Dr. Nasir Malik'e, tüm bilimsel deneyimlerini benimle paylaşan kimyager Jose Luis Perez'e ve teknisyen Jim E. Brockington'a teşekkürlerimi sunarım.

Ocak, 2011

Selin ŞAHİN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ	xi
SEMBOL LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	6
2.1. BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ÖNEMİ	6
2.1.1. Fitokimyasallar (Bitki kimyasalları)	7
2.1.2. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrosötikler	8
2.1.3. Fenolik Bileşikler	9
2.1.4. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitesi	10
2.1.4.1. Serbest Radikaller	10
2.1.4.2. Oksidatif Stres	11
2.1.4.3. Antioksidan Savunma Mekanizması	12
2.1.5. Fenolik Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitesi	14
2.2. ZEYTİN AĞACI	16
2.2.1. Zeytin Ağacının Tarihçesi	17
2.2.2. Zeytin Ağacının Morfolojik Özellikleri ve Yetiştirme Koşulları ...	18
2.2.3. Zeytin Ağacının Dünya Üzerindeki Dağılımı	21
2.2.4. Zeytin Ağacının Türkiye’deki Durumu	22
2.2.5. Zeytin Meyvesi	23
2.3. ZEYTİN YAPRAĞI	26
2.3.1. Zeytin Yaprağının Farmakolojik Etkileri	26

2.3.1.1. <i>Antioksidan Etkisi</i>	27
2.3.1.2. <i>Antiinflamatuvar ve Antitrombotik Etkisi</i>	28
2.3.1.3. <i>Antimikrobiyal Etkisi</i>	28
2.3.1.4. <i>Antihipertansif Etkisi</i>	29
2.3.1.5. <i>Hipoglisemik Aktivitesi</i>	29
2.3.1.6. <i>Diğer Aktiviteler</i>	29
2.3.2. <i>Zeytin Yaprağında Rastlanan Biyoaktif Bileşenler</i>	29
2.3.2.1. <i>Oleuropein</i>	33
2.3.2.2. <i>Verbaskozit</i>	35
2.3.2.3. <i>Luteolin 7-O-glukozit</i>	36
2.3.2.4. <i>Luteolin 4'-O-glukozit</i>	37
2.3.3. <i>Zeytin Yaprağının Bileşimini Etkileyen Çevresel Faktörler</i>	38
2.3.3.1. <i>Su Stresi</i>	39
2.4. <i>KATI-SIVI EKSTRAKSİYONU</i>	40
2.4.1. <i>Sokslet Yöntemi</i>	44
2.4.2. <i>Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu</i>	46
2.4.2.1. <i>Kritik Sıcaklık ve Kritik Basınç</i>	48
2.4.2.2. <i>Süperkritik Akışkan</i>	49
2.4.2.3. <i>Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunu Etkileyen Parametreler</i> ..	52
2.4.2.4. <i>Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Uygulama Alanları</i>	58
2.4.3. <i>Katı-Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Diğer İleri Teknikler</i> ...	60
2.4.3.1. <i>Ultrason destekli ekstraksiyon (Ultrasound-assisted extraction, UAE)</i>	60
2.4.3.2. <i>Mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-assisted extraction, MAE)</i>	61
2.4.3.3. <i>Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Accelerated solvent extraction, ASE)</i>	62
2.5. <i>ANALİZ YÖNTEMLERİ</i>	64
2.5.1. <i>Spektroskopik Teknikler</i>	66
2.5.1.1. <i>Toplam Fenolik Madde Tayini</i>	67
2.5.2. <i>Kromatografik Teknikler</i>	68
2.5.2.1. <i>Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)</i>	68
2.5.2.2. <i>Sıvı Kromatografisi-Elektro Sprey İyonizasyonu-Kütle</i>	

Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi (LC-ESI-MS/MS)	70
2.5.3. İstatistik Analiz	72
2.6. KONU İLE İLGİLİ YAPILMIŞ OLAN ÇALIŞMALAR	73
3. MALZEME VE YÖNTEM	87
3.1. ZEYTİN YAPRAKLARINDAN EKSTRAKT ELDESİNE VE EKSTRAKTIN OLEUROPEİN İÇERİĞİNİN İNCELENMESİNE YÖNELİK YAPILAN DENEMELER	87
3.1.1. Malzeme	87
3.1.2. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu	88
3.1.2.1. Metanol ile Ekstraksiyon	89
3.1.2.2. Su ile Ekstraksiyon	89
3.1.2.3. Metanol/Su (1/3: v/v) ile Ekstraksiyon	90
3.1.3. Sokslet Metodu ile Ekstraksiyon	91
3.1.4. Süperkritik-CO ₂ (SC-CO ₂) Ekstraksiyonu	92
3.1.5. Analizler	96
3.2. FENOLİK MADDE PROFİLİNİN İNCELENDİĞİ DENEMELER	97
3.2.1. Malzeme	97
3.2.2. Ekstraksiyon	99
3.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini	99
3.2.4. HPLC ile Fenolik Madde Analizi	100
3.3. SU STRESİ DENEMELERİ	102
3.3.1. Malzeme	102
3.3.2. Araştırma Yerinin Tanımı ve Özellikleri	102
3.3.3. Aminoasit Ekstraksiyonu	104
3.3.4. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu ile Saflaştırma ...	104
3.3.5. Toplam Aminoasit Tayini	105
3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	106
4. BULGULAR	107
4.1. KLASİK ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU DENEMELERİ	107
4.1.1. Çözücü Türünün ve Ekstraksiyon Süresinin Verime Etkisi	107
4.2. SOKSLET METODU İLE YAPILAN EKSTRAKSİYON	

DENEMELERİ	111
4.2.1. Çözücünün Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etkisi	111
4.3. SÜPERKRİTİK-CO ₂ (SC-CO ₂) EKSTRAKSİYONU	
DENEMELERİ	114
4.3.1. Süperkritik-CO ₂ (SC-CO ₂) Ekstraksiyonunda İşletme	
Parametrelerinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi	114
4.3.1.1. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Sıcaklığın Verim Üzerine	
Etkisinin İncelendiği Denemeler	115
4.3.1.2. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Basıncın Verim Üzerine	
Etkisinin İncelendiği Denemeler	117
4.3.2. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak	
Suyun Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın	
Ekstraksiyon Verimine Etkisi	119
4.3.3. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak	
Etanol Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın	
Ekstraksiyon Verimine Etkisi	124
4.3.4. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak	
Metanol Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın	
Ekstraksiyon Verimine Etkisi	128
4.3.5. Süperkritik-CO ₂ Ekstraksiyonunda Farklı Yardımcı Çözücü	
Türlerinin Ekstraksiyon Verimine Etkilerinin	
Karşılaştırılması.....	132
4.4. SÜPERKRİTİK-CO ₂ EKSTRAKSİYONU İLE SOKSLET	
YÖNTEMİNİN EKSTRAKSİYON VERİMİNE ETKİLERİNİN	
KARŞILAŞTIRILMASI	135
4.5. ZEYTİN YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE PROFİLİNİN	
ÇEŞİTLİ FAKTÖRLERE GÖRE DEĞİŞİMİ	139
4.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Ağaç Türlerine Göre	
Değişimi	139
4.5.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Bölgelere Göre Değişimi	142
4.5.3. Başlıca Fenolik Madde (Oleuropein, Verbaskozit, Luteolin 7-O-	
glukozit, Luteolin 4'-O-glukozit) Miktarının Ağaç Türlerine	
Göre Değişimi	143

4.5.4. Başlıca Fenolik Madde Miktarının Bölgelere Göre Değişimi	151
4.6. ZEYTİN AĞACINA UYGULANAN SU STRESİNİN EKSTRAKT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	152
4.6.1. Su Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi	152
4.6.2. Su Stresinin Toplam Aminoasit Miktarına Etkisi	156
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	161
KAYNAKLAR	168
EKLER	190
ÖZGEÇMİŞ	193

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: Fitokimyasalların sınıflandırılması.....	8
Şekil 2.2	: Serbest radikalın nötralizasyonu	14
Şekil 2.3	: Türkiye’de bölgelere göre zeytin ağacı dağılımı (numaralandırma bölgelerin ağaç sayısına göre çoktan aza doğru yapılmıştır)	22
Şekil 2.4	: Türkiye’de önemli zeytinci illerin ağaç sayısı	23
Şekil 2.5	: Zeytin yaprağı ekstraktının bileşenlerine ait şematik gösterimi .	30
Şekil 2.6	: Oleuropeinin organik yapısı	34
Şekil 2.7	: Verbaskozitin organik yapısı	35
Şekil 2.8	: Luteolin 7- <i>O</i> -glukozitin organik yapısı	36
Şekil 2.9	: Flavonoidlerin sınıflandırılmaları ve organik yapıları	37
Şekil 2.10	: Luteolin 4’- <i>O</i> -glukozitin organik yapısı	38
Şekil 2.11	: Bitki hücre dokusunun şematik gösterimi	43
Şekil 2.12	: Sokslet aparatı. 1- Kaynama balonu, 2- Sokslet ekstraktörü, 3- Soğutma suyu girişi, 4- Yoğunlaştırıcı, 5- Soğutma suyu çıkışı .	45
Şekil 2.13	: Süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi ..	47
Şekil 2.14	: Karbondioksitin sıcaklık - basınç faz diyagramı	49
Şekil 2.15	: Karbondioksitin süperkritik hali alırkenki faz değişimleri	50
Şekil 2.16	: Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun uygulama alanları	60
Şekil 2.17	: 1980 senesinden itibaren biyoaktif maddeler üzerine yayınlanan araştırma sayısı.....	65
Şekil 2.18	: Homojen bir absorplayıcı ortamdan ışığın geçişi: I_0 , tabakaya gelen ışık şiddeti; I , tabakadan çıkan ışık şiddeti.....	67
Şekil 2.19	: HPLC cihazı akış şeması.....	69
Şekil 2.20	: ESI-MS/MS akış şeması	72
Şekil 3.1	: Memeli türü zeytin ağacının meyvesi ve yaprakları.....	88
Şekil 3.2	: Süperkritik akışkan ekstraksiyonu deney düzeneği. 1- CO ₂ tüpü, 2- Ekstraksiyon kabı, 3- Soğutmalı sirkülatör, 4- Sıcaklık kontrol sistemi, 5- Hava basınç regülatörü, 6- Mikro-ölçüm vanası, 7- Hava kompresörü, 8- Yardımcı çözücü pompası.....	94
Şekil 3.3	: Arbequina zeytin ağacı yaprak örneklerinin toplandığı şehirler ve coğrafi konumları.....	98
Şekil 3.4	: Toprak nem ölçer aparatı.....	103
Şekil 3.5	: İyon değiştirici reçine yardımı ile analiz öncesi ekstraktların saflaştırılması. 1, kolonun reçine ile şartlandırılması; 2, ekstraktın kolona aktarılması; 3, kolonun yıkanması ve istenmeyen bileşenlerin elüsyonu; 4, solutenin tutucu maddeden uygun bir çözücü ile elüsyonu (●, istenmeyen bileşenler; ▲, solute).....	104
Şekil 4.1	: Klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresinin ve çözücü türünün ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi	110

Şekil 4.2	: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün ekstrakt miktarına etkisi. Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir	112
Şekil 4.3	: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün oleuropein miktarına etkisi. Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir	113
Şekil 4.4	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (300 bar, 5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi).....	116
Şekil 4.5	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (300 bar, 5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi)	116
Şekil 4.6	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (50 °C, 5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi).....	118
Şekil 4.7	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (50 °C, 5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi).....	118
Şekil 4.8	: SC-(CO ₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi.....	121
Şekil 4.9	: SC-(CO ₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.....	122
Şekil 4.10	: SC-(CO ₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi.....	126
Şekil 4.11	: SC-(CO ₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.....	127
Şekil 4.12	: SC-(CO ₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi	130
Şekil 4.13	: SC-(CO ₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi	131
Şekil 4.14	: SC-CO ₂ ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, saf CO ₂ ve 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü ile modifiye edilmiş CO ₂ 'in varlığında, sıcaklık ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dakika). Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.....	133
Şekil 4.15	: SC-CO ₂ ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, saf CO ₂ ve 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü ile modifiye edilmiş CO ₂ 'in varlığında, sıcaklık ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120	

	dakika). Veriler ortalama (n=3) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir	134
Şekil 4.16	: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO ₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen ekstrakt miktarının en iyi şartlarda karşılaştırılması. Veriler ortalama (n=3) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.....	137
Şekil 4.17	: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO ₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen oleuropein miktarının en iyi şartlarda karşılaştırılması. Veriler ortalama (n=3) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.....	137
Şekil 4.18	: Farklı türlerdeki zeytin ağacı yapraklarının Şubat ve Haziran aylarındaki toplam fenolik madde dağılımı. Herbir türe ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.....	141
Şekil 4.19	: Arbequina zeytin ağacı yapraklarına ait toplam fenolik maddenin Şubat ve Haziran aylarındaki coğrafi orijine göre dağılımı. Herbir türe ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir	143
Şekil 4.20	: Leccino zeytin yaprağı ekstraktının örnek HPLC kromatogramı. Pikler: 1, luteolin 7-O-glukozit (t _R = 21.048); 2, verbaskozit (t _R = 21.667); 3, luteolin 4'-O-glukozit (t _R = 24.066); 4, oleuropein (t _R = 26.918). Ölçümler 280 nm'de gerçekleştirilmiştir.....	144
Şekil 4.21	: 27 °C sıcaklıktaki Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	153
Şekil 4.22	: 38 °C sıcaklıktaki Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	154
Şekil 4.23	: 27 °C sıcaklıktaki Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	155
Şekil 4.24	: 38 °C sıcaklıktaki Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	155
Şekil 4.25	: 27 °C sıcaklıktaki Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	157
Şekil 4.26	: 38 °C sıcaklıktaki Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	158
Şekil 4.27	: 27 °C sıcaklıktaki Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi	159
Şekil 4.28	: 38 °C sıcaklıktaki Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.....	159
Şekil E.1	: Denemelerde kullanılan zeytin ağacı yapraklarının temin edildiği "Sandy Oaks Olive Orchard" isimli zeytin bağı (San	

	Antonio, Teksas).....	191
Şekil E.2	: Denemelerde kullanılan Arbequina türü zeytin ağacı yaprakları.	192
Şekil E.3	: “United States Department of Agriculture, Research, Education and Economics, Agricultural Research Service (USDA-ARS)” isimli araştırma merkezinin zeytin araştırma serası.....	192
Şekil E.4	: Koroneiki ve Arbequina zeytin ağaçlarının muhafaza edildiği, sera içerisinde bulunan iklim odaları.....	193
Şekil E.5	: Koroneiki ve Arbequina zeytin ağaçlarının 23.7 - 37.4 °C’ de (en düşük - en yüksek) muhafaza edildiği, sera içerisinde bulunan iklim odası.....	193

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1	: Zeytin ağacının taksonomik olarak sınıflandırılması.....	18
Tablo 2.2	: Zeytin meyvesinin fiziksel özellikleri ve bileşimi.....	25
Tablo 2.3	: Zeytin yaprağı ekstraktı içerisinde bulunan ana fenolik bileşikler ve bu bileşiklerin kuru ekstrakt temelinden % miktarları	32
Tablo 2.4	: Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılabilecek saf çözücüler	51
Tablo 2.5	: Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yönteminde CO ₂ 'i modifiye etmek için kullanılan çözücüler ve sahip oldukları dielektrik sabitleri ve polarite indeksleri.....	56
Tablo 2.6	: Sokslet, ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) yöntemlerinin prosesi etkileyen çeşitli faktörler bakımından kıyaslanması	64
Tablo 3.1	: Mobil fazların beslenme oranlarına ait derecelenme program....	96
Tablo 3.2	: HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon program.....	101
Tablo 3.3	: Standartlara ait eğri denklemleri.....	101
Tablo 4.1	: Metanol ile 25 °C'de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *	108
Tablo 4.2	: Su ile 25 °C'de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *	108
Tablo 4.3	: Su ile 75 °C'de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *	109
Tablo 4.4	: Metanol/su (1/3:v/v) ile 25 °C'de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *	109
Tablo 4.5	: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi *	112
Tablo 4.6	: SC-CO ₂ ekstraksiyonu denemelerinde kullanılan işletme parametreleri ve seçilen değerler.....	115
Tablo 4.7	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (300 bar, 2 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi) *	115
Tablo 4.8	: SC-CO ₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (50 °C, 5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dak ekstraksiyon süresi) *	117
Tablo 4.9	: SC-(CO ₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dakika) *	120

Tablo 4.10	: SC-(CO ₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dakika) *	125
Tablo 4.11	: SC-(CO ₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (5 mL/dak CO ₂ akış hızı, 120 dakika) *	129
Tablo 4.12	: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO ₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen ekstrakt ve içeriğindeki oleuropein miktarlarının ayrı ayrı en iyi şartlarda karşılaştırılması *	136
Tablo 4.13	: Şubat ve Haziran aylarında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın toplam fenolik madde miktarı ve Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklardaki toplam fenolik madde miktarındaki azalma oranı *	140
Tablo 4.14	: 5 farklı bölgeden, Şubat ve Haziran aylarında toplanan Arbequina zeytin ağacı yapraklarına ait toplam fenolik madde miktarı ve Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklardaki toplam fenolik madde miktarındaki azalma oranı *	142
Tablo 4.15	: Şubat ayında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın fenolik bileşik miktarı (µg/mg taze yaprak) *	146
Tablo 4.16	: Haziran ayında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın fenolik bileşik miktarı (µg/mg taze yaprak) *	147
Tablo 4.17	: Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklarda bulunan başlıca fenolik bileşik miktarındaki azalma oranı.....	149
Tablo 4.18	: Şubat ayında 5 farklı bölgeden toplanan aynı türe (Arbequina) ait zeytin ağacı yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşik miktarı * ...	151
Tablo 4.19	: Haziran ayında 5 farklı bölgeden toplanan aynı türe (Arbequina) ait zeytin ağacı yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşik miktarı *	151
Tablo 4.20	: Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *	153
Tablo 4.21	: Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *	154
Tablo 4.22	: Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *	157
Tablo 4.23	: Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *	158

SEMBOL LİSTESİ

A	:	absorbans
I	:	çözeltiden çıkan ışık şiddeti
I₀	:	çözeltiye giren ışık şiddeti
N	:	veri sayısı
p	:	olasılık (probability)
P_{kritik}	:	kritik basınç
R²	:	regresyon katsayısı
T	:	transmitans
T_{kritik}	:	kritik sıcaklık
X	:	aritmetik ortalama
X_i	:	veri
σ	:	standart sapma

ÖZET

ZEYTİN AĞACI YAPRAKLARINDAN SÜPERKRİTİK-CO₂ İLE EKSTRAKT ELDESİ VE BİLEŞİMİNDEKİ OLEUROPEİN MİKTARININ İNCELENMESİ

Bu çalışmada zeytin ağacı (*Olea europaea*) yapraklarından farklı yöntemlerle ekstrakt elde edilmesi ve ekstrakt bileşimindeki oleuropein miktarının elde etme yöntemlerine göre incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ülkemizde (Menemen, İzmir) yetişen Memeli türü zeytin ağaçlarından toplanmış, kurutulmuş ve öğütülmüş yapraklardan klasik çözücü ekstraksiyonu, sokslet ekstraksiyonu ve süperkritik karbondioksit (SC-CO₂) ekstraksiyonu yöntemleri ile çeşitli işletme parametrelerinde ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların oleuropein içeriği sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyonu- kombine kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Zeytin ağacının türünün, coğrafi konumunun ve örnek alma zamanının yapraktan elde edilen ekstrakt içerisindeki toplam fenolik madde ve temel fenolik bileşiklere (oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit) etkilerinin incelendiği çalışma kapsamında, aynı yetiştirme koşulları altında ve aynı bölgede bulunan (San Antonio, Teksas) 25 farklı türdeki zeytin ağacı yaprağı ekstraktı ile dört farklı coğrafik konumda (San Antonio, Seadrift, Brazoria ve Santa Fe) yetişen aynı tür (Arbequina) zeytin ağacı yaprağı ekstraktı incelenmiştir. Fenolik madde profilinin mevsimsel olarak değişimini gözlemlemek için yapraklar Şubat ve Haziran aylarında olmak üzere iki farklı dönemde toplanmıştır. Elde edilen ekstraktlarda temel fenolik maddelerin analizi HPLC ile, toplam fenolik madde analizleri ise UV-Spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca bitkiler üzerindeki çevresel faktörlerin en önemlilerinden birisi olan su stresinin zeytin ağacı üzerindeki etkileri, ekstraktın içeriğindeki toplam fenolik madde ve aminoasit miktarları açısından incelenmiştir. İki farklı tür (Koroneiki ve Arbequina) zeytin ağacı, iki alternatif sıcaklık aralığında sera içerisinde gözlemlenmiştir.

Elde edilen bulgular, varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Zeytin yapraklarından oleuropein eldesi için SC-CO₂ ile ekstraksiyonda yardımcı çözücü türü ve miktarının verimi oldukça etkilediği görülmüştür. Zeytin ağacı türünün yapraktaki fenolik madde profilinde önemli farklılıklara yol açtığı bulunmuştur. Ancak toplam fenolik madde miktarının türler arasında çok farklı olmadığı ve soğuk hava koşullarında daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Su stresi altındaki ağaçların yapraklarından elde edilen fenolik madde ve aminoasit miktarlarında artış meydana geldiği görülmüştür.

SUMMARY

OBTAINING OF OLIVE LEAF EXTRACT WITH SUPERCRITICAL CO₂ AND INVESTIGATION OF THE OLEUROPEIN CONTENT IN THE EXTRACT

This study aimed to obtain extracts from olive tree (*Olea europaea*) leaves by means of different methods, and to investigate the oleuropein content in extracts with respect to these methods. For this purpose, dried and ground leaves picked from olive trees of Memeli cultivar (Menemen, İzmir) were extracted with conventional solvent extraction, soxhlet extraction and supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction methods in different operation conditions. The oleuropein content of obtained extracts was analyzed by using a liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) technique.

Within the scope of investigating the effects of olive tree cultivar, geographical location and sampling period on total phenolic content and main phenolic compounds (oleuropein, verbascoside, luteolin 7-*O*-glucoside and luteolin 4'-*O*-glucoside), 25 varieties of olive tree leaves cultivated in the same geographical area (San Antonio, Texas) under the same cultural conditions, as well as the same variety of olive tree (Arbequina) leaves cultivated in four different geographical areas (San Antonio, Seadrift, Brazoria and Santa Fe) were evaluated. In order to observe the phenolic profile regarding the season change, leaves were picked in February and June. The analysis of individual phenolic compounds and total phenolic content of the obtained extracts were performed by HPLC and UV-Spectrophotometry, respectively.

In addition, effects of water stress on olive trees, which is one of the most important environmental factor influencing plants, were investigated in terms of total phenolic compound and amino acid contents. Two different kinds of olive tree (Koroneiki and Arbequina) were observed in green house under two alternative temperature ranges.

The results were evaluated statistically by using analysis of variance (ANOVA) method. It was observed that the type and amount of co-solvent used in SC-CO₂ extraction has affected considerably the extraction efficiency. It was found that the olive tree cultivar leads to differences in phenolic compound profile. But the total phenolic content among the cultivars did not change with variety of trees and were found higher under cold weather conditions. Both total phenolic and amino acid contents of olive tree leaves increased by water stress.

1. GİRİŞ

Bitkisel ekstraktlar, taze veya kurutulmuş bir bitkinin meyvelerinden, yapraklarından, çiçeklerinden, odunlarından, reçinelerinden ve çekirdeklerinden çeşitli yöntemlerle elde edilen karmaşık karışımlardır. Hippocrates'e göre hasta bir insanı iyileştirmek için ilk olarak ruhsal tedavi uygulanmalıdır. Sonuç alınmadığı takdirde bitkisel tedaviye başvurulmalıdır. Son çare olarak ise hasta ameliyat edilmelidir [1]. Bu prensip çerçevesinde bahsedilen bitkisel tedavi yöntemi, günümüzde yerini etki kaynağı yine bitkiler olan ilaçla tedaviye bırakmıştır. Ancak bitkilerin içerdiği değerli bileşenlerin doğrudan veya farklı şekillerde izole edilerek tedavi amaçlı kullanıldığı alternatif tıp da günümüze kadar süregelmiştir. Bitkiler aleminin binlerce türünün herbirinin ayrı bir kimya laboratuvarı olduğu düşünülürse, yüzyıllardır birçok bitki hakkında yapılan araştırmaların sonuçları göz ardı edilmemelidir. Dünya sağlık teşkilatının (World Health Organisation, WHO) 91 ülke üzerinde yaptığı araştırmaya göre tedavi amaçlı kullanılan tıbbi bitkilerin toplam miktarı 20.000 civarındadır. Bunlardan 500 kadarının üretiminin yapıldığı kaydedilmektedir. Ayrıca değişik amaçlarla kullanılan bitkilerin çok azı farmokopilerde (kodeks) kayıtlıdır. Türk kodeksinde kayıtlı bitki sayısı 140 civarındadır. Halbuki halk arasında tıbbi amaçla kullanılan bitki sayısı çok fazladır [2]. Dünyanın gelişmiş ülkeleri özellikle tedavide bitkisel kaynaklara yönelmiş durumdadırlar. Tıbbi tedavide kullanılan ilaçların önemli bir kısmını doğal kaynaklı ilaçlar oluşturmaktadır. Doğal kaynaklı ilaçların kullanım oranı gelişmiş ülkelerde % 60, gelişmekte olan ülkelerde ise % 4 civarındadır. Bugün Türkiye florasında 9000'in üzerinde bitki türü olduğu kabul edilmiştir. Bu bitkilerin 1000 kadarı, ilaç ve baharat bitkileridir [3].

Antik çağlardan beri kullanılan ve bazı deneyimlerden sonra bulunan gıdaların dayanıklılığını artırma yöntemleri, aynı zamanda antioksidan olarak etkili bitkisel ürünlerin kullanımını kapsamaktadır. İlk olarak beslenme maksadıyla kullanılan bitkilerin tedavi edici özelliği daha sonradan keşfedilmiştir. Mısır papirüsleri, kişniş ve hintyağının tıbbi, kozmetik ve katkı maddesi olarak kullanıldığı binlerce reçeteden

bahsetmektedir. İbrani ve Çin yazmaları bugün çok faydalı olan 2000 bitkiyi detaylı olarak anlatmaktadır. Grek ve Roma İmparatorluklarında, bitkilerin tedavi edici özellikleri ile ilgili geniş bir süreç bulunmaktadır. 16. yüzyılda aromatik ve şifalı bitkileri sıcak suya koyan İsviçreli botanist Paracelsus, bitkilerin tedavi edici özelliğine önemli bir katkıda bulunmuştur. 19. yüzyılda ise Fransız araştırmacılar, parfüme olan talebin artması ile beraber araştırmalarını bitkiler üzerinde yoğunlaştırarak ekstrakt elde etmek için yeni prosedürler geliştirmişlerdir [1]. Birçoğu tesadüfen, birçoğu da merak sonucu denenerek etkileri anlaşılan doğal ilaçlar, kulaktan kulağa yayılarak herkes tarafından tanınmış ve yıllar geçtikçe daha farklı bitkilerin başka dertlere de deva oldukları anlaşılmıştır. Diğer bir gelişme de bu bitkilerin, beslenmede lezzet, koku, tad verici ve iştah açıcı özelliklerinin anlaşılması ve kullanımının yaygınlaşması suretiyle olmuştur.

Doğal antioksidan aktivitelerinden ötürü bitkilerdeki polifenollerin tayini çok önemlidir. Bitkiler, fenolik komponentleri mikroorganizma ve güçlü ultraviyole (UV) radyasyonuna karşı bir savunma mekanizması olarak sentezlemektedirler ve güçlü antioksidan özellik göstermektedirler. Antioksidanlar, yağ ihtiva eden gıdalara tatsızlığın ve lipid oksidasyonundan ileri gelen toksik bileşenlerin oluşmasının önlenmesi için ilave edilmektedir [4-8]. Yani oksidasyon reaksiyonları yiyeceklerde yalnızca vitamin ve tat kaybına neden olmazlar, aynı zamanda serbest radikaller gibi oksitleyen ürünler oluşturmaktadırlar ve bu radikaller istenmeyen kimyasal reaksiyonları başlatmaktadırlar. Bu oto-oksidasyon reaksiyonlarını önlemek için veya bunlardan kaçınmak için, antioksidanlar uzun yıllardır kullanılmaktadır. Ayrıca, kalp ve damar rahatsızlıkları, kanser, yaş ve bağışıklık sistemi ile ilgili rahatsızlıklar gibi belirli hastalıkların asıl sebebinin serbest radikaller olduğu bilinmektedir. Doğal antioksidan maddeler bu serbest radikallerin zararlı etkilerini yok ederek kronik rahatsızlıklara karşı da potansiyel faydalar sağlamaktadır [9, 10]. Ancak sağlıklı beslenme konusunda giderek artan bir bilinçlenme ve son yıllarda yapay antioksidanların toksik etkilerinin anlaşılmasıyla, kullanımlarında sınırlamalar getirilmesi sonucu doğal antioksidanlar yoğun bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır. Burada belirtilmesi gereken bir diğer önemli ayrıntı ise, kimyasal antioksidanlara karşı söz konusu olan bu endişe sadece gıda değil, kozmetik ve ilaç endüstrileri için de geçerli olduğudur. Dolayısıyla bu üç sektör bir araya gelerek “fonksiyonel gıda”, “gıda

takviyeleri” ve *“nutrosötikler*” olarak bilinen ürünler üzerinde yoğunlaşmışlardır [11]. Ayrıca polifenoller, yüksek antioksidatif özellikleri yanında antimikrobiyal, antiviral ve enfeksiyon giderici özelliklere de sahiptirler [12-14].

Doğal bitki ekstraktları Amerika, Avrupa ve Uzak Doğu’da pazarı sürekli büyüyen yüksek katma değerli ürünlerdir. Türkiye’de çok sayıda endemik bitki bulunmakta ve büyük bir kısmı ticari olarak değerlendirilememektedir. Ülkemizden hammadde olarak ihraç edilen bazı bitkilerin, bu ülkelerde ekstraksiyonu yapılmakta ve esas katma değer ülke dışında kalmaktadır. Bitkisel özüt eldesine yönelik ideal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ilaveten bir saflaştırma gerektirmemeli ve atık çözücü içermemelidir. Klasik çözücü ekstraksiyonu basit, ucuz ve kuramsal olarak yerleşmiş bir yöntem olarak düşük sıcaklıklarda elde edilebilen, sıcaklığa duyarlı maddelerin elde edilmesinde tercih edilebilir olmasına rağmen, bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Bunların en başında yüksek ısı ve çözücü gereksinimi gelmektedir. Genelde çevre, sağlık ve güvenlik açısından zararlı çözücüler kullanılmaktadır. Kullanılan ısı ve çözücüler ürün kalitesini etkilemekte, dolayısıyla ısıl bozunmaya uğrayan hassas maddelerin ekstraksiyonu için geleneksel çözücü ekstraksiyonu uygun bir metod olmaktan uzaklaşmaktadır. Ayrıca ekstraksiyondan elde edilen ürün seyreltiktir. Hedef ürünün çözücünden ayrılıp derişiklendirilmesi için ek bir ayırma işlemine gerek duyulmaktadır. İşlem süresi uzun ve maliyeti yüksektir. Ekonomik ve farmakolojik öneminden ötürü değerli olan ve diğer yandan ışıık, oksijen, pH ve sıcaklık etkilerine karşı bir o kadar da duyarlı bileşiklerin elde edilmesinde çözücü ekstraksiyonu bu haliyle yetersiz kalmaktadır. Polifenoller gibi az miktarda bulunan, ama çok değerli olan maddelerin şeker, protein veya metaller gibi çok çeşitli kimyasal bileşenin yer aldığı karmaşık canlı organizmalardan ekstrakte edilmesi süresince, en az kayba uğrayarak elde edilmesinde hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak süperkritik akışkan ekstraksiyonu (Supercritical Fluid Extraction, SFE) yöntemi literatürde önerilmiştir [4, 6-9, 15-29].

Diğer taraftan, bitki ekstraktlarının süperkritik akışkanlar ile ekstraksiyonu hakkında yapılan araştırmaların sınırlı olması nedeniyle bir standardizasyon eksikliği de bulunmaktadır [30, 31]. Doğal maddelerin katı yapısına sıkı bağlarla bağlanan

solutenin süperkritik şartlardaki çözücü ile etkileşimini tahmin etmek son derece zor olmaktadır. Dolayısıyla doğal maddelerin süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilmesi hususunda daha yoğun araştırmalar yapılmalıdır. Biyoaktif bileşenlerin kazanımını optimize etmek için ekstraksiyon prosesini etkileyen parametreler araştırılmalıdır. Ayrıca bitkisel gıdaların yan ürünleri ile, atıkları son derece değerli olan biyoaktif maddelerden ekstrakt geri kazanımı, elde edilebilirliği kolay ve hiçbir ekonomik değeri olmayan kaynakların değerlendirilmesi açısından da önemli bir hizmet haline gelmiştir. Bu şekilde atık tasfiyesinin azaltılması hem ekonomik hem de ekolojik açılardan kazançlı olmaktadır [9, 11, 12, 32].

Zeytin ağacı yapraklarında bulunan başlıca polifenolik bileşen olan “*oleuropein*”, çoğu araştırmacılar tarafından zeytin yaprağının tedavi edici özelliğinden sorumlu ana komponent olarak kabul edilmektedir. Zira bu bileşiğin bozulma ürünleri dahi biyolojik olarak aktif maddelerdir. Oleuropein, doğal antioksidan özelliğinden dolayı birçok medikal müdahalede de kullanılmaktadır. Antioksidatif özelliğine ilave olarak virüs, bakteri, maya, mantar, küf ve diğer parazitlere karşı antimikrobiyal etkiye de sahiptir.

Bu çalışmada, Türkiye’de zirai ve ekonomik açılardan önemli bir bitki olan zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprağı araştırma materyali olarak seçilmiştir. Zira zeytin ağacı, sadece meyvesi ile değil; yağı, dalı, kökü ve yaprağı ile de çok değerlidir. Hatta son zamanlarda yapılan çalışmalar zeytin yaprağının biyoaktif bileşenlerce, zeytin yağı ve meyvesi ile kıyaslanacak seviyede zengin olduğunu göstermektedir. Hasat edilen zeytinin toplam ağırlığının % 10’unu kapsayan zeytin yaprağı, değerlendirilmediği takdirde zirai bir atık olarak kalmaktadır. Bu yan ürünün ekonomik ve farmakolojik önemi göz önünde tutularak içeriğindeki değerli maddelerin daha verimli bir şekilde elde edilebilmesi için uygun ekstraksiyon metodları teşhis edilmelidir. Çünkü, numunenin hazırlanışı ve uygulanan ekstraksiyon prosedürü bitki dokusunda mevcut ikincil metabolitlerin orijinal yapısını değiştirebilmektedir [33-37].

Ekstrakt içerisindeki fenolik madde miktarını örnek hazırlama şartları ve uygulanan elde etme yöntemleri dışında zeytin ağacının cinsi, hasat dönemi, çevresel ve iklimsel koşullar, bitki hastalıkları, toprak çeşidi, coğrafik bölge, olgunluk, nem içeriği gibi pek

çok faktörün etkilemesi söz konusu olduğundan, belirli bir bileşen elde edilirken uygun zeytin ağacı türünün seçilmesi unutulmamalıdır [38-44].

Araştırma materyali olarak kullanılan yaprakların alındığı zeytin ağaçlarının çevresel faktörler karşısında gösterdiği tepkiler de içeriğindeki bileşenlerin dağılımını oldukça etkilemektedir. Su stresi (water stress), bu faktörlerin en önemlilerinden birisidir. Zeytin ağaçlarının su stresi karşısında göstermiş oldukları tepkiler, yapraklarının içerdiği fenolik madde ve aminoasit miktarlarında ortaya çıkmaktadır. Su stresi altında gözlenen fenolik madde ve aminoasit miktarlarındaki artış, bitkiyi sulama programları ve kuraklığa dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi açısından bir değerlendirme parametresi olarak kabul edilebilmektedir. Suyun kısıtlı olduğu ya da maliyetinin yüksek olduğu durumlarda bitkinin su stresinden en fazla etkilendiği dönemin bilinmesi yine sulama programı açısından önemlidir [45-50].

Bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen bu tez çalışmasının amaçları şu şekilde sıralanabilir:

- Ucuz, kuramsal olarak yerleşmiş, basit bir katı – sıvı ekstraksiyon prosedürü ile zeytin yapraklarının ekstraksiyonunda çözücü olarak kullanılan maddelerin ve dengeye gelme zamanının, ekstraksiyon performansına ve içeriğinde en bol bulunan biyolojik olarak aktif, farmakolojik olarak türlü etkileri olan oleuropein bileşiğinin miktarına etkilerini gözlemlemek,
- Sokslet yöntemi ile ekstrakte edilen zeytin yapraklarından elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına farklı çözücü türlerinin etkilerini incelemek,
- Zeytin yapraklarını yardımcı çözücü (su, etanol, metanol gibi) varlığında süperkritik CO₂ (SC - CO₂) ekstraksiyonu ile ekstrakte etmek ve bu yöntemde kullanılan çeşitli işletme parametrelerinin (yardımcı çözücü miktarı, basınç ve sıcaklık) ayrı ayrı ekstrakt ve oleuropein verimlerine etkilerini incelemek,
- SC - CO₂ ekstraksiyonundan elde edilen bulguları sokslet metodu ile elde edilenlerle kıyaslamak,
- Farklı zeytin ağacı türlerinden toplanan zeytin yapraklarının içeriğindeki fenolik madde profilini analiz etmek suretiyle zeytin ağacı türünün ekstrakt bileşimi üzerindeki etkisini görebilmek,

- İki farklı dönemde (Şubat ve Haziran ayları) aynı zeytin ağaçlarından toplanan yaprakların fenolik madde profilinin mevsimsel olarak nasıl değiştiğini izlemek,
- Aynı tür zeytin ağaçlarından toplanan yaprakların fenolik madde miktarına coğrafi konumun etkilerini gözlemlemek,
- Çevresel faktörlerin en önemlilerinden biri olan su stresinin zeytin ağaçlarına etkisini görebilmek için su stresi karşısında göstermiş oldukları tepkileri, yapraklarının içerdiği fenolik madde ve aminoasit miktarları cinsinden ifade ederek göstermek,
- Su stresi altında farklı tür zeytin ağaçlarını sera koşullarında gözlemleyerek yapraklarındaki toplam fenolik madde ve aminoasit miktarlarının değişimini incelemektir.

Doğal bitkisel ilaçlara olan yoğun yönelim ve kozmetik sanayindeki büyük gelişmeye bakarak, elimizde bulunan düşük maliyetli ve yüksek elde edilebilirliğe sahip çok önemli bir hammadde olan zeytin yaprağının ciddiyetle farkına varıp, bu konuda çalışmalar yapmanın gereği ortadadır. Özet olarak bu çalışmayla ülkemizde büyük bir ticari değeri olan zeytin ağaçlarının yapraklarından ekstrakt elde edilerek ülkemiz ekonomisine katkıda bulunmak amaçlanmaktadır. Diğer taraftan, biyoaktif bileşenlerin kazanımını optimize etmek için ekstraksiyon prosesini etkileyen parametreler irdelenerek, bitki ekstraktlarının süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile eldesi hakkında yapılacak olan diğer çalışmalara da ışık tutarak bu konularda yapılacak araştırmalara katkı sağlanması da yine bu tez çalışmasının hedefleri arasında yer almaktadır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BİTKİSEL EKSTRAKTLARIN ÖNEMİ

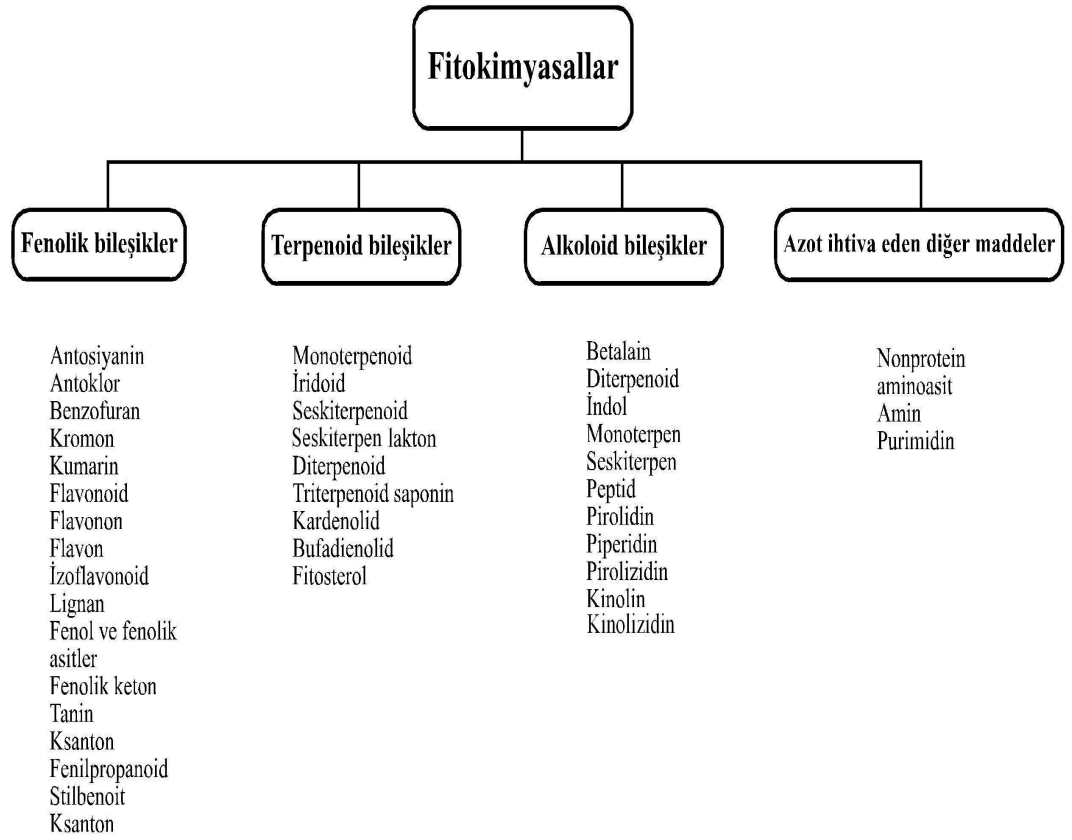
Günümüzde gıda, farmasötik ve kozmetik endüstrilerinde doğal ürünlere duyulan ihtiyaç konusunda, daha önce olduğundan çok daha fazla bir duyarlılık mevcuttur. Bu durum, tüketicilerin sağlık ve çevre konusunda artan ilgilerinin bir sonucu olarak ortaya

çıkması olup, birçok bitki, sebze ve meyvede bulunan doğal ekstraktların çeşitli hastalıkları önlediği, rehabilite ettiği ve yaşlanmayı geciktirdiği de ayrıca bilimsel olarak gözlemlenmiştir. Son yıllarda artan hastalıklara karşı sentetik yapılı ilaçların yetersiz kalması ve yan etkilerinin saptanması doğal ürünlere karşı bir eğilime zorlamıştır. Bu amaçla birçok bitki antioksidatif, antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri bakımından farmakolojik yönlerden çok yönlü olarak araştırılmaktadır. Metabolizmaya yararlı, hastalıklardan korunmaya yardım eden fonksiyonel gıdalara olan ilgi de her geçen gün biraz daha fazla artmaktadır.

Bitkisel ekstraktlar içeriğinde fitokimyasallar ile fonksiyonel gıdalar ve nutrosötikler olarak isimlendirilen, bağışıklık sistemini güçlendiren, hatta gıda takviyesi olarak da kullanılabilen türlü maddelerden oluşmaktadır. Bu tür maddeler geleneksel formlarda sunulabildiği gibi tablet ve kapsül gibi formlarda da tüketilmektedirler. Fonksiyonel gıdalar, doğal antioksidanlar, lifli yapılar gibi fitokimyasallardan oluşmaktadır. Özellikle meyve ve sebzelerde bulunan fitokimyasallar, insan vücudundaki serbest radikaller ile birleşerek, hücreleri zararlı radikallerin saldırılarından korumaktadırlar.

2.1.1. Fitokimyasallar (Bitki kimyasalları)

Fitokimyasallar, makrobesinler denilen karbohidrat, yağ ve proteinler ile sağlığımız için gerekli olan 13 adet vitamin ve 17 adet mineralin dışında olan bitkisel kaynaklı, çoğunlukla polifenollerden oluşan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Bitkilerin içinde bulunan bu kimyasallar meyvelere, sebzelere, tahıllara ve baklagillere renk ve lezzet veren, hastalıklara karşı doğal korumayı sağlayan, sağlığı geliştirici besinlerdir. Fizyolojik ve morfolojik özelliklerinden ötürü sentetik antioksidanlara alternatif olarak görülmektedirler [51]. Fitokimyasallar fenolik bileşikler, terpenoid bileşikler, alkaloid bileşikler ve azot ihtiva eden diğer maddelerden oluşmaktadır (Şekil 2.1) [52].



Şekil 2.1: Fitokimyasalların sınıflandırılması

2.1.2. Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrosötikler

Fonksiyonel gıda ve nutrasötik terimleri, tek veya karışım halde bulunan bir veya birden çok bitki kimyasalının bir gıda ürününün bileşimine girerek, destek veya sinerjistik etkiyle kronik hastalıkların gelişiminde koruyucu, önleyici ve muhtemelen tedavi edici etki göstermesi olarak ifade edilmektedir. Bu maddelerin yararları hayvan ve izole organ deneyleri, epidemiyolojik ve klinik çalışmalarla ortaya koyulmaktadır [53]. Yani bu gıdalarla ilgili sağlık iddiaları kesin bilimsel kanıtlara dayandırılmalıdır.

Nutrasötik ve fonksiyonel gıda terimleri sık sık birbirlerinin yerine kullanılsa bile, nutrasötik hem alışıla gelmiş hem de farklı (tablet, kapsül, vs.) gıda ve gıda bileşenlerini

tarif ederken, fonksiyonel gıda geleneksel gıda formlarını ifade etmektedir. Nutrasötik, hastalıkların tedavisinde veya önlenmesinde sağlığa yararları bilimsel olarak ispatlanmış, toksik olmayan, herhangi bir gıda desteğidir. Fonksiyonel gıda ise hastalık riskini azaltan ve sağlık üzerinde yararlı etki gösteren besin maddesidir [53].

Fonksiyonel gıdalar kesinlikle,

- İlaç, kapsül veya herhangi bir diyet desteği formuna sahip olmamalıdır.
- Bilim dünyası tarafından etkileri onaylanmış olmalıdır.
- Beslenme bakımından yeterli olmanın yanı sıra, vücutta bir veya birden fazla fonksiyon üzerine iyi olma halini sağlama ve/veya hastalık riskini azaltma gibi olumlu etkilere sahip olmalıdır.
- Normal gıda tüketim modelinin bir parçası olmalıdır.

2.1.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler ya da öteki ismiyle polifenoller, bitkiler aleminde en yaygın bulunan maddeler gurubunu oluşturmaktadırlar. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerde fotosentez sonucu oluşan karbonun % 2'si fenolik bileşiklere dönüşmektedir. Bu dönüşümün aromatik aminoasit metabolizması sırasında gerçekleştiği varsayılmakta ve bu nedenle fenolik bileşikler, bitkilerde ikincil (sekonder) metabolit olarak adlandırılmaktadırlar. İkincil metabolitler proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar, yağlar ve kofaktörler gibi birincil metabolitlerden farklıdır. Birincil metabolitler, organizmanın büyüme ve gelişmesi için gerekli olan metaryellerin sentezinden sorumludurlar. İkincil metabolitler ise sınırlı bir dağılım gösterirler ve metabolizmada belirgin bir görevleri yoktur [54]. “Polifenolikler” terimi fonksiyonel türevler içeren hidrosil (-OH) gruplarıyla, dallanmış aromatik benzen halkaları içeren bileşikler olarak tanımlanmaktadır. Buna göre en basit fenolik bileşik, bir tane hidroksil grubu içeren benzen, yani fenoldür. Diğer tüm fenolik maddeler bundan türemişlerdir. Fenoller oda sıcaklığında renksiz bir sıvı ya da beyaz bir katı halinde bulunurlar [55]. Günümüzde bitkisel kaynaklarda olduğu bilinen doğal fenolik bileşikler 8000'den fazladır. Bu bileşiklerin en yaygın ve en bilinen grubu 4000'den fazla sayısı ile flavonoidler ve onların türevleridir [56, 57].

Fenolik bileşikler büyüme ve çoğalma, patojenlere karşı korunma gibi olaylarda önemli rol oynamalarının yanında; meyve ve sebzelerin kendilerine özgü renklerinin ve duyuşal özelliklerinin oluşumunda da etkilidirler. Renk, acılık, burukluk, tat, koku ve ürünün oksidatif stabilitesine etki edebilmektedirler. Besinsel fonksiyonu olmamasına rağmen gıdalardaki fenoliklerin sağlık üzerine olumlu etkilerinin olduğu pek çok defa kanıtlanmıştır. Fenolik maddeler antioksidan özelliklerinden ötürü radikal toplayıcı olmalarının yanında, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antitrombotik, antihipertansif ve hipoglisemik özellikleri de bilinmektedir. Belkide fenolik bileşiklerin en eski tedavi uygulaması fenolün antiseptik olarak kullanılmasıdır. Bugün bile % 1.4 konsantrasyonundaki fenol oral anestezide uygulanmaktadır. Fenolik bileşiklerin bir diğerk çok sık uygulama alanı ise güneş kremleridir. Fenolik yapıda bulunan aromatik halka, güneşten gelen UV radyasyonunun (280 ile 315 nm arasındaki) absorbe edilmesini sağlayarak güneş yanıklarını önlemektedir [55].

2.1.4. Fenolik Bileşiklerin Antioksidan Aktivitesi

2.1.4.1. Serbest Radikaller

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağın yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça kararlıdır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır) ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğesine). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Yani çok daha genel bir tanım yapılacak olursa ortaklanmamış elektron içeren atom, atom gurubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Serbest radikaller katyon, anyon veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Serbest radikaller yaşam için gereklidir. Elektron transferi, enerji üretimi ve pek çok diğerk metabolik işlevde temel oluştururlar. Ama eğer zincir reaksiyonu kontrolsüz bir davranış gösterirse hücrede hasarlara neden olmaktadır.

Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki oksijene gereksinim duymaktadırlar. Anaerobik canlılardaki oksijenin toksik etkisinin nedeni, reaktif oksijen türlerine karşı savunma sisteminin bulunmamasıdır. Oksijen sadece anaerobik türlerde değil, yaşamları için mutlaka moleküler oksijene bağımlı olan canlılarda da toksik etkili olabilmektedir.

Oksijenin canlılardaki toksik etkileri başlıca iki tür mekanizma ile gerçekleşmektedir:

- Moleküler oksijenin bazı enzimleri inhibe etmesi
- Serbest oksijen radikalleri

Yani metabolik işlemler esnasında geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^+ gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektronların transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelmektedir. Moleküler oksijen, yüksek derecede süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) ve nitrik oksit (NO) radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir [53, 58-60].

Vücutta üretilen radikaller her zaman tehlikeli kimyasal türler olarak değerlendirilmemelidir. Oksijenin biyokimyasal tepkimelerde kullanılması için reaktif formlarına çevrilmesi zorunludur. Steroid yapıdaki çok sayıdaki bileşiklerin, eikozanoidler gibi biyolojik aktif moleküllerin sentezi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, çok sayıdaki oksidaz ve hidroksilaz enzimlerinin etkileri için sitotoksik etkilere sahip hücrelerin fonksiyonları için radikal yapımı olmazsa olmaz bir koşuldur.

2.1.4.2. Oksidatif Stres

Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla ROT meydana gelmesi oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Hücrede oluşan ROT, antioksidan savunma sistemleri tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Ancak bazen sigara, alkol, virüsler, güneş ışınları, X ışınları ve kozmik ışınlar, sanayi atıkları,

otomobil egzoz gazları, ozon, ağır metaller, kirli su ve hava gibi dış etkilerin varlığı ile organizmada bulunan bu oksijen türleri gerekenden fazla miktarda bulunur ve hücrel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldan daha fazla reaktif oksijen oluşabilir. Aynı zamanda aktive olmuş fagositler stres sonucu biyolojik olarak üretilmektedirler.

Serbest radikallere bağlı hücre hasarı şu şekillerde gerçekleşebilmektedir:

- *Membran lipidlerinin peroksidasyonu:* Hücre membranının stabilizasyonunu bozar.
- *Disülfid bağı oluşumu:* Proteinlerin konfigürasyonlarını bozarak vücuttaki metabolik aktivitelerini engeller.
- *DNA hasarı:* Serbest radikal etkisiyle DNA'nın yapısının değişmesi mutasyonlara ve hatta canlının eşey hücrelerindeki mutasyona bağlı olarak döllerin ölmesine neden olur.

Yukarıda belirtilen sebeplerden ötürü serbest radikallerin miktarı arttıkça önce yaşlanma hızlanır, hücre ölümü, sonra doku ölümü daha sonra ise beyin damarlarının tahribatına varan hasarlar oluşur. Serbest radikallere bağlı hastalıklar üç başlık altında toplanabilir:

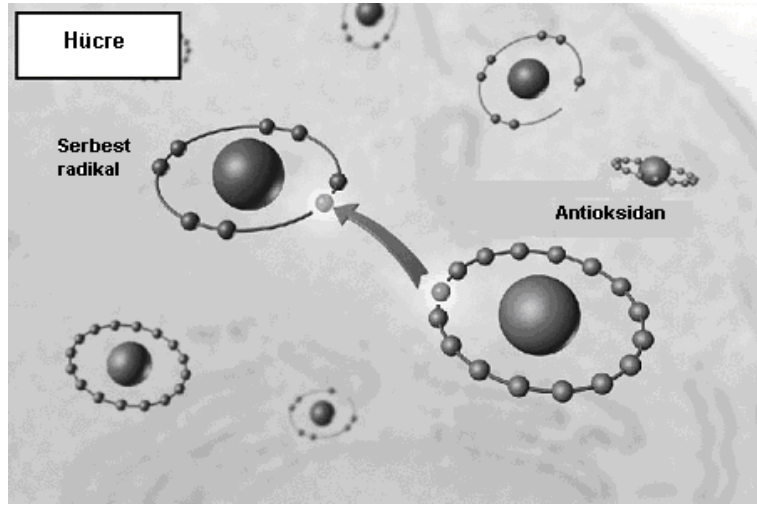
- Genetiğe bağlı (Fanconi's anemisi, bloom sendromu, down sendromu)
- Çevresel bileşenler (meslek hastalıkları, zehirlenmeler, virus ve bakteriyel enfeksiyonlar)
- Hem genetik hem de çevresel (bronşiyal astım, şeker hastalığı, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diğerleri)

2.1.4.3. Antioksidan Savunma Mekanizması

Vücutta oluşan serbest radikallerin inaktivasyonu antioksidan adı verilen savunma mekanizmalarıyla gerçekleştirilmektedir. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidatif hasarı engelleyen veya geciktiren veya etkisini azaltan maddelerdir [55]. Organizmayı

oksidatif etkilere karşı dengede tutabilmek için gerekli olan endojen ve ekzojen antioksidanların toplam etkisi antioksidan kapasiteyi oluşturmaktadır.

Antioksidanlar hidrojen atomu vericisi olarak etki gösterirler ve zincir oluşturan radikalleri daha az reaktif türlere dönüştürürler (Şekil 2.2) [61].



Şekil 2.2: Serbest radikalın nötralizasyonu

Tipik olarak bu olay, serbest radikallerin radikal olmayan moleküle nötralizasyon işlemi esnasında antioksidan moleküllerinin serbest radikale dönüşmesi anlamına gelmektedir. Fakat radikale dönüşen antioksidan molekülü genellikle nötralize olmuş serbest radikalden daha az reaktiftir. Antioksidan molekülü çok büyük olabilmektedir, başka bir antioksidan tarafından kolayca nötralize olmuş olabilir ve/veya kendi serbest radikal durumunu yok etmek için kendinde başka bir mekanizmaya sahip olabilir [62]. Zayıf bağlı hidrojen atomlarına sahip moleküller serbest radikalleri nötralize etmek için bu hidrojen atomlarını elektron gibi kullanabilmektedirler. Hidrojen atomları indirgeme eşdeğerleri diye adlandırılırlar ve bu hidrojenlere sahip moleküller indirgenmiş düzeydedirler.

Bu şekilde oluşan antioksidan radikali oksijen atomu ile aromatik halka üzerindeki çiftleşmemiş elektronun yer değiştirmesiyle stabilize olur. Bu nedenle antioksidan moleküller yapılarında genellikle fenolik grup taşırlar.

ROT besinlerin bozunmalarına da yol açmaktadır. ROT ve antioksidan savunma sistemlerinin dengesizliği biyolojik olarak ilgili makro moleküllerde kimyasal değişikliklerle sonuçlanabilmektedir. Bu değişiklikler üretim, proses, depolanma ve tüketiciye ulaştırılması sırasında, özellikle besinlerin ana bileşenlerinden birisi olan yağların bozunmalarına yol açarak tat, koku, görünüş, besleyici değerlerinin düşmesi ve zararlı kimyasal maddelerin oluşması gibi istenmeyen fiziksel ve kimyasal değişimler şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu dengesizlikler pek çok hastalığın başlangıç ve gelişimi için uygun pato biyokimyasal mekanizma sağlamaktadır. Antioksidanların beslenmedeki rolü ise diyetin temel bir maddesi olan lipidlerin oksidatif bozulmasını önleme yoluyla gıda kalitesini korumaktır.

Doğal antioksidan kaynaklarını genel olarak bitki fenolik maddeleri oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu maddeler insan metabolizmasında ve gıdalardaki savunmalarının yanında bitkinin kendisini de radyasyon ve çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlara karşı korumaktadırlar. Oluşan radikal yeni bir serbest radikal oluşumunu başlatmamalı veya zincir reaksiyonu ile hızlı bir oksidasyona maruz kalmamalıdır. Bu yönden fenolik antioksidanlar mükemmel H^+ ve e^- donörlerdir. Oluşan fenoksi radikali aromatik halka etrafındaki çitleşmemiş elektronların lokalizasyon değişiklikleri ile dengelenmektedir. Ayrıca antioksidan etki, fenol halkasında - OH grubu sayısı arttıkça artmakta ve aynı bileşikte ise bu etki meta -, orto -, ve para - sırası ile yükselmektedir.

2.1.5. Fenolik Bileşiklerin Antimikrobiyal Aktivitesi

Bakteriler, bir hücreli ve hücre çekirdeği olmayan prokaryot canlılardır. Genellikle bitki ve hayvanlar üzerinde parazit olarak yaşamaktadırlar. Dünyadaki atık maddelerin ortadan kaldırılmasına, madde döngüsünün gerçekleşmesine ve kullandığımız birçok ürünün (mayalama) oluşumuna neden olmalarının yanında, birçoğu da önemli hastalıkların nedenini oluşturmaktadır. Bölünerek çok hızlı bir şekilde üremektedirler. Hastalık yapan bakterilere de halk arasında mikrop denir. Bakteriler, çeşitli şekillerde hastalık belirtilerine neden olabilirler. Eğer vücudun savunma mekanizması karşı koyamazsa, aşırı derecede sayıları artan bakteriler konak dokusunda mekanik bir baskı

oluşturmaktadırlar. Çoğalma hızları vücudun bağışıklık sisteminin kapasitesini aşarsa sonuç son derece tehlikeli hale gelebilir. Sayıları milyarları bulduğunda vücudun dokularına zarar verirler ve mikro toksin denilen bir türü üretirler ki bu daha da tehlikeli bir durumdur. Bakteriler, değişen koşullara ve ortama hemen uyum sağlamaktadırlar. Çok hızlı şekilde üremeleri genetik mutasyonları meydana getirerek türlü antibiyotik ilaçların etki göstermemesine sebebiyet vermektedir [63, 64] Virüsler ise bakterilerden daha küçük, çoğalmak için başka bir hücreye girmek zorunda olan varlıklardır. Kendi başlarına bir metabolizmaya sahip değildirler. Konakladıkları hücrenin dışında kristal halde bulunurlar. Ancak canlı bir hücreye girdiklerinde kendi kalıtsal malzemelerini o hücreye kopyalattır. Bu işlemler için hücrenin organellerini kullanırlar. Böylece çoğalırlar ve hücreden çıkarlar. Genellikle hücreyi parçalayarak dışarı çıkarlar. Virüsler kan, tükürük ve beden sıvıları, hapşırma ve öksürme gibi yollarla bulaşan AIDS, grip, sarılık ve uçuk gibi hastalıklara yol açarlar.

İnsan bağışıklık sisteminin patolojik organizmalar tarafından istilası her geçen gün biraz daha artmaktadır. Dolayısıyla, her geçen gün daha da güçlü antibiyotikler geliştirilmektedir. Fakat bu organizmalar, bilim adamlarının yeni bir antibiyotik geliştirmesinden çok daha hızlı bir şekilde mutasyona (kalıtsal değişim) uğramaktadırlar. Bağışıklık sisteminin kendisi de mutasyona uğrayarak, eski antibiyotiklere karşı duyarsızlaşmaktadır. Araştırmalara göre, kalp rahatsızlıkları ve kanserden sonra üçüncü sırada olan enfeksiyonel hastalıklar sonucu ölüm oranı 1980 yılından 1992'ye kadar % 58 oranında artmıştır. Dünya sağlık örgütü (WHO), bitkilerle olduğu gibi geleneksel iyileştirme yollarını tavsiye etmektedir. Bu sebeple, bilim dünyasında bitkisel ekstraktlar gibi doğal ürünlere doğru giderek artan bir merak hızla yükselmektedir [63].

Fenolik bileşiklerin virus ve bakterilere karşı etkileri şu şekilde sıralanabilir:

- Özel virus hücrelerini etkisiz hale getirerek ya da bulaşmalarını, gelişmelerini önleyerek hücre membranı üzerinde yayılmalarını ve/veya virütik enfeksiyonları engellemektedirler,
- Çeşitli mikropların hayatta kalabilmesi için gerekli olan belirli aminoasitlerin üretimini önlemektedirler,

- Enfeksiyona uğramış insan hücresine direkt girerek daha ileri mikrobiyal üretimin olmasını engellemektedirler,
- Bağışıklık sistemini uyarak çeşitli mikroplarla mücadele etmesini sağlamaktadırlar [64].

Bahsedilenlerle beraber gıda endüstrisinin de temel hedeflerinden birisi gıda bozulmalarını önlemek ve gıda güvenliğini sağlamak maksadıyla gıda içerisindeki mikroorganizmaları kontrol altına almaktır. Bunun için ısıtma işlemleri, dondurma, kurutma ve ışınlama gibi türlü yöntemlerden faydalanılmaktadır. Fakat bu yöntemlerden ısıtma işlemleri gıdaların besleyici özelliğini kaybetmesine yol açabilmektedir. Diğer yöntemlerin de maliyetli olması söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle ürünlere katkı maddesi ilave edilerek mikrobiyal aktivitenin azaltılması yoluna başvurulmalıdır. Bu şekilde ürünlerin ambalajı açıldıktan sonra da stabilitesi uzun süre muhafaza edilebilmektedir. Gıdaların saklanması yüzyıllardır kullanılmakta olan tuz ve çeşitli baharatlar bu durumun açıklamasında çok önemli bulgulardır.

Ayrıca sanayileşmiş ülkelerde nüfusun % 30'undan fazlası gıda kaynaklı hastalıklardan muzdariptir. Bu durumun önüne geçebilmek için gıdalarda sentetik katkı maddeleri kullanılmaktadır. Bunun yanında WHO, kardiyovasküler hastalıkların oluşumunu önleyebilmek adına gıdaların bozunmaması için kullanılan tuzun azaltılması konusunda yetkililere çağrıda bulunmaktadır. Tuz miktarının azaltılması, koruyucu katkı maddelerinin kullanımını gerektirmektedir. Bu nedenle, gıdaların emniyeti açısından antimikrobiyal katkı maddesi olarak fenolik bileşenlerin ilave edilmesi söz konusu olabilmektedir [65].

2.2. ZEYTİN AĞACI

Zeytin ağacı dünya üzerinde ekili ağaçlar içerisinde en eski olanlardan birisidir. Öyle ki üç büyük dinin kutsal kitaplarında bereket, barış, akıl, uzun ömür ve olgunluğun simgesi olarak adından söz ettirmektedir. Kullanımı olimpiyat oyunlarında kazananların zeytin

yaprakları ile taçlandırıldığı antik dönemlere kadar uzanmaktadır. Yüzyıllardır barışın, selametın ve bolluğun sembolüdür. Zeytin dalı, Birleşmiş Milletler'in resmi olarak barış sembolüdür [63].

Zeytin ve diğer ürünleri İspanya, İtalya, Fransa, Yunanistan, İsrail, Cezayir, Tunus, Türkiye ve Akdeniz adalarında geleneksel ilaçlar olarak nesilden nesile aktarılmıştır. Günümüzde ise zeytin bitkisi, meyvesi ve yağı açısından çok önemlidir. Arap yarım adası, Hindistan alt kıtası ve Asya'da da yaygın olmasına rağmen, dünya zeytin mahsülünün yaklaşık % 98'ini (yaklaşık 11 milyon ton) Akdeniz bölgesi karşılamaktadır. Son yıllarda Avusturalya'da da zeytin yetiştiriciliği gelişmekte ve subtropikal iklime en uygun türlerin belirlenmesi maksadı ile araştırmalar yürütülmektedir [66]. Yaprğından çekirdeğine çok faydalı olan zeytin ağacının odunu da çok değerlidir. Çürümeye karşı son derece dayanıklıdır. Sert ve parlak odunu damarlarının güzelliğı nedeni ile eski çağlarda heykel yapımında kullanılmış ve bugün de mobilya yapımında kullanılmaktadır.

2.2.1. Zeytin Ağacının Tarihçesi

Zeytin yaprağı fosilleri ve çekirdek kalıntıları üzerine yapılan çalışmalar bizi yaklaşık 50.000 yıl geriye götürmektedir. Söylenceler ve efsaneler bir yana, zeytin ağacının anavatanının neresi olduğuna dair kesin bir şey söylenememektedir. Bazılarına göre Anadolu, Suriye ve İran; bazılarına göre Girit, Yunanistan; kimilerine göre ise Kuzey Afrika, Atlas Dağları, Aşağı Mısır olduğu iddia edilmektedir. Bu konuda arkeobotanikçiler, tarihçiler ve arkeologlar arasında bir görüş birliğı bulunmamaktadır [67, 68]. İ.Ö. 4000 yıllarında Doğı Akdeniz'de yaşayan bir kavmin doğal varlığını binlerce yıldır sürdüren deliceleri (*Olea europaea oleaster*, yabani zeytin ağacı) ıslah ettiğı kabul edilmektedir. Bu tarihten itibaren insanların deliceleri aşılıyarak, denizler ötesi başka toprakları bu ağaçla tanıştıyarak, yeni üretim teknikleri geliştirerek, bilgilerini nesilden nesile aktararak bu süreci tamamladıkları söylenebilir. İ.Ö. 3000 yıllarında Ortadoğı'lu tüccarlar tarafından Kıbrıs ve Girit'e getirilmiştir. Yunanlılar zeytinyağı ve şarap gelirleri ile kurdukları bir koloni ile Sicilyalıları, sonra Romalıları ve onlardan da Fransızlara, İspanyollara ve nihayet Portekizlilere ulaşmıştır. Kimi

tarihçiler de zeytinin İtalya'ya Yunanistan'dan değil de Tunus'tan getirildiği görüşünü savunmaktadır. Aslen bir Akdeniz bitkisi olan zeytin 16. yüzyıldan itibaren Hristiyan misyonerler tarafından Meksika, Arjantin, Peru ve Şili'ye götürülmüştür. 18. yüzyılda da Kuzey Amerika'da zeytinlikler kurulmaya başlanmıştır. Bugün Yeni Zelanda, Avusturalya, Güney Afrika ve hatta Çin'de zeytinciliğe büyük ilgi gösterilmektedir [67, 68].

2.2.2. Zeytin Ağacının Morfolojik Özellikleri ve Yetiştirme Koşulları

Zeytin ağacı, lamiales takımının 24 cins ve yaklaşık 900 türden oluşan “*Oleaceae*” (zeytingiller) familyasından gelmektedir. Leylak, yasemin, diş budak ağacının da içinde bulunduğu “*Olea*” cinsinden olup bu cinsin *Olea europaea* türündendir [67-71]. Başlıca “*Olea europaea oleaster*” (yabani/delice) ve “*Olea europaea sativa*” (ehli) adıyla bilinen iki farklı tür olarak varlığını sürdürmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Zeytin ağacının taksonomik olarak sınıflandırılması

Alem	Plantae (Bitkiler)
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Lamiales
Familiya	Oleaceae (Zeytingiller)
Cins	<i>Olea</i>
Tür	<i>E. oleaster</i> (yabani) <i>E. sativa</i> (ehli)
İsim	<i>Olea europaea</i>

Zeytin ağacı kışların yumuşak, yazların ise sıcak geçtiği bölgelerde yetiştirilmektedir. Zeytin ağacı 0 °C civarındaki sıcaklıkları sever. Çünkü bu değerler ağacın bitkisel dinlenmesini sağlayarak daha verimli olmasına sebep olmaktadır. Fakat - 12 °C'nin altındaki sıcaklıklara toleranslı değildir. Zeytin ağacı için en büyük olumsuzluklar başta don olmak üzere, aşırı ısı farklılıkları ve kuraklıktır. Bu şekilde ılıman - sıcak iklime uyumlu olması ve fazla zengin olmayan kireçli toprakları sevmesi zeytinin tipik bir Akdeniz ağacı olduğunun göstergesidir [69, 72]. Zeytin yetiştiriciliğini bu denizin yani Akdeniz'in çevresinde bulunan ülkelerle sınırlı olmamasının sebebi söz konusu ülkelerde yaşanan benzer iklim koşullarıdır.

Olea europaea oleaster (delice) 3-5 m boylanabilen bir çalı görünümündedir. Yaprakları derimsi, üst yüzü koyu yeşil, alt yüzü gümüşidir. Taneleri ufak, koyu yeşil renkte ve meyveleri yenilecek özellikte değildir. Zeytin denilen *Olea europaea sativa* ise 15 m kadar boylanabilen yayvan tepeli bir ağaçtır. Geniş, kıvrımlı, yamru yumru bir gövdesi vardır.

Zeytin ağaçları fidandan yetiştiği gibi aşı yöntemi ile de yetiştirilmektedir. En yaygın yol çekirdeklerin saçılması ile kendi kendine yetişen yabani zeytinin (delice) aşılmasıdır. Bazen de aşı delice yerinden sökülüp zeytinliklere dikilerek çoğaltılır. Bu yöntemle dikilen ağaçlar 3 yılda ürün vermektedir. Tam verim verebilmesi için 10 – 15 yıl geçmesi gereklidir. Aşı yöntemi sadece yabani zeytin ağaçlarına uygulanmaz. Daha yüksek verim almak amacı ile düşük nitelikteki ehli zeytin ağaçlarına da uygulanmaktadır. Fidandan yetişen zeytinler 5 yıldan sonra meyve verecek duruma gelmektedir. 25 yaşından sonra ise en verimli dönemine girmektedir. İyi bir bakım ile yüzlerce yıl ürün verebilmektedir ki bu bakım,

- Zeytinliklerin sürülmesini
- Ağaçların dallarının budanmasını
- Toprağın güçlendirilmesini
- Zararlılarla mücadeleyi kapsamaktadır.

Zeytin ağacının kökleri 1.5 m derinlere inbilse bile genel olarak yeraltında 80 cm civarında yoğunlaşmaktadır. Yaprığı 20 - 86 mm boyunda, 5 - 17 mm genişliğindedir.

Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunmaktadır. Yaprığın üst yüzü koyu gri yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır. Yapraklar ikinci yılını geçirdikten sonra tüyler dökülmektedir. Zeytin ağacının bir farkı da her mevsim yapraklı kalabilmesidir. Yaprakların kuru, sararmış, dökülmüş olması ağacın iyi bakılmadığının, yeterli su almadığının ve toprağın gübreye ihtiyacı olduğunun bir göstergesidir [67, 68].

Zeytin yetiştiriciliğinde unutulmaması gereken en önemli unsurlardan biri, yetiştirilecek olan bölgenin iklimine ve toprağına en dayanıklı zeytin cinsinin saptanmasıdır. Ayrıca zeytinin yağlık, sofralık veya yeşil sofralık olarak kullanım maksadına göre bölgeye uygun çeşidin seçilmesi gereklidir. Bunun yanında dikim zamanının Kasım ve Mart ayları arasında olması ağacın dinlenme dönemi olması açısından önemlidir. Arazi bakımından ise eğimli araziler güneş ışınlarının yakıcı etkilerini azalttığından üründen daha fazla verim elde edilmesini sağlamaktadır [73]. Zeytincilik sabır gerektiren çok meşakkatli bir iştir. Bir yılın kışı hasatla, baharları ağaçların bakımı ile yazı ise temizlik ve diğer uğraşlarla geçmektedir:

Ocak: Toprak sürülür ve yeni dikimler için çukurlar açılır.

Şubat: Ağaçlar budanır. Gübreleme ve aşılama yapılır.

Mart: Ağaçlar tomurcuklanmaya başlar. İlaçlamalar yapılır ve yabancı otlar temizlenir.

Nisan: Bahçelerde toprak işlenmeye devam edilir.

Mayıs: Çiçeklenme başlar. Kurak dönemlerde gübrelemenin ardından sulama yapılır.

Haziran: Tanelenme başlar. Zararlılarla mücadele edilir.

Temmuz, Ağustos ve Eylül: Taneler büyür ve çekirdeği sertleşir.

Ekim: Yeşil salamuralık çeşitlerin hasatına başlanır.

Kasım: Yağlık zeytinler hasat edilir.

Aralık: Hasat sona erer.

Zeytinin olgunlaşması zeytinin türüne göre değişmektedir. Hasat zamanı türe bağlı olarak farklılık gösterdiği gibi iklim koşullarına göre de Eylül sonunda başlanıp Şubat'a kadar devam edebilir [67, 68, 70].

2.2.3. Zeytin Ağacının Dünya Üzerindeki Dağılımı

Dünya üzerinde ekonomik anlamda 37 ülkede zeytin üretimi yapılmaktadır [74]. Yaklaşık 10 milyon hektar alan üzerinde 890 milyon zeytin ağacı yetiştirilmekte olup, günümüzde ABD, Arjantin, Peru, Meksika gibi Amerika kıtası ülkeleri, Güney Afrika, Avusturalya, Yeni Zelanda ve Çin’de zeytinlikler git gide yaygınlık kazansa da zeytin ekonomik olarak dünyanın her yerinde yetiştirilebilen bir meyve değildir. Dünya üzerindeki zeytin ağacı varlığının yaklaşık % 98’ i Türkiye’nin de içinde bulunduğu 30 –40 ° enlemleri arasında, kuzey yarım kürede ve genelde Akdeniz havzasında bulunmaktadır [75]. İspanya hem 210 milyon ağaç hem de 2 milyon 200 bin hektar zeytinliğiyle dünyanın en büyük zeytin üreticisidir. İkinci sırayı İtalya almaktadır. Yunanistan 123 milyon zeytin ağacı ile Türkiye’den daha fazla ağaca sahiptir, fakat zeytinliklerin kapladığı alan 730 bin hektar olup Türkiye’den azdır. Tunus 69 milyon ağacı ile beşinci sıradadır ve 1600 bin hektar zeytinlik alanıyla dünya ikincisidir. Türkiye, 877 bin hektara yayılan 95 milyon zeytin ağacıyla dünya zeytinliklerinin ve zeytin ağacının % 10’dan fazlasına sahiptir [68].

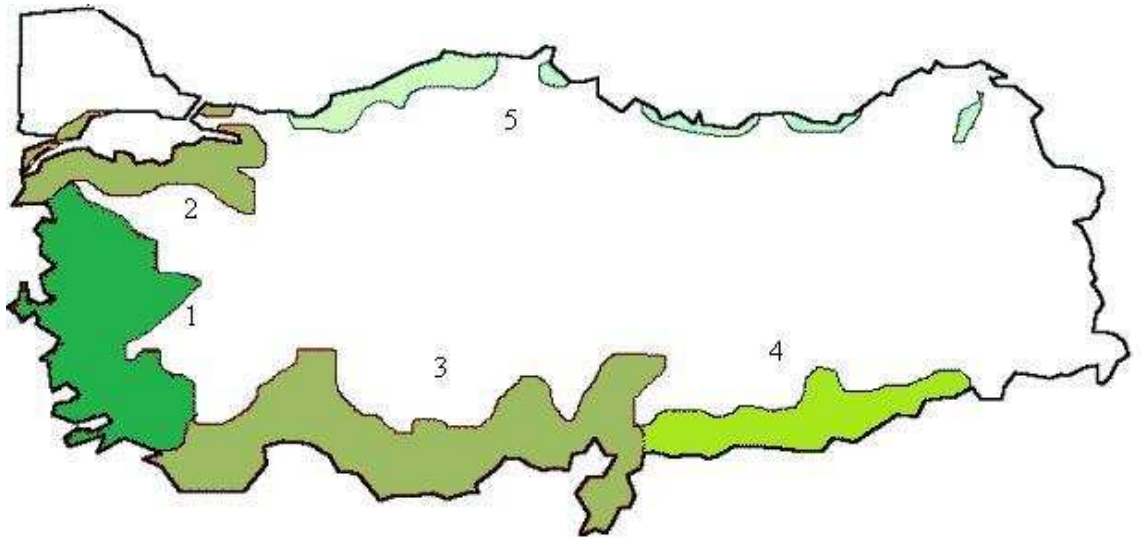
Konuya zeytincilik açısından bakılacak olursa, yaklaşık 13 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin % 86’sı, altı tipik Akdeniz ülkesinde yoğunlaşmıştır. Sırasıyla, üretiminin % 26’sı İspanya, % 23’ü İtalya, % 15’i Yunanistan, % 9’u Türkiye, % 8’i Tunus ve % 5’i Fas tarafından sağlanmaktadır [74]. Zeytinyağı üretiminde ise İspanya, İtalya ve Yunanistan ilk üç sırayı almakta, Türkiye ise Tunus ile dördüncülüğü paylaşmaktadır. Fas ve Portekiz de önemli miktarda zeytinliğe sahiptir. Suriye ise son yıllarda gösterdiği büyük gelişme ile Türkiye’nin önemli rakipleri arasında yer almaya adaydır.

Dünya üzerindeki zeytinliklerin % 10’undan fazlasına sahip olan Türkiye, dünya zeytinyağı üretiminin % 5’ten azını üretmektedir. Ortalama 850 zeytinyağı fabrikasıyla Türkiye dünyada zeytinyağı üretiminde beşinci sırada yer almaktadır [76]. Yunanistan’ın kişi başı yıllık zeytinyağı tüketimi 17 kg iken bizde bu sayı 1 kg’dır. İtalyanlar dünya zeytinyağı üretiminin % 33’ünü, İspanyollar % 22’sini, Yunanlılar % 11’ini, Amerikalılar ise % 5’ini tüketmektedirler. Biz ise sadece % 3’ünü tüketmekteyiz [68].

2.2.4. Zeytin Ağacının Türkiye’deki Durumu

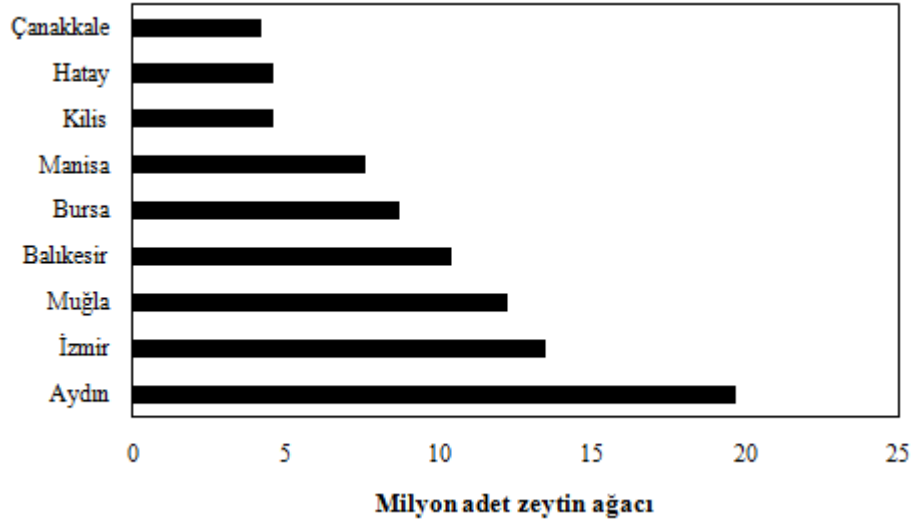
Zeytin engebeli yörelerde tek kültür bitkisi iken, hafif eğimli arazilerde başta incir olmak üzere şeftali, mandalina ve antep fıstığı, hatta çeşitli sebzelerle karışık olarak yetiştirilmektedir [67]. Toplam seksen bir ilimizin otuz altısında zeytin üretimine rastlanmaktadır. Türkiye zeytin alanları, toplam tarım alanlarının % 2’sini ve bağ-bahçe alanlarının ise % 22’sini oluşturmaktadır [74].

Şekil 2.3’te ülkemizde bulunan zeytin ağaçlarının dağılımı gösterilmiştir [77]:



Şekil 2.3: Türkiye’de bölgelere göre zeytin ağacı dağılımı (numaralandırma bölgelerin ağaç sayısına göre çoktan aza doğru yapılmıştır)

Türkiye’de dağlık ve taşlık arazilerde bulunan delicelerin sayısı bilinmemektedir. Ağaç dağılımına bakacak olursak (Şekil 2.4) en önemli iller sırasıyla Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Bursa, Manisa, Kilis, Hatay ve Çanakkale’dir [67]. Ağırlıklı olarak Akdeniz’de yetiştirilse de bu bölgeden uzak bölgelerde de zeytin ağacına rastlanılmasının sebebi Akdeniz’i aratmayan benzer iklim koşullarıdır. Söz konusu koşullar baharların yağışlı geçmesi, yaz aylarının kuru ve güneşli, kışların ise ılık geçmesidir.



Şekil 2.4: Türkiye’de önemli zeytinci illerin ağaç sayısı

Ülkemizde 30 çeşit zeytin ağacı bulunmaktadır. Bunları alfabetik olarak sıralıyacak olursak;

Ayvalık, Büyük topak ulak, Çakır, Çekişte, Çelebi, Çilli, Domat, Edincik su, Eğriburun, Erkence, Gemlik, Halhali, İzmir sofralık, Kalembezi, Kan çelesi, Karamürsel su, Kilis yağlık, Kiraz, Manzanilla, Memecik, Memeli, Nizip yağlık, Samanlı, Sarı haşebi, Sarı ulak, Savrani, Tavşan yüreği, Uslu, Yağ çelesi ve Yamalak kabası [70].

2.2.5. Zeytin Meyvesi

Zeytin meyvesi oval şekilde, sofralık zeytin veya zeytinyağı olarak tüketilebilen, Akdeniz diyetinde temel yağ kaynaklarından birisidir. Bazı zeytin türleri sofralık zeytin olarak tüketilmeye müsaitken bazıları da yağ için uygun olabilmektedir [41]. Zeytinin bir çiçekten olgun bir meyveye dönüşmesi çok karmaşık bir süreçtir. Bu süreç zeytinin diğer bölümlerinin modifikasyonunu, hücre duvarının kaybını, zarın yumuşamasını ve karbohidrat birikimini içermektedir. İlk aşamada zeytin meyvesi çok hızlı bir şekilde büyümektedir ve bunu daha yavaş bir büyüme dönemi takip etmektedir. Ardından gene ilkinе benzer bir hızdaki gelişme dönemine geçilmektedir. Çekirdekleşme meyve gelişiminin ilk zamanlarında yani çiçeklenmenin ardından 10 hafta sonra meydana

gelmektedir ve sıvı endospermin katılaşmasına kadar devam etmektedir. Bu gelişim prosesi zeytinde meyvenin oluşumu, çekirdekleşme ve olgunlaşma esnasında yağın oluşumu ve birikmesi şeklinde 3 ana aşamaya ayrılabilir. Meyve verme hücrel bölünme ve hücre boyutunda artış ile karakterize edilmektedir. Odunlaşmanın ardından yağ asidi sentezleri ve hızlı bir et hücresinin büyümesi başlamaktadır. Zeytinin büyümesinde ve yağ birikim aşamasında yani son aşamada ürünün ebatı tayin edilebilmektedir. Zeytinin olgunlaşması aylar süren uzun ve yavaş bir süreçtir ve yetiştirilen bölgeye, türe, sulama imkanlarına, sıcaklığa bağlı olarak farklılıklar göstermektedir [72].

Zeytin tanesi türüne göre büyük farklılıklar göstermektedir. Bazı türler 1.5 g gelirken bazıları da 17 g gelebilmektedir. Örnek olarak ülkemizde yetişen zeytin türleri arasında en irisi 7.5 g gelen İzmir sofralık ve en küçüğü ise 1.75 g gelen Kilis yağlık çeşitleridir.

Oval ya da elips şeklindeki zeytin anatomik olarak sap (pedical), kabuk (epidermis), et (mesocarpe), çekirdek (endocarpe), çekirdek içi ya da tohum (embriyon) olarak ayrılmaktadır. Zeytin meyvesinin besinsel ve biyolojik bir değer taşıyan kısmı ağırlığının % 66-85'ini oluşturan et kısmıdır (Tablo 2.2). Kabuğu ile yense de bu koruyucu dokunun besin değeri yoktur. Bu kısmın meyve dalında iken ya da işlendiği sırada koruyucu özelliği bulunmaktadır. Delicelerin meyvesinin çekirdeği nispeten büyüktür. Dolayısıyla eti az, yağ oranı düşük (% 30) ve tadı çok acıdır [67, 70, 77]. Zeytini öteki çekirdekli meyvelerden farklı kılan içeriğindeki şeker ve yağ miktarlarıdır. Şeker miktarı % 2 ile 6 arasında iken bu oran diğer benzer meyvelerde % 12'dir. Yağ oranı ise zeytin meyvesinde % 15 ile 30 arasında değişirken, diğerlerinde ortalama % 1.5'tur.

Zeytin meyvesi sofralık ve yağlık olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir. Devlet İstatistik Enstitüsü araştırmalarına göre, Türkiye'de üretilen zeytinlerin % 68'i yağ üretimine ve % 28'i de sofrada kullanılmak üzere yetiştirilmektedir [76].

Tablo 2.2: Zeytin meyvesinin fiziksel özellikleri ve bileşimi

Fiziksel özellikler	Miktar	Bileşim	Miktar
Dane ağırlığı	2 - 12 g	Su	% 50-70
Çekirdek oranı	% 13 - 30	Yağ	% 15-30
Et (pulp) oranı	% 66 - 85	Protein	% 1.6
Meyve kabuğu	% 1.5 - 3.5	Selüloz	% 5.8
		Şeker	% 2-6
		Kül	% 1.5

Zeytinin hasat zamanı besin bileşimini etkileyebilmektedir. Asit seviyesi aşırı yükseleceğinden, aşırı olgunlaşmalarından kaçınmak gereklidir. Çok erken hasat edildiğinde ise içeriğindeki yağ miktarı sınırlı olacaktır. En iyi toplama zamanı zeytinin yeşile döndüğü vakittir. Mor ve akabinde siyah rengi aldığı anda asitliği ve yağ içeriği de git gide artmaktadır.

Zeytinin fenolik komponent kompozisyonunun tür ile nitelik ve nicelik açısından değiştiği görülmektedir [39, 41-43, 72, 78-80]. Oleuropein tüm zeytin çeşitlerinde bulunurken, dimetiloleuropein ve verbaskozit türe bağlı olarak mevcut olan fenolik bileşiklerdir. Küçük meyveler yüksek oleuropein ve düşük verbaskozit miktarı ile karakterize edilirken, iri meyveler tam tersi şekilde karakterize edilmektedir. Zeytinin biyofenol seviyesi meyvanın aşırı olgunlaşması ile beraber azalmaktadır. Fakat ılık iklimlerde yetiştirilen zeytinlerin daha hızlı bir şekilde olgunlaşması ve biyofenol açısından soğuk iklimdekilerden daha zengin yağ vermesi gibi istisnai durumlar da söz konusu olabilmektedir [78]. Ayrıca uygulanan sulama şartlarının zeytinin biyoaktif bileşenler açısından içeriğini etkilediğine dair araştırmalar da mevcuttur [45, 46, 48, 72].

2.3. ZEYTİN YAPRAĞI

Fenolik bileşikler zeytin ağacının tüm bölümlerinde olduğu gibi yapraklarında da bulunmaktadır. Yaprakta bulunan fenolik bileşikler doğası ve konsantrasyonuna bağlı olarak meyvanın rengine ve tadına katkıda bulunmakta ve miktarı çeşitli dokular arasında önemli derecede farklılıklar göstermektedir [72]. Yapraktaki polifenoller çiçekteki, gövdedeki ve meyvadakinden farklıdır. Yaprakta bulunanların şeker içeriği daha azdır ve süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu ile daha kolay ekstrakte edilebilmektedir [4].

Zeytin yaprağı içerdiği değerli fenolik maddeler ve yüksek antioksidan kapasitesiyle önemi her geçen gün artan bir ürün olmasına rağmen yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. Bilinen başlıca kullanım alanları şu şekilde sayılabilir:

- Kurutulduktan sonra yakıt olarak tüketilmektedir.
- Hayvan yemi olarak kullanılmaktadır.
- Fazla olgunlaşmış zeytinlerden elde edilen zeytin yağına, üretim aşamasında % 2 ile 3 oranında zeytin yaprağı ilave edilmektedir. Olgunlaşmış meyve içerisindeki biyoaktif bileşen miktarındaki düşüş ve yağda meydana gelecek olan antioksidan madde açığı bu şekilde telafi edilmiş olmaktadır.
- Zeytin yaprağı ekstraktı marketlerde tabletler halinde de tüketiciye gıda destek ürünleri olarak sunulmaktadır [33, 81].

2.3.1. Zeytin Yaprağının Farmakolojik Etkileri

Zeytin yaprağı çayının Ortadoğu kültüründe öksürük, boğaz ağrısı, ateş, sistit gibi rahatsızlıklarda yüzlerce yıldır kullanıldığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Bununla beraber yaprağın lapası da yanık, kaşıntı ve şişlik gibi deri problemlerinde kullanılmıştır [63]. Zeytin yaprağının ilk kullanımının, medikal amaçlı olarak Mısırlılarda başladığı bilinmektedir. Zeytin yaprağı onların kültüründe gücün simgesiydi. Yapraktan

ekstrakte ettikleri yağı, krallarını mumyalama törenlerinde kullanırlardı. Zeytin yaprağı, diğer kültürlerde de beslenme ve tıbbi sebeplerle kullanılmıştır. Özellikle Akdeniz kültürlerinde enfeksiyon, soğuk algınlığı ve acı gibi çeşitli sağlık durumlarında zeytin yaprağı kullanılmıştır. 19. Yüzyılın ortalarında zeytin yaprağından yapılan çay sıtmaya karşı kininden bile daha etkili bir çare olmuştur. Bu çay İngiltere’ de son derece popüler hale gelmiştir. Denizcilerin tropik kolonilerden dönerken beraberlerinde getirdikleri hastalıkları tedavi etmiştir [33, 64]. Günümüzde ise pek çok marka zeytin yaprağı içerikli bitkisel ilaç piyasada hazır preparatlar olarak ya da tabletler halinde diyabette, hipertansiyonda, kardiyovasküler rahatsızlıklarda, grip, üriner sistem rahatsızlıklarında, kronik halsizlikte, hastaların nekahat döneminde, kötü huylu kolesterolün düşürülmesinde, dejeneratif eklem rahatsızlıkları, bursit (eklem bölgelerinde ağrılı şişlikler), sinüzit, vücudun doğal bağışıklık sisteminin desteklenmesinde kullanılmaktadır. Kozmetikte ise, zeytin yaprağı ekstraktı içeren ürünler antioksidan etkileriyle cilt bakımında kullanılmaktadır. “Antiaging” kürlerinin hemen hepsinde yer almaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktından yapılan ilaçlar yalnız insan sağlığı için değil, hayvan sağlığında da kullanılmaya başlanmıştır. Evcil hayvanların hazır mamalarında ve bitkisel ilaçlarında hem doğal antibiyotik hem de antiparazitik etkisi sebebiyle kullanılmaktadır. Yapılan son deneysel ve teorik çalışmalar, zeytin yaprağı ekstraktının ev sahibi hücrelere HIV virüsü girişini kaptarak anti-HIV aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Saydığımız tüm bu durumlar zeytin yapraklarının mevcut diğer biyolojik aktif maddelerinin yanında sahip olduğu fenolik bileşenlerine atfedilmektedir [10].

2.3.1.1. Antioksidan Etkisi

Zeytin yaprağının içerdiği çok sayıdaki fenolik bileşen güçlü serbest radikal temizleme kapasitesine sahiptir [10, 38, 75, 79, 82, 83]. Üstelik bu komponentler birarada sinerjik bir etki göstermektedir. Yapılmış olan testlere göre (in vitro) flavonoidler, rutin, kateşin ve luteolin, C ve E vitaminlerden neredeyse 2.5 kat daha fazla antioksidan etki göstermektedir [66]. Oleuropein ve hidroksitirosolün BHT, C ve E vitaminleri gibi antioksidanlar ile aynı ya da daha etkili olduğu gösterilmiştir [69, 83]. Bir başka çalışmada ise rutin > kateşin > $\approx$ luteolin > zeytin yaprağı ekstraktı $\approx$ hidroksitirosol > diosmetin > kafeik asit > verbaskozit > oleuropein > luteolin –7– glukozit $\approx$ vanillik asit

≈ diosmetin -7- glukozit > apigenin -7- glukozit > tirosol > vanilin şeklinde bir serbest radikal temizleme yeteneği sıralaması elde edilmiştir. Burada dikkat çeken bir diğer nokta ise flavonoidler, oleuropeosidler ve fenoller arasındaki sinerjik etkiden ötürü zeytin yaprağı ekstraktının C ve E vitaminlerinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olmasıdır [84]. Yaprakların olgunlaşması ile beraber antioksidan kapasitesinin değişiminin incelendiği bir çalışmada, yetişkin yaprakların yeni yapraklara kıyasla daha yüksek oranda antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlenmiştir [85].

2.3.1.2. *Antiinflamatuvar ve Antitrombotik Etkisi*

Antiinflamasyon özelliği özellikle oleuropein, hidroksitirosol, oleik asit, luteolin ve apigeninden ileri gelmektedir. Oleuropein ve hidroksitirosol inflamasyona sevk eden yollardaki lökotrien B4 oluşumunu engellemektedirler. Bu polifenoller pıhtı toplaşmasını, lipoksijenazı ve eikosanoid üretimini de durdurabilmektedirler [66].

2.3.1.3. *Antimikrobiyal Etkisi*

Zeytin yaprağı ekstraktının türlü bakteri, virüs, maya ve mantara karşı antimikrobiyal etkisi bulunmaktadır. Bronşit ve bademcik iltihabı gibi yaygın bakteriyel enfeksiyonlar, kadınların vajinal bölgelerinde oluşan mantar enfeksiyonları ve uçuk gibi virütik enfeksiyonların tedavisinde zeytin yaprağı ekstraktı kullanılmaktadır [58, 64, 66]. Yapılmış olan bir çalışmada (in vitro) ise mantar gelişimini önlemede en etkin fenolik bileşenin tirosol olduğu ve bunu sırası ile kateşin ve oleuropeinin takip ettiği görülmüştür. Bileşenleri izole etmek yerine ham ekstraktı kullanmanın, bileşenlerin sinerjik olarak etki ettiklerinde çok daha iyi sonuç verdikleri gözlemlendiğinden daha uygun olabilmektedir [75, 86, 87]. Zeytin yaprağı ekstraktı içerisindeki komponentler patojenlerle savaşmak ve onları yok etmek dışında vücudun bağışıklık sisteminin bu mikroplara karşı daha etkili olmasını da sağlamaktadır [64].

Zeytin yaprağındaki biyoaktif bileşenlerin bakteri ve mantar gelişimini geciktirdiği ve/veya önlediği yönünde gerçekleştirilmiş olan araştırmalar bu bileşenlerin gıda katkı maddesi ve haşere ile mücadelede kullanılabileceğini göstermektedir [87].

2.3.1.4. Antihipertansif Etkisi

Canlılarda (in vivo) yapılmış olan çalışmalar kan basıncını düşürme özelliğini doğrulamaktadır. Bazı araştırmalarda, özel olarak hazırlanmış olan zeytin yaprağı ekstraktı, hayvanlara ağız yolu ile verildiğinde kan basıncını düşürücü bir etki gösterdiği gözlenmiştir [58, 66].

2.3.1.5. Hipoglisemik Aktivitesi

Zeytin yaprağı ekstraktı deney hayvanlarında hipoglisemik aktivite göstermiştir ve bu aktiviteden sorumlu bileşiklerden biri oleuropeosidedir. Bu madde aloksana bağlı şeker hastalığı olan hayvanlarda antidiyabetik aktivite üretmektedir [71, 83, 88-91].

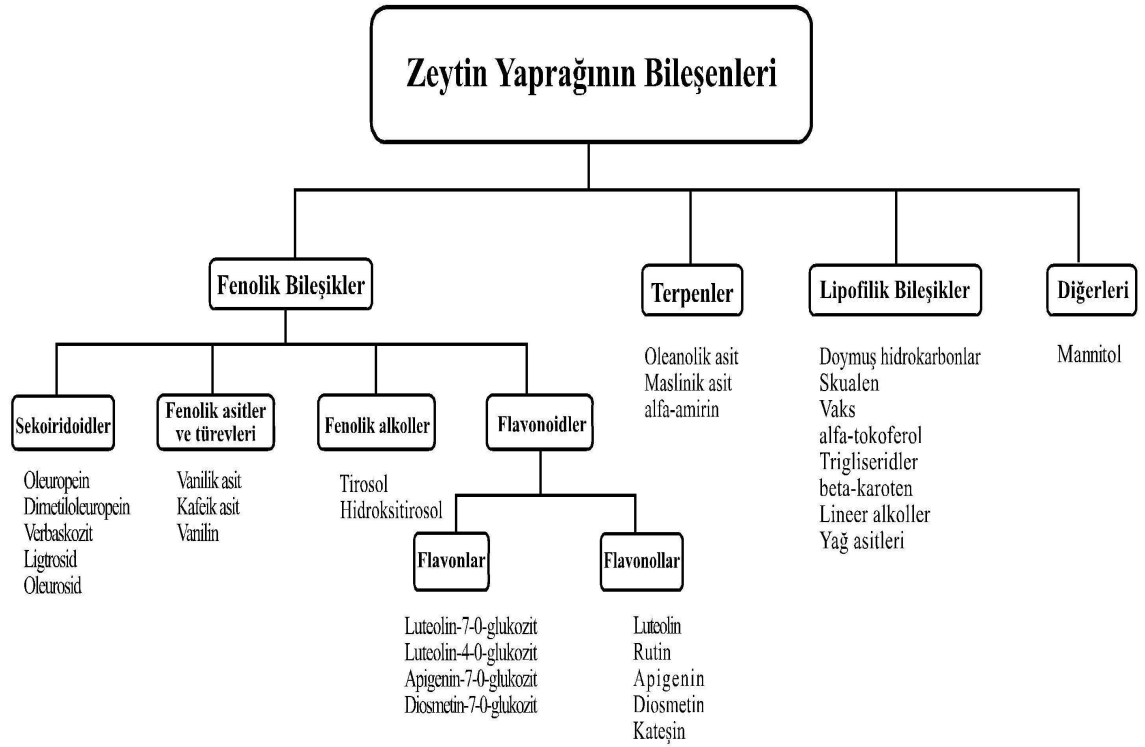
2.3.1.6. Diğer Aktiviteler

Geleneksel metinlerde zeytin yaprağının kanı durdurucu ve antiseptik olduğu ve soğuk algınlıklarına müdahalede su içerisinde kaynatılarak elde edilen özütün faydalı olduğu da anlatılmaktadır.

2.3.2. Zeytin Yaprığında Rastlanan Biyoaktif Bileşenler

Çoğu bitki gibi zeytin ağacı da sürekli olarak yüksek sıcaklık ve UV radyasyonu gibi çevresel strese maruz kalmaktadır. Bu duruma karşı bitkinin bütünlüğünü koruyabilmesi ve kendini savunabilmesi için antioksidan özellik taşıyan fenolik asitler, fenolik alkoller, sekoiridoidler ve flavonoidler gibi çeşitli fenolik bileşikleri üretmektedir. Söz konusu bileşenlerin nitel ve nicel olarak değişimi zeytin ağacının türü, yaprağın olgunlaşma derecesi, *Dacus Olea* olarak bilinen zeytin sineği tarafından meydana gelebilecek muhtemel bir böceklenme, iklim ve coğrafi konum gibi çeşitli faktörler tarafından değişmektedir [82]. Zeytin yaprağı içeriğinin büyük miktarını

fenolik bileşikler oluştursa da terpenik bileşikler, lipofilik komponentler ve türlü diğer bileşenlere de rastlamak mümkündür (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Zeytin yaprağı ekstraktının bileşenlerine ait şematik gösterimi

Zeytin yaprağında tayin edilmiş olan sekoiridoidler oleuropeosid olarak da adlandırılmaktadır. Bunlar oleuropein, dimetiloleuropein, ligstrosid, verbaskozit, oleosit dimetilester, oleuropeinin bir izomeri olan oleurosit şeklinde sayılabilir. Ayrıca luteolin -7-O- glukozit, apigenin -7-O- glukozit, rutin, luteolin ve apigenin gibi önemli miktarda da flavonoid gurubundan olan fenolik maddeleri içermektedir. Fakat burada adı geçen bileşenlerden fenolik asitler, fenolik alkoller ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşenler türlü meyve ve sebzede bulunurken, oleuropein gibi sekoiridoidler, sadece zeytin ağacının (*Olea europaea*) da içinde olduğu zeytingiller (*Oleaceae*) ailesine ait bitkilerde mevcuttur. Sekoiridoidler, hem terpenik hem de hidroksi aromatik

ikincil metabolitlerdir. Sekoiridoidler olarak adlandırılan fenolik bileşikler, moleköl yapısında hem elenolik asit hem de elenolik asitin türevlerinin varlığı ile karakterize edilmektedir. Oleuropein, dimetiloleuropein, ligitrosit ve nüzhinide bu türde en fazla bulunan sekoiridoidlerdir [54, 78, 83, 92].

Fenolik komponentler dışında α -amirin, maslinik asit ve oleanolik asit gibi terpenik guruplara da rastlanmaktadır. Özellikle de biyolojik aktivitesinden ötürü üzerine sayısız çalışma yapılmış olan oleanolik asit, yaprağın kuru ağırlığının yaklaşık % 3'ünü oluşturmaktadır [33, 93].

Zeytin yaprağı doymuş hidrokarbonlar, skualen, vaks, α -tokoferol, trigliseridler, β -karoten, lineer alkoller ve yağ asitleri (palmitik, oleik ve linoleik asitler) gibi çeşitli yağda çözünen bileşikleri de ppm mertebesinde ihtiva etmektedir. Mevcut hidrokarbonların karbon sayısı 29 ile 33 (C_{29} - C_{33}) arasında değişmektedir. Vaksları yağ asitleri ile terpenik alkollerden (palmitik, oleik ve linoleik) oluşmaktadır. Hekzanlı zeytin yaprağı ekstraktında analiz edilen α -tokoferol, β -karoten, α - ve β -amirin, skualen insan fizyolojik sistemini module edebilen biyoaktif bileşenlerdir. Dolayısıyla bu bileşiklerin farmasötik, kozmetik ve gıda endüstrilerinde çoklu uygulamaları vardır. Fakat, burada unutulmaması gereken zeytin yaprağının meyvesinin aksine oleik asit ya da skualen gibi doymamış yağ asitlerini bol miktarda ihtiva etmemesidir [66]. Zeytin yaprağı sadece zeytingiller familyasının sentezleyebildiği bir bileşik olan mannitol şeker alkolünü de içermektedir. Mannitol, mannozun bir hekzitol türevidir. Sukrozun % 70'ine tekabül eden tatlandırma potansiyeline sahiptir. Diş çürümelerine yol açmaz ve insanlardaki metabolizması insüline bağlı olmadığından diyabetikliler tarafından kullanımı uygundur. Antioksidan olarak etkilerinin yanında ciddi kafa yaralanmalarında beyin içi basıncı düşürücü etkisi de bulunmaktadır. Zeytin yaprağının bir gramında 10 ile 20 mg arasında bu karbohidrattan bulunmaktadır [33].

Zeytin yaprağı ekstraktı ve asitliği % 1'in altında olan natürel sızma zeytin yağı yüksek kaliteli fenolik komponent kaynağı olarak kabul edilmektedirler. Avusturalya'da yapılmış olan bir test sonucuna göre, toplam fenol miktarı 200–800 mg/L arasında olan ekstra saf zeytin yağına kıyasla, zeytin yaprağı ekstraktı içerisindeki toplam fenol seviyesi 6360 ile 8190 mg/L olarak tayin edilmiştir [66].

Tüm bileşenleri bir yana, içerdiği fenolik bileşikler açısından çok değerli olan zeytin yaprağının fenolik profilini irdeleyen çalışmalar içerisinde, zeytin yaprağı ekstraktının ana fenolik komponentlerinin nitel ve nicel olarak tayin edildiği bir çalışmadan edinilen bulgular Tablo 2.3'te sunulmuştur [84].

Zeytin yaprağının sahip olduğu söz konusu fenolik bileşikler, saf zeytinyağının kalitesinin değerlendirilmesinde dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir. Çünkü bu bileşenler zeytin yağının oto-oksidasyon stabiletisinden ve duyuşal niteliklerinden kısmen de olsa sorumludurlar [82].

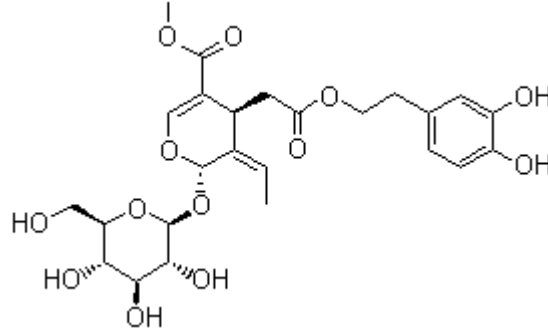
Tablo 2.3: Zeytin yaprağı ekstraktı içerisinde bulunan ana fenolik bileşikler ve bu bileşiklerin kuru ekstrakt temelinden % miktarları

Fenolik komponent	% Miktar
(kuru ekstrakt miktarı üzerinden)	
Oleuropein	24.54
Hidroksitirosol	1.46
Luteolin 7-O- glukozit	1.38
Apigenin 7-O- glukozit	1.37
Verbaskozit	1.11
Tirosol	0.71
Vanilik asit	0.63
Diosmetin 7-O- glukozit	0.54
Kafeik asit	0.34
Luteolin	0.21
Rutin	0.05
Diosmetin	0.05
Vanilin	0.05
Kateşin	0.04

2.3.2.1. Oleuropein

1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından zeytinin meyvesi üzerinde yapılan bir çalışmada oleuropein olarak adlandırılan fenolik bir bileşik fark edilmiştir. Bu bileşiği kristal yapılı olmayan, oldukça acı, suda ve alkolde çözünebilen ve eterde çözünemeyen madde olarak anlatmışlardır. Daha sonra yapılan çalışmalarda da elenolik asit ve dihidroksifeniletanolden oluşan ester yapısı aydınlatılmıştır [84, 85, 94]. Çoğu araştırmacı yaprağın tedavi edici özelliğinin, bünyesinde en bol bulunan fenolik bileşik olan oleuropeinden kaynaklandığı düşüncesinde hem fikirdirler. Çünkü bu maddenin hidroliz ürünlerinin de biyolojik faydası önemlidir [4, 10, 33, 42, 63, 64, 91]. Üstelik zeytin ağacı üzerinde bu maddeyi en fazla ihtiva eden yapraklarıdır. Zeytin yağı içerisindeki oranı % 0.005 ile 0.12 arasında değişirken, bu değer zeytin kara sularında % 0.87'ye kadar çıkmaktadır. Zira zeytin yağının apolar karakterde olması ve oleuropeinin ise polar bir madde olarak zeytin kara suyunda daha fazla bulunması beklenen bir durumdur. Zeytin yaprağındaki seviyesi ise % 1 ile 14 arasında değişmektedir [78, 90]. Biyolojik değeri anlaşıldıktan sonra kurtbağrı, yasemin, leylak gibi zeytin yaprağı dışındaki pek çok oleuropein kaynağı da araştırılmaya başlanmıştır [95, 96].

β -glukosilat elenolik asitli bir (3,4-dihidroksi fenil) etanol (hidroksitirosol) olan oleuropein, zeytin meyvesi ve yaprağının ana fenolüdür [43, 80, 95, 97, 98]. Dolayısıyla yine değerli bir doğal antioksidan madde olan hidroksitirosolün varlığından sorumlu olan komponent de oleuropeindir. Zeytinin oleuropein seviyesi meyvanın aşırı olgunlaşması ile beraber azaldığından, olgunlaşmamış zeytinin acı tadının sebebi de oleuropeindir [82]. Molekül formülü $C_{25}H_{32}O_{13}$ ve molekül ağırlığı 540.514 g/mol olup organik yapısı Şekil 2.6'da verilmiştir [99].



Şekil 2.6: Oleuropeinin organik yapısı

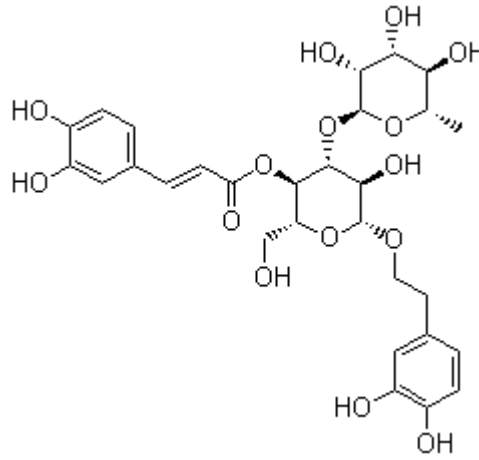
Oleuropein virüs, bakteri, maya, mantar, küf ve diğer parazitlere karşı antimikrobiyal etkiye sahiptir [84]. Oleuropeinin içeriğindeki elenolik asidin de bu etkiye katkıda bulunduğu laboratuvar koşullarında kanıtlanmıştır. Oleuropeinden hidroliz yolu ile elde edilen kalsiyum enolatın da antiviral ve antibakteriyal aktiviteleri kanıtlanmıştır [33, 74, 95]. Doğal antioksidan özelliğinden ötürü de pek çok medikal müdahalede kullanılmaktadır. Trombosit birikimini ve eikosanoid üretimini önleyerek hücreyi ve organizmayı korumaktadır. Koroner genişmesinde rol oynayan membran lipid oksidasyonunu koruyarak kardiyoloji ile ilgili rahatsızlıkları önlemektedir. Obezite problemlerinin üstesinden gelebilmek için lipid metabolizmasını iyileştirmektedir. Kanser hastalarında enzimleri korumakta ve yüksek tansiyon hücre ölümünü önlemektedir [83, 88-91]. Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) seviyesinde % 30 oranında azalma sağlamaktadır [33].

[63].

Oleuropeinin antioksidan kapasitesinin yüksek olması halka yapısındaki o-dihidroksi (kateşol) yapısına atfedilmektedir [84]. Bu madde yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olsa bile saf haldeki antioksidan kapasitesi sınırlıdır. Bu durum oleuropeinin parçalanarak kendisinden çok daha güçlü olan hidroksitirosola parçalanması ve böylece ekstraktın toplam antioksidan kapasitesinin artması ile açıklanabilmektedir. Bir diğer açıklama ise ekstrakt içerisindeki fenolik maddelerin sinerjik etkisi şeklinde yapılabilir.

2.3.2.2. Verbaskozit

Zeytingiller familyasından olan bitkilerde yaygın olarak bulunan diğ er bir polifenol ise verbaskozittir [100]. Kafeik asit ile hidroksitirosolden meydana gelen bir ester olan verbaskozitin molek l formülü $C_{29}H_{36}O_{15}$ ve molek l ağırlığı 624.59 g/mol olup, organik yapısı Şekil 2.7’de gösterilmiştir [101].



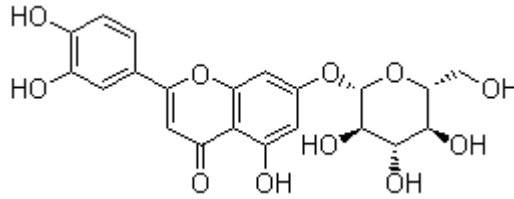
Şekil 2.7: Verbaskozitin organik yapısı

Verbaskozit oleuropeinin aksine tüm zeytin türlerinde mevcut olmayan bir fenolik bileşiktir. Ayrıca yine oleuropein için söz konusu olan durumun aksine küçük zeytin meyvelerinde düşük miktarlarda, iri meyvelerde ise yüksek miktarlarda verbaskozit bulunmaktadır. Zeytin yaprakları ile yapılan çalışmalara bakıldığında 100 g kuru yaprağın 5.3 g verbaskozit içerdiği görülmüştür [78]. Oleuropein içeriği açısından da çok fakir olan zeytin yağının içerisinde çoğu zaman verbaskozit bileşiğine rastlanmadığı görülmüştür. Hatta bu durumu telafi etmek adına yapılan çalışmalarda zeytin yaprağı içerisindeki fenolik bileşenlerin türlü ekstreksiyon prosesleri ile yağ içerisine transferi gerçekleştirilmiş ve yağın litresi başına 2 mg verbaskozit olacak şekilde bir zenginleşme meydana getirilmiştir [89].

Eroin tüketimi ile beraber beyinde meydana gelen oksidatif hasarın tedavisinde kullanılmaktadır [88, 89]. Ayrıca, tıpkı oleuropein gibi trombosit birikimini de önlediği görülmüştür. Yapılmış olan çalışmalar, verbaskozitin deri tümörlerine karşı sitotoksik ve sitostatik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu fenolik glukozitin fare kalbinde kardiyolojik bileşiklerden biri olduğu da söylenmektedir. Bu tür farmakolojik etkilerinin yanında antibakteriyel ve antiviral etkileri de yapılan in vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır [100].

2.3.2.3. Luteolin 7-O-glukozit

Luteolin 7-O-glukozit, apigenin 7-O-rutinosit ve luteolin 4'-O-glukozit gibi zeytin yaprağında en fazla bulunan flavonoidlerden birisidir [102]. Molekül formülü $C_{21}H_{20}O_{11}$ ve molekül ağırlığı 448.38 g/mol olan luteolin 7-O-glukozitin organik yapısı Şekil 2.8'de verilmiştir [103].



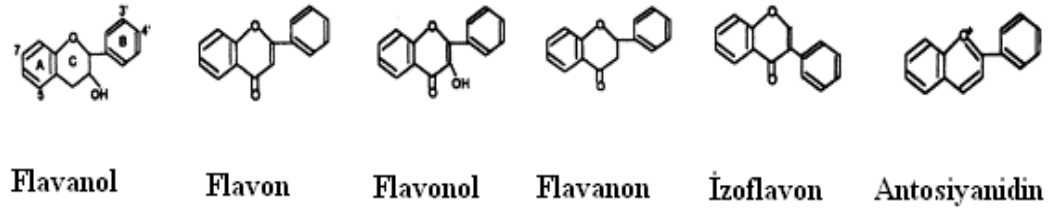
Şekil 2.8: Luteolin 7-O-glukozitin organik yapısı

Damar sertliği gibi patojenlerin oluşumunun bir sebebi olan aortik damar kası hücrelerinin anormal artışını önlemektedir [83, 88, 89]. Antioksidan potansiyeli ise Trolox testi ile ölçülmüş ve sentetik bir antioksidan olan butillenmiş hidroksi toluenden (BHT) daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Süperoksit radikallerinin süpürülmesinde E vitaminin iki katı potansiyele sahiptir. Tedavi edici özelliğinden faydalanılarak ülser ve egzama tedavilerinde önemli olan merhem ve kremlerde kullanılmaktadır. İltihap, baş ağrısı ve sinir hastalığı gibi durumlarda Çin'de kullanılan ilaçların içerisinde de

bulunmaktadır [104]. Katır tırnağı bitkisinden elde edilmiş olan luteolin 7-*O*-glukozitin kılcal damarları güçlendirdiği görülmüştür [105].

2.3.2.4. Luteolin 4'-*O*-glukozit

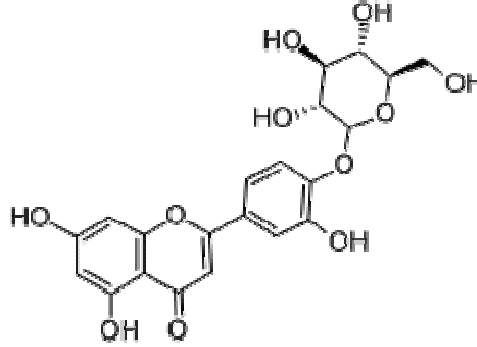
Luteolin 4'-*O*-glukozit de luteolin 7-*O*-glukozit gibi zeytin yaprağında en bol bulunan flavonoid gurubu fenolik bileşiklerinden birisidir [102]. Flavonoidler, bitkiler aleminde önemli miktarlarda (% 0.5 ile 1.5) sentezlenen fenol türevleridirler. Tüm flavonoidler, 3' - 4' dihidroksi konfigürasyonu ile antioksidan aktiviteye sahiptirler. Dolayısıyla bu bileşikler gıdalarda serbest radikalleri süpürme etkisi göstermektedirler. 4000'den fazla flavonoid tespit edilmiştir. Bitkilerin içeriğindeki bu komponentler bitkiyi ultraviyole radyasyonu, patojenler ve otçullardan korumaktadırlar. Şekil 2.9'da da gösterildiği gibi flavonoidler flavonlar, flavononlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler olmak üzere 6 guruba ayrılmaktadırlar [56, 57].



Şekil 2.9: Flavonoidlerin sınıflandırılmaları ve organik yapıları

Flavonoidlerin flavon sınıfından bileşik olan luteolin 4'-*O*-glukozit oleuropeosidler (oleuropein, verbaskozit, ligstrosid, oleurosid vb.) gibi zeytingiller familyasında fazlasıyla bulunmaktadır [54]. Tıpkı luteolin 7-*O*-glukozit gibi metabolizmada dikkate değer bir tamamlayıcı rol üstlenmektedir [104].

Molekül formülü $C_{21}H_{20}O_{11}$ ve molekül ağırlığı 448.38 g/mol olan luteolin 4'-O-glukozitin organik yapısı Şekil 2.10'da gösterilmiştir [106].



Şekil 2.10: Luteolin 4'-O-glukozitin organik yapısı

2.3.3. Zeytin Yaprağının Bileşimini Etkileyen Çevresel Faktörler

Dünya iklim sisteminde değişikliklere neden olan küresel ısınmaya bağlı olarak dünyanın bazı bölgelerinde kasırgalar, seller ve taşkınların şiddeti ve sıklığı artarken bazı bölgelerde uzun süreli, şiddetli kuraklıklar ve çölleşme etkili olmaktadır. Kışın sıcaklıklar artarken, ilkbahar erken gelmekte, sonbahar gecikmektedir. Kısacası iklimler değişmekte ve bu değişikliklere dayanamayan bitki türleri de ya azalmakta ya da yok olmaktadır. Yani bitkiler üzerinde önemli verim kayıpları yaşanmaktadır. Dünya nüfusunun artması ve tarım alanlarının bu artışa göre yetersiz olması, birim alandan daha fazla verim elde etme gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bitki bünyesindeki biyoaktif bileşenlerin seviyeleri hasat, elde etme ve depolama aşamalarında çeşitli faktörlerin etkisi altında değişmektedir [38-44]. Bitkiler farklı çevresel faktörlerin (kuraklık, sıcaklık, radyasyon, su baskını, rüzgar, kar ve buz örtüsü gibi fiziksel faktörler; hava kirliliği, bitki besin elementleri, pestisitler, toksinler, tuzlar, toprak pH'ı gibi kimyasal faktörler; yabancı bitkiler, böcekler, mikroorganizmalar, hayvanlar gibi biyotik faktörler) etkisi altında yaşamlarını sürdürmeye çalışırken, bu faktörlerdeki herhangi bir artış veya azalış bitkide stres meydana getirmektedir. Stres,

bitkide mevcut olan söz konusu biyoaktif bileşenlerden ikincil metabolitlerin miktarının değişiminde önemli derecede etkili olmaktadır [45-50].

2.3.3.1. Su Stresi

Hücreler hücre zarı denilen ince bir zarla çevrilidirler. Bu zar, protein ve fosfolipitlerden oluşmuş çift katlı sıvı bir biyolojik membran olarak düşünülebilir, dolayısıyla seçici geçirgendir. Bazı maddelerin geçmesine izin verirken bazı maddelerin geçişine izin vermez. Suyun hücre zarından geçişi osmoz denilen fiziki bir yolla meydana gelmektedir. Yarı geçirgen bir zarla ayrılmış bir ortamda suyun konsantrasyonunun yüksek olduğu yerden düşük olduğu yere doğru bir geçme eğilimi vardır. Bu geçiş, her iki taraftaki konsantrasyon eşit oluncaya kadar devam eder. Bu olaya osmoz denir. Bitkideki mevcut bu osmotik durum, bitkinin su stresine adapte olabilmesini sağlayan önemli proseslerden birisidir. Yetersiz suya maruz bırakılan bitkiler aminoasit (pirolin, aspartik asit gibi), protein, şeker (sukroz, glukoz, mannitol gibi) ve organik asitleri sentezlemekte ve biriktirmektedirler. Söz konusu maddelerin konsantrasyonunun yüksek olması suyun bu hücrelere ulaşmasını sağlayarak, bitki dokularının topraktaki düşük suya toleransını artırmaktadır [45].

Sudaki yetersizliğe karşı verilen tepki, bitkinin türü ile de ilgilidir. Örnek olarak zeytin ağacı, dokularının su ihtiyacını azaltarak su stresine direnebilmektedir [46]. Zeytin ağacı kurak, subtropik iklimin yaşandığı Akdeniz bölgesine özgü olarak kuraklık ve yüksek sıcaklık gibi çevre şartlarına karşı uyum gösterebilmektedir. Dolayısıyla kuraklığa yüksek tolerans göstermekte, terlemeyi ve su alımını kontrol etmekte ve bazı antioksidan enzimlerinin aktivitesini artırmaktadır. Su stresi, zeytin ağaçlarının yaprak anatomisinde de değişikliklere sebep olmaktadır. Bu değişiklik, kuraklığa adaptasyonda faydalı olmaktadır. Su stresi altındaki yaprağın boyutunun küçülmesi ve buna paralel olarak yaprak hücrelerinin yoğunluğundaki artış, yaprak liflerini ve stomasını artırmaktadır ki, yarı kurak bölgelerde bol olan yüksek sıcaklık ve güneş radyasyonuna uyumu sağlamaktadır [45].

Her geçen gün hızla artan dünya nüfusunun yeterli beslenebilmesi için tarımsal ürünlerin üretiminin de o oranda artması gerekmektedir. Tarım yapılan alanların sınırlı olması nedeniyle artan nüfusun beslenebilmesi ancak birim alandan alınacak verimin yükselmesi ile mümkün olacaktır. Kurak ve yarı kurak bölgelerde yaz aylarında doğal koşullar altında bitki gelişmesi için gerekli suyun sağlanması mümkün olmamaktadır. Özellikle yağışın çok az olması son yıllarda sık sık kuraklık olayları ile karşılaşılması, su kaynaklarının çok iyi kullanılması konusunu gündeme getirmektedir. Dünyanın büyük bir kısmı kurak iklim koşulları altındayken kültürü yapılan tüm bitkiler için geliştirme koşulları da dikkate alınarak kuraklığa dayanıklılık konusunda gerekli çalışmaların yapılması kaçınılmaz olmuştur. Kurak dönemlerde su eksikliği nedeniyle ürün kaybını en aza indirmek veya tamamen ortadan kaldırmak için optimum su uygulama programları geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.4. KATI - SIVI EKSTRAKSİYONU

Karışımları ayırmada farklı yöntemler izlenmesine rağmen hepsinin özünde iki faz oluşturmak ve daha sonra bu fazları mekanik tekniklerle birbirinden ayırmak ana fikri yatmaktadır. Heterojen karışımlarda zaten iki faz olduğu için bu tür karışımların ayrılması nispeten daha kolaydır. Bu temelden yola çıkarak ekstraksiyonun tanımı, herhangi bir madde karışımında bulunan bir ya da birkaç maddeyi uygun faz teşkil eden bir çözücü veya çözücü karışımı kullanmak suretiyle ayırma şeklinde yapılabilir [107]. Ekstraksiyon işlemi destilasyon, kromatografi, osmoz, kristalizasyon, termodifüzyon metodlarına benzer şekilde fiziksel bir ayırma yöntemidir. Bu tarz yöntemlerin dışında bir de kimyasal ayırma yöntemleri mevcuttur. Mesela petrolün saflaştırılmasında sülfirik asitten faydalanılır ve neticesinde aromatik bileşikler elde edilir. Bu proseste kimyasal olarak sülfolanma gerçekleşir ve oluşan sülfonik asit H_2SO_4 fazlasında çözünür, organik fazda çözünmez. Fiziksel metodların kimyasal metodlara bazı üstünlükleri söz konusudur:

- Bileşenlerin hiçbirini bozunmaz ve hiçbir yan ürün oluşmaz. Kimyasal yöntemlerde bazı bileşenler kayba uğrar ve genel olarak ayrılması çok zor olan yan ürünler oluşabilir. Bu yan ürünlerin ayrılması da bir maliyet problemidir. Bu sebepten dolayı fiziksel metodlar daha kullanışlı son ürünlerin elde edilmesine imkan sağlamaktadırlar.
- Genellikle fiziksel yöntemler çok daha ucuzdur. Fiziksel yöntemlerde maliyet neredeyse yalnızca harcanacak enerji ve ekipman sarfiyatının tekelindedir. Ancak kimyasal yöntemlerde ihtiyaç duyulan kimyasal malzemeler de maliyeti etkiler ve bu maddeler de enerji ve ekipmanın yanında oldukça maliyetlidirler.

Ekstraksiyonda fazlardan biri katı diğeri sıvı olabildiği gibi her ikisi de sıvı olabilir. Bu durumlara göre sırasıyla, katı - sıvı ve sıvı - sıvı ekstraksiyonlarından bahsedilebilir. Sıvı - sıvı ekstraksiyonu, çözelti içinde çözünmüş bir maddeyi, bu çözeltiyi kendisiyle karışmayan başka bir sıvı ile çalkalayarak alma işlemidir. Sıvı – sıvı ekstraksiyonu fenol, anilin, nitratlı aromatikler gibi yüksek kaynama noktalı organiklerin sudan uzaklaştırılmasında; formik asit, asetik asit ve formaldehit gibi hidrojen bağı ihtiva eden organiklerin sudan uzaklaştırılmasında; tıbbi ürünler, aromalar, tatlandırıcılar, gıda ürünleri gibi ısıya duyarlı maddelerin saflaştırılmasında; kaprolaktam, adiponitril, akrilik asit ve zirai kimyasallar gibi maddelerin reaksiyonlardan geri kazanımında; bazı petrol fraksiyonlarının ayrılmasında geniş bir uygulama alanı bulmaktadır [108].

Katı – sıvı ekstraksiyonu ise katı bir faz içerisinde olan ve katıdan özütleme (leaching), sıvıda özütleme (lixiviation) ve yıkama (washing) gibi kavramları da kapsayan bir terimdir. Çok bileşenli bir katıdan istenilen bileşenin bir çözücü ile çözülerek ayrılması işlemidir. Sıvı – sıvı ekstraksiyonuna benzemekle beraber daha fazla zaman alan ve daha zor bir süreçtir. Zira katı içerisindeki difüzyon sıvıdakinden daha yavaştır. Katı – sıvı ekstraksiyonuna günlük hayattan en güzel örnek çay veya kahve yapımıdır. Bakırın filizlerinden seyreltik sülfirik asitle kazanımı, soya fasülyesinden soya yağının, şeker pancarından şekerin, balıktan balık yağının, bitkilerden esansların, çay ve kahveden kafeinin elde edilmesi de yine katı - sıvı ekstraksiyonu ile gerçekleşen proseslerdir [109].

Katı - sıvı ekstraksiyon yönteminde, katı içinde bulunan madde, bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir çözücü yardımıyla alındığı için çözücünün seçimi son derece önemlidir. Çözücü seçiminde dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekilde sıralanabilir:

- “Benzer benzeri çözer” prensibinden yola çıkarak istenilen maddenin ekstraksiyonunda seçimli olmalıdır.
- Kullanılan çözücü kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Sistemdeki diğer komponentlere ve kullanılan teçizatın malzemesine karşı inert davranmalıdır.
- Kolay temin edilebilmeli ve maliyeti düşük olmalıdır.
- Düşük korrozivite, düşük viskozite, düşük bir donma noktası, düşük bir spesifik ısı ve buharlaşma ısı, düşük alevlenme veya patlama noktası gibi fiziksel özelliklere sahip olmalıdır [110].

Burada çözücünün ekstrakte edilecek katı malzemeye oranı da önemlidir. Çözücü miktarının yüksek olması ekstrakt verimini artırsa da, ekstraksiyon sonucunda elde edilecek ürünün seyreltik olması ve bu çözücüye buharlaştırmak için harcanacak enerji düşünüldüğünde, solutenin çözücüdeki doygunluk noktasına bağlı olarak çözücü kapasitesi belirlenmelidir.

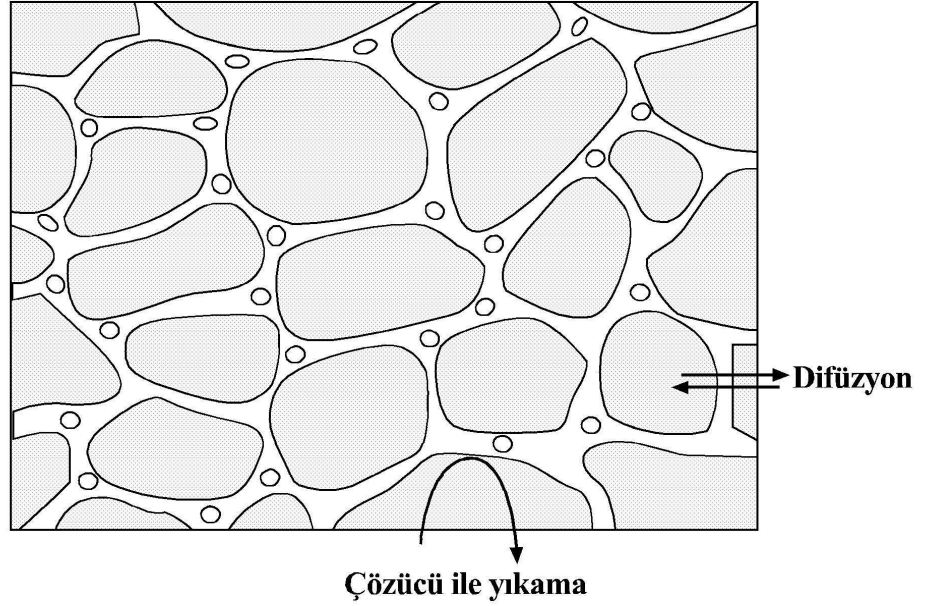
Çözücü ile ekstrakte edilecek malzemenin teması da katı – sıvı ekstraksiyonunda önemli bir diğer husustur. Kütle iletimi katı faz ile sıvı faz arasındaki ara yüzey ile orantılı olduğundan katı malzemenin boyutunun küçültülmesi ekstraksiyonu hızlandırmaktadır. Bitkilerin ekstraksiyonu hücresel yapıya sahip olmalarından dolayı diğer maddelerin ekstraksiyonundan biraz daha farklı olmaktadır. Bitki dokusu duvarlarla sarılmış hücrelerden oluşmaktadır. Kurutulmuş bir bitkisel malzemenin çözücü ile ekstraksiyonu, iki aşamalı bir süreçtir. Bunlar;

1. Bitki üzerindeki porların genişlemesini kolaylaştırmak için çözücü ile ıslatılması, böylece bitki dokusunun hidrasyonu ve şişmesi,
2. Bu genişletilmiş porlardan çözücüye solutenin difüzyon ve osmotik proseslerle geçişi.

Solitenin çözücüye geçişini sağlayan ekstraksiyon mekanizması ise iki fiziksel fenomenden ibarettir:

- Bitki hücrelerinde var olan solitenin difüzyon ile çözücüye geçmesi,
- Ufaltma ile duvarları parçalanan hücrenin çözücü ile yıkanarak içeriğindeki solitenin çözücüye geçmesi.

Şekil 2.11’de bitkisel bir doku üzerinde vuku bulan ekstraksiyon mekanizması şematik olarak gösterilmiştir [1].



Şekil 2.11: Bitki hücre dokusunun şematik gösterimi

Söz konusu ekstraksiyonda meydana gelen kütle iletimine sebebiyet veren itici güç, ekstrakte edilecek maddelerin bitkideki konsantrasyonları ile çözücüdeki konsantrasyonları arasındaki farktır.

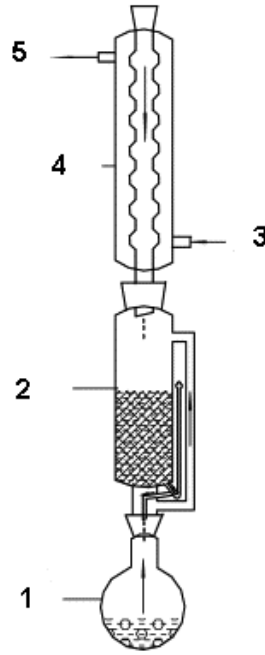
Katı – sıvı ekstraksiyon işlemleri geleneksel ve ileri metotlar olmak üzere iki grup halinde incelenebilir. Klasik çözücü ekstraksiyonu ve sokslet metodu geleneksel yöntemlerdir. Ekstrakte edilecek metaryel direkt olarak çözücü içerisine batırılacağı

gibi ısı ve karıştırma gibi takviye güçler uygulanabilmektedir. Klasik bir çözücü ekstraksiyonunun başarısı ısı ve/veya karıştırma ile beraber seçilen çözücüye bağlıdır. Bu yöntemlerde işlemlerin uzun sürmesi, büyük miktarlarda çözücü tüketiminin olması ve bu çözücülerini geri kazanırken meydana gelen yüksek enerji tüketimi gibi dezavantajlar, ileri ayırma yöntemlerinin doğmasına sebep olmuştur. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Microwave-Assisted Extraction, MAE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (Accelerated Solvent Extraction, ASE) gibi yöntemler geleneksel yöntemlere nazaran yatırım maliyetleri yüksek olmasına rağmen hem hızlı hem de oldukça etkilidirler [111].

2.4.1. Sokslet Yöntemi

Sokslet yöntemi, eskiden beri kullanılan ve ekstraksiyondaki performansı tamamen seçilen çözücüye bağlı olan standart bir tekniktir. Şekil 2.12 ile aparatı gösterilmiş olan sokslet metodunun çalışma prensibi şu şekilde ifade edilebilir [111]:

Balon içerisinde bulunan ve ısıtıcı ile kaynatılan çözücü buharları soğutucuya doğru ilerleyerek burada yoğunlaşmaktadır. Yoğunlaşan çözücü kartuş içerisine yerleştirilmiş olan katı maddenin içinden geçerek katı içindeki soluteyi alıp sifon yaparak balona geri dönmektedir. Sifon sayısı arttıkça balonda kaynayan çözücü içindeki ekstrakte edilen madde miktarı da artmaktadır.



Şekil 2.12: Sokslet aparatı. 1- Kaynama balonu, 2- Sokslet ekstraktörü, 3- Soğutma suyu girişi, 4- Yoğunlaştırıcı, 5- Soğutma suyu çıkışı.

Sokslet metodu ile elde edilen ürün içerisindeki çözücü, buharlaştırmayla uzaklaştırılmaktadır. Dolayısıyla, ekstraksiyon ve buharlaşma sıcaklıklarının ürünün kalitesi üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Kaynama noktası yüksek bir çözücü seçildiğinde işlem için gerekli uzun ekstraksiyon ve buharlaşma süreleri, elde edilen ekstraktın görüntüsünü daha koyu renkli hale getirebilmektedir. Yüksek kaynama noktalı çözücülerin geri kazanımı vakum uygulanarak veya membran ile ayrılarak da yapılabilir.

Sokslet, her ne kadar ucuz, basit, filtrasyon basamağına ihtiyaç duymayan, yerleşmiş bir yöntem olsa da pek çok dezavantajı bulunmaktadır. Ekstraksiyon süresi uzundur. Bu uzun ekstraksiyon süreleri kararsız bileşenlerin bozunmasına yol açmaktadır. Prosesi hızlandırabilecek bir karıştırma imkanı da bulunmamaktadır. Çok fazla

miktarda çözücü tüketimi söz konusudur. Bu da uçurulması gereken çözücü için harcanan enerjinin yüksek olmasına yol açmaktadır [112].

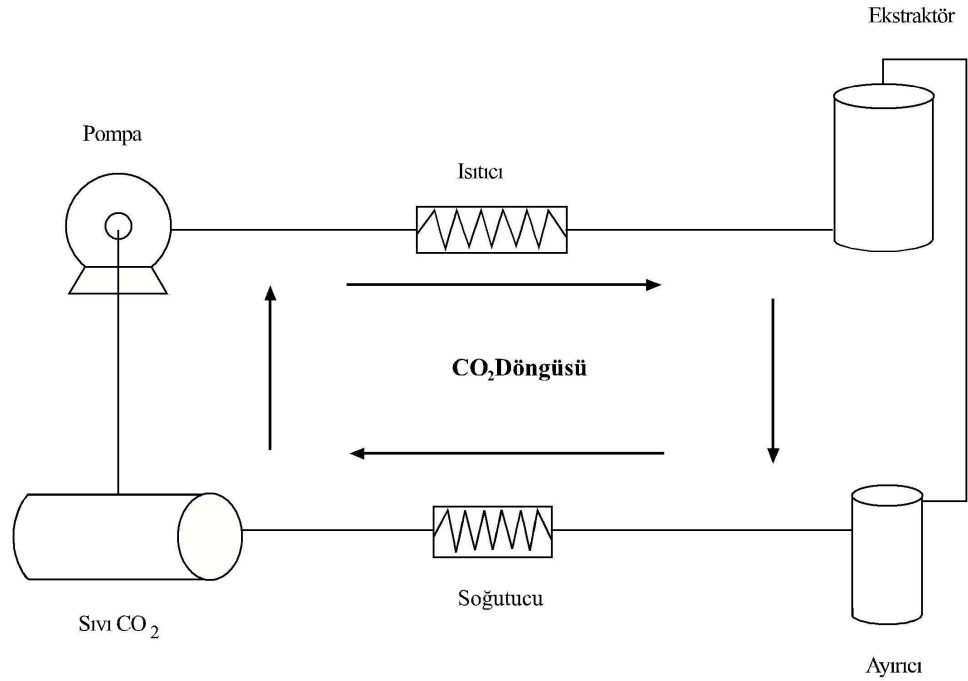
2.4.2. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Klasik çözücü ekstraksiyonu, proseslerde kullanılan sıvı karışımlarının çözünürlüklerinin ve özelliklerinin anlaşılması ile zaman içerisinde geliştirilmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu geliştirilen metodlardan biri olup, çözücü olarak kullanılan akışkanın (çoğu kez CO₂'tir) kritik üstü koşullarda sahip olduğu üstün çözme gücünden faydalanılması esasına dayanır. Bir maddenin kritik noktası ilk kez Boron Cagniard de La Tour tarafından 1822'de gözlemlenmiştir. 1879 yılında Royal Society seminerlerinde (Londra) Hannay ve Hogart, metal halojenürler gibi katı maddelerin süperkritik metanol ve CCl₄'de çözüldüğünü rapor ederek bir bakıma yeni bir solventin olasılığını da göstermiş olmuşlardır. Birkaç yıl sonra Eduard Buchner uzun süren bir çalışmanın ardından bir model bileşik olarak naftalinin süperkritik CO₂ içindeki çözünürlüğünü ölçmüştür. Francis 1954'te yayınladığı bir makalede 261 tane farklı bileşenin süperkritik CO₂ içerisinde çözüldüğünü belirtmiştir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun ticari uygulamaları ise yalnızca 1960 yılından itibaren gerçekleştirilmiştir [15, 113].

Diğer taraftan endüstrinin çeşitli alanlarında tüketilen çok büyük miktarlardaki organik çözücüler, çevreye çok ciddi bir tehdit oluşturmaktadır [114, 115]. Bu sebepten dolayı tehlikeli çözücülerin üretimi ve tüketiminin sınırlandırılması veya tamamen ortadan kaldırılması amacıyla 1987 yılında Montreal Protokolü takdim edilmiştir [15]. Özellikle Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency, EPA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Yönetimi (U S Food and Drug Administration, FDA) süperkritik akışkan ekstraksiyonu metodlarının gelişimi için bu kapsamda çaba göstermektedir. Bunun dışında Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (European Food Safety Authority, EFSA) gibi kuruluşlar da daha temiz teknolojiler için türlü kısıtlamalar getirmektedirler. Sonuç olarak çevreye zarar veren, organik çözücülerin tüketimini gerektirmeyen yeni tekniklerin kullanımı konusunda dünya çapında büyük bir baskı söz konusudur. 1970'li yılların sonundan itibaren doğal ürünlerin ayrılmasında süperkritik akışkanlar

kullanılmaktadır. Fakat uzunca bir süre, ticari uygulamalar yalnızca bir kaç ürün üzerinde kalmıştır. 1980’lerde bu konu üzerinde yapılan yoğun araştırma sayısı 1990’lı yıllarda ciddi bir azalma göstermiştir [30, 31]. Günümüzde ise farklı proses ve ekipmanın geliştirilmesi ile bu açık kapatılmaktadır. Son yıllarda yapılan araştırma sayısının artması da bu ilginin bir göstergesidir. Buna ilave olarak 1990’lı yıllardan beri endüstriyel süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamaları çok sayıda patent almıştır [15].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda akışkan olarak uygun süperkritik özelliklere sahip olması nedeniyle uygulamaların yaklaşık % 98’inde CO₂ kullanılmaktadır [30]. Tipik bir süperkritik akışkan ekstraksiyon işleminin akış diyagramı Şekil 2.13’te verilmiştir.



Şekil 2.13: Süperkritik akışkan ekstraksiyon sisteminin şematik gösterimi

Buna göre sistemdeki sıvı CO₂ önce bir pompa ile istenilen basınç değerine ayarlanır. Buradan bir ısıtıcıya gönderilen akışkan istenilen sıcaklık değerine ısıtılır. Böylece süperkritik sıcaklık ve basınç değerlerine getirilmiş olan akışkan, sıcaklığı sabit tutulan

bir ekstraktöre gönderilir. Ekstraktörde bulunan madde ile temas sonucu, süperkritik CO₂'de çözünen karışım bir ayırıcıya alınır ve basıncı düşürülür. Basıncının düşürülmesi sırasında çözme gücünü kaybeden akışkan üründen ayrılır. Ayırıcıdan alınan CO₂ gazının geri kazanımı için bir soğutucuda sıcaklığı düşürülmektedir. Soğutucudan çıkan sıvı CO₂ tekrar sisteme beslenmek üzere sıvı CO₂ tüpünden alınan akımla karıştırılır. Elde edilen ürün ya da ürünler ayırıcının altından toplanır.

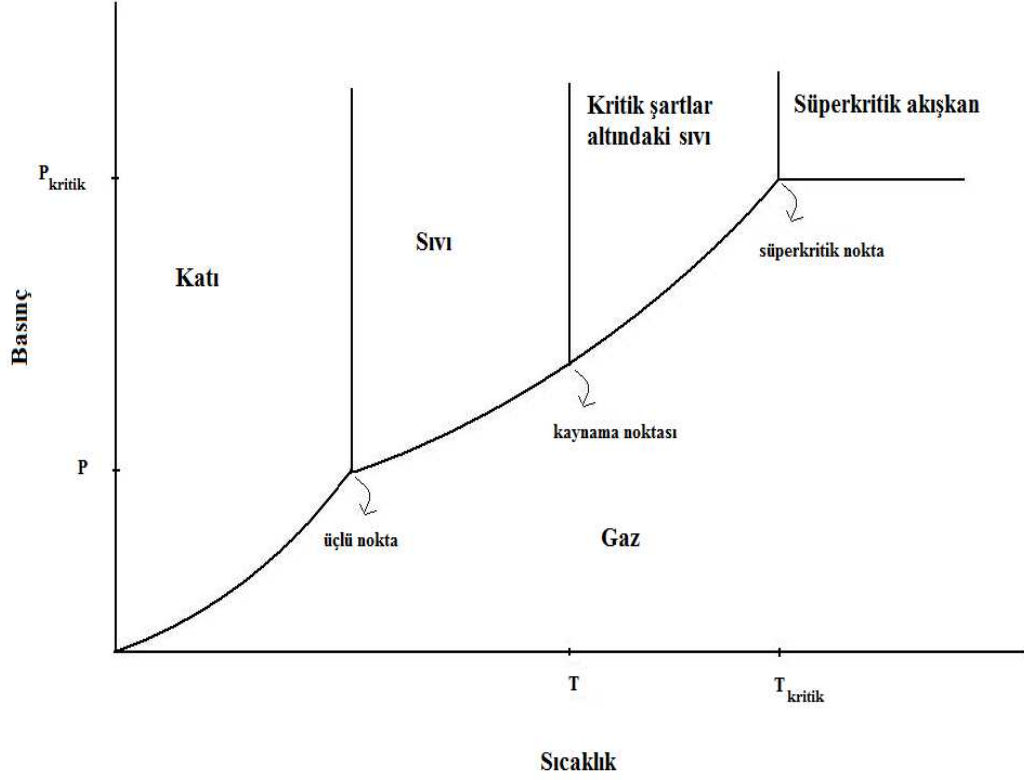
Süperkritik akışkan ekstraksiyon yöntemi yeni gıdalar, gıda katkı maddeleri ve farmosötikler gibi ürünlerin geliştirilmesi için günümüzde önemli bir alternatiftir. Ayrıca çevresel açıdan çözücü tüketimini azaltmak, endüstriyel yan ürünlerden kıymetli bileşikler elde etmek ve ortamdan bileşikler uzaklaştırmak gibi bazı avantajlarını kanıtlamıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu sonunda, çözücü olarak kullanılan CO₂ normal koşullarda gaz haline geçip ortamdan kolayca ayrılmaktadır. Dolayısıyla ekstraksiyon sonrası ayrılması istenen maddenin istenmeyen bileşenlerden temizlenmesi ve yoğunlaştırılması gibi ekstraksiyon sonrası yöntemlere gerek kalmamaktadır.

2.4.2.1. Kritik Sıcaklık ve Kritik Basınç

Bir gazın davranışı, basıncın artması ve sıcaklığın azalmasıyla ideallikten giderek daha çok sapmaktadır. Bu koşulların sınırında gazlar sıvılaşmaktadır. Bir gazın sıcaklığı arttıkça gazın sıvılaştırılması güçleşmekte ve dolayısıyla da yüksek basınç uygulaması gerekmektedir. Her gaz için öyle bir sıcaklık değeri vardır ki bu sıcaklığın üstünde ne kadar yüksek basınç uygulanırsa uygulansın gaz sıvılaştırılmaz. Bu sıcaklığa o gazın “kritik sıcaklığı” denir. Bir gazı kritik sıcaklığında sıvılaştırmak için gerekli minimum basınca ise “kritik basınç” denir (Şekil 2.14). Kritik sıcaklık öyle bir sıcaklık noktasıdır ki, bu noktadan sonraki sıcaklık değerlerinde maddenin gaz ve sıvı hali birbirinden kesin olarak ayırt edilememektedir. Yani madde gaz ve sıvı halini bir arada gösterebildiği gibi, ne sadece gaz ne de sadece sıvı gibi hareket etmektedir [116].

“Süperkritik hal”, bir maddenin alabileceği kritik basınç ve kritik sıcaklık değerlerinden daha yüksek değerlere ulaşması halinde alacağı haldir. Bundan kasıt, o maddenin gaz ve

sıvı halinin denge durumunda kalmasını sağlayan en yüksek sıcaklık ve basınç değerleridir.



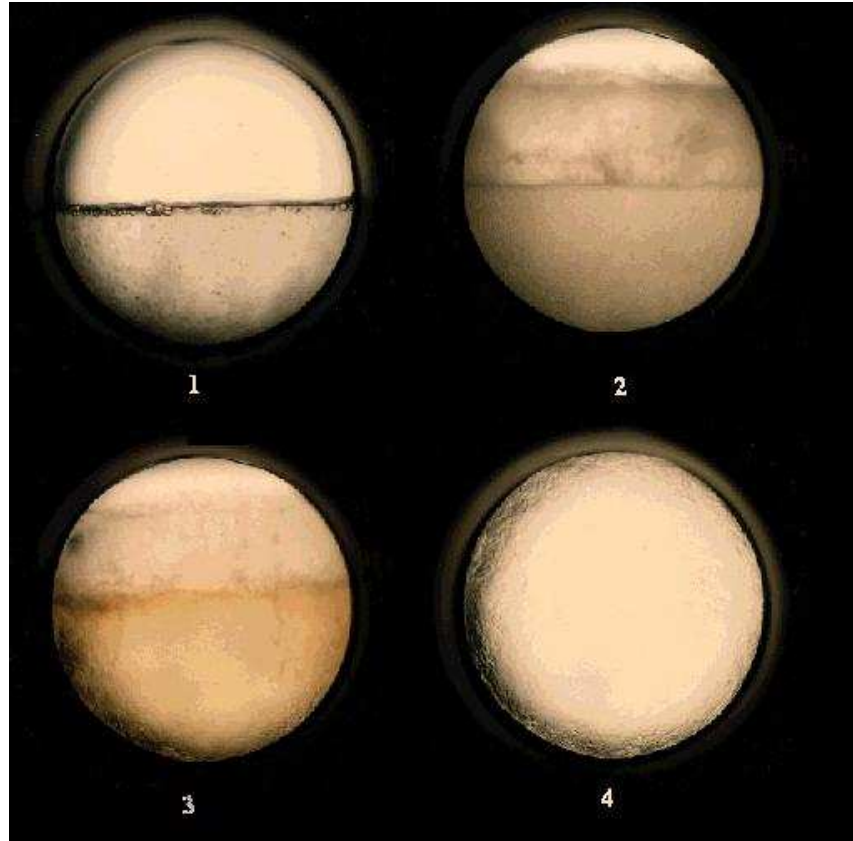
Şekil 2.14: Maddenin sıcaklık - basınç faz diyagramı

2.4.2.2. Süperkritik Akışkan

Bir maddenin sıcaklık-basınç faz diyagramında (Şekil 2.14), gaz-sıvı denge eğrisi üzerinde ileriye doğru hareket edilecek olursa, sıcaklık ve basıncı artmaktadır. Isıl genleşmeler nedeniyle sıvının yoğunluğu azalırken, basıncın artmasından dolayı gazın yoğunluğu artmaya başlamaktadır. Giderek iki fazın yoğunlukları birbirine yaklaşarak, gaz ve sıvı arasındaki farklar kaybolur ve eğri bir kritik noktaya gelir. Bu noktada madde artık “akışkan” olarak adlandırılabilir. Böylece maddenin sıcaklığı kritik sıcaklığının, basıncı ise kritik basıncının üzerine çıkarıldığında katı, sıvı ve gaz

fazlarından daha farklı yeni bir bölge ortaya çıkar ve bu bölgedeki akışkan “*süperkritik akışkan*” olarak tanımlanır [117-121].

Çok sık kullanılan bir akışkan olan karbondioksitin süperkritik akışkan halini alırken geçirdiği faz değişimi Şekil 2.15 ile gösterilmiştir [122]. Şekle göre, başta CO₂’in sıvı ve gaz fazları belirgin bir şekilde ayırt edilmektedir (1). Ara yüzey yani menisküs rahatlıkla farkedilmektedir. Sıcaklığın artması ile beraber menisküs kaybolmaya başlamaktadır (2). Sıcaklığın daha fazla artması sıvı ve gaz yoğunluklarını birbirine yaklaştırmakta ve menisküsün farkedilmesini güçleştirmektedir (3). Kritik sıcaklık ve basınç değerlerine ulaşıldığında ise ara yüzey tamamen ortadan kalkmakta, sıvı ve gaz fazları artık ayırt edilememektedir (4).



Şekil 2.15: Karbondioksitin süperkritik hali alırkenki faz değişimleri

Değerli ve ortam koşullarına duyarlı ham maddelerin süperkritik akışkanlarla ekstraksiyonu işleminde kullanılacak akışkanın seçimi son derece önemlidir. Bu seçimde, ham maddelerin akışkan içindeki çözünürlüğü, akışkanın kimyasal kararlılığı, ekonomik ve kolay bulunabilen bir akışkan olması ve toksik, patlayıcı ve yanıcı olmaması gibi güvenlik sorunları göz önünde tutulmalıdır. Tablo 2.4'te bazı önemli çözücülerin kritik sıcaklık ve basınç değerleri verilmiştir.

Tablo 2.4: Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda kullanılabilecek saf çözücüler

Çözücü	Kritik Sıcaklık (°C)	Kritik Basınç (atm)	Kritik Yoğunluk (g/mL)
Metan	-83.2	45.40	0.162
Etilen	9.3	49.64	0.218
Kloroformetan	28.9	38.68	0.579
Karbondiyoksit	31.06	72.83	0.468
Etan	32.3	48.16	0.203
Propilen	91.9	45.59	0.233
Propan	96.7	41.84	0.217
Amonyak	132.5	111.52	0.235
Dietil eter	194.6	35.92	0.265
Pentan	196.5	33.26	0.237
Aseton	235	46.4	0.278
Metanol	239.5	79.84	0.272
Benzen	289	48.26	0.302
Toluen	318.6	40.56	0.292
Pridin	346.9	55.56	0.312
Su	374.2	217.11	0.322
Ksenon	16.6	57.63	1.113

Literatürde yapılan çalışmalar, süperkritik akışkan ekstraksiyonunda uygulamaların % 98’den fazlasının CO₂ ile gerçekleştirildiğini göstermektedir. Bu da CO₂’in ekstraktan olarak bu teknolojiye ne kadar hakim olduğunu göstermektedir [30]. Ekstraksiyon işleminde CO₂ kullanımının getirdiği avantajları şu şekilde sıralamak mümkündür:

Faz dengesi:

- Düşük molekül ağırlıklı hidrokarbon ve oksijenli organik bileşiklerle kolay karışabildiği için iyi bir çözücüdür.
- Sudaki çözeltilerden organik maddelerin kolaylıkla ekstrakte edilmesi mümkündür.
- Diğer organik çözücülerle karşılaştırıldığında uçuculuğu yüksektir. Bu nedenle ürünün geri alımı ve CO₂’in sisteme yeniden çevrilmesi kolaydır.

Taşıma özellikleri:

- Viskozitesi düşüktür.
- Difüzyon katsayısı yüksek olduğundan katı kısımlara kolayca nüfuz eder.
- Isıl iletim özellikleri çok iyidir.

Termodinamik Özellikleri:

- 31.06 °C ve 72.83 atm olan kritik sıcaklık ve kritik basınç değerlerine kolaylıkla ulaşılabilir.
- Buharlaşma ısısı küçük olduğundan, özellikle kritik noktaya yakın bölgede düşük enerjiye ihtiyaç duyar.

Güvenilirlik:

- Toksik değildir.
- Çevre açısından herhangi bir problem oluşturmaz.
- Yanıcı değildir.
- Korozyon özellik göstermez.

Ekonomi:

- Maliyeti düşüktür.
- Kolaylıkla ve saf halde eldesi mümkündür [15-29].

2.4.2.3. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunu Etkileyen Parametreler

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunu etkileyen değişkenlerin optimum değerlerinin kullanımı, istenilen maddenin geri kazanımı açısından son derece önemlidir. Bu yöntemde her bir parametrenin diğer bir parametre üzerine etkisi söz konusu olabilmektedir. Ayrıca, elde edilen verinin doğruluğundan emin olabilmek için tekrarların, kalite kontrollerinin ve cihaz bakımının yapılması gerekmektedir.

- *Numune hazırlama ve akışkanın akışı:* Yeni bir metod geliştirirken dikkate alınması gereken ilk husus numunenin boyutuna karar vermektir. Boyutun küçülmesi ekstraksiyonu hızlandırmaktadır. Fakat, akışkanın akışında da aksaklıklara sebep olmaktadır. Akış hızı sorununu ortadan kaldırmak için numune küresel cam veya deniz kumu gibi inert maddelerle paketlenmelidir. Bu maddeler numuneyi katı ve geçirgen olmayan bir tabakaya dayatmaktan kurtarır ve böylece numune yatağının istenilen geçirgenliğe sahip olması sağlanır. Ekstraksiyon hücresinin giriş ve çıkış kısımlarına yerleştirilen filtreler de akışkan akışının düzenli olmasına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, analitin muhtemel bir degrade olma ve buharlaşma gibi sonuçlarının önüne geçilebilmesi için örnek bir sıvı yardımı olmaksızın homojenize şekilde bulunmalıdır. Söz edilenlere ilave olarak numune içerisindeki suyun varlığı ya da yokluğu bu ekstraksiyon yönteminde çok önemli bir rol oynamaktadır. Su, ekstrakte edilecek malzemenin matrisine, soluteye ve miktarına bağlı olarak ekstraksiyonun yararına veya zararına olabilir. Maddenin yapısındaki porları açarak matrisin şişmesine ve dolayısıyla akışkanın solute ile daha iyi etkileşime girmesine sebep olarak ekstraksiyon verimini artırabilmektedir. Ayrıca, polar maddelerin ekstraksiyonunda süperkritik akışkanın polaritesini arttıran bir yardımcı çözücü gibi rol oynayabilmektedir. Diğer taraftan, ekstraksiyon esnasında buz oluşumuna bağlı olarak vana veya musluğun tıkanmasına neden olmaktadır [19, 28].
- *Tanecik boyutu ve homojenlik:* Ekstrakte edilecek maddenin katı içinden difüzyonlanması yavaş olduğu için katı materyal ekstrakte edilmeden önce

ufalanmalıdır. Yüzey alanı artırılmış olan numune, çözücü ile bu şekilde daha fazla temas edebilmektedir. Fakat burada uygun bir tanecik boyut aralığı seçilmelidir. Çünkü tanecik boyutunun büyük olması ekstraksiyonu difüzyon kontrollü hale getirerek ekstraksiyon süresini uzatmaktadır. Boyutun çok küçük olması ise ekstraktörde düzenli bir akışkan akışını engelleyebilmektedir. Çünkü çok küçük partiküllerin nem kapma hızı yükselmekte ve yapışkanlığı artmaktadır. Bu durum da sistemin hatlarında veya vanalarında tıkanmalara sebep olmaktadır. Ayrıca çok küçük partiküllerin yüzey alanının büyük olması özellikle doğal maddelerin ekstraksiyonunda matrinden desorbe olmuş analitin tekrardan adsorbe olmasına yol açabilmekte ve dolayısıyla ekstraksiyon verimini düşürmektedir [19, 28]. Boyut küçültürken numunenin dondurulması da yine homojenizasyon açısından tavsiye edilen bir durumdur. Örneği donmuş olarak muhafaza edebilmek için kuru buz ya da sıvı azot kullanımına başvurulabilmektedir.

- *Kurutma:* Ekstraksiyon işlemine başlamadan yapılması gereken ilk ön işlem ekstrakte edilecek malzemenin kurutulmasıdır. Nemin varlığı nedeniyle ekipmanın vanalarında oluşabilecek tıkanıklar mekanik olarak aksaklıklara ve dolayısıyla zaman ve verim kayıplarına yol açabilmektedir. Bitkilerdeki suyun uzaklaştırılmasında $MgSO_4$, Na_2SO_4 gibi maddelere, silika jel, diatome toprak, hidromatriks gibi adsorbentlere ve 2, 2 dimetoksi propan, dietoksi propan gibi asetallere başvurulmaktadır. Bu tür maddeler kurutmanın yanı sıra ekstraktör içerisindeki ölü hacmin de bertaraf edilmesini sağlamaktadır. Ayrıca akışkan ile numune arasındaki teması artırmaktadır. Yalnız burada $MgSO_4$, Na_2SO_4 gibi maddeler diğerlerinden daha pahalı olma, ısınma ve tıkanma problemleri çıkaracak şekilde ufak parçalardan oluşma gibi dezavantajlara sahiptir.

Buna ilaveten vakumda, liyofilizasyon (dondurarak kurutma) ve açık havada olmak üzere çeşitli kurutma yöntemleri de uygulanabilmektedir. Kurutmadaki esas, ürün kalitesini bozmadan en kısa sürede ve en az enerji harcayarak içeriğindeki nemi uzaklaştırmaktır [19, 28].

- *Yardımcı çözücü etkisi:* Ekstraksiyon işleminde doğrudan bir polar çözücü kullanmak yerine, apolar bir çözücü olan süperkritik CO₂ içerisine belirli oranlarda polar bir çözücü ilave etmek suretiyle çözücünün polaritesinde bir artış sağlama yoluna gidilmektedir. Yardımcı çözücünün türü ve/veya çözücü sistemi içerisindeki oranı ekstraksiyonun verimini önemli derecede etkilemektedir.

Ekstrakte edilcek maddenin matrisine ve solutenin matrise olan afinitesine bağlı olarak yardımcı çözücünün ekstraksiyona etkisi iki şekilde açıklanmaktadır [22, 24-26, 123, 124].

1. Akışkan içerisindeki solute ile yardımcı çözücü arasındaki etkileşimin bir neticesi olarak solutenin süperkritik akışkan içerisindeki çözünürlüğünü arttırmak,
2. Hücre üzerindeki porları açarak, matrisin şişmesini sağlamak, ve böylece solutenin matrisden süperkritik akışkana iletimini kolaylaştırmaktır.

Buradaki durum özetle süperkritik akışkan, yardımcı çözücü ve matriks olmak üzere üç metaryalin birbiri ile olan ilişkisi ile meydana gelmektedir. Şöyle ki, bu tür sistemlerdeki verim artışında polar bir çözücünün kullanılması ile çözünürlüğün artırılması şeklindeki bir açıklama yetersiz kalmaktadır.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun kullanılma sebeplerinden biri de az miktarda çözücü tüketimi olduğuna göre mümkün olduğunca düşük oranda yardımcı çözücü ilave etmek hedeflenmelidir. Ayrıca eklenen yardımcı çözücü miktarının çok yüksek olması ekstrakt miktarında aşırı bir artışa ve dolayısıyla ekstrakt alım hattında türlü problemlere de sebep olabilmektedir [28]. Solute ile matris arasındaki etkileşimlerin fazla olduğu durumlarda ise yardımcı çözücü seviyesinin yüksek olması ekstrakt veriminde pek fazla etkili olmayabilmektedir [121]. Bu durumda ekstraksiyonda, ekstrakte edilecek metaryalin ve istenilen bileşenin yapısı daha fazla öne çıkmaktadır. Yardımcı çözücünün fazla ilave edilmesinin bir dezavantajı da zayıf seçiciliğe de yol açmasıdır. Klorofiller ve mumsu maddeler gibi yüksek safsızlık oluşturan bileşenler de aranan madde ile beraber ekstrakte edilebilmektedir.

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yönteminde CO₂'i modifiye etmek için genel olarak kullanılan yardımcı çözücüler dielektrik sabitleri ve polarite indeksleri ile beraber Tablo 2.5'te verilmiştir [125].

Tablo 2.5: Süperkritik akışkan ekstraksiyonu yönteminde CO₂'i modifiye etmek için kullanılan çözücüler ve sahip oldukları dielektrik sabitleri ve polarite indeksleri

Yardımcı çözücü	Dielektrik sabiti (20 °C)	Polarite indeksi
Metanol	32.70	5.1
Etanol	24.30	4.3
Propan-1-ol	20.33	4.0
Propan-2-ol	19.30	3.9
Hekzan-1-ol	13.30	3.5
2-Metoksietanol	16.93	5.5
Tetrahidrofuran	7.58	4.0
1,4-Dioksan	2.25	4.8
Asetonitril	37.50	5.8
Diklorometan	8.93	3.1
Kloroform	4.81	4.1
Propilen karbonat	69.00	6.1
N,N-Dimetilasetamid	37.78	6.5
Dimetil sülfoksit	46.68	7.2
Formik asit	58.50	-
Su	80.10	10.2
Karbon disülfid	2.64	-

- *Sıcaklık:* Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda sıcaklığın artması çözücü molekülleri arasındaki mesafeyi artırarak çözücünün yani süperkritik akışkanın yoğunluğunun azalmasına sebep olmaktadır. Bu durum çözücü yoğunluğun

azalmasıyla beraber akışkanın çözme gücünü azaltması şeklinde açıklanabilir [6, 28, 59, 113, 118–121, 126-128]. Fakat aynı durum farklı bir açıdan da yorumlanabilmektedir. Şöyle ki, sıcaklık artışı çözücü moleküllerinin kendi içindeki etkileşimini azaltarak (yani aradaki mesafeyi açarak) çözücü ile çözünen madde molekülleri arasındaki etkileşimi arttırmakta ve dolayısıyla ekstraksiyon veriminin artmasını sağlamaktadır. Ayrıca, sıcaklığın artması ile akışkanın difüzivitesi ve akışkanlığının artması da solutenin matrisden süperkritik akışkan ortamına geçişinde etkili olmaktadır [26]. Bu yöntemde sıcaklık artışının bir diğer önemli etkisi de solutenin buhar basıncını yükselterek verimi artırmasıdır [4, 59, 127, 129].

- *Basınç:* Süperkritik akışkanın çözme gücü, yoğunluğunun bir fonksiyonu olduğundan ve yoğunluğun da basıncın artması ile beraber artması temelinden yola çıkarak, sistemin basıncının artması ile ekstraksiyon veriminin de arttığı söylenmektedir [6, 28, 59, 113, 118–121, 126-128]. Burada söz konusu olan diğer bir durum ise basıncın artması ile yoğunluğu artan akışkanın kendi içerisindeki moleküllerinin etkileşiminin artması ve çözünen ile olan etkileşiminin azalması ve dolayısıyla ekstraksiyon veriminin düşmesidir.
- *Akış hızı:* Süperkritik akışkanın ekstraksiyondaki akış hızının düşük olması hem daha az miktarda akışkan tüketimini sağlamakta hem de akışkanın matris içindeki kalma süresi arttığından ekstrakte edilen maddenin alınması kolaylaşmaktadır. Akış hızının yüksek olması ise daha fazla miktarda akışkan kullanımını gerektirmektedir. Diğer taraftan akış hızının yüksek olması ekstraksiyonu hızlandırmakta ve daha fazla çözücü kullanıldığından daha fazla verim elde edilmesini sağlamaktadır [130]. Akış hızının ekstraksiyon verimine etkisi ekstrakte edilecek metaryalin yapısı ile de ilgilidir. Bazı örnekler üzerinde etkisi yüksek iken bazılarında hemen hemen hiç etkisi olmayabilmektedir. Dolayısıyla akış hızı ile ekstraksiyon verimi arasındaki ilişkiyi kurarken hem teorik temeller hem de pratikte yöntem geliştirmeye ihtiyaç vardır [131].

- *Çıkış vanası sıcaklığı:* Ürün verimi açısından önemli bir diğer parametre ise çıkış vanası sıcaklığıdır. Akışkanın ekstraktörü terk edip normal atmosfer koşullarına çıkış yaptığı hatta (vanada), genleşmeden dolayı aşırı soğuma meydana gelmektedir. Çıkış vanası sıcaklığı ekstraksiyon sıcaklığının biraz üzerinde tutularak sistem içerisinde donmadan kaynaklanan tıkanmaların önüne geçilebilmekte ve muhtemel bir aksaklık engellenebilmektedir [117].

2.4.2.4. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonunun Uygulama Alanları

Bu teknolojinin endüstriyel uygulamaları olan kahveden kafeinin ve şerbetçi otundan acı asitlerin ekstraksiyonu çok bilinen proseslerdir. İlkindeki amaç, özel bir bileşeni yani kafeini uzaklaştırarak hem kahvenin ticari değerini arttırmak hem de kafeini ticari olarak ayrıca değerlendirmektir. Diğerinde ise amaç sadece ticari değeri yüksek bir bileşeni şerbetçi otundan ekstrakte ederek elde etmektir. Bu bilinen uygulamalar dışında trigliseridlerin ve yağ asitlerinin arıtılması, doğal ürünlerden çeşnilerin, baharatların ve esansiyel yağların ekstraksiyonu, antioksidan maddelerin üretimi, düşük yağ ve düşük kolesterolü gıda maddelerinin üretimi, tütünden seçimli olarak nikotinin ayrılması da yine bu tekniği endüstriyel çapta kullanan uygulama alanlarıdır [15, 125].

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamalarında ekstrakte edilecek bir malzemenin ideal kabul edilebilmesi için geçirgenliğinin iyi, etkileşimlere imkan veren geniş bir yüzey alanına sahip yeterince ufalanmış bir katı olması gerekmektedir. Toprak, partiküller ve kurutulup ufalanmış bitkiler süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamalarında ekstrakte edilen tipik metaryellerdir. Polimerler gibi yarı geçirgen malzemeler de çok kötü olmamakla beraber kısmi geçişe imkan tanıdıkları için yine ekstrakte edilebilecek maddelerdir. En kötü örnekler ise balık gibi ıslak organizma dokularıdır. Çünkü bunlar geçirgen değildirler. Kurutma yöntemine başvurmak mümkündür, fakat bu seferde rutin bir kullanımda ekstra bir aşama ilave etmek hem maliyeti arttıracak hem de vakit kaybına neden olacaktır [132].

Bu alanda yapılan araştırmaların büyük bir kısmını çevre ile ilgili çalışmalar oluşturmaktadır. Toprakta pestisitlerin, ağır metallerin ve süreç akımlarından toksik atıkların uzaklaştırılması gibi çevresel örneklerden organik kirleticilerin ayrılması

çalışmalarında büyük ilgiye sahip olmasında CO₂'in apolar yapıda bir akışkan olmasının önemi vardır. Özellikle de poliaromatik hidrokarbonlar gibi polar olmayan kirleticileri uzaklaştırmada CO₂ tartışmasız ideal bir çözücü olmaktadır.

Kahveden kafeinin uzaklaştırılması dışında çeşitli gıda bileşenlerinden yağların uzaklaştırılması da en eski uygulamalarındandır. Bunların dışında gıdadaki diğer uygulamaları aroma ve uçucu bileşenlerin bitkisel ve gıda maddelerinden ekstraksiyonu, gıdaların paketlenmesi ile gıdaya bulaşan pestisit kalıntılarının ve polimer katkı maddelerinin uzaklaştırılmasıdır. Yağlı tohumlardan yağın ve lipofilik antioksidan maddelerin ekstrakte edilmesi gıda sektöründeki uygulamalardır.

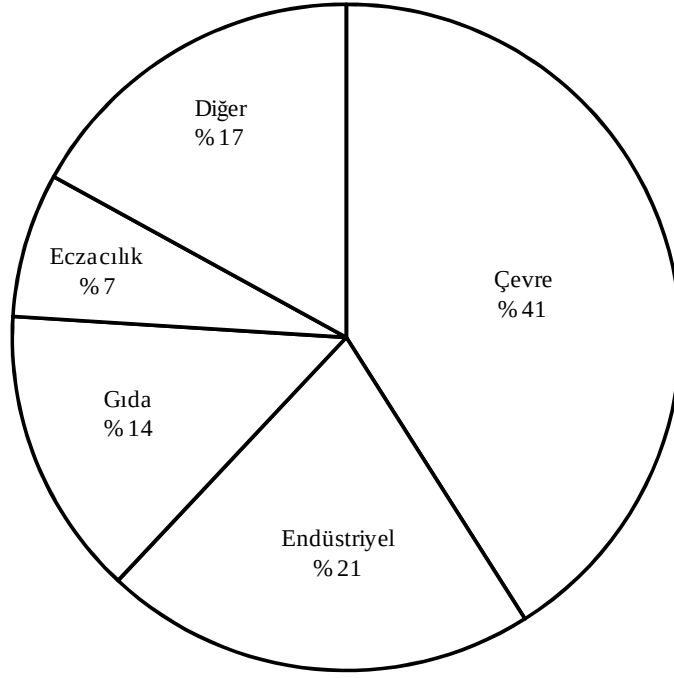
Katı yapısının içerisine geçmiş polimer katkı maddelerinin organik çözücüler ile ekstraksiyonu çok zor olmaktadır. Dolayısıyla düşük viskozite ve yüksek difüzyon hızına sahip bir süperkritik akışkan, polimer matrisine kolaylıkla nüfuz edebilmekte ve ayrılmayı hızlandırmaktadır [132].

Ayrıca kömürden ve bitümden gazlaşabilir maddeler ve yağların ekstraksiyonu, yağlardan asfaltın uzaklaştırılması, kalıntı ekstraksiyonu ve jeolojik oluşumlardan yağ ve gaz kazanımı gibi süperkritik akışkan ekstraksiyonunun kullanıldığı bir diğer endüstriyel sektör ise petrokimyadır [120].

Ölüme sebebiyet veren uyuşturucu, kokain gibi uyarıcıların teşhisi, sporcular tarafından uyarıcı olarak kullanılan bazı kortizonların teşhisi, parmak izi tayini ve patlayıcı maddelerin belirlenmesi gibi adli tıpta da süperkritik akışkan ekstraksiyonu uygulamalarına rastlamak mümkündür [133].

Şekil 2.16'da süperkritik akışkan ekstraksiyonu yönteminin uygulama alanları özetlenmektedir [31]. Endüstrinin çeşitli alanlarında tüketilen çok büyük miktarlardaki organik çözücüler ve bunların çevreye çok ciddi bir tehdit oluşturması, bunun neticesinde EPA, FDA ve EFSA gibi türlü otoritelerin dünya çapında göstermiş oldukları büyük baskı, temiz bir teknoloji olma yolunda ilerleyen süperkritik akışkan ekstraksiyonu kullanımını özellikle de çevresel uygulamalarda (% 41) kaçınılmaz hale

getirmektedir. Endüstriyel, gıda ve biyomedikal laboratuvar uygulamaları da yüksek potansiyele sahiptir [30, 31].



Şekil 2.16: Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun uygulama alanları

2.4.3. Katı – Sıvı Ekstraksiyonunda Kullanılan Diğer İleri Teknikler

Bitkilerde mevcut olan değerli ve az miktarda bulunan fitokimyasalların ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresini kısaltmak, çözücü tüketimini azaltmak, ekstrakt verimini artırıp, ürün kalitesini yükseltmek ve çevre kirliliğinin önüne geçebilmek için ileri ekstraksiyon tekniklerinden faydalanılmaktadır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu dışında ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) gibi yöntemler konvensiyonel yöntemlere nazaran yatırım maliyetleri yüksek olmasına rağmen hem hızlı hem de oldukça etkili teknolojilerdir [111].

2.4.3.1. Ultrason destekli ekstraksiyon (*Ultrasound-assisted extraction, UAE*)

20 kHz'den daha yüksek frekansa sahip olan ses dalgaları katı, sıvı veya gaz içerisindeki mekanik titreşimlerdir. Mekanik titreşimler mekanik basınç dalgalarına dönüşerek enerjiyi ortama ve ortamda dalgayla temas eden maddeye aktarmaktadır. Ultrason ekstrete edilecek maddenin hücrelerini parçalayarak partiküllerin boyutunu küçültmekte ve böylece katı yüzeyindeki ultrasonik jetin katı ve sıvı faz ile temasını artırarak çözücünün istenilen ekstrakta difüzyonunu kolaylaştırmaktadır.

Bu ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve oldukça etkili olması nedeniyle geleneksel yöntemlere iyi bir alternatiftir. Hem hızlı olması hem de düşük sıcaklıklarda da iyi bir performans göstermesi özellikle ısıya duyarlı, kararsız maddelerin ekstraksiyonunda oldukça etkili hale gelmektedir. Bu yöntemde, ultrasona uğrayan bitkisel dokularda hücre duvarları hasar görür ve bu şekilde doku içerisindeki solute'nin dışarı çıkması kolaylaşır. Bitki içerisindeki bu maddelerin çözücü içerisinde kütle transferi artmakta ve ekstraksiyon kısa sürede tamamlanmaktadır. Bu yöntemde yüksek basınç gibi koşullara da ihtiyaç duyulmamaktadır. Yalnız bu sistemde dikkat edilmesi gereken bazı hususlar vardır. Ultrasonun kendisi bir ısı meydana getireceği için, ekstraksiyon boyunca sıcaklık kontrol edilmelidir. Ayrıca uzun ekstraksiyon süresinin yaratacağı fazladan bir sonikasyon ürününün kalitesine zarar verebilmektedir [97, 111, 134].

2.4.3.2. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (*Microwave-assisted extraction, MAE*)

Mikrodalgalar 0.3 - 300 GHz aralığında değişen elektromanyetik radyasyonlardır. Bu metod ile doğal ürünlerin ekstraksiyonu 2.5 ile 75 GHz'de gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga ile ısıtmanın avantajı moleküllerin dipol rotasyonu ile zayıf hidrojen bağlarının kopmasıdır. Ayrıca, ortamda bulunan bu çözünmüş iyonlar, çözücünün katı metaryel içerisine nüfuzunu artırarak analitin çözünmesini kolaylaştırmaktadır. Ortamın viskozitesinin yüksek olması moleküler rotasyonu etkileyerek bu mekanizmayı engellemektedir. Klasik temas yoluyla ısı iletimi yöntemlerinin aksine, mikrodalgalar numunenin tamamını aynı anda ısıtmaktadır.

Bu yöntemde mikrodalga enerjisi kullanılarak çabuk bir şekilde ısıtma söz konusudur. Mikrodalga destekli ekstraktörler açık ve kapalı olmak üzere iki türlüdür. Açık olanlar atmosferik basınçta yürütülmektedir. Kapalı olanlarda ise yüksek basınç ve sıcaklıklarda çalışılmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonda partikül boyutunun seçimi önemlidir. Çünkü bu yöntemde ekstraksiyonun sınırlayıcı adımı matris yapısı içindeki bileşenlerin çözücüye difüzyonudur. Boyutun küçük olması yüzey alanını arttırarak bitki matrisi ile çözücünün etkileşimini arttırmaktadır. Çözücü seçiminde dielektrik sabiti son derece önemli olan bir diğer parametredir. Seçilen çözücünün yüksek bir dielektrik sabitine sahip olması ve mikrodalga enerjisini çok iyi absorbe etmesi gerekmektedir. Etanol, metanol ve su gibi çözücüler mikrodalga enerjisi ile ısıtılacak kadar yeterli polariteye sahiptirler. Dielektrik sabitleri düşük olan hekzan ve toluen gibi apolar çözücüler ise mikrodalga destekli ekstraksiyon için uygun değildir. Bu yöntemde, katı malzemenin yapısı da ekstraksiyonu etkileyebilmektedir. Kullanılan çözücünün dielektrik sabiti düşük olduğunda, metaryelin kendisi mikrodalgalar ile etkileşebilmekte ve böylece çözücü ısınmamaktadır. Böyle bir durum, ısıya duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu için büyük bir avantaj haline gelmektedir [135].

Düşük ekstraksiyon süresi, az çözücü tüketimi gibi avantajlarının olması mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemini ekonomik ve pratik açılardan biyoaktif metaryellerin ekstraksiyonu için önemli bir ileri ekstraksiyon tekniği haline getirmektedir. Diğer taraftan, elde edilen ürünün filtre edilmesi veya santrifüjlenmesi gibi proste ek basamaklara ihtiyaç olması yöntemin dezavantajlarından. Ayrıca solute ve çözücü apolar veya uçucu olduğunda bu yöntem yetersiz kalabilmektedir [90, 111].

2.4.3.3. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (*Accelerated solvent extraction, ASE*)

Bu yöntemde 50 ile 200 °C sıcaklık ve 10 ile 15 MPa basınç değerlerinde çalışılmaktadır. Bu sebepten dolayı basıncı arttırılmış çözücü ekstraksiyonu da denilebilir. Ekstraksiyonun basınç altında yürütülmesinin nedeni yüksek sıcaklıktaki çözücüğü sıvı halde muhafaza etmektir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu süresince çözücü kritik şartlarının altında bulunmaktadır. Yüksek sıcaklık, ekstraksiyon kinetiğini arttırmakta, yüksek basınç da çözücüğü sıvı halde tutmakta ve böylece güvenli ve sürekli bir ekstraksiyon meydana gelmektedir. Ayrıca yüksek basınç ekstraksiyon

hücresinin hızlı bir şekilde dolmasını sağlamakta ve sıvıyı katı strüktür içerisine girmeye zorlamaktadır. Yüksek sıcaklık da sıvının viskozitesini azaltıp, solute ile matris arasındaki bağları zayıflatıp, difüzyonunu arttırarak ekstraksiyonu hızlandırmaktadır.

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, genelde çevre ile ilgili çalışmalarda yüksek sıcaklıklara dayanıklı kirleticilerin ekstraksiyonunda faydalanılan bir yöntemdir. Bitkisel ham maddelerden fitokimyasallar gibi maddelerin ekstraksiyonu ile ilgili yapılmış olan çalışma sayısı ise çok azdır [111, 135].

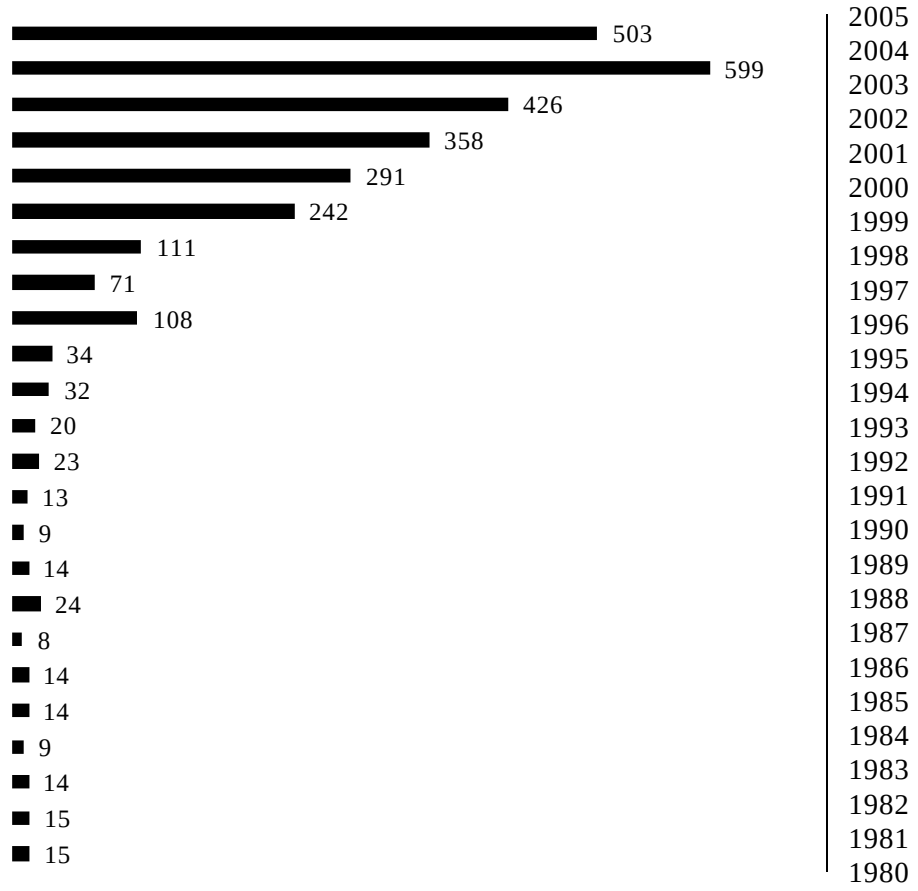
Tablo 2.6’da farklı ekstraksiyon proseslerinin çeşitli faktörler bakımından karşılaştırılması yapılmıştır. Bu tabloya bakıldığında sokslet metodunun yatırım maliyeti açısından en ucuz yöntem olduğu görülmektedir. Fakat çözücü tüketimi ve ekstraksiyon süresi oldukça yüksektir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile kıyaslandığında, ultrason destekli ekstraksiyon daha ucuz ve kullanımı daha kolay olan bir sistemdir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon ise hem yatırım maliyeti bakımından makul olup, bu yöntem ile hem az miktarda çözücü tüketimi hem de çok hızlı bir ekstraksiyon gerçekleştiğinden tercih edilebilir bir yöntemdir. Fakat bu yöntemde de saflaştırma aşamasına ihtiyaç olmakta ve ekstraksiyon hücreleri için uzun süren soğutma zamanları gerekmektedir. Ayrıca, çözücü olarak kullanılacak maddelerin mikrodalgaları absorbe edebilme durumu söz konusu olduğundan, ekstraksiyonda seçilecek çözücü sayısı da sınırlı hale gelmektedir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, sokslet metoduna benzediği için karmaşık bir proses değildir. Fakat yatırım maliyeti yüksek ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile kıyaslandığında çözücü tüketimi fazladır. Dolayısıyla ürün saflaştırma basamağına da ihtiyaç duymaktadır [31].

Tablo 2.6: Sokslet, ultrason destekli ekstraksiyon (UAE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (ASE) ve süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE) yöntemlerinin prosesi etkileyen çeşitli faktörler bakımından kıyaslanması

Faktör	Sokslet	UAE	MAE	ASE	SFE
Yatırım maliyeti	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek	Yüksek
Proses süresi	Uzun (48 saate kadar)	Kısa (< 30 dakika)	Kısa (< 30 dakika)	Kısa (< 30 dakika)	Kısa (< 60 dakika)
Çözücü tüketimi	Yüksek (200 – 500 mL)	Normal (< 100 mL)	Az (< 40 mL)	Normal (< 100 mL)	Çok az (< 5 mL)
Metod geliştirme	Basit	Basit	Basit	Basit	Laboratuar seviyesinde
Ürün saflaştırma	Gerekli	Gerekli	Gerekli	Gerekli	Gerekli değil

2.5. ANALİZ YÖNTEMLERİ

Bitkilerde bulunan değerli bileşenlere olan ilgi her geçen gün biraz daha artmaktadır. Yapılan araştırmalar bitkinin orijinini, kimyasını, biyoaktivitesini, klinik öncesi ve klinik çalışmalarını kapsamaktadır. Ayrıca fenolik bileşikler ekstrakte edildikten sonra degrade olma ve ekstrakt içindeki diğer bileşenler ile kompleks oluşturmaya eğilimi olan maddelerdir. Bu nedenle analiz yönteminden önce çözücünün türü, ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon metodu gibi parametreler ekstraksiyon protokolünün geliştirilmesinde çok önemlidir [136]. Şekil 2.17 biyoaktif maddelerin analizlerini de içeren araştırmaların yıllara göre dağılımını göstermekte olup, buna göre 1980 yılında yapılan yayın sayısı 15 iken, 2002 yılında bu sayı 600'lere ulaşmıştır [137]. Dolayısıyla bu bileşiklerin karakterizasyonu ve nicel analizleri de ciddi bir araştırma alanı haline gelmiştir.



Şekil 2.17: 1980 senesinden itibaren biyoaktif maddeler üzerine yayınlanan araştırma sayısı

Fenolik bileşiklerin tayini için denenmiş metodların çoğunluğu yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve UV spektrofotometrisini temel almaktadır. Çünkü bu tekniklerde yüksek kaynama noktalı maddeler olan fenolik bileşikleri uçucu bir forma sokmak için gerekli olan türevlendirme işlemlerine ihtiyaç duyulmamaktadır.

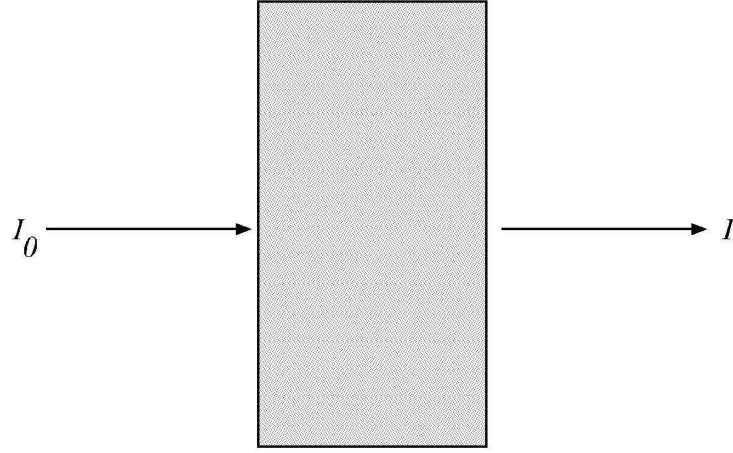
2.5.1. Spektroskopik Teknikler

Spektrofotometri, ışık kaynağı ile prizma arasına yerleştirilen renkli maddenin ışık spektrumunun bazı renklerini absorplaması ve konsantrasyona göre spektrumda zayıf veya kuvvetli bant göstermesi özelliğine dayanan miktar tayin yöntemidir. Kısacası elektromanyetik ışınlar ile madde arasındaki etkileşimden yararlanan yöntemlerdir. Enerji düzeyleri arasındaki geçişler sonucu ortaya çıkan spektrum ölçülmektedir. Spektroskopik yöntemler ışının absorplanmasına dayanan spektrofotometri (UV-Visible), kolorimetri, atomik absorpsiyon spektroskopisi, NMR spektroskopisi, ESR (Elektron Spin Rezonans) spektroskopisi metodları ve ışının yayılmasına dayanan kütle spektroskopisi, emisyon spektroskopisi, atomik emisyon spektroskopisi, fluoresan spektroskopisi ve radyokimyasal yöntemler şeklinde gruplandırılabilir [138].

Spektrofotometrede ölçümü yapılacak örnek bir küvet içerisine konur. Küvet içerisine konmuş renkli bir çözeltiden çıkan ışık şiddeti (I), çözeltiye giren ışık şiddetinden (I_0) daha küçüktür. Çözeltiden çıkan ışık şiddetinin çözeltiye giren ışık şiddetine oranı (I/I_0) transmitans (T) olarak tanımlanmaktadır. T 'nin tersinin logaritması absorbans (A) olarak bilinmektedir. Bu da çözeltiden geçen ışığın ne kadarının absorbe edildiğinin göstergesidir (Şekil 2.18).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.1)$$

$$A = \log \frac{1}{T} \quad (2.2)$$



Homojen bir absorplayıcı ortam

Şekil 2.18: HOMOJEN bir absorplayıcı ortamdan ışığın geçişi: I_0 , tabakaya gelen ışık şiddeti; I , tabakadan çıkan ışık şiddeti.

UV spektrofotometrisinin esası da yine bir kalibrasyon eğrisinin hazırlanıp, bilinmeyen numunenin absorpsiyonunun ölçülüp bu eğri aracılığıyla derişiminin saptanmasıdır. Bu yöntem hem yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan çabuk sonuç alınan hem kolay hem de doğruluk derecesi yüksek olan bir yöntemdir. Ayrıca her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon piki olduğu için selektivitesi yüksektir. Çok düşük konsantrasyonlardaki maddelerin bile analizi yapılabilmektedir.

2.5.1.1. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde tayini, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarına dayanması ve bitki ekstraktının toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan aktivitesi arasında lineer bir ilişkinin olması nedeniyle, ekstraktın antioksidan kapasitesi hakkında da ışık tutmaktadır.

Yöntemde fenolik bileşikler Folin reaktifi ile 750 – 765 nm’de gözlenebilen renkli bir kompleks oluşturmaktadır. Fakat fenolik maddelerin reaktif ile reaksiyon verebilmesi

için ortamın alkali hale getirilmesi gerekmektedir. Bu da sodyum karbonat çözeltisinin ilave edilmesi ile gerçekleştirilmektedir.

2.5.2. Kromatografik Teknikler

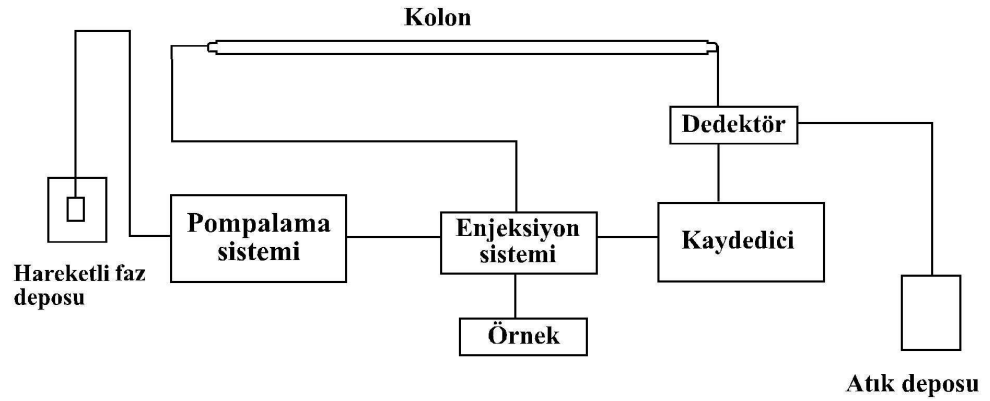
Kromatografi, çok basit bir ifade ile bir karışımdaki çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilmeleri ve bu geçiş esnasında farklı hızlarla hareket etmeleri esasına dayanmaktadır. Kromatografide maddeler birbirine karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Hareketli olan “*mobil faz*”, sabit olan ise “*stasyoner faz*” olarak da adlandırılmaktadır. Sabit faz, kolon olarak adlandırılan bir tüp içine doldurulmuş, gözenekli partiküllerden oluşmaktadır. Hareketli faz ise bu boşlukları doldurmakta ve kolon boyunca maddeleri sürüklemektedir. Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit fazda dağılımı yüksek olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyon profili “*pik*” olarak adlandırılmaktadır. Piklerin oluşturduğu grafiğe de “*kromatogram*” denir.

Kullanılan faza göre, hareketli faz olarak gaz, sabit faz olarak da sıvı kullanılan kromatografi türüne gaz kromatografisi (GC); hareketli faz olarak sıvı kullanılan kromatografi türüne sıvı kromatografisi (LC) denir. Kritik sıcaklık üzerindeki sıcaklık değerlerine kadar ısıtılıp, basınç ile sıvılaştırılan akışkanlar ile gerçekleştirilen kromatografi ise süperkritik akışkan kromatografisi (SFC) olarak bilinmektedir .

2.5.2.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performans, yüksek hız ve yüksek rezolüsyonlu ayırmaları ifade etmektedir. Bu da çok küçük çaplı (< 20 µm) kolon dolgu maddeleri kullanılarak sağlanmaktadır. Bu şekilde band genişlemesi azaltılarak daha dar pikler elde edilmektedir. Küçük çaplı kolon dolgu maddeleri kullanıldığından, kolon boyunca hareketli fazın ilerlemesini sağlamak için yüksek basınç gerekmektedir. Bu sebepten dolayı yöntem yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak da adlandırılmaktadır.

HPLC cihazı kolon, pompa, enjeksiyon üniteleri (manuel enjeksiyon valfleri ve basit otomatik enjektörler), dedektör ve kaydediciden oluşmaktadır (Şekil 2.19). Çözücü ya da çözücü karışımı ile doldurulmuş olan hareketli faz deposuna ucunda filtre bulunan pompa giriş hortumu daldırılır. Pompaya hava kaçmaması için filtre çözücüye tamamen dalmış durumda olmalıdır. Pompanın düzgün çalışabilmesi için hatlarda hava olmamalıdır. Pompa, depodan aldığı hareketli fazı enjeksiyon sistemine gönderir. Enjeksiyon sisteminden hareketli faz ile taşınan örnek ayırmanın gerçekleştiği kolona gelir. Kolondan hareketli faz ile birbirinden ayrılmış halde çıkan elüsyon buradan dedektöre aktarılır. Cihazın önemli bir kısmı olan dedektörün görevi örnek konsantrasyonu ile orantılı elektriksel bir cevap üretmektir. Örnek bileşenleri UV veya görünür alandaki ışığı absorplayan fonksiyonel gruplar içeriyorsa UV-görünür alan dedektörü ilk tercih olmalıdır. Bunun dışında floresans dedektörleri, elektrokimyasal detektörler, refraktif indeks dedektörleri, amperometrik dedektörler ve kütle spektrometresi gibi dedektör tipleri de mevcuttur.



Şekil 2.19: HPLC cihazı akış şeması

HPLC’de ayırma normal faz ve ters faz olmak üzere iki türlü olmaktadır. Normal faz durumunda polar bir sabit faz ve apolar bir hareketli faz kullanılmaktadır. Polaritesi yüksek olan analit sabit fazla daha fazla etkileşmekte ve böylece kolonu daha geç terk etmektedir. Apolar olanlar ise polar olana göre daha az tutunarak kolondan daha önce

çıkmaktadır. Kolon dolgu maddesi olarak silikajel ve alümina kullanılmaktadır. Silika jelin polar olan –OH uçları dolgu maddesine polar özellik kazandırmaktadır [139].

Ters faz sıvı kromatografisi (RP–LC), sabit fazın apolar, hareketli fazın ise polar olduğu bir kromatografidir. Apolar sabit faz genellikle C₈ ve C₁₈ dolgu malzemeleridir. Dolgu maddesi olarak kullanılan silikanın polarlığını azaltmak için yüzeyi 8 veya 18 karbonlu hidrokarbon ile kaplanmaktadır. Fenolik bileşiklerin HPLC ile ayrılması genel olarak ters faz (RP) kolonlar vasıtası ile gerçekleşmektedir. Fenolik bileşikler gibi polaritesi yüksek olan maddeler kolondan daha çabuk çıkmaktadır. Hareketli faz olarak metanol veya asetonitril ve çok az oranda asit ihtiva eden su kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak kullanılan su içerisine asit eklenmesinin sebebi ise analitin solvent sisteminde kolayca disosiyeye olmasını sağlayarak ayırma işlemine, rezolüsyona ve pik şekline faydalı olmaktır. Çünkü fenolik bileşiklerde bulunan hidroksil grupları bu maddelerin zayıf asidik özellik göstermesine neden olmaktadır. Burada modifiye edici olarak kullanılan asitler formik asit, asetik asit, trifloroasetik asit ve fosforik asittir. Dedektör olarak kütle spektrometrisi (MS) kullanıldığında, hareketli faz içerisine modifiye edici olarak formik ve asetik asitler gibi zayıf asit ilave edilirse, pozitif iyon oluşumunun artmasından ötürü ayırmadaki hassasiyet önemli derecede artmaktadır. Kütle spektrometrisi iyon kaynağına zararlı olabileceği için inorganik fosforik asit kullanımından kaçınılmalıdır. Trifloroasetik asit, elektrofilik florin grupları içerdiğinden, proton verici olarak da görev yapmış olur [137].

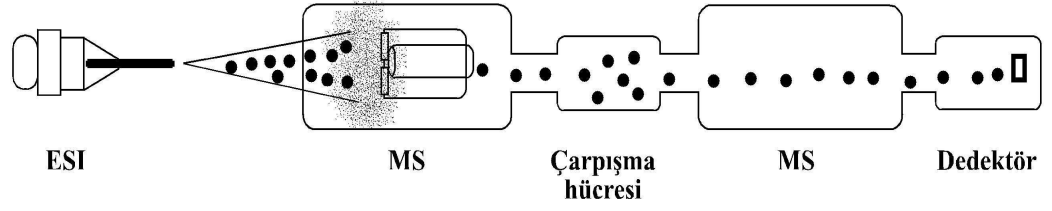
2.5.2.2. Sıvı Kromatografisi-Elektro Sprey İyonizasyonu-Kütle Spektroskopisi/Kütle Spektroskopisi (LC-ESI-MS/MS)

Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi (LC–MS) tekniği, sıvı kromatografisinin (LC) ayırma özelliği ve kütle spektrometrisinin (MS) seçicilik gücünü birleştiren bir teknolojidir. Bu teknolojinin tarihi 1970’lere kadar uzanmaktadır. MS, UV-görünür bölge spektrumuna göre daha iyi bir ayırma özelliğine sahiptir. Bu sebepten MS’in HPLC’ye kombinasyonu ile özellikle karmaşık biyolojik metaryellerdeki bileşiklerin analizi daha seçici ve duyarlı olarak gerçekleştirilmektedir.

MS yönteminde, atom veya moleküllerden gaz fazında iyonlar oluşturulur ve bu iyonlar kütlelerine göre birbirinden ayrılarak kaydedilir. Oluşan her bir iyon kendine özgü “kütle/yük” (m/z) oranına sahiptir. İyonların m/z oranlarına göre çizilmiş olan grafiğine “kütle spektrumu” denir. Dolayısıyla her maddenin spektrumu kendine özgüdür. Bilinmeyen bileşiğin spektrumu, standartunki ile karşılaştırılarak bileşiğin miktarı hesap edilir.

Bir maddenin kütle spektrumunun elde edilebilmesi için bunun iyonlaştırılması gerekmektedir. Örnek önce buharlaştırılıp ardından iyonize edilmektedir. Yaygın olarak kullanılan iyonlaştırma teknikleri atmosfer basınçlı kimyasal iyonlaştırma (APCI) ve elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). 1980’li ve 90’lı yıllarda termosprey (TSP) ara yüzey kullanılmıştır. TSP’de iyonlar sıvı halden gaz haline dönüştürülürken yüksek vakum ve yüksek sıcaklıklar kullanılmaktadır. Dolayısıyla pratikte gerçekleşen bu sınırlamalardan ötürü bu ara yüzeyin yerini APCI ve ESI’yı kapsayan atmosferik basınç iyonizasyon (API) metodları almıştır. ESI modu altında proteinler ve peptidler gibi yüksek molekül ağırlıklı moleküller çoklu bir şekilde yüklenebilirler. LC–MS ile kombine edilmiş ESI’nin geliştirilmesi ile birlikte bu teknik özellikle polar bileşikler için son derece hassas ve daha yüksek iyonizasyon kararlılığına sahip olduğunu kanıtlamıştır. APCI ise daha az polar bileşiklerin analizinde kullanılmaktadır ve termal olarak kararsız analitler için uygun değildir. Ayrıca ESI’nin aksine beklenmeyen fragmentler de üretmektedir. Fragment, yüklü moleküllerin başka moleküllerle ya da bir yüzey ile çarpışması sonucu ayrılan parçalarıdır.

Ardışık kütle spektrometrisinde (Tandem MS/MS) karışım birinci MS’in iyon kaynağına verilmektedir. Burada oluşan iyonlar ana iyonlardır. Bu şekilde aranan bileşenin ana iyonları seçilmiş olmaktadır. Burada (Şekil 2.20) [140]. Bu şekilde taranmış olan bileşen yüksek seçicilikte tanımlanmaktadır.



Şekil 2.20: ESI-MS/MS akış şeması

LC-ESI-MS/MS büyük, kararsız ve oldukça polar olan karmaşık örneklerin analizinde, hiç bir saflaştırma işlemine gerek duymaksızın çok büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Yüksek seçiciliğinin yanında türevlendirme aşamasına gerek olmadığı gibi analizin çok kısa sürede tamamlanması da mümkün olmaktadır [83, 97].

2.5.3. İstatistik Analiz

Bilimsel araştırmalarda elde edilen deneysel veriler genellikle düzensiz bir halde bulunmaktadır. Ayrıca güvenilirliği hakkında bilgi verilmemiş bir sonuç tamamlanmamış anlamına gelmektedir. Dolayısıyla hesaplanan sonuçlara ait belirsizlik hakkında mutlaka bilgi verilmesi gerekmektedir.

Elde edilen bu ham verilerin işlenmesinde ortalama, standart sapma ve standart hata gibi özelliklerden faydalanılmaktadır. Aritmetik ortalama ve varyans bir veri serisini betimleyen iki ölçüttür. Standart sapma, veri değerlerinin yayılımının özetlenmesi için kullanılan bir ölçüdür ve σ ile gösterilmektedir. Verilerin ortalamadan sapmalarının kareleri ortalamasının kareköküdür. Yani varyansın kareköküdür [141]. $\bar{X}$, bir dizi bağımsız tayin sonucunun aritmetik ortalamasıdır (mean). X_i ise N sayıda tekrarlanmış ölçüm değerinden bir tanesini ifade etmektedir. Burada $(X_i - \bar{X})$ ise i 'nci ölçümün aritmetik ortalamadan sapmasıdır. Belirli sayıdaki yani N tane veriden oluşan bir dizinin standart sapması için

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X)^2}{N}} \quad (2.3)$$

bağıntısı kullanılmaktadır.

Karşılaştırılacak olan ortalama bağımsız değişken değerleri ikiden fazla olduğunda tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmaktadır. Tek yön ile grupların birbirinden tek bağımlı değişkenle ayrıldığı ifade edilmektedir [142].

İstatistikte “*p*” değeri olasılık (probability) teriminin kısaltılmış halidir. % 5 hatayı kabul ederek karşılaştırma yapıldığında; $p < 0.05$ (yani *p* değeri % 5’ten küçük ise) “gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır” denir. Yani verilen kararın doğru olma olasılığı % 95 iken, hatalı olma olasılığı en fazla % 5’tir. % 1 hatayı ($p < 0.01$) kabul ederek karşılaştırma yapıldığında ise gene “gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır” denir. Yani birinci karşılaştırmada % 95 olasılıkla, ikincisinde ise % 99 olasılıkla güven aralığı belirlenmiş olmaktadır.

2.6. KONU İLE İLGİLİ YAPILMIŞ OLAN ÇALIŞMALAR

Literatürde zeytin yapraklarının içeriği ve ekstraksiyonu ile ilgili farklı çalışmalar mevcuttur. Düşük sıcaklıklarda elde edilebilen, sıcaklığa duyarlı maddelerin elde edilmesinde çözücü ekstraksiyonu tercih edilebilir bir yöntemdir. Bu sebeple polifenollerce zengin ürünlerin kazanılmasında uygulanabilmektedir. Burada ekstrakt elde etmeden önce uygulanması gereken ön işlemler, içeriğindeki madde miktarlarını önemli oranda etkilemektedir. Zeytin yapraklarına uygulanan kurutmanın, içeriğindeki oleuropein miktarına etkisinin incelendiği bir çalışmada, yapraklara 25 ile 150 °C arasında kurutma ve dondurarak kurutma işlemleri uygulanmıştır [143]. Sonuçlar 60 °C’den itibaren oleuropein miktarında bir düşüş göstermiş ve 80 °C’den sonra yeniden hızlı bir yükselişe geçmiştir. Bu durum bu sıcaklık değerine kadar oleuropeini degrade

eden enzimlerin hala aktif olduğunun bir göstergesi olabilir. Çünkü bu değerin üzerinde belirgin bir oleuropein artışı gözlenmiştir.

Yine kurutma sıcaklığının oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit miktarlarına etkisinin ve aynı zamanda ekstrakte edilen oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin stabilitesinin korunmasının incelendiği bir başka çalışmada kurutma etkisi diğer çalışma ile uyumlu sonuçlar vermiştir [144]. Elde edilen oleuropein ekstraktı ise su ile muhafaza edildiğinde oda sıcaklığında 7 gün kararlılığını korumuş, 17. günün sonunda tamamen bozunmuştur. Diğer fenolik bileşikler daha az kararlılık göstermişlerdir. Diğer taraftan, oleuropein ve diğer adı geçen bileşenler metanollü ekstrakt içerisindeyken oda sıcaklığında tam 30 gün bozunmadan saklanmışlardır.

Zeytin yaprağının fenolik bileşikleri ve bu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitelerinin incelendiği bir araştırmada ters-faz HPLC/DAD (diode array detector) yönteminden faydalanılarak zeytin yapraklarının içerisindeki fenolik bileşiklerin karakterizasyonu yapılmış ve bunun neticesinde 7 farklı fenolik bileşen tayin edilmiştir [75]. Bunlar kafeik asit, verbaskozit, oleuropein, luteolin 7-O-glukozit, rutin, apigenin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit olarak sıralanmıştır. Analizler % 73 ile oleuropeinin zeytin yaprağındaki en yüksek miktarda bulunan bileşen olduğunu göstermiştir. En düşük miktarı ise % 1 ile kafeik asit temsil etmiştir. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktı olağanüstü bir antibakteriyel ve antifungal etki sergilemiştir. Bu sonuç, içeriğindeki fenolik komponentlerin göstermiş olduğu katkı ve sinerjik etkinin bir sonucu olarak açıklanmış ve sağlık açısından kullanımı şiddetle tavsiye edilmiştir.

İtalyan orijinli, Moraiolo zeytin ağacının yapraklarındaki fenollerin ve bunların antioksidan özelliklerinin araştırıldığı bir çalışmada, elde edilen ekstrakt içerisindeki fenolik bileşenler, saf zeytin yağından ve pek çok ticari olarak tablet halinde satılan zeytin yaprağı ekstraktından daha güçlü bir antioksidan kapasite ile karakterize edilmişlerdir [145]. Fenolik profili analiz etmede gaz kromatografisinden faydalanıldığından örneklere bis(trimetilsili)trifloroasetamid ve trimetilklorosilan gibi türevlendiriciler eklenerek türevlendirme ön işlemi yapıldıktan sonra analize geçilmiştir. Ekstraktın gaz kromatogram sonucu tirosol, hidroksitirosol, sirinjik asit, oleuropein ve oleuropein aglikon ve çok az miktarlarda gallik ve ferulik asit göstermiştir. Toplam

fenol içeriğine bakıldığında oleuropeinin zeytin yaprağındaki temel fenol olduğu bir kez daha görülmüştür.

7 farklı cins İtalyan zeytin ağacı (Dritta, Leccino, Caroleo, Coratina, Castiglione, Nebbio ve Grossa di Cassano) yapraklarında mevcut bulunan oleuropein miktarına ağacın türü, toplama zamanı (ilkbahar ve sonbahar), yaprağın renk (yeşil, yeşil-sarı ve sarı) ve yaşına ilave olarak bir de uygulanan metodun etkisinin incelendiği bir çalışma da literatürde mevcuttur [81]. Son baharda toplanan örneklerdeki oleuropein miktarının, bu dönemde olgunlaşma ile gerçekleşen yüksek degradasyon hızından dolayı daha düşük seviyede olduğu gözlemlenmiştir. Burada dikkat çeken en önemli bulgu, oleuropein içeriğinin zeytin ağacının türü, uygulanan ekstraksiyon veya analiz metodu ve toplama zamanından bağımsız olarak yaprağın yaş ve renk faktöründen önemli derecede etkilenmesi olmuştur. Koyu yeşil yapraklardaki oleuropein miktarı çok yüksek iken, bu seviye yeşil-sarı ve özellikle de sarı renkli olanlarda farkedilir derecede azalmıştır. Burada gaz kromatografisi ve HPLC olmak üzere iki farklı nicellendirme metodu da karşılaştırılmış ve elde edilen bulguların istatistiksel anlamda bir farklılık sergilemediği görülmüştür.

Zeytin yaprağı içeriğinin incelendiği oldukça kapsamlı bir araştırmada, İspanya'nın aynı bölgesinde yetişen 13 farklı zeytin ağacı türünden (Alameño, Arbequina, Azulillo, Chorna, Hojiblanca, Lechfn, Manzanillo, Negrillo, Nevadillo, Ocal, Pierra, Sevillano ve Tempranillo) ve 6 farklı bölgede (Córdoba, kuzey ve güney Mallorca, Ciudad Real, Lleida ve Navarra) bulunan aynı zeytin ağacı türünden (Arbequina) elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının fenolik profili HPLC/DAD ile analiz edilerek detaylı bir şekilde mukayese edilmiştir [146]. Farklı türlerin ve farklı bölgelerden toplanan aynı türün fenolik madde bileşiminin farkedilmesinin yapıldığı bir başka çalışma da literatüre yeni kazandırılmıştır [147]. Burada da 5 farklı türden zeytin ağacı (Carolea, Cassanese, Coratina, Nocellara ve Leccino) yaprakları ve İtalya'nın 3 farklı şehrinde toplanan Carolea türünün yaprakları fenolik madde profili açısından değerlendirilmiştir.

Zeytin yaprağının yaşı, türü ve örnek alma zamanının karşılaştırıldığı bir çalışmada ise, bu parametrelerin yaprak ekstraktı içerisindeki toplam antioksidan aktivite, toplam fenolik madde ve tek tek fenolik bileşiklere etkisi incelenmiştir [40]. Tek tek fenolik

madde açısından (oleuropein, hidrokstitirosol, verbaskozit ve bazı flavonoidler) belirgin farklılıklara rastlanmış ve bu farklılıkların tür ve yaştan ziyade toplanma zamanının farklı olmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca oleuropein tüm örneklerde ana komponent olarak bulunmamıştır. Ama yılın her döneminde toplanan zeytin yapraklarının çok güçlü bir radikal süpürücü etkisi olduğu gözlemlenerek, çok önemli bir antioksidan kaynağı olarak tavsiye edilmiştir.

Sekoirodoidler ve flavonoidler gibi fenolik bileşikler açısından çok zengin bir kaynak olan zeytin yaprağının çok güçlü bir antioksidan kapasiteye sahip olması beklenmektedir. Fakat bu kapasiteye olgunlaşma etkisinin ne olduğunu anlamak için yapılan çalışma sayısı yetersiz olduğu için genç ve olgunlaşmış yapraklar, diklorometan, etil asetat ve metanol ile ekstrakte edilip elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometrisi (ESI-MS) yöntemi ile fenolik madde içeriği bakımından karakterize edilmiştir [85]. Genç yaprakların daha fazla miktarda oleuropein ve türevlerini içerdiği, olgun yaprakların ise daha fazla oranda verbaskozit izomerlerini içerdiği görülmüştür. Daha da önemlisi olgunlaşmış yaprakların ekstraktı genç olanlarınkinden daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bu çalışmada fark edilen bir diğer ayrıntı ise etil asetatlı ekstraktların daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğudur.

Fransa'da yürütülen bir çalışmada ise, Fransa orijinli 11 tür (Aglandau, Cailletier, Cayet Rouge, Cayon, Grossanne, Lucques, Picholine, Picholine Noire, Tanche, Verdale de l'Hérault ve Verdale-Picholine hibriti) ile Tunus orijinli 3 tür (Bid el Haman, Chemlali ve Meski) olmak üzere, aynı kültürel yetiştirme şartlarına ve aynı coğrafik, jeolojik ve iklimsel şartlara tabi tutulan toplam 14 farklı zeytin ağacının yaprakları araştırılmıştır [148]. Bunlar arasında en yüksek oleuropein seviyelerine Tunus türlerinde, Cailletier, Tanche, Verdale-Picholine hibritinde ve özellikle de Lucques'de rastlanmış ve dolayısıyla bu türler endüstriyel çapta gerçekleştirilecek olan ekstraksiyonda önemli kaynaklar olarak tavsiye edilmiştir.

Literatürden yola çıkarak zeytinin meyvesinin yapraklarına benzer fenolik profil ihtiva ettiğini iddia eden Portekizli bir gurup, 18 tür Portekiz orijinli zeytin ağacının (Bical, Cordovesa, Madural, Verdeal Transmontana, Borrenta, Redondal, Borreira, Madural Fina, Madural Negra, Roupuda, Santulhana, Cobrançosa, Lentisca, Cornicabra,

Negrinha do Freixo, Bical de Castelo Branco, Cordovil de Castelo Branco) bileşenlerini incelemiştir [149]. Fenolik profil açısından türler arasında çok göze çarpan farklılıkların olmadığı görülmüştür.

İran'ın çeşitli bölgelerinde yetiştirilen, 2 farklı mevsimde yaprakları toplanmış olan Mary Zeitoon, Koroneiki ve Sevilano zeytin ağacı türlerini kapsayan bir makale de henüz yayınlanmıştır [150]. Soğuk dönemde tropik olan bölgeden toplanan örneklerin, sıcak dönemde ılıman olan bölgeden toplanandan daha fazla oleuropein ihtiva ettiği görülmüştür.

Ekstraksiyonda seçilen çözücünün ekstrakte edilen toplam flavonoid ve fenolik madde miktarına etkisinin incelendiği bir bilimsel yayında, % 80 (v/v) etanol, butanol, etilasetat, hekzan, kloroform ve su ile gerçekleştirilen bir ekstraksiyonda % 80 (v/v) etanol, butanol ve etilasetat fraksiyonlarında hekzan, kloroform ve sulu fraksiyonlardan daha fazla verim elde edilmiştir [58]. Farklı çözücülerle elde edilen fraksiyonların antioksidan kapasitesi ise büyükten küçüğe doğru % 80 etanol fraksiyonu > etilasetat fraksiyonu > butanol fraksiyonu > kloroform fraksiyonu > su fraksiyonu > hekzan fraksiyonu şeklindedir. Zeytin yaprağının başta oleuropein olmak üzere önemli bir fenolik bileşen kaynağı olduğu ve güçlü antioksidan kapasite gösterdiği ve bu özelliklerin türlü ekstraksiyon metodları ile önemli oranda modifiye edilebileceği gösterilmiştir.

Yine aynı çalışma gurubunun yeni yayınlamış olduğu bir makalede fenolik bileşiklerin tek tek ve toplu olarak antimikrobiyal etkisi incelenmiş ve ekstraktın bir bütün halinde daha yüksek etki gösterdiği görülmüştür [151]. Antioksidan aktivite açısından ise hem tek tek fenolik bileşenler hem de bir bütün halinde yaprak ekstraktı önemli sonuçlar vermiştir. Dolayısıyla zeytin yaprağı ekstraktı değerli bir biyoaktif kaynak olarak hem sağlık hem de tıbbi gıda sektörlerine tavsiye edilmiştir. Zira organik çözücü fraksiyonlanması ve kolon kromatografisi gibi saflaştırma yöntemlerine gerek duyulmadan daha ekonomik bir ekstraksiyon söz konusudur.

Ekstraksiyon ortamının elde edilen ekstraktı nitel ve nicel olarak etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu kapsamda zeytin yaprakları ile yapılan bir çalışmada,

su/etanol/sitrik asit kombinasyonundan oluşan bir ekstraksiyon ortamında ortam pH'nın, ekstraksiyon süresinin ve etanol konsantrasyonunun ekstrakte edilen fenolik madde miktarına etkisi incelenmiştir [32]. Ayrıca yaprakların içeriğindeki klorofil, diklorometan kullanılarak elimine edilmiştir. Etanol konsantrasyonu % 40'tan 50'ye çıkarıldığında toplam fenolik bileşen miktarında bir azalma görülmüş, % 50'den 60'a çıkarıldığında ise tekrardan bir artış görülmüştür. Bu durum, fenolik maddelerin çözünürlüğünün etanol konsantrasyonu ile oynanarak değiştirilebileceğinin bir göstergesi olarak yorumlanmıştır. Çünkü konsantrasyonunun değiştirilmesi etanolün yoğunluk, dielektrik sabiti gibi fiziksel özelliklerini etkilemektedir. Zeytin yaprağının fenolik bileşenlerinin çoğunluğu glukozit olduğu için bunların çözünürlüğü % 40 etanol ihtiva eden sistemde % 50 olandan daha yüksek ve oleuropein gibi daha az polar olan bileşenlerin çözünürlüğünün de % 60 etanol içinde % 50 olandan daha yüksek olabileceği düşünülerek verimdeki azalış ve artışlar açıklanmıştır. Ortam pH'sının artması da polifenollerin asidik fenolik – OH gruplarının disosiyasyonunu yükselterek, bu bileşenlerin çözünürlüğünü arttırmıştır.

Zeytin ağacı yaprağının değil de meyvesinin gelişim süreci içinde yani meyveyi vermesinden hasat zamanına kadar geçen süre boyunca zeytindeki antioksidan aktiviteyi gözlemlemek ve farklı zeytin ağacı türlerini kıyaslayarak fenolik profili ile antioksidan aktivitesi arasındaki ilişkiyi gözlemlemek için literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur [41, 42, 79, 80]. İspanya'da yetiştirilen Arbequina, Farga ve Morrut zeytin ağacı türlerinin gelişimi boyunca içeriğindeki fenolik profil ile enzimatik aktivite arasındaki korelasyonun incelendiği bir araştırmada, zeytinin çekirdeğinin sertleşmeye başladığı dönemde içeriğindeki oleuropein miktarı maksimum, zeytinin yağ üretimi için toplanma zamanında yani renginin siyaha döndüğü dönemde ise minimum olduğu görülmüştür. Aynı sonuç sonradan yapılan başka bir çalışma ile de desteklenmektedir [39].

Ayrıca, bu maddenin azaldığı dönem, farklı ağaç türlerinde genetik faktörlerin etkisiyle olgunlaşma döneminin aynı olmamasından ötürü farklı aylarda gözlenmiştir [72]. Diğer fenolik bileşenlerde dönemsel değil de sadece türe bağlı olarak farklılıklar söz konusu olmuştur. Bu sebeple oleuropeinin olgunlaşma parametresi olarak kullanılması ve böylelikle her zeytin ağacı türü için hasat toplama zamanının belirlenmesi tavsiye edilmiştir.

Portekiz' in kuzey ve orta bölgelerindeki 18 farklı ağaç türünden toplanan örneklerin incelendiği bir başka çalışmada ise, fenolik profilin pek çok faktör tarafından nicel olarak etkilendiği görülmüştür [42]. Bu faktörler olgunlaşma derecesi, coğrafi köken ve bitki türünün doğası olarak sıralanmıştır. Nicel sonuçlar hidroksitirosol ve oleuropeinin temel fenolik komponentler olduğunu göstermiştir. Hatta hidroksitirosolün genel olarak oleuropeinden daha fazla miktarda bulunduğu görülmüş ve bu durum oleuropeinin bozunarak hidroksitirosola dönüşmesiyle açıklanmıştır.

Fazla olgunlaşmış zeytinlerden elde edilen zeytin yağına, üretim aşamasında % 2 ile 3 oranında zeytin yaprağı ilave edilerek, yağda meydana gelecek olan antioksidan madde açığının telafi edilmesi kapsamında çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Zeytin yaprağında bulunan oleuropein miktarı % 1 ile 14 arasında değişirken, bu oran zeytin yağında % 0.005 - 0.12 olarak bulunmaktadır. Hatta verbaskozit, apigenin -7-glukozit ve luteolin -7-glukozit çoğu zaman zeytin yağında tespit edilememiştir. Bu bağlamda, yağ içerisine fenol transfer prosesi düşünülmüştür [89]. Yağların zeytin yaprağındaki fenolik bileşenler ile zenginleştirilmesi için metod geliştirmeyi hedefleyen bir çalışmada, penetrasyonu ve kütle iletimini artırmak için ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve bu metod ile yağların fenolik açıdan daha fazla zenginleştiği görülmüştür. Metod, oda sıcaklığında ve çözücü kullanılmaksızın zeytin yağı, ay çiçek yağı ve soya yağına, sadece 20 dakika süre ile uygulanmıştır. Bu şekilde yağın litresi başına ortalama 14 mg oleuropein, 2'şer mg ise verbaskozit, apigenin -7-glukozit ve luteolin -7-glukozit olacak şekilde bir zenginleşme gerçekleşmiştir. Ultrasonik destek kullanılarak geliştirilen bu metod hem süresinin çok kısa hem yatırım ve işletme maliyetinin düşük olması hem de çözücü kullanılmaması gibi avantajlarından ötürü endüstriyel uygulamalara tavsiye edilmiştir.

Zeytinyağının toplam ağırlığının % 98'i gliseroldür. Geri kalanı ise alifatik ve triterpenik alkoller, steroller, hidrokarbonlar, uçucu bileşikler ve antioksidanlardır. Bu antioksidanlar karotenler ve hem lipofilik hem de hidrofilik fenolik bileşiklerdir. Lipofilik fenoller diğer bitkisel yağlarda bulunurken, biyofenol olarak da adlandırılan hidrofilik fenoller sadece zeytinyağında bulunmaktadır. Bu kapsamda, yine aynı çalışma gurubunun aynı konu üzerine geliştirdiği başka bir metod da mevcuttur [88].

Zeytin yaprakları ilk önce etanol ile mikrodalga destekli bir ekstraktörde ekstrakte edilmiştir. 8 dakikalık bir ekstraksiyonun ardından, süspansiyon santrifüjlenmiştir. 10 mL ekstrakt, 10 mL yağ ile 15 dakika karıştırılmış ve ardından emülsiyon 10 dakika santrifüj edilmiştir. Organik fazdaki olası bir etanol döner bir buharlaştırıcı yardımı ile uçurulmuştur. Bu şekilde zenginleştirilmiş olan yağdan 8 mL alınarak, 8 mL metanol ile 15 dakika karıştırılmış ve metanol fazı analiz edilmiştir. Yağın litresi başına 442 mg (zeytinyağı için), 162 mg (ay çiçek yağı) ve 164 mg (soya yağı) oleuropein olduğu görülmüştür.

Zeytin yaprağı ekstraktının sağlığa zararlı bir etkisinin olup olmadığı konusundaki şüpheleri ortadan kaldırmak adına yapılmış olan çalışmalar da mevcuttur. Zira bazı gıda maddelerinde raf ömrünü uzatmak için antioksidan madde ilave etmek gerekmektedir. Bunun için de doğal olmayan butillenmiş hidroksi toluen (BHT), butillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi kimyasal maddelerden faydalanılmaktadır. Bu durumun önüne geçebilmek için çok önemli bir antioksidan madde kaynağı olan zeytin yaprağı ekstraktı tavsiye edilmektedir. Bu kapsamda, hidrolik pres ile elde edilen ham zeytin yaprağı suyu polifenol kaynağı olarak deney farelerine enjekte edilmiştir [152]. BHT gibi sentetik bir antioksidan maddenin de eş zamanlı olarak başka bir deney gurubu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgular, BHT'nin farelerin karaciğer ve böbreklerini olumsuz olarak etkilediğini göstermiştir. Ham zeytin yaprağı suyunun ise organizma üzerinde hiç bir yan etkiye bulunmadığı görülmüştür.

Yine aynı çalışma gurubu, ayçiçek yağına antioksidan madde olarak ham zeytin yaprağı suyunu ilave etmişler ve yağı ısıtma sırasındaki stabilitesini gözlemlemişlerdir [153]. Hiç bir katkının yapılmadığı kontrol gurubu ile beraber BHT katkılı ve zeytin yaprağı suyu katkılı ayçiçeği yağı örnekleri 180 °C'de birbiri ardına 5 gün boyunca günde 5 saat kızartılmıştır. Kızartılmış ve kızartılmamış yağların fiziksel ve kimyasal özelliklerinde farklılıklar gözlenmiştir. Katkı maddesi ihtiva etmeyen yağ okside olmuştur. 800 ppm mertebesinde zeytin yaprağı suyu içeren örnekler, 200 ppm seviyesindeki BHT' den daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktı son zamanlarda AIDS hastalarının da faydalandığı bir ilaç takviyesi haline gelmiştir. Hastalar bağışıklık sistemlerini güçlendirmek, kronik

yorgunluğu gidermek, HIV'e karşı kullandıkları ilaçların etkisini arttırmak ve HIV'e bağlı diğer enfeksiyonlarla mücadelede bu ekstraktı kullanmaktadır. Bu duruma istinaden zeytin yaprağı ekstraktının HIV-1'e ve replikasyonlarına karşı antiviral aktivitesi araştırılmıştır [154]. Yapılan incelemelerden ekstraktın HIV'e karşı akut enfeksiyon gösterdiği görülmüştür.

Bir grup gönüllü denek üzerinde yapılan araştırmada zeytin yaprağının kandaki glukoz seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir [71]. Ayrıca bu ekstraktın hipoglisemik etkileri deney fareleri üzerinde de görülmüştür. Dolayısıyla şeker hastalarına gıda takviyesi olarak tavsiye edilmiştir.

Güney Afrika'nın vahşi zeytin ağaçlarından ve gene bu bölgede yetiştirilen Yunan orijinli zeytin ağaçlarından toplanan yapraklardan elde edilen ekstraktlar deney farelerinin üzerinde incelenerek, kan basıncını düşürücü etkisi kanıtlanmıştır [155]. Burada çarpıcı bir diğer sonuç ise Afrika kökenli zeytin ağacı yapraklarında neredeyse hiç oleuropeine rastlanmamış ve triterpenoid açısından zengin olduğu görülmüştür.

Tunus kökenli bir zeytin ağacı türü olan Chemlali'den Temmuz ayından başlayarak Mart ayına kadar yaprak toplanmış ve içeriğindeki temel komponent analiz edilmiştir [37]. Her dönemde oleuropein ana bileşen olarak gözlenmiştir. Bunun yanında luteolin 7-O-glukozit, luteolin 7-O-rutinozit, apigenin 7-O-glukozit, rutin, luteolin ve apigenin gibi 6 tane de flavonoid görülmüştür. Ardından saf hidroksitirosol üretebilmek için zeytin yaprağı ekstraktı hidrolize edilmiştir. Hidroliz neticesinde yapılan analizde yüksek oranda hidroksitirosol elde edildiği görülmüştür. Analizlerde oleuropeine hiç rastlanmamıştır. Bu durum, hidroksitirosol ve oleoside 11-metil esteri olan oleuropeinin tamamının bozunarak hidroksitirosol ve diğer oleuropein türevlerini oluşturduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışma içinde antioksidan aktivite tayini ile ilgili yapılan analizler de en yüksek aktiviteyi hidroksitirosol göstermiştir.

Aynı çalışma grubu daha sonra zeytin kara suyundan sıvı – sıvı ekstraksiyonu ile etil asetat çözücüsünü kullanarak ekstrakt elde etmişler ve kara suyundan elde edilen ekstraktın ana bileşeninin hidroksitirosol olduğunu görmüşlerdir [156]. 4 g kuru ekstrakt başına 1 g saf hidroksitirosol olduğu saptanmıştır. Zeytin yapraklarını ise bu

sefer hem asit ile hem de enzimatik yollardan (β – glukozidaz enzimi ile) hidroliz ettirip sonuçları mukayese etmişlerdir. Asit ile hidroliz sonucunda daha yüksek oranda hidroksitirosol elde edilmiştir. Bir de bu yöntemde diğer bozunma ürünü tirosol iken, enzimatik yöntemde oleuropein aglikon olarak görülmüştür. Aynı çalışma kapsamında zeytin mevyesi de incelenmiş ve yeşil olgunlaşmamış zeytinlerin en yüksek seviyede oleuropein içerdiği (taze zeytinin kilosu başına 6.5 g), fakat bu seviyenin olgunlaşma ile beraber azaldığı ve olgun zeytinlerde bulunan en yüksek miktardaki fenolik komponentin hidroksitirosol olduğu gözlenmiştir.

Zeytin ağacının türlü ürünlerine yönelik yürütülen bir başka araştırma ise Portekiz’de yürütülmüştür [92]. Zeytinin, yaprağının ve çekirdeğinin ekstraktları incelenmiş, çekirdeği dışındakilerde toplam fenolik madde miktarı ile toplam antioksidan aktivite arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür. Zeytinin çekirdeğinin en yüksek antioksidan aktivite göstermesi içeriğindeki temel fenolik madde olan nüzheneden kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Diğer taraftan, çekirdek ekstraktı en düşük toplam fenolik madde miktarına sahip olarak da dikkat çekmiştir. Zira nüzhenede dışındaki bileşenler ise tam bir fenolik bileşik yapısında olmadığından toplam fenolik madde tayininde kullanılan Folin Denis reaktifi ile reaksiyon vermemişlerdir. Dolayısıyla tayin edilen toplam fenolik madde miktarı da düşük seviyelerde kalmıştır.

Zeytinyağı, zeytinyağı üretimi esnasında ele geçen alperujo (% 65–70 oranında nem ihtiva eder), zeytin yaprağı, dalları ve çekirdekleri her biri ayrı uygun bir yöntemle ekstrakte edilip, içeriklerindeki biyofenoller açısından LC/MS/MS ile analiz edilmişlerdir. Yağda oleuropeine hiç raslanmazken, yapraklarda 19050 mg/kg, dallarda 673 mg/kg, alperujoda 37 mg/kg ve çekirdeğinde 0.06 mg/kg oleuropein olduğu görülmüştür. Alperujonun en yüksek miktarda hidroksitirosol (831 mg/kg) içeren bir zeytin yan ürünü olduğu görülmüştür. Dallarının ve çekirdeklerinin de kilogram başına 20 mg hidroksitirosol gibi değerli bir antioksidan madde içerdiği de gözlenen sonuçlardan birisi olmuştur. Bu tarzda elde edilen, içeriğinde pek çok bileşen olan karmaşık ekstraktları saflaştırmaya gerek duymaksızın son derece hassas ve hızlı (20 dakika) bir şekilde analiz etmede LC/MS/MS gayet başarılı sonuçlar vermiştir [83].

Literatürde zeytin yapraklarından süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile ekstrakt eldesine yönelik yapılmış az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Modifiye edici miktarı, basınç, sıcaklık, akış hızı, ekstraksiyon süresi ve toplama/elüsyon değişkenleri gibi parametrelerin incelendiği bir süperkritik akışkan ekstraksiyonu çalışmasında kurutulan, ufalanan ve elenen 30 mg civarındaki zeytin yaprakları ekstraksiyona tabi tutulmuştur. 100 °C sıcaklık ve 334 bar basınçtaki CO₂, % 10 metanol ile modifiye edilerek 2 mL/dak akış hızı ile 140 dakika sürede ekstraksiyon gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon kolonundaki ölü hacmi azaltmak için diatome toprak kullanılmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunun fenolik bileşikler ekstrakte etmede hekzan, dietil eter ve etil asetatın çözücü olarak kullanıldığı ultrasonik destekli ekstraksiyondan daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Fakat çözücü olarak metanolün kullanıldığı yine ultrasonik destekli ekstraksiyonda, süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile elde edilen sonucun 2 katından fazla verim elde edilmiştir [4]. Yine zeytin yapraklarından lipofilik bir bileşik olan tokoferolün ekstraksiyonunda süperkritik akışkan ekstraksiyonu yöntemi kullanılmıştır. 25–45 MPa basınç ve 313–333 K sıcaklık aralığında, 0.25–1.5 mm partikül büyüklüğünde ve 0.5–1.5 SL/dak akışkan akış hızında çalışılmış ve optimum şartlar belirlenmiştir. Elde edilen bulgular hekzan ile gerçekleştirilen sokslet metodu ile kıyaslanmıştır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonunda 2 saat süre optimum reaksiyon süresi olarak tayin edilmiştir. Zira uzun ekstraksiyon süreleri ekstrakt miktarını önemli seviyede arttırmamış ve üstelik daha seyreltik bir ekstrakt eldesine sebebiyet vermiştir. Elde edilen tokoferol miktarı basınç arttıkça azaldığı için optimum basınç 25 MPa olarak seçilmiştir. Oysa basınç artışı ile beraber elde edilen toplam ekstrakt miktarı artmıştır. Bu durum ekstrakt içerisindeki diğer bileşenlerin basınç ile beraber daha fazla ekstrakte edilmesi ve böylece ekstrakte edilen tokoferolün miktarının azalması ile açıklanmıştır. Sıcaklık artışı ile verim artışı önemli seviyede değişmemiş ve optimum sıcaklık 313 K olarak kabul edilmiştir. Partikül boyutu küçüldükçe ekstrakt miktarı artmış, fakat tokoferol miktarı azalmıştır. Bu durum ön işlemlerde boyut küçültme esnasında tokoferolün bozulmuş olabilmesi ihtimali ile yorumlanmıştır. Bunun önüne geçebilmek için 1.5 mm ortalama çap ideal boyut olarak seçilmiştir. Akış hızının arttırmanın ekstraktörde kalan akışkanın süresinin az ve dengeye gelme süresinin yeterli olamayabileceği düşüncesini doğurmuş, ortalama bir değer olan 1 SL/dak'da çalışmasının uygun olacağı kanaati doğmuştur. Sokslet metodu ile kıyaslandığında ekstrakt verimi açısından süperkritik akışkan ekstraksiyonundan çok daha iyi sonuçlar

elde edilmesine rağmen, tokoferol hiç elde edilememiştir. Bu netice ise sokslet metodunun uzun ekstraksiyon süresi ve dolayısıyla tokoferolün termal ve oksidatif bozunması ile açıklanmıştır [129].

İspanya’da yürütülmüş olan bir çalışmada hekzan ile ekstrakte edilmiş ham zeytin yaprağı ekstraktı, pilot ölçekte bir ters akımlı süperkritik akışkan ekstraksiyonu ile fraksiyonlanmıştır. 10 kg yaprak öğütülüp 50 L hekzan ile 48 saat ısıtılıp bekletilmiş ve ardından süzülüp hacmi 5 L oluncaya kadar çözücüsü buharlaştırılmıştır. Sıvı örnek, CO₂ girişinin üzerinden dolgulu kolonun (kolon 3 mm çapındaki Fenske halkaları ile doldurulmuştur) ortasından verildiği için bir ters akım meydana gelmektedir. Çünkü örnek yukardan aşağıya akarken, CO₂ yukarıya doğru çıkmaktadır. Hekzan ekstraktı içerisinde vakslar, hidrokarbonlar, skualen, β -karoten, trigliseridler, α -tokoferol, β -sitosterol ve alkoller olduğu görülmüştür. 75–200 bar basınç, 35–50 °C sıcaklık ve % 0–10 etanol oranında çalışılmış ve çoğu bileşen için en iyi verimin 75 bar, 35 °C ve % 10 etanol parametreleri ile elde edildiği gözlenmiştir. Vakslar ve α -tokoferol rafinatta kalırken, hidrokarbonlar seperatörden geri kazanılmıştır. α -tokoferolün en kolay ayrılan bileşen olduğu da elde edilmiş önemli bulgulardandır [35].

Zeytin yapraklarından ekstrakt elde etmede süperkritik akışkan ekstraksiyonu dışında diğer ileri ayırma yöntemlerinin kullanıldığı birkaç çalışmaya da literatürde rastlamak mümkündür. Geleneksel metodlara kıyasla daha hızlı ve daha etkili olan ultrasonik destekli ekstraksiyon yardımı ile zeytin yaprağı ekstraktı elde edilmiş ve 24 saate karşı 25 dakika gibi kısa sürede, etanol-su çözücü sistemi ile istenilen verime ulaşılmıştır. Bu yöntemde söz konusu olan bir dezavantaj ultrasonik dalgaların meydana getirdiği sıcaklıkta bir artıştır. Bu, termal bozunmalara sebebiyet veren bir durum olsa da zeytin yapraklarının içinde bulunan oleuropein, verbaskozit, apigenin –7–glukozit ve luteolin –7–glukozit gibi istenilen maddelerin degrade olmadığı görülmüştür [157].

Buna benzer bir diğer çalışma da mikrodalga destekli ekstraksiyon ile gerçekleştirilmiştir. Aynı araştırmacılar tarafından gerçekleştirilmiş ve optimum şartlar altında, zeytin yapraklarının ekstraksiyonunda en iyi verime 8 dakikada (ultrasonik destekli ekstraksiyondan da kısa sürede) ulaşılmıştır. 1 g yaprak 8 mL etanol/su (4v/v) çözücü karışımı ile 200 W’lık mikrodalga ışınlaması ile ekstrakte edilmiş, elde edilen

süspansiyon santrifüj edilerek analize verilmeden önce seyreltilmiştir. Konvansiyonel yöntemde ise yine 1 g yaprak 8 mL aynı çözücü karışımı ile, fakat bu kez 40 °C’ de 24 saat bir erlen içerisinde karıştırılmıştır [90].

Aynı çalışma gurubunun yine zeytin yapraklarına uygulamış olduğu bir başka yöntem ise süper ısıtılmış sıvı ekstraksiyonudur. Optimum şartlardaki ekstraksiyon 13 dakika sürmüştür. Bu yöntemde kritik değerlere çıkılmaksızın yüksek sıcaklık ve basınçta organik çözücü kullanılmaktadır. Ekstraksiyon, 6 bar basınç ve 140 °C sıcaklık koşullarında, etanol/su (7v/3v) çözücü karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu şartlar altında çözücünün yüzey gerilimi ve viskozitesi azalmakta ve bu durum örneğin daha iyi ıslanmasına ve matrisin daha iyi penetrasyonuna sebep olmaktadır. Dolayısıyla kütle iletimi de artmaktadır. 6 bar ve 140 °C gibi şartların uygulandığı bir ekstraktörün, ultrason ve mikrodalga destekli olanlardan daha ucuz olması, bakım masraflarının da düşük olması ve etanol–su karışımı gibi tamamen çevre dostu çözücülerin kullanılmasıyla oldukça iyi verimlerin elde edilmesi gibi nedenlerden ötürü endüstriyel boyutta tavsiye edilmiştir [91].

Zeytin yapraklarındaki antioksidan maddelerin ipek fibroini üzerinde adsorpsiyonu ile ilgili yayınlanmış makaleler mevcuttur. Zeytin yaprağının önemli fenolik bileşiklerinin ekstraksiyonu ve ardından saflığı arttırmak için ipek fibroini üzerinde adsorbsiyonu yapılmıştır. Sonuçta, ipek fibroininin antioksidatif ve antimikrobiyal fonksiyonel gıda veya gıda takviyelerinin üretiminde tavsiye edilebilir bir protein bazlı biyopolimer olduğuna karar verilmiştir. Bitki ekstraktının içinde şeker, protein veya metaller gibi pek çok diğer bileşen de olacağı için spesifik ürünü elde etmek için daha ileri bir saflaştırma gerekebilmektedir. Dolayısıyla ham özütten seçimli olarak bitkisel metabolitlerin kazanımında adsorpsiyon da düşük maliyetli olarak tercih edilebilir bir yöntem olarak önerilmiştir [10, 158].

Daha önce de belirtildiği gibi oleuropein gibi sekoiridoidler sadece zeytingiller familyasına ait bitkilerde bulunmaktadır. Bu durumu doğrular nitelikte iki farklı bitkiden (leylak ve kurtbağrı) oleuropein ve diğer benzer fenolik komponentler ekstrakte edilmiştir. Sonuçların zeytin yaprağı ile kıyaslanır seviyede olduğu görülmüştür [95, 96].

Çevresel faktörlerin en önemlilerinden biri olan su stresine karşı zeytin ağacının göstermiş olduğu tepki yaprağının, meyvesinin ve neticesinde yağının içeriğindeki bileşenlerin dağılımını etkilemektedir. Yapılmış olan pek çok araştırmada zeytin ağacına uygulanan sulama programının yağının içeriğindeki fenolik madde dağılımını önemli seviyede değiştirdiği gözlemlenmiştir. Fenolik madde seviyesindeki değişim yağın oksidatif kararlılık ve acımsı tad gibi özelliklerini etkilemiştir. Nitekim ağaçlara uygulanan su miktarı azaltıldığında yani su stresi arttırıldığında, ürünün kararlılığı ve duyusal özelliklerinden sorumlu fenolik maddelerin miktarlarının arttığı görülmüştür [48, 159, 160].

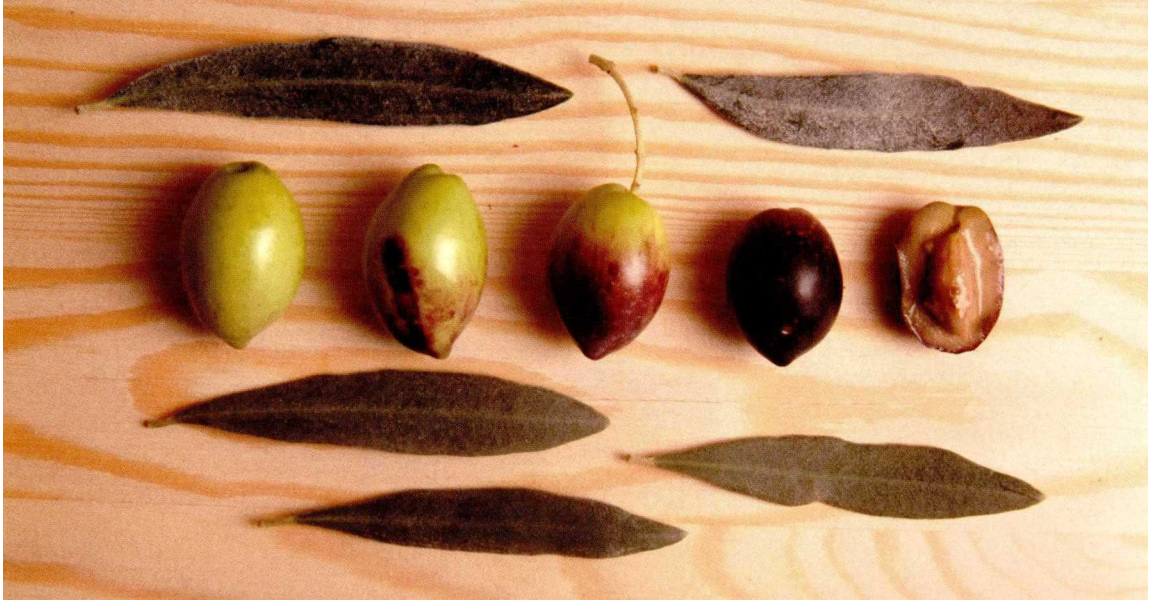
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ZEYTİN YAPRAKLARINDAN EKSTRAKT ELDESİNE VE EKSTRAKTIN OLEUROPEİN İÇERİĞİNİN İNCELENMESİNE YÖNELİK YAPILAN DENEMELER

Bu çalışmanın ilk aşamasında zeytin ağacı yapraklarından ekstrakt elde edilmesi ve içeriğindeki oleuropein miktarının incelenmesi için yapılan denemelerde, kurutulmuş ve öğütülmüş yapraklara klasik çözücü ekstraksiyonu, sokslet metodu ve süperkritik-CO₂ (SC-CO₂) ekstraksiyonu yöntemleri uygulanmıştır. Ekstrakt içerisindeki oleuropeinin analizi ise LC-ESI-MS/MS kombine yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Malzeme

Ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan zeytin ağacı yaprakları Ege Bölgesi'nin Menemen yöresinden temin edilmiştir. Faydalanılan zeytin ağacı türü Memeli'dir. Bu tür Emiralem, Akzeytin ve Çekişte olarak da adlandırılmaktadır. Memeli türü zeytin ağacı, dallanmanın sık ve yaprak yoğunluğunun bol olduğu bir ağaç türüdür. Yaprak orta uzunlukta ve genişlikte eliptik bir yapıdadır. Üst yüzeyi puslu, koyu mat yeşil ve tüysüzdür. Alt yüzeyi ise gri-yeşil ve tüysüzdür. Ucunda küçük sarı bir iğne bulunmaktadır. Sapı ise gri – yeşil renktedir. Literatürdeki ortalama boy ve eni sırasıyla 57.38 mm ve 11.08 mm'dir (Şekil 3.1) [70]. Çalışmalarda kullanılan yaprakların ortalama boy ve eni ise sırasıyla 56.48 mm ve 11.44 mm olarak ölçülmüştür. Ortalama boyut ölçümleri, 100 adet taze toplanmış yaprağın en ve boylarının hassas kumpas aleti ile ölçülüp aritmetik ortalamalarının alınması suretiyle bulunmuştur.



Şekil 3.1: Memeli türü zeytin ağacının meyvesi ve yaprakları

Çalışmaların bu aşamasında kullanılan yapraklar aynı ağaçlardan, 2008 yılının Ağustos ayında elle toplanmıştır. Oda sıcaklığında muhafaza edilerek kurutulduktan sonra karanlık ve kapalı bir ortamda saklanmıştır. Dallarından temizlenen yapraklar mutfak tipi bir robot yardımıyla öğütüldükten sonra bir elek serisi (Endocotts Ltd., London, England) kullanılarak elek analizi yapılmıştır. Ortalama tanecik boyutu $> 605 \mu\text{m}$ olarak tayin edildikten sonra ekstraksiyon işlemlerine geçilmiştir. SC-CO₂ denemelerinde kullanılan karbondioksit HABAS'tan temin edilmiş olup % 99.9 saflıktadır. Etanol, metanol ve hekzan ise Merck firmasından sağlanmıştır ve her biri ayrı ayrı $> \% 99.5$, $> \%99.8$ ve > 99 saflıktadırlar.

3.1.2. Klasik Çözücü Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon verimlerini kıyaslamak amacıyla kullanılan yöntemlerden biri olan klasik çözücü ekstraksiyonunda öğütülmüş zeytin yaprağı istediğimiz maddeyi (oleuropein) çözebilen polar bir çözücü (su ve metanol) ve çözücü karışımı ile (metanol/su) belirli bir süre temasta bırakılmıştır. Bu esnada bazı denemelerde, kullanılan çözücü ile karışmayan ve istediğimiz maddeden ziyade yaprak içerisindeki yağları çözebilen apolar yapıdaki hekzan da ikinci bir ekstraktan olarak ortama ilave edilmiş ve faz ayrımı

gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde oleuropein dışında kalan ve istenilmeyen maddelerin hekzan fazına geçmesi amaçlanmıştır. Ekstraksiyon işlemi her bir örneğe üç kez uygulanmış olup sonuçlar üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması olarak gösterilmiştir. Sonuçlar % oleuropein cinsinden verilmiştir. Bu yöntemle göre zeytin ağacı yapraklarına uygulanan işlemler şöyledir:

3.1.2.1. Metanol ile Ekstraksiyon

1. Numune hazırlama: Parçalanıp ufalanan yapraklar elendikten sonra yaklaşık 5 g alınarak içerisinde manyetik balık bulunan 100 mL'lik bir erlen içerisinde konulmuştur.
2. Ekstraksiyon: Erlen içerisinde 40 mL metanol koyulup Heidolph MR Hei-Standart model ısıtıcılı manyetik bir karıştırıcı üzerinde, oda sıcaklığında, 1400 devir/dak hızda 160 dakika (10 dakikalık periyotla analiz için durdurmak kaydıyla) karıştırılmıştır. Karıştırma esnasında erlenin çevresi alüminyum folyo ile sarılarak ışık etkisiyle çeşitli bozunmaların önüne geçilmesi hedeflenmiştir.
3. Analize hazırlama: Karıştırma işlemi 10 dakika aralıklarla analiz edilmek üzere durdurulmuştur. Karışımdan elde edilen süzüntü bir santrifüj tüpüne alınarak Sigma 3-18 K model bir cihazda 3000 devir/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek fazların ayrılması sağlanmıştır. Üst fazdan 100 µL çekilip 30 mL % 20'lik bir metanol çözeltisi içerisinde alınmıştır. Bu şekilde analiz edilecek numune, derişimi 100 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu numune bir şırınga ile 0.45 µm'lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip 1.8 mL'lik bir vialle alınarak analiz edilmiştir.

3.1.2.2. Su ile Ekstraksiyon

1. Numune hazırlama: Yaklaşık 5 g ağırlığındaki kurutulup ufalanmış yapraklar içerisinde manyetik balık bulunan 100 mL'lik bir erlen içerisinde konulmuştur.

2. Ekstraksiyon: Erlen içerisinde 40 mL su ilave edilip Heidolph MR Hei-Standard model ısıtıcılı manyetik bir karıştırıcı üzerinde, 1400 devir/dak hızda, 25 °C sıcaklıkta ve 160 dakika, 75 °C’de ise 90 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma esnasında erlenin çevresi alüminyum folyo ile sarılarak ışık etkisiyle çeşitli bozunmalarının önüne geçilmesi ve ısı yalıtımının sağlanması hedeflenmiştir.
3. Analize hazırlama: Karıştırma işlemi belirli periyotlarda analiz edilmek üzere durdurulmuştur. Karışımdan elde edilen süzüntü bir santrifüj tüpüne alınarak Sigma 3-18 K model bir cihazda 3000 devir/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek fazların ayrılması sağlanmıştır. Sulu fazdan 100 µL çekilip 30 mL % 20’lik bir metanol çözeltisi içerisinde alınmıştır. Bu şekilde analiz edilcek numune derişimi 100 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu numune bir şırınga ile 0.45 µm’lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip 1.8 mL’lik bir vialle alınarak analiz edilmiştir.
4. Ekstraksiyon: 25 °C’de gerçekleştirilen ekstraksiyonda 120 dakikanın neticesinde elde edilmiş ve ayrılmış süzüntü aynı erlene geri boşaltılmış ve bu kez bu karışıma 40 mL daha su eklenmiştir. Bu yöntem, dengeye ulaşmanın çözünürlüğün tamamlanamamış olmasından kaynaklanabileceği düşüncesi ile uygulanmıştır. Ekstraksiyon 40 dakika daha sürmüştür.
5. Analize hazırlama: Toplamda 160 dakikalık bir ekstraksiyonun sonunda alınan numune analize hazırlarken, sulu fazdan yine 100 µL çekilmiş fakat bu kez 15 mL %20’lik metanol çözeltisi içerisinde alınmıştır. Bu şekilde 100 ppm konsantrasyonuna ulaşılmıştır.

3.1.2.3. Metanol/Su (1/3: v/v) ile Ekstraksiyon

1. Numune hazırlama: Parçalanıp ufalanan yapraklar elendikten sonra yaklaşık 5 g alınarak içerisinde manyetik balık bulunan 100 mL’lik bir erlen içerisinde konulmuştur.

2. Ekstraksiyon: Erlen içerisine 40 mL metanol/su (1/3: v/v) çözücü karışımı ve buna ek olarak 10 mL hekzan koyulup Heidolph MR Hei-Standart model ısıtıcılı manyetik bir karıştırıcı üzerinde, oda sıcaklığında, 1400 devir/dak hızda, 160 dakika karıştırılmıştır. Karıştırma esnasında erlenin çevresi alüminyum folyo ile sarılarak ışık etkisiyle çeşitli bozunmaların önüne geçilmesi hedeflenmiştir.
3. Analize hazırlama: Karıştırma işlemi belirli periyotlarda analiz edilmek üzere durdurulmuştur. Karışımdan elde edilen süzüntü bir santrifüj tüpüne alınarak Sigma 3-18 K model bir cihazda 3000 devir/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek fazların ayrılması sağlanmıştır. Sulu fazdan 100 µL çekilip 30 mL % 20'lik bir metanol çözeltisi içerisine alınmıştır. Bu şekilde analiz edilecek numune, derişimi 100 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu numune bir şırınga ile 0.45 µm'lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip 1.8 mL'lik bir vialle alınarak analiz edilmiştir.

3.1.3. Sokslet Metodu İle Ekstraksiyon

Kurutulup öğütülmüş yapraklardan yaklaşık 10 g tartılarak sokslet cihazının kartuşuna konulmuştur. Kartuş sokslet içerisine yerleştirilmiştir. Alt kısımda yer alan ve içerisinde kaynama taşı bulunan balon jojeye 250 mL çözücü ilave edildikten sonra ısıtma işlemi yapılmıştır. Her sokslet ekstraksiyonu denemesinde yaklaşık 30 kez çözücünün kartuş üzerinden geçmesiyle sifon yapması sağlanmıştır. Elde edilen ekstrakt oda sıcaklığına soğutulduktan sonra çözücüsü laboratuvar ölçekli döner buharlaştırıcıda (Buchi, Switzerland) uçurularak verim hesabı yapılmıştır.

Sonuçlar birim kuru yaprak başına ayrı ayrı ekstrakt ve oleuropein miktarları şeklinde ifade edilmiştir (mg ekstrakt/g kuru yaprak ve mg oleuropein/g kuru yaprak). Hesaplamalar aşağıda bir örnek üzerinden gösterildiği şekliyle yapılmıştır:

250 mL su ile yapılan sokslet ekstraksiyonuna ait deneme sonucu;

10.0289 g kuru yaprak, 250 mL su ile 30 kez sifon yapacak şekilde sokslet ekstraksiyonu işlemine tabi tutulmuş ve yapılan tartım sonunda 2.6572 g kuru ekstrakt elde edildiği görülmüştür.

Bu ekstraktan 5 mg numune alınmış, 5 mL hacmen % 20'lik metanol içerisinde çözündürülmüştür. Bu çözeltinin 150 µL'si 10 kat seyreltilerek 100 ppm'lik çözelti hazırlanmıştır. Bu numune bir şırınga ile 0.45 µm'lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip bir vialle alınarak LC-ESI-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonunda bu numunede 1.4472 ppm oleuropein olduğu görülmüştür. Bu miktar kuru ekstrakt üzerinden % oleuropein miktarına tekabül etmektedir. Buna göre ekstrakt ve oleuropein miktarları sırasıyla,

$$\frac{2.6572}{10.0289} \times 1000 = 264.9543 \text{ mg ekstrakt/g kuru yaprak}$$

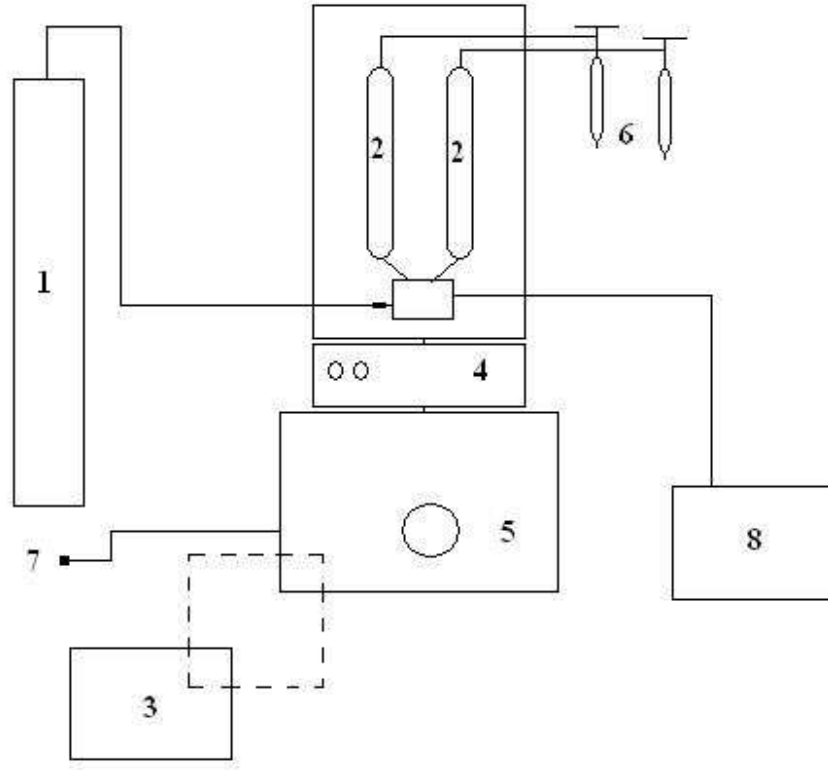
$$\frac{\frac{1.4472 \times 2.6572}{100}}{10.0289} \times 1000 = 3.8344 \text{ mg oleuropein/g kuru yaprak}$$

olarak bulunmuştur.

3.1.4. Süperkritik-CO₂ (SC-CO₂) Ekstraksiyonu

Zeytin yapraklarından SC-CO₂ ile ekstrakt elde etmek için kullanılan deney düzeneği Şekil 3.2' de gösterilmiştir. Applied Separations firmasından temin edilen Spe-ed SFE-2 7070 model süperkritik akışkan ekstraksiyon cihazının çıkabileceği en yüksek sıcaklık, basınç ve CO₂ akış hızı değerleri sırasıyla 240 °C, 680 bar ve 400 mL/dak'dır. Ekstraksiyon paslanmaz çelikten yapılmış 25 mL'lik bir hücrede gerçekleşmektedir. İstenildiği takdirde sistemde iki ekstraksiyon paralel bir şekilde yürütülebilmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu prosesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir:

Ekstraksiyon hücresinin alt kısmına bir polietilen frit, üzerine polipropilen yün, onun üzerine de yaklaşık 1 cm yüksekliğinde nem alıcı granül matriks yerleştirdikten sonra yaklaşık 5 g zeytin yaprağı konulmuştur. Hücrenin üst kısmına da yine sırasıyla matriks, polipropilen yün ve frit konularak sıkıca kapatılıp sisteme yerleştirilmiştir. 0 °C’de tutulan soğutmalı bir sirkülatörden (PolyScience marka, PN: 082551-AS model) geçirilen CO₂’in sisteme girişi sağlanmıştır. Kontrol panelleri vasıtasıyla sistem istenilen sıcaklık değerine ulaştıktan sonra hava basınç regülatörü ile basıncı istenilen değere artırılmıştır. CO₂ çıkış vanası yavaşça açılarak akışkanın sistemden akması sağlanmış ve hemen ardından mikro-ölçüm vanası ile akışkanın akış hızı ayarlanıp istenilen değer akış ölçerden okunmuştur. Sistemin çalışması için gerekli olan sıkıştırılmış hava da 3 kW gücünde “Gamak MSD 100 L2” model elektrik motoru ile çalıştırılan “Yığitsan” marka 10 bar basınç ve 400 L hacimli bir hava kompresörü ile sağlanmıştır. Yardımcı çözücü kullanıldığı durumlarda kullanılan çözücü ikinci bir yüksek basınç pompası (Spe-ed SFE Modifier Pump Module-P/N 7170) ile 0.25-1 mL/dak olacak şekilde istenilen akış hızlarında sisteme basılmıştır. Ekstraksiyon bitiminde pompa üzerindeki hava basınç regülatörü ile sistemin basıncı düşürülmüştür. Aynı zamanda fırın sıcaklığı da kapatılmıştır. Karbondioksit akışını kesmek için giriş vanası kapatılmış ve ekstraksiyon kabının basıncını düşürmek için boşaltma vanası açılmıştır. Basınç tamamen düşünce boşaltma vanası da kapatılmıştır. Numune toplama kabı ekstraksiyon boyunca çeşitli bozunmaları önlemek maksadıyla alüminyum folyaya sarılı olarak muhafaza edilmiştir. Ekstrakt bünyesindeki yardımcı çözücü buharlaştırıldıktan sonra analiz edilene kadar karanlıkta ve soğukta muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2: Süperkritik akışkan ekstraksiyonu deney düzeneği. 1- CO₂ tüpü, 2- Ekstraksiyon kabı, 3- Soğutmalı sirkülatör, 4- Sıcaklık kontrol sistemi, 5- Hava basınç regülatörü, 6- Mikro-ölçüm vanası, 7- Hava kompresörü, 8- Yardımcı çözücü pompası.

5 g civarında alınan zeytin ağacı yaprağı örnekleri ile 2 L/dak CO₂ (gaz) akış hızında 100, 200 ve 300 bar basınç ile 50 ve 100 °C sıcaklık değerlerinde, 120 dakikalık ekstraksiyon denemeleri gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta yapılan ön denemelerde ekstraksiyon, yardımcı çözücü olmadan yapılmış ve ekstraktların analiz sonuçlarından oleuropein veriminin çok düşük olduğu görülmüştür. Bu sebeple ekstraksiyon verimini artırmak, yani oleuropeinin karbondioksit içindeki çözünürlüğünü artırmak için yardımcı çözücü katkısı yapılmıştır. Yardımcı çözücünün kullanıldığı durumlarda, sistem istenilen sıcaklık ve basınca getirildikten sonra süperkritik CO₂ sisteme beslenmeye başlanmış ve hemen ardından sisteme yüksek basınç pompası yardımıyla 1 saat boyunca yardımcı çözücü beslenmiştir. Bu sürenin sonunda pompa kapatılmış ve

ekstraksiyon hücresi içinde yardımcı çözücü kalmaması için işleme 1 saat daha sadece CO₂ ile devam edilmiştir.

Sonuçlar birim kuru yaprak başına ayrı ayrı ekstrakt ve oleuropein miktarları şeklinde ifade edilmiştir (mg ekstrakt/g kuru yaprak ve mg oleuropein/g kuru yaprak). Hesaplamalar aşağıda bir örnek üzerinden gösterildiği şekliyle yapılmıştır:

50 °C sıcaklık ve 300 bar basınçta gerçekleştirilen denemenin sonucuna göre;

5.2725 g kuru yaprak, 50 °C sıcaklık ve 300 bar basınçta 120 dakika boyunca yardımcı çözücü olmadan SC-CO₂ işlemine tabi tutulmuş ve yapılan tartım sonunda 0.0859 g kuru ekstrakt elde edildiği görülmüştür.

Bu ekstraktan 5 mg numune alınmış 5 mL % 20 (vol.) metanol içerisinde çözündürülmüştür. Bu çözeltiden 150 µL alınmış ve 10 kat seyreltilerek 100 ppm'lik çözelti hazırlanmıştır. Bu numune bir şırınga ile 0.45 µm'lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip bir vialle alınarak LC-ESI-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz sonunda bu numunede 0.6934 ppm oleuropein olduğu görülmüştür. Bu miktar, kuru ekstrakt üzerinden % oleuropein miktarına tekabül etmektedir. Buna göre ekstrakt ve oleuropein miktarları sırasıyla,

$$\frac{0.0859}{5.2725} \times 1000 = 16.2921 \text{ mg ekstrakt / g kuru yaprak yaprak}$$

$$\frac{\frac{0.6934 \times 0.0859}{100}}{5.2725} \times 1000 = 0.1130 \text{ mg oleuropein / g kuru yaprak yaprak}$$

olarak bulunmuştur.

3.1.5. Analizler

Ekstraktlar “Agilent Technologies” marka “1200 Series” model sıvı kromatografisi pompa sistemi ile bağlantılı bir “Agilent Jet Stream ESI” elektro sprey iyonizasyon kaynağı olan “Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS” model kütle spektroskopisi (LC-ESI-MS/MS) cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Cihazda ZORBAX SB (50x4.6 mm; C18, 5 μ m) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz A olarak hacimce % 0.02 formik asit içeren % 95 su ve % 5 metil alkol, mobil faz B olarak ise % 100 metil alkol kullanılmıştır. Negatif iyon modunda çalışılmıştır. Kolon sıcaklığı 55 °C ve enjeksiyon hacmi 2 μ L’ dir. Ayırma işlemi 0.9 mL/dak akış hızında aşağıdaki derecelenme programı ile gerçekleştirilmiştir:

Tablo 3.1: Mobil fazların beslenme oranlarına ait derecelenme programı

Süre (dakika)	B (%)	A (%)
0	0	100
0.5	0	100
1.5	95	5
5	95	5
5.1	0	100
8.5	0	100

3.2. FENOLİK MADDE PROFİLİNİN İNCELENDİĞİ DENEMELER

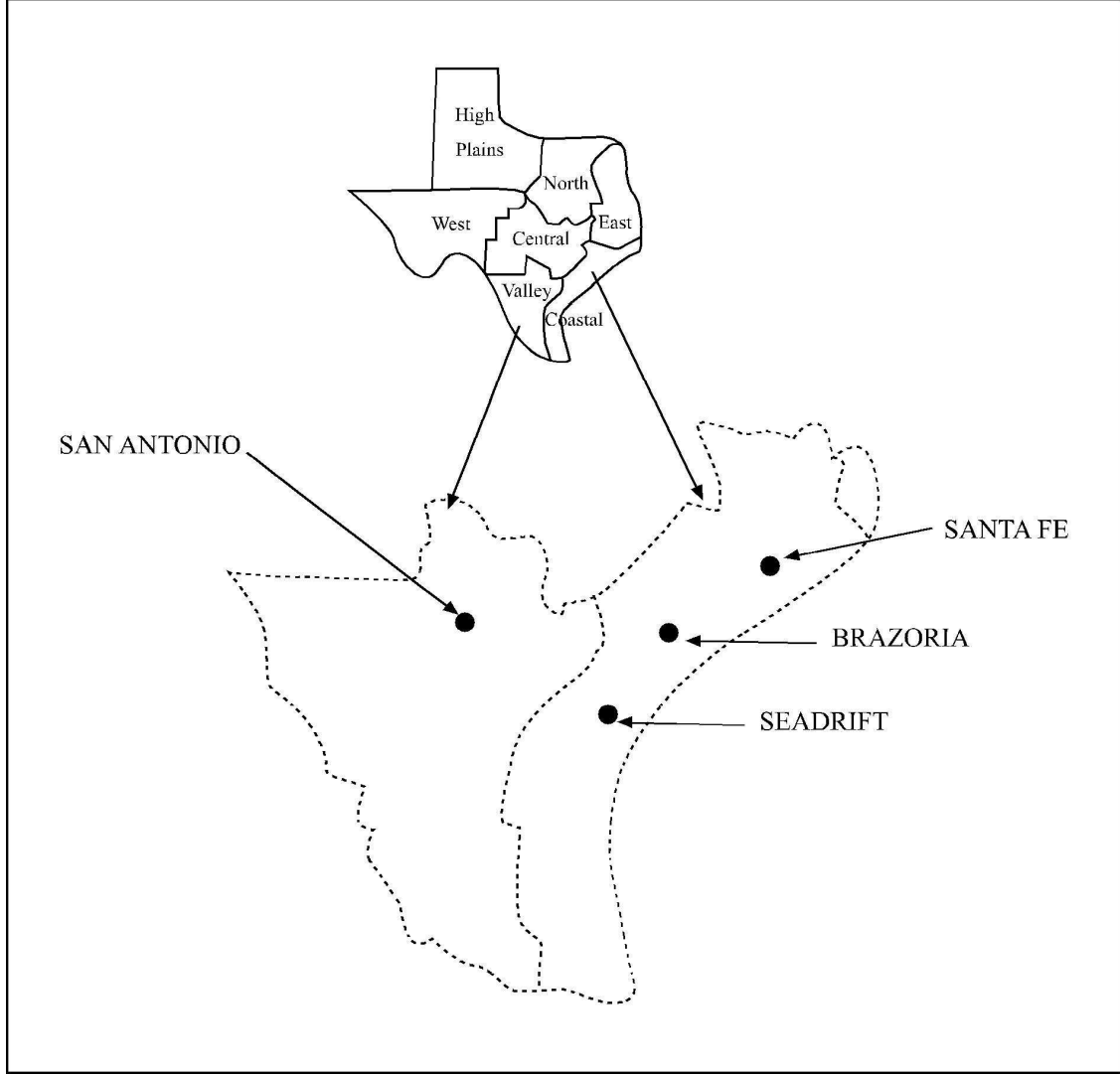
Zeytin yaprağının türünün, coğrafi kökeninin ve örnek alma zamanının ekstrakt içerisindeki toplam fenolik madde ve tek tek temel fenolik bileşiklere (oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit) etkisinin incelenmesini kapsayan çalışma, tez çalışmasının ileriki safhasında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan "United States Department of Agriculture, Research, Education and Economics, Agricultural Research Service (USDA-ARS)" isimli araştırma merkezinde yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı spektrofotometrik yöntemle, fenolik bileşenlerin oranları ise HPLC ile tayin edilmiştir.

3.2.1. Malzeme

Araştırma materyali olarak kullanılan 25 farklı kültür örneği (San Felice, Galleaga, Frantoio, Maurino, Leccino, Arbasana, Arbequina, Empeltre, Koroneiki, Taggiasca, Grappolo, Manzanilla, Oueslati, Santa Caterina, Ligurian, Itrana, Pendolino, Sevillano, Chitoni, Picual, Chemlali, Coratina, Mission, Aglandau ve Nichitskaia) Teksas eyaletinin San Antonio şehrinde bulunan "Sandy Oaks Olive Orchard" isimli bir zeytin bağından temin edilmiştir (EKLER). İncelenen zeytin ağacı türleri Amerika Birleşik Devletleri, Fransa, İspanya, İtalya, Portekiz, Rusya, Tunus ve Yunanistan orijinlidir. Dolayısıyla söz konusu türler aynı coğrafi ve iklimsel şartlara tabi tutulmuştur. Ayrıca, İspanyol kökenli ve Teksas' da çok popüler bir tür olan Arbequina zeytin ağacına ait yapraklar (EKLER), Teksas' ın dört farklı şehriden (San Antonio, Seadrift, Brazoria ve Santa Fe) toplanmıştır. San Antonio deniz seviyesinden 172 m, Seadrift 4.9 m, Brazoria 6.1 m ve Santa Fe 7.6 m yüksekliklerde bulunmaktadırlar (Şekil 3.3).

Her bir tür için üç farklı ağaç kullanılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması ($\pm$ standart sapma) olarak gösterilmiştir. Örnekler toplandıktan hemen sonra soğutucu içerisinde muhafaza edilmiştir. Nitrojen ortamında, havan ve tokmak ile öğütülen yaprak örnekleri ekstrakte edilene kadar -80 °C'de derin dondurucu içerisinde

tutulmuştur. Hasat işlemi 2010 yılının Şubat ve Haziran ayları olmak üzere iki farklı dönemde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3: Arbequina zeytin ağacı yaprak örneklerinin toplandığı şehirler ve coğrafi konumları

Polifenol ekstraksiyonu için kullanılan metanol HPLC saflığında olup Riedel-de Haën (BioChemica Fluka Cheme GmbH Buchs, İsviçre)'dan, spektrofotometrik toplam polifenol analizinde kullanılan Folin-Cioacalteu reaktifi ve Na_2CO_3 ise E. Merck Co. (Darmstadt, Almanya)' dan satın alınmıştır. Gallik asit ise Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)' dan sağlanmıştır. HPLC ile fenolik madde analizinde kullanılan oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit Extrasynthese (Genay, Fransa)' den temin edilmiştir.

3.2.2. Ekstraksiyon

Öğütülmüş yapraklardan ekstrakt elde etmek amacıyla % 80 metanol (vol.) içerisinde çeşitli ön denemeler yapılmıştır. Taze yapraklardan önce 0.3 g, daha sonra 0.6 g ve en sonunda 1.2 g alınarak 10 mL % 80 metanol içerisinde, Polytron marka (PT 3100) bir homojenizatör kullanılarak 10 saniye (3 tekrarlı olarak) 28000 rpm’de karıştırılmıştır. Ardından Beckman J2-HC marka bir cihazda 18000 rpm hızla 25 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen ekstrakt dekante edildikten sonra, kalıntıya 10 mL daha metanol çözeltisi ilave edilip aynı işlemler tekrar edilmiştir. Dekantasyonun ardından ekstrakt hacmi toplam 25 mL olacak şekilde metanol çözeltisi ilave edilerek derin dondurucuda, -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu ekstraksiyon işlemi her bir örneğe üç kez uygulanmış olup sonuçlar üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması olarak gösterilmiştir.

Analizlere geçmeden önce her bir numune bir şırınga ile 0.45 µm’lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilip 1.8 mL’lik viallere alınmıştır.

Yapılan ön denemelerin analiz sonuçlarından yola çıkılarak, tüm ekstraksiyon işlemlerinde 1.2 gram öğütülmüş yaprak kullanılmıştır.

3.2.3. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam polifenol analizi spektrofotometrik Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Kullanılan spektrofotometre Beckman-Coulter UV marka olup, modeli DU530’tur. Bu analiz için standart gallik asit çözeltisinin 0.5-2.5 mg/mL aralığındaki 10 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($R^2 = 0.9976$) ($y = 0.4618x - 0.0312$). Sonuçlar elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve µg gallik asit eş değeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

Bu yöntemde 10 µL zeytin yaprağı ekstraktı 190 µL saf su ile seyreltilmiştir. Ardından 1 mL Folin-Ciocalteu reaktifi ile karıştırılmıştır. Karışıma 800 µL, % 7.5’lik doygun sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek iyice çalkalanmıştır. Elde edilen karışım 30 dakika karanlıkta inkübe edildikten sonra oluşan mavi rengin absorbansı spektrofotometrede 765 nm’de okunmuştur.

Her bir örnek üç kez analiz edilmiş olup sonuçlar üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması olarak gösterilmiştir.

3.2.4. HPLC ile Fenolik Madde Analizi

Seyreltik ham ekstrakt 0.45 µm'lik rejenere selüloz bir filtreden geçirilerek süzölmüştür. Filtre edilmiş ekstraktın 200 µL'si 1.5 mL'lik vialler içerisindeki yerleştiricilere (inserter) koyulmuştur. HPLC analizinde uygulanan koşullar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Örnekteki fenolik bileşiklerin tanımlanması, bileşiklerin kolondaki alıkonma süresi ve UV-spektrumlarının ilgili standart maddelere ait süre ve spektrumlarının karşılaştırılması suretiyle yapılmıştır. Fenolik bileşiklere ait piklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanması, bileşiklerin maksimum absorpsiyon değeri verdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle fenolik maddelerin analizi için 280 nm dalga boyu seçilmiştir. Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve standart maddelerin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır. Herbir standarta ait eğrinin denklemi Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

Tablo 3.2: HPLC çalışma koşulları ve gradient elusyon programı

HPLC çalışma koşulları	Gradient elusyon program		
	Süre (dakika)	A (%)	B (%)
Model: Waters (Milford, MA, USA) Alliance 2695	0	5	95
Kolon: Waters XTerra MS (3.9 mm x150 mm; 5 µm; C ₁₈)	10	10	90
Dedektör: 2996 fotoiyot dedektör (PDA)	24	30	70
Mobil faz: A= Asetonitril	35	40	60
B= Su + % 0.02 trifloroasteik asit (v/v)	45	80	20
Dedeksiyon: 280 nm			
Akış hızı: 1 mL/dak			
Kolon sıcaklığı: 35 °C			
Enjeksiyon miktarı: 10 µL			

Tablo 3.3: Standartlara ait eğri denklemleri

Standart	Eğri denklemi
Oleuropein	$y = 115x + 24.917$
Verbaskozit	$y = 9145.6x - 9.3936$
Luteolin 7-O-glukozit	$y = 2859.8x + 7.7668$
Luteolin 4'-O-glukozit	$y = 8215.8x + 5.0807$

3.3. SU STRESİ DENEMELERİ

USDA-ARS isimli araştırma merkezinde yapılan çalışma sürecinde zeytin ağaçları üzerine en önemli çevresel faktörlerden biri olan su stresinin etkileri de gözlenmiştir. Bu çalışma kapsamında, ilgili zeytin ağaçlarının su stresi karşısında göstermiş oldukları tepkiler, yapraklarının içerdiği fenolik madde ve aminoasit miktarları cinsinden ifade edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, sera içerisinde yetiştirilen iki farklı tür zeytin ağacı, iki alternatif sıcaklıktaki iklim odalarında gözlemlenmiştir. İncelenen örneklerin yapraklarındaki toplam fenolik madde ve aminoasit miktarları saptanmıştır. Toplam fenolik madde ve toplam aminoasit miktarları spektrofotometrik yöntemlerle ölçülmüştür.

3.3.1. Malzeme

Fenolik maddeler için uygulanan ekstraksiyon ve toplam fenol tayini metodları daha önce bahsedildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Aminoasitlerin analizi için ise biraz daha farklı bir ekstraksiyon tekniği uygulanmıştır. Elde edilen ekstraktı saflaştırmak için kullanılan katyon değiştirici reçine AG[®] 50W-X8 (100-200 mesh, H⁺) Bio-Rad Laboratories, Inc.'den alınmıştır. Amonyum hidroksit 14.8 N olarak Fisher Scientific'den satın alınmıştır. Aminoasitlerin analizi için kullanılan L-alfa-Amino-n-Bütirik Asit, MP Biomedicals, LLC'den sağlanmıştır. Ninhidrin reaktifi ise % 2'lik solüsyon halinde Sigma - Aldrich firmasından temin edilmiştir.

3.3.2. Araştırma Yerinin Tanımı ve Özellikleri

Denemeler Amerika Birleşik Devletleri, Texas eyaletinin güney kesiminde (Weslaco) bulunan “United States Department of Agriculture, Research, Education and Economics, Agricultural Research Service (USDA-ARS)” isimli araştırma merkezinin serasında gerçekleştirilmiştir. Araştırma sera ortamı (EKLER) ile yine sera içerisinde, fakat farklı bir sıcaklık uygulamasını içeren ayrı bir iklim odasında (EKLER) muhafaza edilen zeytin ağaçlarını kapsamaktadır. Sera içerisindeki sıcaklık 16.6-27.8 °C (en düşük–en yüksek) arasında değişmektedir. İklim odası ise 23.7-37.4 °C sıcaklık

değerlerine sahiptir. İklim odasının nem içeriği sera atmosferi ile aynı şekilde % 40–45 olarak ayarlanmıştır. Odadaki hava, sabah saat sekizde ve akşam saat dörtte olmak üzere günde iki kez değiştirilmektedir. Bir vakum pompası havayı dışarıya atarken, bir hava kompresörü ise içeriye hava basmaktadır. Bu işlem, odadaki nem miktarının dışarıya yani sera ortamı ile aynı değere ulaşması için gerekli olan havanın içeriye alınmasına yetecek bir süre olan 20 dakikada tamamlanmaktadır. Çalışmada “*Koroneiki*” ve “*Arbequina*” olmak üzere iki ayrı zeytin ağacı türü gözlemlenmiştir. İncelenen ağaçların nem miktarı bir toprak nem ölçer cihazı ile her gün ölçülmüştür (Şekil 3.4). Her bir tür için üç farklı ağaç kullanılmış olup sonuçlar 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması ($\pm$ standart sapma) olarak gösterilmiştir. Topraktaki nem miktarı % 100, % 30 ve % 10 olduğunda her bir türden ve her bir türün ağacından iki ayrı tüpte yaprak toplanmış ve ekstrakte edilene kadar -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. Hedeflenen program tamamlandığında yapraklar ekstrakte edilip içeriğindeki ayrı ayrı toplam fenol ve toplam aminoasit miktarlarının tayini yapılmıştır.



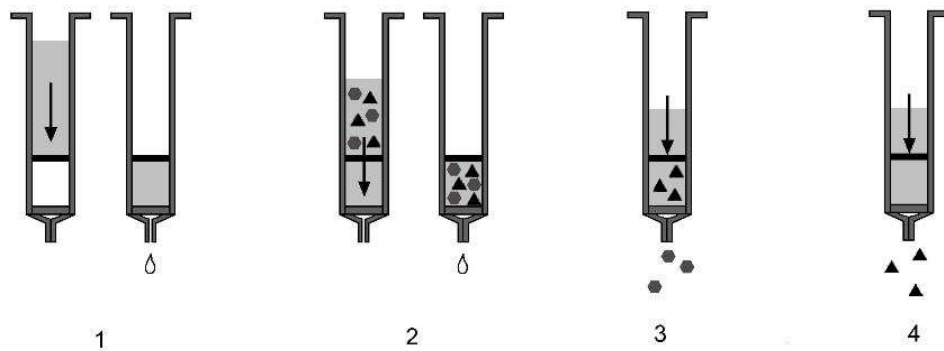
Şekil 3.4: Toprak nem ölçer aparatı

3.3.3. Aminoasit Ekstraksiyonu

Taze öğütülmüş yapraklardan 0.3 g alınarak 25 mL % 80 metanol içerisinde, Polytron marka (PT 3100) bir homojenizatör kullanılarak 10 saniye (3 tekrarlı olarak) 28000 rpm’de karıştırılmıştır. Homojenizasyonun ardından karışımlara cam boncuklardan ilave edilmiştir. Cam tüpler içerisinde bulunan bu karışımlar, su banyosu içerisinde 20 dakika kaynatılmıştır. Kaynar haldeki ekstraktlar cam yününden süzüldükten sonra 1 mL % 80 metanol çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır. Dekantasyonun ardından elde edilen ekstrakt, toplam hacmi 15 mL olacak şekilde metanol çözeltisi ilave edilerek derin dondurucuda, -80 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu ekstraksiyon işlemi her bir örneğe üç kez uygulanmış olup sonuçlar üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması ($\pm$ standart sapma) olarak gösterilmiştir.

3.3.4. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu ile Saflaştırma

Örnek hazırlama spektrometrik ve kromatografik yöntemleri uygulamadan hemen önce yapılması gereken önemli bir aşamadır. Bu işlem için kullanılan yöntemlerden birisi de katı faz ekstraksiyonudur. Bu yöntemde çeşitli tutucu maddeler tek kullanımlık iyon değiştirici reçine içeren kolonlara doldurularak pratik bir örnek hazırlama düzeneği tasarlanır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: İyon değiştirici reçine yardımı ile analiz öncesi ekstraktların saflaştırılması. 1, kolonun reçine ile şartlandırılması; 2, ekstraktın kolona aktarılması; 3, kolonun yıkanması ve istenmeyen bileşenlerin elüsyonu; 4, solutinin tutucu maddeden uygun bir çözücü ile elüsyonu (●, istenmeyen bileşenler; ▲, solute).

Yapılan çalışmada katyon değiştirici reçine olarak AG 50W-X8 (H⁺), Bio-Rad kullanılmıştır. Kullanılan kolon 100 x 9 mm ebatında ve camdan yapılmıştır. Yaklaşık 1.2 g reçine bir plastik t p içerisine alınıp üzerine 8 mL kadar su ilave edilmiştir. Karışım çok yavaş bir şekilde karıştırılıp kolona boşaltılmıştır. Ardından 4 mL ekstrakt  rneği kolona gönderilmiştir.  rnek reğineden s z ld kten sonra 2 kez su ile yıkanmıştır. İstenmeyen bileşenlerin uzaklaştırılmasından sonra 10 mL, 2 M NH₄OH ile aminoasitler el e edilmiştir. Elde edilen örneğin buharlaştırılması ise SpeedVac[®] System, SP D 1010 marka ve model evaporatör ile gerçekleştirilmiştir. Kurutulmuş örneğe 200  L, 20 mM HCl ilave edildikten sonra 0.45  m'lik rejenere selüloz bir filtreden s z lm ştir.

3.3.5. Toplam Aminoasit Tayini

Toplam aminoasit tayini için gene Beckman-Coulter UV marka, DU530 model spektrofotometre kullanılmıştır. Bu analiz için standart olarak L-alfa-Amino-n-Bütirik Asit (AABA)  zeltisi kullanılmıştır. Toz halindeki bu maddeden 0.0066 g alınıp, 25 mL 0.1 M HCl  zeltisi içerisine ilave edilmiştir. AABA  zeltisinin 10-0.156  M aralığındaki 6 farklı konsantrasyonu ile bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir ($r^2 = 0.9981$). Sonuçlar elde edilen eğrinin ($y = 0.2413x + 0.0135$) regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve  g AABA eş değeri olarak ifade edilmiştir.

Bu yöntemde 200  L zeytin yaprağı ekstraktı 300  L saf su ile seyreltilmiştir. Ardından 250  L % 2'lik ninhidrin reaktifi (Sigma-Aldrich) ile karıştırılmıştır. Karışım bir vorteks yardımı ile hafifçe çalkalanıp, 80  C'de kuru banyo bir inkübatör (Fisher Scientific) yardımı ile 10 dakika inkübe edilmiştir. Oda sıcaklığına getirilen örneklere 1250  L etanol ilave edildikten hemen sonra oluşan rengin absorbansı spektrofotometrede 570 nm'de okunmuştur.

Her bir örnek üç kez analiz edilmiş olup sonuçlar üç tekrarlı ölçümlerin ortalaması ($\pm$ standart sapma) olarak gösterilmiştir.

3.4. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ

İstatistiksel analizler InStat® software, version 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) programı ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 3 tekrarlı ölçümlerin ortalaması $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. Tek yollu varyans analizi (ANOVA) tablosu oluşturularak verilerin anlamlı olup olmadığına bakılmıştır. “*Tukey*” karşılaştırma testiyle [142] % 95 olasılıkla (% 5 hata ile) karşılaştırmalar yapılarak, örnekler arasındaki farklılık incelenmiştir. Buna göre ANOVA tablosunda aynı sütunda yer alan ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmayan sonuçlar aynı harfle simgelenirler. Farklı sonuçlara farklı harfler verilmek suretiyle benzerlik (eş değerlik, yakınlık) dereceleri ortaya konmuş olur.

4. BULGULAR

4.1. KLASİK ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU DENEMELERİ

Klasik çözücü ekstraksiyonunda uygulanan ekstraksiyon süresi ile bu süreçte kullanılan çözücülerin ve ortam sıcaklığının zeytin yapraklarından elde edilen ekstrakta ve içeriğindeki oleuropein miktarına etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde gösterilmiştir.

4.1.1. Çözücü Türünün ve Ekstraksiyon Süresinin Verime Etkisi

Klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresinin ve çözücü türünün verime etkisini görmek amacıyla yaklaşık 5 g zeytin ağacı yaprağı üzerinde çözücü olarak metanol, su ve metanol/su (1/3: v/v) çözücü karışımının kullanıldığı ve detayları Bölüm 3.1’ de açıklanan ekstraksiyon denemeleri yapılmıştır. Elde edilen ekstraktların çözücüleri buharlaştırılmaksızın oleuropein miktarları analiz edilerek sonuçlar Tablo 4.1 - 4.4 ile verilmiş olup, Şekil 4.1 ile de grafiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.1: Metanol ile 25 °C’de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *

Süre (dakika)	% Oleuropein (kuru ekstrakt üzerinden)
10	1.71 ± 0.04
20	1.94 ± 0.04
30	2.20 ± 0.02
40	2.18 ± 0.02
50	2.20 ± 0.11
60	2.28 ± 0.06
120	2.29 ± 0.04
150	2.29 ± 0.08
160	2.29 ± 0.06

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

Tablo 4.2: Su ile 25 °C’de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *

Süre (dakika)	% Oleuropein (kuru ekstrakt üzerinden)
15	0.19 ± 0.02
30	0.20 ± 0.02
45	0.22 ± 0.02
60	0.23 ± 0.03
120	0.44 ± 0.04
150	0.51 ± 0.05
160	0.42 ± 0.05

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

Tablo 4.3: Su ile 75 °C’de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *

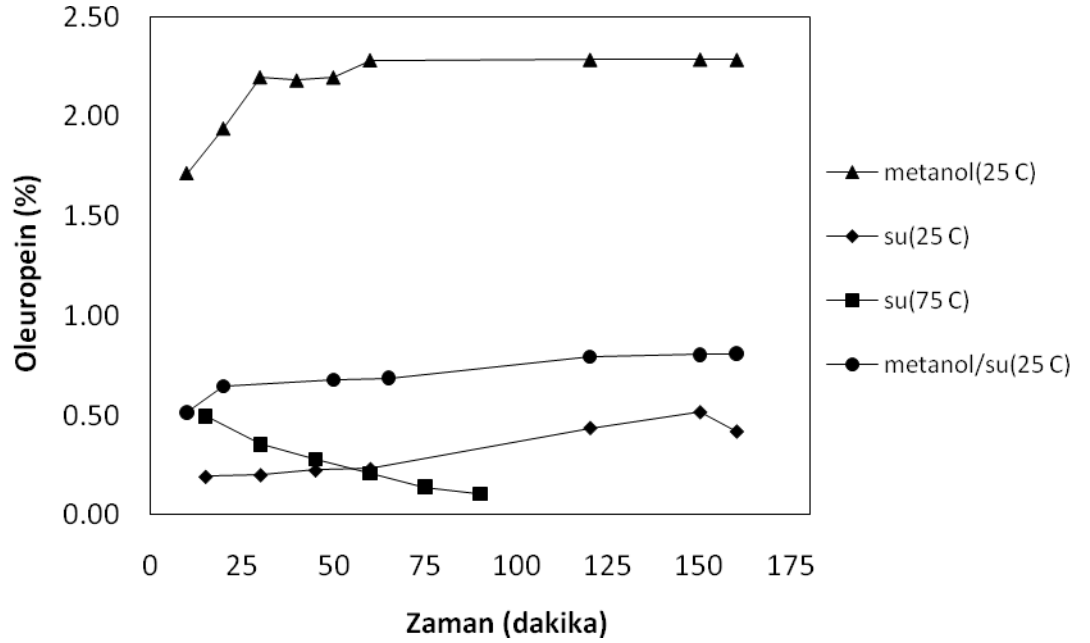
Süre (dakika)	% Oleuropein (kuru ekstrakt üzerinden)
15	0.50 ± 0.06
30	0.35 ± 0.03
45	0.28 ± 0.08
60	0.21 ± 0.03
75	0.14 ± 0.04
90	0.10 ± 0.05

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

Tablo 4.4: Metanol/su (1/3: v/v) ile 25 °C’de yapılan klasik çözücü ekstraksiyonunda zamanla ölçülen oleuropein miktarları *

Süre (dakika)	% Oleuropein (kuru ekstrakt üzerinden)
10	0.51 ± 0.04
20	0.65 ± 0.01
50	0.68 ± 0.04
65	0.69 ± 0.05
120	0.79 ± 0.05
150	0.80 ± 0.06
160	0.81 ± 0.06

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



Şekil 4.1: Klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraksiyon süresinin ve çözücü türünün ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.

Tablo 4.1 ile 4.2'den oda sıcaklığındaki metanollü zeytin yaprağı ekstraktının sulu olandan daha yüksek oranda oleuropein içerdiği görülmektedir. Bu durum metanolün viskozitesinin suyunkine kıyasla daha düşük olması özelliğinin bir sonucu olarak metanolün zeytin yaprağı içerisine difüzyonun daha kolay olması ve dolayısıyla yaprak içerisindeki oleuropeinin metanole geçişinin de daha yüksek olması şeklinde açıklanabilir. Metanoldeki oleuropein ise 60. dakikadan itibaren kararlılığını korumuştur (Şekil 4.1). Bu durum zeytin yaprağı ekstraktının metanol içerisinde uzun zaman muhafaza edilebilirliği hakkında da ışık tutmaktadır. Suyun sıcaklığının artması ile beraber ekstrakte edilen oleuropein miktarının önce yüksek çıktığı (25 °C'deki suya göre) görülmüştür (Tablo 4.3). Sıcaklık artışı su ile oleuropein molekülleri arasındaki etkileşimi arttırarak oleuropeinin ilk başta suda daha fazla çözünmesini sağlamıştır. Ancak 75 °C'de oleuropeini degrade eden enzimlerin aktif hale gelip oleuropeini bozması nedeniyle zaman ilerledikçe oleuropein miktarında azalma görülmüştür. Bu durum literatürde şu şekilde açıklanmıştır [143, 144]: Oleuropein yaprak içerisindeki strüktür gözeneklerinde (kompartman) kararlı olarak bulunmaktadır. Sıcaklık ve basınç

gibi herhangi bir stres oluşumunda bu gözenekler kırılmaktadır. Kırılma sonucu oleuropeinden ayrılan organellerinin içinde bulunan enzimler aktif hale geçmektedirler ve oleuropein degrade olmaktadır (bozunmaktadır). Suichi [143], 2004 yılında yapmış olduğu çalışmalarda zeytin yaprağı için kompartmanların bozunma sıcaklığının 65-80 °C olduğunu ve 80 °C'nin üzerinde ise kompartmanların kırık olmasına rağmen oleuropein miktarında azalma görülmediğini, ve bunu da, 80 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda oleuropeini bozan enzimlerin artık aktif olmadığı (öldüğü) şeklinde açıklamıştır. Metanol/su (1/3: v/v) çözücü karışımının kullanıldığı ekstraksiyonda ise sadece metanolün kullanıldığı ekstraksiyona göre daha az oleuropein elde edildiği görülmüştür (Tablo 4.4). Bu durum, suya metanol ilavesiyle su-metanol moleküllerinin kendi aralarındaki etkileşimin artması ve oleuropeini saf metanolden daha az çözebilir hale gelmesi ile açıklanabilir.

4.2. SOKSLET METODU İLE YAPILAN EKSTRAKSİYON DENEMELERİ

Sokslet metodu ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda kullanılan çözücülerin zeytin yapraklarından elde edilen ekstrakt verimine ve içeriğindeki oleuropein miktarına etkileri incelenmiş ve elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde gösterilmiştir.

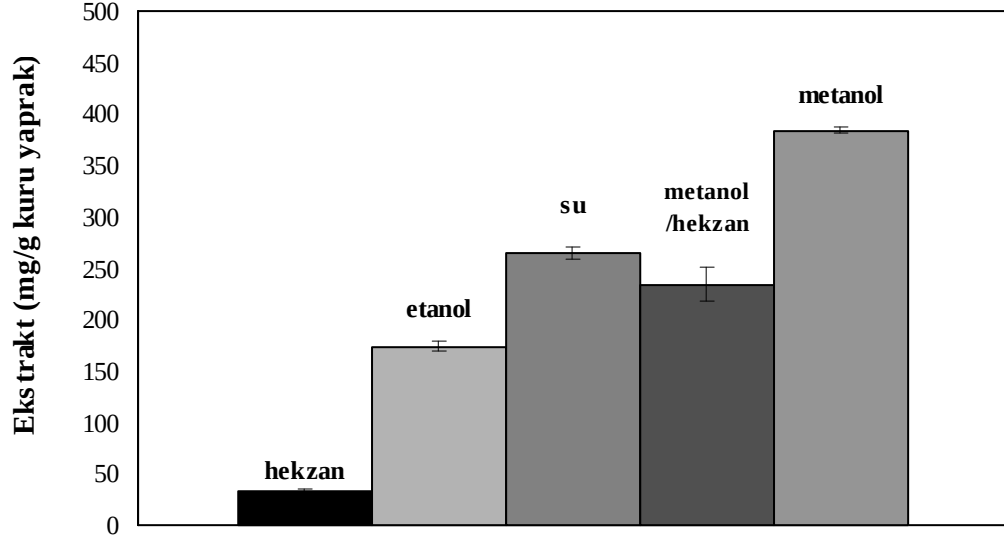
4.2.1. Çözücünün Ekstraksiyon Verimi Üzerine Etkisi

Denemelerde kullanılan çözücülerin ekstraksiyon performanslarını incelemek üzere sokslet metodu ile yapılan ekstraksiyon denemelerinde çözücü olarak hekzan, su, etanol, metanol ve metanol/hekzan (3/2: v/v) karışımı kullanılmıştır. Söz konusu deneylere ait veriler Tablo 4.5'te ve bu verilere tekabül eden grafikler Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmiştir.

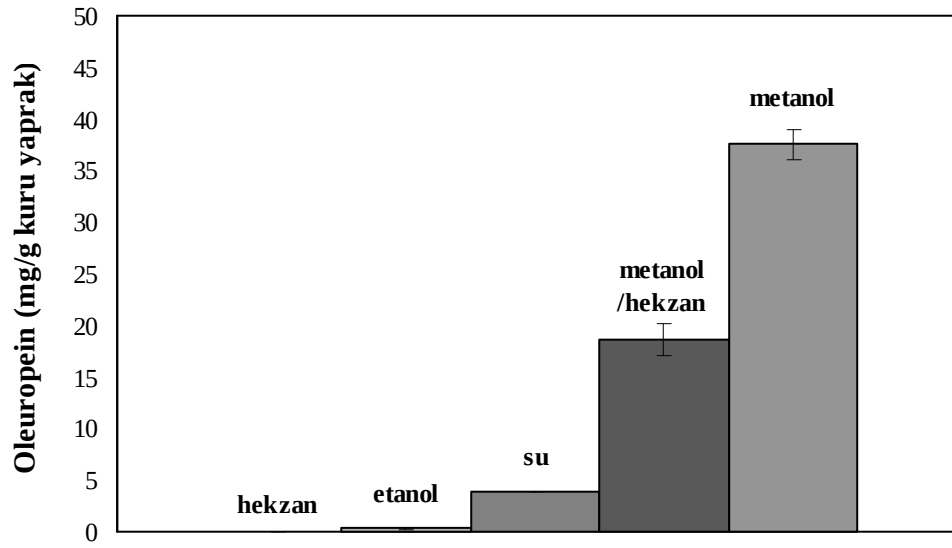
Tablo 4.5: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi *

Çözücü (250 mL)	Ekstrakt miktarı (mg/ g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/ g kuru yaprak)
Hekzan	32.66 ± 2.72	0.01 ± 0.00
Etanol	173.89 ± 4.96	0.29 ± 0.01
Metanol/Hekzan	234.00 ± 16.02	18.58 ± 1.57
Su	264.95 ± 3.35	3.83 ± 0.05
Metanol	383.94 ± 7.76	37.55 ± 1.43

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



Şekil 4.2: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün ekstrakt miktarına etkisi. Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.



Şekil 4.3: Sokslet yöntemi ile gerçekleştirilen zeytin yaprağı ekstraksiyonunda kullanılan çözücü türünün oleuropein miktarına etkisi. Veriler ortalama ($n=3$) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

Metanolün çözücü olarak kullanıldığı denemelerde elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarları diğer çözücülerle elde edilenlerden oldukça yüksektir (Tablo 4.5). Şekil 4.2’de görüldüğü gibi apolar bir çözücü olan hekzanın ekstraksiyon performansı en düşük olup, kullanılan diğer çözücüler (su, etanol ve metanol/hekzan karışımı) yaklaşık olarak birbirlerine yakın performans sergilemişlerdir. Kullanılan çözücülerin polaritesinin artması ile birlikte ekstrakte edilen madde miktarının ve oleuropein içeriğinin genel olarak arttığı söylenebilir. Kullanılan çözücülerden en poları su olmasına rağmen oleuropeini ekstrakte etmede iyi bir performans sergilemediği görülmektedir (Şekil 4.3). Bunun sebebi, sokslet metodunun yüksek sıcaklık değerlerinde uzun süren kaynama periyodunun ekstraktın içeriğindeki oleuropeini bozması olabilir. Metanollü ekstraktlarda böyle bir durumla karşılaşılmamış olması ise, metanolün kaynama noktasının (64.7°C) suyunkinden daha düşük olması ile açıklanabilir.

Metanol ile karışmayan ve asıl istediğimiz komponent olan oleuropeinden ziyade yaprak içerisindeki yağları çözeabilen apolar yapıdaki hekzanın ikinci bir ekstraktan olarak ortama ilave edilerek faz ayrımının gerçekleştirildiği bir çözücü ortamı olan metanol/hekzan karışımı ile de bir ekstraksiyon denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu

şekilde oleuropein dışında kalan ve istenilmeyen maddelerin hekzan fazına geçmesi amaçlanmış ve metanollü ekstrakt ve içeriğindeki oleuropein miktarları incelenmiştir. Karışımın ekstraksiyon gücünün yaklaşık olarak saf hekzan ile saf metanol arasında bir değeri aldığı görülmüştür. Ekstrakte edilen oleuropein açısından incelendiğinde, metanol/hekzan karışımının suya göre daha çok oleuropein ekstrakte ettiği görülmektedir. Bu durum, hem karışımdaki metanolün düşük viskozitesi dolayısıyla hem de organik yapı olan oleuropeine (sudan daha çok) benzemesi nedeniyle, oleuropeini daha çok çözdüğü şeklinde açıklanabilir.

4.3. SÜPERKRİTİK-CO₂ (SC-CO₂) EKSTRAKSİYONU DENEMELERİ

SC-CO₂ ekstraksiyonunda başlangıçta yardımcı çözücü kullanılmaksızın basınç ve sıcaklık değerlerinin zeytin yaprağından elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkilerinin incelendiği denemeler yapılmıştır. Ardından yardımcı çözücü türü, yardımcı çözücü miktarı, sıcaklık ve basınç parametrelerinin etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular tablolar ve grafikler halinde gösterilmiştir.

4.3.1. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda İşletme Parametrelerinin Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstraksiyon öncesi örnek hazırlama problemleri ortadan kaldırıldıktan sonra işletme parametrelerinin geliştirilmesi çok zor olmamaktadır. Tablo 4.6'da kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO₂ ekstraksiyonunda kullanılan parametreler ve değerleri sunulmuştur.

Tablo 4.6: SC-CO₂ ekstraksiyonu denemelerinde kullanılan işletme parametreleri ve seçilen değerler

Parametre	Değer
Yardımcı çözücü	Su, etanol ve metanol
Yardımcı çözücü besleme hızı	0.25 mL/dak, 0.5 mL/dak ve 1 mL/dak
Ekstraksiyon sıcaklığı	50 °C ve 100 °C
Ekstraksiyon basıncı	100 bar, 200 bar ve 300 bar

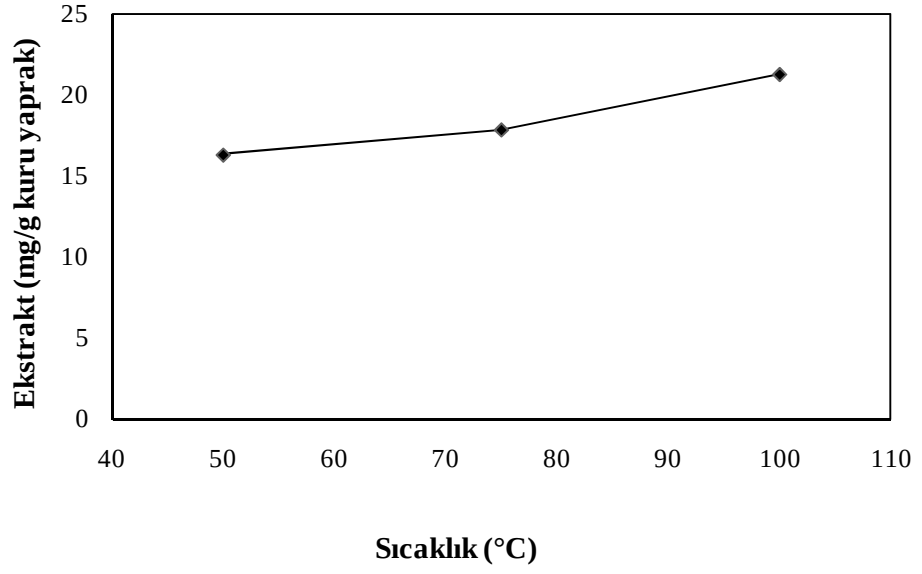
4.3.1.1. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Sıcaklığın Verim Üzerine Etkisinin İncelendiği Denemeler

SC-CO₂ ekstraksiyonu yöntemi ile yapılan denemelerde ilk olarak sıcaklığın ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için 300 bar basınç, 2 L/dak CO₂ akış hızında 120 dakika süre ile yardımcı çözücü kullanılmaksızın 50, 75 ve 100 °C sıcaklıklarda denemeler yapılmıştır. Bu sıcaklık değerlerinin seçimi, CO₂'in kritik sıcaklığının 31.1 °C olması ve yüksek sıcaklıkların oleuropeinin kimyasal yapısını bozabileceği göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Denemelerin sonuçları Tablo 4.7'de verilmiş olup, grafiksel gösterimleri ise Şekil 4.4 ve 4.5'te yapılmıştır.

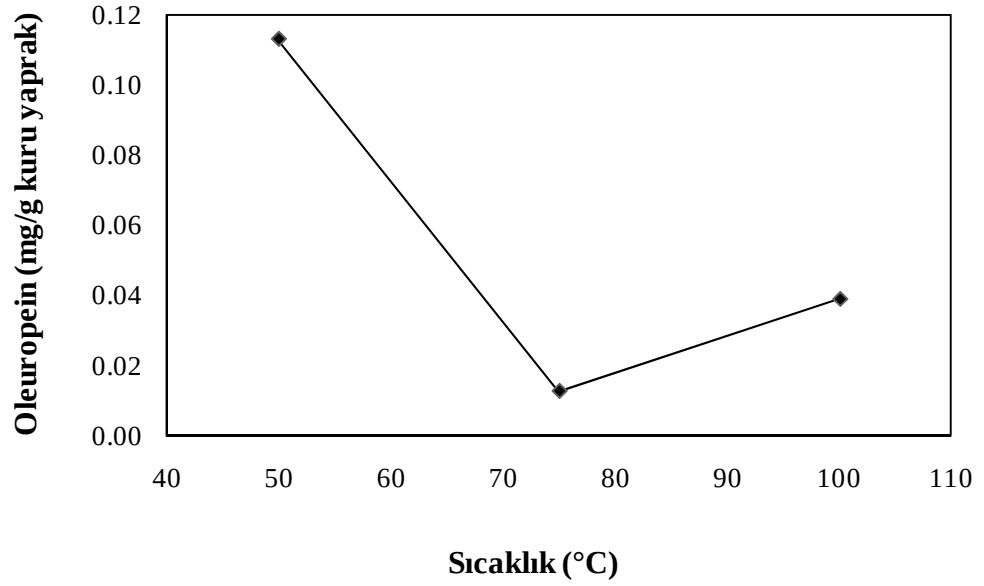
Tablo 4.7: SC-CO₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (300 bar, 2 L/dak CO₂, 120 dak) *

Sıcaklık (°C)	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
50	16.29 ± 1.71	0.11 ± 0.00
75	17.85 ± 1.86	0.01 ± 0.01
100	21.28 ± 1.81	0.04 ± 0.00

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



Şekil 4.4: SC-CO₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (300 bar, 2 L/dak CO₂, 120 dak).



Şekil 4.5: SC-CO₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (300 bar, 2 L/dak CO₂, 120 dak).

Şekil 4.4'ten görüldüğü gibi sıcaklığın artması ile beraber ekstrakt miktarının da arttığı görülmektedir. Süperkritik akışkanların teorik temellerine göre sıcaklığın artması ile beraber akışkanın yoğunluğunun azaldığı ve dolayısıyla buna bağlı olarak da akışkanın çözme gücünün azaldığı bilinmektedir [6, 28, 59, 114, 117-120, 125-127]. Diğer taraftan, çözünen maddelerin sıcaklıkla beraber buhar basınçlarının artması ve

çözünürlüklerinin artması gerçeği de gözardı edilemez [3, 59, 126, 128]. Yaptığımız çalışmalar sonucunda SC-CO₂ ekstraksiyonu ile zeytin yaprağından ekstrakt elde edilmesi işleminde ikinci etkinin daha baskın olduğu söylenilebilir.

Ekstrakt içerisindeki oleuropein miktarı incelendiğinde (Şekil 4.5), sıcaklığın 50 °C'den 75 °C'ye çıkarılmasıyla birlikte ekstrakte edilen oleuropein miktarının azaldığı daha sonra da az miktarda artma gösterdiği görülmektedir. Bu durum, sıcaklığın artması ile beraber antioksidan bir madde olan oleuropeinin bozunması [59, 142, 143], 75 °C'den sonra ise oleuropeinin degradasyonuna yol açan enzimlerin inaktive olması [142, 143] nedeniyle ekstrakt içindeki oleuropein miktarında bir miktar artış olması ile açıklanabilir.

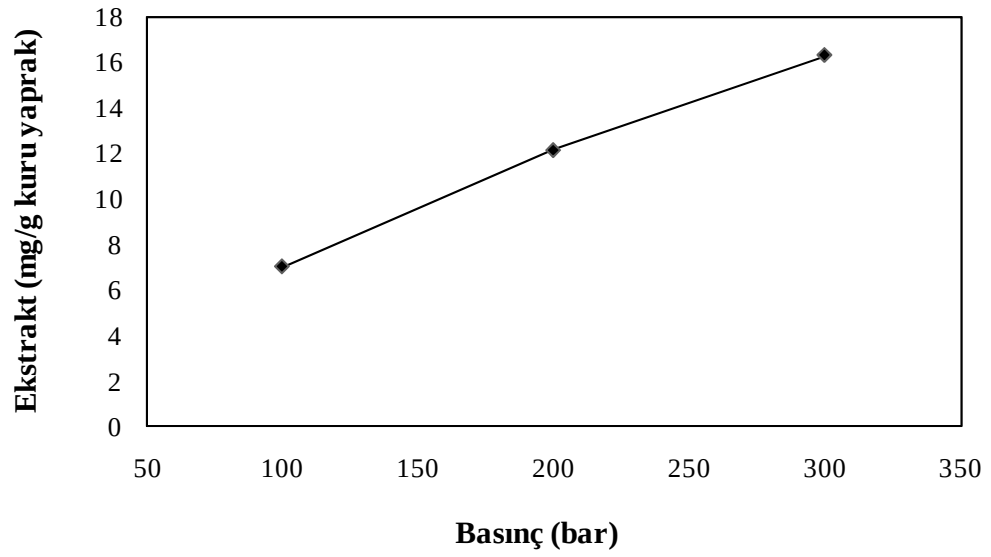
4.3.1.2. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Basıncın Verim Üzerine Etkisinin İncelendiği Denemeler

SC-CO₂ ekstraksiyonu ile yapılan denemelerde basıncın ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için 50 °C sıcaklık, 2 L/dak CO₂ akış hızında 120 dakika süre ile yardımcı çözücü kullanılmaksızın denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 4.8'de verilmiş olup, grafiksel gösterimleri ise Şekil 4.6 ve 4.7'de yapılmıştır.

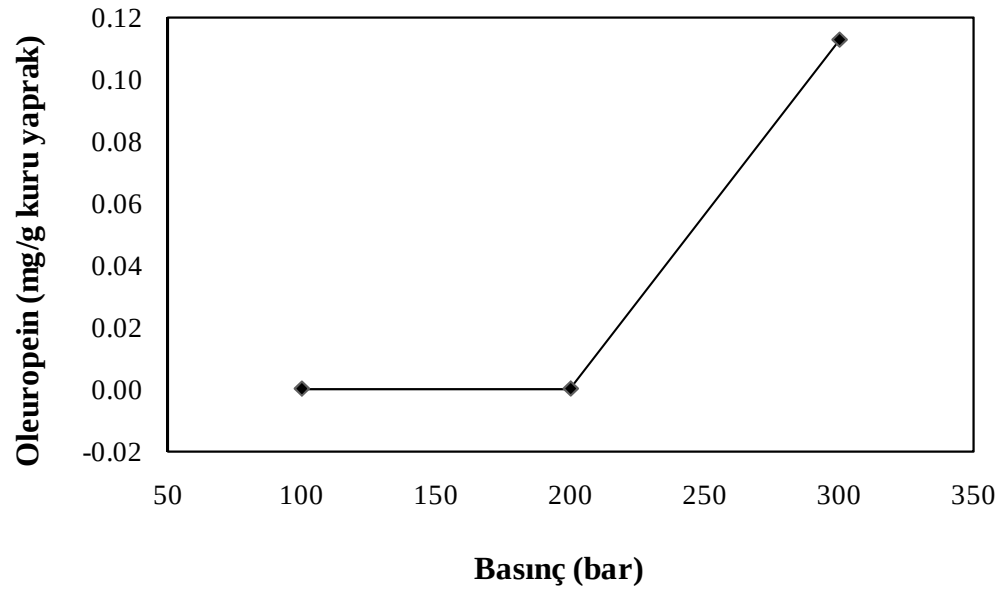
Tablo 4.8: SC-CO₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (50 °C, 2 L/dak CO₂, 120 dak) *

Basıncı (bar)	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
100	7.05 ± 0.30	2.8x10 ⁻⁵ ± 0.00
200	12.13 ± 1.94	4.9x10 ⁻⁵ ± 0.00
300	16.29 ± 1.71	0.11 ± 0.00

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



Şekil 4.6: SC-CO₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (50 °C, 2 L/dak CO₂, 120 dak).



Şekil 4.7: SC-CO₂ ekstraksiyonunda basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (50 °C, 2 L/dak CO₂, 120 dak).

Süperkritik akışkanın çözme gücü, yoğunluğunun bir fonksiyonu olduğundan ve yoğunluğun da basıncın artması ile beraber artması temelinden yola çıkarak [6, 28, 59, 113, 118-121, 126-128] sistemin basıncının artması ile ekstraksiyon veriminin de arttığı

görülmüştür (Şekil 4.6). Elde edilen ekstrakt içindeki oleuropein miktarı 100 ve 200 bar basınçlarda yok denecek kadar az iken, 300 bar basınçta anlamlı bir değer almıştır (Şekil 4.7). Bu durum, CO₂'in apolar bir çözücü olması nedeniyle düşük basınçlarda oleuropeini tek başına çözemediğini, ancak 300 bar gibi yüksek basınç şartlarında (basıncın artmasıyla polaritenin artması sebebiyle) çözebildiği şeklinde açıklanabilir.

SC-CO₂ ekstraksiyonu ile yardımcı çözücü kullanılmaksızın yapılan bu denemelerde elde edilen ekstrakt miktarlarının oldukça düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. SC-CO₂ ekstraksiyonunda sıcaklığın etkisinin incelendiği denemelerde ekstrakt verimlerinin % 1.63–2.13 aralığında (Tablo 4.7), basıncın etkisinin incelendiği denemelerde ise ekstrakt veriminin % 0.70–1.63 aralığında olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.8). Gözlemlenen bu bulgular ve yapılmış olan mevcut çalışmalar, bu şartlarda elde edilen ekstrakt verimi ve oleuropein miktarının artırılması için yardımcı çözücünün gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Ekstrakt verimini arttırmak amacıyla SC-CO₂ ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak su, etanol ve metanolün kullanıldığı denemeler yapılmış ve yardımcı çözücünün ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için de farklı basınç, sıcaklık ve yardımcı çözücü miktarlarında çalışmalar yapılmıştır.

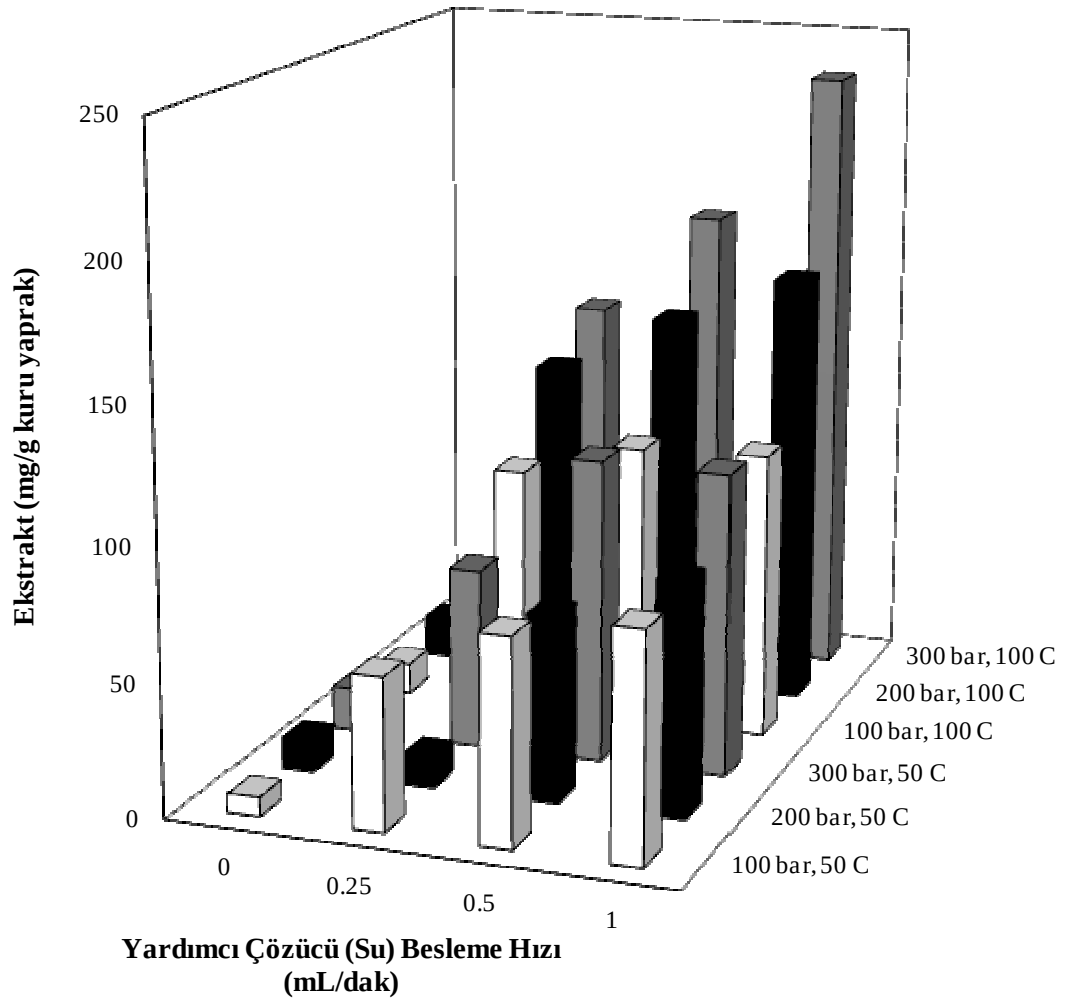
4.3.2. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak Suyun Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

Ekstrakt verimini arttırmak amacıyla SC-CO₂ ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak su kullanılmış ve suyun ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için de farklı basınç, sıcaklık ve su besleme hızlarında çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla yapılan SC-CO₂ ekstraksiyonu denemelerinde 100, 200 ve 300 bar basınçlarda, 50 ve 100 °C sıcaklıklarda, 2 L/dak CO₂ akış hızında 120 dakika süre ile çalışılmış ve yapılan denemelerin sonuçları ile sonuçların Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları Tablo 4.9'da verilmiştir. Sonuçların grafiksel gösterimleri ise Şekil 4.8 ve 4.9'da yapılmıştır.

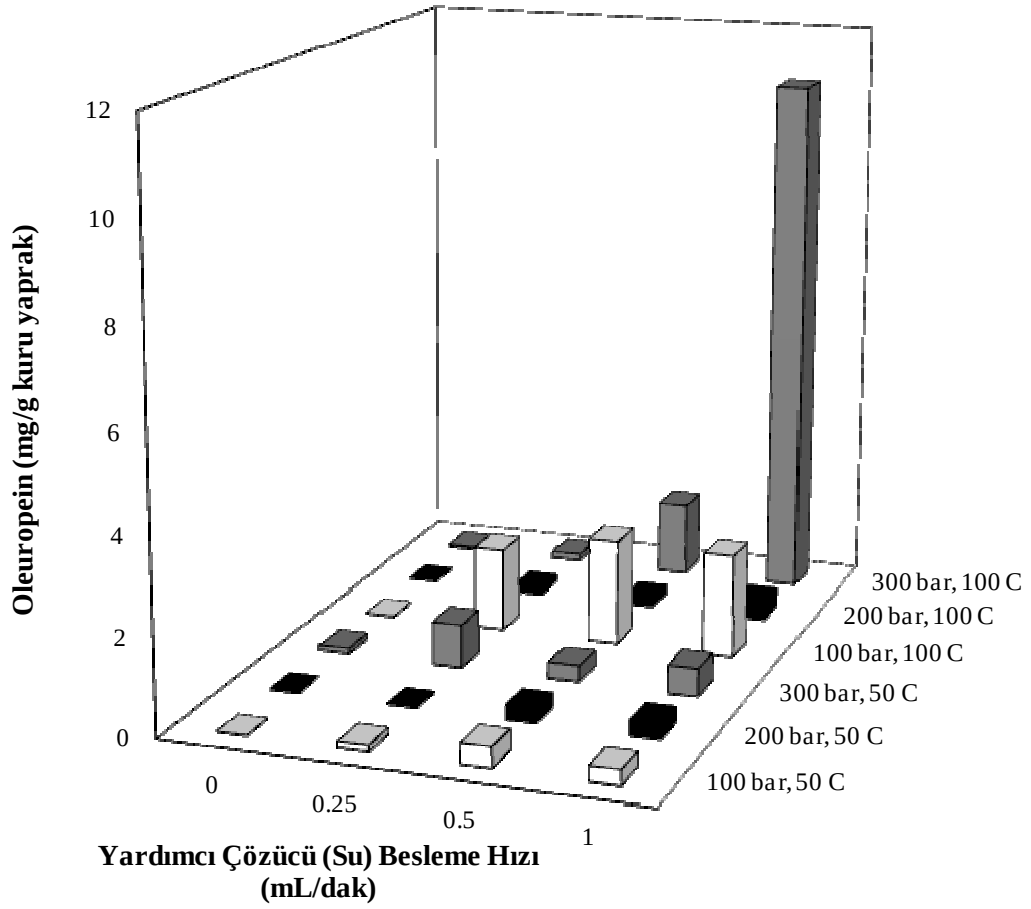
Tablo 4.9: SC-(CO₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (2 L/dak CO₂, 120 dak) *

Basıncı (bar)	Sıcaklık (°C)	Yardımcı çözücü besleme hızı (mL/dak)	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
100	50	0	7.05 ± 0.30 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	57.19 ± 2.81 b	0.13 ± 0.01 b
		0.5	77.37 ± 2.72 c	0.42 ± 0.00 c
		1	85.16 ± 1.93 cd	0.31 ± 0.01 de
	100	0	11.46 ± 1.24 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	94.00 ± 3.61 d	1.72 ± 0.02 f
		0.5	103.67 ± 3.51 e	2.12 ± 0.01 g
		1	108.33 ± 2.68 e	2.16 ± 0.03 g
200	50	0	12.13 ± 1.94 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	11.67 ± 1.34 a	0.00 ± 0.00 a
		0.5	69.75 ± 3.76 c	0.29 ± 0.02 d
		1	87.58 ± 2.42 d	0.31 ± 0.01 de
	100	0	15.04 ± 2.05 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	122.15 ± 2.75 e	0.14 ± 0.02 b
		0.5	144.92 ± 4.77 f	0.16 ± 0.02 b
		1	164.04 ± 3.05 g	0.38 ± 0.01 ec
300	50	0	16.29 ± 1.71 ah	0.11 ± 0.00 b
		0.25	67.90 ± 2.91 c	0.90 ± 0.01 h
		0.5	114.25 ± 2.21 e	0.34 ± 0.02 e
		1	113.90 ± 1.10 e	0.58 ± 0.00 i
	100	0	21.28 ± 1.81 h	0.04 ± 0.00 a
		0.25	135.83 ± 4.84 i	0.13 ± 0.02 b
		0.5	175.93 ± 2.06 j	1.52 ± 0.01 j
		1	233.68 ± 2.39 k	10.91 ± 0.10 k

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.8: SC-(CO₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi.



Şekil 4.9: SC-(CO₂ + Su) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan suyun besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.

Şekil 4.8’de SC-(CO₂ + su) ile yapılan ekstraksiyon denemelerinde su oranının artması ile beraber ekstrakt miktarının arttığı görülmektedir. Su ile modifiye edilmiş karbondioksitin polaritesi artmakta ve dolayısıyla da bünyesinde polar gruplu fenolik yapıdaki maddeleri ihtiva eden zeytin yaprağını çözme gücü artmaktadır. Oleuropein miktarı ise, yardımcı çözücü olarak kullanılan suyun miktarının artmasıyla, özellikle yüksek sıcaklıklarda artmıştır (Şekil 4.9). Yoğun süperkritik şartlar altında (yüksek basınç ve yüksek sıcaklık), artan su miktarı ile birlikte oleuropein miktarındaki artış çok fazla olmuştur. Diğer taraftan denemeler esnasında yüksek su seviyelerinde bazı olumsuzluklarla da karşılaşmıştır. Şöyle ki, yüksek su içeriği gözeneklerde tıkanmaya neden olmuş veya ani genleşmeler nedeniyle dengesiz durumlar yaşanmıştır. Düşük su miktarında ise bazı durumlarda katı numuneyi ıslatma zamanı çok uzun süreler almış, dolayısıyla da ekstraktı çekme yani işlem süresi çok uzamıştır.

Düşük sıcaklıkta (50 °C) basıncın 100 bar'dan 200 bar'a yükseltilmesiyle elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarının istatistiksel açısından önemli bir değişim göstermediği görülmüştür. Hatta 1 mL/dak su besleme hızında sırası ile elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarları istatistiksel olarak aynı bulunmuştur (Tablo 4.9). Yine aynı sıcaklıkta basıncın 300 bar'a çıkarılması, elde edilen her iki verimi de hafif bir şekilde arttırmıştır (Şekil 4.8 ve 4.9). Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Basıncın artması ile birlikte akışkanın yoğunluğunun arttığı ve buna bağlı olarak da akışkanın çözme gücünün arttığı bilinmektedir [6, 28, 59, 113, 118-121, 126-128].

Yüksek sıcaklıkta ise (100 °C), basıncın artması ile birlikte akışkanın yoğunluğunun düşük sıcaklığa göre çok daha belirgin olarak arttığı ve buna bağlı olarak da akışkanın çözme gücünün arttığı elde edilen ekstrakt miktarından açıkça görülmektedir (Şekil 4.8). Ayrıca, sıcaklığın artmasıyla beraber süperkritik akışkanın yoğunluğunun azalmasına rağmen solutenin buhar basıncındaki artış çözünürlüğü ve dolayısıyla ekstraksiyon verimini arttırmıştır [124]. Duruma oleuropein verimi açısından bakılacak olursa, 100 bar'dan 200 bar'a önce bir miktar düşme, ardından 300 bar'da tekrar bir yükselme gözlenmiştir (Şekil 4.9). Burada şöyle bir husus da dikkat çekmektedir: 300 bar'da artan su miktarı ile birlikte verim artmaya başlamış olsa bile 300 bar'da elde edilen oleuropein miktarları 100 bar'dakilerine ulaşamamıştır. Ancak yardımcı çözücü miktarının daha da artırılması verimi dikkat çekici seviyede arttırmıştır (1 mL/dak su besleme hızı).

100 bar basınç değerinde sıcaklığın yükseltilmesi ekstrakt miktarlarını arttırmıştır. Yine aynı basınçta, 0.5 ve 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü kullanılması halinde her iki sıcaklıkta da elde edilen ekstrakt miktarlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı da görülmüştür (Tablo 4.9). Diğer şartlarda ise basınç arttıkça elde edilen ekstrakt miktarlarının neredeyse 2 katı kadar arttığı gözlenmiştir. 300 bar, 50 °C şartlarında 0.5 ve 1 mL/dak besleme hızında su ile modifiye edilmiş SC-CO₂ ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstrakt miktarları arasında istatistiksel olarak fark görülmemiştir. En yüksek ekstrakt verimi 300 bar, 100 °C ve 1 mL/dak besleme hızında suyun kullanıldığı şartlarda elde edilmiştir (233.68 mg/g kuru yaprak).

100 bar’da elde edilen oleuropein miktarı sıcaklığın artması ile artmıştır. Basınç 200 bar değerine çıkarıldığında bir değişim gözlenmemiştir. Hatta 1 mL/dak besleme hızında su kullanılması halinde her iki sıcaklık değerinde (200 bar) de istatistiksel anlamda aynı sonuçlar elde edilmiştir. Basıncın biraz daha arttırılması verimi keskin şartlarda yükseltmiştir (300 bar, 100 °C ve 1 mL/dak su miktarı). Gram kuru yaprak başına 0.31 mg’e karşı 10.91 mg oleuropein elde edilmiştir (yaklaşık 35 kat).

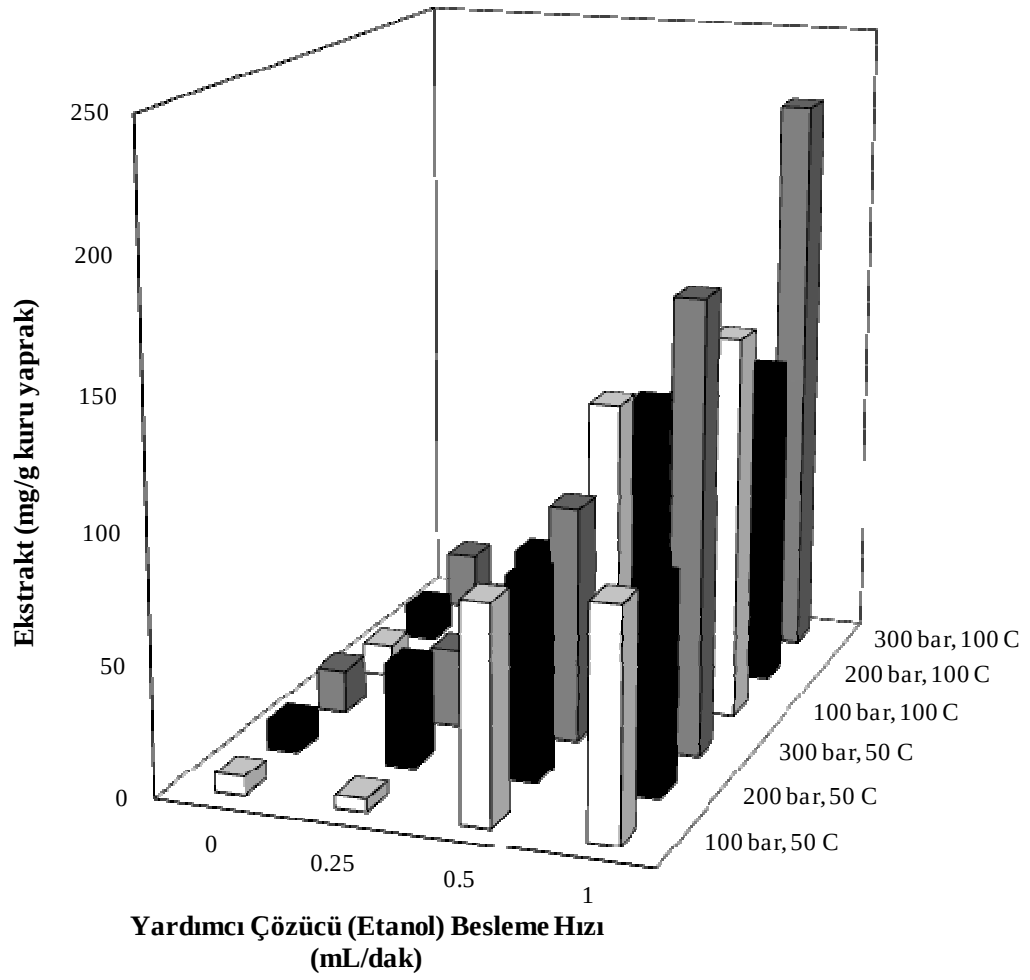
4.3.3. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak Etanol Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

SC-CO₂ ile ekstraksiyonda, kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktın ve içeriğindeki oleuropeinin miktarını yükseltmek maksadı ile yardımcı çözücü olarak etanolün kullanıldığı denemeler yapılmıştır. Yardımcı çözücünün ayrı ayrı ekstrakt ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için de farklı basınç, sıcaklık ve etanol miktarlarında çalışılmıştır. SC-(CO₂ + etanol) sisteminde etanol oranının sıcaklık ve basınca bağlı olarak ekstrakt ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için 100, 200 ve 300 bar basınçlarda, 50 ve 100 °C sıcaklıklarda, 2 L/dak CO₂ akış hızında 120 dakika süre ile yapılan çalışmaların deneysel verisi ve bunların Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları Tablo 4.10’da verilmiş olup, grafiksel gösterimleri ise Şekil 4.10 ve 4.11’de yapılmıştır.

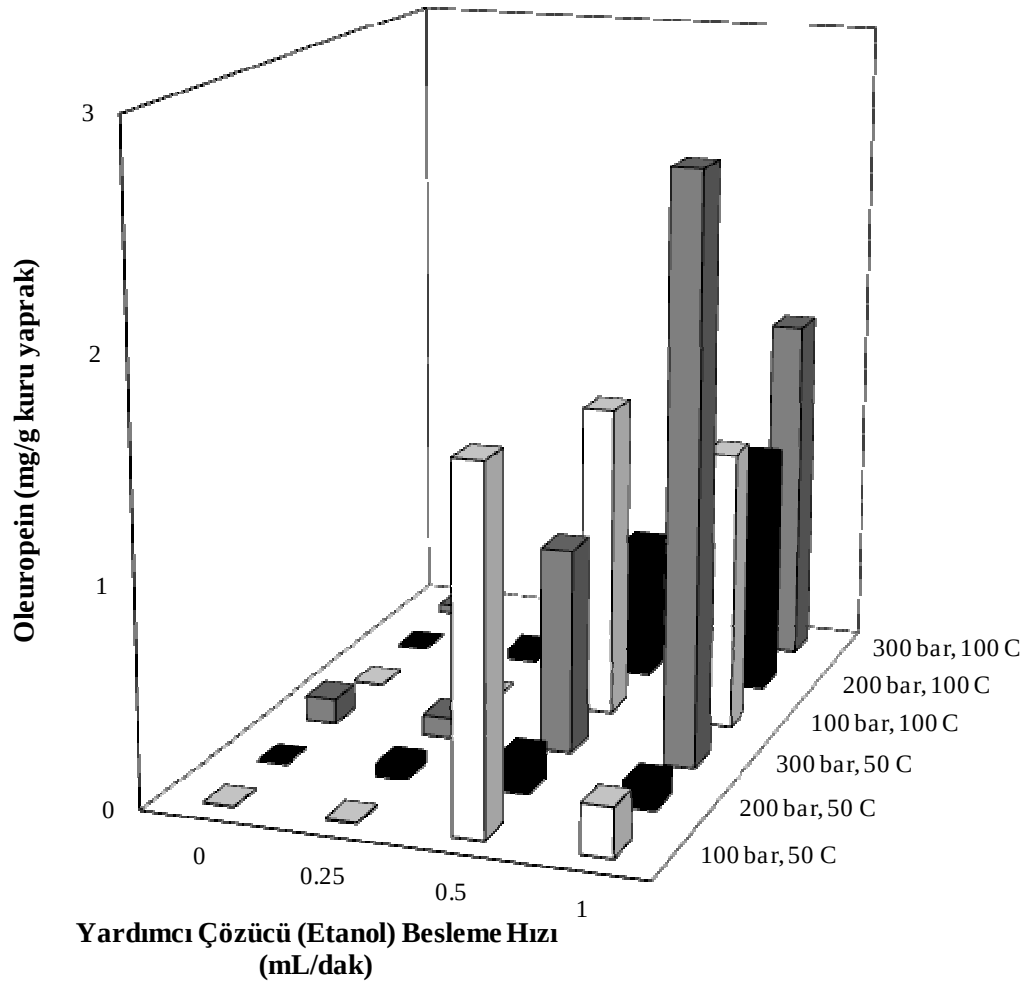
Tablo 4.10: SC-(CO₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (2 L/dak CO₂, 120 dak) *

Basıncı (bar)	Sıcaklık (°C)	Yardımcı çözücü besleme hızı (mL/dak)	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
100	50	0	7.05 ± 0.30 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	4.65 ± 0.36 a	0.00 ± 0.00 a
		0.5	83.12 ± 2.99 bc	1.63 ± 0.17 b
		1	86.19 ± 1.81 bc	0.20 ± 0.01 c
	100	0	11.46 ± 1.24 ad	0.00 ± 0.00 a
		0.25	5.24 ± 0.12 a	0.00 ± 0.00 a
		0.5	117.19 ± 3.11 e	1.35 ± 0.10 d
		1	147.96 ± 2.76 f	1.22 ± 0.02 e
200	50	0	12.13 ± 1.94 ad	0.00 ± 0.00 a
		0.25	36.50 ± 1.50 g	0.04 ± 0.00 ac
		0.5	76.39 ± 1.63 b	0.12 ± 0.01 c
		1	81.60 ± 1.40 b	0.13 ± 0.01 c
	100	0	15.04 ± 2.05 ad	0.00 ± 0.00 a
		0.25	38.33 ± 3.31 g	0.03 ± 0.01 ac
		0.5	104.63 ± 3.47 h	0.56 ± 0.15 f
		1	121.10 ± 5.91 e	1.09 ± 0.05 g
300	50	0	16.29 ± 1.71 d	0.11 ± 0.00 c
		0.25	33.57 ± 2.32 g	0.10 ± 0.01 c
		0.5	90.79 ± 3.22 ch	0.79 ± 0.02 h
		1	179.34 ± 2.43 f	2.90 ± 0.10 i
	100	0	21.28 ± 1.81 d	0.04 ± 0.00 ac
		0.25	42.82 ± 4.20 g	0.05 ± 0.01 ac
		0.5	98.25 ± 3.25 h	0.44 ± 0.03 j
		1	220.24 ± 3.76 i	1.61 ± 0.04 b

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.10: SC-(CO₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi.



Şekil 4.11: SC-(CO₂ + Etanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan etanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.

Şekil 4.10’da SC-(CO₂ + etanol) ile yapılan ekstraksiyon denemelerinde etanol oranının artması ile beraber ekstrakt miktarının genel olarak arttığı görülmektedir. Etanol karbondioksitin polaritesini arttırmakta ve böylece karbondioksitin fenolik yapıdaki maddeleri içeren ekstraktı çözme gücü artmaktadır [4, 27, 59, 111, 158]. Dolayısıyla fenolik bir bileşen olan oleuropein [3, 126] miktarında da artma söz konusu olmaktadır (Şekil 4.11).

Sabit sıcaklıkta basıncın artması ile beraber ekstrakt ve içindeki oleuropein miktarının önce azaldığı sonra arttığı görülmektedir (Şekil 4.10 ve 4.11). Bu durum, çözücü karışımının sıcaklık ve basıncı ile kontrol edilen CO₂’in yoğunluğu ile solutenin buhar

basıncı arasındaki kompleks denge ile açıklanabilir. Ayrıca basıncın artması önce yaprakların porlarını sıkıştırmış ve çözücünün yaprağın içine yayılımını zorlaştırmış olabilir [127]. Ancak daha yüksek basınçlarda ise yaprakların strüktürü tamamen bozulmuş ve ekstraksiyon verimi artmıştır.

Sabit basınçta sıcaklığın artmasıyla beraber süperkritik akışkanın yoğunluğunun azalmasına rağmen solutenin buhar basıncındaki artış çözünürlüğü arttırmış [4, 17, 59, 124, 127, 129, 161], ve dolayısıyla ekstrakt verimi artmıştır (Şekil 4.10). 100 bar ve 50 °C’de 0.5 ve 1 mL/dak besleme hızında etanol kullanılması halinde elde edilen ekstrakt miktarlarının istatistiksel anlamda birbirinin aynı olduğu görülmüştür (83.12 ve 86.19 mg/g kuru yaprak). Ayrıca 100 bar, 50 °C ile 100 bar, 100 °C şartlarında ayrı ayrı saf karbondioksit ve 0.25 mL/dak besleme hızında etanol kullanılması halinde elde edilen ekstrakt miktarları arasında da bir fark olmadığı gözlenmiştir (11.46, 5.24, 7.05 ve 4.65 mg/g kuru yaprak). 100 °C sıcaklık ve 300 bar basınçta, 1 mL/dak besleme hızında etanol ile modifiye edilmiş SC-CO₂ ile en yüksek ekstrakt verimine ulaşılmıştır (220.24 mg/g kuru yaprak). Buna karşılık en iyi oleuropein verimi ise gram kuru yaprak başına 2.90 mg oleuropein miktarı ile 50 °C sıcaklık ve 300 bar basınçta 1 mL/dak besleme hızında etanol varlığında elde edilmiştir. Bu durum, 300 bar basınç değerinde sıcaklığın artması ile beraber antioksidan bir madde olan oleuropeinin bozunması [59, 142, 143] ile açıklanabilir.

4.3.4. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Yardımcı Çözücü Olarak Metanol Kullanılması Durumunda Sıcaklık ve Basıncın Ekstraksiyon Verimine Etkisi

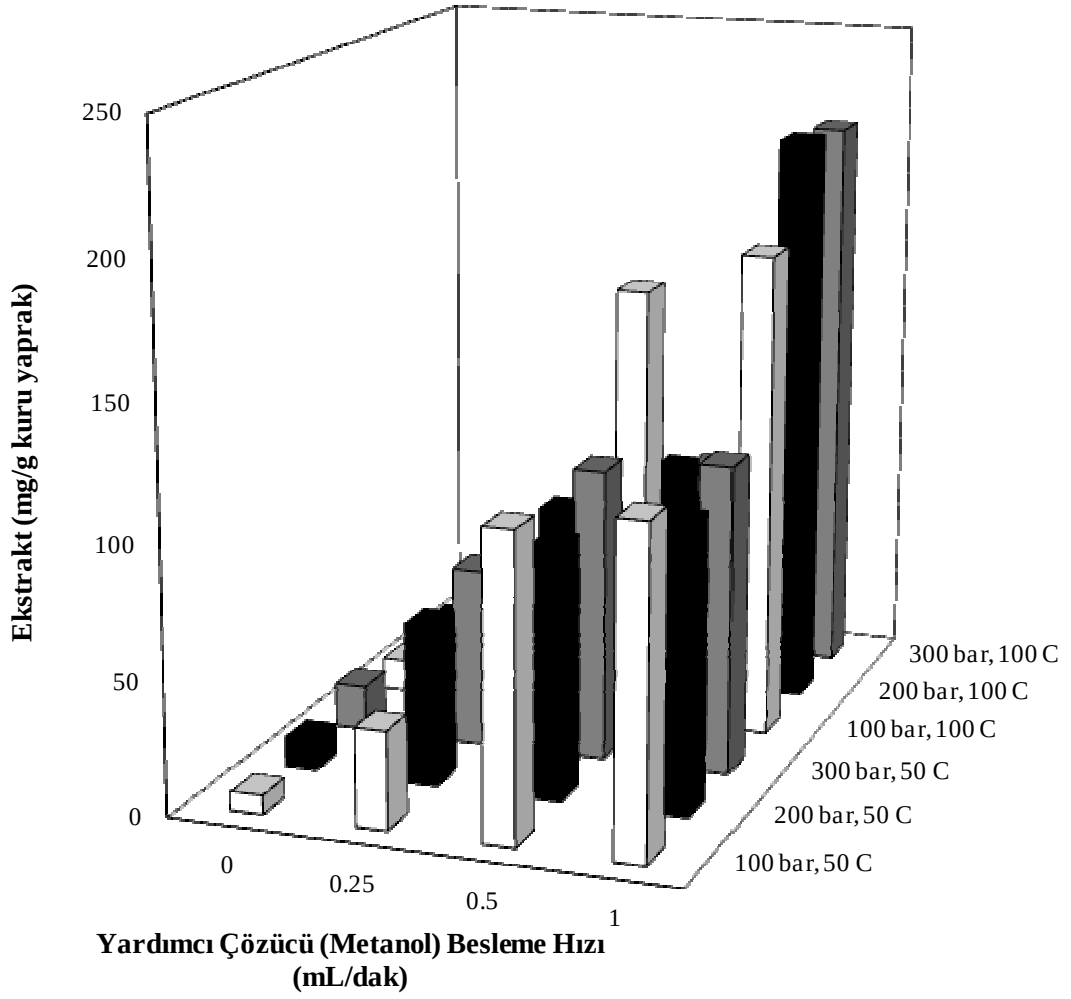
SC-CO₂ ile ekstraksiyonda, kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktın ve içeriğindeki oleuropeinin miktarını yükseltmek maksadı ile yardımcı çözücü olarak metanolün kullanıldığı denemeler yapılmıştır. Yardımcı çözücünün ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için de farklı basınç, sıcaklık ve metanol miktarlarında çalışılmıştır. SC-(CO₂ + metanol) sisteminde metanol oranının sıcaklık ve basınca bağlı olarak ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek için 100, 200 ve 300 bar basınçlarda, 50 °C ve 100 °C sıcaklıklarda, 2 L/dak CO₂ akış hızında 120 dakika süre ile yapılan çalışmaların

sonuçları ve bu sonuçların Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları Tablo 4.11’de verilmiş olup, grafiksel gösterimleri ise Şekil 4.12 ve 4.13’te yapılmıştır.

Tablo 4.11: SC-(CO₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklık ve basıncın elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarlarına etkisi (2 L/dak CO₂, 120 dak) *

Basınç (bar)	Sıcaklık (°C)	Yardımcı çözücü besleme hızı (mL/dak)	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
100	50	0	7.05 ± 0.30 a	0.00 ± 0.00 a
		0.25	31.39 ± 3.38 b	1.03 ± 0.01 b
		0.5	112.59 ± 2.50 cd	3.49 ± 0.03 c
		1	122.04 ± 3.13 c	3.67 ± 0.15 c
	100	0	11.46 ± 1.24 ae	0.00 ± 0.00 a
		0.25	20.56 ± 4.45 e	0.61 ± 0.06 de
		0.5	170.01 ± 4.04 f	8.78 ± 0.18 f
		1	181.00 ± 4.01 g	7.33 ± 0.28 g
200	50	0	12.13 ± 1.94 ae	0.00 ± 0.00 a
		0.25	61.58 ± 3.08 hi	1.41 ± 0.03 h
		0.5	95.02 ± 1.98 j	2.25 ± 0.04 i
		1	107.45 ± 2.56 d	3.26 ± 0.03 j
	100	0	15.04 ± 2.05 ae	0.00 ± 0.00 a
		0.25	63.59 ± 3.60 hi	0.58 ± 0.07 d
		0.5	81.55 ± 1.53 k	0.80 ± 0.02 e
		1	218.32 ± 3.46 l	10.88 ± 0.28 k
300	50	0	16.29 ± 1.71 ae	0.11 ± 0.00 a
		0.25	67.12 ± 3.95 hk	2.24 ± 0.07 i
		0.5	110.25 ± 4.24 d	5.84 ± 0.16 l
		1	115.10 ± 4.91 cd	4.18 ± 0.20 m
	100	0	21.28 ± 1.81 e	0.04 ± 0.00 a
		0.25	53.51 ± 4.30 i	0.38 ± 0.02 n
		0.5	75.69 ± 2.32 k	0.40 ± 0.02 dn
		1	212.92 ± 3.98 l	14.24 ± 0.10 o

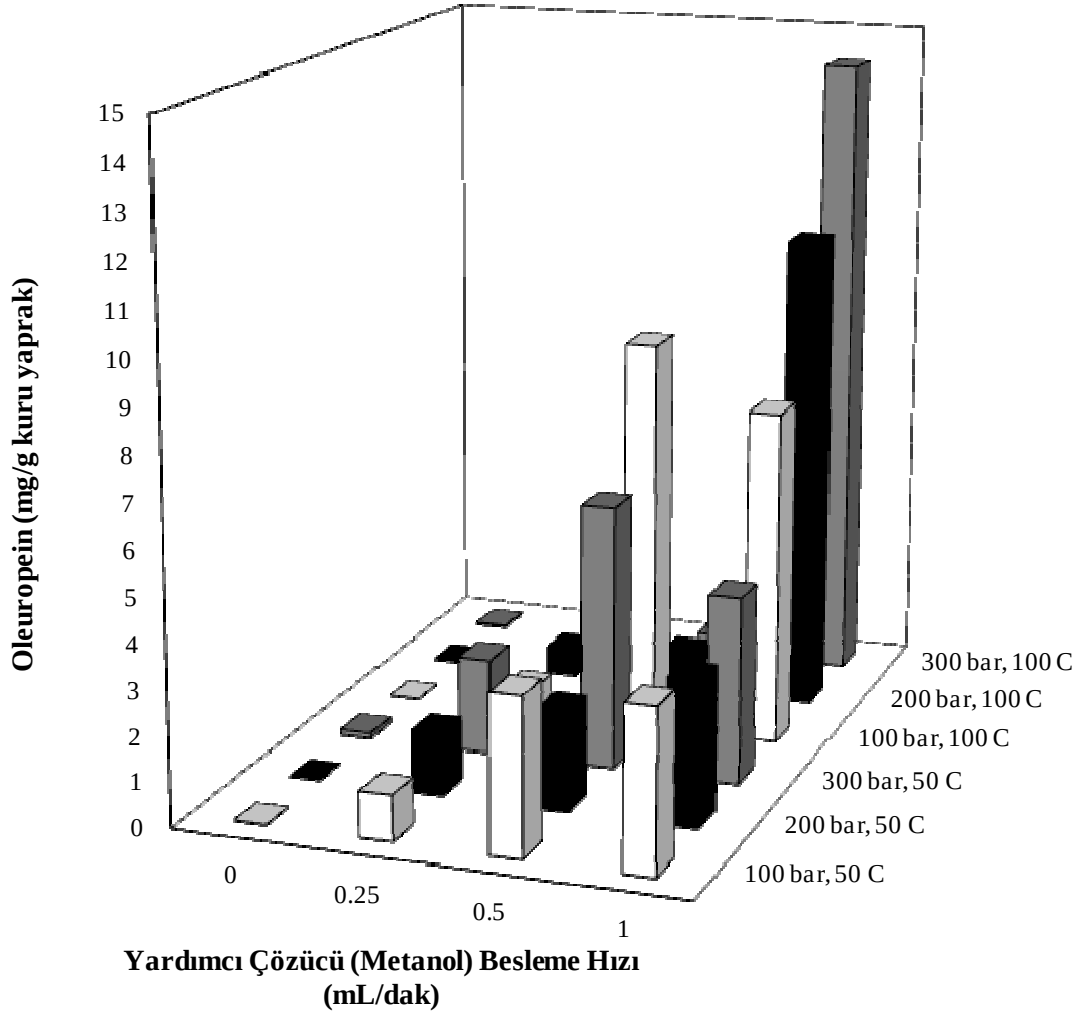
* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.12: SC-(CO₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi.

Tablo 4.11’de sunulan deneysel sonuçlara bakıldığında, SC-(CO₂ + metanol) sistemi ile yapılan ekstraksiyon işleminde yardımcı çözücü yüzdesi arttıkça elde edilen ekstrakt ve oleuropein miktarının arttığı görülmektedir. Beklenildiği gibi, sıcaklığın 50’den 100 °C’ye çıkarılması, ekstrakte edilen madde miktarını arttırmıştır (Şekil 4.12). Her ne kadar sıcaklıktaki artışın akışkan yoğunluğunu düşürüp çözme gücünü azalttığı söz konusu olsa da, sıcaklık artışı çözücü moleküllerinin kendi içindeki etkileşimini azaltarak çözücü ile çözünen madde molekülleri arasındaki etkileşimi arttırmaktadır. Bununla beraber, sıcaklık artışı akışkanın difüzivitesini yükseltip, viskozitesini düşürdüğünden solutenin matrisden çözücü ortamına geçişini kolaylaştırmaktadır.

Sıcaklık artışının bir diğer önemli etkisi ise daha önceden de bahsedildiği gibi solutenin buhar basıncını yükselterek verimi arttırmasıdır [4, 17, 59, 124, 127, 129, 161].



Şekil 4.13: SC-(CO₂ + Metanol) sistemi ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, kullanılan metanolün besleme hızına bağlı olarak sıcaklığın ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi.

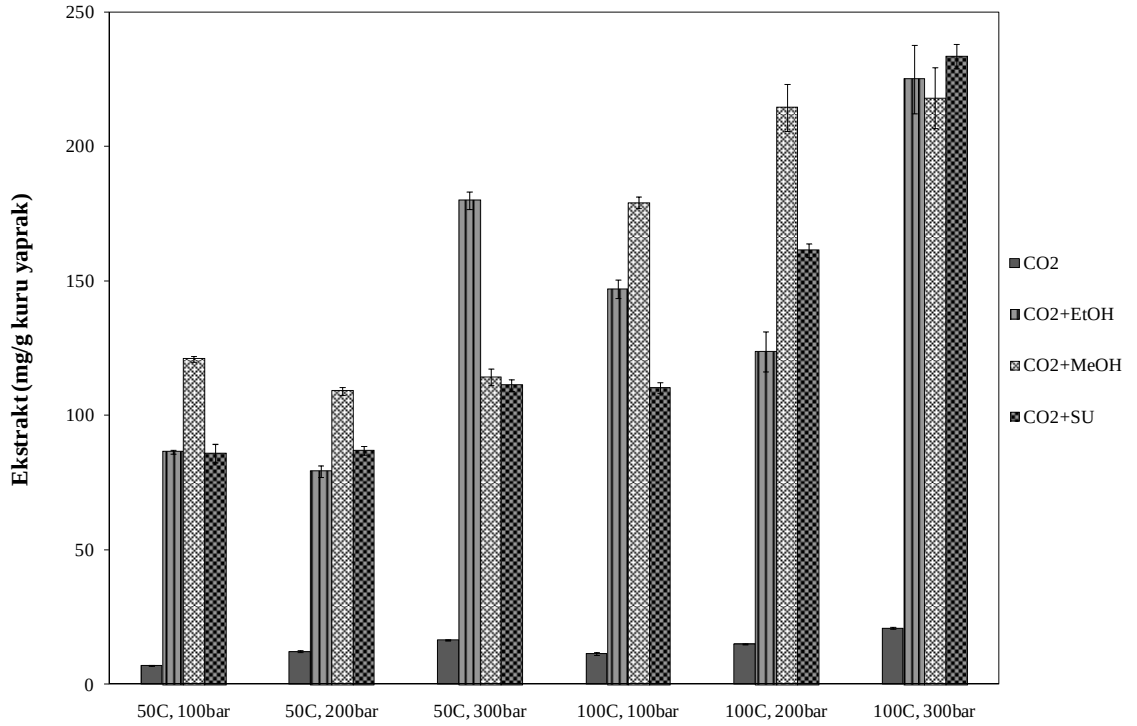
Sıcaklığın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisine bakılacak olursa (Şekil 4.13), 1 mL/dak besleme hızında metanol kullanıldığında, üç basınç değerinde de sıcaklığın artması ile beraber oleuropein veriminde keskin bir artış gözlenmiştir.

Aynı çözücü sisteminde basıncın etkisine bakıldığında, bazı tutarsızlıklar gözlemlendiği söylenebilir (Tablo 4.11). Bu tutarsızlıklar değerlendirilirken solutenin matris içinden ekstrakte edilebilirliğinin solute-yardımcı çözücü etkileşiminin yanı sıra yardımcı çözücü matris etkileşimine de bağlı olduğunu unutmamak gerekir [123]. Fakat kesin olan birşey var ki, o da yoğun ekstraksiyon şartlarında (100 °C ve 1 mL/dak besleme hızında metanol katkısı ile) ekstrakt ve oleuropein verimlerinin artmış olmasıdır (Şekil 4.12 ve 4.13).

Bu sistemde elde edilen en yüksek ekstrakt miktarları 100 °C ve 1 mL/dak besleme hızında metanol ile 200 ve 300 bar basınç seviyelerinde elde edilmiştir (aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmayan 218.32 ve 212.92 mg/g kuru yaprak değerleri ile). Gram kuru yaprak başına elde edilmiş olan en yüksek oleuropein miktarı ise 14.24 mg'dır.

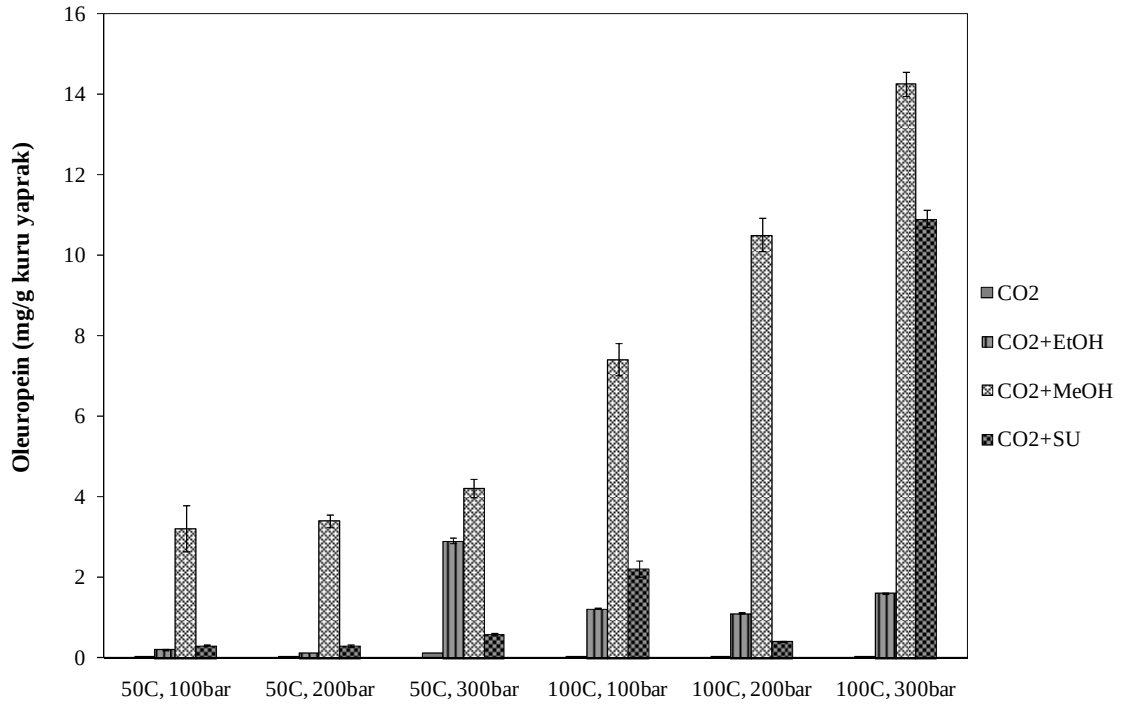
4.3.5. Süperkritik-CO₂ Ekstraksiyonunda Farklı Yardımcı Çözücü Türlerinin Ekstraksiyon Verimine Etkilerinin Karşılaştırılması

Yapılmış olan SC-CO₂ denemelerinde kullanılan yardımcı çözücü miktarının artması ile ekstraksiyon verimin arttığı açık bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.8–4.13). Farklı çözücü sistemlerinin performansını kıyaslamak maksadı ile 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü ile modifiye edilmiş CO₂'in kullanıldığı ekstraksiyon denemeleri bulguları kullanılmıştır. SC-CO₂ ekstraksiyonu ile yapılan denemelerde sabit bir yardımcı çözücü miktarında, basıncın ve sıcaklığın ekstraksiyon ve oleuropein verimlerine etkisini incelemek üzere Tablo 4.9–4.11'den faydalanılarak su, etanol ve metanolün 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü olarak kullanıldığı, 50 ve 100 °C sıcaklıklarda 100, 200 ve 300 bar basınçlara ait denemelerin sonuçları karşılaştırmalı olarak Şekil 4.14 ve 4.15 ile gösterilmiştir.



Şekil 4.14: SC-CO₂ ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, saf CO₂ ve 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü ile modifiye edilmiş CO₂'in varlığında, sıcaklık ve basıncın ekstrakte edilen madde miktarına etkisi (2 L/dak CO₂, 120 dak). Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

100 °C sıcaklık ve 300 bar basınç değerlerinde gerçekleştirilen, yardımcı çözücü olarak su, etanol ve metanolün kullanıldığı SC-CO₂ ekstraksiyonu denemelerinde hemen hemen birbirine yakın ekstrakt verimleri elde edilmiş olsa da, en yüksek verim 233.68 mg/g kuru yaprak değeri ile suyun kullanıldığı denemelerde görülmüştür (Şekil 4.14). Zira sıcaklığının yükseltilmesi ile azalan dielektrik sabiti, suyun polaritesini düşürmektedir [162]. Bu durumda da su, yaprak içerisindeki apolar özellikteki büyük organik bileşikler için de iyi bir çözücü haline gelmektedir. Dolayısıyla ekstrakt verimi bakımından en yüksek değer yardımcı çözücü olarak suyun kullanılması halinde elde edilmiştir. Bu durum da toksik olmayan, alev alma, patlama ve kansorejenik riskler taşımayan, ucuz, kolay temin edilebilen bir çözücü olarak suyun kullanımı kaçınılmaz hale getirmektedir.



Şekil 4.15: SC-CO₂ ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda, saf CO₂ ve 1 mL/dak besleme hızında yardımcı çözücü ile modifiye edilmiş CO₂'in varlığında, sıcaklık ve basıncın ekstrakte edilen oleuropein miktarına etkisi (2 L/dak CO₂, 120 dak). Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Ekstrakte edilen oleuropein açısından bir kıyaslama yapılacak olursa, metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı denemelerde tüm sıcaklık ve basınç şartlarında ulaşılan verimin diğerlerinden belirgin bir şekilde yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Süperkritik akışkan ekstraksiyonu denemelerinde polar maddelerin ekstraksiyonunda yardımcı çözücü olarak en sık kullanılan madde metanoldür. CO₂ ile yaklaşık % 20 oranında karışabilmektedir. Ayrıca, belirli oranlardaki metanol ilavesinin solute ile bitki matrisi arasındaki bağları kırdığı düşünülmektedir [28]. Dolayısıyla bu çalışmada yürütülen denemelerde süperkritik akışkana 0.25 mL/dak besleme hızında bir metanol takviyesi bile oleuropein verimini oldukça yükseltmiştir. Su ve etanolün kullanıldığı sistemlerde ise yine aynı miktardaki bir akışkan modifikasyonunda, oleuropein verimi istatistiksel olarak önemli derecede farklılaşmayacak şekilde aynı seviyelerde kalmıştır (Tablo 4.9–4.11).

Ancak yoğun ekstraksiyon şartlarında (yüksek sıcaklık ve yüksek basınç) oleuropein için su da yardımcı çözücü olarak göz ardı edilmemesi gereken önemli bir madde olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 4.15).

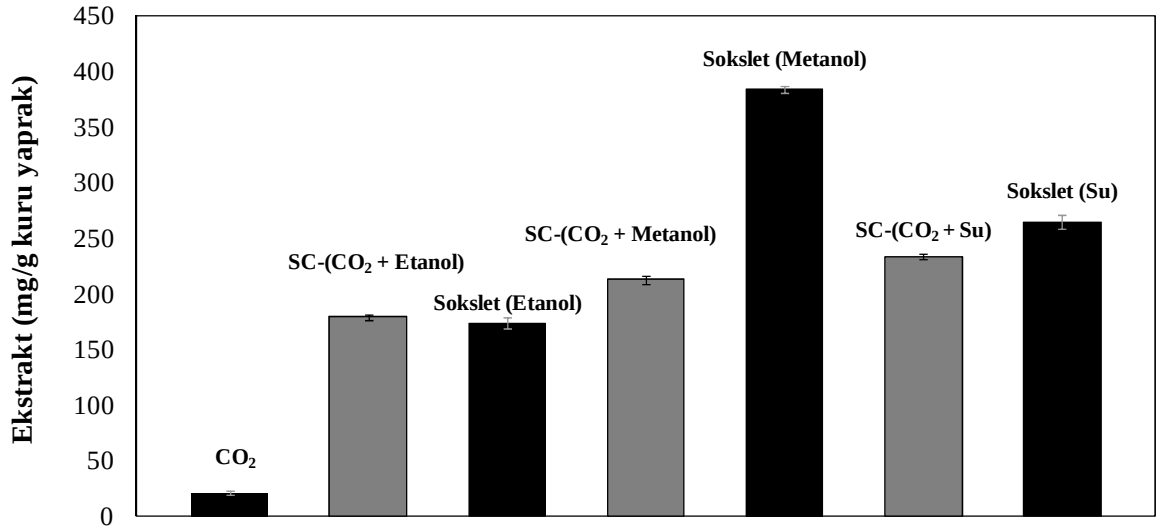
4.4. SÜPERKRİTİK-CO₂ EKSTRAKSİYONU İLE SOKSLET YÖNTEMİNİN EKSTRAKSİYON VERİMİNE ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO₂ ekstraksiyonu ile ekstrakt elde etme yöntemi genel olarak incelenecek olursa, yardımcı çözücü kullanılmaksızın yapılan SC-CO₂ ekstraksiyonu verimlerinin çok düşük olduğu görülmüştür. Yardımcı çözücü olarak su, etanol ve metanolün kullanılması durumunda ise süperkritik şartların yoğunlaştırılmasıyla birlikte ekstraksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.9–4.11). Bu üç yardımcı çözücünün kullanılması ile en yüksek oleuropein veriminin elde edildiği SC-CO₂ ekstraksiyonu denemelerinin sonuçları ile sokslet yönteminde su, etanol ve metanolün kullanılmasıyla elde edilen sonuçlar Tablo 4.12’de verilmiş olup, Şekil 4.16 ve 4.17 ile gösterilmiştir.

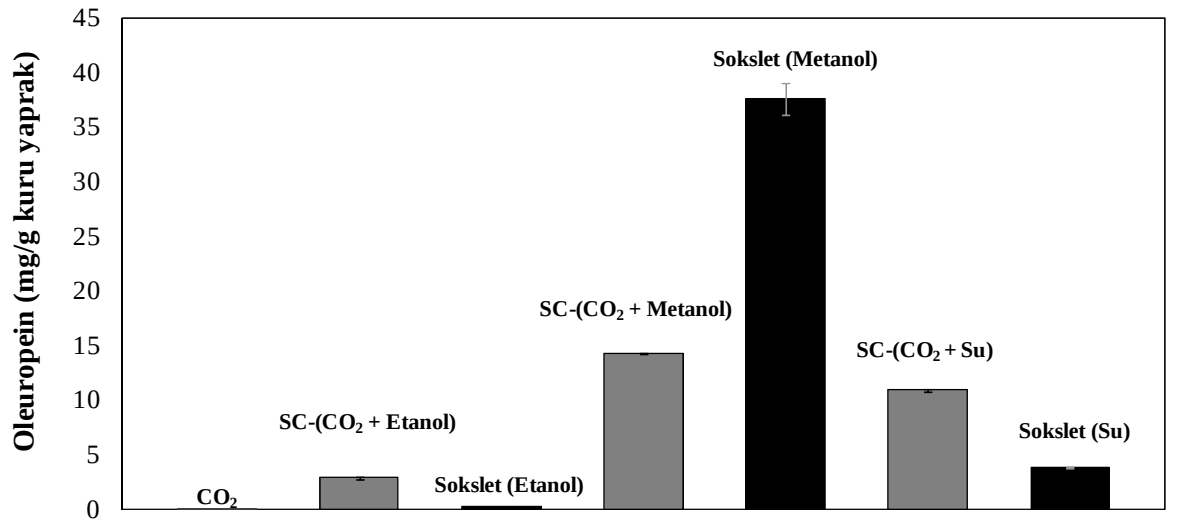
Tablo 4.12: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen ekstrakt ve içeriğindeki oleuropein miktarlarının ayrı ayrı en iyi şartlarda karşılaştırılması *

Yöntem	Çalışma şartları	Ekstrakt miktarı (mg/g kuru yaprak)	Oleuropein miktarı (mg/g kuru yaprak)
Sokslet	Çözücü: Etanol, 30 devir	173.89 ± 4.96	0.29 ± 0.01
Sokslet	Çözücü: Metanol, 30 devir	383.94 ± 3.35	37.55 ± 1.43
Sokslet	Çözücü: Su, 30 devir	264.95 ± 6.15	3.83 ± 0.05
SC-CO ₂	100 °C, 300 bar, saf CO ₂	21.28 ± 1.81	0.04 ± 0.00
SC-CO ₂	50 °C, 300 bar, 1 mL/dak besleme hızındaki etanol ile modifiye edilmiş CO ₂	179.34 ± 2.43	2.90 ± 0.1
SC-CO ₂	100 °C, 300 bar, 1 mL/dak besleme hızındaki metanol ile modifiye edilmiş CO ₂	212.92 ± 3.98	14.24 ± 0.1
SC-CO ₂	100 °C, 300 bar, 1 mL/dak besleme hızındaki su ile modifiye edilmiş CO ₂	233.68 ± 2.39	10.91 ± 0.1

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



Şekil 4.16: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen ekstrakt miktarının en iyi şartlarda karşılaştırılması. Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.



Şekil 4.17: Kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan SC-CO₂ ekstraksiyonu ve sokslet yönteminden elde edilen oleuropein miktarının en iyi şartlarda karşılaştırılması. Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir.

Şekil 4.16'dan saf CO₂'in kullanıldığı süperkritik akışkan ekstraksiyonu denemesinden ve metanol ile gerçekleştirilen sokslet yönteminden elde edilen sonuçlar dışında, hemen

hemen birbirine yakın verimlerin elde edildiği görülmektedir. En yüksek ekstrakt miktarı 383.94 mg/g kuru yaprak değeri ile metanolün kullanıldığı sokslet yöntemi ile elde edilmiştir. Saf CO₂ ile gerçekleştirilen süperkritik şartlardaki ekstraksiyon verimi, apolar bir çözücü olan hekzanın kullanıldığı sokslet denemelerinden elde edilene yakın oldukça az sonuçlar vermiştir. Metanollü sokslet yönteminden elde edilen ekstrakt miktarı, yardımcı çözücü kullanılmaksızın gerçekleştirilen SC-CO₂ yönteminden elde edilenin yaklaşık 18 katıdır (Tablo 4.12).

Su ile yapılan ekstraksiyonlarda da yine sokslet metodu ile daha fazla verim elde edilmiştir. Bu sonucun elde edilmesinde, SC-CO₂ ekstraksiyonunun kullanılması ile beraber ekstraksiyonda meydana gelen seçimliliğin göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Zira sokslet yönteminde istenilen fenolik bileşenler dışında zeytin yaprağı içerisindeki polifenoller, organik asitler, pigmentler, polisakkaridler ve nükleik asitler gibi diğer bileşenler de ekstrakte edilmektedir (Şekil 4.16).

En yüksek oleuropein miktarının 37.55 mg/g kuru yaprak değeri ile yine metanolün çözücü olarak kullanıldığı sokslet yönteminden elde edildiği görülmektedir. Su ve metanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı SC-CO₂ ile elde edilen ekstraktlarda birbirine çok uzak olmayan oleuropein miktarlarına rastlanmıştır (10.91 ile 14.24 mg/g kuru yaprak). Bu durum, suyun fenolik bileşiklerle (oleuropeinle) hidrojen bağları oluşumuna ve dipol-dipol etkileşimlerine yatkın bir çözücü olmasından kaynaklanmaktadır [23]. Böyle bir durumda toksik olmayan, çeşitli riskler taşımayan, ucuz ve kolay temin edilen bir madde olan su metanole tercih edilebilir.

Etanolün kullanıldığı ekstraksiyon çalışmalarına bakıldığında her iki yöntemde de oldukça düşük seviyelerde oleuropein elde edildiği görülmektedir (Şekil 4.17). SC-CO₂ ekstraksiyonu ile elde edilen oleuropein miktarı 2.90 mg/g kuru yaprak iken, bu değer sokslet yönteminde 0.29 mg/g kuru yaprak'a düşmektedir. Bu durum, sokslet yönteminde yaşanan uzun kaynama süreleri ile gerçekleşen ekstraksiyonun neticesinde yaprak içerisindeki oleuropeinin bozunmasını gösterebilir. Aynı sonuca su ile yapılan SC-CO₂ ve sokslet denemelerinde de rastlanmıştır. SC-CO₂ ile yapılan sulu denemelerde sokslet metoduna kıyasla daha yüksek verim elde edilmiştir (10.91'e karşı 3.83 mg/g kuru yaprak). Burada da yine çok uzun sürede gerçekleşen ekstraksiyonun

oleuropeini bozmuş olması ile açıklanabilir. Su ve etanolün yardımcı çözücü olarak kullanıldığı SC-CO₂ denemelerinden sokslet yöntemine kıyasla daha yüksek verim elde edilmesi süperkritik akışkanın gazlara benzer kütle iletimi özelliklerine ve sıvılara benzer çözücü özelliklerine sahip olması ile de ilgisi bulunmaktadır. Süperkritik akışkanın gazlara benzer nitelikte yüksek girişkenlik özelliği katı yapı içerisine nüfuzunu kolaylaştırmakta ve sıvılar gibi yüksek yoğunluğa sahip olması da oleuropeini yapraklardan daha kolay almaya imkan vermektedir [15-29].

Su ve etanolün kullanıldığı ekstraksiyonlarda yaşanan bu durum, çözücü olarak metanolün kullanıldığı denemelerde gözlenmemiştir. Zira, metanolün kaynama noktasının diğer çözücülerden daha düşük olması ve kaynama süresince sıcaklığın 50 °C civarında seyretmesi oleuropeinin kararlılığını korumasını sağlamıştır.

4.5. ZEYTİN YAPRAĞINDAKİ FENOLİK MADDE PROFİLİNİN ÇEŞİTLİ FAKTÖRLERE GÖRE DEĞİŞİMİ

Toplam fenolik madde miktarı açısından incelenen farklılıklar, farklı türlerden, farklı zamanlardan ve farklı bölgelerden toplanan zeytin yaprağı örneklerinde belirgin bir şekilde gözlemlenmiştir. Örneklerdeki başlıca fenolik bileşiklerin miktarı tek tek incelendiğinde ise toplam fenolik madde miktarından farklı bir dağılım gösterdikleri görülmüştür.

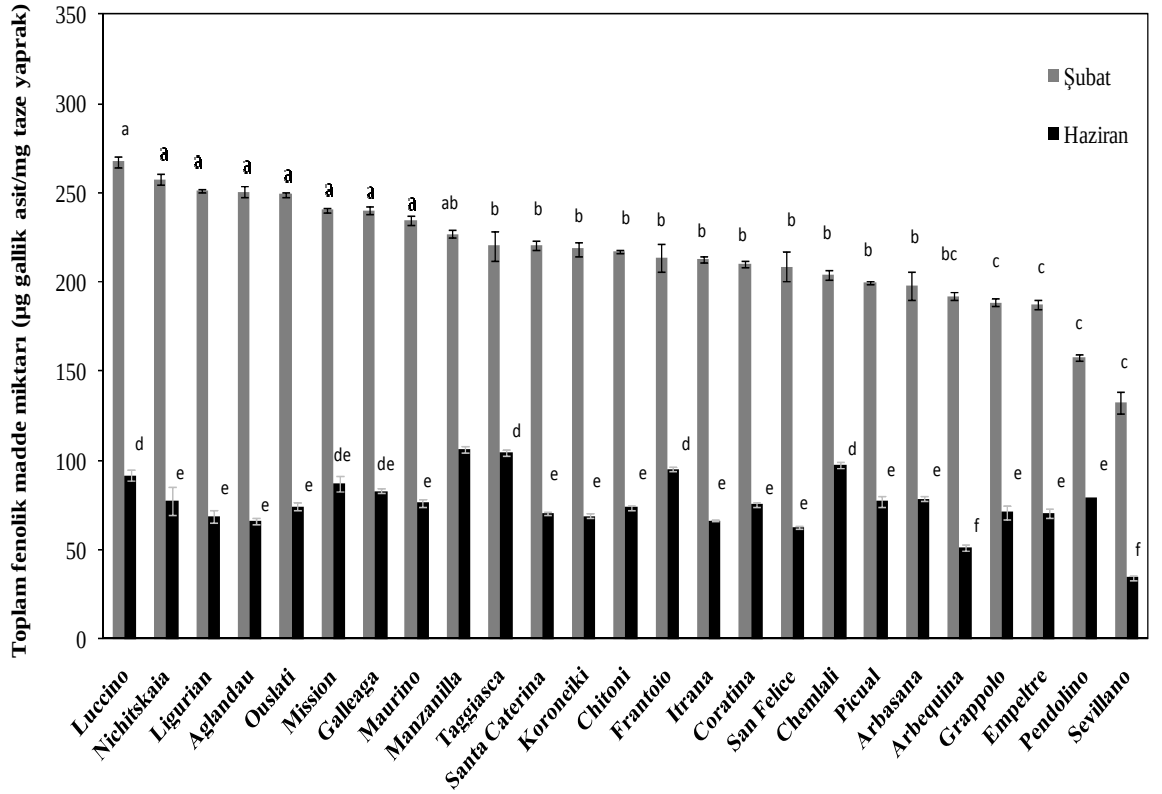
4.5.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Ağaç Türlerine Göre Değişimi

25 farklı zeytin yaprağı kültürü ile % 80 metanol çözeltisi kullanılarak yapılan ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktlarda Şubat ve Haziran aylarında gerçekleştirilen toplam fenol analizlerinin sonucu Tablo 4.13 ile verilmiş olup, Şekil 4.18'de Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte gösterilmiştir.

Tablo 4.13: Şubat ve Haziran aylarında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın toplam fenolik madde miktarı ve Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklardaki toplam fenolik madde miktarındaki azalma oranı *

Zeytin ağacı	(Şubat) Toplam fenolik madde miktarı (µg gallik asit/mg taze yaprak)	(Haziran) Toplam fenolik madde miktarı (µg gallik asit/mg taze yaprak)	Azalma oranı (%)
Leccino	267.55 ± 3.11	91.80 ± 2.83	65.7
Taggiasca	220.45 ± 8.14	104.38 ± 1.61	52.7
Mission	240.40 ± 1.10	87.24 ± 4.73	63.7
Aglandau	250.55 ± 3.17	66.41 ± 1.64	73.5
Picual	199.80 ± 0.93	77.20 ± 2.97	61.4
Manzanilla	226.89 ± 2.25	106.51 ± 1.84	53.1
Oueslati	249.09 ± 1.38	74.44 ± 2.17	70.1
Frantoio	213.48 ± 7.99	95.44 ± 1.30	55.3
Ligurian	251.49 ± 0.83	68.96 ± 3.22	72.6
Koroneiki	218.46 ± 4.27	69.18 ± 1.00	68.3
Galleaga	239.93 ± 2.19	83.08 ± 1.13	64.0
Empeltre	187.83 ± 2.59	70.88 ± 2.64	62.3
Grappolo	188.80 ± 1.90	71.23 ± 3.88	62.3
Chemlali	203.67 ± 2.60	97.44 ± 1.85	52.2
Arbequina	192.10 ± 2.04	51.57 ± 1.86	73.2
Coratina	209.90 ± 1.82	75.51 ± 1.13	64.0
Maurino	234.64 ± 2.69	76.47 ± 2.00	67.4
Nichitskaia	257.52 ± 2.84	77.46 ± 7.57	69.9
Chitoni	217.08 ± 0.92	73.75 ± 1.59	66.0
San Felice	208.55 ± 8.17	63.00 ± 0.82	69.8
Itrana	212.85 ± 1.51	66.38 ± 0.50	68.8
Sevillano	132.61 ± 6.43	34.62 ± 1.31	73.9
Santa Caterina	220.44 ± 2.49	70.78 ± 1.09	67.9
Arbasana	197.91 ± 7.48	78.82 ± 1.63	60.2
Pendolino	157.60 ± 1.72	79.53 ± 0.23	49.5

* Veriler ortalama (n=9) ± standart sapmayı göstermektedir.



Şekil 4.18: Farklı türlerdeki zeytin ağacı yapraklarının Şubat ve Haziran aylarındaki toplam fenolik madde dağılımı. Herbir türe ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

Toplam fenolik madde konsantrasyonu, Şubat ayında toplanan örneklerde 132.61 ile 267.55 μg gallic asit/mg taze yaprak (ayrı ayrı Sevillano ve Leccino türlerinde) arasında değişirken, Haziran ayında 34.62 ile 106.51 μg gallic asit/mg taze yaprak arasında değişmektedir (ayrı ayrı Sevillano ve Manzanilla). Elde edilen sonuçlar, zeytin ağacı türünün fenolik madde miktarı üzerine etkilerinin incelendiği daha önceki çalışmalar ile uyumluluk içerisinde [54, 146, 163, 164]. Bazı türler arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bir grup tür içerisinde minimum düzeyde ya da hiçbir fark yokken, Sevillano ve Leccino gibi türlerin bulunduğu bir grup ise önemli miktarda farklılık göstermişlerdir (Şekil 4.18).

4.5.2. Toplam Fenolik Madde Miktarının Bölgelere Göre Değişimi

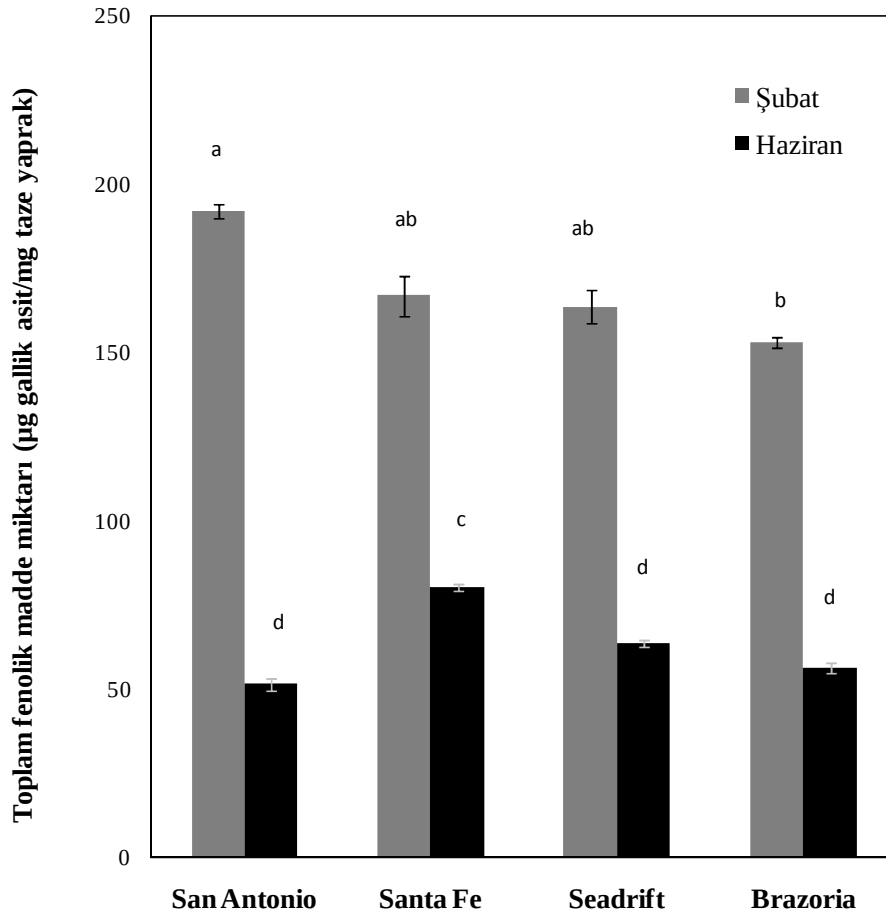
Arbequina zeytin ağacı türüne ait yaprakların fenolik madde içeriğine bölgelerin etkisinin incelendiği deneylerin Şubat ve Haziran aylarına ait analiz sonuçları ise Tablo 4.14 ile sunulmuştur. Söz konusu veriler ve Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları Şekil 4.19 ile gösterilmiştir.

Tablo 4.14: 4 farklı bölgeden, Şubat ve Haziran aylarında toplanan Arbequina zeytin ağacı yapraklarına ait toplam fenolik madde miktarı ve Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklardaki toplam fenolik madde miktarındaki azalma oranı *

Zeytin ağacının yetiştirildiği yer	(Şubat)	(Haziran)	Azalma oranı (%)
	Toplam fenolik madde miktarı (μg gallik asit/ mg taze yaprak)	Toplam fenolik madde miktarı (μg gallik asit/ mg taze yaprak)	
San Antonio	192.00 $\pm$ 2.00	51.57 $\pm$ 1.86	73.14
Santa Fe	167.00 $\pm$ 6.00	80.17 $\pm$ 0.98	51.99
Seadrift	163.50 $\pm$ 5.00	63.80 $\pm$ 0.95	60.98
Brazoria	153.00 $\pm$ 1.50	56.36 $\pm$ 1.71	63.17

* Veriler ortalama ($n=9$) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir.

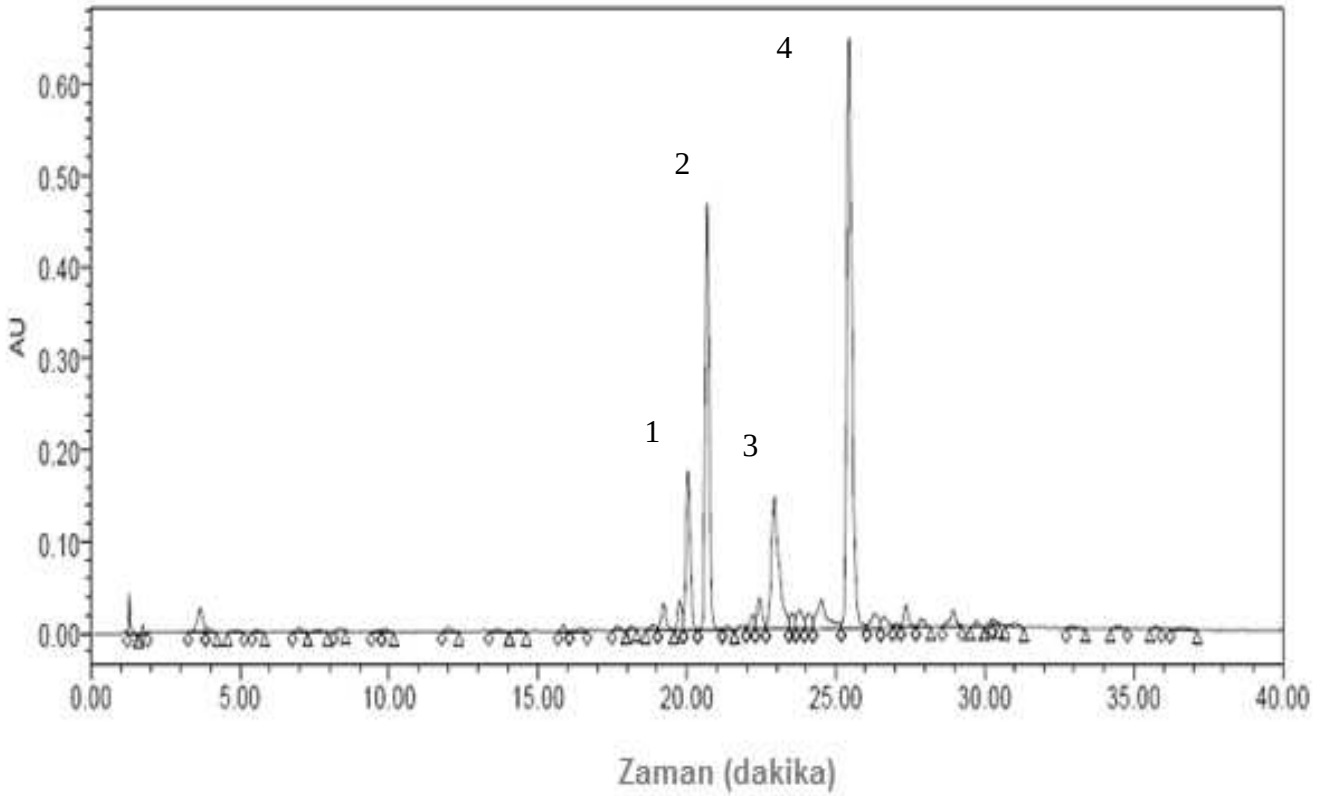
Toplam fenolik madde konsantrasyonu, Şubat ayından Haziran ayına geçerken ortalama olarak % 64 gibi önemli oranında azalmıştır (Tablo 4.13 ve 4.14). Şubat ayında yaprakların toplandığı şehirlerden kışın en sert geçtiği San Antonio'daki örneklerde toplam fenol miktarı en yüksek olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.19). Bu miktarın düşmesi, yaza girerken San Antonio şehrinde yaşanan önemli sıcaklık artışı ile ilişkilendirilebilir. Dolayısıyla yüksek sıcaklıklar yapraklardaki fenolik madde miktarını azaltma eğilimi göstermektedir. Fenolik madde seviyesi üzerine muhtemel bir sıcaklık etkisi düşüncesi Tablo 4.14 ile desteklenmektedir. İncelenen coğrafi bölgeler içerisinde kışın en sert ve yazın en sıcak geçtiği San Antonio'da Şubat ayından Haziran ayına geçerken en belirgin düşüş (% 73 oranında) görülmüştür.



Şekil 4.19: Arbequina zeytin ağacı yapraklarına ait toplam fenolik maddenin Şubat ve Haziran aylarındaki coğrafi orijine göre dağılımı. Herbir türe ait sütunlar üzerindeki farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

4.5.3. Başlıca Fenolik Madde (Oleuropein, Verbaskozit, Luteolin 7-O-glukozit, Luteolin 4'-O-glukozit) Miktarının Ağaç Türlerine Göre Değişimi

Zeytin yaprağında bulunan fenolik maddelerin başlıcaları oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4'-O-glukozit olarak bilinmektedir. Bu maddeler ilaç, kozmetik ve gıda sanayiinde oldukça yaygın kullanıma sahiptir. Dolayısıyla bu aşamada zeytin yaprağından elde edilen ekstraktların içerdiği başlıca fenolik maddeler incelenmiştir. Şekil 4.20, Leccino zeytin ağacı yaprağına ait bir ekstraktın alıkonma zamanları ile beraber örnek kromatogramını göstermektedir.



Şekil 4.20: Leccino zeytin yaprağı ekstraktının örnek HPLC kromatogramı. Pikler: 1, luteolin 7-O-glukozit (t_R = 21.048); 2, verbaskozit (t_R = 21.667); 3, luteolin 4'-O-glukozit (t_R = 24.066); 4, oleuropein (t_R = 26.918). Ölçümler 280 nm'de gerçekleştirilmiştir.

HPLC kromatogramlarından elde edilen bulgular, kullanılan zeytin ağacı türü, coğrafi konum ve toplanma zamanından bağımsız olarak zeytin yaprağı ekstraktı içerisinde en fazla seviyede bulunan fenolik bileşimin oleuropein olduğunu göstermektedir (Şekil 4.20). Ayrıca, alıkonma zamanlarına bakarak söz konusu fenolik bileşiklerin polariteleri hakkında bir fikir elde edilebilmektedir. Alıkonma zamanı en yüksek olan oleuropeinin (t_R = 26.918) polaritesinin diğer bileşiklerden daha düşük olduğu söylenebilir. Polar yapıdaki mobil fazın kolondan ilk olarak luteolin 7-O-glukoziti (t_R = 21.048) sürüklemesi bu bileşiğin polaritesinin en yüksek olduğunun bir göstergesidir.

Bileşiklerin miktarlarının tespit edilmesinde bileşiklere ait HPLC kromatogramlarından elde edilmiş entegre alanlar ve oleuropein, verbaskozit, luteolin 7-*O*-glukozit ve luteolin 4'-*O*-glukozitin ara stok çözeltileri ile hazırlanmış kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır.

Şubat ve Haziran aylarında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın fenolik bileşik miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak) ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları Tablo 4.15 ve 4.16'da Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte ayrı ayrı sunulmuştur. Tablo 4.17 ise Şubat ayından Haziran ayına geçerken örneklerde gözlenen değişimin yüzde olarak oranlarını temsil etmektedir.

Tablo 4.15: Şubat ayında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın fenolik bileşik miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak) *

Zeytin ağacı	Oleuropein	% fark**	Verbaskozit	% fark**	Luteolin 7- O-glukozit	% fark**	Luteolin 4'- O-glukozit	% fark**
Leccino	148.32 $\pm$ 3.93 a	0	0.90 $\pm$ 0.09 cd	0	1.28 $\pm$ 0.06 b	0	0.68 $\pm$ 0.01 ab	0
Taggiasca	121.69 $\pm$ 11.33 b	18	0.38 $\pm$ 0.07 d	58	0.98 $\pm$ 0.02 c	23	0.54 $\pm$ 0.04 b	20
Mission	107.80 $\pm$ 4.26 bc	27	1.47 $\pm$ 0.10 c	+63	1.62 $\pm$ 0.04 a	+26	0.88 $\pm$ 0.01 a	+28
Aglandau	100.46 $\pm$ 1.10 cd	32	1.57 $\pm$ 0.03 c	+74	0.65 $\pm$ 0.03 d	49	0.55 $\pm$ 0.06 b	19
Picual	99.43 $\pm$ 1.97 cd	32	0.28 $\pm$ 0.02 de	68	0.87 $\pm$ 0.01 d	32	0.54 $\pm$ 0.01 b	20
Manzanilla	89.14 $\pm$ 4.13 cd	39	0.46 $\pm$ 0.05 d	49	0.77 $\pm$ 0.02 d	39	0.59 $\pm$ 0.02 b	13
Oueslati	84.71 $\pm$ 6.01 d	42	1.01 $\pm$ 0.20 cd	+12	0.79 $\pm$ 0.04 d	37	0.65 $\pm$ 0.01 ab	4
Frantoio	83.71 $\pm$ 0.61 de	43	0.49 $\pm$ 0.01 d	45	0.80 $\pm$ 0.05 d	37	0.42 $\pm$ 0.03 c	38
Ligurian	72.43 $\pm$ 1.15 de	51	1.90 $\pm$ 0.04 bc	+111	0.74 $\pm$ 0.03 d	41	0.48 $\pm$ 0.06 b	29
Koroneiki	68.69 $\pm$ 1.57 de	53	1.33 $\pm$ 0.12 c	+47	0.73 $\pm$ 0.07 d	42	0.41 $\pm$ 0.20 c	39
Galleaga	63.69 $\pm$ 2.44 ef	57	1.49 $\pm$ 0.05 c	+66	0.82 $\pm$ 0.01 cd	36	0.55 $\pm$ 0.05 b	19
Empeltre	60.50 $\pm$ 4.30 ef	59	0.21 $\pm$ 0.04 e	77	0.63 $\pm$ 0.03 d	50	0.34 $\pm$ 0.02 c	49
Grappolo	55.95 $\pm$ 0.06 ef	62	1.03 $\pm$ 0.13 cd	+14	1.01 $\pm$ 0.03 c	21	0.47 $\pm$ 0.06 b	30
Chemlali	55.16 $\pm$ 2.22 ef	62	0.58 $\pm$ 0.07 d	35	0.84 $\pm$ 0.02 cd	34	0.61 $\pm$ 0.04 b	10
Arbequina	54.40 $\pm$ 2.82 ef	63	0.27 $\pm$ 0.01 de	69	1.27 $\pm$ 0.07 b	1	0.62 $\pm$ 0.03 b	8
Coratina	54.22 $\pm$ 1.91 ef	63	1.27 $\pm$ 0.30 c	+40	1.22 $\pm$ 0.03 b	4	0.68 $\pm$ 0.01 ab	0.5
Maurino	53.59 $\pm$ 4.46 ef	63	1.90 $\pm$ 0.02 c	+110	1.03 $\pm$ 0.03 c	19	0.69 $\pm$ 0.05 ab	+0.8
Nichitskaia	52.85 $\pm$ 0.77 ef	64	3.32 $\pm$ 0.20 a	+269	0.79 $\pm$ 0.01 d	38	0.75 $\pm$ 0.11 ab	+10
Chitoni	52.57 $\pm$ 3.68 ef	64	1.06 $\pm$ 0.04 c	+17	0.91 $\pm$ 0.05 c	29	0.57 $\pm$ 0.06 b	16
San Felice	51.65 $\pm$ 2.39 ef	65	1.36 $\pm$ 0.22 c	+51	1.04 $\pm$ 0.01 c	18	0.63 $\pm$ 0.06 b	7
Itrana	50.91 $\pm$ 2.95 ef	65	1.47 $\pm$ 0.12 c	+63	1.09 $\pm$ 0.05 bc	14	0.75 $\pm$ 0.02 ab	+10
Sevillano	50.65 $\pm$ 8.17 ef	65	0.22 $\pm$ 0.05 e	75	0.59 $\pm$ 0.10 e	53	0.33 $\pm$ 0.04 c	51
Santa Caterina	44.20 $\pm$ 0.24 f	70	2.21 $\pm$ 0.19 b	+145	0.77 $\pm$ 0.01 d	40	0.81 $\pm$ 0.05 a	+19
Arbasana	42.84 $\pm$ 3.48 f	71	0.54 $\pm$ 0.06 d	40	0.81 $\pm$ 0.04 cd	36	0.60 $\pm$ 0.04 b	11
Pendolino	42.57 $\pm$ 1.99 f	71	0.90 $\pm$ 0.09 cd	58	0.78 $\pm$ 0.04 d	39	0.46 $\pm$ 0.02 b	32

* Veriler ortalama (n=9) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

** 'Leccino' zeytin ağacı türüne oranla % olarak azalma miktarını göstermektedir (+ ise % olarak artışı ifade etmektedir).

Tablo 4.16: Haziran ayında toplanan 25 farklı zeytin ağacı türüne ait yaprağın fenolik bileşik miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak) *

Zeytin ağacı	Oleuropein	% fark **	Verbaskozit	% fark **	Luteolin 7-O-glukozit	% fark **	Luteolin 4'-O-glukozit	% fark **
Leccino	64.80 $\pm$ 2.48 b	0	0.51 $\pm$ 0.04 c	0	0.69 $\pm$ 0.04 cd	0	0.48 $\pm$ 0.02 c	0
Taggiasca	73.01 $\pm$ 2.82 b	+12	0.55 $\pm$ 0.01 b	+8	1.30 $\pm$ 0.04 a	+88	0.72 $\pm$ 0.03 a	+50
Mission	50.36 $\pm$ 1.76 cd	22	0.72 $\pm$ 0.14 b	+40	0.63 $\pm$ 0.15 cd	8	0.56 $\pm$ 0.04 b	+17
Aglandau	45.04 $\pm$ 2.09 de	30	0.30 $\pm$ 0.04 cd	41	0.48 $\pm$ 0.06 d	30	0.34 $\pm$ 0.03 e	28
Picual	16.91 $\pm$ 0.89 g	73	0.14 $\pm$ 0.01 de	73	0.11 $\pm$ 0.02 f	84	0.23 $\pm$ 0.01 f	50
Manzanilla	109.49 $\pm$ 3.11 a	+68	0.76 $\pm$ 0.04 ab	+48	0.78 $\pm$ 0.02 bc	+13	0.61 $\pm$ 0.00 b	+27
Oueslati	67.77 $\pm$ 1.13 b	+4	0.23 $\pm$ 0.02 de	53	0.44 $\pm$ 0.11 de	36	0.39 $\pm$ 0.01 d	17
Frantoio	44.08 $\pm$ 0.57 de	31	0.22 $\pm$ 0.01 de	56	0.96 $\pm$ 0.03 b	+39	0.62 $\pm$ 0.01 b	+29
Ligurian	46.99 $\pm$ 1.74 de	27	0.26 $\pm$ 0.01 de	48	0.55 $\pm$ 0.13 cd	19	0.39 $\pm$ 0.02 d	18
Koroneiki	47.05 $\pm$ 2.99 de	27	0.22 $\pm$ 0.01 de	56	0.11 $\pm$ 0.00 f	83	0.35 $\pm$ 0.01 e	26
Galleaga	59.48 $\pm$ 1.23 bc	8	0.65 $\pm$ 0.06 b	+28	0.67 $\pm$ 0.01 cd	+2	0.49 $\pm$ 0.00 c	+3
Empeltre	37.19 $\pm$ 1.18 ef	42	0.40 $\pm$ 0.11 c	21	0.43 $\pm$ 0.02 de	37	0.31 $\pm$ 0.01 ef	34
Grappolo	36.45 $\pm$ 3.48 f	43	0.27 $\pm$ 0.01 cd	47	0.18 $\pm$ 0.01 ef	74	0.44 $\pm$ 0.03 cd	7
Chemlali	39.44 $\pm$ 2.95 ef	39	0.89 $\pm$ 0.01 a	+74	0.71 $\pm$ 0.01 bc	2	0.60 $\pm$ 0.01 b	+26
Arbequina	24.45 $\pm$ 0.78 g	62	0.14 $\pm$ 0.00 de	71	0.15 $\pm$ 0.01 f	78	0.30 $\pm$ 0.03 ef	37
Coratina	57.58 $\pm$ 1.23 bc	11	0.33 $\pm$ 0.00 c	34	0.15 $\pm$ 0.01 f	78	0.53 $\pm$ 0.00 bc	+10
Maurino	68.20 $\pm$ 0.55 b	+5	0.35 $\pm$ 0.00 c	31	0.16 $\pm$ 0.00 f	76	0.60 $\pm$ 0.00 b	+25
Nichitskaia	23.43 $\pm$ 2.26 g	63	0.19 $\pm$ 0.00 de	62	0.96 $\pm$ 0.03 b	+39	0.40 $\pm$ 0.02 d	14
Chitoni	50.28 $\pm$ 3.44 cd	22	0.26 $\pm$ 0.00 de	49	0.27 $\pm$ 0.01 ef	61	0.54 $\pm$ 0.01 b	+13
San Felice	50.97 $\pm$ 0.98 cd	21	0.22 $\pm$ 0.01 de	57	0.10 $\pm$ 0.01 f	85	0.37 $\pm$ 0.01 de	21
Itrana	67.05 $\pm$ 0.47 b	+3	0.06 $\pm$ 0.02 e	87	0.85 $\pm$ 0.03 bc	+23	0.40 $\pm$ 0.01 d	15
Sevillano	18.79 $\pm$ 0.74 g	71	0.05 $\pm$ 0.01 e	90	0.44 $\pm$ 0.01 de	35	0.22 $\pm$ 0.01 f	53
Santa Caterina	45.24 $\pm$ 1.64 de	30	0.29 $\pm$ 0.02 cd	42	0.18 $\pm$ 0.01 ef	73	0.46 $\pm$ 0.02 cd	4
Arbasana	0.65 $\pm$ 0.10 h	98	0.13 $\pm$ 0.00 de	74	0.26 $\pm$ 0.03 ef	61	0.31 $\pm$ 0.01 ef	35
Pendolino	44.42 $\pm$ 0.91 de	31	0.22 $\pm$ 0.00 de	56	0.12 $\pm$ 0.00 f	81	0.41 $\pm$ 0.00 d	14

* Veriler ortalama (n=9) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

** 'Leccino' zeytin ağacı türüne oranla % olarak azalma miktarını göstermektedir (+ ise % olarak artışı ifade etmektedir).

Şubat ayında toplanan örneklerden, toplam fenolik madde miktarı en fazla Leccino türünde bulunurken, verbaskozit miktarını en fazla ihtiva eden tür Nichitskaia olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.18 ve Tablo 4.15). Benzer şekilde, Sevillano en düşük toplam fenol içeriğine sahipken (Şekil 4.18), Arbasana türü en düşük oleuropein miktarına sahiptir (Tablo 4.16). Ekstrakt içerisindeki toplam fenolik madde miktarı ile içeriğindeki başlıca fenolik bileşik konsantrasyonu arasında bir korelasyonun olduğu hususunda bir çalışmaya rastlanmamıştır [163].

Tablo 4.17: Şubat ayından Haziran ayına geçerken yapraklarda bulunan başlıca fenolik bileşik miktarındaki azalma oranı

Zeytin ağacı	Oleuropein (%)	Verbaskozit (%)	Luteolin 7-O-glukozit (%)	Luteolin 4'-O-glukozit (%)
Leccino	56.3	43.3	46.4	30.1
Taggiasca	40.0	+46.4	+32.1	+32.6
Mission	53.2	51.1	61.0	35.9
Aglandau	55.1	81.1	25.7	38.0
Picual	82.9	51.6	51.6	56.9
Manzanilla	+22.8	+65.3	+65.3	+2.9
Oueslati	19.9	76.7	76.7	39.2
Frantoio	47.3	54.9	54.9	+46.5
Ligurian	35.1	86.1	86.1	19.6
Koroneiki	31.5	83.2	83.2	14.5
Galleaga	6.6	56.2	56.2	10.0
Empeltre	38.5	+93.3	+93.3	9.4
Grappolo	34.8	74.0	82.2	7.2
Chemlali	28.5	+53.2	16.0	1.5
Arbequina	55.0	46.5	88.2	52.3
Coratina	+6.2	73.8	88.0	21.9
Maurino	+27.2	81.6	84.3	13.1
Nichitskaia	55.6	94.1	+21.5	45.9
Chitoni	4.34	75.7	70.6	5.6
San Felice	1.3	84.2	90.3	41.0
Itrana	+31.7	95.7	22.2	46.8
Sevillano	62.9	77.1	24.7	33.3
Santa Caterina	+2.3	86.7	76.5	43.9
Arbasana	98.4	67.8	67.8	49.2
Pendolino	+4.3	84.0	84.0	11.0

+, % olarak artışı ifade etmektedir.

Bazı fenolik bileşiklerin miktarında dikkate değer oranda değişiklikler gözlemlenmiştir (Tablo 4.17). Örneğin Arbasana türünde oleuropein konsantrasyonu, Haziran ayında % 98.4 oranında azalmıştır. Bu durum, İtalya’da yürütülen ve Mart ve Ekim aylarında toplanan zeytin yaprağı örneklerinde oleuropein içeriği bakımından bir değişimin gözlenmediği çalışmadan farklı bir sonuç göstermiştir [81]. Yapılmış olan söz konusu çalışmada, benzer tek tür Leccino’dur. Fakat bu türde de yaz döneminde % 56.3 oranında bir azalma gözlemlenmiştir (Tablo 4.17). Söz konusu iki çalışmadaki farklılık, iklimsel farklılıktan kaynaklanabilmektedir. İtalya’nın Roma şehrinde, Mart ayındaki sıcaklıklar 16 °C/5 °C (ortalama yüksek/ortalama düşük) ve Kasım ayındaki sıcaklıklar ise 23 °C/10 °C’dir. San Antonio’da ise bu değerler Şubat ayında 19 °C/6 °C, Haziran ayında ise 33 °C/22 °C’ dir [165]. Benzer durum, İran’ın ılıman ve tropik olmak üzere farklı bölgelerinde yetiştirilmiş olan Sevillano türünde de rastlanmıştır. Ocak ayında toplanan örneklerdeki oleuropein miktarı gram kuru yaprak başına 235.7 mg iken, Temmuz’da bu miktar 54.2 mg/g kuru yaprak olarak bulunmuştur [150].

Haziran ayında çoğu fenolik bileşik konsantrasyonu azalırken, oleuropein içeriğinin çok az miktarda arttığı Manzanilla, Coratina, Maurino, Itrana, Santa Caterina ve Pendolino gibi türler de görülmüştür (Tablo 4.17). Farklı türlerdeki verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4’-O-glukozit seviyelerinin ise toplama dönemlerinden bağımsız bir şekilde değiştiği görülmüştür. Mesela yazın Chemlali’de sadece verbaskozit miktarı artmışken, Empeltre’de hem verbaskozit hem de luteolin 7-O-glukozit miktarı artmıştır. Taggiasca ise verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4’-O-glukozit miktarları artmıştır. Manzanilla da ise dört fenolik bileşik de Haziran ayında artış göstermiştir (Tablo 4.17). Verbaskozit, luteolin 7-O-glukozit ve luteolin 4’-O-glukozit yapraktaki toplam fenol içeriğinin çok az miktardaki bileşenlerinden olduğundan seviyelerindeki değişim dikkate değer olmamıştır. Bazı durumlarda da verbaskozit veya diğer metabolitlerin seviyelerindeki artış oleuropeinin bozunması sonucu ile açıklanabilir [72, 166]. Çalışılan türler içerisinde Manzanilla, Maurino ve Itrana da istisnai bir durum gözlenerek oleuropein miktarı yükselmiştir.

4.5.4. Başlıca Fenolik Madde Miktarının Bölgelere Göre Değişimi

Arbequina zeytin ağacı türüne ait yaprakların fenolik madde içeriğinin bölgelere göre etkisinin incelendiği deneylerin Şubat ve Haziran aylarına ait analiz sonuçları ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak) ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları şeklinde Tablo 4.18 ve 4.19'da Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte verilmiştir.

Tablo 4.18: Şubat ayında 4 farklı bölgeden toplanan aynı türe (Arbequina) ait zeytin ağacı yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşik miktarı *

Zeytin ağacının yetiştirildiği yer	Oleuropein ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Verbaskozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Luteolin 7-O-glukozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Luteolin 4'-O-glukozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)
Santa Fe	71.53 $\pm$ 2.76 a	0.46 $\pm$ 0.11 a	1.06 $\pm$ 0.08 ab	0.65 $\pm$ 0.07 a
Brazoria	57.58 $\pm$ 0.78 b	0.18 $\pm$ 0.01 a	0.70 $\pm$ 0.02 b	0.40 $\pm$ 0.01 b
San Antonio	54.4 $\pm$ 2.82 b	0.27 $\pm$ 0.01 a	1.27 $\pm$ 0.07 a	0.42 $\pm$ 0.08 b
Seadrift	42.48 $\pm$ 1.22 c	0.16 $\pm$ 0.01 a	0.73 $\pm$ 0.05 b	0.45 $\pm$ 0.03 b

* Veriler ortalama ($n=9$) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

Tablo 4.19: Haziran ayında 4 farklı bölgeden toplanan aynı türe (Arbequina) ait zeytin ağacı yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşik miktarı *

Zeytin ağacının yetiştirildiği yer	Oleuropein ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Verbaskozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Luteolin 7-O-glukozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)	Luteolin 4'-O-glukozit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ taze yaprak)
Santa Fe	52.99 $\pm$ 1.60 a	0.11 $\pm$ 0.02 bc	0.72 $\pm$ 0.01 a	0.53 $\pm$ 0.01 a
Brazoria	37.29 $\pm$ 1.53 bc	0.08 $\pm$ 0.00 c	0.54 $\pm$ 0.03 b	0.36 $\pm$ 0.02 b
San Antonio	24.45 $\pm$ 0.78 c	0.14 $\pm$ 0.00 b	0.15 $\pm$ 0.01 c	0.08 $\pm$ 0.01 c
Seadrift	48.32 $\pm$ 7.73 ab	0.19 $\pm$ 0.01 a	0.83 $\pm$ 0.07 a	0.57 $\pm$ 0.05 a

* Veriler ortalama ($n=9$) $\pm$ standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

En yüksek oleuropein ve luteolin 4'-O-glukozit miktarlarına 71.53 ve 0.65 µg/mg taze yaprak değerleri ile Şubat ayında Santa Fe'den toplanan örneklerde rastlanmıştır, en yüksek luteolin 7-O-glukozit miktarı ise 1.3 µg/mg taze yaprak değeri ile San Antonio'daki örneklerde gözlenmiştir (Tablo 4.18). Farklı bölgelerden toplanan zeytin yaprağı örnekleri içerisinde, birkaç istisnai durum olarak Haziran ayına girerken yaşanan azalma dışında, verbaskozit seviyelerinde önemli bir farklılık görülmemiştir (Tablo 4.18 ve 4.19).

4.6. ZEYTİN AĞACINA UYGULANAN SU STRESİNİN EKSTRAKT ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Zeytin ağacına uygulanan su stresinin bu ağaçlardan toplanan yapraklardan elde edilen ekstraktlar üzerindeki etkileri, bu ekstraktların sahip oldukları toplam fenolik madde ve toplam aminoasit miktarlarındaki değişimler incelenerek gösterilmiştir.

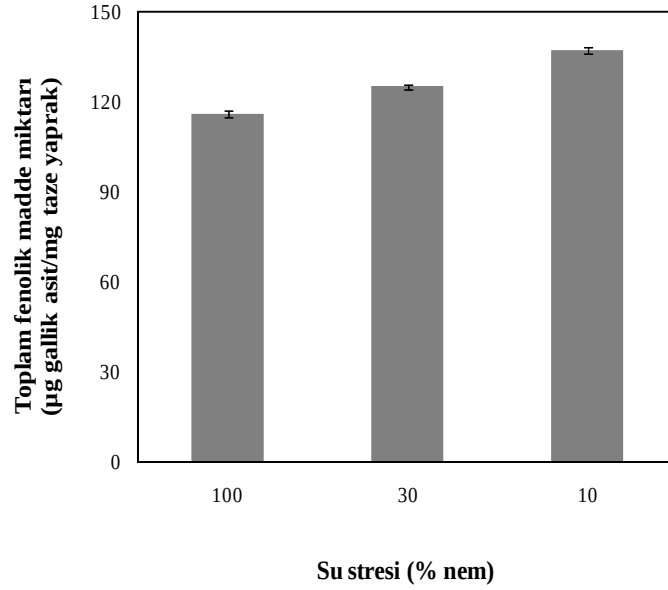
4.6.1. Su Stresinin Toplam Fenolik Madde Miktarına Etkisi

16.6 - 27.8 °C ve 23.7 - 37.4 °C sıcaklık aralıklarında muhafaza edilen ve belirli nem oranlarındayken toplanan, Arbequina zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam fenol miktarı tayininin sonuçları ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları Tablo 4.20'de Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte verilmiş olup, sonuçlara ait grafiksel gösterim ise Şekil 4.21 ve 4.22 ile yapılmıştır.

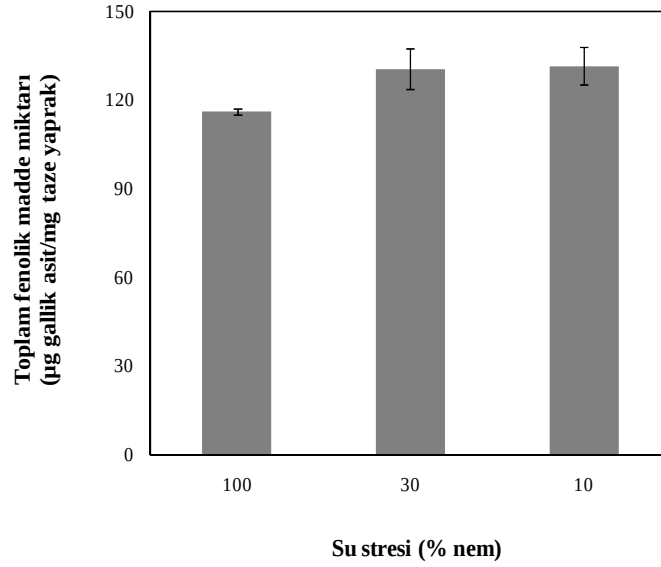
Tablo 4.20: Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *

Sıcaklık (°C)	Su stresi (% nem)	Toplam fenolik madde miktarı (µg galik asit/mg taze yaprak)
16.6 - 27.8	100	116.0 ± 1.00 a
	30	125.0 ± 1.00 ac
	10	137.0 ± 1.00 b
23.7 - 37.4	100	116.0 ± 1.00 a
	30	130.5 ± 7.00 bc
	10	131.5 ± 6.50 bc

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.21: 16.6 - 27.8 °C sıcaklık aralığında Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.



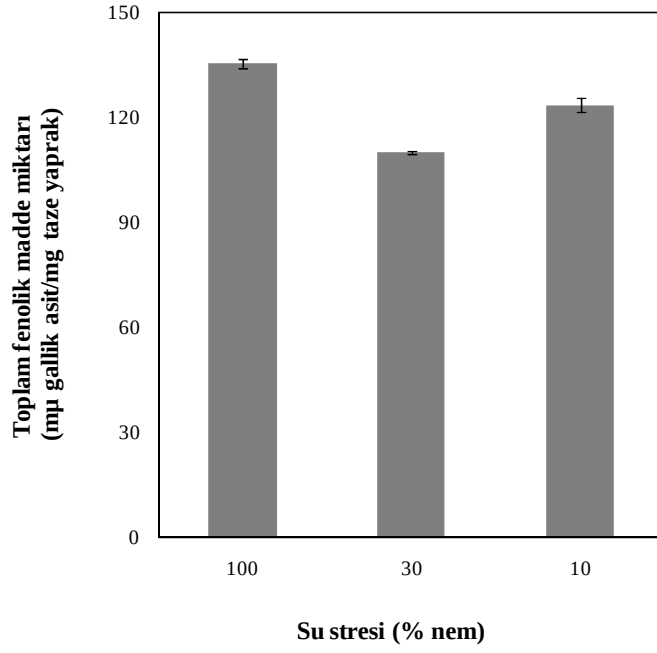
Şekil 4.22: 23.7 - 37.4 °C sıcaklık aralığında Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.

Koroneiki türü zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam fenol miktarı tayininin sonuçları ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları Tablo 4.21’de Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte verilmiş, sonuçlara ait grafiksel gösterim ise Şekil 4.23 ve 4.24 ile yapılmıştır.

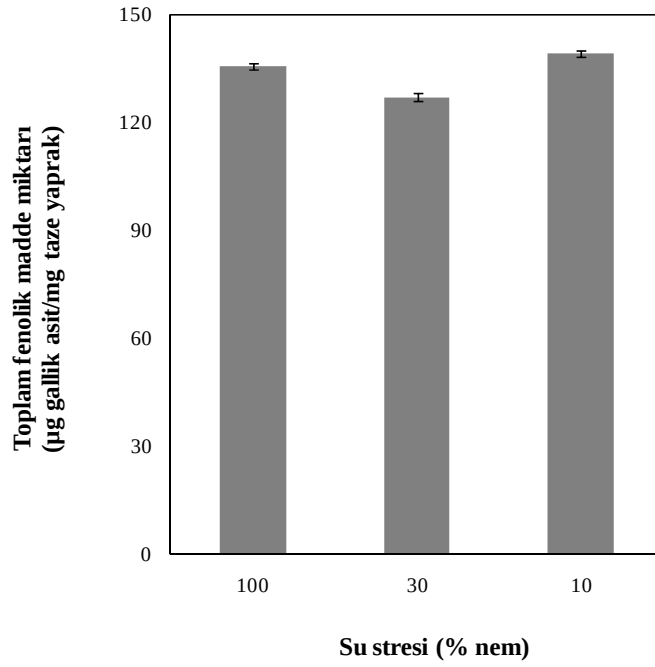
Tablo 4.21: Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *

Sıcaklık (°C)	Su stresi (% nem)	Toplam fenolik madde miktarı (µg galik asit/mg taze yaprak)
16.6 - 27.8	100	135.5 ± 1.50 a
	30	110.0 ± 0.50 b
	10	123.5 ± 2.00 c
23.7 - 37.4	100	135.5 ± 1.00 a
	30	127.0 ± 1.00 d
	10	139.0 ± 1.00 e

* Veriler ortalama ($n=3$) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.23: 16.6 - 27.8 °C sıcaklık aralığında Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.



Şekil 4.24: 23.7 - 37.4 °C sıcaklık aralığında Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam fenol konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.

Su stresine maruz bırakılan zeytin çeşitlerinde kontrol bitkilerine göre toplam fenol konsantrasyonlarının arttığı görülmüştür (Şekil 4.21–4.24). Bu durum bitkilerde bulunan fenolik komponentlerin yüksek sıcaklık, düşük nem, pestisit, UV radyasyonu ve su gibi stres şartlarında bir tepki olarak sentezlenmesi ile açıklanmaktadır [46]. Bu sebepten dolayı su stresinin bitkilerin biyoaktif bileşenleri üzerinde çok büyük bir etkisi bulunmaktadır. Ayrıca su stresi ile beraber bitki içerisindeki fenolik bileşenlerin artması, reaktif oksijen türlerinin artmasına (oksidatif stres) karşı daha yüksek bir antioksidan savunmanın oluşmasına da neden olabilmektedir. Yani elde edilen deneysel sonuçlar daha önce yapılmış olan çalışmalar ile uyumluluk içerisindedir [47, 48]. Düşük sıcaklıktaki Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklarda çok az bir farklılık gözlenmiştir (Şekil 4.23). Stresle beraber ciddi bir düşüş gözlemlenmemesine rağmen, artış da olmamıştır (% 100 nem oranında toplam fenol miktarı 135.5 µg gallik asit/mg taze yaprak iken, bu değer % 10 nem oranında 123.5 µg gallik asit/mg taze yaprak olarak saptanmıştır). Bu durum farklı zeytin ağacı çeşidinin, strese karşı farklı sıcaklıkta vermiş olduğu karakteristik bir tepki olarak yorumlanabilir. Kesin bir yargıya varabilmek için aynı deneysel şartların en az bir kez daha tekkerrür edilmesi ve daha kapsamlı bir çalışmanın yapılması gerekmektedir.

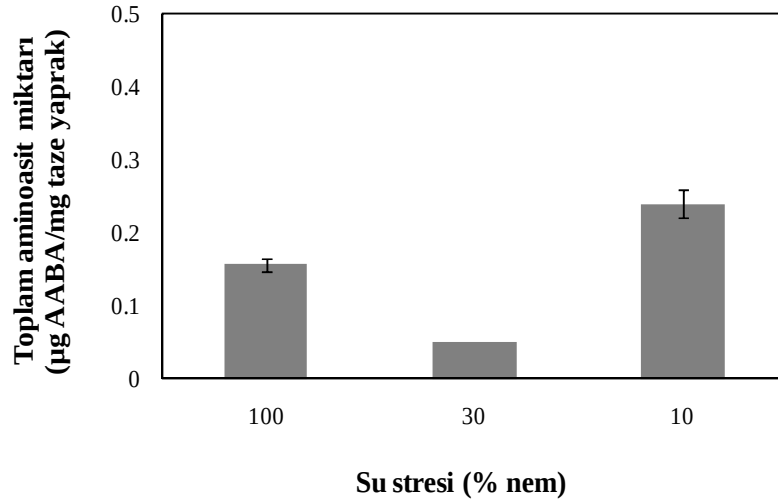
4.6.2. Su Stresinin Toplam Aminoasit Miktarına Etkisi

Belirli nem oranlarındayken toplanan Arbequina türü zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam aminoasit miktarı tayinlerinin sonuçları ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları Tablo 4.22’de Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte verilmiş olup, sonuçlara ait grafiksel gösterim ise Şekil 4.25 ve 4.26 ile yapılmıştır.

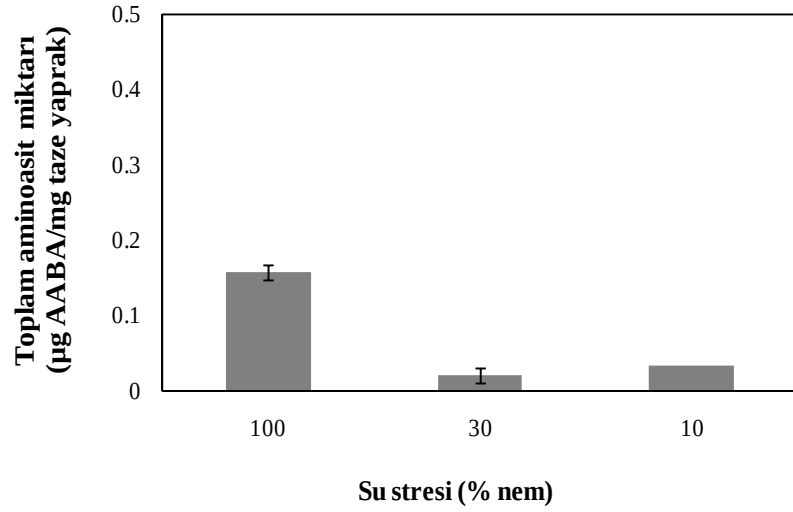
Tablo 4.22: Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *

Sıcaklık (°C)	Su stresi (% nem)	Toplam aminoasit miktarı (µg AABA/mg taze yaprak)
16.6 - 27.8	100	0.156 ± 0.01 a
	30	0.050 ± 0.00 b
	10	0.240 ± 0.02 d
23.7 - 37.4	100	0.156 ± 0.01 a
	30	0.019 ± 0.01 c
	10	0.033 ± 0.00 bc

* Veriler ortalama (n=3) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine (p < 0.05) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.25: 16.6 - 27.8 °C sıcaklık aralığında Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.



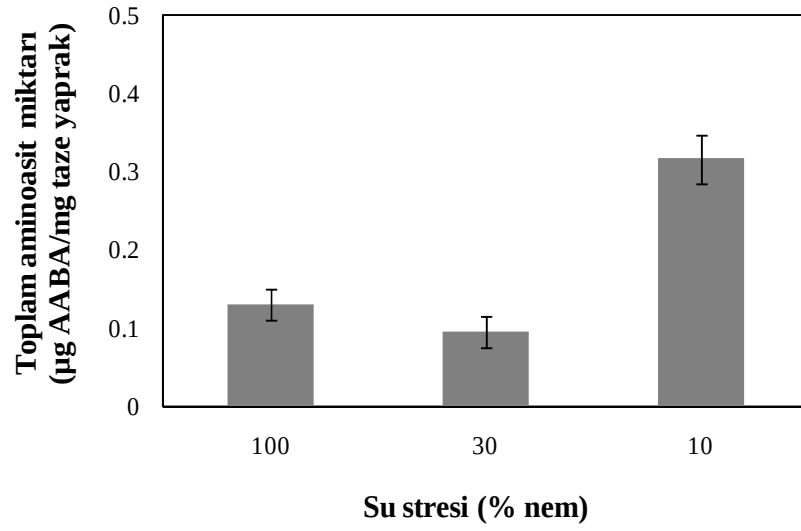
Şekil 4.26: 23.7 - 37.4 °C sıcaklık aralığında Arbequina zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.

Koroneiki türü zeytin ağacı yapraklarından elde edilen ekstraktlarda gerçekleştirilen toplam aminoasit miktarı tayininin sonuçları ve üç tekrarlı ölçümlerin ortalamalarının standart sapmaları Tablo 4.23'te Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılıkları ile birlikte verilmiş olup, sonuçlara ait grafiksel gösterim Şekil 4.27 ve 4.28'te yapılmıştır.

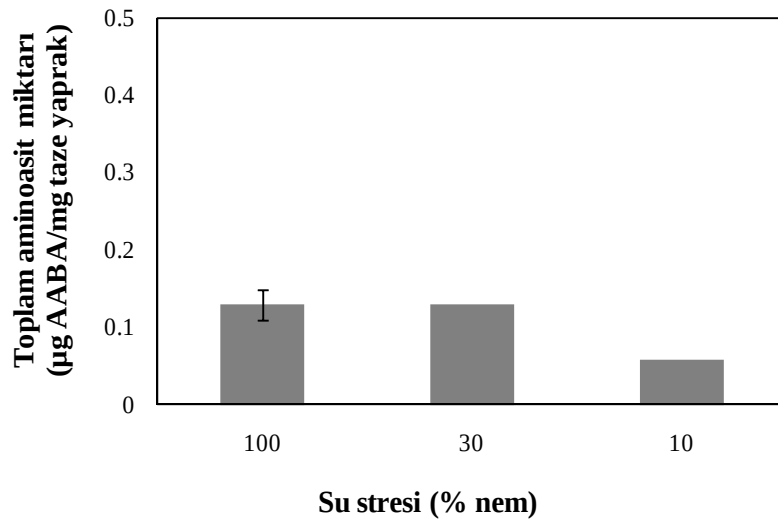
Tablo 4.23: Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi *

Sıcaklık (°C)	Su stresi (% nem)	Toplam aminoasit miktarı (µg AABA/mg taze yaprak)
16.6 - 27.8	100	0.130 ± 0.02 a
	30	0.095 ± 0.02 ab
	10	0.316 ± 0.03 c
23.7 - 37.4	100	0.130 ± 0.02 a
	30	0.130 ± 0.00 a
	10	0.058 ± 0.00 b

* Veriler ortalama ($n=3$) ± standart sapmayı göstermektedir. Aynı sütun içerisinde yer alan farklı harfler Tukey testine ($p < 0.05$) göre istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.



Şekil 4.27: 16.6 - 27.8 °C sıcaklık aralığında Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.



Şekil 4.28: 23.7 - 37.4 °C sıcaklık aralığında Koroneiki zeytin ağacına ait yapraklardaki toplam aminoasit konsantrasyonunun farklı su stresi değerlerindeki değişimi.

Arbequina örneklerinin toplam aminoasit konsantrasyonlarına bakılacak olursa (Şekil 4.25 ve 4.26), düşük sıcaklıkta su stresi ile beraber aminoasit miktarında bir artış yaşandığı söylenebilir. Bu durum su stresi ortamında proteinin degrade olması ile serbest aminoasit oluşturmaları ve aminoasit birikiminin gerçekleşmesi şeklinde açıklanmaktadır [50]. Yüksek sıcaklıkta ise aksi bir durum görülmüştür. Bu da düşük sıcaklığa maruz kalan bitkilerin proteinleri, yağları ve nükleik asitleri degradasyona uğratarak strese karşı bir tepki vermesi durumu olabilir [47]. Aynı trend Koroneiki örneklerinde de gözlemlenmiştir (Şekil 4.27 ve 4.28).

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

- Zeytin yapraklarından fenolik bir madde olan oleuropeinin SC-CO₂ ile ekstraksiyonunda yardımcı çözücü türü ve miktarının verimi oldukça etkilediği görülmüştür.
- SC-CO₂'e 0.25 mL/dak besleme hızında bir metanol takviyesinin bile oleuropein verimini oldukça yükselttiği görülmüştür. Fakat su ve etanolün kullanıldığı sistemlerde belirgin bir verim artışının ancak 1 mL/dak besleme hızında bir ilave ile elde edildiği görülmüştür. Bu sistemlerdeki 0.25 mL/dak besleme hızında bir akışkan modifikasyonunda ise oleuropein verimi istatistiksel olarak önemli derecede farklılaşmayacak şekilde saf CO₂ ile aynı seviyelerde kalmıştır.
- Etil alkol her ne kadar bir bitkisel alkol olarak adlandırılarak, toksik olmaması sebebi ile metanole tercih edilebilir olsa da SC-CO₂ ekstraksiyonunda elde edilen oleuropein verimi metanolün beşte biri kadar bulunmuştur. Sokslet metodunda ise metanollü ekstraktın, etanollü olanın neredeyse 130 katı kadar oleuropein ihtiva ettiği görülmüştür.
- Kurutulmuş zeytin yapraklarından gram başına ekstrakte edilen en yüksek ekstrakt ve oleuropein miktarları ayrı ayrı 383.94 ve 37.55 mg olarak sokslet metodu ile elde edilmiştir. Hem ekstrakt hem de oleuropein açısından en yüksek verim, metanol ile gerçekleştirilmiş olan sokslet yöntemi ile elde edilmiş olsa bile, bu yöntem ve SC-CO₂ ekstraksiyonu arasında genel bir mukayese yapmak pek de mümkün olmamaktadır. Herşeyden önce bir solutenin bir sıvı içerisindeki çözünürlüğü süperkritik bir akışkan içerisindeki çözünürlüğünden daha yüksektir. Bir başka ifade ile süperkritik akışkan demek, süper çözücü demek değildir. Zira süperkritik CO₂ bir sıvı değildir. Sadece yoğunluğu artırıldığında sıvı çözücülere benzemektedir. Zaten süperkritik akışkandaki çözünürlük yoğunluğunun artırılması ile sıvıya yaklaşılmaktadır. Diğer

tarafından, yüksek diffüzyon hızı ve düşük bir viskoziteye sahip olmasının neticesinde kütle iletiminin hızlı bir şekilde gerçekleşmesi ve proses süresinin kısalması, az miktarlarda çözücü tüketimi ve elde edilen ürünün kalitesinin daha yüksek olması gibi [167] üstün yönlerinin olması SC-CO₂ ekstraksiyonu metodunu daha cazip hale getirmektedir. Nitekim sokslet yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz deneyler 1 gün sürmüş olmasına rağmen, SC-CO₂ ekstraksiyonunda bu işlem 2 saatte tamamlanmıştır. Ayrıca 5 g yaprak için sokslet metodunda 125 mL sıvı çözücü kullanılmışken, SC-CO₂ ekstraksiyonu yönteminde CO₂'in devrettiği göz önüne alınırsa, en fazla 60 mL sıvı çözücü harcanmıştır.

- Dolayısıyla kullanılan her yöntemin kendi içinde artısı ve eksiklikleri olacağından, bir yönteme karar verirken amaç ve imkanlar doğrultusunda bir seçim yapılmalıdır. Üretilen ürünün hangi amaçla üretileceği ve modern yöntemler için yeterli alt yapı ve bütçenin olup olmaması gibi durumlar tahlil edilmelidir.
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu için yardımcı çözücü konusunda kesin bir teori bulunmamakla birlikte, seçimde solutinin bağlı bulunduğu katının matrisi ve hedef komponentin (solutenin) özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır [168].
- Elde edilen bulgular, genel olarak zeytin ağacı çeşidinin genetik yapısının yapraktaki fenolik bileşik profilinde önemli farklılıklara yol açtığını göstermiştir. Fakat toplam fenolik madde içeriği açısından tüm türlerin birbirinden çok farklı olmadığı gözlenmiştir.
- Belirli bir fenolik madde elde edilirken uygun zeytin ağacı türünün seçilmesi unutulmamalıdır.
- Fenolik madde seviyesinin sıcak yaz günlerinde azalma eğilimi gösterdiği görülmüştür. Dolayısıyla zeytin ağacı yapraklarından kış mevsiminde örnek alınması daha yüksek oranda fenolik madde elde edilmesini sağlayacaktır.

- Su stresi altında gözlenen fenolik ve aminoasit miktarlarındaki artış bitkiyi sulama programları ve kuraklığa dayanıklı bitki türlerinin belirlenmesi açısından bir değerlendirme parametresi olarak kabul edilebilir.
- Suyun kısıtlı olduğu ya da maliyetinin yüksek olduğu durumlarda bitkinin su stresinden en fazla etkilendiği dönemin bilinmesi yine sulama programı açısından önemlidir.
- Su stresi altındaki bitki sadece daha yüksek fenolik madde ihtiva etmez. Bu durumun bir sonucu olarak bir de daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olur [169]. Bu husus bitkilerden elde edilen ilaçların ve bitkisel/diyet takviye ürünlerinin hazırlanmasında kalite kontrolü açısından son derece önemlidir.
- Su stresi altında daha yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu gözlenen zeytin ağacının, reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu hücre hasarına karşı da bir savunmaya sahip olduğu sonucu çıkarılabilir [170].
- Bu durum, zeytin ağacının kurak iklim koşullarına dayanabilen bir bitki olduğunun da göstergesidir. Başka bir ifadeyle zeytin ağacı verdiği tepkilerle sınırlı sulamaya adapte olabilmektedir.
- Sudan faydalanma ile bağlantılı olarak, su stresine maruz kalan hasattan elde edilen zeytin yağının daha yüksek oranda fenolik bileşene sahip olduğu kabul edilmektedir [48]. Böylece su stresi, hem ürünün duyuşal özellikleri hem de antioksidan kapasitesi üzerinde etkili olmaktadır.
- Küresel ısınmanın yol açtığı mevsimsel değışiklikleri bitki yaşamı, dolayısıyla diğer canlıların yaşamı için de tehlike oluşturmaktadır. Yaprğından çekirdeğıne kadar tümüyle değerli olan zeytin ağacının stres faktörlerine dayanıklılık mekanizmalarının belirlenmesine yönelik temel araştırmaların, çalıştığımız zeytin ağacı türleri dışında, diğer türlere de tüm yönleriyle

uygulanması ve stres faktörlerinden en az etkilenen türlerin belirlenerek bu bilgilerin üreticilerle paylaşılmasının önemi unutulmamalıdır.

- Bitkilerdeki fenolik madde içeriği genetik faktörler ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Yaprığın koyu yeşil, yeşilimsi sarı veya tamamen sarı olması gibi fiziksel durumları içeriğindeki fenolik madde miktarına etki etmektedir. Bu renkler yaprağın olgunluğunun bir ölçüsüdür. Dolayısıyla koyu yeşil olan genç yapraklar daha yüksek oranda oleuropein içermektedir. Yaprığın olgunlaşması ile içeriğindeki ilgili enzimlerin de etkisiyle metabolik dönüşümlerle beraber bu oran düşmektedir.
- Ülkemizin Ege Bölgesinde yetiştirilen Memeli türü zeytin ağacından Ağustos ayında toplanan yapraklar çeşitli yöntemler ve şartlar ile elde edilen ekstraktlar içerisindeki oleuropein içerikleri karşılaştırılmıştır. Gram kuru yaprak başına elde edilen en yüksek oleuropein miktarının 37.55 mg olduğu görülmüştür. Tez çalışmasının ABD’de yürütülen safhasında, Teksas eyaletinin San Antonio şehrinde Haziran ayında toplanan Sevillano ve Picual zeytin ağacı türlerinin yapraklarındaki oleuropein içeriğine yakın olduğu görülmüştür (Gram kuru yaprak başına sırasıyla 37.58 ve 33.82 mg). Hatta 1.31 mg/g kuru yaprak oleuropein içeriği ile Arbasana türü ağaç yapraklarının daha düşük oleuropein içerdiği görülmüştür.
- ABD’de yapılan araştırmada zeytin ağacı türleri içerisinde en yüksek verime gram kuru yaprak başına 296.64 mg oleuropein içeren, Şubat ayında San Antonio şehristen toplanan Leccino türü zeytin ağacı yapraklarında ulaşılmıştır. Bu miktarın ülkemizden toplanan örneklerden elde edilen en yüksek değerin neredeyse 8 katı olmasının muhtemel sebepleri şunlar olabilir:

1. Ülkemizde toplanan yaprağın zeytin ağacının türü Memeli olup Ege Bölgesi’nin Menemen yöresinden temin edilmiştir. ABD’de çalışılan San Felice, Galleaga, Frantoio, Maurino, Leccino, Arbasana, Arbequina, Empeltre, Koroneiki, Taggiasca, Grappolo, Manzanilla, Oueslati, Santa Caterina, Ligurian, Itrana, Pendolino, Sevillano,

Chitoni, Picual, Chemlali, Coratina, Mission, Aglandau ve Nichitskaia türleri ise ABD, Fransa, İspanya, İtalya, Portekiz, Rusya, Tunus ve Yunanistan orijinlidir. Dolayısıyla ekstrakte edilecek yaprakların toplandığı zeytin ağaçlarının farklı tür ve orijinlerden olması içeriğindeki fenolik madde profilini önemli derecede etkilemektedir.

2. Elde edilen bulgulardan örneklerin içeriğindeki oleuropein miktarının coğrafi konuma göre de değiştiği rahatlıkla söylenebilir. Batı Anadolu Bölgesi'nin coğrafi şartları, iklimi, toprağın niteliği, sıcaklık farkları Teksas'ın güneyine benzemediğinden içerikte gözlenen farklılıklar kaçınılmazdır. Nitekim ABD'de çalışılan Arbequina zeytin ağacı türlerinden toplanan yapraklar dahi aynı orijine sahip olmalarına rağmen aynı eyalet içerisinde bulunan farklı şehirlerde birbirinden farklı değerler göstermiştir.
3. Oleuropeinin yaprağın olgunlaşmayla beraber β -glukosidaz enzimi ile bozunarak yapraktaki diğer bileşenleri oluşturması söz konusu olacağından, örnekleri toplama zamanı da son derece önemli hale gelmektedir. Aynı koşullarda yetiştirilen ve aynı ağaçlardan toplanan örneklerde Şubat ayından Haziran ayına geçerken gözlenen fenolik madde miktarındaki azalma, zamanla meydana gelen bu bozunma olayı ile açıklanabilir. Bazı zeytin ağacı türlerinde aksi bir durumun gözlenmiş olması, farklı yaprak türlerinin farklı zamanlarda olgunlaşmasını ve dolayısıyla genetik faktörlerin fenolik profile etkisini göstermektedir. Leccino zeytin ağacı yapraklarının, ülkemiz zeytin ağaçlarından neredeyse 8 kat fazla oleuropein içermesi de yine toplama zamanlarının farklı olmasından kaynaklanabilir (Şubat ayına karşılık Ağustos ayı).
4. Toplanan yaprakların içeriğindeki oleuropein miktarı, hasat zamanına bakılmaksızın renk ve yaş gibi faktörler tarafından da önemli derecede etkilenebilmektedir. Yeşilimsi sarı ve tamamen sarı (dökülme dönemindeki yapraklarda) yapraklar koyu yeşil olanlardan daha az miktarda oleuropein içermektedirler.
5. Yapraklardan ekstrakt elde etmeden önce uygulanan numune hazırlama tekniği de deneysel veriyi etkilemektedir. Şöyle ki, SC-

CO₂ ekstraksiyonu çalışmalarının başında enerji harcamaksızın, maliyetsiz bir şekilde oda temperaturünde kurutma yöntemine başvurulmuştur. Yapraklar kurutulduktan sonra karanlık ve kapalı bir ortamda saklanmış ve ekstraksiyona başlarken dallarından temizlenerek mutfak tipi bir robot ile ufalanmışlardır. Çalışmanın fenolik profilin incelendiği aşamasında ise örnekler toplandıktan hemen sonra soğutucu içerisinde muhafaza edilmiştir. Nitrojen ortamında, havan ve tokmak ile öğütülen yaprak örnekleri ekstrakte edilene kadar -80 °C’de derin dondurucu içerisinde tutulmuştur. Burada boyut küçültürken numunenin sıvı azot ile dondurulması muhtemel bir ısınmayı önlemiş ve termal ve oksidatif bozunmaların önüne geçmiştir.

6. Ayrıca dondurarak öğütme parçacık büyüklüğü dağılımını mümkün olduğunca dar sınırlar içerisinde tutmakta yani homojenlik sağlamaktadır. İrili ufaklı parçacıkların olması da ekstraksiyon verimini etkilemektedir.
7. Çözücünün türü, ekstraksiyon süresi, ortamın sıcaklığı ve ekstraksiyon metodu gibi parametreler ekstraktın bileşimini etkilemektedir. Klasik çözücü ekstraksiyonu, sokslet metodu ve süperkritik akışkan ekstraksiyonunun kullanıldığı çalışmalarda oda sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda çalışılmıştır. Bir homojenizatör yardımı ile 28000 rpm gibi çok yüksek devirlerde karıştırma yapılarak kütle iletiminin artırıldığı denemeler ise oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Yani herhangi bir bozunma problemi ile karşılaşmamak için ısınma durumlarından kaçınılmaya çalışılmıştır. Nitekim çok hızlı bir şekilde karıştırmadan dolayı ısınmanın olmaması için 30 saniyelik ekstraksiyon 10 saniyelik periyotlar halinde üç defada tamamlanmıştır.

- Zeytin ürünleri (yaprağı, meyvesi, yağı, dalı ve hatta çekirdeği) içindeki fenolik madde miktarlarının tayin yöntemi de çok önemlidir. Kantitatif analizler için bu çalışmada farklı yöntemlerden faydalanılmıştır. Çalışmanın ilk safhasında oleuropein gibi molekül ağırlığı büyük, polar maddeler için son derece hassas,

kromatografik bir saflaştırmaya ve/veya türevlendirme aşamasına gerek duymayan LC-ESI-MS/MS cihazı kullanılmıştır. Bu yöntemle bir örnek içerisindeki oleuropein analizi 8.5 dakika gibi çok kısa bir sürede tamamlanırken, aynı işlem HPLC ile 45 dakika sürmüştür.

- Dünya nüfusunun büyük çoğunluğunun tıbbi bitkilerden elde edilen ekstratlarla tedavi edildiği ve dünyadaki toplam zeytin ağaçlarının % 10'undan fazlasının ülkemizde olduğu düşünülürse, ülkemizde yetiştirilen bu değerli bitkinin özellikle de farmakolojik etkileri çeşitli araştırmalarla kanıtlanmış olan yapraklarının kendi ülkemizde işlenerek ilaç hammadesi üretiminde kendi endüstrilerimizi kurup kendi sağlık sorunlarımızın çözümü için teşvik edilmesi hatta daha da ileri gidilerek dünya pazarlarına girilmesi ülke ekonomisi açısından büyük katkı sağlayacaktır.
- Yapılan bu çalışmadan çok fazla uzaklaşmadan da elde edilen ekstraktın finansal açıdan önemini anlamak mümkündür. Zira bu tez çalışması sırasında bilimsel maksatla kullanılmak üzere yurt dışından ithal edilen saf oleuropeinin 40 mg'ı için 1050 TL ödenmiştir. Bu kadar az bir miktar için bile katma değer yurt dışında kalmıştır. Bizzat bu durum bile zeytin yaprağının içeriğindeki fenolik bileşenlerin özellikle de oleuropeinin ne kadar değerli olduğu hakkında bir bilgi vermektedir.
- Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular, burada unutulmaması gerekli bir diğer çok önemli hususun, bilim dalları arasındaki iş birliği olduğunu göstermektedir. Kimyagerlerin, kimya mühendislerinin ve ziraat mühendislerinin beraber çalışmasıyla meyvesi, yağı, dalı, kökü ve yaprağı ile çok değerli olan zeytin ağaçlarından sağlıklı beslenme, kozmetik, ilaç ve gıda endüstrileri gibi diğer sanayi kollarına pazar imkanı sağlama, katma değerın yurt içinde kalması ve istihdam imkanı gibi ekonomimiz için önemli alanlarda katkıda bulunulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. VINATORU, M., 2001, An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs, *Ultrasonics Sonochemistry*, 8, 303-313.
2. BENLİ, M., YİĞİT, N., 2005, Ülkemizde Yaygın Kullanımı Olan Kekik (*Thymus vulgaris*) Bitkisinin Antimikrobiyal Aktivitesi, *Or-Lab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(8), 1-8.
3. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, 2008, http://www.tarim.gov.tr/uretim/Bitkisel_Uretim,Aromatik_Tibbi_Bitkiler.html [Ziyaret Tarihi: 15 Mayıs 2010].
4. LE FLOCH, F., TENA, M.T., RIOS, A., VALCARCEL, M., 1998, Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves, *Talanta*, 46 (5), 1123-1130.
5. DIMITRIOUS, B., 2006, Sources of natural phenolic antioxidants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (9), 505-512.
6. LUENGTHANAPHOL, S., MONGKHOLKHAJORN SILP, D., DOUGLAS, S., DOUGLAS, P. L., PENG SOPA, L., PONG AMPHAI, S., 2004, Extraction of antioxidants from sweet Thai tamarind seed coat-preliminary experiments, *Journal of Food Engineering*, 63 (3), 247-252.
7. TENA, M. T., VALCÀRCEL, M., HIDALGO, P. J., UBERA, J. L., 1997, Supercritical fluid extraction of natural antioxidants from rosemary: comparison with liquid solvent sonication, *Analytical Chemistry*, 69 (3), 521-526.

8. GRIGONIS, D., VENSKUTONIS, P. R., SIVIK, B., SANDAHL, M., ESKILSSON, C. S., 2005, Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloë odorata*), *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (3), 223-233.

9. VÁGI, E., SIMÁNDI, B., VÁSÁRHELYINÉ, K. P., DAOOD, H., KÉRY, Á., DOLESCHALL, F., NAGY, B., 2007, Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products, *The Journal of Supercritical Fluids*, 40 (2), 218-226.

10. ALTIOK, E., BAYÇIN, D., BAYRAKTAR, O., ÜLKÜ, S., 2008, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea Europaea L.*) by adsorption on silk fibroin, *Separation and Purification Technology*, 62 (2), 342-348.

11. PESCHEL, W., SÁNCHEZ-RABANEDA, F., DIEKMANN, W., PLESCHER, A., GARTZÍA, I., JIMÉNEZ, D., LAMUELA-RAVENTÓS, R., BUXADERAS, S., CODINA, C., 2006, An Industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chemistry*, 97 (1), 137-150.

12. BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chemistry*, 99 (1), 191-203.

13. GÖKALP, N., 2006, Doğal antioksidanlar, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

14. HAYOUNI, E. A., ABEDRABBA, M., BOUIX, M., HAMDI, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts, *Food Chemistry*, 105 (3), 1126-1134.

15. HERRERO, M., MENDIOLA, J. A., CIFUENTES, A., IBÁÑEZ, 2010, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *Journal of Chromatography A*, 1217 (16), 2495-2511.
16. REVERCHON, E., DE MARCO, I., 2006, Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *The Journal of Supercritical Fluids*, 38 (2), 146-166.
17. YAMINI, Y., ASGHARI-KHIAVI, M., BAHRAMIFAR, N., 2002, Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets, *Talanta*, 58 (5), 1003-1010.
18. SAHENA, F., ZAIDUL, I. S. M., JINAP, S., KARIM, A. A., ABBAS, K. A., NORULAINI, N. A. N., OMAR, A. K. M., 2009, Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review, *Journal of Food Engineering*, 95 (2), 240-253.
19. LEHOTAY, S. J., 1997, Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, Review, *Journal of Chromatography A*, 785 (1-2), 289-312.
20. ÖZCAN, A., ÖZCAN, A. S., 2004, Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the quantification of hydrocarbons from *Euphorbia macroclada*, *Talanta*, 64 (2), 491-495.
21. MICHIELIN, E. M. Z., BRESCIANI, L. F. V., DANIELSKI, L., YUNES, R. A., FERREIRA, S. R. S., 2005, Composition profile of horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin: comparing SFE and organic solvents extraction, *The Journal of Supercritical Fluids*, 33 (2), 131-138.
22. CASAS, L., MANTELL, C., RODRIGUEZ, M., TORRES, A., MACIAS, F. A., DE LA OSSA, E. M., 2007, Effect of the addition of cosolvent on the

- supercritical fluid extraction of bioactive compounds from *Helianthus annuus* L., *The Journal of Supercritical Fluids*, 41 (1), 43-49.
23. MURGA, R., SANZ, T. S., BELTRÀN, S., CABEZAS, J. L., 2002, Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 23 (2), 113-121.
 24. HAMBURGER, M., BAUMANN, D., ADLER, S., 2004, Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Selected Medicinal Plants - Effects of High Pressure and Added Ethanol on Yield of Extracted Substances, *Phytochemical Analysis*, 15 (1), 46-54.
 25. YANG, C., XU, Y., YAO, W., 2002, Extraction of Pharmaceutical Components from *Ginkgo biloba* Leaves Using Supercritical Carbon Dioxide, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4), 846-849.
 26. ROSTAGNO, M. A., ARAÚJO, J. M. A., SANDI, D., 2002, Supercritical fluid extraction of isoflavones from soybean flour, *Food Chemistry*, 78 (1), 111-117.
 27. HSU, R. C., LIN, B. H., CHEN, C. W., 2001, The Study of Supercritical Carbon Dioxide Extraction for *Ganoderma Lucidum*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40 (20), 4478-4481.
 28. LANG, Q., WAI, C. M., 2001, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies – a practical review, *Talanta*, 53 (4), 771-782.
 29. RAVENTÓS, M., DUARTE, S., ALARCÓN, R., 2002, Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview, *Food Science and Technology International*, 8 (5), 269-284.
 30. LUQUE DE CASTRO, M.D., JIMENEZ-CARMONA, M.M., 2000, Where is Supercritical Fluid Extraction Going?, *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (4), 223-228.

31. ZOUGAGH, M., VALCARCEL, M., RIOS, A., 2004, Supercritical Fluid Extraction: a critical review of its analytical usefulness, *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (5), 399-405.
32. MYLONAKI, S., KIASOS, E., MAKRIS, D. P., KEFALAS, P., 2008, Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392 (5), 977-985.
33. GUINDA, À, 2006, Use of solid residue from the olive industry, *Grasas Y Aceites*, 57 (1), 107-115.
34. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2007, Small Branches of Olive Tree: A Source of Biophenols Complementary to Olive Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (11), 4584-4588.
35. TABERA, J., GUINDA, Á., RUIZ-RODRÍGUEZ, A., SEÑORÁNS, F. J., IBÁÑEZ, E., ALBI, T., REGLERO, G., 2004, Countercurrent Supercritical Fluid Extraction and Fractionation of High-Added-Value Compounds from a Hexane Extract of Olive Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), 4774-4779.
36. BOUDHRIOUA, N., BAHLOUL, N., SLIMEN, I. B., KECHAOU, N., 2009, Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, *Industrial Crops and Products*, 29 (2-3), 412-419.
37. BOUAZIZ, M., SAYADI, S., 2005, Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of a Tunisian cultivar olive tree, *European Journal of Lipid Science Technology*, 107 (7-8), 497-504.
38. EL, N. S.; KARAKAYA, S., 2009, Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67 (11), 632-638.

39. MALIK, N. S. A., BRADFORD, J. M., 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives, *Scientia Horticulturae*, 110 (3), 274-278.
40. PAPOTI, V. T., TSIMIDOU, M. Z., 2009, Impact of Sampling Parameters on the Radical Scavenging Potential of Olive (*Olea europaea* L.) Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9), 3470-3477.
41. ESTI, M., CINQUANTA, L., NOTTE, E. L., 1998, Phenolic Compounds in Different Olive Varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1), 32-35.
42. VINHA, A., F., FERRERES, F., SILVA, B., M., VALENTÃO, P., GONÇALVES, A., PEREIRA, J., A., OLIVEIRA, M., B., SEABRA, R., M., ANDRADE, P., B., 2005, Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin, *Food Chemistry*, 89 (4), 561-568.
43. BRIANTE, R., PATUMI, M., LIMONGELLI, S., FEBBRAIO, F., VACCARO, C., SALLE, A. D., CARA, F. L., NUCCI, R., 2002, Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L., *Plant Science*, 162 (5), 791-798.
44. ROMANI, A., MULINACCI, N.; PINELLI, P.; VINCIERI, F. F.; CIMATO, A., 1999, Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 964-967.
45. DICHIO, B., XILOYANNIS, C., SOFO, A., MONTANARO, G., 2006, Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering, *Tree Physiology*, 26 (2), 179-185.

46. XILOYANNIS, C., DICHIO, B., NUZZO, V., CELANODEFENCE, G., 1999, Defence strategies of olive against water stress, *Acta Horticulturae*, 474, 423-426.
47. ABREU, I. N, MAZZAFERA, P., 2005, Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (3), 241–248.
48. TOVAR, M. J., MOTILVA, M. J., ROMERO, M. P., 2001, Changes in the Phenolic Composition of Virgin Olive Oil from Young Trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) Grown under Linear Irrigation Strategies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5502-5508.
49. ESTIARTE, M., FILELLA, I., SERRA, J., PEÑUELAS, J., 1994, Effects of nutrient and water stress on leaf phenolic content of peppers and susceptibility to generalist herbivore *Helicoverpa armigera* (Hubner), *Oecologia*, 99 (3-4), 387–391.
50. SANO, M., KAWASHIMA, N., 1982, Water Stress Induced Proline Accumulation at Different Stalk Positions and Growth Stages of Detached Tobacco Leaves, *Agricultural and Biological Chemistry*, 46, 647–653.
51. RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
52. DILLARD, C. J., GERMAN, J. B., 2000, Phytochemicals: nutraceuticals and human health – Review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (1), 1744-1756.
53. BAŞER, K. H. C., 2004, Fonksiyonel Gıdalar ve Nutrasötikler, 14. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 29-31 Mayıs 2002, Eskişehir, 31-44.

54. RYAN, D., ANTOLOVICH, M., PRENZLER, P., ROBARDS, K., LAVEE, S., 2002, Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L., *Scientia Horticulturae*, 92 (2), 147-176.
55. VERMERRIS, W., NICHOLSON, K., 2006, *Phenolic Compounds and Their Effects on Human Health*, Springer Netherlands, 235-255.
56. VINSON, J. A., DABBAGH, Y. A., SERRY, M. M., JANG, J., 1995, Plant Flavonoids, Especially Tea Flavonols, are Powerful Antioxidants Using An in Vitro Oxidation Model for Heart Disease, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (11), 2800–2802.
57. HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., BOBILYA, D. J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572-584.
58. LEE, O., LEE, B., LEE, J., LEE, H., SON, J., PARK, C., SHETTY, K., KIM, Y., 2009, Assessment of phenolics–enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities, *Bioresource Technology*, 100 (23), 6107-6113.
59. MARTINEZ, J. L., 2007, *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, CRC Press, Taylor & Francis Group, 275-293.
60. ÇİMEN, M. B. Y., 1999, Flavonoidler ve Antioksidan Özellikleri, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 19 (5), 296-304.
61. Habibi Health Resources, 2002, <http://www.drhabibi.com/info.asp?id=21> [Ziyaret Tarihi: 28 Aralık 2010].
62. BUETTNER, G. R, JURKIEWICZ, B. A., 1996, Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid, *Radiation Research*, 145, 532-541.

63. HANSEN, M., VERITY, A., *Olive Leaf Extract-Potent Antibacterial, Antiviral and Antifungal Agent*, <http://www.69rpm.com/images/oliveleafbookletforfree.pdf> [Ziyaret tarihi: 16 Kasm 2010].
64. RITCHASON, J., 1999, *Olive Leaf Extract*, Woodland Publishing, Inc.
65. BURT, S., 2004, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *International Journal of Food Microbiology*, 94 (3), 223-253.
66. BRAUN, L., COHEN, M., 2007, *Herbs and Natural Supplements, An Evidence-Based Guide*, Churchill Livingstone, Elsevier Australia, 892.
67. ÜNSAL, A., 2000, *.Ölmez Ağacın Peşinde – Türkiye’ de Zeytin ve Zeytinyağı*, Yapı Kredi Yayınları.
68. BOYNUDELİK, M., BOYNUDELİK, Z. İ., 2007, *Zeytin Kitabı – Zeytinden Zeytinyağına*, Oğlak Yayıncılık ve Reklamcılık Ltd. Şti.
69. Wildman, R. E. C., 2007, *Hand Book of Nutraceuticals and Functional Foods*, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL USA, 297.
70. BÜLBÜL, E., 2008, *Her Yönüyle Zeytincilik*, İnkılâp Kitapevi.
71. KOMAKI, E., YAMAGUCHI, S., MARU, I., KINOSHITA, M., KAKEHI, K., OHTA, Y., TSUKADA, Y., 2003, Identification of Anti- α -Amylase Components from Olive Leaf Extracts, *Food Science and Technology Research*, 9 (1), 35-39.
72. MORELLÓ, J. R., ROMERO, M., P., RAMO, T., MOTILVA, M., J, 2005, Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time, *Plant Science*, 168 (1), 6-72.

73. BEDESTENCİ, H. Ç., VURUŞ, H., 2000, Türkiye’ de Zeytin Üretimi ve Geleceği, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 3 (2), 136-144.
74. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü, 2006, <http://www.zae.gov.tr/ekonomi/1.asp>. [Ziyaret Tarihi: 18 Nisan 2010].
75. PEREIRA, A., P., FERREIRA, I., C.F.R., MARCELINO, F., VALENTÃO, P., ANDRADE, P.,B., SEABRA, R., ESTEVINHO, L., BENTO, A., PEREIRA, J., A., 2007, Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves, *Molecules*, 12, 1153-1162.
76. Ana Gıda, 2009, <http://www.komilizeytinyagi.com.tr/komili/anasayfa/tarih%20ve%20kultur/dunyada.aspx?ContentID=273&NodeID=273> [Ziyaret Tarihi: 23 Mart 2010].
77. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 2006-2010, <http://www.agri.ankara.edu.tr/bahce/pratikbilgiler/meyve/zeytin/ekonomi.htm> [Ziyaret Tarihi: 25 Aralık 2009].
78. LUQUE DE CASTRO, M. D., JAPÓN-LUJÁN, R., 2006, State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives, *Trends in Analytical Chemistry*, 25 (5), 501-510.
79. SAVARESE, M., DE MARCO, E., SACCHI, R., 2007, Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry, *Food Chemistry*, 105 (2), 761-770.
80. RYAN, D., ROBARDS, K., LAVÉE, S., 1999, Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 832 (1-2), 87-96.
81. RANALLI, A., CONTENTO, S., LUCERA, L., DI FEBBO, M., MARCHEGIANI, D., DI FONZO, V., 2006, Factors Affecting the Contents of

- Iridoid Oleuropein in Olive Leaves (*Olea europaea* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (2), 434-440.
82. NIKOLAOUMAVRAKIS, T., 2009, Exploitation of Bioactive Constituents of Olive Leaves, Grape Pomace, Olive Mill Waste Water and Their Applications in Phytoprotection, Thesis (PhD). Cranfield University.
83. JAPÓN-LUJÁN, R., CAPOTE, F. P., MARINAS, A., LUQUE DE CASTRO, M. D., 2008, Liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring for optimal selection of transitions to evaluate nutraceuticals from olive-tree materials, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22 (6), 855-864.
84. BENAVENTE-GARCÍA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUÑO, A., DEL RIO, J. A., 2000, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves, *Food Chemistry*, 68 (4), 457-462.
85. LAGUERRE, M., GIRALDO, L. J. L., PIOMBO, G., FIGUEROA-ESPINOZA, M. C., PINA, M., BENAÏSSA, M., COMBE, A., CASTERA, A. R., LECOMTE, J., VILLENEUVE, P., 2009, Characterization of Olive-Leaf Phenolics by ESI-MS and Evaluation of their Antioxidant Capacities by the CAT Assay, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86 (12), 1215-1225.
86. DEL RÍO, J. A., BÀIDEZ, A. G., BOTÍA, J. M., ORTUÑO, A., 2003, Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp., *Food Chemistry*, 83 (1), 75-78.
87. SOUSA, A., FERREIRA, I. C. F. R., CALHELHA, R., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., SEABRA, R., ESTEVINHO, L., BENTO, A., PEREIRA, J.

- A., 2006, Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives “alcaparra”, *Biorganic and Medicinal Chemistry*, 14 (24), 8533-8538.
88. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2008, Liquid-Liquid Extraction for the Enrichment of Edible Oils with Phenols from Olive Leaf Extracts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (7), 2505-2511.
89. JAPÓN-LUJÁN, R., JANEIRO, P., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2008, Solid-Liquid Transfer of Biophenols from Olive Leaves for the Enrichment of Edible Oils by a Dynamic Ultrasound-Assisted Approach, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (16), 7231-7235.
90. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2006, Multivariate optimization of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 753-759.
91. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE DE CASTRO, M.D., 2006, Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Journal of Chromatography A*, 1136 (2), 185-191.
92. SILVA, S., GOMES, L., LEITÃO, F., COELHO, A.V., BOAS, L. V., 2006, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves, *Food Science and Technology International*, 12 (5), 385-396.
93. GUINDA, À., ALBI, T., PÉREZ-CAMINO, M. C., LANZÓN, A., 2004, Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (*Olea europaea*), *European Journal of Lipid Science Technology*, 106 (1), 22-26.
94. CRUESS, W. V., ALSBERG, C. L., 1934, The Bitter Glucoside of the Olive, *A Contribution from the Food Research Institute, Stanford University, and the Agricultural Experiment Station, University of California*, 56 (10), 2115-2117.

95. NENADIS, N., VERVOORT, J., BOEREN, S., TSIMIDOU, M. Z., 2007, *Syringa oblata* Lindl var. *alba* as a source of oleuropein and related compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (1), 160-166.
96. ROMANI, A., PINELLI, P., MULINACCI, N., VINCIERI, F. F., GRAVANO, E., TATTINI, M., 2000, HPLC Analysis of Flavonoids and Secoiridoids in Leaves of *Ligustrum vulgare* L. (Oleaceae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (9), 4091-4096.
97. DE NINO, A., LOMBARDO, N., PERRI, E., PROCOPIO, A., RAFFAELLI, A., SINDONA, G., 1997, Direct Identification of Phenolic Glucosides from Olive Leaf Extracts by Atmospheric Pressure Ionization Tandem Mass Spectrometry, *Journal Of Mass Spectrometry*, 32 (5), 533-541.
98. BRIANTE, R., LA CARA, F., FEBBRAIO, F., PATUMI, M., NUCCI, R., 2002, Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts, *Journal of Biotechnology*, 93 (2), 109-119.
99. Chemblink, 2010, <http://www.chemblink.com/products/32619-42-4.htm> [Ziyaret Tarihi: 30 Aralık 2010].
100. SOLAR-RIVAS, C., ESPÍN, J. C., WICHES, H. J., 2000, Oleuropein and related compounds-Review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1013-1023.
101. Chemblink, 2010, <http://www.chemblink.com/products/61276-17-3.htm> [Ziyaret Tarihi: 30 Aralık 2010].
102. LIAKOPOULOS, G., STAVRIANAKOU, S., KARABOURNIOTIS, G., 2006, Trichome layers versus dehaired lamina of *Olea europaea* leaves: differences in flavonoid distribution, UV-absorbing capacity, and wax yield, *Environmental and Experimental Botany*, 55 (3), 294-304.

103. Chemblink, 2010, <http://www.chemblink.com/products/5373-11-5.htm> [Ziyaret Tarihi: 30 Aralık 2010].
104. Luteolin.com, 2009, <http://www.luteolin.com> [Ziyaret Tarihi: 20 Aralık 2010].
105. ImmunoBiotics, Inc., 2009, <http://www.immunobiotics.com/pdf/intro/AbstractsofLutiMax.pdf> [Ziyaret Tarihi: 20 Aralık 2010].
106. ChemicalBook, 2008, <http://www.chemicalbook.com/ProdSupplierGWCB1489550.EN.htm> [Ziyaret Tarihi: 30 Aralık 2010].
107. ŞAHİN, S., 2006, *Karboksilli Asitlerin Sulu Çözeltilerinden Ekstraksiyonunda Sıvı Faz Denge Verilerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
108. TREYBALL R.E., 1963, *Mass Transfer Operations*, McGraw-Hill, Inc., New York, 408-409.
109. BROWN, G.G., 1955, *Unit Operations*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 277.
110. TREYBALL, R.E., 1963, *Liquid Extraction*, 2nd Ed., McGraw-Hill, Inc., New York.
111. WANG, L., WELLER, C. L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300-312.
112. DE CASTRO, M. D. L., GARCÍA-AYUSO, L. E., 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica Chimica Acta*, 369 (1-2), 1-10.

113. Mc HUGH, M., KRUKONIS, J., V., 1994, *Supercritical Fluid Extraction*, Butterworth-Heinemann Publishers, Boston, 17-27.
114. AKGÜN, M., DENİZ, S., BARAN, N., UZUN, N. I., AKGÜN, N. A., DİNÇER, S., 2005, Synthesis of polydimethylsiloxane-*block*-polystyrene-*block*-polydimethylsiloxane via polysiloxane-based macroinitiator in supercritical CO₂, *Polymer International*, 54 (2), 374-380.
115. BARAN, N., DENİZ, S., AKGÜN, M., UZUN, I. N., DİNÇER, S., 2005, Dispersion polymerization of styrene in supercritical carbon dioxide using monofunctional perfluoropolyether and silicone-containing fluoroacrylate stabilizers, *European Polymer Journal*, 41 (5), 1159-1167.
116. MORTIMER, C., E., 1997, *Modern Üniversite Kimyası*, Çağlayan Kitabevi, İstanbul, Cilt 1, 263-264.
117. ÇALIMLI, A., 2003, *Kayısı ve Vişne Suyu Üretimindeki Atıkların Değerlendirilmesi*, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara, 13-18.
118. ŞENSOY, N., D., 2007, *Adaçayı (Salvia Officinalis) Yapraklarından Süperkritik Karbon Dioksit Ekstraksiyonu ile Doğal Antioksidan Eldesi ve Tayini*, Yüksek Lisans Tezi Kimya Mühendisliği, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 23-33.
119. GALİP, F., 2007, *Böğürtlen (Rubus Sp.) Meyvesinin Karbon Dioksit ile Süper Kritik Ekstraksiyonundan Doğal Boyar Madde Eldesi ve Uygulanabilirliği*, Yüksek Lisans Tezi İleri Teknolojiler, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 10-18.
120. DİNÇER, S., ACARALI, N., B., UZUN, İ., N., DENİZ, S., 2007, A Second Option In Special Separation Operations: Supercritical Fluid Processes, Invited Review Paper, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 25(2), 106-128.

121. AKGÜN, N., MESUT, A., 2006, Extraction of Grape Seed by Supercritical Carbon Dioxide, Research Article, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 4, 49-58.
122. University of Leeds, 2010, [http://www.chem.leeds.ac.uk/ People/ CMR/ criticalpics.html](http://www.chem.leeds.ac.uk/People/CMR/criticalpics.html) [Ziyaret Tarihi: 22 Aralık 2010].
123. FAHMY, T. M., PAULAITIS, M. E., JOHNSON, D. M., MCNALLY, M. E. P., 1993, Modifier Effects in the Supercritical Fluid Extraction of Solutes from Clay, Soil, and Plant Materials, *Analytical Chemistry*, 65 (10), 1462-1469.
124. ŞANAL, İ.S., BAYRAKTAR, E., MEHMETOĞLU, Ü., ÇALIMLI, A., 2005, Determination of optimum conditions for SC-(CO₂ + ethanol) extraction of β -carotene from apricot pomace using response surface methodology, *The Journal of Supercritical Fluids*, 34 (3), 331-338.
125. MODEY, W. K., MULHOLLAND, D. A., RAYNOR, M. W., 1996, Analytical Supercritical Fluid Extraction of Natural Products, *Phytochemical Analysis*, 7 (1), 1-15.
126. SEADER, J., D., ERNEST, J., H., 1998, *SEPARATION PROCESS PRINCIPLES*, John Wiley and Sons, Inc, 641.
127. LEE, M. R., LIN, C. Y., LI, Z. G., TSAI, T. F., 2006, Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1120 (1-2), 244-251.
128. MIRA, B., BLASCO, M., BERNA, A., SUBIRATS, S., 1999, Supercritical CO₂ extraction of essential oil from orange peel. Effect of operation conditions on the extract composition, *The Journal of Supercritical Fluids*, 14 (2), 95-104.

129. LUCAS, A. D., OSSA, E., M., D., L., RINCÓN, J., BLANCO, M., A., GRACIA, I., 2002, Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves, *The Journal of Supercritical Fluids*, 22 (3), 221-228.
130. ALEXANDER, W. S., BRUSEWITZ, G. H., MANESS, N. O., 1997, Pecan Oil Recovery and Composition as Affected by Temperature, Pressure, and Supercritical CO₂ Flow Rate, *Journal of Food Science*, 62 (4), 762-766.
131. . HAWTHORNE, S. B., GALY, A. B., SCHMITT, V. O., MILLER, D. J., 1995, Effect of SFE Flow Rate on Extraction Rates: Classifying Sample Extraction Behavior, *Analytical Chemistry*, 67 (15), 2723-2732.
132. SMITH, R. M., 1999, Supercritical fluids in separation science – the dreams, the reality and the future-Review, *Journal of Chromatography A*, 856 (1-2), 83-115.
133. RADCLIFFE, C., MAGUIRE, K., LOCKWOOD, B., 2000, Applications of supercritical fluid extraction and chromatography in forensic science, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43 (1-3), 261-272.
134. PENG, L., JIA, X., WANG, Y., ZHU, H., CHEN, Q., 2010, Ultrasonically Assisted Extraction of Rutin from *Artemisia selengensis* Turcz: Comparison with Conventional Extraction Techniques, *Food Analytical Methods*, 3 (3), 261-268.
135. KAUFMANN, B., CHRISTEN, P., 2002, Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction, *Phytochemical Analysis*, 13 (2), 105-113.
136. YAO, L., JIANG, Y., DATTA, N., SINGANUSONG, R., LIU, X., DUAN, J., RAYMONT, K., LISLE, A., XU, Y., 2004, HPLC analyses of

flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia, *Food Chemistry*, 84 (2), 253-263.

137. WU, Q., WANG, M., SIMON, J. E., 2004, Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds-Review, *Journal of Chromatography B*, 812 (1-2), 325-355.
138. TURGUT, G., 1999, *İnstrümental Analiz*, Gazi Kitapevi, Ankara.
139. LINDSAY, S., 1992, *High Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd., London, UK.
140. MORGAN, C. M., 2004, *Institute Of Biological, Environmental & Rural Sciences, Aberystwyth University, Wales, Uk*, <http://qbab.aber.ac.uk/roy/mss/qtof.htm> [Ziyaret Tarihi: 27 Aralık 2010].
141. ÖZBEK, H., KESKİN, S., 2007, Standart Sapma mı Yoksa Standart Hata mı?, *Van Tıp Dergisi*, 14 (2), 64-67.
142. İstatistik Analiz ®, http://www.istatistikanaliz.com/varyans_analizi.asp [Ziyaret Tarihi: 22 Ekim 2010].
143. SHUICHI, H., 2004, Effect of drying temperature on the oleuropein content of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *Food Preservation Science*, 30 (4), 191-193.
144. MALIK, N. S. A., BRADFORD, J. M., 2008, Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 6 (2), 8-13.
145. BRIANTE, R., PATUMI, M., TERENCEZIANI, S., BISMUTO, E., FEBBRAIO, F., NUCCI, R., 2002, *Olea europaea* L. Leaf Extract and

- Derivatives: Antioxidant Properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (17), 4934-4940.
146. JAPÓN-LUJÁN, R., RUIZ-JIMÉNEZ, J., LUQUE DE CASTRO, M. D., 2006, Discrimination and Classification of Olive Tree Varieties and Cultivation Zones by Biophenol Contents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (26), 9706–9712.
 147. DONNA, L. D., MAZZOTTI, F., NACCARATO, A., SALERNO, R., TAGARELLI, A., TAVERNA, D., SINDONA, G., 2010, Secondary metabolites of *Olea europaea* leaves as markers for the discrimination of cultivars and cultivation zones by multivariate analysis, *Food Chemistry*, 121 (2), 492–496.
 148. SAVOURNIN, C., BAGHDIKIAN, B., ELIAS, R., KESRAOUI, F. D., BOUKEF, K., BALANSARD, G., 2001, Rapid High-Performance Liquid Chromatography Analysis for the Quantitative Determination of Oleuropein in *Olea europaea* Leaves, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 618-621.
 149. MEIRINHOS, J., SILVA, B. M., VALENTÃO, P., SEABRA, R. M., PEREIRA, J. A., DIAS, A., ANDRADE, P. B., FERRERES, F., 2005, Analysis and Quantification of Flavonoidic Compounds from Portuguese Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Cultivars, *Natural Product Research*, 19 (2), 189-195.
 150. HASHEMI, P., DELFAN, B., GHIASVAND, A. R., ALBORZI, M., RAESI, F., 2010, A Study of the Effects of Cultivation Variety, Collection Time, and Climate on the Amount of Oleuropein in Olive Leaves, *Acta Chromatographica*, 22 (1), 133-140.
 151. LEE, O., LEE, B., 2010, Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresource Technology*, 101 (10), 3751-3754.

152. FARAG, R. S., MAHMOUD, E. A., BASUNY, A. M., ALI, R. F. M., 2006, Influence of crude olive leaf juice on rat liver and kidney functions, *International Journal of Food Science and Technology*, 41 (7), 790-798.
153. FARAG, R. S., MAHMOUD, E. A., BASUNY, A. M., ALI, R. F. M., 2007, Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating, *International Journal of Food Science and Technology*, 42 (1), 107-115.
154. LEE-HUANG, S., ZHANG, L., HUANG, P. L., CHANG, Y., HUANG, P. L., 2003, Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307 (4), 1029-1037.
155. SOMOVA, L. I., SHODE, F. O., RAMNANAN, P., NADAR, A., 2003, Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves, *Journal of Ethnopharmacology*, 84 (2-3), 299-305.
156. BOUAZIZ, M., HAMMAMI, H., BOUALLAGUI, Z., JEMAI, H., SAYADI, S., 2008, Production of Antioxidant from Olive Processing By-Products, *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7 (8), 3231-3236.
157. JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRIGUEZ, J. M., LUQUE DE CASTRO, M. D., 2006, Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Journal of Chromatography A*, 1108 (1), 76-82.
158. BAYÇIN, D., ALTIOK, E., ÜLKÜ, S., BAYRAKTAR, O., 2007, Adsorption of Olive Leaf (*Olea europaea* L.) Antioxidants on Silk Fibroin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (4), 1227-1236.

159. ROMERO, M. P., TOVAR, M. J., GIRONA, J., MOTILVA, M. J., 2002, Changes in the HPLC Phenolic Profile of Virgin Olive Oil from Young Trees (*Olea europaea* L. Cv. Arbequina) Grown under Different Deficit Irrigation Strategies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), 5349–5354.
160. TOVAR, M. J., ROMERO, M. P., ALEGRA, S., GIRONA, J., MOTILVA, M. J., 2002, Composition and organoleptic characteristics of oil from Arbequina olive (*Olea europaea* L) trees under deficit irrigation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (15), 1755-1763.
161. PARK, H. S., CHOI, H. K., LEE, S. J., PARK, K. W., CHOI, S. G., KIM, K. H., 2007, Effect of mass transfer on the removal of caffeine from green tea by supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, 42 (2), 205-211.
162. YILDIZ, R., *Aşırı Isıtılmış Su Ortamında Diels-Alder Reaksiyonlarının incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
163. GUTFINGER, T., 1981, Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58 (11), 966–968.
164. GÓMEZ-RICO, A., FREGAPANE, G., SALVADOR, M. D., 2008, Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41 (4), 433-440.
165. The Weather Channel Interactive, Inc. weather.com® Licensed by TRUSTe, 1995-2010, <http://www.weather.com/> [Ziyaret Tarihi: 22 Eylül 2010].
166. SIVAKUMAR, G., BATI, C. B., UCCELLA, N., 2005, HPLC-MS Screening of the Antioxidant Profile of Italian Olive Cultivars. *The Chemistry of Natural Products*, 41 (5), 588–591.

167. AKGÜN, M., AKGÜN, N. A., DİNÇER, S., 2000, Extraction and Modeling of Lavender Flower Essential Oil Using Supercritical Carbon Dioxide, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 39 (2), 473-477.
168. LANGENFELD, J. J., HAWTHORNE, S. B., MILLER, D. J., PAWLISZYN, J., 1994, Role of Modifiers for Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction of Environmental Samples, *Analytical Chemistry*, 66 (6), 909-916.
169. KIRAKOSYAN, A., SEYMOUR, E., KAUFMAN, P. B., WARBER, S., BOLLING, S., CHANG, S. C., 2003, Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (14), 3973-3976.
170. SOFO, A., DICHIO, B., XILOYANNIS, C., MASIA, A., 2004, Antioxidant defences in olive trees during drought stress: changes in activity of some antioxidant enzymes, *Functional Plant Biology*, 32 (1), 45-53.

EKLER

Şekil E.1: Denemelerde kullanılan zeytin ağacı yapraklarının temin edildiği “Sandy Oaks Olive Orchard” isimli zeytin bağı (San Antonio, Teksas).



Şekil E.2: Denemelerde kullanılan Arbequina türü zeytin ağacı yaprakları



Şekil E.3: “United States Department of Agriculture, Research, Education and Economics, Agricultural Research Service (USDA-ARS)” isimli araştırma merkezinin zeytin araştırma serası.



Şekil E.4: Koroneiki ve Arbequina zeytin ağaçlarının muhafaza edildiği, sera içerisinde bulunan iklim odaları.



Şekil E.5: Koroneiki ve Arbequina zeytin ağaçlarının 23.7 - 37.4 °C' de (en düşük - en yüksek) muhafaza edildiği, sera içerisinde bulunan iklim odası.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İstanbul'da doğdum. 1999 yılında Çemberlitaş Kız Lisesi'den mezun olduktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2004 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2005 yılında, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Temel İşlemler ve Termodinamik programında yüksek lisans eğitimime başladım. Yüksek lisans eğitimim süresince sözleşmeli olarak İngilizce öğretmeni olarak ve ardından bir madeni yağ firmasında kimya mühendisi olarak çalıştım. 30 Aralık 2005 tarihinde İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak kabul edildim. 2007 yılında ise yine aynı Anabilim Dalı'nda doktora programına başladım.