

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN YAPRAKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN
EKSTRAKSİYON KİNETİĞİNE KURUTMA YÖNTEMİ
VE PARAMETRELERİNİN ETKİSİ

Melda CEBBAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Danışman

Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ

Eş Danışman

Prof. Dr. Dilek KILIÇ

Şubat, 2024

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİN YAPRAKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN
EKSTRAKSİYON KİNETİĞİNE KURUTMA YÖNTEMİ VE
PARAMETRELERİNİN ETKİSİ**

Melda CEBBAR tarafından hazırlanan tez çalışması 20.02.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Kimya Mühendisliği Programı **YÜKSEK LİSANS** olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Prof. Dr. Dilek KILIÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Rezan DEMİR ÇAKAN, Üye
Gebze Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Halit Eren FİGEN, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi

Danışmanım Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan “Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Kinetiğine Kurutma Yöntemi ve Parametrelerinin Etkisi” başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Melda CEBBAR

İmza



Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FYL-2023-5679” numaralı projesi ile desteklenmiştir.



Aileme
ve
arkadaşlarırma

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim sırasında kendisinden çok şey öğrendiğim, tez çalışmam süresince değerli bilgilerini benden esirgemeyen, manevi desteğini her zaman hissettiğim, her fırsatta bana zaman ayıran, yanına çekinmeden gidebildiğim kendisiyle çalışmaktan büyük onur duyduğum değerli tez danışmanım Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ’e teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, samimiyetiyle yanında kendimi çok iyi hissettiğim çok kıymetli eş danışmanım Prof. Dr. Dilek KILIÇ’a çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca aldığım tüm kararlarda beni destekleyen, tez çalışmam süresince gösterdikleri sabır ile beni bu günlere getiren, tüm sıkıntılara ve sevinçlerime ortak olan hayattaki en büyük şansım sevgili AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmam süresince desteğiyle bana çok yardımcı olan, hedeflerimiz doğrultusunda birbirimizi yüreklendirdiğimiz, çok sevgili canım arkadaşım Dina HAMUR’a ve ayrı ayrı tüm arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK MAM Temiz Enerji Teknolojileri Araştırma Grubuna ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında yardımları için Arş. Gör. Sena Nur KARABEKİROĞLU’na teşekkür ederim.

Tez çalışmamı maddi anlamda destekleyen Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

Melda CEBBAR

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ	ix
KISALTMA LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
TABLO LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xvi
1 GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	5
1.3 Hipotez	5
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Fitokimyasallar	6
2.1.1 Fenolik Bileşikler ve Sağlığa Faydaları	7
2.2 Zeytin Ağacı	11
2.3 Zeytin Yaprağı	13
2.3.1 Zeytin Yaprağındaki Fenolik Bileşikler	14
2.3.2 Zeytin Yaprağının Faydaları	18
2.4 Kurutma İşlemi	21
2.4.1 Gölgede Kurutma	22
2.4.2 Mikrodalga Kurutma	22
2.5 İnce Tabaka Kurutma Modelleri (Kurutmanın Modellenmesi)	25
2.5.1 Teorik Modeller	25
2.5.2 Yarı Teorik Modeller	25
2.5.3 Deneysel Modeller	26
2.5.4 Efektif Difüzyon Katsayısı (D_{eff})	27
2.6 Fenolik Bileşiklere Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri	28
2.6.1 Ultrason Destekli Ekstraksiyon	28
2.7 Ekstraksiyon Kinetiğinin Modellenmesi	31
2.7.1 Peleg Modeli	31
2.7.2 Page Modeli	32
2.7.3 Logaritmik Model	32
2.7.4 Güç Yasası (Power Law) Modeli	32

2.8 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)	32
2.8.1 Deney Tasarımı.....	34
2.8.2 Model Denkleminin Oluşturulması.....	36
2.8.3 Model Uygunluğunun Test Edilmesi	38
2.8.4 Optimizasyon.....	41
2.9 Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar.....	41
3 MALZEME VE YÖNTEM	50
3.1 Malzeme.....	50
3.2 Kullanılan Cihazlar	50
3.3 Yöntemler.....	50
3.3.1 Zeytin Yapraklarının Hazırlanması.....	52
3.3.2 Kurutma Deneyleri.....	52
3.3.3 Ekstraksiyon Deneyleri	54
3.3.4 Toplam Fenolik Bileşen Miktarının Belirlenmesi	54
3.3.5 Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması.....	55
3.3.6 Ekstraksiyon Kinetiğinin Belirlenmesi	56
3.3.7 Ekstraksiyon Deneylerinin Planlanması	56
3.3.8 Box-Behnken Deneysel Tasarım Deneylerinin Yapılışı	57
3.3.9 İstatiksel Analizler	58
3.4 Analizler.....	58
3.4.1 FT-IR Analizi	58
3.4.2 Oleuropein Miktarının Belirlenmesi	58
4 SONUÇ VE ÖNERİLER	59
4.1 Zeytin Yapraklarının Kurutulması.....	59
4.2 Kurutma Kinetiğinin Belirlenmesi	60
4.3 Zeytin Yaprakları için Efektif Difüzyon Katsayısının Belirlenmesi	63
4.4 Fenolik Bileşik Değişiminin FT-IR Spektroskopisi Kullanılarak Belirlenmesi	65
4.5 Zeytin Yapraklarındaki Oleuropein Miktarının Belirlenmesi.....	67
4.6 Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu	68
4.6.1 Kurutma Yöntemi ve Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Bileşen Miktarına Etkisi	68
4.6.2 Mikrodalga Yöntemi ile Farklı Mikrodalga Güçlerinde Kurutulan Zeytin Yapraklarından Toplam Fenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu	73
4.6.3 Taze, Oda Koşullarında ve Mikrodalga da Kurutulan Zeytin Yapraklarından Ekstrakte Edilen Toplam Fenolik Bileşenlerin Miktarının Karşılaştırılması.....	78

4.7 Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Kinetiğinin Belirlenmesi	79
4.8 Zeytin Yapraklarından Toplam Fenolik Bileşen Ekstraksiyonun Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu	81
4.8.1 Deneysel Tasarım Sonuçları.....	81
4.9 Tartışma	89
KAYNAKÇA	93
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR	105



SİMGE LİSTESİ

C_o	Başlangıç Anındaki Fenol Konsantrasyonu
Y	Cevap
$\bar{y}$	Cevapların Ortalaması
N	Deney Sayısı
ε	Deneysel Hata
M_e	Denge Anındaki Nem İçeriği
n	Difüzyon Üssü
$Adj-R^2$	Düzenlenmiş Determinasyon Katsayısı
D_{eff}	Efektif Difüzyon Katsayısı
f	Gerçek Cevap Fonksiyonu
r	Korelasyon Katsayısı
K	Kurutma Sabiti
p	Model Denklemindeki Katsayı Sayısı
M_R	Nem Oranı
K_{p1}	Peleg Hız Sabiti
K_2	Peleg Kapasite Sabiti
R^2	Determinasyon Katsayısı
C_t	t Anındaki Fenol Konsantrasyonu
M_t	t Anındaki Nem İçeriği
M_o	$t=0$ Anındaki Nem İçeriği
$Pred-R^2$	Tahminlenen Determinasyon Katsayısı
L	Ürün Yarı Kalınlığı

KISALTMA LİSTESİ

ANO	Ayarlanabilir Nem Oranı
ANOVA	Varyans Analizi
BHT	Bütil Hidroksi Tolüen
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GHz	Gigahertz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KM	Numunenin İçeriğindeki Kuru Madde Kütlesi
MHz	Megahertz
MS	Ortalama Kare Değerleri
MSE	Hata Karelerinin Ortalama Kare Değeri
MSM	Modelin Ortalama Kare Değeri
RSM	Cevap Yüzey Yöntemi
SE	Standart Hata
SSE	Hata Kareleri Toplamı
SSM	Model Kareleri Toplamı
SST	Toplam Karelerin Toplamı
TE	Trolox Eşdeğeri
TEAC	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi
TFC	Toplam Flavonoid Miktarı
TPC	Toplam Fenolik Bileşen Miktarı
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması [20]	8
Şekil 2.2 Flavonoidlerin kimyasal yapısı [22]	9
Şekil 2.3 Ülkelere göre zeytinlik alan dağılımı [27]	12
Şekil 2.4 Türkiye’de illere göre zeytin ağacı dağılımı [5]	13
Şekil 2.5 (a): zeytin ağacı; (b): zeytin yaprakları; (c): çiçeklenme; (d): olgunlaşmış meyveler, (c): zeytin ağacı gövdesi [29]	13
Şekil 2.6 Oleuropeinin kimyasal yapısı [35]	17
Şekil 2.7 Oleuropeinin faydalı etkileri [37]	17
Şekil 2.8 Oleuropeinin hidrolizi [30]	18
Şekil 2.9 Antioksidan çalışma mekanizması [46]	20
Şekil 2.10 Mikrodalga da ısı aktarımı [55]	23
Şekil 2.11 (a): doğrudan olmayan (b): doğrudan ultrason destekli ekstraksiyon [70]	29
Şekil 2.12 Merkezi kompozit tasarım bölümleri [88]	35
Şekil 2.13 Box-Behnken deney noktalarının kübik şekli [87]	36
Şekil 3.1 (a): taze yaprak; (b): kurutulmuş yaprak	52
Şekil 3.2 (a): ultrason destekli ekstraksiyon işlemi; (b): ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın membran filtrede süzülmesi; (c): numunelerin inkübatörde karıştırılması; (d): UV spektrofotometresi ile absorbans değerinin belirlenmesi	55
Şekil 3.3 Kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.1 Zeytin yapraklarının oda koşulunda kurutulmasında nem oranının kurutma süresi ile değişimi	59
Şekil 4.2 Mikrodalga fırında kurutulan zeytin yapraklarının nem oranının kurutma süresi ile değişimi	60
Şekil 4.3 Oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için elde edilen deneysel verilerin 1. mertebe kinetik modeline (Lewis modeli) uygunluğu	62
Şekil 4.4 Mikrodalga da kurutulan zeytin yaprakları için elde edilen deneysel verilerin 1. mertebe kinetik modeline (Lewis modeli) uygunluğu	63
Şekil 4.5 Oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının $\ln(M_R)$ değerlerinin kurutma süresi ile değişimi	64
Şekil 4.6 Mikrodalga da 180 W, 300 W, 450 W ve 600 W’ta kurutulan zeytin yaprakların $\ln(M_R)$ değerlerinin kurutma süresi ile değişimi	65
Şekil 4.7 Oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde (180 W, 300 W, 450 W, 600 W) kurutulan zeytin yapraklarının FT-IR analiz sonucu	65

Şekil 4.8 Taze yapraklardan toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisi	69
Şekil 4.9 Taze zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisi.....	70
Şekil 4.10 Taze ve oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisinin birlikte gösterimi	72
Şekil 4.11 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının distile suda (%0 etanol oranında) ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri	74
Şekil 4.12 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının %25 etanol içeren etanol-distile su karışımında ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri	74
Şekil 4.13 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının %50 etanol içeren etanol-distile su karışımında ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri	75
Şekil 4.14 Mikrodalga da 180 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi	76
Şekil 4.15 Mikrodalga da 300 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi	76
Şekil 4.16 Mikrodalga da 450 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi	77
Şekil 4.17 Mikrodalga da 600 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi	77
Şekil 4.18 (a): %0 etanol oranı; (b): %25 etanol oranı; (c): %50 etanol oranı ile elde edilen ekstraktlar	79
Şekil 4.19 Deneysel ve tahmini toplam fenolik bileşen miktarlarının karşılaştırılması	87
Şekil 4.20 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve mikrodalga gücü parametrelerinin etkileşiminin etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği.....	89

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Zeytin ağacının taksonomik sınıflandırılması [5]	11
Tablo 2.2 Zeytin yaprağı ekstratındaki fenolik bileşiklerin % miktarları [32]	15
Tablo 2.3 Zeytinin kısımlarına göre içerdiği oleuropein miktarı [34]	16
Tablo 2.4 Zeytin yapraklarındaki fenolik bileşenlerin antioksidan kapasiteleri [32]	20
Tablo 2.5 Newton'un soğuma yasasından türetilen yarı teorik kurutma kinetiği modelleri [63]	26
Tablo 2.6 Fick kanunundan türetilen kurutma kinetiği modelleri [63]	26
Tablo 2.7 Deneysel kurutma kinetiği modelleri [63]	26
Tablo 2.8 Ekstraksiyon kinetiği modelleri [78]	31
Tablo 2.9 Box-Behnken deney planı (3 faktörlü) [87]	36
Tablo 2.10 ANOVA analizindeki istatistiksel terimler	41
Tablo 3.1 Box-Behnken deney tasarımı kullanılan faktörler ve seviyeleri	57
Tablo 3.2 Box-Behnken deneysel tasarım deney seti	57
Tablo 4.1 Kurutma kinetiği modelleri, modeller için elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel veriler	61
Tablo 4.2 Taze, oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan ekstraksiyon kinetiği modelleri ve sabitleri	80
Tablo 4.3 Box-Behnken deney planı ve deneysel sonuçlar	81
Tablo 4.4 Model istatistikleri	82
Tablo 4.5 Önerilen modelin istatistiksel sonuçları	82
Tablo 4.6 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu için elde edilen deneysel tasarım modelinin ANOVA analizi sonucu	83
Tablo 4.7 İndirgenmiş model denklemine ait istatistiksel sonuçlar	84
Tablo 4.8 İndirgenmiş model denklemine ait ANOVA analizi	85
Tablo 4.9 Deneysel ve tahmini toplam fenolik bileşen miktarları	87
Tablo 4.10 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu için optimum koşullar, tahmini (teorik) ve deneysel toplam fenolik bileşen miktarları	88

Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Kinetiğine Kurutma Yöntemi ve Parametrelerinin Etkisi

Melda CEBBAR

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimya Mühendisliği Programı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ

Eş-Danışman: Prof. Dr. Dilek KILIÇ

Zeytin yaprakları (*Olea Oleuropein L.*) yapılarında çok sayıda fenolik bileşen bulundurmalarına rağmen günümüzde pek değerlendirilememektedir. Kolay elde edilebilen, ekonomik değeri olmayan yapraklar kurutularak saklanabilir ve yapılarındaki fenolik bileşikler ile katma değeri yüksek ürünlerin geliştirilmesinde hammadde olarak kullanılabilir. Zeytin yapraklarından ekstrakte edilebilen fenolik bileşiklerin miktarı kurutma ve ekstraksiyon yöntemlerinden etkilenmektedir.

Bu çalışmada, ultrason destekli ekstraksiyon ile zeytin yapraklarından ekstrakte edilen toplam fenolik bileşenlerin miktarına kurutma yöntemlerinin, parametrelerinin ve ekstraksiyon parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Balıkesir ili Edremit ilçesinden temin edilen zeytin yaprakları oda koşullarında ve mikrodalga kurutma yöntemi (180 W-600 W) ile kurutulmuştur. Kurutma kinetiği incelenmiş ve Lewis modelin kurutma davranışını en iyi açıklayan model olduğu tespit edilmiştir.

Kurutmanın zeytin yaprakları yapısındaki oleuropein miktarına etkisini incelemek için, oda koşullarında ve mikrodalga da 180 W, 300 W'ta kurutulan yapraklarda oleuropein tayini gerçekleştirilmiştir. En düşük oleuropein miktarı (7,5 mg/g) oda koşullarında kurutulan yapraklardan, en yüksek (297,4 mg/g) ise mikrodalga da 300 W'ta kurutulan yapraklardan elde edilmiştir.

Taze (kurutulmamış), oda koşullarında kurutulmuş ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde kurutulmuş yaprakların ekstraksiyon işlemi, farklı oranlarda etanol-distile su karışımlarında (0-50 %v/v), 3 saatlik ekstraksiyon süresinde gerçekleştirilmiştir. En düşük toplam fenolik bileşen miktarına (15,11 mg GAE/g kuru yaprak) taze yaprak, %0 etanol oranı ile ulaşılırken en yüksek toplam fenolik bileşen miktarı (41,56 mg GAE/g kuru yaprak) 180 W, %50 etanol oranı ile elde edilmiştir. Gerçekleştirilen modelleme çalışmaları ekstraksiyon kinetiğinin Logaritmik model ile ifade edilebileceğini göstermiştir. Box-Behnken deneysel tasarım metodu ile mikrodalga gücü, etanol oranı ve ekstraksiyon süresi faktörlerinin fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. ANOVA analizine göre güç ve zaman faktörlerinin toplam fenolik bileşen miktarına etkisi lineer terimlerde anlamlı iken, etanol oranının tek başına önemli bir faktör olmadığı kuadratik ve etkileşim terimlerinde etkili olduğu görülmüştür. Optimizasyon işlemi ile maksimum toplam fenolik bileşen miktarına (42,57 mg GAE/g kuru yaprak) 183,61 W, %48,69 etanol oranı ve 2,58 dakika ekstraksiyon süresi ile ulaşılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Zeytin yaprağı, toplam fenolik bileşen miktarı, oleuropein, kinetik modelleme, Box-Behnken tasarımı

Effect of Drying Method and Parameters on the Extraction Kinetics of Phenolic Components from Olive Leaves

Melda CEBBAR

Department of Chemical Engineering

Master of Science Thesis

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem DOĞAN AYDENİZ

Co-supervisor: Prof. Dr. Dilek KILIÇ

Despite containing many phenolic components, olive leaves aren't currently well evaluated. However, these leaves can be dried and used as raw materials for high value-added products. The drying and extraction methods affect the amount of phenolic compounds that can be extracted from olive leaves.

In this study, the effects of drying and extraction parameters on the extraction of phenolic compounds from olive leaves using ultrasound-assisted extraction were examined. Olive leaves were dried under room conditions and by microwave drying method. The drying kinetics were modeled using a Lewis model.

The amount of oleuropein in the leaves was determined for different drying methods. The lowest amount of oleuropein (7.5 mg/g) was obtained from leaves dried under room conditions, while the highest amount (297.4 mg/g) was obtained from leaves dried in the microwave at 300 W.

The extraction was carried out using ethanol-distilled water mixtures (0-50% v/v) over a 3 hour period. The results showed that the lowest total phenolic component amount (15.11 mg GAE/g dry leaf) was obtained from fresh leaves with a 0%

ethanol ratio, while the highest total phenolic component amount (41.56 mg GAE/g dry leaf) was obtained from leaves dried in the microwave at 180 W with a 50% ethanol ratio. The extraction kinetics were modeled using a logarithmic model. The effects of the factors on the extraction of phenolic compounds were examined using the Box-Behnken experimental design method. ANOVA analysis, while power and time factors were significant in linear terms, ethanol ratio was found to be effective in quadratic and interaction terms. The optimization process aimed to achieve the highest possible quantity of the phenolic component. The results revealed that a total of 42.57 mg GAE/g dry leaf could be obtained by utilizing 183.61 W, an ethanol rate of 48.69%, and an extraction time of 2.58 minutes.

Keywords: Olive leaf, total amount of phenolic compounds, oleuropein, kinetic modelling, Box-Behnken design

1.1 Literatür Özeti

Fitokimyasallar, bitkilerde ikincil metabolit faaliyetler sonucu açığa çıkan bitkinin kendine has koku, renk ve tat oluşumunda etkili olan biyoaktif bileşiklerdir. İnsan sağlığına antioksidan, antimikrobiyal ve daha birçok özellikleri ile çok yararlı etkileri bulunmaktadır. İnsanların, beslenme ve sağlık arasındaki ilişkinin daha fazla farkına varması ve teknolojiye gelişmeler ile fitokimyasallara olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Fenolik bileşenler, tanenler, alkaloidler, koferoller, fitosteroller, karotenoidler, terpenoidler, sülförafanlar, tokoferoller, saponinler, izotiyosiyanatlar, kumarinler, terpenler, indoller, sülfidler, flavonoidler, fitöstrojenler yaygın olarak bilinen fitokimyasal bileşiklerdir [1].

Fitokimyasalların en büyük grubunu oluşturan fenolik bileşikler antioksidan, antialerjen, antimutajen, antikanser, antigliserik, antikolesterol, anti-inflamatuar, anti-trombotik, antimikrobiyal, sakinleştirici, kalp ve damar genişletici özelliklere sahip olmaları ile insan sağlığına çok faydalı etkileri olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. İnsan vücudunda üretilen serbest radikaller DNA, yağ ve protein yapısında oksidatif stres oluşturarak hasara neden olmaktadır. Meyve ve sebze tüketilerek bitkilerde bulunan fenolik bileşenlerin insan vücuduna geçmesi ile birçok hastalığın önüne geçilmektedir [2]. Bu sebeple antik dönemlerden beri tıbbi bitkiler sağlığa olan pozitif etkileri nedeniyle ilaç, gıda gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü bu bitkilere yönelik harcamanın her geçen gün arttığını ve şuanda yılda 14 milyar dolar olan bitki pazarının değerinin 2050 senesine kadar 5 trilyon dolardan daha fazla olacağını bildirmektedir. Bu durum insanların daha doğal kaynaklardan beslenme isteği ve buna bağlı olarak fonksiyonel gıdalara olan talebin artmasından kaynaklanmaktadır.

Günümüzde gıda atıkları yakılmakta, hayvan yemi ve gübre olarak kullanılmaktadır. Fenolik bileşikler açısından zengin olan atık ürünlerin (yaprak, posa, sap vb.) değerlendirilerek katma değeri yüksek fonksiyonel gıda, ilaç gibi ürünlerde kullanımını yaygınlaştırmak ümit verici bir yaklaşım olarak görülmektedir. Bu sayede fenolik bileşenler ucuz ve güvenli kaynaklardan elde

edilecek ve günümüzde ekonomik değeri olmayan ama değerli bileşenler içeren atıkların değerlendirilmesi ile ülke ekonomilerine katkı sağlanacaktır [1] [3].

Dünyada 8 milyondan fazla yetiştirilen zeytin ağacı (*Olea Europaea*) en eski kültür bitkilerindendir ve neredeyse %98'i Akdeniz bölgesinde (Türkiye, İspanya, İtalya vb.) bulunmaktadır. İspanya ve Türkiye ise zeytin yetiştiriciliğinde önde gelen ülkelerdendir [4]. Türkiye dünyada zeytin ağacı varlığı bakımından dördüncü, ekim alanı açısından altıncı sırada bulunmaktadır [2]. Zeytin ağacı bir bütün olarak çok değerlidir. Yalnızca zeytin meyvesi değil yan ürün olan yaprak ve dallarıda oldukça kıymetlidir [5]. Hatta yapılan çalışmalarda yaprağın zeytin meyvesi ve zeytin yağına kıyasla daha fazla fenolik bileşik içerdiği tespit edilmiştir [6]. Zeytin yaprakları zeytin meyvelerinin toplanması ve zeytinyağının üretim basamaklarından olan temizleme-harmanlama işlemleri sırasında oluşan bir yan üründür. Hasat sonunda zeytin ağırlığının %10'u kadar zeytin yaprağı elde edilmekte ve zeytin endüstrisinden yıllık yaklaşık 1 milyon ton zeytin yaprağı açığa çıkmaktadır [7]. Türkiye'de ise 330 bin tondan fazla zeytin yaprağı açığa çıkmaktadır [3]. Böylesine kıymetli ve çok miktarda elde edilen yapraklar günümüzde pek değerlendirilmemektedir. Yapraklar hayvan yemi olarak kullanılmakta, gömülmekte ya da budama dalları ile beraber yakılmaktadır [7]. Zeytin yapraklarının yapısında yüzden fazla bileşen bulunmaktadır. Fakat bu bileşenlerin içerisinde en fazla fenolik bileşikler dikkat çekmektedir. Yapısındaki fenolik bileşenler ile zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyal, anti-HIV, antioksidan, hipoglisemik, anti-inflamatuar, anti-aterojenik, anti-karsinojenik, anti-viral, ve nöroprotektif gibi sağlığa faydalı etkileri bulunmaktadır [8]. Geçmiş dönemlerde de ekstraktlar ateş ve sıtma rahatsızlıklarına karşı halk tarafından ilaç olarak kullanılmıştır. Antioksidan, antimikrobiyal özellikleri ile zeytin yaprağı ekstraktları gıda katkı maddesi olarakta kullanılmaktadır [9]. Zeytin yapraklarındaki ana fenolik bileşen ise oleuropeindir hatta araştırmacıların çoğu zeytin yaprağı ekstraktlarının böylesine tedavi edici özelliğinin özellikle oleuropeinden kaynaklandığını belirtmektedirler. Oleuropein antioksidan, antiinflamatuar ve antimikrobiyal etkilere sahiptir. Antioksidan özelliği ile birçok tıbbi işlemde kullanılmaktadır [5]. Zeytin yaprağı ekstraktlarının bu faydalı özellikleri nedeni ile ucuz ve kolay temin edilebilecek atık yaprakların değerlendirilmesi ve ekonomiye kazandırılması oldukça önemlidir. Zeytin

yaprağından elde edilen fenolik bileşen miktarı uygulanan ekstraksiyon yöntemine ve parametelerine (zaman, sıcaklık, çözücü, pH vb.), aynı zamanda ekstraksiyon öncesi uygulanan ön işlemlere bağlı olarak değişebilmektedir [8]. Taze zeytin yaprakları ekstraksiyon işlemine uğramadan önce genellikle kurutularak yapılarındaki su uzaklaştırılmakta böylece enzimatik, kimyasal ve mikrobiyolojik bozulmaların önüne geçilmektedir. Ayrıca hammadde olarak depolanabilmesi için de kurutma işlemi gerçekleştirilmektedir. Kurutma işleminde hem ısı hem kütle aktarımının aynı anda gerçekleşmesinden dolayı süreç karışıktır. Bu nedenle kurutma işleminin modellenmesi oldukça önemlidir. Kurutma aynı zamanda malzemenin ekstrakte edilebilme özelliğini ya da ekstraksiyon verimliliğini de arttırmaktadır. Zeytin yaprakları gibi ürünlerin kurutma kinetiği ince tabaka kurutma modelleri ile tanımlanmaktadır. Bu modeller teorik, yarı teorik ve ampirik modellerdir [10].

Zeytin yapraklarının yapısındaki fenolik bileşenleri daha verimli bir şekilde ekstrakte edebilmek için uygun ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Ekstraksiyon yöntemleri geleneksel ve yeni teknikler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ekstraksiyon yöntemlerinden çoğunlukla beklenen hızlı, ucuz ve basit olmasıdır. Maserasyon gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinde daha fazla çözücüye ve daha çok ekstraksiyon süresine ihtiyaç duyulurken ultrason, mikrodalga destekli vb. yeni ekstraksiyon tekniklerinde daha az çözücüye ve zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Yeni yöntemlerle çözücü miktarının azalmasına bağlı olarak çevre kirliliği de azalmaktadır [5] [8]. Ayrıca maserasyon yöntemi ile daha az fenolik bileşen ekstrakte edilmektedir. Yeşil bir teknik olan ultrason destekli ekstraksiyon ile zaman, sıcaklık ve çözücü tüketiminin azalması ile beraber fenolik bileşenler verimli bir şekilde ekstrakte edilmektedir [11]. Ultrason destekli ekstraksiyon ayrıca bir ekstraksiyon işleminden beklendiği gibi basit, ucuz ve verimli bir yöntemdir. Fenolik bileşen miktarının iyi bir düzeyde elde edilmesi oluşturduğu ultrasonik dalgalardan da kaynaklanmaktadır. Ultrasonik dalgalar bitkilerin hücre duvarlarının parçalanmasını sağlayarak fenolik bileşenlerin çözücüye geçişini hızlandırmaktadır. Ultrason destekli ekstraksiyondan esansiyel yağların ve fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda yaygın olarak yararlanılmaktadır [12]. Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ultrason destekli ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırıldığında ultrason destekli ekstraksiyon çözücü, zaman,

sıcaklık tüketimini azalttığından daha yeşil bir yöntem olarak kabul edilmektedir [11]. Literatürde ultrason destekli ekstraksiyon ile çeşitli bitki materyallerinden fenolik bileşenlerin ekstrakte edildiği çalışmalarda ultrasonun geleneksel yöntemlere kıyasla ekstraksiyon süresini önemli ölçüde azalttığı ve ekstraksiyon verimini arttırdığı ortaya konmuştur [13].

Ekstrakte edilecek bileşen miktarını arttırmak için ekstraksiyon parametrelerinin optimize edilmesi oldukça önemlidir [11]. Ayrıca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilirken kinetik çalışma ile ekstraksiyon kinetiğinin modellenmesi, ekstraksiyon için ihtiyaç duyulan süreyi belirleyerek enerji tüketiminin minimum düzeyde tutulmasını sağlamak açısından oldukça önemlidir [7].

Ekstraksiyon süreçlerinin optimizasyonu deneysel tasarım yöntemi kullanılarak sağlanabilmektedir. Deneysel tasarım yöntemi ile ekstraksiyona parametrelerinin etkisi değerlendirilirken klasik yöntemle kıyasla daha az deney gerçekleştirilir böylelikle zamanda da tasarruf sağlanmış olunur. Deneysel tasarım bağımsız değişkenlerin birbirleri ile etkileşiminin de ortaya konulmasını ve deneysel sonuçların yorumlanmasını basitleştirmektedir [11].

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında fenolik bileşenler açısından zengin olan kolay ve ucuz olarak elde edilebilen zeytin yaprakları oda koşullarında ve mikrodalga da kurutularak fenolik bileşenlerin eldesi için ham madde olarak kullanılmıştır. Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda, ekstraksiyon için daha kısa süre ve daha az çözücü kullanımı gerektirmesi ve daha fazla verim sağlaması nedeni ile ultrasonikasyon yöntemi tercih edilmiştir. Çalışmada mikrodalga da kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, kurutmada kullanılan mikrodalga gücünün ve ekstraksiyon parametrelerinin etkisi Box-Behnken deneysel tasarım planı oluşturularak incelenmiş ve ekstraksiyon prosesinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, kurutma ve ekstraksiyon kinetikleri incelenerek, zeytin yapraklarının kurutma kinetiğini ve zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyon kinetiğini açıklamak için en uygun kinetik modeller belirlenmiştir.

1.2 Tezin Amacı

Bu çalışmada;

- Ülkemizde kolay ve ucuz olarak elde edilebilen zeytin yapraklarını değerlendirerek, ilaç, fonksiyonel gıda vb. katma değeri yüksek ürünlerde kullanılacak fenolik bileşenlerin ekstraksiyonun sağlanması,
- Zeytin yapraklarını farklı kurutma yöntemleri ile kurutarak, kurutma yöntem ve parametrelerinin kurutma kinetiğine etkisini incelemek ve kurutma kinetiğini modellemek,
- Farklı kurutma yöntemlerinin zeytin yapraklarından ekstrakte edilen fenolik bileşenlerdeki oleuropein miktarına etkisini incelemek,
- Farklı kurutma yöntemlerinin parametrelerinin ve ekstraksiyon parametrelerinin (ekstraksiyon süresi, çözücü türü ve oranı) zeytin yapraklarından elde edilebilecek toplam fenolik bileşen miktarına etkisini incelemek ve ekstraksiyon kinetiğini belirlemek,
- Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, kurutmada kullanılan mikrodalga gücünün ve ekstraksiyon parametrelerinin etkisini Box-Behnken deneysel tasarım yöntemini kullanarak incelemek ve maksimum fenolik bileşen miktarı için ekstraksiyon prosesinin optimizasyonunu gerçekleştirmek amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Kurutma yöntemi, ekstraksiyon yöntemi, çözücü türü ve oranı, ekstraksiyon süresi gibi faktörler zeytin yaprağından ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarını etkilemektedir. Kurutma yöntemlerinin ve ekstraksiyon parametrelerinin zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna etkisi belirlenerek maksimum toplam fenolik bileşen eldesi için faktörlerin optimizasyonu gerçekleştirilebilir.

2.1 Fitokimyasallar

Geçmişten günümüze insanlar hastalıkları tedavi etmek amacıyla bitkileri birçok işleminden geçirmişlerdir. Günümüzde teknolojinin gelişmesiyle beraber yeni ilaçlar üretilmiş ve zamanla bu ilaçların neden olduğu yan etkiler ortaya çıkmıştır. Bu zararlı etkiler bilim insanlarını bitkilerin biyoaktif özelliklerinin araştırılmasına yöneltmiştir. Bu yönelim günümüzde reçeteye satılan ilaçların %25'inin bitkilerden elde edilen etken maddelerden oluşmasına katkı sağlamıştır. Biyoaktif bileşiklerden olan fitokimyasallar, bitkilerin ürettiği ve onların sağlık açısından yararlı olmalarını sağlayan, ikincil metabolit faaliyetler sonucunda ortaya çıkan bileşiklerdir. İkincil metabolitler birincil metabolit faaliyetlerin ara ürünleridir. Birincil metabolitin aksine ikincil metabolitin canlının üremesinde ve gelişimde doğrudan etkisi bulunmaz. Bu nedenle ikincil metabolit eksikliğinde canlıda ani ölüm gerçekleşmez. İkincil metabolit olarak ortaya çıkan fitokimyasallar bitkinin kendine has renk, koku ve tat oluşumuna katkı sağlamaktadırlar [4].

Yaygın olarak bilinen fitokimyasal bileşikler, alkaloidler, koferoller, fenolik bileşikler, fitosteroller, karotenoidler, terpenoidler, sülföforanlar, tokoferoller, saponinler, izotiyosiyanatlar, kumarinler, terpenler, indoller, sülfidler, flavonoidler, fitoestrogenler ve tanenlerdir. Fitokimyasallar yüksek antioksidan özelliğe sahiptirler. Hücreyi dış faktörlere karşı korurken bağırsak florasını, pH'ı ve safra asitlerini de düzenlerler. Ayrıca kanser ve tümörü tetikleyen maddelerin oluşumunu da engellemektedirler [1]. Kanser riskinin meyve ve sebze tüketimiyle ilişkisi incelendiğinde, az meyve ve sebze tüketiminin kansere yakalanma riskini iki kat azalttığı görülmüştür [14].

Fitokimyasallar, kanın pıhtılaşmasını ve damar sertliğinin oluşmasını önleyici aynı zamanda kan damarlarını genişletici özelliklere de sahiptirler. Antienflamatuvar, antiaterojen, antimikrobiyal, antiülser, ve dejenatif hastalıkların önüne geçen bir ajan görevi görmektedirler. Bitkileri ise UV ışınlarından korurlar ve ayrıca hücre çeperinin korunmasını sağlamada da oldukça etkilidirler. Fitokimyasalların hastalıkları tedavi edici ya da hastalıkların ortaya çıkmasını önleyici özellikleri,

sağlık giderlerindeki yüksek maaliyetler, hayvansal besinlerin fazla tüketilmesinin sağlığa zarar vermesi ve sağlığın beslenme ile bağlantılı olduğunun bilincine varılması, insanları bu şifalı bitkilerden yararlanma yoluna itmiştir [1] [4]. Bu amaçla kullanılan fitokimyasal bileşikler açısından zengin olan bitkilerin yaklaşık 20 bin civarında olduğu dünya sağlık örgütü tarafından bildirilmiştir [4].

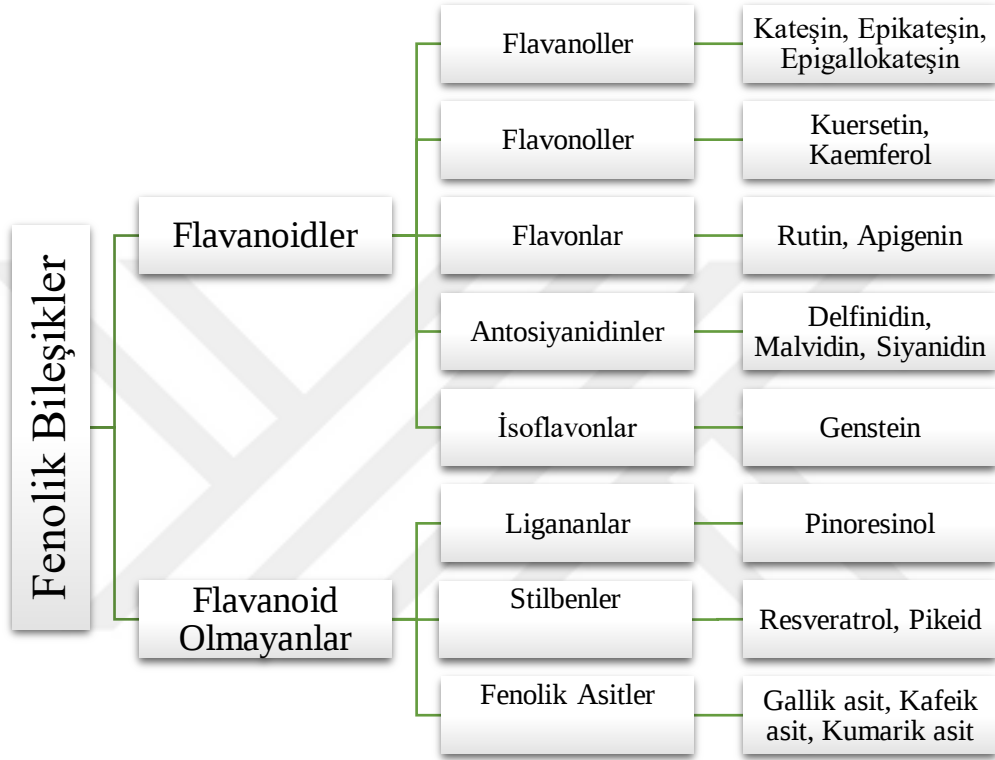
Fitokimyasalların insan sağlığına yeterince faydalı olabilmesi için, hedef dokulara önemli miktarlarda ulaşması gerekmektedir. Laboratuvar ortamında ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalardan alınan veriler bazı fitokimyasalların, yenilebilir bitkisel gıdalardan alınabilecek miktarlarının çok daha üstündeki dozlarda elde edilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir. Bu nedenle biyoaktif bileşenin ekstraksiyonu veya sentezi, insanlar üzerindeki etkilerinin görülebilmesi için gereklidir [14].

2.1.1 Fenolik Bileşikler ve Sağlığa Faydaları

Fenolik bileşikler fitokimyasalların en büyük grubunu oluştururlar [1]. Bitkilerin fotosentez sonucu açığa çıkardığı karbondan üretilmektedirler. Sekonder metabolit faaliyetler sonucunda bitkilerin aromatik aminoasit metabolizması sırasında fenolik bileşikler oluşmaktadır. Benzen halkasına bir tane hidroksil grubun bağlanması ile oluşan fenol formu en basit fenolik bileşik formudur. Diğer fenolik bileşikler fenolden türemiştir [15]. Polifenoller ise her bir molekülde birden fazla fenol yapısının bulunduğu bileşiklerdir. Suda orta düzeyde çözünebilen daha çok alkol eter gibi çözücülerde daha fazla çözünen ve proteinlerle birleşerek tortu oluşturabilen fenolik bileşikler oda koşullarında renksiz sıvı formda veya beyaz katı yapıda olabilmektedir [4] [16]. Bitkiler tarafından oluşturulmuş 30 binden fazla fenolik bileşik bulunmaktadır. Günümüzde bu fenolik maddelerin 5 binden fazlasının yapısı tanımlanabilmiştir. Fenolik bileşikler meyve, tahıl, sebze, baklagil ve çay, kahve gibi bitkisel türevli içeceklerde bulunurlar [17]. Bitkilerde renk, tat ve koku oluşumuna etki ederler [4].

Bitkilerin kuru ağırlığının %0,5-5'ini fenolik bileşikler oluşturmaktadır. Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin miktarı ve niteliksel özellikleri yetiştirme koşullarından, hasat sonrası saklama koşullarından, hasat anındaki olgunluk düzeyinden etkilenmektedir. Olumsuz koşulların (radyasyon, aşırı sıcaklık, parazit vb.) etkisinde olan bitkilerde fenolik bileşiklerin miktarı artabilmektedir [18].

Fenolik bileşikler flavonoidler, fenolik asitler, lignanlar ve stilbenler olarak yapılarındaki fenol halkalarının sayısına ve fenollerini birbirine bağlayan yapılara göre gruplandırılırlar (Şekil 2.1). Flavanoller, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, isoflavonlar, antosiyanidinler halka yapılarının farklılığı, doymamışlık dereceleri arasındaki farklılıklar ile flavonoidler başlığını oluşturmaktadırlar. Flavonoidler bu gruplandırmanın içinde 4000’den fazla olmasıyla en fazla bulunan formudur [19].



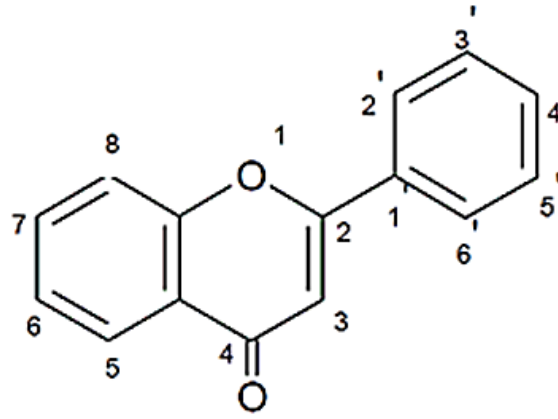
Şekil 2.1 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması [20]

Fenolik bileşikler birçok hastalığın ortaya çıkmasını önlemede ya da var olan hastalıkların iyileştirilmesinde oldukça etkilidirler. Yüksek antioksidan özelliklere sahip olmalarının yanı sıra antimikrobiyal, antialerjik, antikanser, antiviral antienflamatuar, antiobezitik gibi etkileri bulunmakta ve gıda, ilaç, kozmetikte yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Antioksidan özellikleri ile serbest radikallere bağlanarak hücrelerin zarar görmesinin önüne geçerler [19]. Fenol maddelerinin antiseptik olarak kullanışı günümüzde de %1,4 derişiminde oral anestezide kullanılmaktadır. Kozmetik alanında ise güneş kremlerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Fenolün yapısındaki aromatik yapı 280-315 nm aralığındaki UV ışınlarını yapısında tutarak güneşin zararlı etkilerinden korunmayı

sağlamaktadır [16]. Fenolik bileşiklerin türlerine göre insan sağlığına etkileri aşağıda maddeler halinde verilmiştir [21].

- Flavonoidler

Fenolik maddelerin en büyük grubudur. Kimyasal yapısı Şekil 2.2’de gösterildiği gibi iki benzen halkası ile yapısında oksijen bulunan piren halkasının bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Turuncu, yeşil ve kırmızı renk pigmentlerinin oluşumundan sorumludur. Bu nedenle bitkilerin kendilerine has renklerinin oluşmasında etkilidir. Düzenli tüketilmelerinde prostat, kalp hastalıkları ve kanseri önlemede, kılcal damar çatlamaları ve kanamaların durdurulmasında etkili oldukları söylenmektedir.



Şekil 2.2 Flavonoidlerin kimyasal yapısı [22]

- Antosiyaninler

Antosiyanin ortam pH’ına göre meyve sebzelerin mavi, turuncu ve kırmızı renklere sahip olmalarını sağlarlar. Bitkilerin UV ışınlarından korunması, üreme, antioksidan özellik gibi görevlerden sorumludurlar. Yapılan çalışmalar ile antiviral, antioksidan, antienflamatuar, antialerjik, antikanserojenik, antimikrobiyal, antimutajenik etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

- Flavanoller

Flavonoid oluşum sırasında ara ürün olarak çıkarlar. Renksizdirler. Flavanoller üzerine yapılmış bir çalışmada, siyah çaydan elde edilen flavanollerin OH⁻ radikalini %83 oranında ortadan kaldırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca diş eti hastalıklarına neden olan mikroplara karşı antimikrobiyal etkisileri de bulunmaktadır.

- Flavonoller

Flavonoller, flavonun üçüncü karbon atomuna bağlanmış bir hidroksil grubuna sahiptirler. Kaempeferol, fisetin, kuersetin ve mirisetin önemli flavonollerdir. Lahana, soğan ve elmada bulunmaktadır.

- Flavonlar

Flavonoid grubunun ana bileşenidir. Sarı renk verirler. Kas gevşetici ve sakinleştirici özelliklere sahiptirler.

- Flavanonlar

Antioksidan ve antinflamatuar özelliklere sahiptirler. Yumurtalık kanserinin önüne geçmekte etkilidirler.

- Fenolik Asitler

Hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler fenolik asitler grubunu oluşturmaktadır. Hidroksibenzoik asitler C6-C1 fenil metan formunda iken hidroksisinamik asitler C6-C3 fenilpropan formundadırlar. Vanilik, şiringik ve gallik asit hidroksibenzoik asitlere örnek olarak gösterilirken kafeik, ferulik ve sinapik asitler ise hidroksisinamik asitlere örnek olarak verilebilir. Genellikle lezzet ajanı olarak kullanılan vanilik asit bu özelliği dışında pıhtılaşma önleme, antimikrobiyal, antienflamatuar etkilere de sahiptir. Gıda, kozmetik ve ilaç sektöründe çok sık kullanılan gallik asitin antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Şiringik asitin ise metal şelatlayıcı ajan, antioksidan özellik gösterme ve kronik karaciğer rahatsızlığında hepatit fibrözünü engelleme özelliği bulunmaktadır.

Kafeik asit özellikle ay çekirdeğinde ve ayçiçeği tohumlarında bulunur. Antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri bulunmaktadır. Ferulik asitin ise bitkilerin hücre çeperlerinde bulunan, gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği görülmüştür.

- Stilbenler

Stilbenler bitkiler tarafından mikroplara ve stres faktörlerine bağlı enfeksiyonlara karşı üretilir. Resveratrol stilbenlerin en yaygınıdır. Resveratrolün yaşlanma geciktirici, antiviral, antioksidan, enfeksiyondan koruma, kardiyoprotektif ve obeziteyi azaltma gibi faydaları bulunmaktadır.

- Lignanlar

Lignanlar 2 fenil propanların oksidatif dimerizasyonu ile oluşmaktadır. Yağlı tahıllarda ve keten tohumunda çok fazla bulunurlar. Stilbenlere benzer faydalı etkileri bulunmaktadır. Anthriscus sylvestri (L.) Hoffm bitkisi yüksek miktarda lignan içermesiyle kansere karşı etki göstermektedir. Ayrıca antienflamatuar, antialerjik ve antiviral etkiler gösterdiği çalışmalarda görülmüştür [22] [23].

2.2 Zeytin Ağacı

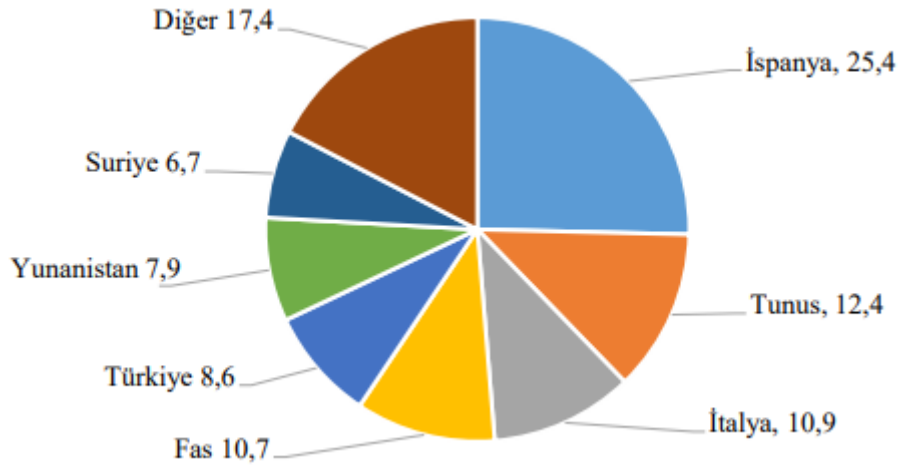
Oleacea familyasının bir türü olan zeytin ağacı (Olea Europaea), yaprak dökmeyen en eski kültür bitkilerindendir [3] [7]. Zeytin ağacı 20-86 mm boyunda ve 5-17 mm genişliğinde yapraklara sahipken kökleri de yer altında 1,5 m'ye uzanabilmektedir. Tablo 2.1'de zeytin ağacı taksonomik olarak sınıflandırılmıştır [5].

Tablo 2.1 Zeytin ağacının taksonomik sınıflandırılması [5]

Alem	Bitkiler (Plantae)
Bölüm	Kapalı tohumlular (Magnoliophyta)
Sınıf	İki çenekliler (Magnoliopsida)
Takım	Lamiales
Familya	Zeytingiller (Oleaceae)
Cins	Olea
Tür	E. oleaster (yabani), E. sativa (ehli)
İsim	Olea Europaea

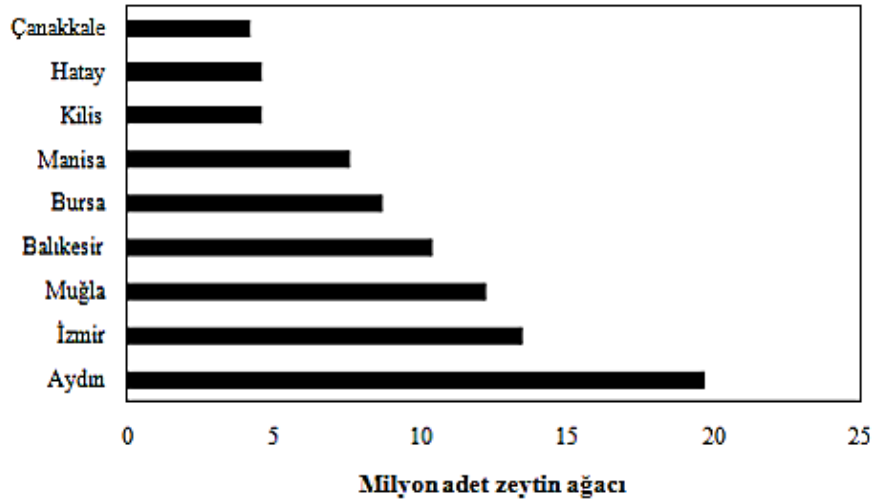
Zeytin bitkisi yazların sıcak, kışların ise yumuşak geçtiği yerlerde yetiştirilmektedir. 0°C civarındaki sıcaklıklarda zeytin ağacı bitkisel dinlenmesini gerçekleştirdiğinden daha verimli olmaktadır. Zeytin ağacı için don, kuraklık ve yüksek ısı farklılıkları büyük problem yaratmaktadır. Bu sebeple ılıman iklim ve çok zengin olmayan kireçli topraklarda yetişmesi ile tam bir Akdeniz bölgesi ağacı olduğunu kanıtlamaktadır [24] [25]. Zeytin ağaçları aşılama ya da fidandan yetiştirilmektedir. Fidan yöntemi ile yetiştirilen zeytinler 5 yıldan sonra ürün verirken aşılama ile yetiştirilenler 3 yılda ürün vermektedir. Fidandan yetişen zeytinler 25 yıldan sonra en verimli dönemlerine girerler. Ek olarak zeytinliklerin sürülmesi, dalların budanması, toprağın güçlendirilmesi ile zeytin ağaçları yüzlerce yıl verimliliklerini koruyabilmektedirler [5].

Zeytin ağaçlarının %98'i Türkiye, İspanya, İtalya, Yunanistan, Tunus, Portekiz, Suriye, Fas ve Cezayir gibi Akdeniz ülkelerinde yetişmektedir [3] [7]. Zeytin ağaçları özellikle zeytin ve zeytinyağı üretimi için yetiştirilmekte olup dünyada en bol yetiştirilen bitkiler arasında bulunmaktadır [26]. Gıda ve tarım örgütü verilerine göre 2021 yılında dünyada yaklaşık 10,3 milyon hektar alanda 23 milyon ton zeytin üretimi yapılmıştır [27]. Türkiye ise zeytin üretiminin yaklaşık %15,2'sini gerçekleştirmektedir [28]. 2010 yılında 9,900 milyon hektarlık zeytinlik alan bulunurken bu alan 2019 yılında 10,578 milyar hektar alana çıkmıştır ve bu yıllar arasında zeytinlik alanlarda yaklaşık %7'lik bir artış görülmüştür. Ükelere göre zeytinlik alanların büyüklüğü değerlendirildiğinde Şekil 2.3'te de görüldüğü gibi İspanya %25,4'lık oranla ilk sırada yer almaktadır Tunus %12,4 ile ikinci sırada yer alırken sırasıyla %10,9 ile İtalya, %10,7 ile Fas, %7,9 ile Yunanistan ve %8,6 ile Türkiye dünya üzerinde en fazla zeytinlik alana sahip ülkeler konumundadırlar [27].



Şekil 2.3 Ükelere göre zeytinlik alan dağılımı [27]

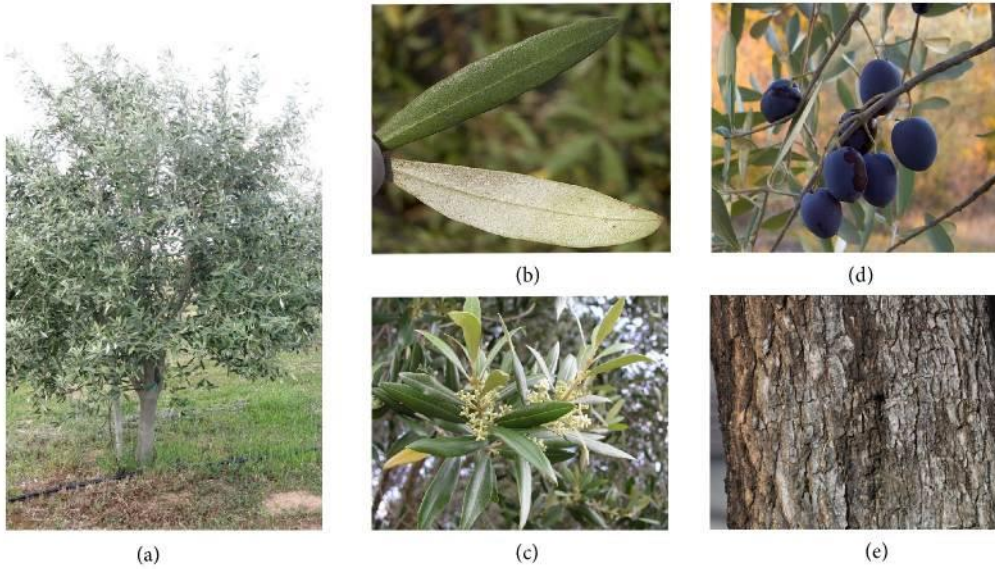
Türkiye’de Ege bölgesi zeytin ağacının en fazla bulunduğu bölge konumundadır [2]. Türkiye’de illere göre zeytin ağacı sayısı incelendiğinde Aydın birinci sırada yer almaktadır (Şekil 2.4) [5]. Özellikle son yirmi yılda zeytin ağacı sayısındaki artışın sebebi zeytinin sağlığa olan olumlu etkilerinin her geçen gün daha fazla fark edilmesi olmuştur [7].



Şekil 2.4 Türkiye’de illere göre zeytin ağacı dağılımı [5]

2.3 Zeytin Yaprığı

Zeytin ağacı yaprakları her mevsim yeşilliğini korumakta, yaprağın şekli ve boyutu zeytinin türüne göre farklılaşmaktadır. Yaprığın rengi üste doğru açık yeşil iken alt kısımlara doğru renk, mat yeşile dönmektedir. Ekim-Kasım dönemlerinde meyvelerin olgunlaşmasıyla beraber meyvelerin renkleri yeşilden mora dönmektedir (Şekil 2.5) [29]. Yapraklar olumsuz koşullar olmadığı durumlarda (hastalık, soğuk vb.) 18 ile 30 ay aralığında yaşamaktadırlar [30].



Şekil 2.5 (a): zeytin ağacı; (b): zeytin yaprakları; (c): çiçeklenme; (d): olgunlaşmış meyveler, (e): zeytin ağacı gövdesi [29]

Zeytin yaprağı zeytin ağaçlarının budanması, zeytin meyvelerinin toplanması ve zeytinyağının üretim basamaklarından olan temizleme-harmanlama işlemleri

sırasında oluşan bir yan üründür. Zeytin ağaçlarının budanması sırasında açığa çıkan zeytin yapraklarının miktarı iklim koşulları, ağacın yaşı, budama yöntemi, yetiştirilen çeşit gibi birçok faktöre bağlı olduğundan kesin olarak belirlenemesinde budama ile ağaç ağırlığının yaklaşık olarak %25'i kadar zeytin yaprağı elde edilmektedir [7] [31]. Bir hektar alan zeytin yaprağı miktarı açısından değerlendirildiğinde 1500 ton budama atığı ortaya çıkmakta bu atığı yaprak ve küçük dallar oluşturmaktadır. Bu miktarın %25'ini ise zeytin yaprakları oluşturmaktadır. Bu durumda bir hektar alandan 375 kg yaprak atığı, bir ağaçtan yaklaşık 25 kg yaprak atığı açığa çıkmaktadır [3]. Zeytin yağı üretiminde ise zeytin ağırlığının %10'nu kadar zeytin yaprağı açığa çıkmaktadır [7]. Türkiye için bu veriler değerlendirildiğinde, yıllık 880 bin hektar alanda yaklaşık 1 milyon 300 bin ton budama atığı ortaya çıkmakta bu atığın 330 bin tonunu zeytin yaprakları oluşturmaktadır. Zeytin yağı üretiminde açığa çıkan yapraklar da hesaplandığında Türkiye'de 330 bin tondan fazla zeytin yaprağı açığa çıkmaktadır [3].

Zeytin yaprakları fenolik bileşikler açısından oldukça zengin bir atıktır [31]. Fakat biyoaktif içerikler bakımında oldukça zengin olan ve değerlendirilmesi gereken zeytin yaprakları günümüzde pek değerlendirilmemekle birlikte elden çıkarılması da maliyetlidir. Zeytin yaprakları yakılmakta, toprağa gömülme ya da hayvan yemi olarak kullanılmaktadır. Aslında zeytin yaprakları biyoaktif özellikleri (doğal fenolik bileşik kaynağı) bakımından katma değeri yüksek ürünlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek ucuz, kolay erişilebilir bir hammaddedir [9] [10].

2.3.1 Zeytin Yaprakındaki Fenolik Bileşikler

Zeytinin meyvesi ve yağı insan sağlığına yararlı olduğu kadar zeytin yaprağı da insan sağlığı için oldukça faydalıdır. Zeytin yaprağı çok eski dönemlerden beri ilaç olarak kullanılmaktadır. Zeytin yaprağı faydalı özelliklerini içeriğinde bol miktarda bulunan fenol bileşiklerine borçludur [30]. Fenolik bileşikler, zeytin ağacı tarafından yüksek sıcaklığa ve UV ışınlarına sürekli maruz kalması nedeni ile, ayrıca böcek saldırılarından kendini koruyabilmesi için üretilmektedir [5]. Zeytin yaprağı özütünde başlıca oleuropein, hidroksitirozol, luteolin 7-glukozid, apigenin 7-glukozid ve verbaskozid fenolik bileşikleri bulunmaktadır.

Zeytin yaprağında bulunan tüm fenolik bileşikler 5 başlık altında sınıflandırılabilir.

Bunlar;

- Flavonlar (diosmetin, luteolin-7-glukozid, diosmetin-7-glukozid, apigenin-7-glukozid, luteolin)
- Sekoiridoidler (verbaskozid, oleuropein)
- Flavan-3-oller (kateşin)
- Flavonoller (rutin)
- İkame fenoller (hidroksitirozol, vanilin, tirozol, kafeik ve vanilik asit) [30].

Yukarıda bahsi geçen fenolik bileşikler çoğu sebze ve meyvede bulunurken oleuropein gibi oleuropeosidler yalnızca zeytingiller grubundaki bitkilerde bulunmaktadır [5]. Benavente-Garcia ve arkadaşları gerçekleştirdikleri çalışmada (2000), zeytin yaprağındaki ana fenolik bileşikleri belirlemeyi ve bu bileşiklerin antioksidan özelliklerini tanımlamayı hedeflemişlerdir. Çalışmada sadece zeytingiller grubundaki bitkilerde bulunan oleuropeinin yaprağın yapısında diğer fenolik bileşiklerden daha çok bulunduğu rapor edilmiştir (Tablo 2.2). Ayrıca oleuropein, hidroksitirozol, tirozol ve kafeik asitin toksisiteye neden olmadan lökositlerle etkileşime girerek reaktif oksijen türlerinin oluşumuna engel olduğunun belirlendiği bildirilmiştir [32] .

Tablo 2.2 Zeytin yaprağı ekstratındaki fenolik bileşiklerin % miktarları [32]

Fenolik Bileşenler	% Miktar (kuru ekstrakt baz alınmıştır)
Oleuropein	24,54
Hidroksitirozol	1,46
Luteolin 7 glukozid	1,38
Apigenin 7 glukozid	1,37
Verbaskozid	1,11
Tirozol	0,71
Vanilik asit	0,63
Diosmetin 7 glikozit	0,54
Kafeik asit	0,34
Luteolin	0,21
Rutin	0,05
Diosmetin	0,05
Vanilin	0,05
Kateşin	0,04

Toplam fenolik bileşen miktarı zeytinin çeşidi, toplanma zamanı, olgunluk seviyesi, iklim ve depolanma şartları, toprak gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca yaprağın yaşı, budama zamanı, kurutma ve ekstraksiyon yöntemi, kullanılan

Çözücü, haşlama, parçalama gibi ön işlemler de fenolik bileşen miktarını etkilemektedir [33].

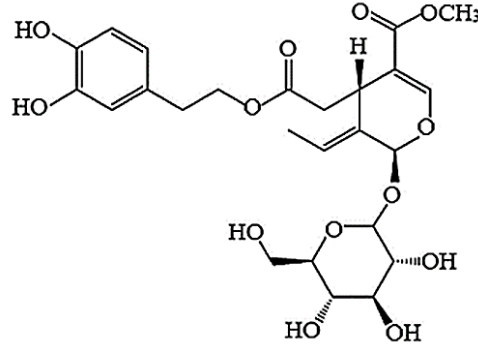
Zeytin yaprağı, zeytin meyvesi ve zeytin yağına kıyasla daha fazla fenolik bileşik içermektedir (Tablo 2.3) [34]. Saf zeytin yağında toplam fenolik bileşenlerin miktarı 200 ile 800 mg/L arasında iken zeytin yaprağı ekstraktı için 6360-8190 mg/L olarak belirlenmiştir [5]. Makris ve arkadaşlarının çalışmasında da (2007), zeytin yaprağındaki fenolik bileşenlerin miktarı 2058 mg GAE/100 g yaprak olarak bulunmuştur. Bu değer fenol içeriğinin yüksek olduğu yaygın olarak bilinen siyah üzüm ile aynıdır [6].

Tablo 2.3 Zeytinin kısımlarına göre içerdii oleuropein miktarı [34]

Zeytin ağacının kısımları	Oleuropein miktarı (mg/g kuru ağırlık, yaş ağırlık*)
Yaprak	60,0-90,0
	5,6-9,2
	93,0-134,0
Dal	11,0-14,0
	18,9
Kök	1,9-6,0*
iek	15,3-20,9*
Tomurcuk	15,7-58,4*
Meyvesi	13,6-50,8*
	0,4-21,7
Sofralık zeytin	0,0-0,1
	0,0-0,5*
Zeytin fabrikası atık suyu	6,5
Zeytin ezmesi	0,4

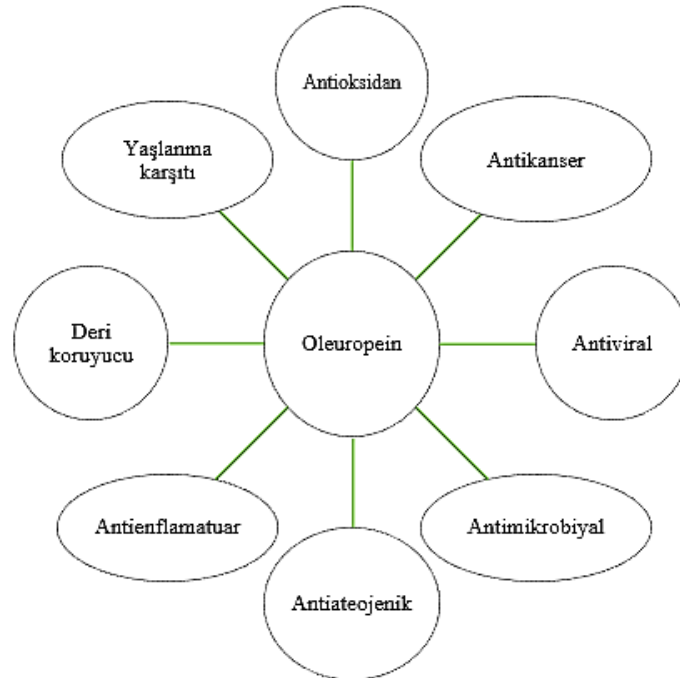
2.3.1.1 Oleuropein

Oleuropein 1908 yılında Vintilesco ve Bourquelot tarafından keşfedilmiş, yapısı ise tam olarak 1960 yılında tanımlanmıştır. şekil 2.6'da verildiği gibi oleuropein $C_{25}H_{32}O_{13}$ molekül formülüne sahiptir. Molekül ağırlığı ise 540,514 g/mol'dür [35].



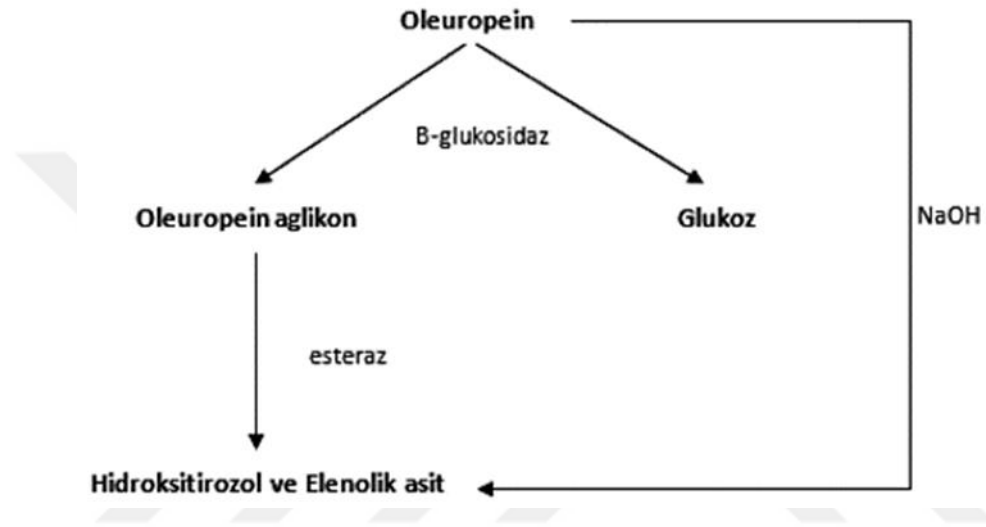
Şekil 2.6 Oleuropeinin kimyasal yapısı [35]

Oleuropeinin yüksek antioksidan, antimikrobiyal etkileri bulunmaktadır. Yüksek antioksidan özellik göstermesinin sebebi yapısında bulunan kateşoldür. Hatta yapılan bir çalışmada doğal ve sentetik antioksidanlara göre oleuropein ve hidrokşitirozolün lipit ve DNA oksidasyonunda daha çok antioksidan etki gösterdiği belirtilmiştir [36]. Oleuropeinin eikosanoid üretimine engel olarak hücreyi koruduğu bildirilmiştir. Lipid metabolizmasını iyileştirme özelliği ile obezite sorunlarının önüne geçilmesini sağlamaktadır. Kanser hastalıklarında enzimlerin zarar görmesini önlemektedir. Şekil 2.7’de oleuropeinin sağlığa faydalı etkileri gösterilmiştir.



Şekil 2.7 Oleuropeinin faydalı etkileri [37]

Oleuropein bağırsaklarda esteraz ve β -glukozidaz enzimleri ile ilk olarak glukoz ve oleuropein aglikona daha sonra da elenolik asit ve hidroksitirozole hidroliz olmaktadır (Şekil 2.8). Saf hali ile antioksidan özelliği kısıtlı olan oleuropein hidrolizi sonucu açığa çıkan hidroksitirozol ile daha yüksek antioksidan etki sağlanmaktadır [38] [39]. Parçalanma öncesi emilimi zor olan oleuropeinin hidroliz işlemi sonrası emilimi kolaylıkla sağlanmakta ve insan dışkısında bulunmamaktadır [40]. Hidroksitirozol güçlü antioksidanlardan biridir. Elenolik asit ise antimikrobiyal özellikler göstermektedir [41].



Şekil 2.8 Oleuropeinin hidrolizi [30]

Glukozid yapılı polisakkarit olan oleuropein meyveye acımsı tat vermektedir. Olgunlaşmamış zeytinde daha fazla bulunmakta ve zeytin olgunlaştıkça miktarı azalmaktadır. Bu sebepten olgunlaşmamış zeytinin tadı oleuropeinden dolayı acımsı olmaktadır. Oleuropein zeytin yaprağında zeytin meyvesi ve zeytin yağına kıyasla daha fazla bulunmaktadır. Zeytin yağında %0,005-0,12 arasında bulunurken zeytin yaprağında bu oran %1 ile %14 oranlarına çıkmaktadır [30].

2.3.2 Zeytin Yaprakının Faydaları

Zeytin yaprağının yapısında bulunan fenolik bileşikler geçmişten günümüze araştırmacıların dikkatini çekmektedir [9]. Mısırlılar için gücün simgesi olan yapraklar ilk defa Mısırlılar ile tıbbi olarak kullanılmıştır. Diğer medeniyetlerde de beslenme ve tıbbi olarak kullanımı sağlanmıştır. Örneğin Akdeniz kültürlerinde soğuk algınlığı, enfeksiyon gibi durumlarda zeytin yaprakları kullanılmıştır [42].

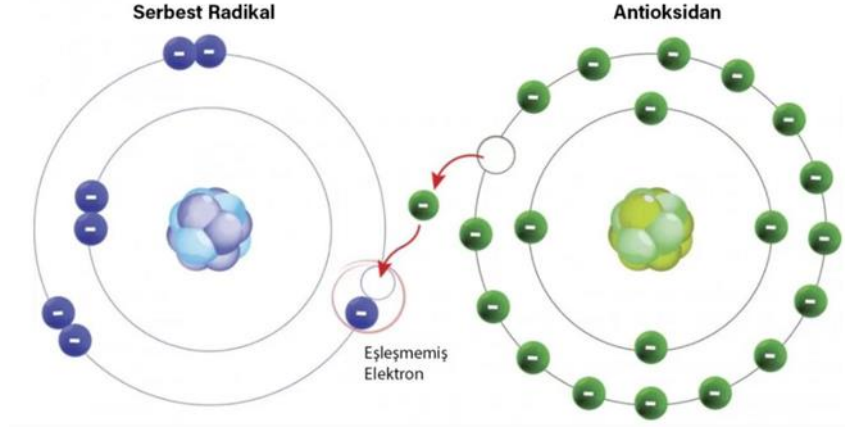
Geleneksel olarak yapraklar sıtma, ateş gibi rahatsızlıklarda ilaç olarak, kaynatılarak ishal ve idrar yolu enfeksiyonlarında, kurutulmuş yaprakların sıcak su ekstratı bronşiyal astım tedavisinde, çiğnenerek ağız temizlemesinde, lapa olarak yanık, şişlik ve kaşıntı gibi deri rahatsızlıklarının giderilmesinde kullanılmıştır [9].

Zeytin yaprağı yapısında bulunan fenolik bileşiklerin anti-diyabetik, antiviral, anti-fungal, anti-inflamatuar, antimikrobiyal, antikanserojen, antioksidan, hipoglisemik ve hipokolesterolemik, cilt koruması, yaşlanma karşıtı ve obeziteye karşı olma gibi birçok faydalı özelliğe sahip olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [26] [43].

Zeytin yaprağı içeren tabletler diyabet, dejeneratif eklem rahatsızlıkları, sinüzit, grip, hipertansiyon, kronik halsizlik, eklem bölgelerinde ağrılı şişlikler, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde kullanılmaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktının sadece tıbbi değil kozmetik kullanımında mevcuttur. Antioksidan özelliği ile cilt bakımında kullanılmakta bu sebeple yaşlanma karşıtı çoğu üründe yer almaktadır. Ekstraktalar doğal antibiyotik ve antiparazit etkisi ile hayvan ilaçlarında da kullanılmakta, hayvan mamalarında da bulunmaktadır [42]. Çeşitli araştırmalar zeytin yaprağı ekstraktlarının, hayvanlarda kan basıncını düşürdüğünü, koroner arterlerdeki kan akışını arttırdığını ve bağırsakta kas spazmlarını engelleme etkisinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca meme kanserine karşı sitotoksik aktivite, anti-HIV virüsü etkisi, mide koruyucu aktivitelerinin olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [9]. Pek çok araştırmacı, zeytin yaprağının tedavi edici özelliğinin, yapısında bulunan oleuropeinden kaynaklandığı görüşündedir [5].

2.3.2.1 Antioksidan Etki

Kimyasal sinyalleme ve bağışıklık gibi hücrel mekanizmalar için insan vücudu reaktif oksijen ve nitrojen türlerini üretmektedir. Bunların fazlası ise hücrel düzeyde oksidatif hasara neden olurlar. Antioksidanlar ise serbest radikallerin oluşmasını engellemeye çalışır ya da var olanları yok ederek oksidatif hasarın önlenmesini sağlarlar (Şekil 2.9) [44]. Serbest radikaller süperoksit anyon, hidrojen peroksit, hidroksi ve peroksi radikalleri gibi yapılarında eşleşmemiş elektron bulunan yapılardır [45]. Antioksidanların serbest radikallere müdahalesi ile kronik rahatsızlıkların oluşma riski azalmaktadır [44].



Şekil 2.9 Antioksidan çalışma mekanizması [46]

Zeytin yaprakları yapılarındaki fenolik bileşiklerin çokluğu ile serbest radikallerle mücadele edebilmektedir. Yapılan bir çalışmaya göre yaprağın yapısında bulunan flavonoidler, kateşin, luteolin ve rutin antioksidan özellikleri ile bilinen E ve C vitaminlerinden (sırası ile 1,12 ve 1,10 mmol/L TEAC) iki buçuk kat daha fazla etki göstermektedir (Tablo 2.4). Hidroksitirozol ve oleuropein ise sentetik antioksidan olan Bütil Hidroksi Tolüen (BHT) ve C, E vitaminleri ile neredeyse aynı ya da biraz daha fazla etki göstermektedir. Ayrıca fenolik bileşiklerin ve zeytin yaprağı ekstratının antioksidan etkinliği incelenmiş ve rutinin 2,75 mmol/L ile en yüksek antioksidan etki gösterdiği zeytin yaprağı ekstratının 1,58 mmol/L değeri ile Tablo 2.4'te de görüldüğü üzere çoğu fenolik bileşikten daha yüksek seviyede antioksidan etki gösterdiği belirlenmiştir [32].

Tablo 2.4 Zeytin yapraklarındaki fenolik bileşenlerin antioksidan kapasiteleri [32]

Fenolik Bileşikler	Antioksidan miktarı (Trolox eşdeğeri mmol/L)
Zeytin yaprağı ekstraktı	1,58
Rutin	2,75
Kateşin	2,28
Luteolin	2,25
Hidroksitirozol	1,57
Diosmetin	1,42
Oleuropein	0,88
Vanilik asit	0,67
Luteolin 7-glukozit	0,71
Apigenin 7-glukozit	0,42
Tirizol	0,35
Vanilin	0,13

Yaprak olgunluğunun antioksidan seviyesine etkisi incelendiğinde yeni yaprakların olgun yapraklara göre daha az etkiye sahip olduğu belirlenmiştir [32]. Kamran ve arkadaşları (2015) çalışmalarında taze zeytin yaprakları ile kurutulmuş yaprak ekstratlarının DPPH analizi ile antioksidan içeriklerini incelemişlerdir. Taze yaprakların (0,23 mmTE/g kuru yaprak) 105°C fırında kurutulmuş yapraklara (62 mmTE/g kuru yaprak) göre daha az antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir [47].

2.3.2.2 Antimikrobiyal Etki

Zeytin yapraklarının ekstratı mantar, virüs ve mayalara karşı antimikrobiyal özellik göstermektedir. Zeytin yaprağı ekstratı kadınlarda vajinal bölgede meydana gelen mantar ve uçuk gibi enfeksiyonlarda, bronşit gibi bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. İn vitro bir çalışmada sırası ile tirosol, kateşin ve oleuropeinin mantar oluşumunu engellemede en etkili fenolik bileşenler olduğu bildirilmiştir. Ekstrakta bulunan bileşenler patojenleri yok etmenin yanında mikroplara karşı bağışıklık sistemini de güçlendirmektedir [48] [49]. Lee ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada, zeytin yapraklarında bulunan oleuropein, vanillin, rutin ve kafeik asitin bir arada bulunduğu hali ile Salmonella enteritidis ve Bacillus cereus bakterileri üzerinde daha fazla yok edici etki gösterdiklerini bildirilmiştir [50].

Hidroksitirozol oleuropeinin bir parçası iken oleuropeinden daha fazla antimikrobiyal etki göstermektedir. Bu durumun oleuropeinin kompleks yapısı ve glikoz grubu içermesi ile hücre membranının penetrasyonunu düşürmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir [51].

2.4 Kurutma İşlemi

Kurutma gıda maddelerinin raf ömrünün uzatılarak saklanabilmesi amacı ile kullanılan etkili ve en eski yöntemlerden biridir. Kurutma, gıda sanayisinde kullanılan çoğu ürünün içeriğinde çok fazla su içermesinden (%80-90) ötürü uygulanmaktadır. Kurutma işlemi ile gıdanın yapısındaki su %10 ile %20 seviyelerine düşürülür böylece mikroorganizmaların çoğalmasının önüne geçilerek ürünün bozulması geciktirilir. Bu işlem su ile katı faz arasındaki uçuculuk farkı ile gerçekleşir. Kurutma ile gıda ağırlığında ve hacminde azalma olacağından depolama ve taşınma kolaylığı sağlanır ve maliyetler düşer [52]. Çoğu muhafaza

yöntemine göre işçiliği düşük, ekipman ihtiyacı az, daha ucuz ve besin içeriğini (lif içeriği) daha iyi koruyan bir yöntemdir [53].

Gıdalardaki karbonhidrat, yağ ve proteinlerin oksijenle reaksiyona girmesi kalite kayıplarına neden olmaktadır. Gıdada renk, tat ve koku problemleri oluşmaktadır. Bu sorun için özellikle ucuz olmaları nedeniyle sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda sentetik antioksidanların kanserojen etkilerinden dolayı doğal antioksidan kaynaklarına yönelim giderek artmıştır. Zeytin yapraklarının yapısındaki fenolik bileşenlerin antioksidan etkiye sahip olmaları bu değerlendirilemeyen yan ürünün gıda hammaddesi olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır [54]. Kurutma işleminin ekstrakte edilen malzemelerin fenolik bileşen miktarını ve kalitesini pozitif anlamda etkilendiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu amaçla fenolik bileşenlerin ekstrakte edilebilmesi ayrıca yaprakların depolanabilmesi için kurutulması gerekmektedir [10].

Kurutma işlemleri yapay ve doğal olarak iki gruba ayrılmaktadır. Doğal kurutma ise, güneşte ve gölgede kurutma olarak kendi içinde ayrılmaktadır. Yapay kurutmada ise taşınım, iletim ya da ışınlama ile ısı aktarımı yapılarak kurutma gerçekleştirilmektedir [52].

2.4.1 Gölgede Kurutma

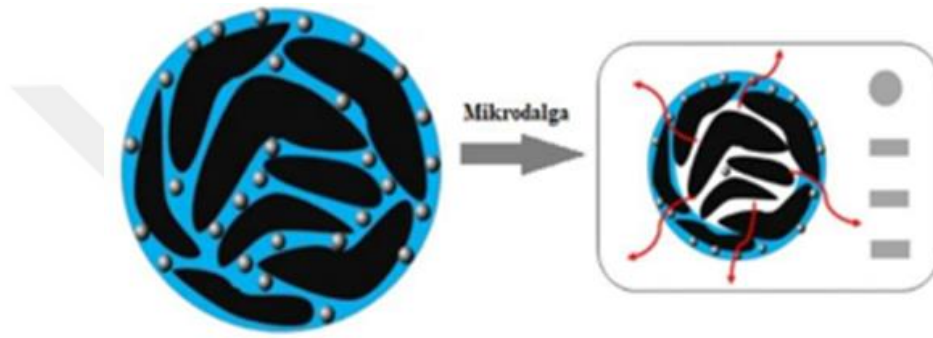
Güneşe maruz kalmadan gölgeli bir ortamda ortam havası ve neminde gerçekleştirilen kurutma işlemidir. Bu yöntem oda koşullarında, iç mekan dehidrasyonu gibi isimlerle de ifade edilmektedir. Genellikle aromatik bitkilerin ve baharatların kurutulmasında kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin en önemli avantajı ek enerjiye ihtiyaç duyulmamasıdır. Kurutmanın uzun sürmesi ürün içeriğinde kayıplara neden olmaktadır. Fakat diğer kurutma yöntemlerine kıyasla C vitamininin ve minerallerin korunmasını sağlamaktadır. Kurutulan ürün sinek gibi zarar veren hayvanlara maruz kalabilmektedir. Nem kontrolünün zor olması küf mantarı ile karşı karşıya kalınmasına neden olabilmektedir [55] [56].

2.4.2 Mikrodalga Kurutma

Mikrodalgalar 1mm-1m dalga boylarında, 300MHz ile 300 GHz arasında frekanslardadır. Endüstriyel ve laboratuvarlarda kullanılan mikrodalgalar genellikle 2,45 GHz veya 915 MHz frekanslarda olmaktadır. Ev tipimikrodalga

fırınlarda ise 2,45 GHz'lik frekans kullanılmaktadır [57]. Mikrodalgalar fırın boşluğu, güç kaynağı, dalga yayıcı, havalandırma sistemi ve magnetrondan oluşmaktadır. Magnetron elektrik enerjisini mikrodalgaya dönüştürür. Bu yüksek frekanslı dalgalar kurutulacak ürüne absorbe olarak yapısındaki suyu titreştirir. Titreşimle meydana gelen hareket enerjisi ısı enerjisine dönüşür (Şekil 2.10). Kurutulacak olan ürün oluşan ısı enerjisi ile ürünün merkezinden başlayarak dışa doğru ısınır. Kuruma aslında ürünün kendi iç enerjisi ile olmaktadır [55].

Kurutma verimliliğini, aplikatör boyutu, magnetron frekansı ve gücü, kurutulan malzemenin dielektrik sabiti etkilemektedir [57].



Şekil 2.10 Mikrodalga da ısı aktarımı [55]

Mikrodalga kurutmanın avantajları [55] [57];

- Kısa işlem süresi
- Düşük enerji tüketimi
- Kurutulacak üründe kalite kayıplarının minimum olması
- İşlemin yapılacağı yerin önceden ısıtılmaması
- Kolay temizlenme
- Az yer kaplama
- Ambalajlı gıdalarda kullanılabilirliği

Mikrodalga kurutmanın dezavantajları ise [55];

- Kurulum maliyeti
- Ürün yüzeyinin eşit ısınmaması
- Şekerli gıdalarda esmerleşme, yanma vb. bozunmalar

olarak sıralanabilir.

Kurutma yöntemlerinin kurutulacak ürüne etkileri birçok araştırmacı tarafından incelenmiştir.

Güler (2019) yaptığı çalışmada, farklı kurutma yöntemlerinin fesleğen, nane, biberiye, kekik ve stevyanın toplam fenol içeriğine etkisini incelemiştir. Biber ve fesleğenin mikrodalga kurutma ile 800 W'ta, stevyanın gölgede, kekik'in kurutma tüneline 30°C'de, nanenin ise güneşte kurutulduğunda en yüksek fenol içeriğine ulaşıldığını bildirmiştir [58].

Pinar ve arkadaşları (2021) gerçekleştirdikleri çalışmada, biberi gölgede, serada, güneşte, dondurarak, mikrodalga da (300-600 W) ve konvektif kurutma (60-80°C) yöntemleri ile kurutmuşlardır. En fazla C vitaminini gölgede ve dondurularak kurutulan biberlerin içerdiğini belirlemişlerdir. En yüksek toplam fenolik bileşen içeriğinin mikrodalga kurutmada, en az yağ asiti içeriğinin gölgede kurutmada elde edildiğini bildirmişlerdir. En uzun kurutmanın gölgede yapılan kurutma (240 saat), en kısa kurutmanın 600W'ta mikrodalga gerçekleştirilen kurutma (21 dakika) olduğunu rapor etmişlerdir [59]. Patel ve arkadaşları (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da, sarımsağın gölgede kurutulmasında benzer sonuca (en yüksek C vitamin değerine) ulaşılmış ve bu durum C vitaminin sıcaklığa duyarlı olması ile açıklanmıştır [60].

Akbaş (2017) yaptığı çalışmada, zeytin yapraklarını etüv (70°C), mikrodalga (180 W, 360 W, 540 W) ve atmosfer koşullarında kurutarak kurutmanın toplam fenol miktarına etkisini araştırmıştır. Ekstraksiyon işlemini 80:20 oranında metanol-su çözücüsü ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada Fenol içeriği çoktan aza doğru sıralandığında 540 W (3053,6 mg GAE/100 g) > atmosfer (2976,2 mg GAE/100 g) > 360 W (2706,7 mg GAE/100 g) > etüv (2645,2 mg GAE/100 g) > 180 W (1431 mg GAE/100 g) olarak rapor edilmiştir [37].

Kurutma süreci ısı ve kütle aktarımının eş zamanlı olarak gerçekleşmesinden ötürü karışık bir işlemdir. Bu sebeple modelleme kurutma işlemleri için oldukça önemlidir. Zeytin yaprakları gibi malzemeler ince tabaka kurutma modelleri ile ifade edilmektedir [10].

2.5 İnce Tabaka Kurutma Modelleri (Kurutmanın Modellenmesi)

İnce tabaka kurutma, malzemenin bir tabaka olarak kurutulması olarak ifade edilir [53]. Kurutma işleminde nem ve sıcaklığın eşit olarak dağıldığı kabul edilmektedir. Ek olarak kurutma cihazı ile malzeme arasında tam olarak etkileşim olmaktadır. İnce tabaka kurutma modelleri ile kurutma şartları net bir şekilde matematiksel ifadelerle açıklanmaktadır. Kurutulacak olan malzemenin kurutma şartlarının belirlenmesinin yanında yeni süreçlerin tasarımı ve sistemlerin daha etkin olmalarını sağlamak için kurutma sürecin modellenmesi oldukça önemlidir [61]. Kolayca kullanılabilmeleri ve çok veriye ihtiyaç duyulmadığından bu modeller son zamanlarda kurutma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

İnce tabaka kurutma modeller 3 gruba ayrılmaktadırlar.

- Teorik Modeller
- Yarı Teorik Modeller
- Deneysel (Ampirik) Modeller

Bu modellerin içinden yarı teorik ve deneysel modeller nem aktarımında malzeme ile hava arasındaki dış direnci de hesaba katarken, teorik modeller sadece iç direnci dikkate almaktadır. Bu nedenle yarı teorik ve ampirik modeller teorik modellere nazaran daha çok tercih edilmektedir [10] [53]. Bu modeller kurutma işleminde malzemelerin ısı ve kütle transfer özelliklerini dolaylı olarak yansıtan bağıl nem oranı (M_R) ve kuruma süresinin (t) işlevsel bir ifadesidir.

2.5.1 Teorik Modeller

Teorik modeller Fick'in ikinci difüzyon kanundan türetilmiş modellerdir. Bu modeller çok fazla kabul yapılarak oluşturulduğundan (iletkenlik, ürün geometrisi, kütle difüzivitesi, vb.) kurumayı iyi derecede ifade edebilmelerine rağmen sonuçların gerçekçiliği düşüktür. Kurutma karakterini açıklarlar fakat modelleme süreci zordur [10] [63].

2.5.2 Yarı Teorik Modeller

Bu modeller hem Fick kanunundan hemde Newton'un soğuma yasasından türetilmektedir. Uygulanan proses şartları için geçerli olan bu matematiksel ifadeler az kabul yapılarak oluşturulurlar. Bu sebeple doğru sonuçlar verirler. Ayrıca

uygulamaları da kolaydır [53]. Modeller deney sonuçlarından oluşturulduğundan deneysel çalışmanın yapıldığı aralıkta geçerlidir [10].

Newton'un soğuma kanundan türetilen bazı modeller Tablo 2.5'te verilmiştir [63].

Tablo 2.5 Newton'un soğuma yasasından türetilen yarı teorik kurutma kinetiği modelleri [63]

Model Adı	Eşitlik
Lewis Modeli (1. Derece Kinetik Model)	$M_R = \exp(-kt)$
Page Modeli	$M_R = \exp(-kt^n)$
Modifiye Page-I Modeli	$M_R = \exp[(-kt)^n]$
Modifiye Page-II Modeli	$M_R = \exp[-(kt)^n]$

M_R : Nem oranı; k : Kurutma sabiti (s^{-1}); n : Model sabiti; t : Zaman (dakika)

Lewis modeli genellikle tarım ürünlerinin düşük sıcaklıkta bir sıvı içerisinde bulunan gövdeden ısı akışı sağlayarak kurutulmasında kullanılmaktadır. Page 1949 yılında, Lewis modelindeki kurutma süresine üs ekleyerek kurutma süresini daha iyi açıklamaya çalışmış ve Page modelini oluşturmuştur [53].

Fick kanunundan türetilen ve literatürde sıklıkla kullanılan kurutma kinetiği modelleri Tablo 2.6'da verilmiştir [63].

Tablo 2.6 Fick kanunundan türetilen kurutma kinetiği modelleri [63]

Model Adı	Eşitlik
Logaritmik	$M_R = a \exp(-kt) + b$
Henderson & Pabis	$M_R = a \exp(-kt)$
Midilli	$M_R = a \exp(-kt^n + bt)$
Çift Terimli	$M_R = a \exp(k_0 t) + b \exp(-k_1 t)$
Verma	$M_R = a \exp(-kt) + (1-a) \exp(-bt)$
Demir	$M_R = a \exp[(-kt)^n] + b$

M_R : Nem oranı; k : Kurutma sabiti (s^{-1}); n , a , b : Model sabitleri; t : Zaman (dakika)

2.5.3 Deneysel Modeller

Deney sonuçlarından oluşturulan modeller olup yalnızca deney şartlarında geçerlidirler. Kurutmanın davranışını açıklayamazlar. Yaygın kullanılan deneysel modeller Tablo 2.7'de gösterilmiştir [63].

Tablo 2.7 Deneysel kurutma kinetiği modelleri [63]

Model Adı	Eşitlik
Wang&Singh	$M_R = 1 + at + bt^2$
Thompson	$t = a \ln(M_R) + b [\ln(M_R)]^2$
Polinom	$M_R = 1 + at + bt^2 + ct^3$

M_R : Nem oranı; a , b , c : Model sabitleri; t : Zaman (dakika)

2.5.4 Efektif Difüzyon Katsayısı (D_{eff})

Kurutma süreci boyunca nem hareketini tanımlayan net bir mekanizma mevcut değildir. Fakat efektif difüzyon katsayısı ile malzemelerden nemin aktarımı karakterize edilerek suyun malzeme içindeki genel kütle aktarımı ifade edilebilmektedir. Sıvı difüzyonu, buhar difüzyonu, yüzey difüzyonu, kılcal akış ve hidrodinamik akış gibi gıdalardaki kütle aktarımının tüm olası mekanizmalarını tanımlamaktadır. Bu nedenle dehidrasyon, adsorpsiyon ve depolama sırasında nemin desorpsiyonu gibi kütle aktarım proseslerinin modellenmesi ve tasarlanması için efektif difüzyon katsayısı bilinmelidir [64]. Efektif difüzyon katsayısı malzemenin özelliğine, kurutma şartlarına ve kurutma yöntemine göre değişmektedir. Gıda ürünlerinde kuruma sürecinin azalan hız periyodunda ve iç difüzyon (sıvı ya da gaz difüzyonu) ile gerçekleştiği kabul edilmektedir. Bu nedenle kuruma davranışını analiz etmek için iç kütle aktarımının temel mekanizması olan difüzyon sürecini tanımlayan Fick'in ikinci yasası (2.1) eşitliği kullanılmaktadır [65].

$$\frac{\partial M_R}{\partial t} = \nabla[D_{eff}(\nabla M_R)] \quad (2.1)$$

Numune başlangıç neminin numune içerisinde eşit olarak dağıldığı, merkezle simetrik kütle aktarımının gerçekleştiği, dış direncin ihmal edildiği ve büzülmenin gerçekleşmediği, difüzyon katsayısının sabit olduğu, kütle aktarımının difüzyon mekanizması ile temsil edildiği varsayımları dikkate alınarak Fick'in ikinci yasası sonsuz bir levha için (2.2) eşitliğinde basitleştirilerek verilmiştir.

$$M_R = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \left(\frac{1}{(2n+1)^2} \exp\left[- (2n+1)^2 \frac{\pi^2 D_{eff}}{4L^2} t \right] \right) \quad (2.2)$$

(2.3) eşitliğinden uzun kuruma süresi için doğruluğu etkilemeden ikinci terim çıkarılarak serinin ilk terimine göre basitleştirilerek (2.3) eşitliği elde edilir.

$$M_R = \frac{8}{\pi^2} \exp\left(\frac{-\pi^2 D_{eff}}{4L^2} t \right) \quad (2.3)$$

(2.3) eşitliğin de her iki tarafın doğal logaritması alınarak eşitlik (2.4)'e ulaşılır.

$$\ln(M_R) = \ln \frac{8}{\pi^2} - \frac{\pi^2 D_{\text{eff}}}{4L^2} t \quad (2.4)$$

Eşitlik (2.4)'te ; M_R nem oranını, D_{eff} efektif difüzyon katsayısını (m^2/s), L ürünün yarı kalınlığını (m), t kuruma süresini (s) ifade etmektedir.

Efektif difüzyon katsayısı (D_{eff}), kuruma süresi (t)'ye karşı $\ln(M_R)$ değerlerinin çizilmesi ile elde edilen doğrunun eğimi ile belirlenebilir [64] [66].

2.6 Fenolik Bileşiklere Uygulanan Ekstraksiyon Yöntemleri

Bitkilerin yapısındaki bileşenleri belirleyebilmek için ilk işlem ekstraksiyondur. Bileşiklerin bir fazdan diğerine aktarılma işlemi olan ekstraksiyon başka bir ifade ile sıvı ya da katı formda bulunan bir ya da daha fazla maddenin çözünürlük özellikleri ile diğer sıvı faza geçmesi işlemine denir. Bu sürecin kolay, hızlı ve ucuz olması endüstriyel anlamda oldukça önemlidir [67]. Ekstrakte olan bileşenler bozulmadan ve kaybolmadan ayrıca ek saflaştırma işlemine ihtiyaç duymadan elde edilmelidir [68].

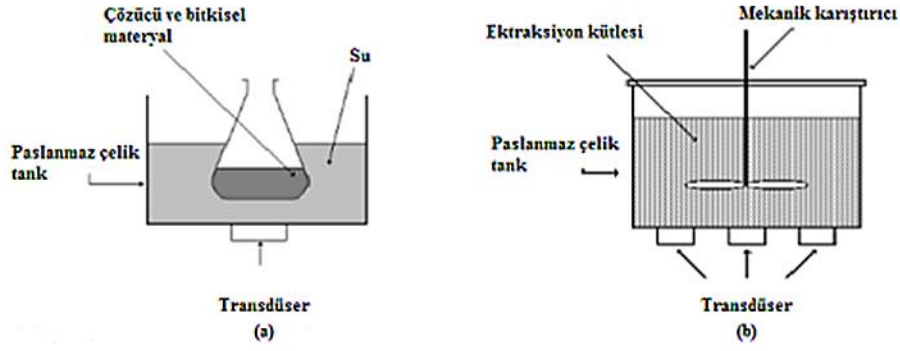
Bitkilerdeki fenol bileşenlerinin eldesinde geleneksel ve geleneksel olmayanlar yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden olan katı-sıvı ekstraksiyonu, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve meserasyon yöntemi en yaygın kullanılan yöntemler olmalarının yanı sıra fazla çözücünün kullanılması, fazla emek gerektirme gibi dezavantajlara sahiptirler. Geleneksel yöntemlerin eksikliklerini gidermek amacıyla araştırmacılar tarafından yeni yöntemler (geleneksel olmayan) geliştirilmektedir. Bu yöntemlere süperkritik sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, yüksek hidrostatik basınç ekstraksiyonu ve karşı akım kromatografisi örnek gösterilebilir. Bu tekniklerde geleneksel tekniklere nazaran daha yüksek ekstraksiyon verimliliği, otomasyon, gelişmiş seçicilik, ve daha az çözücü kullanımı amaçlanmaktadır [69].

2.6.1 Ultrason Destekli Ekstraksiyon

Ultrason, 20 kHz'den daha yüksek frekansta ürettiği ses dalgaları ile katı, sıvı ya da gaz içerisinde mekanik titreşimlere neden olur. Bu titreşimler mekanik basınç dalgalarına dönüşmekte ve enerji sırası ile ortama ve maddeye iletilmektedir. Ultrason maddenin hücrelerini parçalar ve partikülün boyutunu küçültür. Böylece

katı ve sıvı faz etkileşimi artar, çözücünün istenilen ekstrakta akışı kolaylaşır (Şekil 2.11) [5].

Ultrasonik ekstraksiyon işlemi problu ultrason kullanılarak veya ultrasonik banyoda yapılabilmektedir [70].



Şekil 2.11 (a): doğrudan olmayan (b): doğrudan ultrason destekli ekstraksiyon [70]

Ultrasonik banyolar, yapılarında dönüştürücü (transdüser) bulunan paslanmaz çelik malzemeden yapılan tanklardır. Dönüştürücüler oluşan titreşimleri metal gövdeye, gövde ise içerisinde bulunan sıvıya aktarmaktadır. Ekstraksiyonu yapılacak malzeme banyoya yerleştirilir ve işlem sırasında 1 ile 5 W/cm² arasında güç uygulanır. Uygulamasının kolay ve ekonomik olması yanında banyoya yerleştirilen malzemenin ısınması bir dezavantajdır.

Proplu ultrason işleminde ise prob doğrudan katı-sıvı karışım içerisine daldırılmakta bu sebeple daha çok güç kullanılmaktadır. Fazla güç kullanımının önüne geçmek için ultrasonik banyo ekstraksiyonun aksine proplu ultrason küçük hacimli uygulamalarda kullanılır. Bu nedenle genellikle laboratuvar ortamında gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılmaktadır [71] [72] [73].

Ultrasonik ekstraksiyon işleminde ultrason dalgalarının uygulanması ile bitkilerin hücre çeperleri kavitasyon nedeniyle zarara uğrar (fiziksel ve yapısal bozunma). Bu sayede doku içerisindeki istenen maddenin çözücüye kütle aktarımı yüksek basınçla ihtiyaç duymadan artmakta ve bu duruma bağlı olarak ekstraksiyon süresi kısalmaktadır [5] [74].

Ultrasonun gücü, pH, kullanılan çözücü, ekstraksiyon süresi, çözücü/numune oranı ultrasonik ekstraksiyonu etkileyen parametrelerdir.

Ultrasonik ekstraksiyonun geleneksel yöntemlere alternatif olmasını sağlayan avantajları maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır.

- Ekipmanın ucuzluğu,
- Çevre dostu olması,
- Kolay kullanım,
- Yüksek verim,
- Az çözücü tüketimi,
- Yüksek kütle aktarım hızı,
- Düşük sıcaklıkta yüksek performansı ile bitkideki kararsız bileşiklerin sıcaklığa bağlı bozulmasının önüne geçilmesi,
- Yüksek temas alanı etkisi ile işlem süresinin kısılması [5] [75].

Ayrıca mikrodalga destekli ekstraksiyon gibi geleneksel olmayan ekstraksiyon teknikleri ile de karşılaştırıldığında çalışma kolaylığı ve daha ucuz olması ile daha avantajlıdır [76].

Ultrason yardımıyla bitkilerden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu ile ilgili literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Aşağıda birkaç örnek çalışmaya yer verilmiştir;

Virod ve arkadaşları (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, elma posasından fenol bileşenlerinin klasik ve ultrason destekli ekstraksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. İki ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında ultrasonik ekstraksiyon işleminin daha verimli (%20'den fazla) olduğunu bildirmişlerdir [77].

Cifa ve arkadaşlarının (2018) yaptıkları çalışmada, meserasyon ve ultrasonik ekstraksiyon yöntemleri ile zeytin yapraklarından elde edilen oleuropeinin verimini ve toplam fenolik madde miktarını incelemişlerdir. Ultrasonik banyoda daha az çözücü kullanımı, düşük ekstraksiyon süresi ve daha düşük sıcaklıkla daha fazla oleuropein ve fenolik bileşen ekstrakte edildiğini bildirmişlerdir [74].

2.7 Ekstraksiyon Kinetiğinin Modellenmesi

Ekstraksiyon kinetiği belirli bir ekstraksiyon verimi elde edebilmek için ihtiyaç duyulan süreyi belirlemek ve böylece enerji tüketimini minimum düzeyde tutulmasını sağlamak açısından oldukça önemlidir [7] [78]. Kinetik çalışma genellikle daha iyi reaksiyon kontrolü ve ekstraksiyondaki bozulma oranının anlaşılması için yapılmaktadır [79].

Ekstraksiyon kinetiği modellenerek sürecin tasarımı, kontrolü ve optimizasyonu için kullanılabilir. Literatürde bitkilerden değerli bileşiklerin ekstraksiyonu için birçok model önerilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda en uygun modelin ekstraksiyon türü ve parametrelerine ayrıca bitki çeşidine göre değiştiği görülmektedir. Yaygın olarak kullanılan kinetik modeller Tablo 2.8’de verilmiştir [78].

Tablo 2.8 Ekstraksiyon kinetiği modelleri [78]

Model Adı	Formül
Birinci derece model	$\log (C_s - C_t) = \log (C_s) - (K_1 t / 2,303)$
İkinci derece model	$t/C_t = 1/C_e + 1/k_2 C_e^2$
Page modeli	$C_t = \exp(-kt^n)$
Peleg modeli	$C_t = t / (K_1 + K_2 t)$
Güç Yasası modeli	$C_t = Bt^n$
Logaritmik model	$C_t = a \log(t) + b$

C_s : Denge anında fenol konsantrasyonu; C_t : t anında fenol konsantrasyonu; k, k_2 , K_1 : Hız sabitleri; K_2 : Peleg kapasite sabiti; a, b, n, B: Model sabitleri; t: ekstraksiyon süresi

2.7.1 Peleg Modeli

Ekstraksiyon eğrileri ektrakte olan toplam fenol konsantrasyonunun zamanla değişiminden oluşur. Bu eğriler sorpsiyon eğrilerine benzer olan Peleg modeli ile temsil edilebilirler [79]. Eşitlik (2.5) ile ifade edilen Peleg modeli, genellikle gıdanın bozulma oranı ve kalitesini ifade etmek için kullanılmaktadır [78].

$$C_t = C_0 + \frac{t}{K_1 + K_2 t} \quad (2.5)$$

Eşitlik (2.5)’te , t: ekstraksiyon süresini (dk), C_t : t anındaki fenol konsantrasyonunu (mg GAE/g), C_0 : başlangıç anındaki fenol konsantrasyonunu ($C_0 = 0$), K_1 : Peleg hız sabitini (dk.g/mg GAE) ve K_2 : Peleg kapasite sabitini (g/mg GAE) temsil etmektedir.

2.7.2 Page Modeli

Page tarafından oluşturulan bu model ekstraksiyon modellemesinde çoğunlukla kullanılmaktadır. Page modeli eşitlik (2.6) ile ifade edilmektedir.

$$C_t = \exp(-kt^n) \quad (2.6)$$

Eşitlik (2.6)'da, k ve n Page model sabitlerini ifade etmektedir.

2.7.3 Logaritmik Model

Bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyon kinetiğini ifade etmek için kullanılan Logaritmik model eşitlik (2.7)'de gösterilmiştir [78]. Eşitlikte a ve b model sabitleridir.

$$C_t = a \log t + b \quad (2.7)$$

2.7.4 Güç Yasası (Power Law) Modeli

Güç Yasası modeli çoğunlukla kimyasal maddenin ya da çözücünün non-swelling cihazlar ile difüzyon sürecini anlamak için uygulanır. Güç Yasası modeli (2.8) eşitliği ile ifade edilmektedir [78].

$$C_t = Bt^n \quad (2.8)$$

Eşitlik (2.8)'de, 'B' denklem sabitini, 'n' difüzyon üssünü temsil etmektedir. Çoğu bitki için "n" değeri birden küçüktür [80].

2.8 Cevap Yüzey Yöntemi (RSM)

İstatistik elde var olan verilerden sonuç çıkarma olarak tanımlanır. İstatistiksel yöntemler kullanılarak verilerin doğru yorumlanması, gözlemlerden sonuç çıkarılması, deneylerin planlanması ve tasarlanması sağlanır. İstatistiksel yöntemlerle minimum zaman, para ve malzeme ile hedeflenen sonuçlara düşük hata oranı ile ulaşılması bu yöntemlere olan talebi artırmıştır [81].

Cevap yüzey yöntemi 1951 yılında Box ve Wilson tarafından kimya mühendisliğinde optimizasyon için matematiksel ve istatistiksel yöntemlerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak geliştirilmiştir [82]. Cevap yüzey yöntemi, bağımsız değişkenlerin belirlenmesi, bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini gösteren ampirik model denklemlerinin oluşturulması ve istenilen yanıt için bağımsız değişkenlerin seviyelerinin belirlenmesi için uygulanan optimizasyon

yöntemlerini içermektedir. Asıl kullanım amacı bağımsız değişkenlerin birbirleri ile ilişkilerinin belirlenmesi ve faktörlerden etkilenen yanıt yüzeyinin optimum değerlerinin belirlenmesidir [83].

Cevap yüzey yönteminin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır.

Avantajları;

- Deney sayısının azlığı ile zamandan tasarruf sağlanması ve bu duruma bağlı maliyetlerin düşmesi
- Minimum deney ile maksimum bilginin sağlanması
- Faktörlerin birbiri ile etkileşimlerinin incelenebilmesi
- Faktörlerin yanıt üzerindeki etkilerinin oluşturulan model denklemi ile açıklanabilmesi

Dezavantajı ise model denklemlerinin doğrusal olmayan süreçleri açıklayamamasıdır. Örneğin simetrik olmayan fonksiyonlar ve hiperbolik fonksiyonlar bu yöntem ile modellenemezler [84].

Cevap yüzey yönteminde bağımsız değişkenler (faktörler) ve bunların seviyeleri belirlenerek uygun deney tasarımı seçilir. Uygun model denklemi regresyon analizi ile oluşturulur. Model denklemindeki katsayıların (regresyon katsayıları) değerleri oldukça önemlidir. Regresyon katsayılarının değerleri ile faktörlerin yanıtı olan etkilerinin ne ölçüde önemli olup olmadığı belirlenir. Regresyon model denkleminin uygun olup olmadığını anlamak için varyans analizi (ANOVA), model, model uygunsuzluğu testleri gerçekleştirilir. Model uygunluğuna karar verildikten sonra cevabın en yüksek ya da en düşük olduğu optimum değerler için deney parametreleri belirlenir. Son adım olarak deney parametrelerinin cevap üzerindeki etkileri üç ya da iki boyutlu grafiklerle gösterilir [85].

Cevap yüzey yönteminin bu aşamaları 4 başlık altında özetlenebilir. Bunlar [86] ;

1. Deney tasarım
2. Model denkleminin oluşturulması
3. Model uygunluğunun test edilmesi
4. Optimizasyon

2.8.1 Deney Tasarımı

İstatistiksel analizin en önemli basamağı olan deneysel tasarım ile deney sayısı minimumda tutularak zamandan tasarruf sağlanmasının yanında geleneksel yöntemlerin aksine bağımsız değişkenlerin birbirleri ile etkileşimlerinin sonuca etkisi de incelenebilmektedir. Geleneksel yöntemlerde bir bağımsız değişkenin sonuç üzerindeki etkisi belirlenirken diğer bağımsız değişkenler sabit tutularak bir seferde sadece tek değişken etkisi incelenebilmektedir. Bu nedenle bütün bağımsız değişkenlerin etkileri sonuç üzerinde aynı anda incelenemez. Deneysel tasarım ile proseste yapılması gereken değişiklikler var ise belirlenebilir [87] [88].

Deneysel tasarım yöntemlerinde kullanılan tasarım terminolojisine ait ifadeler aşağıda açıklanmıştır.

Faktör (bağımsız değişken): Değişimleri ile deney sonucunu etkileyen ama birbirlerinden bağımsız değiştirilebilen değişkenlerdir.

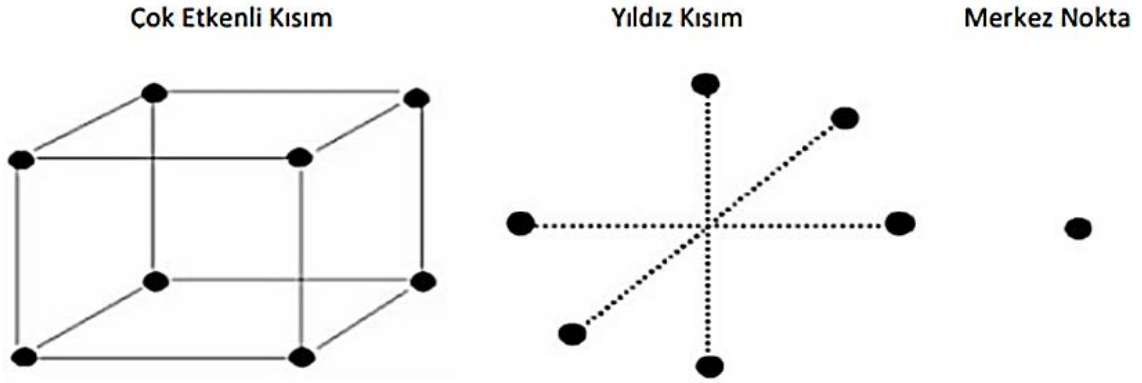
Seviye: Herbir faktör bölümü.

Cevap: Deney sonuçları.

Cevap yüzey yönteminde yaygın olarak kullanılan deneysel tasarımlar Box-Behnken ve Merkezi Kompozit tasarımlarıdır. Bu tasarımlar ile faktör ile cevap arasında doğrusal olmayan, yapısında ikinci dereceden ifadelerin bulunduğu modeller elde edilebilir [81].

- **Merkezi Kompozit Tasarım**

Bu tasarım ile 2. derece yanıt yüzeyi oluşturulur. Faktörler en az üç seviyede olmalıdır. Merkezi kompozit tasarım Şekil 2.12'de gösterildiği gibi 2^k tane çok etkenli kısım yani köşe noktaları (fraksiyonel faktöriyel noktalar), $2k$ tane yıldız kısım, başka bir ifade ile tasarım merkezine eşit mesafede olan eksen noktaları ve merkez noktadan oluşmaktadır [83].



Şekil 2.12 Merkezi kompozit tasarım bölümleri [88]

Merkezi kompozit tasarım için toplam deney sayısı eşitlik (2.9) ile belirlenmektedir.

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad (2.9)$$

Eşitlik (2.9)'da;

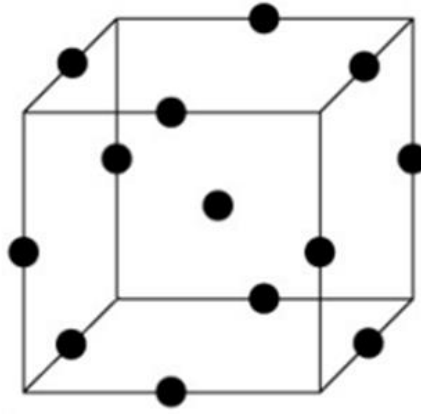
N: deney sayısı

k: değişken sayısı

n_0 : merkez nokta için deney tekrarı sayısıdır [83].

• Box-Behnken Tasarımı

1960 yılında Box ve Behnken tarafından geliştirilen tasarımda faktörler en az üç seviyede (-1, 0, 1) incelenmektedir. Bu tasarım Merkezi kompozit tasarım ile karşılaştırıldığında daha az deney gerektirmekte, buna bağlı olarak zamandan ve maliyetten tasarruf edilmektedir. Box Behnken tasarımında Şekil 2.13'te gösterildiği gibi köşe noktalarda deney gerçekleştirilmemektedir. Başka bir ifade ile -1, 0, 1 seviyelerinin en yüksek ve en düşük seviye noktaları tek bir deney setinde bir arada bulunmamaktadır. Deney setleri merkez tekrarları ve küp kenarlarının ortasından oluşmaktadır (Tablo 2.9). Böylece uç noktalardan gelen tahmin dışı cevapların sistemi olumsuz etkilemesinin önüne geçilmektedir. 3 faktörlü (A, B, C), 3 seviyeli (-1, 0, 1), merkez seviyesinde (0, 0, 0) tekrar deney sayısının bir olduğu Box-Behnken deney tasarımı plan örneği Tablo 2.9'da gösterilmiştir [81] [83].



Şekil 2.13 Box-Behnken deney noktalarının kübik şekli [87]

Tablo 2.9 Box-Behnken deney planı (3 faktörlü) [87]

Deney No	A	B	C
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	-1	0	-1
4	-1	0	1
5	0	-1	-1
6	0	-1	1
7	0	0	0
8	1	-1	0
9	1	1	0
10	1	0	-1
11	1	0	1
12	0	1	-1
13	0	0	0

Bu tasarım yöntemi diğer yöntemlere kıyasla daha az deney gerektirmesi, uygulanabilirliği ve verimliliği ile, hammadde ve zamanın kıymetli olduğu kimya mühendisliği, biyoteknoloji, eczacılık gibi alanlarda çok tercih edilmektedir [83].

2.8.2 Model Denkleminin Oluşturulması

Model denkleminin oluşturulması ile faktörlerin cevap üzerindeki etkilerinin ne ölçüde etkili olduğu belirlenmiş olur. Model denklemleri regresyon analizi ile oluşturulmaktadır [83]. Model denklemleri farklı türlerde olabilirler. Cevap faktörün lineer bir fonksiyonu şeklinde ise 1. dereceden polinom denklemler uygun modeller olmaktadır. Eğer cevap yüzeyinde eğrilik mevcut ise 2. dereceden polinom ya da daha yüksek dereceli denklemler uygulanmaktadır. 2. dereceden denklemler 1. dereceden denklemlere kıyasla daha avantajlı özelliklere sahip olmaları nedeni ile daha çok tercih edilirler. 2. dereceden model denklemleri eğrilik tahminlemede yeterlilik gösterirken 1. dereceden modeller bu anlamda eksiktir.

Ayrıca 2. derece modeller sahip oldukları esneklik ile farklı fonksiyonel formlara dönüşebilmekte, böylece gerçek cevap daha kolay şekilde oluşturulmakta, denklem katsayıları en küçük kareler yöntemi ile kolay belirlenmekte ve bir maksimum ya da bir minimum noktaya sahip olmaları ile optimum değerler kolaylıkla tespit edilmektedir. Cevap yüzey yöntemini uygulatan çoğu programlar 2. dereceden polinom denklemleri uygulamaktadırlar. Koşulların 2. dereceden denkleme uygun olmadığı durumlarda ya faktörlerin aralıkları değiştirilir veya cevap ya da faktörlerin transformasyonu gerçekleştirililerek 2. dereceden model ile ifade edilmesi sağlanır [82].

Cevap ile faktörler arasındaki ilişki genel olarak eşitlik (2.10) ile ifade edilmektedir.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) + \varepsilon \quad (2.10)$$

(2.10) eşitliğinde Y cevabı, f gerçek cevap fonksiyonunu, $X_1, X_2, \dots, X_n$ faktörleri, ε deneysel hatayı temsil etmektedir.

Cevap ile faktörler arasındaki ilişki 1. dereceden modellerle eşitlik (2.11)'de gösterildiği şekilde ile ifade edilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon \quad (2.11)$$

(2.11) eşitliğinde Y cevabı, β_0 model sabitini ve $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ lineer etkiyi ifade eden regresyon katsayılarını, $X_1, X_2, \dots, X_n$ faktörleri, ε deneysel hatayı temsil etmektedirler [89].

Cevap ile faktörler arasındaki ilişki 2. dereceden modellerle eşitlik (2.12)'de gösterildiği şekilde ile ifade edilmektedir.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2.12)$$

(2.12) eşitliğinde Y cevabı, β_0 model sabitini, β_i lineer etkiyi ifade eden regresyon katsayısını, β_{ii} kuadratik etkiyi ifade eden regresyon katsayısını, β_{ij} etkileşim terimlerindeki etkiyi gösteren regresyon katsayısını, X_i, X_j faktörleri, ε deneysel hatayı temsil etmektedirler [83] [86].

2.8.3 Model Uygunluğunun Test Edilmesi

Regresyon modeli belirlendikten sonra bu denklemin ilişkiyi açıklamada ne ölçüde uygun olduğuna karar verebilmek için bazı istatistiksel analizler yapılmalıdır. Elde edilen cevap yüzey modelinin uygunluğu uygulanan deney tasarım metoduna, deney sonuçlarındaki hataya ve doğru deney modelinin seçilip seçilmediğine bağlıdır. Varyans analizi başka bir ifade ile ANOVA günümüzde en yaygın uygulanan istatistik analizdir. ANOVA analizinde yer alan terimlerin anlamları aşağıda açıklanmıştır [82] [83] [90] .

Toplam karelerin toplamı (SST) hata kareleri toplamı (SSE) ile model kareleri toplamının (SSM) birleşimidir (2.13).

$$SST = SSE + SSM$$

SST eşitlik (2.13)'te gösterildiği gibi hesaplanmaktadır.

$$SST = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \quad (2.13)$$

(2.13) eşitliğinde n gözlem sayısını, y_i cevabı, $\bar{y}$ cevapların ortalamasını ifade etmektedir.

Ortalama kare değerleri (mean square, MS) kareler toplamlarının serbestlik derecelerine bölünmesi ile elde edilir. Bu şekilde modelin ortalama kare değeri (MSM) ve hata karelerinin ortalama kare değeri (MSE) hesaplanır [81].

(2.14) eşitliği yardımıyla hesaplanan MSM ve MSE'nin birbirine oranlanması ile F değeri elde edilir [90].

$$F = \frac{MSM}{MSE} \quad (2.14)$$

Elde edilen F değerinin değerlendirilebilmesi için anlamlılık düzeyi (önem seviyesi) belirlenmelidir. Yaygın olarak kullanılan anlamlılık düzeyi 0,05'tir. 0,05 anlamlılık düzeyi deneylerin %95 güven aralığında gerçekleştirildiğini ve geriye kalan %5'in kabul edilebilir hata seviyesi olduğunu ifade etmektedir. Hesaplanan F değeri, seçilen anlamlılık düzeyine bağlı F tablolarından okunan F_{kritik} değeri ile karşılaştırılır. Eğer hesaplanan F değeri F_{kritik} 'ten büyükse oluşturulan model denkleminin sistem için uygun olduğu anlamı çıkarılır. Eğer hesaplanan F değeri

F_{kritik} değerinden küçükse bazı faktörler model denkleminden çıkarılmalı ya da anlamlılık düzeyi değiştirilerek hesaplanan F değeri büyütülmeye çalışılarak modelin anlamlı olması sağlanmalıdır. Eğer hala istenilen seviyeye ulaşılmadıysa model denklemini değiştirilmelidir [90]. Hesaplanan F değerinin büyüklüğü model ve parametrelerin daha güvenilir ve parametrelerin sisteme etkisinin çok daha fazla olduğunu göstermektedir. [83].

%CV varyasyon katsayısını ifade etmektedir. %CV hata varyasyonunun ortalamaya bağlı bir ölçüsüdür ve (2.15) eşitliği kullanılarak hesaplanmaktadır [90]. Varyasyon katsayısı en düşük 0 en yüksek 100 değerine sahip olmaktadır. Değerin sıfırdan uzaklaşması güvenilirliği azaltmakta ve deneylerin tekrarlanması gerektiğini göstermektedir. Varyasyon katsayısının %10'nun altında olması model denkleminin kabul edilebilirliğini göstermektedir [2].

$$\%CV = \frac{\hat{\sigma}}{\bar{y}} \times 100 \quad (2.15)$$

(2.15) eşitliğinde deney verilerinin ortalamasını, $\hat{\sigma}$ ifadesi deneysel ve model denkleminin kaynaklanan (lack of fit) hatayı temsil etmektedir.

p değeri yani olasılık ifadesi eğer model ve parametreler için 0,05'ten (seçilen anlamlılık düzeyinden) küçükse ($p < 0,05$ significant, anlamlı) o modelin ve parametrelerin anlamlı olduğunu yani model denkleminin kullanılabilir ve terimlerinde etkili olduğunu göstermektedir. $p > 0,05$ (not significant, anlamsız) olduğu durum ise güven aralığının dışına çıkıldığından modelin ve parametrelerin anlamlı olmadığını yani etkili olmadığını göstermektedir [83] [87].

R^2 (determinasyon katsayısı) parametrelerin yanıt yüzeyindeki değişkenliğinin azalmasının ölçüsünü temsil etmektedir. R^2 değeri 0 ile 1 aralığındadır ve değerin 1'e yakın olması arzulanmaktadır. R^2 'nin 1 olması modelin hedef alandaki değerleri mükemmel bir şekilde ifade ettiğinin göstergesidir. Determinasyon katsayısı (2.16) eşitliği kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$R^2 = \frac{SSM}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (2.16)$$

R^2 'yi bire yakınlıktır modelde değişken eklenmesi (istatistiksel olarak anlamsız değişkende olabilir) ile kolaylıkla sağlanabildiğinden yanıltabilen bir değerdir. Modele eklenen bağımsız değişken sayısının da dikkate alındığı eşitlik (2.17) ile

hesaplanan düzenlenmiş determinasyon katsayısı (adj-R^2) kullanılması tavsiye edilmektedir.

$$\text{Adj-R}^2 = 1 - \frac{f_x}{f_y} (1 - R^2) \quad (2.17)$$

R^2 'nin aksine eğer modele eklenen değişkenler istatistiksel olarak anlamsız ise adj-R^2 değeri azalacaktır. Düzenlenmiş R^2 her zaman R^2 'den küçük veya ona eşittir. Değeri sıfırın altına düşebilir [83]. R^2 ile adj-R^2 arasında farkın çok büyük olmaması beklenir. Bu durumun tersi mevcutsa modelde anlamsız değişkenlerin olduğu düşünülmelidir [90].

Yeterli tahminleme (adequate precision) sinyal-gürültü oranını ifade etmektedir. Tahmin edilen değerlerin aralığını karşılaştırarak tasarımda ortalama tahmin hatasını göstermektedir. Değerinin 4'ten büyük olması arzulanmaktadır [90].

Uyumsuzluk (lack of fit) modelin matematiksel yapısının uygunsuzluğundan dolayı oluşan hatayı ifade etmektedir. Hata sadece deney sırasında yapılan hatadan değil modelin uygunsuzluğundan da kaynaklanmakta, buna bağlı modelden hesaplanan tahmini değerler ile deneysel değerler arasında fark oluşmaktadır. Lack of fit testi ile modelden kaynaklanan hata değeri verilmekte ve bu değer (p değerinin) 0,05'ten büyük olması arzulanmaktadır. Böylece model için hatanın anlamsız (not significant) olduğu tespit edilir ve bu durum olması gerektirir. Bu durumun aksine istatistiksel olarak ANOVA analizi sonucunda modelin p değerinin 0,05'ten küçük yani anlamlı (significant) olması gerekmektedir [82].

Model uygunsuzluğu, deneysel çalışma sonucunda elde edilen yanıtların ortalaması ($\bar{y}_l$) ile modelden elde edilen yanıtların ($\hat{y}_l$) arasındaki farkın karesi hesaplandıktan sonra tüm gözlem sayıları (n) için toplanması ile ifade edilmektedir (2.18).

$$\text{SSLOF} = \sum_{l=1}^n n_l (\bar{y}_l - \hat{y}_l)^2 \quad (2.18)$$

Yukarıda açıklanan ANOVA analizi istatistiksel terimlerinin hesaplamaları Tablo 2.10'da özetlenmiştir [90].

Tablo 2.10 ANOVA analizindeki istatistiksel terimler

Varyasyon Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Değeri	F değeri
Model	$SSM = \sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$f_x = p-1$	$MSM = SSM/f_x$	MSM/MSE
Hata	$SSE = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$	$f_y = n-p$	$MSE = SSE/f_y$	
Uyumsuzluk (Lack of fit)	$SSLOF = \sum_{i=1}^n n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	f_z	$MSLOF = SSLOF / f_z$	$MSLOF/MSE$
Toplam	$SST = SSM + SSE$	$f_t = n-1$	SST/f_t	

*p: model denklemindeki katsayı sayısı

Model uygunluğu analizinden sonra üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri çizilmektedir. Bu grafikler ile parametrelerin birbirleri ile ilişkisi ve parametrelerin yanıt yüzeyine olan etkileri incelenmektedir [83].

2.8.4 Optimizasyon

Prosesi daha verimli duruma ulaştırmak için gerçekleştirilen optimizasyon hedeflenen kriterleri maksimum ya da minimum değerlere ulaştırmak için bağımsız değişkenlerin değiştirilmesini içermektedir. Elde edilen regresyon modeli ile optimizasyon işlemi yapılabilir [88].

2.9 Konuyla İlgili Yapılan Çalışmalar

Bu bölümde, zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu ile ilgili literatürde yer alan bazı çalışmalar incelenmiş ve aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Kashaninejad ve arkadaşları (2020) yaptıkları çalışmada, İspanyadan, İrandan budama işlemi sonrası ve İrandaki yağ fabrikasından yan ürün olarak açığa çıkan zeytin yapraklarını kullanmışlardır. Yaprak kaynağının ve ekstraksiyon yönteminin zeytin yaprağı ekstraktındaki biyoaktif bileşen miktarını ne ölçüde etkilediğini, ayrıca dondurarak kurutmanın elde edilen ekstrakt üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Geleneksel çözücü ekstraksiyonunda 50°C'de 1 saat boyunca ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve ekstraksiyon çözeltisinden periyodik olarak

numuneler alınmıştır. Çözücü olarak farklı oranlarda etanol içeren (%100, %80, %50, %20 ve %) etanol-su karışımı kullanılmıştır. Çalışmada en yüksek toplam fenolik madde miktarı İspanya zeytin yapraklarında $37.6 \pm 0,8$ mg GAE/g kuru yaprak olarak, %80 etanol-sukarışımı ile elde edilmiştir. Bu koşullarda en yüksek oleuropein ve luteolin-7-Oglukozid içeriği 31 ± 2 ve $4,1 \pm 0,2$ mg/g kuru yaprak olarak belirlenmiştir. Çalışmada uygulanan ultrason destekli ekstraksiyonda ise çözücü olarak su kullanılmış ve işlem 50°C 'de gerçekleşmiştir. Ultrason daha hızlı toplam fenolik miktar ekstraksiyonuna yol açmış ancak geleneksel ekstraksiyona ile aynı ekstraksiyon verimine ulaşılmıştır. Araştırmacılar, Güç Yasası ve Weibull modellerinin ekstraksiyon kinetiğini açıkladığını bildirmişlerdir. En yüksek antioksidan değeri İspanya cinsi yapraklar için $62,2 \pm 0,2$ mg Trolox/g kuru yaprak olarak bulunmuştur. Çalışma sonucunda dondurularak kurutulmuş ekstraktın antioksidan aktivitesini iki ay boyunca korunduğu belirlenmiştir [7].

Margarita ve arkadaşları (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, İspanya'dan toplanan zeytin yaprakları 120°C 'de sıcak havayla ve dondurularak kurutulmuştur. Yapraklardan ekstraktlar meserasyon yöntemi (etanol-su, 80:20, v/v) ile elde edilmiştir. Elde edilen ekstraktların bir kısmı 120°C 'de sıcak havayla, bir kısmı ise 55°C 'de vakumla kurutulmuştur. Sıvı ve toz formdaki ekstraktlar 4, 25 ve 35°C 'de 4 hafta boyunca depolanmıştır. Çalışmada saklama koşullarının (sıcaklık ve ekstrakt formu) ekstraktların antioksidan aktivitesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Zeytin yapraklarının sıcak hava ile 120°C derecede kurutulması ile en yüksek antioksidan ve toplam fenolik madde miktarı elde edilmiştir. En yüksek değerin sıcak hava ile elde edilmesinden dolayı sadece sıcak hava ile kurutulmuş zeytin yaprağı ekstraktlarının sıcak hava ve vakum altında kurutulması yapılmış ve sırası ile 7,60 mg GAE/ml, 7,33 mg GAE/ml toplam fenolik madde miktarı elde edilmiştir. Antioksidan değerleri ise sırasıyla 12,1 mg Trolox/ml özü, 12,4 Trolox/mL özü olarak belirlenmiştir. Ekstraktların sıvı ya da toz formda olmasının ve depolama sıcaklığının fenolik madde miktarını etkilemediği belirlenmiştir [91].

Şahin ve arkadaşları (2017), Avşa adasında yetiştirilen Gemlik çeşidi zeytin yapraklarına uygulanan kurutma yöntemlerinin (mikrodalga, vakum, oda koşullarında, dondurarak ve fırında kurutma) toplam fenolik bileşen miktarına (TPC) ve oleuropein miktarına etkilerini incelemişlerdir. Mikrodalga yöntemi

uygulanması için cevap yüzey yöntemi kullanarak merkezi kompozit merkezli deneysel tasarım metodu gerçekleştirmişlerdir. Mikrodalga gücüne karar verebilmek için 200, 400, 600, 800 W değerlerinde kurutma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 400 W'tan sonra özellikle 800W'ta kurutmanın çok kısa bir sürede (2,5 dakika) gerçekleştiği rapor edilmiştir. Ancak oleuropein bileşeni aşırı ısınmaya dayanamadığından çalışma için uygun mikrodalga gücü aralığı 200-600 W olarak belirlenmiştir. Deneysel tasarım faktörlerinin mikrodalga gücü (300, 400, 500 W), katı kütlesi (1,5, 2, 2,5 g) ve kurutma zamanı (4, 5, 6 dakika) olduğu, üç faktör-üç seviyeli toplam 20 deney gerçekleştirmişlerdir. Kurutulan zeytin yaprakları 32 ml 50 %v/v metanol içeren çözeltide homojenizatör destekli ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Çalışma sonucunda en fazla fenolik madde (39,36 mg GAE/g kuru yaprak) ve oleuropein miktarına (210,65 mg/g kuru yaprak) 400 W, 1,5 gram katı kütlesi ve 5 dakika kurutma süresinin kullanıldığı deney setinde ulaşılmıştır. Mikrodalga gücünün arttırılması başta toplam fenolik bileşen ve oleuropein miktarını arttırırken, yaklaşık 450 W'tan sonra sıcaklıktaki hızlı artış nedeni ile biyoaktif bileşiklerin bozulmaya başlaması sonucunda fenolik bileşen ve oleuropein miktarlarında düşüş görüldüğü belirtilmiştir. En yüksek TPC ve oleuropein miktarı için optimum mikrodalga gücü 459,257 W olarak belirlenmiştir. Katı kütlesinin artması, TPC ve oleuropeinde hafif bir azalmaya neden olmuş ve maksimum TPC ve oleuropein miktarı için 2,085 g katı kütlesi optimum değer olarak belirlenmiştir. Mikrodalga kurutma süresinin artması ise TPC ve oleuropeinin az da olsa artmasına neden olmuştur. En yüksek TPC ve oleuropein miktarı için optimum mikrodalga kurutma zamanı 6 dakika olarak belirlenmiştir. Mikrodalga kurutma ile diğer kurutma yöntemleri karşılaştırıldığında TPC ve oleuropein miktarı büyükten küçüğe şu şekilde sıralanmıştır; mikrodalga kurutma > dondurarak kurutma > vakum kurutma > fırında kurutma > oda koşullarında kurutma. Dondurarak kurutmada oleuropein miktarında mikradalga kurutmaya göre %5'lik bir düşük belirlenmiştir. Bu nedenle mikrodalga yönteminin diğer kurutma yöntemlerine göre daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır. Dondurarak kurutmanın mikrodalga harici diğer yöntemlere kıyasla daha iyi sonuç vermesi bitkinin yapısında oluşan buz kristalleri ile bitki dokularının daha fazla bozulması ve düşük moleküler maddelerin difüzyonunun daha çok gerçekleşmesi olarak açıklanmıştır. Fırında kurutmada oleuropein miktarının %38 oranında azalmasının enzimatik olmayan oksidasyondan kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir. Oda

koşullarında kurutmada oleuropeindeki azalma %57 olarak rapor edilmiş ve bu durumun nedeni kurutma süresinin uzun sürmesine bağlı olarak oksijene aşırı maruz kalma olarak açıklanmıştır. Oda koşullarında kurutmada TPC değeri mikrodalga kurutmaya yakın bir değer bulunmuş bu durum oksidatif ve hidrolitik enzimlerin deaktive olması ile fenolik bileşiklerin kaybının önlenmiş olması şeklinde yorumlanmıştır. Araştırmacılar belirlenen optimum değerlerde (459,257 W, 2,085 g katı kütlesi, 6 dakika kurutma süresi) gerçekleştirdikleri deney sonucunda 38,712 mg GAE/g kuru yaprak TPC ve 203,561 mg/g kuru yaprak oleuropein elde etmişlerdir [92].

Hashemi ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada İran'da yetiştirilen zeytin yapraklarının toplanma zamanına göre yapılarındaki oleuropein miktarının değişimi incelemişler ve oleuropeinin soğuk mevsim ve tropik bölgelerde, sıcak mevsim ve ılıman bölgelere göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [93].

Abaza ve arkadaşları (2011) Borj-Cédria Biyoteknoloji Merkezinde bulunan bir meyve bahçesinden temin ettikleri Chetoui çeşidi zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonunda çözücü türünün fenolik bileşen miktarına etkisini incelemişlerdir. Çözücü olarak deiyonize su, %80 metanol, %70 etanol ve %80 aseton kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen toplam fenolik bileşen miktarının 16,52-24,93 mg GAE/g kuru yaprak aralığında değiştiği ve en fazla toplam fenolik bileşen miktarının metanol çözücüsü kullanılarak elde edildiği bildirilmiştir [94].

Garro ve arkadaşları (2022), İspanya Navarre'deki yağ fabrikasından temin ettikleri zeytin yapraklarının TPC ve oleuropein miktarına yaprak çeşidi ve uygulanan kurutma yönteminin etkisini incelemişlerdir. Çalışmada vakum kurutma, fırında kurutma, dondurarak kurutma ve oda koşullarında kurutma yöntemleri, Arroniz, Empeltre, Arbosana, Picual, geleneksel 'Arbequina' ve ekolojik 'Arbequina' yaprak türlerine uygulanmıştır. İki farklı senede toplanmış taze yaprakların TPC değeri her iki sene içinde ölçülürken sadece ikinci yılda toplanan numuneler kurutulmuştur. Oleuropein miktarı isentaze ve kurutulmuş numuneler için sadece ikinci yılda toplanan yapraklar için belirlenmiştir. Farklı senelerde toplanan taze yapraklar için oleuropein ve TPC değerlerinde ciddi bir fark görülmemiştir. Yapraklar homojenizatör ekstraksiyonu ile 70:30 oranında metanol /su oranında 4 ml çözücüde, 800 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında ekstrakte edilmiştir. Taze zeytin

yapraklarının $15,0 \pm 0,7$ ile $37,4 \pm 2,0$ mg GAE/g kuru yaprak aralığında TPC içerdiği bildirilmiştir. Taze yaprakta en fazla TPC $34 \pm 1,1$ mg GAE/g kuru yaprak değeri ile Arbosana çeşidi için elde edilmiştir. Geleneksel ($26,2$ mg GAE/g kuru yaprak) ve ekolojik Arbequina'lar ($26,6$ mg GAE/g kuru yaprak) için birbirine yakın TPC değerlerinin elde edildiği bildirilmiştir. Kurutma uygulanan yapraklarda TPC değerleri $6,0 \pm 1$ - $46,1 \pm 2,8$ mg GAE/g kuru yaprak aralığında bulunmuştur. Kurutma yöntemleri arasında en yüksek TPC $46,1 \pm 2,8$ mg GAE/g kuru yaprak değeri ile dondurularak kurutulmuş ekolojik Arbequina için elde edilmiştir. Vakum kurutmada en yüksek TPC değeri Arbosana çeşidi için $35,4 \pm 2,0$ mg GAE/g kuru yaprak olarak elde edilmiştir. Fırında ve oda koşullarında kurutmada ise en yüksek TPC değeri ekolojik Arbequina çeşidi için sırası ile $37,0 \pm 2,0$ ve $45,4 \pm 6,6$ mg GAE/g kuru yaprak olarak elde edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde kurutmanın TPC üzerinde pozitif anlamda etkili olduğu görülmüştür. Çalışmada oleuropein miktarının taze yapraklarda çok az görüldüğü ($0,05$ - $0,8$ mg/g kuru yaprak), kurutulmuş yapraklarda ise $0,2 \pm 0,0$ - $40,1 \pm 2,1$ mg/g kuru yaprak aralığında değiştiği bildirilmiştir. Kurutma yöntemlerinin etkisi oleuropein miktarı açısından kıyaslandığında en fazla miktarın oda koşullarında gerçekleştirilen kurutmada elde edildiği bildirilmiştir (Picual, $40,1 \pm 2,1$ mg/g kuru yaprak). Çalışmada geleneksel 'Arbequina' hariç, incelenen zeytin yapraklarının neredeyse tamamı için, oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının, vakumla kurutulan, fırında kurutulan veya dondurularak kurutulan yapraklara göre daha fazla TPC ve oleuropeine sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle çalışmada en uygun kurutma yöntemi olarak oda koşullarında kurutma seçilmiştir. Oda koşullarında kurutulmuş yapraklar arasında ekolojik 'Arbequina' için elde edilen TPC ve oleuropein miktarları diğer yaprak türlerine göre daha fazla olduğu için ekolojik 'Arbequina' değerli bileşen ekstraksiyonu için en uygun yaprak çeşidi olarak seçilmiştir. Bu çalışmada kurutulmuş yapraklarda TPC ve oleuropein değerlerinin taze yapraklara göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu durum, kurutmanın bitkisel dokulara hasar vererek ekstraksiyon işleminde çözücünün yapraklara daha iyi nüfuz etmesi ve buna bağlı daha fazla bileşen aktarımının sağlanması olarak açıklanmıştır [95].

Afaneh ve arkadaşları (2015), Filistin (Beit Sahour, West Bank)'deki zeytin ağaçlarından topladıkları yaprakların kurutulmasının ve ekstraksiyonda kullanılan

çözücü türünün oleuropein içeriğine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada, zeytin ağaçlarından Kasım ayının ortasında toplanan yapraklar oda sıcaklığında (25°C) ve 50°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Kurutulan, ağaçtan kuru (esmerleşmiş) olarak toplanılan ve taze yaprakların oleuropein içeriği HPLC analizi ile belirlemiştir. Taze zeytin yaprakları etil asetat, 80:20 etanol/su, 20:80 asetonitril/su çözücüleri ile Sokselet ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiştir. Çalışmada taze yapraklar için elde edilen oleuropein miktarı kullanılan çözücü türüne göre şu şekilde sıralanmıştır; 20:80 oranında asetonitril/su (19,0±0,21 mg/g yaprak) > 80:20 etanol/su (15,6±0,16 mg/g yaprak) > etil asetat (0,19±0,01 mg/g yaprak). Oleuropeinin polar hidroksil gruplara sahip olması nedeni ile çözünürlüğü polar çözücülerde daha iyi olmaktadır. Asetonitril ve etanol çözücüler ise etil asetata kıyasla daha polar çözücülerdir ve bundan dolayı da oleuropein eldesinde daha etkili oldukları belirtilmiştir. Kurutulmuş ve toz formuna getirilmiş yapraklar 20:80 oranında asetonitril/su çözücü ile Soxhlet ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiştir. En yüksek oleuropein içeriğine oda koşullarında kurutma (10,0±0,26 mg/g) ile ulaşılırken en düşük değerin 50°C sıcaklıkta (1,7±0,13 mg/g) gerçekleştirilen kurutma için elde edildiği bildirilmiştir. Dalında kurumuş yapraklar için 2,5±0,21 mg/g oleuropein elde edilmiştir. Dalında kurumuş olan yaprakların esmer görüntüsü, oleuropein ile difenol oksidazın etkileşimi ile esmerleşmenin gerçekleşmesi olarak açıklanmıştır. Taze yaprakların oleuropein içeriğinin kurutulmuşlara kıyasla düşük bulunması kurutulmuş yaprakların toz haline getirilerek yüzey alanının artırılmış olması, taze yaprakların yüzey alanının bu durumun aksine daha küçük olmasından çözücünün yapraklara nüfus etmesinin zorluğu ve bu nedenle oleuropeinin yaprak içerisinde korunmuş olması ile açıklanmıştır. Yüksek oleuropein geri kazanımı için yaprakların oda koşullarında kurutulması önerilmiştir [96].

Malik ve Bradford (2008), yüksek sıcaklıkta (40°C) havayla kurutmanın, oleuropein ve diğer polifenollerin bozulmasından dolayı önemli miktarda polifenol kaybına yol açtığını bildirmişlerdir [97].

Adnany ve arkadaşları (2023) Fas'ın Marakeş kentindeki Fas pikolin çeşidi zeytin yapraklarından fenolik bileşen eldesinde ekstraksiyon koşullarının etkisini incelemişlerdir. Bağımsız değişkenler olarak ekstraksiyon süresi (30,45,60 dakika), numune/çözücü oranı (5, 12,5, 20 ml/g) ve çözücü oranı (20, 60, 100 (%v/v) etanol) seçtikleri çalışmalarında Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi ile prosesin

optimizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Yapraklar ultrason destekli ekstraksiyon işleminden önce fırında 80°C’de 5 saat kurutulup toz forma getirilmiştir. Optimum koşullar 53,52 dakika ekstraksiyon süresi, 9,83 ml/g numune/çözücü oranı ve 59,7 (%v/v) etanol konsantrasyonun olarak belirlenmiştir. Optimum koşullarda; TPC 74,45±1,22 mg GAE/g kuru yaprak, toplam flavonoid (TFC) 17,08±1,85 mg EC/g kuru yaprak ve antioksidan aktivitesi DPPH ile %83,45±0,89, ABTS ile %82,85±1,52, FRAP yöntemi ile ise %85,01±2,35 olarak bildirilmiştir. Numunesıvı oranının 12,5 ml/g’a çıkarılmasının polifenol ve flavonoid içeriğinde ve antioksidan aktivitesinde bir artışa neden olduğu, 30 ve 45. dakikaların flavonoidler ve DPPH için özellikle etkili olduğu rapor edilmiştir. %60 etanol içeren numunelerin en yüksek TPC, TFC, DPPH, ABTS ve FRAP değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir [11].

Mylonaki ve arkadaşlarının (2008), zeytin yaprakları üzerine gerçekleştirdikleri çalışmada %40, %50 ve %60 etanol konsantrasyonları kullanarak toplam fenol içeriği belirlenmiş ve %50 etanol oranının fenolik madde miktarında en düşük değeri verdiği rapor edilmiştir. Etanol oranının artması ya da azalmasının zeytin yapraklarından fenolik madde ekstraksiyonunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir [99].

Elboughdiri (2018) çalışmasında, etanol konsantrasyonun, ekstraksiyon sıcaklığının ve katı/çözücü oranının toplam fenolik madde miktarına etkisini incelediği çalışmada %50, %60 %70 ve %80 (%v/v) oranlarında etanol çözücüleri kullanmıştır. Çalışma sonucunda bu etanol oranları için yakın toplam fenolik madde miktarı değerlerine ulaşıldığı, %50 ve %70 oranlarının %60 ve %80 oranlara nazaran fenolik madde miktarını az bir fark olsa da daha çok arttırdığı bildirilmiştir. Katı/çözücü oranının etkisini incelemek için iki farklı deney seti hazırlamıştır. İlk deney seti için deney koşulları katı/çözücü oranı 20, ekstraksiyon sıcaklığının 20°C ve etanol konsantrasyonun %60, ikinci deney seti için deney koşulları katı/çözücü oranı 30, ekstraksiyon sıcaklığı 40°C ve etanol konsantrasyonu %80 olarak belirlenmiştir. Çalışmada 50 saat boyunca ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, 10. 20. 30. 40. ve 50. saatlerde ekstraksiyon çözeltilerinden alınan numunelerin toplam fenolik madde miktarı analiz edilmiştir. İki deney setinde de en yüksek fenol içeriği 1. set için yaklaşık 20 mg kafeik asit/g kuru yaprak, 2. set için yaklaşık 30 mg kafeik asit/g kuru yaprak olarak 20. saatte elde

edilmiştir. Parametre değerlerinin artırılması ile daha fazla fenolik madde elde edilebileceği sonucuna varılmıştır [100].

Şahin ve Şamlı (2013) yaptıkları çalışmada zeytin yapraklarına uyguladıkları ultrason destekli ekstraksiyon işleminde yanıt yüzey metodu kullanarak ekstraksiyon parametrelerini optimize etmişlerdir. Çalışmada bağımsız değişkenler olarak etanol konsantrasyonu (0, 50, 100 (%v/v)) katı/çözücü oranı (500/10, 500/15, 500/20 mg/ml) ve ekstraksiyon süresi (20,40,60 dakika) kullanılmıştır. Öngörülen optimum çalışma koşulları 500/10 mg/ml katı/çözücü oranı, %50 etanol konsantrasyonu ve 60 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir. Bu koşullar için 201,22 ml/g kuru yaprak ekstraksiyon verimi, 25,06 mg GAE/g kuru yaprak toplam fenolik madde miktarı, %95,56 antioksidan kapasitesi rapor edilmiştir. Etanol konsantrasyonunun etkisi incelendiğinde en yüksek değere %50 etanol oranında ulaşıldığı %100 etanol oranında da yakın bir sonuç elde edildiği bildirilmiştir. Suyun (en polar çözücü olmasına rağmen) ve saf etanolün tek başına iyi performans gösterememesi suyun yüksek viskozitesine bağlı olarak kütle aktarımını zorlaştırması bu sebeple fenolik bileşiklerin geçişinin zorlaşması olarak yorumlanırken, %50 alkol konsantrasyonunda ekstraksiyon veriminin artması suyun bitki materyalini şişirme özelliğinden yararlanılarak alkolün ortam viskozitesini düşürmesi ve bitki matrisindeki bağları bozması sonucunda bir denge sağlandığı şeklinde açıklanmıştır. %100 etanol konsantrasyonunda antioksidan kapasitenin diğer konsantrasyonlara oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. En düşük antioksidan kapasitesinin saf su kullanıldığı durumlarda elde edildiği bildirilmiştir. Katı/çözücü oranının artmasının ekstraksiyon verimini ve toplam fenolik madde miktarını azalttığı fakat antioksidan kapasitesini etkilemediği rapor edilmiştir. Çalışmada zamanın artmasının toplam fenolik madde miktarını arttırdığı ancak 40. dakikadan sonra antioksidan kapasitesinde düşüşe neden olduğu bildirilmiştir. Bu düşüş ultrason destekli ekstraksiyon işleminde zamanın artmasına bağlı numunenin ısınması ve antioksidan etkinin bozulması olarak yorumlanmıştır. Deney koşullarında belirlenen maksimum süre olan 60 dakikaya kadar tüm deney setleri için toplam fenolik madde miktarının arttığı gözlenmiştir. Sürenin uzatılması ile daha fazla fenolik madde elde edilebileceği ancak bu durumun ekonomik olarak negatif etki yaratacağı bildirilmiştir [101].

Ahmad-Qasem ve arkadaşları (2016) tarafından zeytin yaprakları üzerine gerçekleştirilen çalışmada çözücü olarak 80:20 oranında etanol/su kullanılmış ve elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı 66 mg/g olarak rapor edilmiştir. Aynı zamanda ultrason destekli ekstraksiyonda yalnızca su çözücüsünün kullanımını incelediklerinde ekstraksiyon süresinin kısa olduğu durumda fenolik bileşiklerin eldesinde suyun etkili bir çözücü olduğunu bildirilmişlerdir. Metanol ile ekstraksiyon veriminin yüksek olmasına rağmen metanolün yüksek toksisite etkisinden dolayı daha güvenilir bir çözücü ile çalışılması gerektiğini bildirmişlerdir [91].

Şahin ve arkadaşları (2015) zeytin yapraklarından fenol ve flovonoidlerin ultrason destekli ekstraksiyonuna ekstraksiyon parametrelerinin etkisini cevap yüzey yöntemi kullanarak incelemişlerdir. 0,5 gram kurutulmuş zeytin yaprağı 10 ml etanol çözeltisinde, ultrasonik banyoda ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmada sıcaklık (27, 32, 37°C), etanol konsantrasyonu (10, 40, 70 %v/v) ve ekstraksiyon zamanı (30, 45, 60 dakika) faktörleri 3 seviyede incelenmiştir. TPC ve TFC değerlerinin sıcaklıktan pozitif etkilendiği, TPC değerinin alkol oranının %10'dan %40'a artması ile arttığı alkol oranı %70'e çıkarıldığında ise azaldığı, TFC değerinin ise alkol oranı arttıkça artış gösterdiği, zaman artışının TPC ve TFC'yi arttırdığı bildirilmiştir. Çalışmada ekstraksiyon süresinin uzatılmasının, fenolik bileşiklerin oksidasyonuna ve kimyasal reaksiyonuna neden olabileceği belirtilmiştir. Araştırmacılar DPPH analizi ile antioksidan kapasitesinin %89,3-90,5 aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonucunda maksimum TPC (43,8252 mg GAE/g kuru yaprak) için optimum proses koşulları; 34,18°C sıcaklık, 43,61 % (v/v) etanol oranı ve 59,99 ekstraksiyon süresi olarak, maksimum TFC (31,99 mg CE/g kuru yaprak) için ise optimum proses koşulları; 34,44°C sıcaklık, 60 dakika ekstraksiyon süresi ve %70 etanol konsantrasyonu olarak belirlenmiştir [103].

3.1 Malzeme

Çalışmada kullanılan zeytin yaprakları Türkiye’de bulunan Balıkesir ili Edremit ilçesinden temin edilmiştir.

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; etil alkol ve sodyum karbonat Merck, Folin-Ciocalteu reaktifi ve gallik asit Sigma Aldrich, sodyum hidroksit J.T. Baker firmasından temin edilmiştir.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Zeytin yapraklarının kurutulmasından, ekstrakte edilip, analizlerin yapılmasına kadar kullanılan cihazlar aşağıda belirtilmiştir.

- Mikrodalga fırın (Samsung MS23K3515)
- Ultrasonik banyo (Bandelin Sonorex)
- Hassas terazi (Ohaus Pioneer)
- Orbital çalkalayıcı (WiseShake SHO-1D)
- Çalkalamalı inkübatör (IKA KS4000i)
- UV spektrofotometre (Analytic Jeva Specord 200)
- FTIR spektroskopisi (Bruker Alpha)
- HPLC (Shimadzu Nexera XR)
- Kahve öğütücü (Bosch MKM6003)

3.3 Yöntemler

Fenolik bileşiklerin miktarı ve kalitesi uygulanan ekstraksiyon ve kurutma yöntemlerinden ve parametrelerinden etkilenmektedir.

Bu çalışmada;

- Taze, oda koşullarında kurutulmuş ve farklı güç seviyelerinde mikrodalga yöntemi ile kurutulmuş zeytin yaprakları
- Etanol oranı
- Ekstraksiyon süresi

parametrelerinin zeytin yapraklarından ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarına etkisi araştırılmıştır. Parametre ve seviyeleri literatürde yapılan çalışmalar dikkate alınarak belirlenmiştir.

Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda metanol, etanol, su gibi çözücüler yaygın olarak kullanılmaktadır. Metanolla yapılan çalışmalarda yüksek toplam fenolik bileşen miktarı elde edilmiş olmasına rağmen, yüksek toksik etkilerinden dolayı zararlı bir çözücü olduğu için bu çalışmada metanol tercih edilmemiştir. Etanol fenolik bileşik eldesinde en yüksek afinitiyeye sahip olması ile ilk tercih sebebidir [104]. Bu çalışmada, daha az organik çözücü kullanılarak maksimum toplam fenolik madde tayini gerçekleştirmek amaçlanmıştır. Bu nedenle çözücü olarak, farklı oranlarda etanol içeren (0-50 %v/v) etanol-distile su karışımı kullanılmıştır. Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde, genel olarak etanol oranının %50'nin üzerine çıktığı durumlarda toplam fenolik içerik azalmıştır. Örneğin Şahin ve arkadaşlarının (2015), Şahin ve arkadaşlarının (2013) çalışmalarında sırası ile (%10, 40, 70) ve (%0, 50, 100) etanol oranları ile çalışmış ve ilk çalışmada %40 etanol oranından sonra ikinci çalışmada ise %50 etanol oranından sonra toplam fenolik bileşen miktarında düşüş görülmüştür [101] [103]. Bu çalışmalar ve incelenen diğer benzer çalışmalar sonucunda etanol oranı etkisinin 0-50 %v/v aralığında incelenmesine karar verilmiştir.

Şahin ve arkadaşlarının (2018) 200, 400, 600, 800 W seviyelerinde mikrodalga güçlerinin etkilerinin incelendiği çalışmada 400 W'tan sonra oleuropein ve toplam fenolik bileşen miktarının azaldığı bildirilmiştir [92]. Gamlı ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında 52, 90, 167, 290, 347 W seviyelerinde kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda 167 W'a kadar toplam fenolik bileşen miktarı artarken bu seviyeden sonra düşüş görülmüştür [105]. Akbaş ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında 180, 360 ve 540 W güçlerinde kurutulan zeytin yaprakları arasından 540 W gücünde kurutulan yaprakların en fazla toplam fenolik bileşen içerdiği belirtilmiştir [106]. Bu çalışmada ise kullanılacak olan mikrodalga güç seviyeleri 180, 300, 450, 600 W olarak belirlenmiştir.

Ekstraksiyon süresinin artışının toplam fenolik bileşen ve oleuropein miktarını arttırması ve genellikle çalışmaların maksimum 1 saate kadar gerçekleştirilmiş olması sebebi ile bu çalışmada daha uzun ekstraksiyon sürelerinin denenmesine karar verilmiş ve ekstraksiyon süreleri 1, 2, 3 saat olarak alınmıştır [11] [101] [103].

3.3.1 Zeytin Yapraklarının Hazırlanması

Zeytin yapraklarındaki toz ve kirliliği ortadan kaldırmak için yapraklar çeşme suyu ile yıkanmış ardından kurutma kağıdı ile kalan su uzaklaştırılmıştır. Mikrobiyal fermentasyonun önüne geçmek, fenolik bileşiklerin bozulmasını önlemek ve ekstraksiyona kurutma yöntemlerinin etkisini incelemek için zeytin yaprakları oda koşullarında (gölgede) ve mikrodalga fırında kurutulmuştur [96]. Yapraklar oda koşullarında kurutulurken doğrudan güneş ışığına maruz bırakılmadan sabit tartıma gelene kadar kurutulmuştur. Mikrodalga fırında ise belli güç seviyelerinde sabit tartıma gelene kadar kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutulan numuneler kahve öğütücüde küçük parçalar haline gelene kadar öğütülmüştür. Taze zeytin yaprakları analiz zamanına kadar 4°C’de buzdolabında saklanmıştır. Kurutulan yapraklar oda sıcaklığında, nemsiz ve kapalı ortamda saklanmıştır. Taze ve kurutulmuş zeytin yaprakları Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 (a): taze yaprak; (b): kurutulmuş yaprak

3.3.2 Kurutma Deneyleri

Yaklaşık 2,50 g zeytin yaprağı oda koşullarında iki saatte bir tartılarak sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş ve tartımlar not edilmiştir. Mikrodalga fırında ise 180, 300, 450, 600 W güçlerinde dakikada bir tartılarak sabit tartıma gelene kadar kurutulmuş ve tartımlar not edilmiştir.

3.3.2.1 Nem İçeriğinin Hesaplanması

Zeytin yapraklarının kurutulması sırasında belirli zamanlarda tartımları alınan numunelerin nem içeriği (3.1) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$M_t = \frac{m - KM}{KM} \quad (3.1)$$

Eşiklik (3.1)'de;

M_t : Herhangi bir t zamanındaki nem içeriğini, $kg_{su} / kg_{kuru\ madde}$

m: Numune ağırlığını (g)

KM: Numunenin içeriğindeki kuru madde kütlesini (g)

ifade etmektedir.

3.3.2.2 Nem Oranın Hesaplanması

Kuruma hızının belirlenmesi için numunelerin nem oranı (3.2) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$M_R = \frac{M_t - M_e}{M_o - M_e} \quad (3.2)$$

Eşitlik (3.2)'de;

M_R : Nem oranını

M_t : Herhangi bir t zamanındaki nem içeriğini, $kg_{su} / kg_{kuru\ madde}$

M_e : Denge anındaki nem içeriğini, $kg_{su} / kg_{kuru\ madde}$

M_o : Başlangıçtaki nem içeriğini, $kg_{su} / kg_{kuru\ madde}$

ifade etmektedir.

Denge anındaki nem içeriği (M_e), M_o ve M_t ile karşılaştırıldığında çok küçük bir değere sahip olduğu için M_e değerinin sıfır kabul edilmesi sonuçları etkilemeyecektir [62]. Bu nedenle bu çalışmada M_e değeri sıfır kabul edilmiştir.

3.3.2.3 Kurutma Kinetiğinin Belirlenmesi

Kurutma kinetiğini belirlemek amacı ile kurutma deneyleri sonucunda elde edilen kinetik verilerin (zamana karşı elde edilen nem oranı değerlerinin) literatürde kurutma kinetiğini ifade etmek için sıklıkla kullanılan ve Bölüm 2.5'te tanıtılan Page, Lewis, Logaritmik, Wang&Sing, Handerson&Pabis, Polinom ve Midilli modellerine uygunluğu test edilmiştir. Modelleme çalışmalarında CurveExpert Basic 2.2 ve Microsoft Excel programları kullanılmıştır.

3.3.2.4 Efektif Difüzyon Katsayısının Hesaplanması

Zeytin yapraklarının kurutulması sırasında suyun malzeme içerisindeki kütle aktarımının ifade edilebilmesini sağlayan efektif difüzyon katsayısı (3.3) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\ln(M_R) = \ln \frac{8}{\pi^2} - \frac{\pi^2 D_{\text{eff}}}{4L^2} t \quad (3.3)$$

Eşitlik (3.3)'te;

M_R : Nem oranını

D_{eff} : Efektif difüzyon katsayısını (m^2/s)

L : Zeytin yapraklarının merkezden yüzeye olan uzaklığını (m) ($L = 0,39 \pm 0,10$ mm)

t : Kuruma süresini (s)

ifade etmektedir [66].

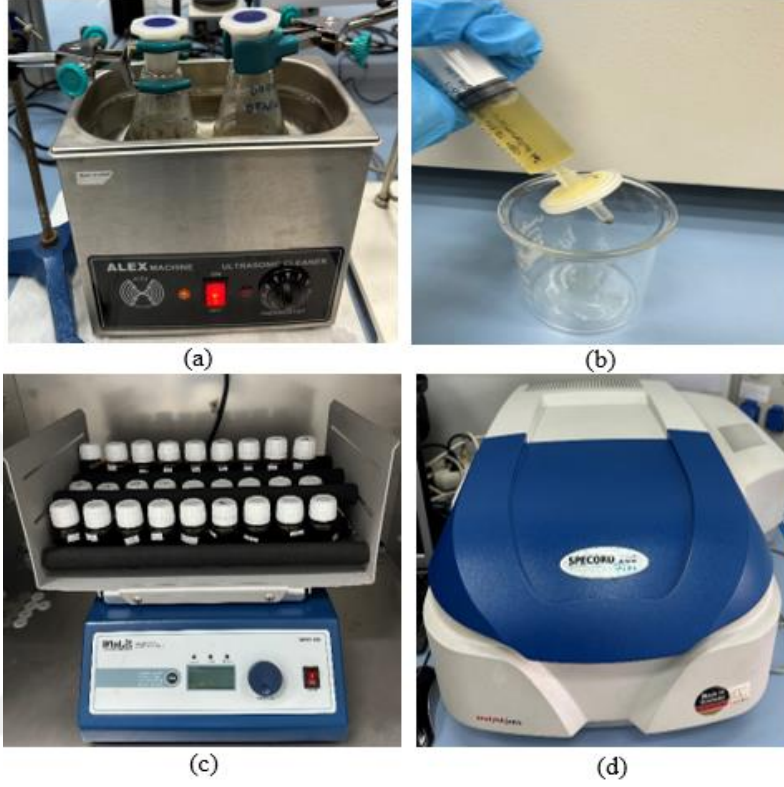
3.3.3 Ekstraksiyon Deneyleri

Taze, oda koşullarında kurutulmuş ve farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyon deneyleri hacimce %0, %25 ve %50 etanol içeren etanol-distile su karışımlarında gerçekleştirilmiştir. 5 gram zeytin yaprağı 100 ml çözücü ortamında 25°C 'de ultrasonik banyoda ekstrakte edilmiştir (Şekil 3.2a). Ekstraksiyon çözeltisinden belirli zamanlarda 0,5 ml numune alınmış ve membran filtreden ($0,45 \mu\text{m}$) geçirilerek toplam fenolik bileşen miktarının belirlenmesi için analize hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2b).

3.3.4 Toplam Fenolik Bileşen Miktarının Belirlenmesi

Toplam fenolik bileşen miktarı gallik asit standartı kullanılarak Folin-Ciocalteu yöntemi [107] ile belirlenmiştir. Bu yöntemle göre ekstraksiyon deneylerinde çözeltiden belirli zamanlarda alınan ve filtreden geçirilen numunelerden 0,1 ml alınarak üzerine 2 ml distile su ve 0,2 ml Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiş ve 5 dakika beklenmiştir. Ardından üzerine %7,5 (w/v)'luk Na_2CO_3 çözeltisinden 1,6 ml ilave edilerek inkübatörde yarım saat karıştırılmıştır (Şekil 3.2c). Karıştırma işleminden sonra numune 2 saat karanlık ortamda bekletilmiş ve absorbans değeri UV spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda okunmuştur (Şekil 3.2d).

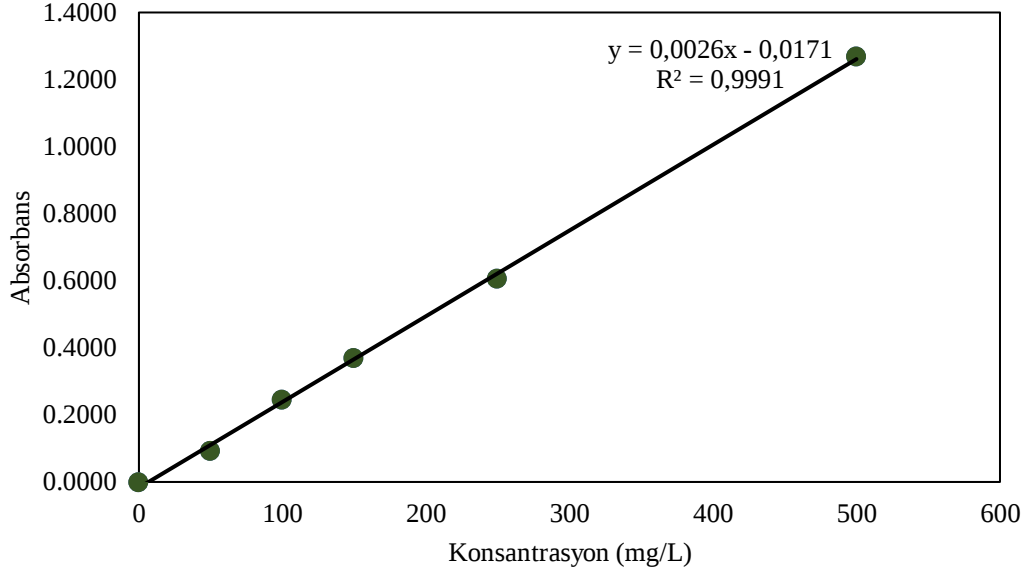
Zeytin yaprağı ekstraktlarının okunan absorbans değerleri, gallik asitle oluşturulan kalibrasyon grafiği kullanılarak toplam fenolik bileşen miktarı (TPC) gram zeytin yaprağı ağırlığı başına miligram gallik asit eşdeğeri olarak tanımlanmıştır (mg GAE/g kuru yaprak).



Şekil 3.2 (a): ultrason destekli ekstraksiyon işlemi; (b): ekstraksiyon sonucunda elde edilen ekstraktın membran filtrede süzülmesi; (c): numunelerin inkübatörde karıştırılması; (d): UV spektrofotometresi ile absorbans değerinin belirlenmesi

3.3.5 Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması

Kalibrasyon grafiği gallik asitin bilinen konsantrasyonları ile oluşturulmuştur. Standart çözeltiler hazırlanırken 100 ml’lik balon jojeye 0,5 gram gallik asit ve 10 ml etil alkol eklenmiştir. Ardından kalan hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır (C: 5000 mg/L). Hazırlanan bu stok çözeltilerden 0, 1, 2, 3, 5, 10 ml alınarak 100 ml’lik balon jöjelere aktarılmış ve kalan hacim distile su ile tamamlanmıştır. Böylece 50, 100, 150, 250, 500 mg/L konsantrasyonlarında 5 standart çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözeltilerin absorbans değerleri UV spektrofotometrede 765 nm’de okunarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Belirli gallik asit konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri ve oluşturulan kalibrasyon grafiği Şekil 3.3’te sunulmuştur.



Şekil 3.3 Kalibrasyon grafiği

3.3.6 Ekstraksiyon Kinetiğinin Belirlenmesi

Zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyon kinetiğini belirlemek amacı ile ekstraksiyon deneyleri sonucunda elde edilen kinetik verilerin Bölüm 2.7’de tanıtilen Peleg, Güç Yasası ve Logaritmik kinetik modellerine uygunluğu test edilmiştir. Modelleme çalışmalarında CurveExpert Basic 2.2 ve Microsoft Excel programları kullanılmıştır.

3.3.7 Ekstraksiyon Deneylerinin Planlanması

Mikrodalga da kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, kurutmada kullanılan mikrodalga gücünün ve ekstraksiyon parametrelerinin etkisi Box-Behnken deneysel tasarım planı oluşturularak incelenmiş ve maksimum fenolik madde miktarı için optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

Toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerine etkisi incelenecek olan proses parametreleri; mikrodalga gücü (A) (180 ± 15 , 300 ± 15 , 450 ± 15 W), etanol oranı (B) (0, 25, 50 %v/v) ve ekstraksiyon süresi (C) (1, 2, 3 saat) olarak belirlenmiştir. 3 faktör ve 3 seviyeli olarak tasarlanan deneyler için faktör ve seviyeleri Tablo 3.1’de, 5 merkez tekrarlı, 17 farklı kombinasyondan oluşan deney seti Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1 Box-Behnken deney tasarımıda kullanılan faktörler ve seviyeleri

Faktörler	Birimler	Faktörlerin Sembolleri	Seviyeler		
			-1	0	+1
Mikrodalga gücü	W	A	180 $\pm$ 15	315 $\pm$ 15	450 $\pm$ 15
Etanol oranı	%	B	0	25	50
Ekstraksiyon süresi	saat	C	1	2	3

Tablo 3.2 Box-Behnken deneysel tasarım deney seti

Deney No	Faktör 1 A: Güç W	Faktör 2 B: Etil alkol oranı %	Faktör 3 C: Ekstraksiyon süresi saat
1	315	25	2
2	180	25	3
3	315	25	2
4	450	25	1
5	315	25	2
6	450	50	2
7	450	0	2
8	315	0	1
9	180	0	2
10	315	50	1
11	315	50	3
12	180	25	1
13	180	50	2
14	315	25	2
15	450	25	3
16	315	25	2
17	315	0	3

3.3.8 Box-Behnken Deneysel Tasarım Deneylerinin Yapılışı

Tablo 3.2’de verilen Box-Behnken deneysel tasarımıdaki her ekstraksiyon deneyi için 250 ml’lik erlene 100 ml çözücü konularak sıcaklık 25°C’ye ayarlanmıştır. Çözücüye 5 g numune (zeytin yaprağı) ilave edilerek erlen ultrasonik banyo içerisine yerleştirilmiş ve ekstraksiyon süresi başlatılmıştır. İşlem süresi sona erdiğinde çözeltiden alınan numuneler membran filtreden geçirilerek analiz edilmiş ve toplam fenolik bileşen miktarı belirlenmiştir. Deneyler ve analizler ikişer kez tekrar edilmiştir.

3.3.9 İstatiksel Analizler

Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için cevap yüzey yöntemine göre Box-Behnken deneysel tasarım planı oluşturulmuş, deney sonuçlarının ve model uygunluğunun değerlendirilmesinde ANOVA kullanılmıştır.

3.4 Analizler

Oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde kurutulan yapraklar için FT-IR analizi ve yapraklardaki oleuropein miktarının belirlenmesi için HPLC analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4.1 FT-IR Analizi

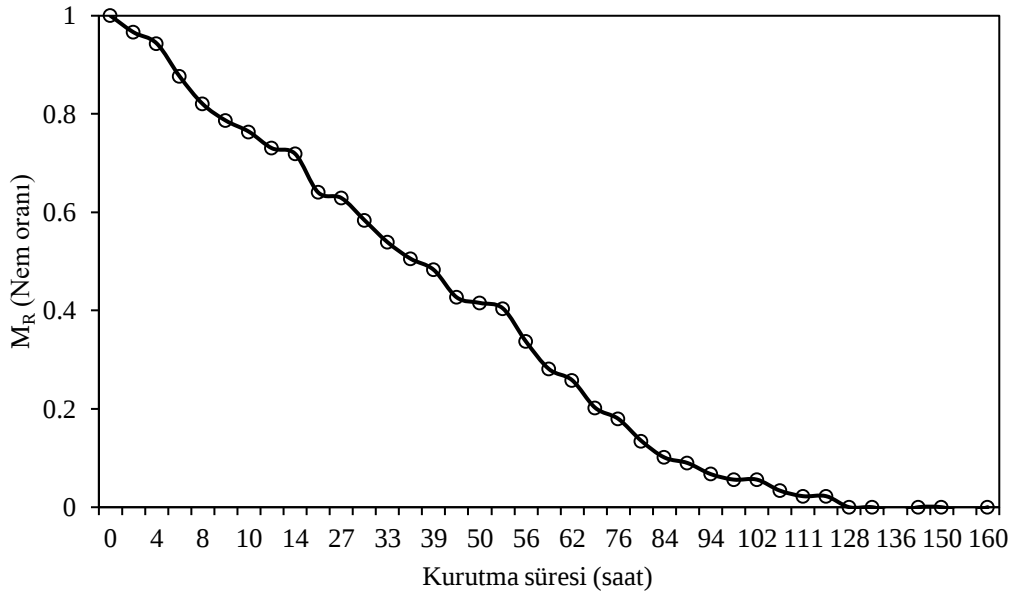
Mikrodalga kurutma yöntemi ile farklı güç seviyelerinde (180, 300, 450, 600 W) ve oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının yapısındaki fenolik bileşenlerin varlığı FT-IR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Böylelikle ısıl işlemin fenolik bileşenlere etkisi incelenmiştir. Numunelerin FT-IR analizleri, Bruker Alpha FT-IR Spektrometresi ile ATR tekniği kullanılarak $650-4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında ve tarama çözünürlüğü 4 cm^{-1} olarak gerçekleştirilmiştir. FT-IR spektroskopisi fenolik bileşik gibi çeşitli biyoaktif bileşenlerin belirlenmesinde hızlı, ekonomik, güvenilir ve kolay bir metot olarak önem kazanmaya başlamıştır.

3.4.2 Oleuropein Miktarının Belirlenmesi

Zeytin yapraklarına uygulanan kurutma yöntemleri yaprakların içeriğindeki oleuropein miktarını etkilemektedir [96]. Bu nedenle bu çalışmada oda koşullarında ve mikrodalga kurutma yöntemi (180, 300 W) kullanılarak kurutulan zeytin yapraklarının yapısındaki oleuropein miktarına kurutma yöntemlerinin etkisi incelenmiştir. Zeytin yapraklarındaki oleuropein miktarı TÜBİTAK Enstrümantal Analiz Laboratuvarında HPLC UV yöntemi ile belirlenmiştir.

4.1 Zeytin Yapraklarının Kurutulması

Zeytin yapraklarından fenol bileşenlerinin ekstraksiyonuna kurutma yöntemi ve parametrelerinin etkisini incelemek amacı ile zeytin yaprakları oda koşullarında ve mikrodalga fırında (180 W-300 W-450 W-600 W) kurutulmuştur. Oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının nem oranının zamanla değişimi Şekil 4.1’de verilmiştir. Yapraklar 6. günde 128. saatte denge nem içeriğine ulaşarak sabit tartıma gelmişlerdir (Şekil 4.1).

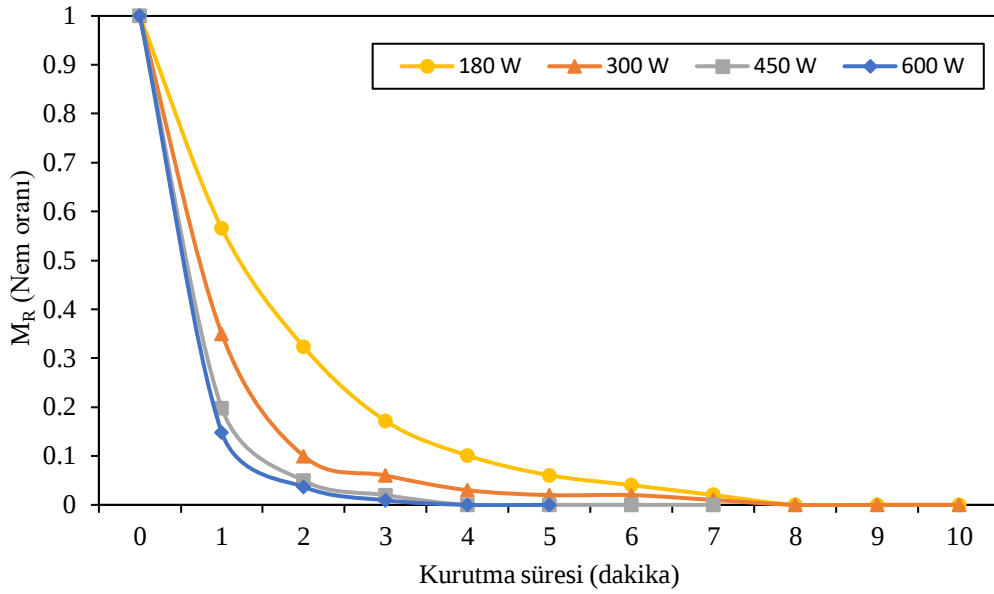


Şekil 4.1 Zeytin yapraklarının oda koşulunda kurutulmasında nem oranının kurutma süresi ile değişimi

Mikrodalga fırında kurutulan zeytin yapraklarının nem oranının zamanla değişimi Şekil 4.2’de verilmiştir. Denge nem içeriklerine 180 W’ta 9 dakikada, 300W’ta 8 dakikada, 450 W’ta 6 dakikada ve 600W’ta 4 dakikada ulaşılmıştır (Şekil 4.2). Kuruma süreleri mikrodalga güç seviyeleri ile ters orantılıdır. Mikrodalga güç seviyesinin 180W’tan 600W’a çıkarılması kuruma süresi %44 oranında azaltmıştır.

Mikrodalga kurutmaya göre oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları daha uzun kurutma süresine sahiptir. Mikrodalga ile kurumanın daha hızlı gerçekleşmesi mikrodalga kurutmada, elektromanyetik dalgalar nedeni ile ısıнын doğrudan

kurutulan ürün içerisinde oluşması ve bu nedenle ürün içerisindeki nemin çok kısa sürede ısınarak buharlaşması ile açıklanabilir.



Şekil 4.2 Mikrodalga fırında kurutulan zeytin yapraklarının nem oranının kurutma süresi ile değişimi

4.2 Kurutma Kinetiğinin Belirlenmesi

Kurutma kinetik modeli, bir malzemenin bağıl nem içeriğini (M_R) kuruma süresiyle (t) ilişkilendiren ve kurutma işlemi sırasında ısı ve kütle aktarım özelliklerine ilişkin bilgi sağlayan matematiksel bir denklemdir. Oda koşullarında ve farklı mikrodalga güçlerinde kurutulan zeytin yapraklarının kurutma kinetiğini belirlemek amacı ile deneylerden elde edilen kinetik verilerin, gıdaların kuruma kinetiklerinin açıklanmasında yaygın olarak kullanılan Page, Lewis, Logaritmik, Wang&Sing, Handerson&Pabis, Polinom ve Midilli modellerine uygunluğu incelenmiştir. Çalışmada kullanılan kinetik modellere ait denklemler, modeller için elde edilen sabitler ve istatistiksel veriler Tablo 4.1’de sunulmuştur.

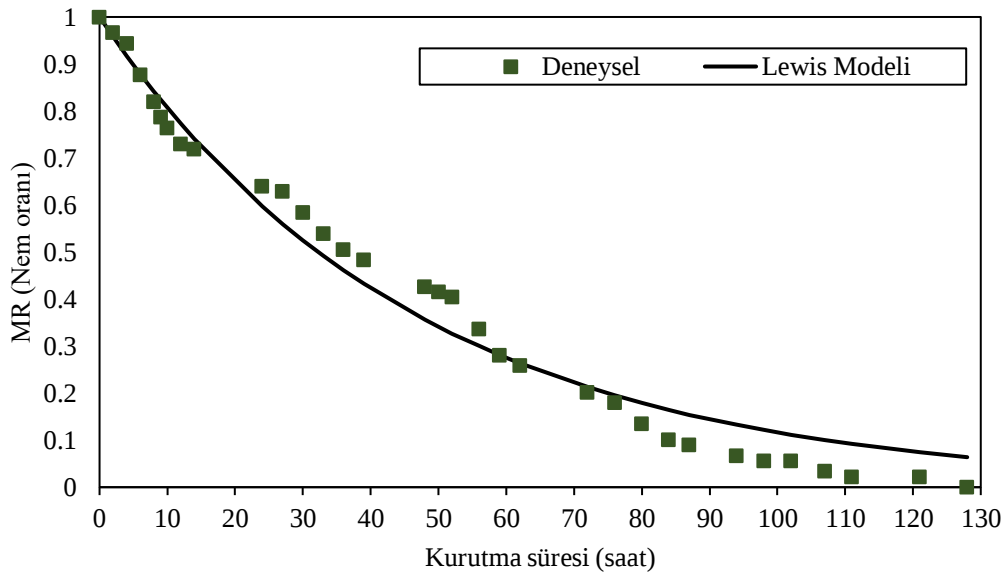
Tablo 4.1 Kurutma kinetiği modelleri, modeller için elde edilen kinetik parametreler ve istatistiksel veriler

Page Modeli					
$M_R = \exp(-kt^n)$					
	Oda koşulları	180 W	300 W	450 W	600 W
K	0,0123	0,5688	1,0742	1,6205	1,9086
N	1,1404	1,0059	0,9509	0,8736	0,7957
SE	0,0458	0,0054	0,0132	0,0036	0,0009
R	0,9904	0,9999	0,9991	0,9999	0,9999
Lewis Modeli					
$M_R = \exp(-kt)$					
K	0,0215	0,5715	1,0589	1,5957	1,8791
SE	0,0502	0,0052	0,0128	0,0067	0,0089
R	0,9881	0,9985	0,9991	0,9999	0,9998
Logaritmik Model					
$M_R = a \exp(-kt) + b$					
A	1,1969	1,0022	0,9922	0,9951	0,9884
K	0,0139	0,5676	1,0891	1,622	1,9678
B	-0,2268	-0,0023	0,0086	0,0046	0,0115
SE	0,0317	0,0054	0,0119	0,0074	0,0081
R	0,9956	0,9999	0,9994	0,9999	0,9999
Henderson & Pabis Modeli					
$M_R = a \exp(-kt)$					
A	1,0108	1,0006	0,9998	0,9995	0,9996
K	0,0217	0,5719	1,0587	1,5951	1,8787
SE	0,0508	0,0054	0,0135	0,0075	0,0110
R	0,9882	0,9998	0,9991	0,9999	0,9982
Wang & Sing Modeli					
$M_R = 1 + at + bt^2$					
A	-0,0158	-0,2716	-0,3491	-0,6492	-0,9627
B	0,0001	0,0167	0,0267	0,0936	0,2147
SE	0,0353	0,1223	0,1868	0,1547	0,1066
R	0,9943	0,9199	0,8089	0,9362	0,9828
Polinom Modeli					
$M_R = 1 + at + bt^2 + ct^3$					
A	-0,0169	-0,4098	-0,5866	-1,0344	-1,4414
B	0,0001	0,0537	0,1025	0,3329	0,6991
C	0,0001	-0,0022	-0,0055	-0,0334	-0,1096
SE	0,0343	0,0446	0,0892	0,0617	0,1132
R	0,9948	0,9907	0,9643	0,9926	0,9692
Midilli Modeli					
$M_R = a \exp(-kt^n + bt)$					
A	0,9321	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
K	0,4473	-184,975	-174,902	-141,458	-125,065
N	1,0108	0,8800	0,8456	0,6954	0,5300
B	0,4470	-185,55	-175,95	-143,07	-126,975
SE	0,0443	0,1290	0,0469	0,0377	0,0384
R	0,9916	0,9272	0,9915	0,9981	0,9989

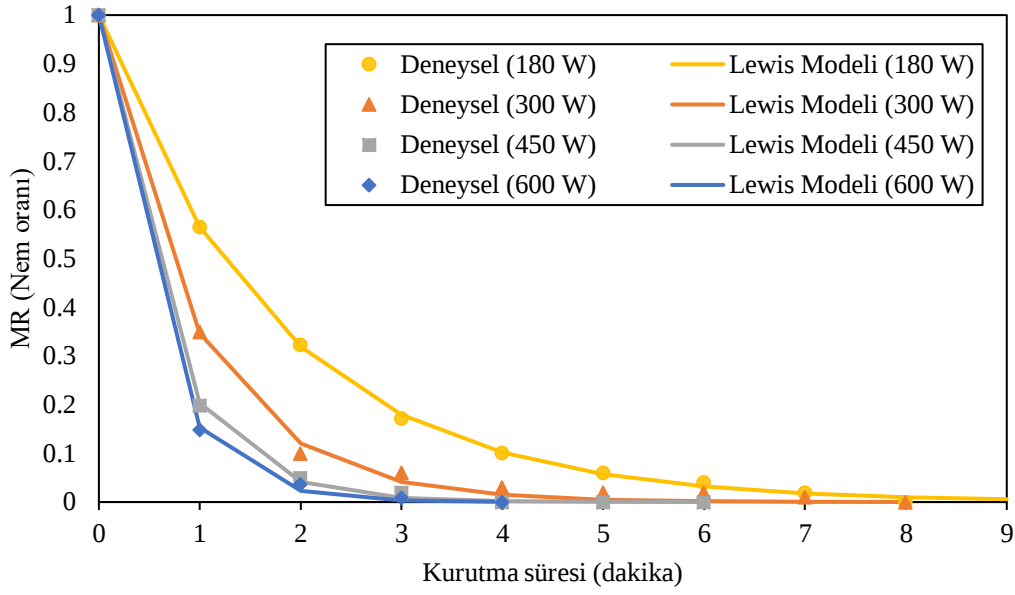
M_R : Nem oranı, k: Kurutma sabiti (dakika^{-1}), n, a, b, c: Model sabitleri, t: Zaman (dakika), SE: Standart hata, r: Korelasyon katsayısı

Deneysel verilere uygunluğu incelenen kinetik modeller için elde edilen korelasyon katsayıları değerlendirildiğinde (Tablo 4.1); Page, Lewis (1. mertebe kinetik modeli), Logaritmik ve Henderson & Pabis modellerinin tüm koşullarda deneysel verilere yüksek oranda uyumluluk sağladığı (dört model için çalışılan tüm koşullar için $r \geq 0,99$), Wang&Singh, Polinom ve Midilli modellerinin de deneysel verilere iyi uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Deneysel verilere yüksek oranda uyumluluk gösteren 4 model arasından 1. mertebeden kinetik model (Lewis Modeli) diğer modellere göre daha basit ve kinetik çalışmalar için daha anlamlı bir model olduğu için zeytin yapraklarının kurutma kinetiğini ifade etmek için en uygun model olarak seçilmiştir. Deneysel verilerin 1. mertebe kinetik modeline uygunluğu Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te grafiksel olarak ayrıca gösterilmiştir.

Lewis modelinde zeytin yapraklarından suyun uzaklaşma hızını temsil eden kuruma hız sabiti (k) değerleri farklı koşullarda gerçekleştirilen kurutma işlemleri için 0,0215-1,5957 dak^{-1} aralığında bulunmuştur. Beklendiği şekilde en düşük k değeri oda koşullarında gerçekleştirilen kurutma işlemi için elde edilirken, mikrodalga kurutmada kurutma gücünün artması ile k değerleri artmıştır. Mikrodalga gücünün artması ile hız sabiti değerinin dolayısı ile kuruma hızının arttığı, mikrodalga gücünün artışı ile daha dik hale gelen kuruma eğrilerinden de (Şekil 4.4) açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.3 Oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için elde edilen deneysel verilerin 1. mertebe kinetik modeline (Lewis modeli) uygunluğu



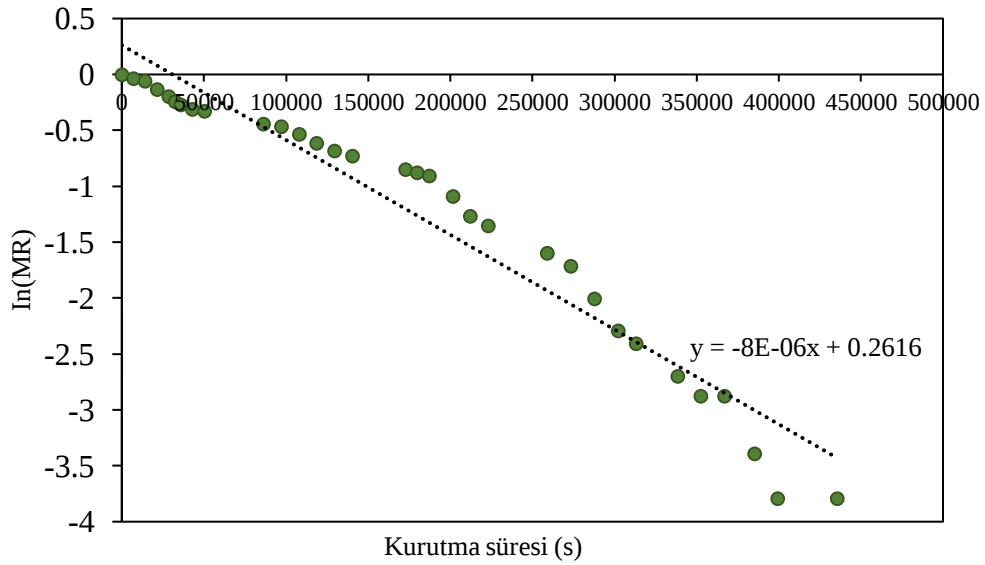
Şekil 4.4 Mikrodalga da kurutulan zeytin yaprakları için elde edilen deneysel verilerin 1. mertebe kinetik modeline (Lewis modeli) uygunluğu

Gamlı ve arkadaşları (2018), Osmaniye-Gemlik çeşidi zeytin ağacı yapraklarının mikrodalga yöntemi ile kurutulmasını inceledikleri çalışmalarında kurutma verilerinin 11 farklı kurutma modeline uygunluğunu test etmişlerdir. Araştırmacılar en düşük kök ortalama kare hatası ve en yüksek regresyon katsayısı değerlerini Page modeli için elde ettiklerini bildirmişlerdir [105]. Erbay ve İçier (2007), Memecik tipi zeytin yapraklarını 50°C’de tepsili kurutucuda farklı hava hızlarında (0,5-1,5 m/s) kurutmuşlardır. Kurutma verilerine 11 farklı kurutma modelinin uygunluğunu incelemişler ve Henderson & Pabis modelinin en uygun model olduğunu bildirmişlerdir [10].

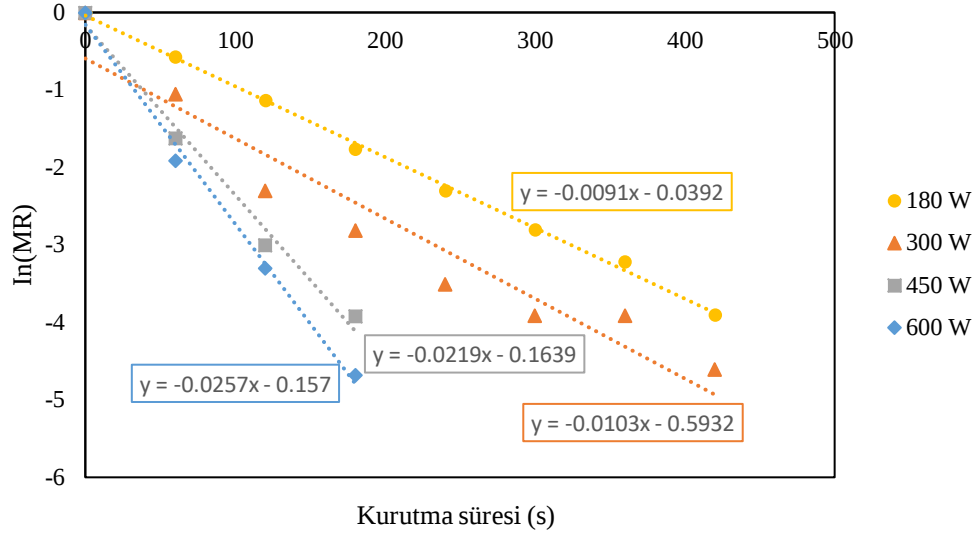
4.3 Zeytin Yaprakları için Efektif Difüzyon Katsayısının Belirlenmesi

Oda koşullarında ve farklı mikrodalga güçlerinde kurutulan zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı, $\ln(MR)$ değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği çizilerek bulunmuştur (Eşitlik 3.3). Grafiklerdeki doğruların eğimleri ile D_{eff} değerleri belirlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı $5,19 \cdot 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ olarak belirlenmiştir. Farklı güç seviyelerinde mikrodalga da kurutulan zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayıları ; $5,90 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (180 W), $6,68 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ (300 W), $1,42 \cdot 10^{-9}$

m^2/s (450 W), $1,62 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ (600 W) olarak belirlenmiştir. Mikrodalga gücünün artması ile efektif difüzyon katsayısı artmıştır. Bu durum, yüksek mikrodalga gücünün yoğun ısı oluşumu meydana getirmesi ile zeytin yaprakları içerisinde su buhar basıncının artması ve basınç etkisiyle gözeneklerin açılarak suyun difüzyonun kolaylaşması olarak açıklanabilir [65]. En düşük efektif difüzyon katsayısı oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarında görülmüştür. Oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için doğrusallıktan hafif sapma mevcuttur (Şekil 4.5). Bu duruma kurutma sırasında nemin eşit olmayan dağılımı ve efektif difüzyon yayılımının nem içeriğiyle değişmesi neden olmuş olabilir [64]. Gamlı ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında farklı mikrodalga güçlerinde kurutulan Gemlik çeşidi zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı $2,65 \cdot 10^{-10}$ - $6,87 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ aralığında hesaplanmıştır. Erbay ve Icier (2010) çalışmalarında ise farklı sıcaklıklarda kurutulan Memecik çeşidi zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı değerlerini $1,05 \cdot 10^{-9}$ - $4,97 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ aralığında bulmuştur [108]. Bahloul ve arkadaşları ise Chemlali, Chemchali, Chetoui ve Zarrazi çeşidi zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı değerlerini $3,44 \cdot 10^{-10}$ - $2,43 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$ aralığında hesaplamışlardır [109]. Boukhiar ve arkadaşlarının (2022) çalışmasında ise, Chemlal çeşidi zeytin yaprakları farklı sıcaklıklarda kurutulmuş ve artan kurutma sıcaklığı ile efektif difüzyon katsayısı değerlerinin arttığı ve bu değerlerin $6,36 \cdot 10^{-12}$ - $2,42 \cdot 10^{-11}$ aralığında olduğu bildirilmiştir [111].



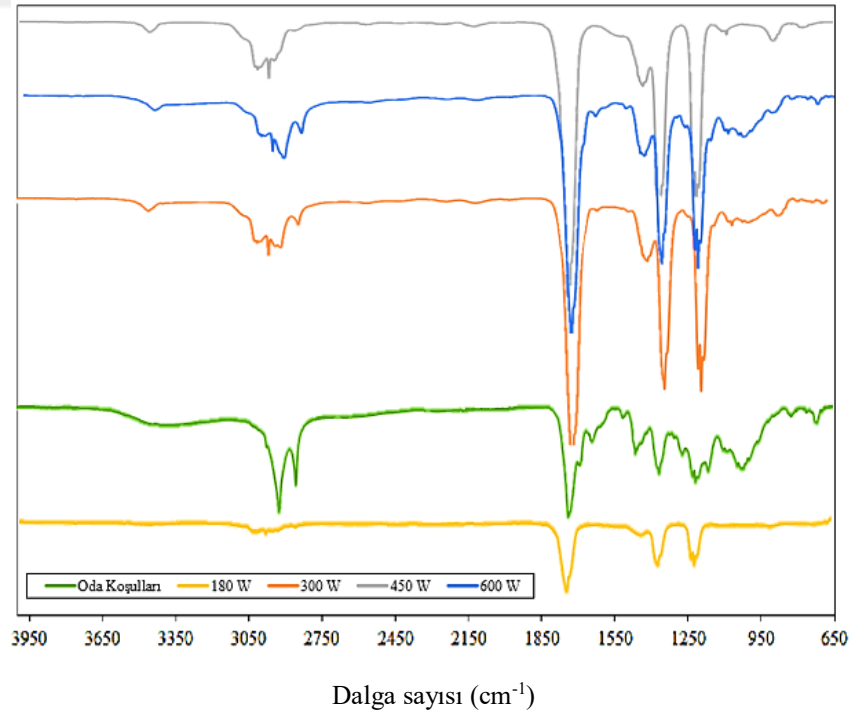
Şekil 4.5 Oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının $\ln(M_R)$ değerlerinin kurutma süresi ile değişimi



Şekil 4.6 Mikrodalga da 180 W, 300 W, 450 W ve 600 W'ta kurutulan zeytin yaprakların $\ln(MR)$ değerlerinin kurutma süresi ile değişimi

4.4 Fenolik Bileşik Değişiminin FT-IR Spektroskopisi Kullanılarak Belirlenmesi

Oda koşullarında ve farklı mikrodalga güçlerinde (180, 300, 450, 600 W) kurutulan zeytin yapraklarına ait FT-IR spektrumu Şekil 4.7’de birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.7 Oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde (180 W, 300 W, 450 W, 600 W) kurutulan zeytin yapraklarının FT-IR analiz sonucu

Şekil 4.7’de verilen FT-IR spektrumları değerlendirildiğinde tüm spektrumların birbirine benzer ortak absorpsiyon bantlarının olduğu fakat şiddetlerinin farklılaştığı görülmektedir. Pik şiddetlerinin farklılığı ve bazı piklerin olmaması kurutma yöntemi ve parametrelerinin farklılığının zeytin yapraklarının yapısındaki fenolik bileşenleri az da olsa etkilediğini göstermiştir. 3400 cm^{-1} civarında görülen geniş orta şiddetli pik fenol grubunun O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. Organik ve inorganik maddelerde çoğunlukla gözlenir [112]. Zeytin yapraklarında görülmesi yapısındaki oleuropein, selüloz, asitler vb. grupların varlığından kaynaklıdır [112] [113] .

$3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki zayıf pikler uzun zincirli alifatik C-H gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. 3000 cm^{-1} civarında görülen pikler aromatik C-H gerilmelerinden kaynaklanmaktadır. 2970 cm^{-1} civarında simetrik CH_3 ’ün, 2920 cm^{-1} civarında asimetrik CH_2 ’nin, 2850 cm^{-1} civarında ise simetrik CH_2 ’nin C-H gerilmeleri görülmektedir [114] [113] [115]. Gün ışığı ve 180 W kurutma pikleri diğerlerine nazaran daha düşük şiddetlidir.

$1800 - 750\text{ cm}^{-1}$ (parmak izi bölgeleri) bölgesinde bulunan bantlar, bitkilerdeki fenolik bileşiklerden kaynaklanır [116]. 1738 cm^{-1} dalga sayısı civarında görülen şiddetli keskin pik C=O gerilme titreşimlerini göstermektedir [115]. 1735 cm^{-1} civarındaki titreşimler esterlerin C=O gerilme titreşimlerine atfedildiğinden muhtemelen zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin ester yapıları C=O titreşimlerine neden olmaktadır. Oda koşullarında ve 180 W’ta kurutulmuş yaprakların pik şiddeti diğerlerine göre daha düşüktür.

Esterler, aromatik halka, asit, karboksilat vb. C=C gerilme titreşimlerine neden olarak 1640 cm^{-1} civarında zayıf pik oluşturmuştur [112]. 180 W ve 450 W kurutmalar için bu aralıkta pik oluşmamıştır.

$1500\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığı O-H deformasyon titreşimleri, C-H ve C-O (fenoller) gerilme titreşimlerini içerdiğinden oldukça karışık bir aralıktır. $1428\text{-}1515\text{ cm}^{-1}$ aralığındaki pikler C-C gerilmelerinden kaynaklı oluşmuştur. 1365 cm^{-1} ’de görülen orta şiddetli keskin pik C-H eğilme titreşimlerine atfedilmiştir. 1228 cm^{-1} civarında görülen keskin orta şiddetli pik O-H bükülme titreşimidir [112] [115]. Bu aralıkta oda koşulları ve 180 W piklerinin şiddetlerinin düşük olduğu görülmüştür.

1200-1009 cm^{-1} aralığındaki pikler C-O-C bükülme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır [112]. 1216 cm^{-1} civarında görülen orta şiddetli (300 W, 450 W, 600 W) keskin pik C-O-C bükülme titreşimlerinden oluşmuştur.

1150-950 cm^{-1} arasındaki yoğun bantlar karbonhidratların endosiklik ve ekzosiklik C-O gerilme titreşimlerinden karşılık gelmektedir [113].

833 cm^{-1} civarında ise fenolik bileşiklerden kaynaklı pikler görülmektedir. Bu piklerin C-H düzlemdışı gerilme titreşimlerini temsil ettiği ifade edilmiştir [112]. Bu çalışmadaki 900 cm^{-1} civarındaki zayıf piklerin C-H düzlemdışı bükülme pikleri olduğu düşünülmektedir.

4.5 Zeytin Yapraklarındaki Oleuropein Miktarının Belirlenmesi

Oda koşullarında, 180 W ve 300 W güçlerinde kurutulan zeytin yapraklarının içeriğindeki oleuropein miktarı HPLC analiziyle sırası ile 7,5 mg/g, 251,0 mg/g ve 297,4 mg/g olarak belirlenmiştir. En düşük oleuropein miktarı oda koşullarında kurutmada görülürken en yüksek miktar 300 W'ta elde edilmiştir. Andrejc ve arkadaşları (2022) ve Afaneh ve arkadaşları (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının sırasıyla 6,8 mg/g ve 10,0 mg/g oleuropein içerdiği bildirilmiştir [96] [117]. Oda koşullarında kurutulan yapraklardan daha az oleuropein elde edilmesi uzun kurutma süresine bağlı olarak yaprakların daha fazla oksijene maruz kalması ile açıklanabilir. Benzer şekilde Şahin ve arkadaşları (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da mikrodalga kurutma yöntemiyle kurutulan zeytin yapraklarının oda koşullarında kurutulanlara göre daha fazla oleuropein içerdiği bildirilmiştir [92]. Kurutma ile oleuropein miktarının artması, β -glukozidaz enziminin kurutmanın etkisiyle oleuropein glikozidi aktive etmesi ile açıklanabilir. Birçok çalışmada kurutulan yaprakların taze yapraklara kıyasla daha fazla oleuropein içerdiği belirtilmektedir [117]. 180 W'ta kurutulan yapraklarda 300 W'ta kurutulan yapraklara göre oleuropein miktarı daha çok bulunmasına rağmen Bölüm 4.6.1.2'de de gösterildiği gibi ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarı en çok 180 W'ta kurutulan yapraklardan elde edilmiştir. Şahin ve arkadaşları (2017) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da benzer şekilde oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarının toplam fenolik bileşen miktarının mikrodalga kurutma ile kurutulan yapraklara kıyasla daha yüksek olduğu fakat oleuropein miktarının daha az olduğu rapor edilmiştir.

Mikrodalga gücünün 200 W'tan 400 W'a artışı ile oleuropein miktarının arttığı bildirilmiştir [92].

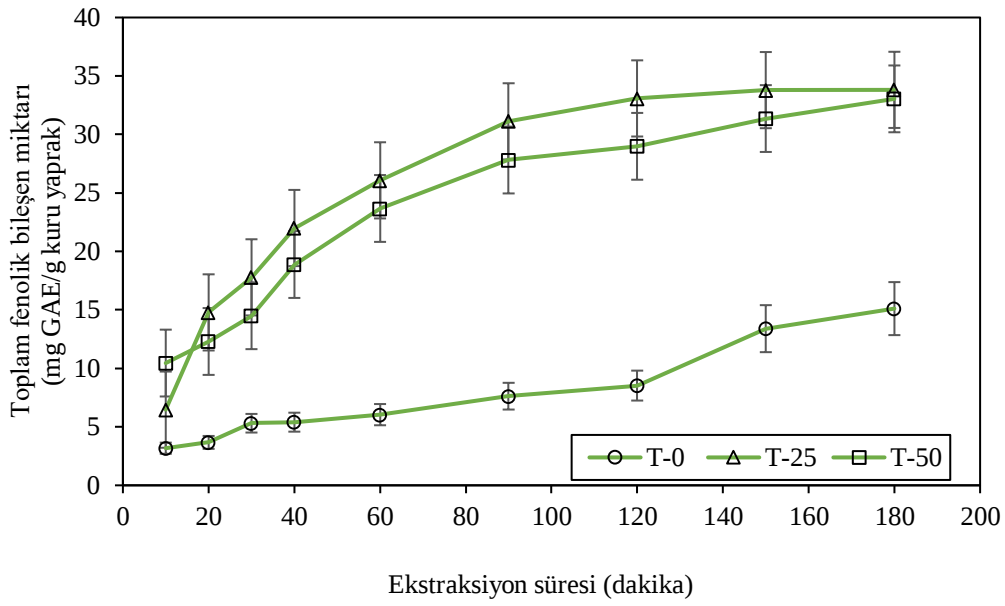
4.6 Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu

Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyon kinetiğini belirlemek ve ultrason destekli ekstraksiyon işleminde, yapraklara uygulanan kurutma yönteminin, etanol oranının ve ekstraksiyon süresinin ekstrakte edilen toplam fenolik bileşenlerin miktarına etkisini incelemek amacıyla ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir.

4.6.1 Kurutma Yöntemi ve Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Bileşen Miktarına Etkisi

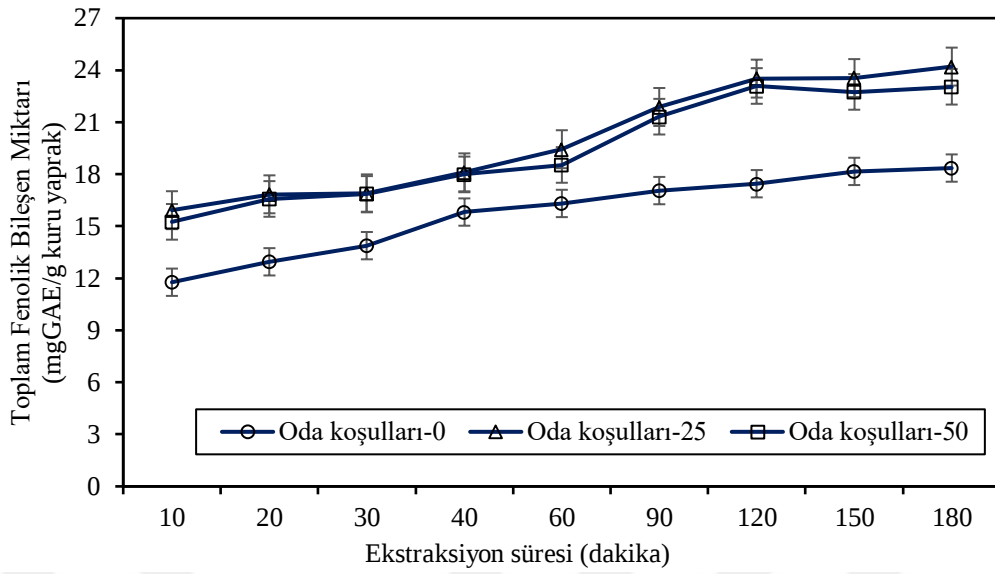
4.6.1.1 Taze ve Oda Koşullarında Kurutulmuş Zeytin Yapraklarından Toplam Fenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu

Taze zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna çözücü bileşiminin etkisinin incelendiği deneyler %0, %25 ve %50 (v/v) etanol içeren etanol-distile su karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarlarının zamanla değişimi Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Şekil 4.8'de T ifadesi taze yaprağı 0, 25, 50 değerleri ise çözücü karışımındaki hacimce etanol yüzdesini ifade etmektedir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi etanol oranının artması %25 etanol oranına kadar toplam fenolik bileşen miktarını arttırırken, %50 etanol oranında %25'e göre bir miktar düşüş görülmüştür. Taze yapraklardan ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarı 3 saatlik ekstraksiyon süresinin sonunda %0, %25 ve %50 etanol oranları için sırası ile 15,11, 33,81 ve 33,04 mg GAE/g kuru yaprak olarak bulunmuştur. Garro ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada farklı çeşitteki taze zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonunu %80 metanol oranında çözücü kullanarak gerçekleştirmiş ve toplam fenolik bileşen miktarının 15,0-37,4 mg GAE/g kuru yaprak aralığında elde edildiği rapor edilmiştir [95]. Abaza ve arkadaşları (2011) ve Ahmad ve arkadaşları (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da sırası ile 17-25 ve 10-49 mg GAE/g kuru yaprak aralıklarında toplam fenolik bileşen miktarları elde edildiği bildirilmiştir [94] [91]. Literatürde rapor edilen sonuçlar mevcut çalışma sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.8 Taze yapraklardan toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisi

Oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonuna çözücü bileşiminin etkisinin incelendiği deneyler %0, %25 ve %50 (v/v) etanol oranlarında gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarlarının zamanla değişimi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Şekil 4.9 incelendiğinde taze zeytin yaprakları için elde edilen sonuçlara benzer şekilde etanol oranının artmasının %25 etanol oranına kadar toplam fenolik bileşen miktarını arttırdığı %50 etanol oranında %25'e göre çok az bir düşüş olduğu görülmektedir. Oda koşullarında kurutulan yapraklardan ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarı 3 saatlik ekstraksiyon süresinin sonunda %0, %25 ve %50 alkol oranları için sırası ile 18,35, 24,21 ve 23,05 mg GAE/g kuru yaprak olarak bulunmuştur. Garro ve arkadaşları (2022) tarafından gerçekleştirilen çalışmada oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklardan 29,20 mg GAE /g kuru yaprak toplam fenolik bileşen elde edildiği rapor edilmiştir [95].



Şekil 4.9 Taze zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisi

Etanol oranının etkisi

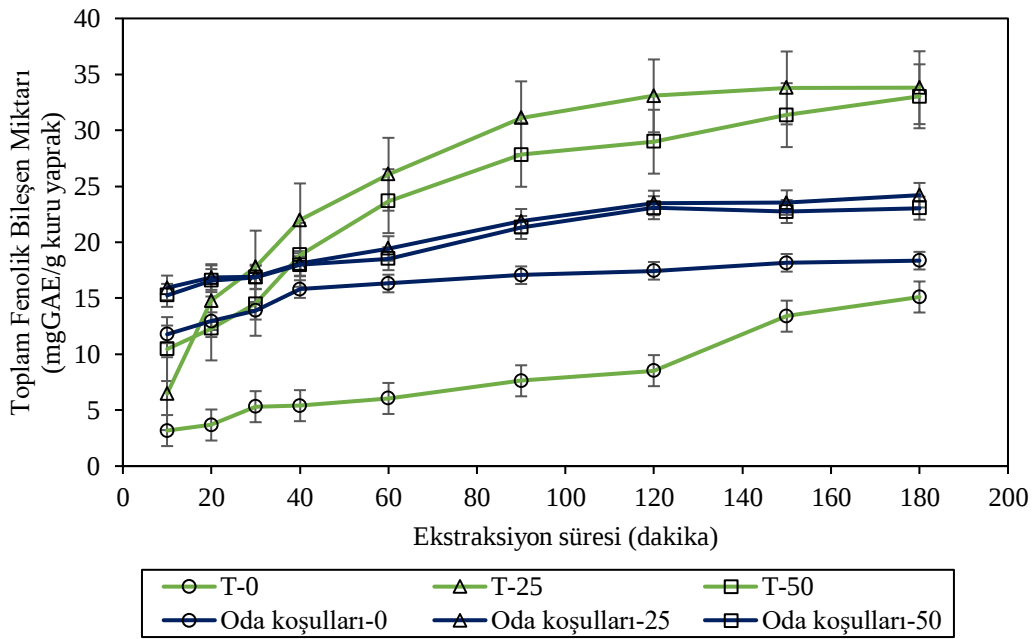
Taze ve oda koşullarında kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranının etkisi karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.10'da verilmiştir. Taze ve oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için en düşük toplam fenolik bileşen %0 etanol oranı ile elde edilmiştir. Taze yapraklardan oda koşullarında kurutulan yapraklara göre daha az fenolik bileşen elde edilmiştir. Taze ve oda koşullarında kurutulmuş yapraklar için %0 etanol oranında 3 saatlik ekstraksiyon süresi sonunda elde edilen değerler sırası ile 15,11 mg GAE/g kuru yaprak ve 18,36 mg GAE/g kuru yaprak'tır. Bu durum, kurutmanın zeytin yapraklarının dokularına zarar vererek çözücünün yapraklara daha iyi nüfuz etmesini ve buna bağlı olarak da daha fazla fenolik bileşen ekstrakte edilmesini sağlaması olarak açıklanabilir.

Taze ve oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları için etanol oranının artması %25 etanol oranına kadar toplam fenolik bileşen miktarını arttırırken %50 etanol oranında bir miktar düşüş gözlemlenmiştir. Fenolik bileşiklerin çoğunlukla polar yapıda olmaları ve suyun en polar çözücü olmasından dolayı, suda daha çok çözünme beklenir. Ancak suyun iyi bir sonuç vermemesi diğer çözücülere göre daha viskoz olması ve bunun sonucu olarak kütle aktarımını olumsuz etkilemesinden kaynaklanmaktadır. Su ve alkolün birarada bulunmasında alkolün

etkisi ile viskozite düşmekte ve kütle aktarımı artmakta su ile bitkinin şişmesi sağlanmakta ve bitkinin yapısındaki çözünen madde etanol ile bitkiden ayrılmaktadır [118]. Etanol-su ile daha çok fenolik madde ekstrakte edilmesi bu şekilde açıklanabilir.

Khiari ve arkadaşları (2009) tarafından da benzer şekilde açıklanmıştır. Khiari ve arkadaşları çözücü konsantrasyonunun viskoziteyi ve dielektrik sabitini etkilediğini, bununda ekstraksiyon hızına ve difüzyona etki ettiğini söylemişlerdir. Polar yapıdaki suya polaritesi daha düşük olan etanol eklenmesi ile dielektrik sabitinin düştüğünü bu duruma bağlı ekstraksiyonun arttığını bildirmişlerdir. Katı soğan atıklarının %60 etanol konsantrasyonunda orta polarite etkisi vermesi ile bu ortamda çözünebilen fenoliklerin ekstrakte edildiğini, etanol konsantrasyonun arttırıldığında ise, polaritenin düşmesine bağlı olarak glikozit benzeri polar maddelerin ekstraksiyonun azalmasından belli bir seviyenin üzerindeki konsantrasyonun iyi sonuçlar vermeyeceğini ifade etmişlerdir [119]. Benzer sonuçlar birçok çalışmada bildirilmiştir. Şahin ve arkadaşları (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonunda %0, %50 ve %100 etanol oranlarında çözücü kullanılmış ve %50 etanol oranına kadar fenolik bileşen ekstraksiyonun arttığı bu oranın üzerinde düşüş görüldüğü bildirilmiştir [101]. Başka bir çalışmada da zeytin yaprakları %20, %60 ve %100 etanol oranları ile ekstrakte edilmiş etanol artışı %60 etanol oranına kadar fenolik bileşen ekstraksiyonunu arttırırken bu değerden sonra düşüş olduğu rapor edilmiştir [11]. %100 etanol oranında daha az fenolik bileşen ekstrakte edilme sebebi bitki metaryalinin şişmesini sağlayacak suyun bulunmaması olarak açıklanmıştır [101]. Şahin ve arkadaşları (2015) zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonunda %10, %40 ve %60 etanol oranlarında çalışmışlar ve maksimum fenolik bileşen miktarını %40 etanol oranında elde etmişlerdir [103]. Etanol oran artışının belli bir değerden sonra etkili olmadığını Elboughdiri'nin (2018) yaptığı çalışmada göstermektedir. Yapılan çalışmada, %50, %60, %70 ve %80 etanol oranlarında ekstraksiyon gerçekleştirilmiş ve birbirlerine yakın toplam fenolik bileşen miktarları elde edilmiştir [100]. *Tagetes erecta* L. (kadife çiçeği) atıkları üzerine yapılan çalışmada da, %70'in üzerindeki etanol oranlarında toplam fenolik bileşen miktarında düşüş olduğu bildirilmiştir [120].

Taze zeytin yapraklarının oda koşullarında kurutulan yapraklara göre %25 ve %50 etanol oranı ile ekstraksiyonunda elde edilen toplam fenolik bileşen miktarının daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). Benzer şekilde Garro ve arkadaşlarının (2022) çalışmasında da taze zeytin yapraklarından elde edilen toplam fenolik bileşen miktarının çeşitli kurutma yöntemlerine kıyasla daha fazla olduğu bildirilmiştir [95]. Başka bir çalışmada da taze zeytin yaprağının toplam fenolik içeriğinin (2385,5 mg GAE/ kg kuru yaprak), 167 W gücünde (2282,9 mg GAE/ kg kuru yaprak) mikrodalga da kurutulmuş yaprağa göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir [105].



Şekil 4.10 Taze ve oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin etkisinin birlikte gösterimi

Ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresinin artışı toplam fenolik bileşen miktarını arttırmıştır (Şekil 4.10). Bilindiği üzere çözücüye uzun süre maruz kalınması kimyasal maddelerin çözeltiye difüzyonunu arttırmaktadır [121]. Bu nedenle süre daha fazla uzatılıp daha fazla fenolik bileşen elde edilebilir fakat bu durum fenolik bileşenlerin kimyasal reaksiyona girmesine ya da oksidasyonuna da neden olabilir. Ayrıca daha fazla ekstraksiyon süresi daha çok enerji maliyetine neden olacaktır. Bu durumların önüne geçebilmek için zamanın optimize edilmesi oldukça önemlidir. Optimum ekstraksiyon süresinin bu verilerle belirlenmesi oldukça zordur. Bu

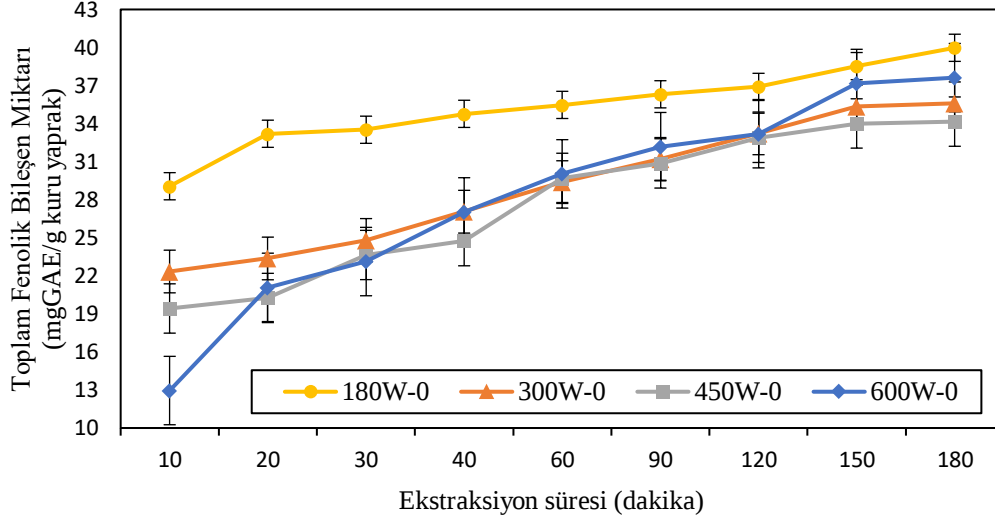
nedenle Bölüm 4.8’de cevap yüzey yöntemi ile ekstraksiyon süresinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.6.2 Mikrodalga Yöntemi ile Farklı Mikrodalga Güçlerinde Kurutulan Zeytin Yapraklarından Toplam Fenolik Bileşenlerin Ekstraksiyonu

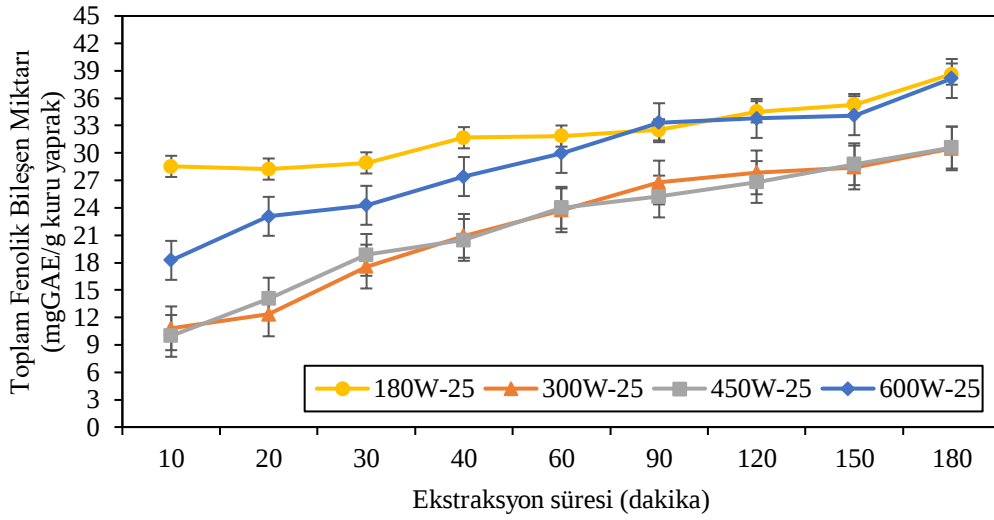
Mikrodalga gücünün etkisi

Mikrodalga da kurutulan yapraklardan toplam fenolik bileşenlerin ekstrakte edildiği deneyler, %0, %25 ve %50 etanol oranlarında gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4.11-Şekil 4.13’te verilmiştir. En fazla toplam fenolik bileşen miktarı 41,56 mg GAE/g kuru yaprak değeri ile mikrodalga da 180 W’ta kurutulan yaprakların %50 etanol oranında 3 saatlik ekstraksiyon işlemi sonucunda elde edilmiştir (Şekil 4.11-Şekil 4.13). Bu durum yüksek mikrodalga güçlerinin hızlı sıcaklık artışına neden olarak fenolik bileşenlerin termal bozunmasını sağlaması ve miktarlarının azalması olarak açıklanabilir. Bu sonucu Gamlı ve arkadaşlarının (2018) Gemlik çeşidi zeytin yaprakları üzerine yaptıkları çalışma da desteklemektedir. Çalışmada 52, 90, 167, 290, 347 W mikrodalga güçlerinde kurutma gerçekleştirilmiş ve maksimum fenolik içeriğe 167 W’ta 2282,9 mg GAE/kg değeri ile ulaşılırken minimum fenolik içerik ise 347 W’ta 994,5 mg GAE/kg olarak elde edilmiştir [105].

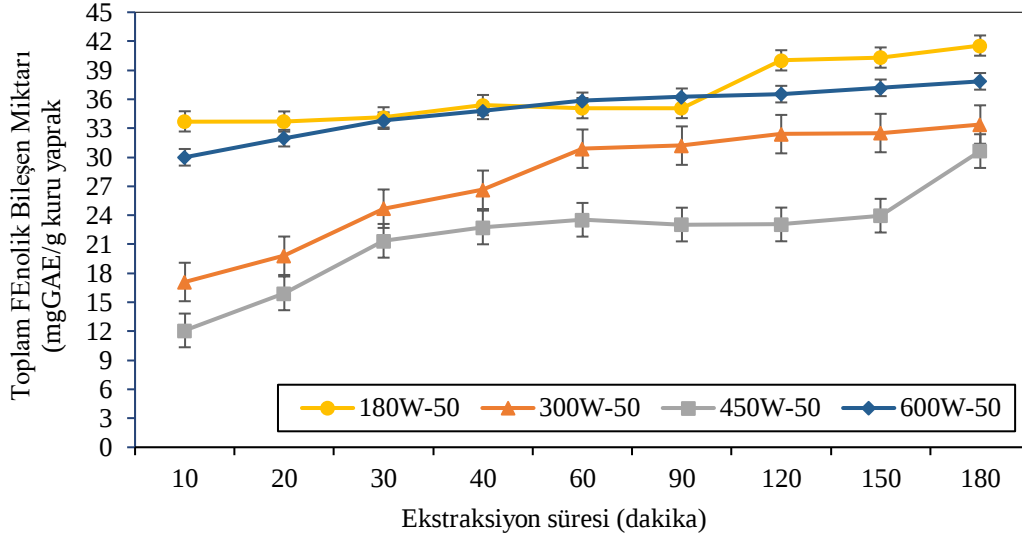
Etanol oranı %0 olan distile suda gerçekleşen ekstraksiyon deneylerinde, 300, 450 ve 600 W’ta kurutulan yapraklardan ekstrakte edilen toplam fenolik bileşenlerin miktarı yaklaşık olarak aynı bulunmuştur. Ancak etanol oranı %25 ve %50 olan etanol-distile su karışımında 600W’ta kurutulan yapraklardan ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarı 180 W’ta kurutulan yapraklardan ekstrakte edilen değere yaklaşmıştır. Şahin ve arkadaşları (2018) ve Garro ve arkadaşları (2022) çalışmalarında mikrodalga güç artışının belli bir seviyeye kadar toplam fenolik bileşen miktarını arttırdığını, belli değerin üzerinde ise düşüşe neden olduğunu bildirilmiştir [92], [95]. Ghanem ve arkadaşlarının (2012) thompson kabuklarını 100, 180, 300, 450 ve 600 W güç seviyelerinde mikrodalga da kuruttukları çalışmada ise, 100-300 W aralığında toplam fenolik bileşen miktarının mikrodalga gücü arttıkça azaldığı fakat 300 W’tan sonra arttığı bildirilmiştir [122].



Şekil 4.11 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının distile suda (%0 etanol oranında) ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri



Şekil 4.12 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının %25 etanol içeren etanol-distile su karışımında ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri

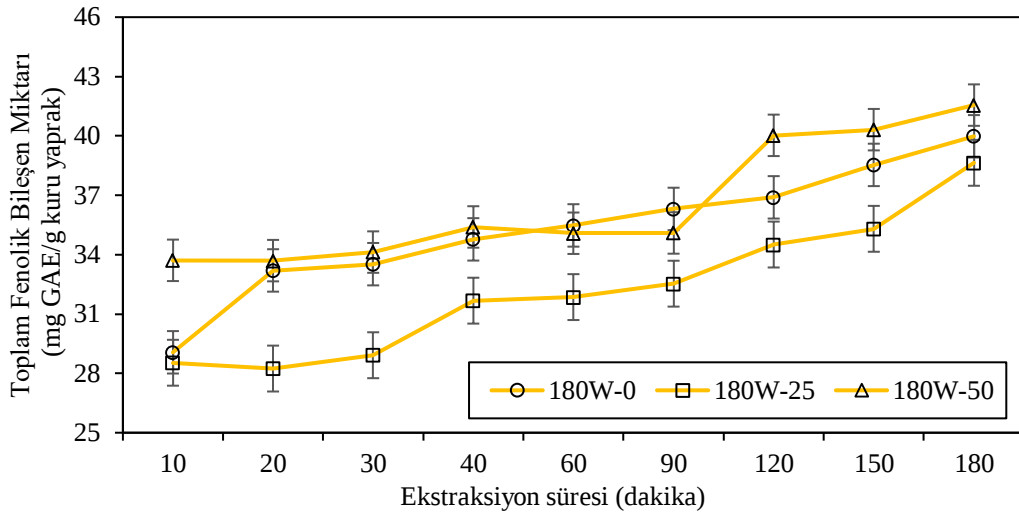


Şekil 4.13 Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarının %50 etanol içeren etanol-distile su karışımında ekstraksiyonu için zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı değerleri

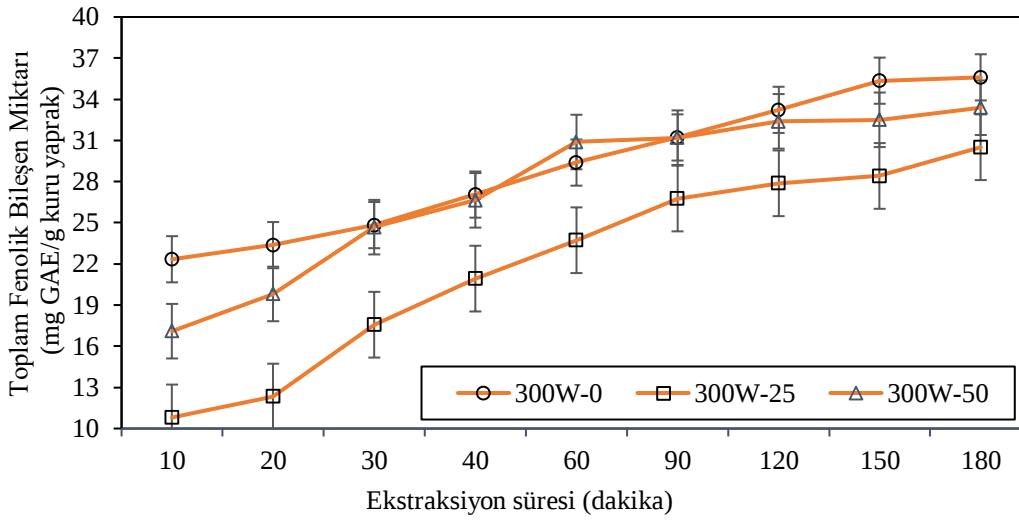
Etanol oranının etkisi

Farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna etanol oranının etkisi Şekil 4.14-Şekil 4.17’de verilmiştir.

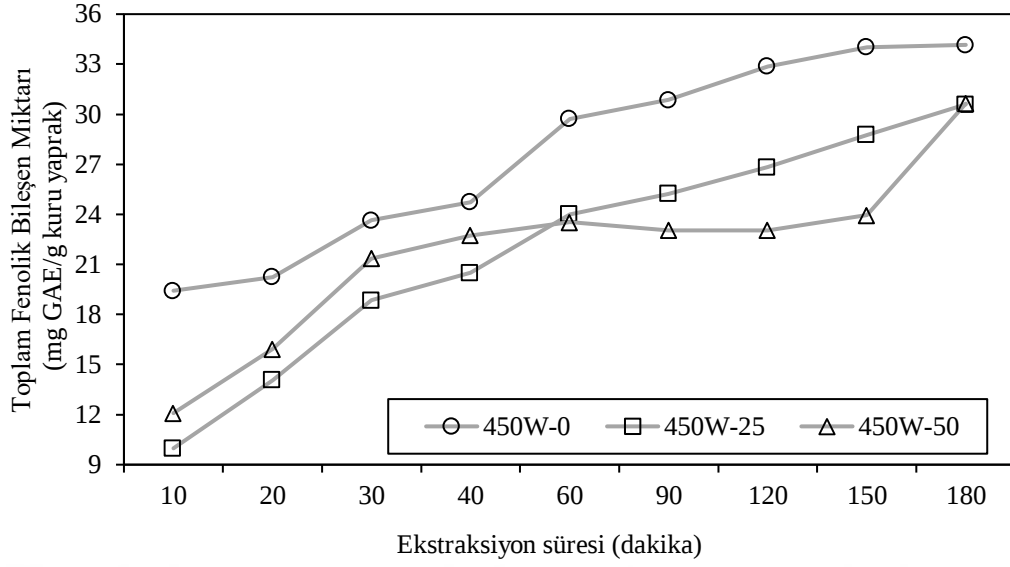
300W ve 450W’ta kurutulan zeytin yapraklarının ekstraksiyonunda, en yüksek toplam fenolik bileşen miktarına genel olarak %0 etanol içeren çözücü ortamında ulaşılmıştır. Ancak 180 W ve 600 W’ta kurutulan yapraklarda ise, en yüksek toplam fenolik bileşen miktarına en yüksek oranda etanol içeren (%50) çözücü ortamında ulaşılmıştır. Şekil 4.14-Şekil 4.17’de verilen grafikler incelendiğinde, kurutma için kullanılan mikrodalga gücü ve çözücü oranı arasındaki etkileşim net bir şekilde açıklanamaktadır. Etanol oranının etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için bağımsız değişkenlerin birbirleri ile etkileşimlerinin de incelenebildiği Box-Behnken deneysel tasarım metodu uygulanarak elde edilen sonuçlar Bölüm 4.8’de ayrıntılı olarak açıklanmıştır.



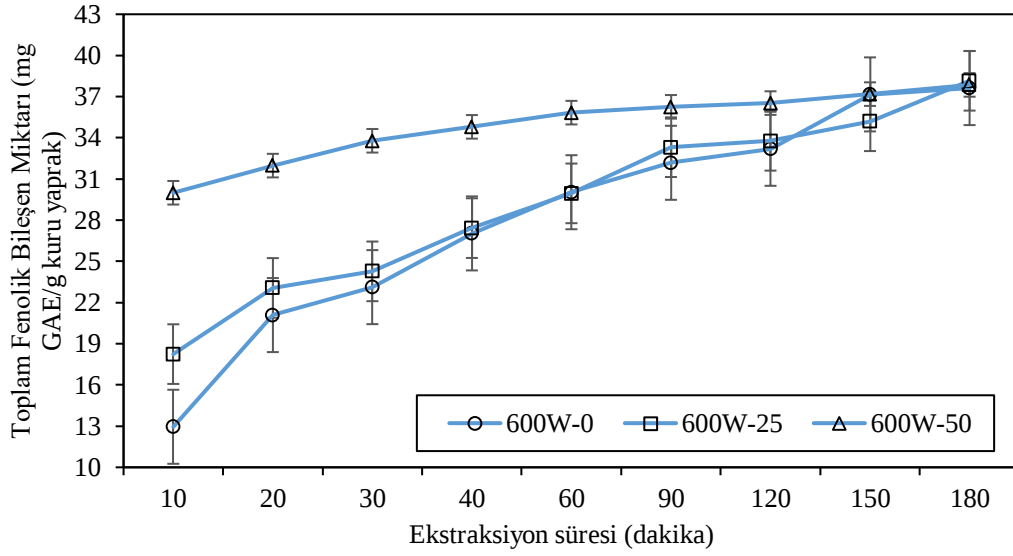
Şekil 4.14 Mikrodalga da 180 W'ta kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi



Şekil 4.15 Mikrodalga da 300 W'ta kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi



Şekil 4.16 Mikrodalga da 450 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi



Şekil 4.17 Mikrodalga da 600 W'ta kurutulan zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonuna alkol oranının etkisi

Ekstraksiyon süresinin etkisi

Ekstraksiyon süresinin artması, taze ve oda koşullarında kurutulan zeytin yapraklarında olduğu gibi mikrodalga da kurutulan yapraklarda da ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarının artmasına neden olmuştur (Şekil 4.14-Şekil 4.17).

4.6.3 Taze, Oda Koşullarında ve Mikrodalga da Kurutulan Zeytin Yapraklarından Ekstrakte Edilen Toplam Fenolik Bileşenlerin Miktarının Karşılaştırılması

Taze, oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde kurutulan yaprakların ekstraksiyonunda, ekstraksiyon süresi ve çözücüdeki etanol oranına bağlı olarak ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarlarının karşılaştırılması aşağıda verilmiştir.

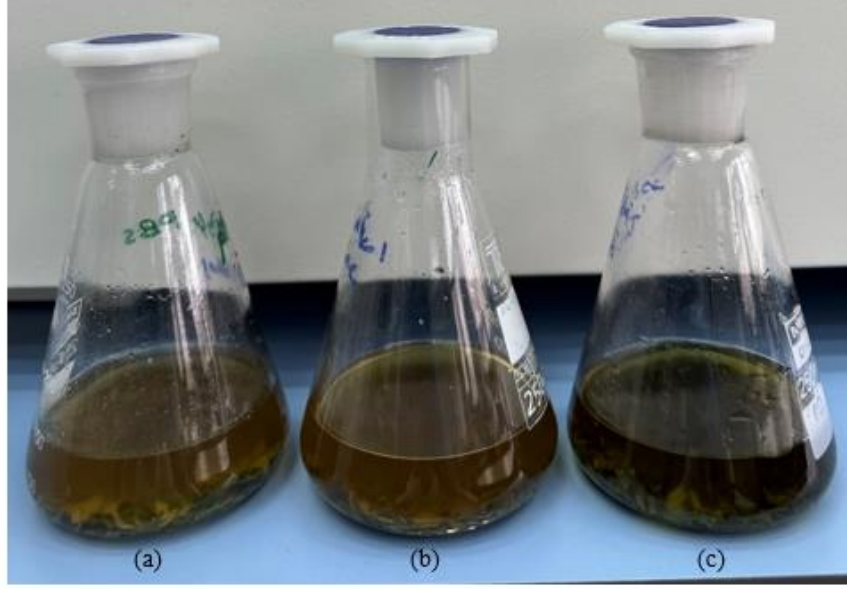
%0 etanol oranında elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı büyükten küçüğe şu şekilde sıralanabilir; 180 W > 600 W~300 W~450 W > Oda koşulları > Taze

%25 etanol oranında elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı büyükten küçüğe şu şekilde sıralanabilir; 180 W > 600 W > Taze > 450 W~300 W > Oda koşulları

%50 etanol oranında elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı büyükten küçüğe şu şekilde sıralanabilir; 180 W > 600 W > 300 W > Taze > 450 W > Oda koşulları

Elde edilen sonuçlardan mikrodalga kurutma yönteminin zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonunda en etkili yöntem olduğu görülmektedir. Şahin ve arkadaşları (2018) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da benzer şekilde farklı kurutma yöntemlerine kıyasla mikrodalga kurutma ile daha fazla toplam fenolik bileşen elde edilmiştir. Bu durum mikrodalga kurutma ile oksidatif ve hidrolitik enzimlerin deaktive olması ile fenolik bileşiklerin kaybının önüne geçilmesi olarak açıklanabilir. Ayrıca mikrodalga bitki dokularına zarar vermiş olabilir. Bu nedenle çözücünün bitkiye geçişi kolaylaşmış ve daha fazla fenolik bileşen ekstraksiyonu gerçekleşmiş olabilir [123].

Etanol oranın %0 ve %25 olduğu durumda ekstrakt rengi sarı iken oranın %50'ye çıkması ile ekstraktın yeşil renge döndüğü görülmüştür (Şekil 4.18). Bu durum alkolün klorofilin ekstrakta geçişini sağlamış olması ile açıklanabilir. Kashaninejad ve arkadaşları (2020) tarafından gerçekleştirilen çalışmada da benzer şekilde alkol oranının artması ile ekstrakt renginin yeşile döndüğü bildirilmiştir [7].



Şekil 4.18 (a): %0 etanol oranı; (b): %25 etanol oranı; (c): %50 etanol oranı ile elde edilen ekstraktlar

4.7 Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyon Kinetiğinin Belirlenmesi

Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu taze, oda koşullarında kurutulan ve farklı mikrodalga güçlerinde kurutulan yapraklar için çalışılmış, ekstraksiyon kinetiğine kurutma yöntem ve parametrelerinin ve etanol oranının etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon kinetiğini belirlemek amacı ile deneylerden elde edilen kinetik verilerin, bitkilerden fenolik bileşenlerin ekstraksiyonun açıklanmasında sıklıkla kullanılan Logaritmik, Peleg ve Güç Yasası modellerine uygunluğu test edilmiştir. Modeller için elde edilen sabitler ve istatistiksel veriler Tablo 4.2’de sunulmuştur.

Modeller için elde edilen korelasyon katsayıları değerlendirildiğinde (Tablo 4.2); Logaritmik model için elde edilen korelasyon katsayısının diğer modellere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Dolayısı ile zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyon kinetiğinin Logaritmik model ile ifade edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.2 Taze, oda koşullarında ve mikrodalga da farklı güç seviyelerinde kurutulmuş zeytin yapraklarına uygulanan ekstraksiyon kinetiği modelleri ve sabitleri

Deney Adı	Peleg Modeli ($C_t = t / (K_1 + K_2t)$)			Güç Yasası Modeli ($C_t = Bt^n$)			Logaritmik Model ($C_t = a \log(t) + b$)		
	R	K ₁	K ₂	r	B	n	r	a	b
T-0	0,9344	7,0968	0,0325	0,9577	0,4485	0,6620	0,8879	3,7722	-7,4936
T-25	0,9935	0,9390	0,0231	0,9615	4,5004	0,4070	0,9915	9,8933	-15,2193
T-50	0,9882	1,0953	0,0246	0,9866	3,9828	0,4145	0,9836	8,6078	-12,0718
Oda koşulları-0	0,9639	0,3970	0,0538	0,9807	8,4458	0,1535	0,9861	2,3808	6,2363
Oda koşulları-25	0,8722	0,3278	0,0420	0,9767	10,0104	0,1706	0,9641	3,2322	7,1213
Oda koşulları-50	0,8878	0,3236	0,0435	0,9754	10,0233	0,1636	0,9669	3,0443	7,3235
180W-0	0,8492	0,0713	0,0263	0,7547	2,7553	0,0627	0,7662	2,2671	26,3958
180W-25	0,7808	0,1045	0,0283	0,9334	20,9875	0,1062	0,9211	3,2728	19,1638
180W-50	0,6776	0,0601	0,0257	0,8718	26,6091	0,0788	0,8590	2,7569	25,5371
300W-0	0,9119	0,2536	0,0283	0,9914	13,8451	0,1828	0,9821	0,9914	8,9078
300W-25	0,9324	0,3251	0,3730	0,9729	5,5115	0,3365	0,9860	7,2367	-6,8216
300W-50	0,9850	0,3632	0,0280	0,9550	11,5142	0,2144	0,9726	5,9261	3,9352
450W-0	0,9504	0,3589	0,0280	0,9829	11,3294	0,2191	0,9818	5,8437	4,3852
450W-25	0,9941	0,7577	0,0298	0,9785	5,8405	0,3227	0,9937	6,9686	-5,7645
450W-50	0,9213	0,4639	0,0349	0,8893	8,8356	0,2235	0,9068	4,9278	2,3248
600W-0	0,9919	0,5211	0,0244	0,9755	8,4131	0,2947	0,9916	8,1930	-4,4798
600W-25	0,9730	0,3673	0,0260	0,9917	11,2209	0,2343	0,9942	6,6182	2,8166
600W-50	0,7949	0,3738	0,0231	0,6554	1,1802	0,2408	0,7248	8,9306	-4,2106

4.8 Zeytin Yapraklarından Toplam Fenolik Bileşen Ekstraksiyonunun Cevap Yüzey Yöntemi ile Optimizasyonu

4.8.1 Deneysel Tasarım Sonuçları

Box-Behnken deneysel tasarım yöntemi uygulanarak belirlenen farklı mikrodalga güçlerinde kurutulmuş zeytin yaprakları, çözücü etanol oranları ve ekstraksiyon süreleri kombinasyonlarında gerçekleştirilen deneyler için elde edilen toplam fenolik madde miktarı değerleri Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3 Box-Behnken deney planı ve deneysel sonuçlar

Deney No	Faktör 1 A: Güç W	Faktör 2 B: Etil alkol oranı %	Faktör 3 C: Zaman saat	Yanıt Toplam Fenolik Madde (TPC) (mg GAE/g kuru yaprak)
1	180	0	2	36,89
2	180	25	1	31,85
3	180	25	3	38,64
4	180	50	2	40,03
5	315	25	2	29,09
6	315	25	2	28,48
7	315	25	2	30,86
8	315	25	2	26,66
9	315	25	2	27,88
10	315	0	1	29,39
11	315	0	3	35,6
12	315	50	1	30,89
13	315	50	3	33,39
14	450	0	2	32,88
15	450	25	1	24,01
16	450	25	3	30,59
17	450	50	2	23,05

Tablo 4.3 incelendiğinde 40,03 mg GAE/g kuru yaprak değeri ile en yüksek toplam fenolik bileşen miktarına 180 W, %50 etanol oranı ve ekstraksiyon süresinin 2 saat olduğu durumda ulaşılırken, 23,05 mg GAE/g kuru yaprak değeri ile en düşük toplam fenolik bileşen miktarı 450 W, %50 etanol oranı ve 2 saatlik ekstraksiyon süresinde elde edilmiştir. Merkez noktalarda (315 W, %25 etanol oranı, 2 saat ekstraksiyon süresi) yapılan 5 tekrar deney sonuçlarının birbirlerine yakın olması deneysel hataların başarılı bir şekilde minimize edildiğini göstermektedir.

Design Expert 13.0 programı tarafından oluşturulan toplam fenolik bileşen miktarına (yanıt) bağımsız değişkenlerin etkisini gösteren matematiksel model denklemleri ve model denklemlere ait istatistikler Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Model istatistikleri

Kaynak	R ²	Adj-R ²	Pred-R ²	Press	Lack of fit p değeri
Lineer	0,6632	0,5855	0,4114	211,05	0,0653
2FI	0,7901	0,6642	0,4055	213,18	0,0825
*İkinci Derece	0,9440	0,8720	0,4923	182,04	0,3554
Kübik	0,9731	0,8924			

*Önerilen model

Program tarafından ikinci dereceden model önerilmiştir. Bu durumun nedeni R², adj-R² ve pred-R² değerlerinin diğer modellere göre daha yüksek olmasıdır. Ayrıca bir modelin uygun olabilmesi için lack of fit (uyumsuzluk) değerinin anlamsız (p>0,05) olması gereklidir. Lack of fit değeri deneysel veriler ile model denkleminde elde edilen tahmini veriler arasındaki hatayı vermektedir. Başka bir ifade ile modelden kaynaklanan hata değerini temsil etmektedir. Eğer bir model anlamlı lack of fit değerine sahipse bu modelin sonuçları temsil edemediği ve bu model üzerinden sonuçların yorumlanamaz olduğu anlamı çıkarılabilir [8]. Bu sonuçlara dayanarak, ultrason destekli ekstraksiyonda toplam fenolik bileşen miktarı (mg GAE/g örnek) ile faktörler arasındaki ilişkiyi ifade etmek için ikinci dereceden model seçilmiştir. Model denklemi (4.1) eşitliğinde verilmiş, modelin istatistiksel ve ANOVA analizi sonuçları Tablo 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir.

$$\text{TPC} = +41,2164 - 0,0711x_A + 0,1133x_B + 0,2430x_C - 0,0001x_Ax_B - 0,0004x_Ax_C - 0,0371x_Bx_C + 0,0001x_A^2 + 0,0045x_B^2 + 0,8918x_C^2 \quad (4.1)$$

Tablo 4.5 Önerilen modelin istatistiksel sonuçları

%CV	5,43
Press	182,04
R ²	0,9440
Adj-R ²	0,8720
Pred-R ²	0,4923
Adeq-Prec.	12,4597

Tablo 4.6 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu için elde edilen deneysel tasarım modelinin ANOVA analizi sonucu

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Değeri	F Değeri	p-değeri	Anlamlılık
Model	338,48	9	37,61	13,11	0,0013	Anlamlı
A-Güç	170,02	1	170,02	59,27	0,0001	*
B-Etanol oranı	6,84	1	6,84	2,39	0,1663	
C-Ekstraksiyon süresi	60,94	1	60,94	21,24	0,0025	*
AB	42,06	1	42,06	14,66	0,0065	*
AC	0,0110	1	0,0110	0,0038	0,9523	
BC	3,44	1	3,44	1,20	0,3097	
A²	13,44	1	13,44	4,69	0,0671	
B²	33,76	1	33,76	11,77	0,0110	*
C²	3,35	1	3,35	1,17	0,3158	
Kalan	20,08	7	2,87			
Uyumsuzluk	10,44	3	3,48	1,44	0,3554	Anlamlı değil
Net Hata	9,64	4	2,41			
Toplam	358,56	16				

(*p<0,05 anlamlı)

ANOVA analizi %95 güven seviyesinde gerçekleştirildiğinden p değerinin 0,05'ten küçük olduğu terimler anlamlıdır. Başka bir ifade ile bu terimler toplam fenolik bileşen miktarı üzerinde etkilidir. Tablo 4.6 değerlendirildiğinde güç ve ekstraksiyon süresi istatistiksel olarak lineer terimlerde anlamlı iken etanol oranının tek başına (lineer terim) anlamlı bir faktör olmadığı (p>0,05) kuadratik (yüksek dereceli terimlere sahip katsayılar) ve etkileşim (birden fazla faktör terimine sahip katsayılar) terimlerinde etkili olduğu görülmektedir. Tüm terimlerin anlamlılık düzeyleri aşağıdaki gibi özetlenebilir (Tablo 4.6);

- Güç(A) ve zaman (C) lineer terimlerde anlamlı (p<0,05)

- Etanol oranı (B) anlamsız ($p>0,05$)
- Etanol oranı kuadratik (B^2) ve etkileşim (AB) terimlerinde anlamlı ($p<0,05$)
- AC, BC, A^2 , C^2 anlamsız ($p>0,05$)

R^2 , $\text{adj-}R^2$ ve $\text{pred-}R^2$ değerlerinin birbirlerine ve 1'e yakın olması model doğruluğunun daha yüksek olduğunu göstermektedir [103]. R^2 değeri model denkleminde yeni değişkenler eklenerek, değişkenlerin anlamlı olmasının gerekli olmadan kolaylıkla 1'e yaklaştırılabilen bir değerdir. Bu durumun aksine $\text{adj-}R^2$ değerinin anlamsız terimler varlığında değeri düşmektedir. $\text{Adj-}R^2$ 'nin büyük değere sahip olması deneysel ve tahmin edilen değerler arasında iyi bir uyum olduğunu göstermektedir [124]. Modelin uygulanabilir olması için $\text{adj-}R^2$ ve $\text{pred-}R^2$ değerleri arasındaki fark en fazla 0,2 olmalıdır [87]. Tablo 4.5'te modele ait istatistikler incelendiğinde $\text{adj-}R^2$ (0,8720) ve $\text{pred-}R^2$ (0,4923) değerleri arasındaki farkın 0,2'den büyük olmasından dolayı (4.1)'deki model denkleminin deneysel sonuçları tam olarak temsil edemediği sonucuna varılmıştır. (4.1) eşitliğinden ANOVA analizi sonucundaki anlamsız terimler çıkartılarak model denklemi eşitlik (4.2)'ye indirgenmiştir.

$$\text{TPC} = +41,2164 - 0,0711xA + 0,1133xB + 0,2430xC - 0,0010xAxB + 0,0001xA^2 + 0,0046xB^2 \quad (4.2)$$

İndirgenmiş ikinci derece model denklemi ile ANOVA analizi tekrarlanmıştır, model için elde edilen istatistiksel sonuçlar ve ANOVA analizi Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.7 İndirgenmiş model denkleminde ait istatistiksel sonuçlar

%CV	5,26
Press	98,97
R^2	0,9250
$\text{Adj-}R^2$	0,8801
$\text{Pred-}R^2$	0,7240
Adeq-Prec.	16,3263

Tablo 4.8 İndirgenmiş model denklemine ait ANOVA analizi

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Ortalama Kareler Değeri	F Değeri	p-değeri	Anlamlılık
Model	331,68	6	55,28	20,57	< 0,0001	Anlamlı
A - Güç	170,02	1	170,02	63,25	< 0,0001	*
B - Etanol oranı	6,84	1	6,84	2,55	0,1416	
C - Ekstraksiyon süresi	60,94	1	60,94	22,67	0,0008	*
AB	42,06	1	42,06	15,65	0,0027	*
A²	14,20	1	14,20	5,28	0,0444	*
B²	34,99	1	34,99	13,02	0,0048	*
Kalan	26,88	10	2,69			
Uyumsuzluk	17,24	6	2,87	1,19	0,4526	Anlamlı değil
Net Hata	9,64	4	2,41			
Toplam	358,56	16				

(*p<0,05 anlamlı)

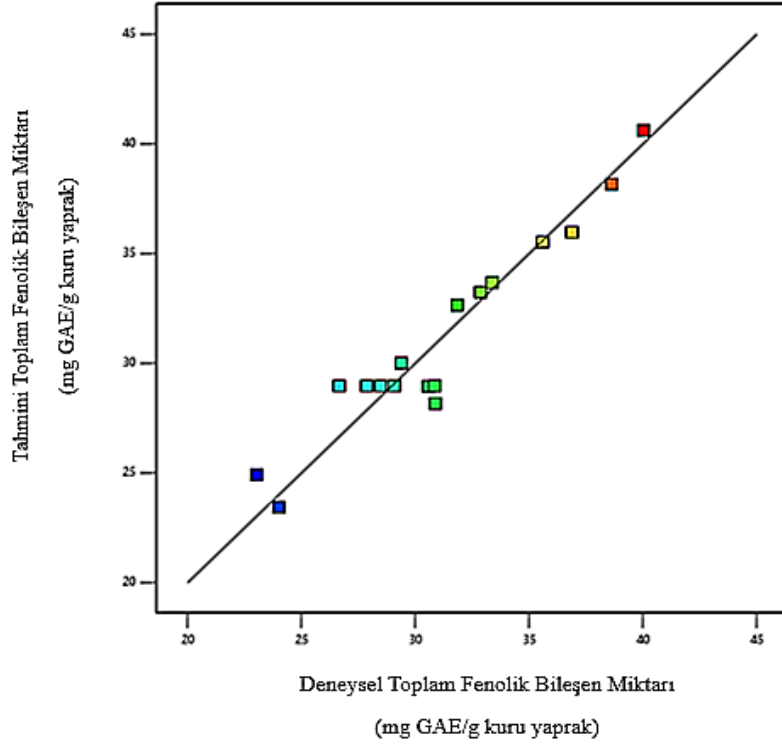
Tablo 4.7'deki sonuçlara göre adj-R^2 (0,8801) ve pred-R^2 (0,7240) değerleri arasındaki farkın 0,2'den küçük olması indirgenmiş ikinci derece modelin uygunluğunu göstermektedir. %10'nun altında CV (varyasyon katsayısı) değeri modelin güvenilir, deneysel ve tahmin edilen değerler arasındaki sapmaların düşük ve deney sonuçlarının tekrarlanabilirliğinin yüksek olduğunu göstermektedir [13]. Bu çalışmada %5,26 CV değeri elde edilmiştir. %10 ile karşılaştırıldığında çok daha düşük bir değer olduğundan modelin güvenilir olduğu görülmektedir. Press (tahmin edilen artık kareler toplamı), modelin tasarımdaki noktalara uygunluğunun bir ölçüsüdür ve değer ne kadar küçük olursa modelin veri noktalarına o kadar iyi uyum sağladığını göstermektedir [125]. Press değeri 98,97 bulunmuştur. Adeq. Precision (yeterli hassasiyet) sinyalin gürültüye oranını ölçer ve bu değer 4'ten büyük olması istenir [87]. Yeterli hassasiyet değerinin 16,3263 olması ile sinyallerin yeterli olduğu görülmektedir. Ayrıca modelinin ANOVA analizi sonucunda model için p değerinin 0,005'den küçük olması modelin anlamlı oluşunu, uyumsuzluk (lack of fit) için p değerinin anlamsız olması ($p>0,05$) ve korelasyon

katsayısı R^2 değerinin 0,925 bulunması istatistiksel olarak modelin uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunda en büyük F değerine (63,25) sahip olan güç terimi en etkili parameter olarak bulunmuştur (Tablo 4.8).

(4.2) eşitliğinde verilen indirgenmiş ikinci derece model denklemindeki terimlerin katsayılarının pozitif ve negatif değerlerde olması bu parametrelerin ekstraktaki toplam fenolik bileşen miktarına etkisini göstermektedir. Güç (A) ve GüçxEtanol oranı (AxB) değerlerinin negatif katsayılı olmasından dolayı bu değerler azaldığında toplam fenolik madde miktarı artmaktadır. Örneğin 3 ve 16 numaralı deneylerde güç değerinin değiştiği ve diğer parametrelerin sabit tutulduğu görülmektedir deney sonuçları değerlendirildiğinde 180W'ta (38,64) 450 W'a (30,59) göre daha fazla fenolik bileşen elde edilmiştir. Diğer parametrelerin ise pozitif katsayılı olması değerlerinin artması ile toplam fenolik bileşen miktarının artacağını göstermektedir.

Box-Behnken deneysel tasarım deney planına göre gerçekleştirilen deneylerin deneysel sonuçları ile indirgenmiş ikinci derece model denkleminde hesaplanan teorik değerlerin karşılaştırılması Şekil 4.19 ve Tablo 4.9'da verilmiştir. Deneysel değerler ile model denkleminde elde edilen teorik değerlerin birbirine yakın olması Box-Behnken deneysel tasarımının uygunluğunu ve elde edilen sonuçların güvenilirliğini göstermektedir.



Şekil 4.19 Deneysel ve tahmini toplam fenolik bileşen miktarlarının karşılaştırılması

Tablo 4.9 Deneysel ve tahmini toplam fenolik bileşen miktarları

Deney No	Deneysel Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (mg GAE/g kuru yaprak)	Tahmini Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (mg GAE/g kuru yaprak)
1	30,59	28,95
2	29,39	30,01
3	36,89	35,97
4	38,64	38,17
5	31,85	32,65
6	32,88	33,24
7	40,03	40,61
8	29,09	28,97
9	28,48	28,97
10	33,39	33,68
11	35,60	35,53
12	30,89	28,16
13	27,88	28,97
14	23,05	24,90
15	30,86	28,97
16	26,66	28,97
17	24,01	23,43

Zeytin yapraklarından maksimum toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu için Design Expert 13.0 programı 97 tane optimizasyon sonucu önermektedir. Önerilen

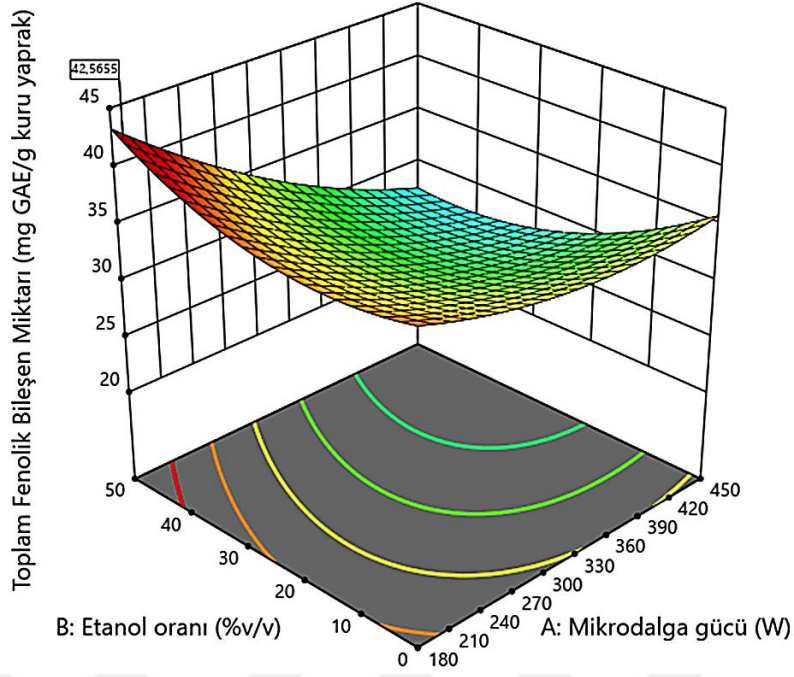
sonuçlar içerisinde toplam fenolik bileşen miktarının maksimum olması dikkate alınmıştır. Buna göre seçilen optimizasyon sonucunda verilen optimum koşullar; 183,61 W mikrodalga gücü, 48,69 %v/v etanol oranı, 2 saat 58 dakika ekstraksiyon süresidir. Bu koşullar için tahmini (teorik) toplam fenolik bileşen miktarı 42,57 mg GAE/g kuru yaprak olarak hesaplanmıştır. Program tarafından verilen tahmini değerlerin doğrulanabilmesi amacıyla önerilen optimum koşullara yakın değerlerde (180 W, 50 %v/v etanol oranı, 3 saat ekstraksiyon süresi) deney gerçekleştirilmiş ve deneysel toplam fenolik bileşen miktarı 41,56 mg GAE/g kuru yaprak olarak bulunmuştur (Tablo 4.10).

Tablo 4.10 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu için optimum koşullar, tahmini (teorik) ve deneysel toplam fenolik bileşen miktarları

Optimum Mikrodalga Gücü (W)	183,61
Optimum Etanol Oranı (%v/v)	48,69
Optimum Ekstraksiyon Süresi (saat)	2,58
Optimum Şartlarda Tahmini Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (mg GAE/g kuru yaprak)	42,57
Optimum Şartlarda Deneysel Toplam Fenolik Bileşen Miktarı (mg GAE/g kuru yaprak)	41,56

Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonunda parametrelerin toplam fenolik bileşen miktarına etkilerinin grafik üzerinde görülebilmesi ve yorumlanması amacı ile 3 boyutlu cevap yüzey grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.20).

Şekil 4.20’de verilen grafikte sabit ekstraksiyon süresinde (2,58 dakika) mikrodalga gücü ve etanol oranının toplam fenolik bileşen miktarına etkisi gösterilmektedir. İkili etkileşim değerlendirildiğinde maksimum toplam fenolik bileşen miktarına mikrodalga gücünün azalması, etanol oranının artması ile ulaşıldığı görülmektedir.



Şekil 4.20 Zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşen ekstraksiyonuna etanol oranı ve mikrodalga gücü parametrelerinin etkileşiminin etkisini gösteren 3D cevap yüzey grafiği

4.9 Tartışma

Bu tez çalışmasında oda koşullarında ve farklı mikrodalga güçlerinde (180 W, 300 W, 450 W, 600 W) kurutulan zeytin yapraklarının kuruma davranışı incelenmiştir. Kurutma kinetiğini belirlemek amacı ile deney sonuçlarından elde edilen kinetik verilerin Page, Lewis, Logaritmik, Henderson & Pabis, Wang & Sing, Polinom ve Midilli ince tabaka kurutma modellerine uygunluğu test edilmiştir. Kurutma sırasında suyun malzeme içerisindeki kütle aktarımını tanımlayabilmek amacı ile efektif difüzyon katsayısı belirlenmiştir.

Zeytin yapraklarına uygulanan kurutma yöntemlerinin yaprağın yapısındaki oleuropein miktarına etkisini belirleyebilmek için HPLC analizi ile oleuropein miktarı analizi gerçekleştirilmiştir.

Taze, oda koşullarında ve farklı mikrodalga güçlerinde kurutulan zeytin yaprakları ultrason destekli ekstraksiyon işlemi ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen toplam fenolik bileşen miktarına kurutma yönteminin, parametrelerinin ve ekstraksiyon parametrelerinin (etanol oranı ve ekstraksiyon süresi) etkisi incelenmiştir. Ekstraksiyon kinetiğinin tanımlanmasında, bitkilerden fenolik bileşenlerin

ekstraksiyonun açıklanmasında sıklıkla kullanılan Logaritmik, Peleg ve Güç Yasası modellerinin uygunluğu incelenmiştir.

Ekstraksiyon kinetiği çalışmasında parametrelerin birbirleri ile etkileşimlerinin yanıt üzerindeki etkisi incelenemediğinden, mikrodalga da kurutulmuş zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ultrason destekli ekstraksiyonunda, kurutmada kullanılan mikrodalga gücünün ve ekstraksiyon parametrelerinin etkisi Box-Behnken deneysel tasarım planı oluşturularak incelenmiş ve maksimum fenolik bileşen miktarı için optimizasyon gerçekleştirilmiştir.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir;

- Oda koşullarında kurutulan zeytin yaprakları 128. saatte denge nem içeriğine ulaşmıştır. Mikrodalga da kurutulan zeytin yaprakları ise 180 W'ta 9 dakikada, 300W'ta 8 dakikada, 450 W'ta 6 dakikada ve 600W'ta 4 dakikada denge nem içeriğine ulaşmıştır. Mikrodalga güç artışının buna bağlı olarak ısıtma işlemi uygulanmasının denge nem içeriğine gelme süresini (kuruma süresini) kısalttığı görülmüştür.
- Zeytin yapraklarının kurutma kinetiğini ifade etmek için Lewis modeli en uygun model olarak belirlenmiştir.
- Kurutulan zeytin yaprakları için efektif difüzyon katsayısı değerleri $5,19 \times 10^{-13}$ - $1,62 \times 10^{-9}$ m²/s aralığında değişmektedir. En düşük değer oda koşullarında kurutulan yapraklarda görülürken en yüksek değer en yüksek mikrodalga gücünde (600 W) görülmüştür.
- Oda koşullarında ve mikrodalga da 180 W ve 300 W'ta kurutulan zeytin yapraklarında, en düşük oleuropein miktarı oda koşullarında kurutulmuş zeytin yapraklarında (7,5 mg/g), en yüksek oleuropein miktarı ise 300 W'ta kurutulan zeytin yapraklarında (297,4 mg/g) elde edilmiştir.
- Taze, oda koşullarında ve farklı mikrodalga güç seviyelerinde kurutulan zeytin yapraklarının farklı etanol oranları (0-50 %v,v) ile 3 saatlik ekstraksiyonu sonunda, ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarı en fazla 180 W'ta kurutulmuş, %50 etanol içeren çözücü ortamında 41,56 mg GAE/g kuru yaprak olarak elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik bileşen

miktarı ise taze zeytin yaprakları için %0 etanol oranı ile 15,11 mg GAE/g kuru yaprak olarak belirlenmiştir.

- Kurutma yöntemlerinin ekstrakte edilen toplam fenolik bileşen miktarına etkisi;

%0 etanol oranı için; 180 W > Oda koşulları > Taze

%25 etanol oranı için; 180 W > Taze > Oda koşulları

%50 etanol oranı için; 180 W > Taze > Oda koşulları

olarak belirlenmiştir.

- Kurutma yöntemleri içerisinde mikrodalga ile kurutmanın zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunu arttırdığı görülmüştür.
- Logaritmik modelin zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin ekstraksiyon kinetiğini açıklamak için en uygun model olduğu belirlenmiştir.
- Deneysel tasarım çalışması sonucunda ekstraksiyon prosesi için proses parametrelerinin ve bu parametrelerin birbirleriyle etkileşimlerinin fenolik bileşen ekstraksiyonu üzerindeki etkilerini gösteren aşağıdaki model denklem elde edilmiştir.

$$\text{TPC} = +41,2164 - 0,0711xA + 0,1133xB + 0,2430xC - 0,0010xAxB \quad (4.3) \\ + 0,0001xA^2 + 0,0046xB^2$$

- Model için elde edilen ANOVA analizi değerlendirildiğinde;

Güç faktörünün zeytin yapraklarından ekstrakte edilen fenolik bileşen miktarı üzerinde en etkili faktör olduğu belirlenmiştir.

Etanol oranının zeytin yapraklarından ekstrakte edilen fenolik bileşen miktarında tek başına etkili olmadığı görülmüştür. Etanol oranının özellikle güç faktörü ile ikili etkileşiminde ekstrakte edilen fenolik bileşen miktarını etkilediği belirlenmiştir.

- Box-Behnken yöntemi ile gerçekleştirilmiş olan deneysel tasarım çalışması sonucunda zeytin yapraklarından fenolik bileşen ekstraksiyonu için optimum proses parametreleri; 183,61 W mikrodalga gücü, 48,69 %v/v etanol oranı ve 2 saat 58 dakika ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

Bu koşullar için tahmini toplam fenolik bileşen miktarı 42,57 mg GAE/g kuru yaprak olarak hesaplanmış ve bu sonuç belirlenen optimum koşullarda gerçekleştirilen deneysel çalışma ile desteklenmiştir.

Bu sonuçlar çerçevesinde;

- Bir atık olan ve deęerlendirilemeyen zeytin yapraklarının özellikle mikrodalga da dūřuk gū seviyesinde kurutulduktan sonra ekstraksiyon yöntemi ile katma deęeri yūsek fenolik bileřiklerin elde edilmesinde kullanılabilei grūlmūřtur.
- Özellikle ūlkemizin zeytin aęacı çokluęu ile dūnyada ilk sıralarda yer alması ūlkemiz için çok būyūk bir avantajdır. Tıbbi faydası kanıtlanmış zeytin yaprakları kullanılarak ilaç hammaddeleri geliřtirilebilir bu sayede hem ūlke ekonomisine hemde tıp dūnyasına katkı saęlanabilir. Bundan sonra gerçekleřtirilecek olan çalıřmalarda; zeytin yapraęı ekstraktları kontrollū salınım sistemlerinde ilaç etken maddesi olarak kullanılabilir.
- Elde edilen ekstraktın kurutularak (ekstrakt formunun), depolanma kořulları ve sūresinin ekstraktların antioksidan aktivitesine etkisi incelenebilir.

KAYNAKÇA

- [1] M. Güzel and Ö. Akpınar, “Meyve ve Sebze Kabuklarının Fitokimyasal ve Antioksidan Özelliklerinin İncelenmesi,” *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 9, pp. 768–780, 2019, doi: 10.17714/gumusfenbil.542458.
- [2] E. Elhussein, “Zeytin yaprağı ekstratının fenolik profilinin stabilitesinin incelenmesi,” Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi. Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul, 2018.
- [3] M. A. Salık and S. Çakmakçı, “Zeytin (*Olea Europaea* L.) Yaprığının Fonksiyonel Özellikleri ve Gıdalarda Kullanım Potansiyeli” *Gıda*, vol. 46, no. 6, pp. 1481–1493, Oct. 2021, doi: 10.15237/gida.gd21133.
- [4] A. Albayrak and G. Başığit Kılıç, “Biological Activities of Phytochemicals in Plants” *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 8, no. 11, pp. 2300–2306, 2020.
- [5] S. Şahin, “Zeytin ağacı yapraklarından süperkritik-CO₂ ile ekstrakt eldesi ve bileşimindeki oleuropein miktarının incelenmesi,” Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2011.
- [6] D. P. Makris, G. Boskou, and N. K. Andrikopoulos, “Polyphenolic content and in vitro antioxidant characteristics of wine industry and other agri-food solid waste extracts,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 20, no. 2, pp. 125–132, Mar. 2007, doi: 10.1016/j.jfca.2006.04.010.
- [7] M. Kashaninejad, M. T. Sanz, B. Blanco, S. Beltrán, and S. M. Niknam, “Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization,” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 124, pp. 196–207, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.fbp.2020.08.015.
- [8] N. Ünver, “Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak zeytin yaprağı ekstraksiyon işleminin optimize edilmesi,” Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, 2018.
- [9] M. M. Özcan and B. Matthäus, “A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves,” *European Food Research and Technology*, vol. 243, no. 1, pp. 89–99, Jan. 2017, doi: 10.1007/s00217-016-2726-9.
- [10] Z. Erbay, F. İçier, “Zeytin yaprağının (*Olea europaea* L.) kuruma kinetiğinin incelenmesi,” *Gıda*, 33(4), pp. 165-173, 2008.
- [11] E. M. El Adnany *et al.*, “Impact and Optimization of the Conditions of Extraction of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Olive

- Leaves (Moroccan picholine) Using Response Surface Methodology,” *Separations*, vol. 10, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/separations10060326.
- [12] Ş. Tavman, S. Kumcuoğlu, Z. Akkaya, “Bitkisel ürünlerin atıklarından antioksidan maddelerin ultrason destekli ekstraksiyonu,” *Gıda*, 34(3), pp. 175-182, 2009.
- [13] J. Prakash Maran, S. Manikandan, K. Thirugnanasambandham, C. Vigna Nivetha, and R. Dinesh, “Box-Behnken design based statistical modeling for ultrasound-assisted extraction of corn silk polysaccharide,” *Carbohydr Polym*, vol. 92, no. 1, pp. 604–611, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.09.020.
- [14] A. M. Salter, Helen. Wiseman, and G. A. (Gregory A.) Tucker, *Phytonutrients*. Wiley-Blackwell, 2012.
- [15] D. Ryan, M. Antolovich, P. Prenzler, K. Robards, and S. Lavee, “Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L,” *Sci Hort*, vol. 92, no. 2, pp. 147–176, 2002, doi: 10.1016/S0304-4238(01)00287-4.
- [16] W. Vermerris and R. Nicholson, “Phenolic compounds and their effects on human health,” *Phenolic Compound Biochemistry*, pp. 235–255, 2006, doi: 10.1007/978-1-4020-5164-7_7.
- [17] E. Atak and M. E. Uslu, “Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri,” *MCBÜ Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, vol. 3, no. 27, pp. 39–48, 2018.
- [18] C. S. Atli, “Sofralık zeytinlerin toplam fenolik madde antioksidan kapasite ve biyoalınabilirlikler üzerine işleme yöntemlerinin etkisi,” Yüksek Lisans Tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [19] S. Şahin, “Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik - CO₂ ile Ekstrakt ve Bileşimindeki Oleuropein Miktarının İncelenmesi,” 2011.
- [20] G. Karabulut and O. Yemiş, “Bound Forms of Phenolic Compounds and their Bioavailability,” *Akademik Gıda*, vol. 17, no. 4. Sidas Medya A.S., pp. 526–537, 2019. doi: 10.24323/akademik-gida.667270.
- [21] S. Y. Tang and B. Halliwell, “Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies?,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 394, no. 1. pp. 1–5, Mar. 26, 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.137.
- [22] T. Demir and Ö. Akpınar, “Bitkilerde Bulunan Fitokimyasalların Biyolojik Aktiviteleri,” *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 8, no. 8, pp. 1734–1746, Aug. 2020, doi: 10.24925/turjaf.v8i8.1734-1746.3484.

- [23] E. Atak, M. E. Uslu, “Fenolik Bileşikler, Ekstraksiyon Metotları ve Analiz Yöntemleri, *Soma Meslek Yüksekokulu Teknik Bilimler Dergisi*, 3(27), pp. 39-48, 2018.
- [24] J. R. Morelló, M. P. Romero, T. Ramo, and M. J. Motilva, “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*, vol. 168, no. 1, pp. 65–72, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.plantsci.2004.07.013.
- [25] B. Lockwood, L. Rapport, *Nutrasötikler* (s. 1-18). Londra: İlaç Basını, 2007.
- [26] A. M. Abi-Khattar *et al.*, “Mechanical damage and thermal effect induced by ultrasonic treatment in olive leaf tissue. Impact on polyphenols recovery,” *Ultrason Sonochem*, vol. 82, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105895.
- [27] Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü, Ürün Raporu Zeytinyağı 2021, Yayın No:350, Ankara, 2021.
- [28] TİM, Dünyada ve Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağının Üretim, Tüketim ve Dış Ticareti.
- [29] M. A. Hashmi, A. Khan, M. Hanif, U. Farooq, and S. Perveen, “Traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *olea europaea* (olive),” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, Feb. 23, 2015. doi: 10.1155/2015/541591.
- [30] M. Gürbüz and S. Öğüt, “Potential Health Benefits of Olive Leaf,” *Türkiye Klinikleri Journal of Health Sciences*, vol. 3, no. 3, pp. 242–253, 2018, doi: 10.5336/healthsci.2017-58346.
- [31] G. K. Lamprou, A. Vlysidis, K. Tzathas, and A. G. Vlyssides, “Statistical optimization and kinetic analysis of the extraction of phenolic compounds from olive leaves,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 95, no. 2, pp. 457–465, Feb. 2020, doi: 10.1002/jctb.6049.
- [32] O. Benavente-García, A. J. Castillo, J. Lorente, A. Ortúzar, and J. A. Del Rio, “Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves.” Available: www.elsevier.com/locate/foodchem
- [33] J. M. Romero-Márquez *et al.*, “Exploring the Antioxidant, Neuroprotective, and Anti-Inflammatory Potential of Olive Leaf Extracts from Spain, Portugal, Greece, and Italy,” *Antioxidants*, vol. 12, no. 8, p. 1538, Jul. 2023, doi: 10.3390/antiox12081538.
- [34] B. Barbaro *et al.*, “Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, no. 10. MDPI AG, pp. 18508–18524, Oct. 14, 2014. doi: 10.3390/ijms151018508.

- [35] A. A. Khalil *et al.*, “Oleuropein: Chemistry, extraction techniques and nutraceutical perspectives-An update,” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Ltd., 2023. doi: 10.1080/10408398.2023.2218495.
- [36] K. Jalarama Reddy, K. Jayathilakan, and M. C. Pandey, “Olive oil as functional component in meat and meat products: a review,” *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 11. Springer India, pp. 6870–6878, Nov. 01, 2015. doi: 10.1007/s13197-015-1852-x.
- [37] Ü. Akbaş, “Farklı çeşit zeytin yapraklarının fenolik bileşen, antioksidan aktivite ve mineral içeriği üzerine kurutmanın etkisi,” Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2017.
- [38] S. Bulotta, M. Celano, S. M. Lepore, T. Montalcini, A. Pujia, and D. Russo, “Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases,” *Journal of Translational Medicine*, vol. 12, no. 1. BioMed Central Ltd., Aug. 03, 2014. doi: 10.1186/s12967-014-0219-9.
- [39] S. Milanizadeh, M. R. Bigdeli, B. Rasoulilian, and D. Amani, “The Effects of Olive Leaf Extract on Antioxidant Enzymes Activity and Tumor Growth in Breast Cancer,” *Thrita*, vol. 3, no. 1, Feb. 2014, doi: 10.5812/thrita.12914.
- [40] I. Mourtzinou, F. Salta, K. Yannakopoulou, A. Chiou, and V. T. Karathanos, “Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin,” *J Agric Food Chem*, vol. 55, no. 20, pp. 8088–8094, Oct. 2007, doi: 10.1021/jf0709698.
- [41] E. Gikas, F. N. Bazoti, and A. Tsarbopoulos, “Conformation of oleuropein, the major bioactive compound of *Olea europea*,” *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, vol. 821, no. 1–3, pp. 125–132, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.theochem.2007.06.033.
- [42] S. Şahin and M. Bilgin, “Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 98, no. 4. John Wiley and Sons Ltd, pp. 1271–1279, Mar. 15, 2018. doi: 10.1002/jsfa.8619.
- [43] R.-N. Jurcău, I.-M. Jurcău, N.-A. Colceriu, C. Popovici, T.-R. Pîrvan, and C. Honceriu, “Polyphenols in Olive Leaves And Their Antioxidant Role-A Brief Review,” *Sport And Society*, Dec. 2021, doi: 10.36836/2021/2/39.
- [44] P. Vogel, I. K. Machado, J. Garavaglia, V. T. Zani, D. de Souza, and S. M. Dal Bosco, “Benefícios polifenoles hoja de olivo (*Olea europaea* L) para la salud humana,” *Nutr Hosp*, vol. 31, no. 3, pp. 1427–1433, Oct. 2015, doi: 10.3305/nh.2015.31.3.8400.
- [45] B. Halliwell, “Free radicals and antioxidants - Quo vadis,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 32, no. 3. pp. 125–130, Mar. 2011. doi: 10.1016/j.tips.2010.12.002.

- [46] H. Gerçekoğlu, Antioksidanlar ve kalp sağlığı, <https://drhakangercekoglu.com/genel/antioksidanlar-ve-kalp-sagligi.html>, (Erişim Tarihi: 07.02.2024).
- [47] M. Kamran, A. S. Hamlin, C. J. Scott, and H. K. Obied, “Drying at high temperature for a short time maximizes the recovery of olive leaf biophenols,” *Ind Crops Prod*, vol. 78, pp. 29–38, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.10.031.
- [48] A. P. Pereira *et al.*, “Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) Leaves,” *Molecules*, vol. 12, pp. 1153–1162, 2007, www.mdpi.org/molecules
- [49] A. N. Sudjana *et al.*, “Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract,” *Int J Antimicrob Agents*, vol. 33, no. 5, pp. 461–463, May 2009, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.10.026.
- [50] O. H. Lee *et al.*, “Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities,” *Bioresour Technol*, vol. 100, no. 23, pp. 6107–6113, Dec. 2009, doi: 10.1016/j.biortech.2009.06.059.
- [51] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, and A. Saija, “On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 51, no. 8, pp. 971–974, Feb. 2010, doi: 10.1211/0022357991773258.
- [52] F. Bilaloğlu, “Farklı kurutma yöntemlerinin pamukova ayvasının kuruma davranışı üzerine etkisinin deneysel incelenmesi,” Doktora Tezi, Sakarya Üniversitesi, Sakarya, 2019.
- [53] N. Kutlu, A. İşci, Ö. Ş. Demirkol, “Gıdalarda ince tabaka kurutma modelleri,” *Gıda*, 40(1), 39-46, 2015.
- [54] K. Papoutsis *et al.*, “Effect of vacuum-drying, hot air-drying and freeze-drying on polyphenols and antioxidant capacity of lemon (*Citrus limon*) pomace aqueous extracts,” *Int J Food Sci Technol*, vol. 52, no. 4, pp. 880–887, Apr. 2017, doi: 10.1111/ijfs.13351.
- [55] S. Günaydın, C. Sağlam, and N. Çetin, “Tarımsal Ürünlerin Kurutulmasında Kullanılan Kurutma Yöntemleri,” *Erciyes Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, vol. 5, no. 1, pp. 30–45, May 2022, doi: 10.55257/ethabd.1096697.
- [56] A. K. Babu, G. Kumaresan, V. A. A. Raj, and R. Velraj, “Review of leaf drying: Mechanism and influencing parameters, drying methods, nutrient preservation, and mathematical models,” *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 90. Elsevier Ltd, pp. 536–556, Jul. 01, 2018. doi: 10.1016/j.rser.2018.04.002.

- [57] M. Gölcü and F. Şen, “Experimental Determination of Dryable the Wet Viol with Microwave,” *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, vol. 20, no. 4, pp. 111–115, 2014, doi: 10.5505/pajes.2014.48569.
- [58] H. D. Güler (2019), Biberiye, fesleğen, kekik, nane ve stevyanın toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesi üzerine kurutma yöntemlerinin etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Bursa Uludağ Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [59] H. Pinar, N. Çetin, B. Ciftci, K. Karaman, and M. Kaplan, “Biochemical composition, drying kinetics and chromatic parameters of red pepper as affected by cultivars and drying methods,” *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 102, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.jfca.2021.103976.
- [60] S. K. Patel, A. Gupta, and S. Chakraborty, “Quality assessment of differently dried garlic (*Allium Sativum* L.) and storage studies of garlic powder with different packaging conditions,” *Int J Chem Stud*, vol. 8, no. 5, pp. 1273–1278, Sep. 2020, doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i5r.10477.
- [61] A. Ö. Karabacak (2021), Farkli yöntemlerle kurutulan havuç pestillerinin kurutma karakteristikleri ile bazı kalite parametrelerindeki değişimin modellenmesi ve in vitro biyoyararlılıklarının belirlenmesi. Doktora Tezi. Bursa Uludağ Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- [62] C. Karacaoğlu, “Ultrasonikasyon destekli vakum impregnasyon tekniğinin elma küplerinin kuruma kinetiği ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi,” Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Burdur, 2017.
- [63] Z. Erbay, “Zeytin yaprağının sıcak hava ile kurutulmasının modellenmesi, optimizasyonu ve ekserji analizi,” Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [64] G. Dadali, D. K. Apar, and B. Özbek, “Estimation of effective moisture diffusivity of okra for microwave drying,” *Drying Technology*, vol. 25, no. 9, pp. 1445–1450, 2007, doi: 10.1080/07373930701536767.
- [65] P. P. Aradwad, A. K. Thirumani Venkatesh, and I. Mani, “Infrared drying of apple (*Malus domestica*) slices: Effect on drying and color kinetics, texture, rehydration, and microstructure,” *J Food Process Eng*, 2022, doi: 10.1111/jfpe.14218.
- [66] G. M. Turkut, H. Çakmak, and Ş. Tavman, “The Determination of Drying Behavior of Enriched İzmir Gevrek with Protein,” *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, vol. 21, no. 9, pp. 421–427, 2015, doi: 10.5505/pajes.2015.57615.
- [67] M. Çam, “Basınçlı solvent ekstraktörü kullanılarak nar kabuğu ve çekirdeğinin antioksidan bileşiklerin su ile ekstraksiyonu,” Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.

- [68] C. Bendicho, I. Lavilla, "Ultrasound extractions," *Encyclopedia of separation science*, 1448-1454, 2000.
- [69] O. R. Alara, N. H. Abdurahman, and C. I. Ukaegbu, "Extraction of phenolic compounds: A review," *Current Research in Food Science*, vol. 4. Elsevier B.V., pp. 200–214, Jan. 01, 2021. doi: 10.1016/j.crfs.2021.03.011.
- [70] M. Vinatoru, "An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs." Available: www.elsevier.nl/locate/ultsonch
- [71] M. Shafiur Rahman, Handbook of Food Preservation. 2nd ed., *CRC Press*, 2007.
- [72] S. Otles, Handbook of Food Analysis Instruments. 1st. ed., *CRC Press*, 2008.
- [73] A. Atif, Özkan Karabacak, C. E. Tamer, Ö. U. Çopur, and M. Yagcilari, "Ultrasound Applications in Fruit and Vegetable Processing," 2019, <https://dergipark.org.tr/tr/pub/bursauludagziraathttp://www.uludag.edu.tr/zi-raatdergi>
- [74] D. Cifá, M. Skrt, P. Pittia, C. Di Mattia, and N. Poklar Ulrih, "Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction," *Food Sci Nutr*, vol. 6, no. 4, pp. 1128–1137, Jun. 2018, doi: 10.1002/fsn3.654.
- [75] G. S. Vieira, R. N. Cavalcanti, M. A. A. Meireles, and M. D. Hubinger, "Chemical and economic evaluation of natural antioxidant extracts obtained by ultrasound-assisted and agitated bed extraction from jussara pulp (*Euterpe edulis*)," *J Food Eng*, vol. 119, no. 2, pp. 196–204, 2013, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.05.030.
- [76] L. Wang and C. L. Weller, "Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 17, no. 6. pp. 300–312, Jun. 2006. doi: 10.1016/j.tifs.2005.12.004.
- [77] M. Viot, V. Tomao, C. Le Bourvellec, C. M. C. G. Renard, and F. Chemat, "Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction," *Ultrason Sonochem*, vol. 17, no. 6, pp. 1066–1074, 2010, doi: 10.1016/j.ultsonch.2009.10.015.
- [78] A. Sridhar, M. Ponnuchamy, P. S. Kumar, A. Kapoor, D. V. N. Vo, and S. Prabhakar, "Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review," *Environmental Chemistry Letters*, vol. 19, no. 4. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, pp. 3409–3443, Aug. 01, 2021. doi: 10.1007/s10311-021-01217-8.
- [79] S. Yiğitarıslan, "Modeling of extraction of total polyphenols from *Zingiber officinale*," *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, vol. 24, no. 7, pp. 1332–1337, 2018, doi: 10.5505/pajes.2018.67934.

- [80] T. I. Lafka, A. E. Lazou, V. J. Sinanoglou, and E. S. Lazos, "Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants," *Foods*, vol. 2, no. 1, pp. 18–31, Mar. 2013, doi: 10.3390/foods2010018.
- [81] K. Açıkalın, "Çeşitli biyokütle atık maddelerin pirolizi ve elde edilen ürünlerin analizi," Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2010.
- [82] B. Koç ve F. Kaymak-Ertekin, "Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları", GIDA, c. 35, sy. 1, ss. 1–8, 2010.
- [83] B. Diler, "Badem ve kestane kabukları kullanılarak sulu çözeltilerden bentazon ve metalaxyl pestisitlerinin giderimi," Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015.
- [84] N. İçyer, "Nar kabuğu fenolik bileşiklerinin su ile ekstraksiyonu ve ekstraktların mikroenkapsülasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [85] P. Yağcıoğlu, "Farklı ekstraksiyon metotları ile adaçayı (*Salvia Officinalis* L.) bitkisinden antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2015.
- [86] D. Ozonur, D. Kılıç, H. T. K. Akdur, and H. Bayrak, "Temel Bileşenler Analizi ve Yanıt Yüzey Yöntemi Kullanılarak Gıda Sektöründe Çoklu Yanıtların Optimizasyonu," *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, vol. 12, no. 2, pp. 734–744, Aug. 2019, doi: 10.18185/erzifbed.485762.
- [87] Z. İlbaý, "Turunçgil meyve ve yapraklarının farklı ekstraksiyon yöntemleriyle ekstraksiyonu ve matematik modellemesi," Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2016.
- [88] G. Akbulut Altunal, "Gıda sanayisinde kullanılan kapyra biberin atıklarından likopen ekstraksiyonu," Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2018.
- [89] F. Bekar and A. Kamiloğlu, "Effect of different carbon sources on exopolysaccharide production of *Lactiplantibacillus pentosus* KS27 and optimization of production conditions using Box-Behnken designing," *Biomass Convers Biorefin*, 2023, doi: 10.1007/s13399-023-04545-7.
- [90] İ. Eren, "Patateslerin osmotik dehidrasyonunun response surface metodu kullanılarak optimizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004.
- [91] M. H. Ahmad-Qasem, B. H. Ahmad-Qasem, E. Barrajon-Catalán, V. Micol, J. A. Cárcel, and J. V. García-Pérez, "Drying and storage of olive leaf

- extracts. Influence on polyphenols stability,” *Ind Crops Prod*, vol. 79, pp. 232–239, Jan. 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.006.
- [92] S. Şahin, E. Elhussein, M. Bilgin, J. M. Lorenzo, F. J. Barba, and S. Roohinejad, “Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf,” *J Food Process Preserv*, vol. 42, no. 5, May 2018, doi: 10.1111/jfpp.13604.
- [93] P. Hashemi, B. Delfan, A. R. Ghiasvand, M. Alborzi, and F. Raeisi, “A study of the effects of cultivation variety, collection time, and climate on the amount of oleuropein in olive leaves,” *Acta Chromatogr*, vol. 22, no. 1, pp. 133–140, Mar. 2010, doi: 10.1556/ACrom.22.2010.1.10.
- [94] L. Abaza, N. Ben Youssef, H. Manai, F. Mahjoub Haddada, K. Methenni, and M. Zarrouk, “Chétoui olive leaf extracts: Influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities,” *Grasas y Aceites*, vol. 62, no. 1, pp. 96–104, Jan. 2011, doi: 10.3989/gya.044710.
- [95] I. Filgueira-Garro, C. González-Ferrero, D. Mendiola, and M. R. Marín-Arroyo, “Effect of cultivar and drying methods on phenolic compounds and antioxidant capacity in olive (*Olea europaea* L.) leaves,” *AIMS Agriculture and Food*, vol. 18, no. 1, pp. 250–264, 2022, doi: 10.3934/agrfood.2022016.
- [96] I. Afaneh, H. Yateem, and F. Al-Rimawi, “Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein,” *Am J Analyt Chem*, vol. 06, no. 03, pp. 246–252, 2015, doi: 10.4236/ajac.2015.63023.
- [97] N. S. A Malik and J. M. Bradford, “Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves WFL Publisher Science and Technology,” 2005. Available: www.world-food.net
- [98] T. W. Caldas *et al.*, “Phenolic compounds recovery from grape skin using conventional and non-conventional extraction methods,” *Ind Crops Prod*, vol. 111, pp. 86–91, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.indcrop.2017.10.012.
- [99] S. Mylonaki, E. Kiassos, D. P. Makris, and P. Kefalas, “Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology,” in *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Nov. 2008, pp. 977–985. doi: 10.1007/s00216-008-2353-9.
- [100] N. Elboughdiri, “Effect of Time, Solvent-Solid Ratio, Ethanol Concentration and Temperature on Extraction Yield of Phenolic Compounds from Olive Leaves,” 2018, www.etasr.com
- [101] S. Şahin and R. Şamli, “Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology,” *Ultrason Sonochem*, vol. 20, no. 1, pp. 595–602, 2013, doi: 10.1016/j.ultsonch.2012.07.029.

- [102] F. Zakaria, J. K. Tan, S. M. Mohd Faudzi, M. B. Abdul Rahman, and S. E. Ashari, "Ultrasound-assisted extraction conditions optimisation using response surface methodology from *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil leaves," *Ultrason Sonochem*, vol. 81, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ultsonch.2021.105851.
- [103] S. Şahin, Z. İlbay, and İ. Kırbaşlar, "Study on Optimum Extraction Conditions for Olive Leaf Extracts Rich in Polyphenol and Flavonoid," *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, vol. 50, no. 8, pp. 1181–1189, May 2015, doi: 10.1080/01496395.2014.966203.
- [104] M. Ramić, S. Vidović, Z. Zeković, J. Vladić, A. Cvejin, and B. Pavlić, "Modeling and optimization of ultrasound-assisted extraction of polyphenolic compounds from *Aronia melanocarpa* by-products from filter-tea factory," *Ultrason Sonochem*, vol. 23, pp. 360–368, 2015, doi: 10.1016/j.ultsonch.2014.10.002.
- [105] Ö. F. Gamli, Ö. Süfer, and T. Eker, "Dehydration Kinetics and Infusion Attributes of Microwave Dried Olive Leaves," *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, vol. 6, no. 8, pp. 963–970, Aug. 2018, doi: 10.24925/turjaf.v6i8.963-970.1596.
- [106] Ü. Akbaş, "Farklı çeşit zeytin yapraklarının fenolik bileşen, antioksidan aktivite ve mineral içeriği üzerine kurutmanın etkisi," Yüksek Lisans Tezi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2017.
- [107] G. S. da Rosa, S. K. Vanga, Y. Garipey, and V. Raghavan, "Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.)," *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, vol. 58, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ifset.2019.102234.
- [108] Z. Erbay and F. Icier, "Thin-layer drying behaviors of olive leaves (*Olea europaea* L.)," *J Food Process Eng*, vol. 33, no. 2, pp. 287–308, Apr. 2010, doi: 10.1111/j.1745-4530.2008.00275.x.
- [109] N. Bahloul, N. Boudhrioua, M. Kouhila, and N. Kechaou, "Convective solar drying of olive leaves," *J Food Process Eng*, vol. 34, no. 4, pp. 1338–1362, Aug. 2011, doi: 10.1111/j.1745-4530.2009.00432.x.
- [110] K. Rayaguru and W. Routray, "Microwave drying kinetics and quality characteristics of aromatic *Pandanus amaryllifolius* leaves," 2011.
- [111] A. Boukhiar, S. Benamara, Y. Bouchal, K. Touderte, and S. Messouidi, "High-temperature Thin-layer Drying Kinetic of Cultivated and Wild Algerian Olive Leaves Modeling and Effect on Oleuropein and Chlorophyll Contents," *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, vol. 66, no. 4, pp. 660–674, Oct. 2022, doi: 10.3311/PPch.20264.

- [112] M. Chiara Di Meo, F. Izzo, M. Rocco, A. Zarrelli, M. Mercurio, and E. Varricchio, "Mid-Infrared spectroscopic characterization: New insights on bioactive molecules of *Olea europaea* L. leaves from selected Italian cultivars," *Infrared Phys Technol*, vol. 127, Dec. 2022, doi: 10.1016/j.infrared.2022.104439.
- [113] F. Aouidi *et al.*, "Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses," *Ind Crops Prod*, vol. 37, no. 1, pp. 292–297, May 2012, doi: 10.1016/j.indcrop.2011.12.024.
- [114] E. Deniz, "Çiğ sığır eti karışımlarında farklı türlere ait etlerin Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi (FT-IR) Spektroskopisi ile belirlenmesi," Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2018.
- [115] A. Can, H. Ayvaz, Ç. U. Pala, N. Condelli, F. Galgano, and R. Tolve, "The potential of near and mid-infrared spectroscopy for rapid quantification of oleuropein, total phenolics, total flavonoids and antioxidant activity in olive tree (*Olea europaea*) leaves," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 12, no. 4, pp. 2747–2757, Dec. 2018, doi: 10.1007/s11694-018-9892-3.
- [116] H. Baltacıoğlu and G. Doğanay, "Isıl işlemin elma suyunda enzim aktivitesi ve fenolik bileşiklere etkisi: FTIR ve HPLC çalışması," *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, vol. 9, no. 1, pp. 14–26, Mar. 2021, doi: 10.21923/jesd.848043.
- [117] D. Cör Andrejč, B. Butinar, Ž. Knez, K. Tomažič, and M. Knez Marevci, "The Effect of Drying Methods and Extraction Techniques on Oleuropein Content in Olive Leaves," *Plants*, vol. 11, no. 7, Apr. 2022, doi: 10.3390/plants11070865.
- [118] N. Sarıtaş, "Ceviz yeşil kabuğundan ultrases yardımıyla fenolik madde ekstraksiyonu, kinetik modellenmesi ve optimizasyonu," Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2018.
- [119] Z. Khiari, D. P. Makris, and P. Kefalas, "An investigation on the recovery of antioxidant phenolics from onion solid wastes employing water/ethanol-based solvent systems," *Food Bioproc Tech*, vol. 2, no. 4, pp. 337–343, 2009, doi: 10.1007/s11947-007-0044-8.
- [120] Y. Gong, Z. Hou, Y. Gao, Y. Xue, X. Liu, and G. Liu, "Optimization of extraction parameters of bioactive components from defatted marigold (*Tagetes erecta* L.) residue using response surface methodology," *Food and Bioprocess Processing*, vol. 90, no. 1, pp. 9–16, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.fbp.2010.12.004.
- [121] S. Chakraborty, R. Uppaluri, and C. Das, "Optimization of ultrasound-assisted extraction (UAE) process for the recovery of bioactive compounds from bitter melon using response surface methodology (RSM)," *Food and*

Bioproducts Processing, vol. 120, pp. 114–122, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.fbp.2020.01.003.

- [122] N. Ghanem, D. Mihoubi, N. Kechaou, and N. B. Mihoubi, “Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: Effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content,” *Ind Crops Prod*, vol. 40, no. 1, pp. 167–177, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.indcrop.2012.03.009.
- [123] S. Şahin, E. Elhussein, M. Bilgin, J. M. Lorenzo, F. J. Barba, and S. Roohinejad, “Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf,” *J Food Process Preserv*, vol. 42, no. 5, May 2018, doi: 10.1111/jfpp.13604.
- [124] U. K. Sahu, S. S. Mahapatra, and R. K. Patel, “Application of Box–Behnken Design in response surface methodology for adsorptive removal of arsenic from aqueous solution using CeO₂/Fe₂O₃/graphene nanocomposite,” *Mater Chem Phys*, vol. 207, pp. 233–242, Mar. 2018, doi: 10.1016/j.matchemphys.2017.11.042.
- [125] A. Mujtaba, M. Ali, and K. Kohli, “Statistical optimization and characterization of pH-independent extended-release drug delivery of cefpodoxime proxetil using Box–Behnken design,” *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 92, no. 1, pp. 156–165, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.cherd.2013.05.032.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

1. M. Cebbar, Ö. Doğan, D. Kılıç, “Zeytin Yapraklarından Ekstrakte Edilen Toplam Fenolik Bileşiklerin Miktarına Kurutma ve Ekstraksiyon Parametrelerinin Etkisi,” *6th International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences*, Online, October 2023, pp. 1504.

