



T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGE BÖLGESİNE AİT ZEYTİN YAPRAKLARINDAKİ OLEUROPEİN
İÇERİĞİNİN HPLC İLE TESPİTİ VE ANTİOKSİDAN ANALİZLERİNİN
BELİRLENMESİ

BEYZA ÇİSİL DEDE

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Salih TUNCAY

Eş Danışman

Dr.Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL

İSTANBUL-2023

T.C.
ÜSKÜDAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

EGE BÖLGESİNE AİT ZEYTİN YAPRAKLARINDAKİ OLEUROPEİN
İÇERİĞİNİN HPLC İLE TESPİTİ VE ANTİOKSİDAN ANALİZLERİNİN
BELİRLENMESİ

BEYZA ÇİSİL DEDE

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Salih TUNCAY
Eş Danışman
Dr.Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL

İSTANBUL-2023

ÖZET

EGE BÖLGESİNE AİT ZEYTİN YAPRAKLARINDAKİ OLEUROPEİN İÇERİĞİNİN HPLC İLE TESPİTİ VE ANTİOKSİDAN ANALİZLERİNİN BELİRLENMESİ

Amaç: Zeytin ağacı (*Olea europaea* L., *Oleaceae*) yetiştiriciliği ülkemizde sektörel bir önem taşımaktadır. Zeytin üreticiliğinin yan ürünü olarak gördüğümüz zeytin yaprağının fenolik bileşiği olan oleuropeince zengin olduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı üç farklı bölgeye ait zeytin yaprağında bulunan oleuropein içeriğinin HPLC ile tespiti ve karakterizasyonunu belirlemek ve elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerinin değerlendirilmesidir.

Metod: Balıkesir, Aydın ve Muğla'nın farklı tür zeytin yaprakları maserasyon ve dekoksasyon (refluks) yöntemleri kullanılarak ekstraksiyon elde edildi ve kolon kromatografisi ile saflaştırıldı. Zeytin yaprağı ekstraktları ve saflaştırmadan elde edilen ekstraktlar öncelikle HPLC ile karakterizasyonu yapıldı. Ardından DPPH ve FRAP yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri hesaplandı.

Bulgular: Balıkesir-Edremit yöresinden temin edilen zeytin yapraklarından alınan etanol ekstraktında HPLC sonuçlarına göre; BE-1 için (40°C, dekoksasyon) 283,69 mg/g ve toplam oleuropein içeriği %9.44 verimle ve BE-2 için (20°C, maserasyon) 310 mg/g ve toplam oleuropein içeriği %6,9 verimle en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Balıkesir-Edremit yöresinde BE-1 için elde edilen ekstrak verimi %33.2 (16,634g/50g) iken düşük sıcaklıkta BE-2 için ekstraksiyon verimi %21.87 (10,935g/50g) olarak tespit edilmiştir. DPPH yöntemi sonucu en yüksek antioksidan kapasite Muğla-Delice (MD-2) için 2.1 ± 0.19 IC₅₀ olarak belirlenirken FRAP yönteminde en yüksek antioksidan sonuçlar yine Balıkesir-Edremit yöresine ait ekstraktlara (BE-1, BE-2; sırasıyla 21.28 ± 0.15 ekuvalent/mmol AA, 21.68 ± 0.11 mg ekuvalent/mmol AA) ait olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç: Türkiye'nin 3 farklı iline ait 5 farklı bölgeden temin edilen tüm ekstraktların ve bu ekstraktlardan izole edilen yüksek oleuropein içerikli izolatların standart olarak kullanılan Askorbik Asitten 4 ila 20 kat daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte ekstraktlar arasında en yüksek verim ve oleuropein içeriğine sahip Balıkesir-Edremit bölgesine ait ham ekstraktların (BE-1 için 21.28 ± 0.15 mg

ekivalent/mmol AA; BE-2 için 21.68 ± 0.11 mg ekuivalent/mmol AA) FRAP yönteminde en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği ve DPPH yönteminde ise OL-1 için 2.46 ± 0.3 IC₅₀ (izolat) ve Muğla-Delice için 2.10 ± 0.19 IC₅₀ (MD-2, 20 °C’de) ekstaraktının en yüksek antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, HPLC, Oleuropein, Zeytin yaprağı (*Olea europaea* L.)



ABSTRACT

DETERMINATION OF OLEUROPEIN CONTENT IN OLIVE LEAVES FROM AEGEAN REGION BY HPLC AND DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ANALYSIS

Objective: Olive tree (*Olea europaea* L., Oleaceae) cultivation has a sectoral importance in our country. It is known that the olive leaf, which we see as a by-product of olive production, is rich in oleuropein, a phenolic compound. The aim of this study is to determine and characterize the oleuropein content in olive leaves from three different regions by HPLC and to evaluate the antioxidant activities of the extracted extracts.

Method: Different kinds of olive leaves of Balıkesir, Aydın and Muğla were extracted using maceration and decoction (reflux) methods and purified by column chromatography. Olive leaf extracts and extracts obtained from purification were first characterized by HPLC. Then, antioxidant activities were calculated with DPPH and FRAP methods.

Results: According to HPLC results of ethanol extract taken from olive leaves obtained from Balıkesir-Edremit region; The best results were obtained for BE-1 (40°C, decoction) with a yield of 283.69 mg/g and total oleuropein content of 9.44%, and for BE-2 (20°C, maceration) with a yield of 310 mg/g and total oleuropein content of 6.9%. While the extract yield for BE-1 in Balıkesir-Edremit region was 33.2% (16,634g/50g), it was determined as 21.87% (10,935g/50g) for BE-2 at low temperature. While the highest antioxidant capacity was determined as 2.1 ± 0.19 IC₅₀ for Muğla-Delice (MD-2) as a result of the DPPH method, the highest antioxidant results in the FRAP method were again for the extracts from the Balıkesir-Edremit region (BE-1, BE-2; 21.28 ± 0.15 equivalents/ mmol AA, 21.68 ± 0.11 mg equivalent/mmol AA).

In conclusion: It has been determined that all extracts obtained from 5 different regions of 3 different provinces of Turkey and isolates with high oleuropein content isolated from these extracts exhibit antioxidant activity 4 to 20 times higher than the standard Ascorbic Acid used. However, among the extracts, crude extracts from Balıkesir-Edremit region with the highest yield and oleuropein content (21.28 ± 0.15 mg equivalent/mmol AA for BE-1; 21.68 ± 0.11 mg equivalent/mmol AA for BE-2) had the highest antioxidant in the

FRAP method. It was determined that the extract showed the highest antioxidant activity in the DPPH method, 2.46 ± 0.3 IC₅₀ (isolate) for OL-1 and 2.10 ± 0.19 IC₅₀ (MD-2, at 20 °C) for Muğla-Delice.

Keywords: Antioxidant activity, HPLC, Oleuropein, Olive leaf (*Olea europaea* L.)



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimde ve akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan; bilgi, tecrübe ve önerileriyle daha iyi olmam konusunda yönlendiren, desteğini hep hissettiren tez danışmanım değerli Dr.Öğr. Üyesi Salih TUNCAY' a ve bu süreçte ilgi, yardım ve hoş görüşünü esirgemeyen eş danışmanım Dr.Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARASAKAL'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca yardımını esirgemeyen tıkağım her konuda elinden geleni yapıp yardımcı olan arkadaşım Yunus Emre TOPRAK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamdaki antioksidan aktive deneylerinde yardımcı olan Dr.Öğr. Üyesi Shirin TARBIAT'a, HPLC analizleri için Prof. Dr. Murat KARTAL ve Bezmialem Fitoterapi Eğitim Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne teşekkür ederim.

Her zaman her koşulda yanımda olup maddi ve manevi desteğini hiç eksik etmeyen kararlarım saygı duyup daha ilerisini hedeflemem konusunda elinden gelen her şeyi yapan canım annem Gülseren DEMİRCİLER'e ve ablalarım Kübra ASLAN ve Melike Zeynep DEDE'ye teşekkürü borç bilirim.

MART 2023

Beyza Çisil DEDE

BEYAN FORMU

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, tarafımdan üretildiğini ve Üsküdar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak yazıldığını beyan ederim.

MART 2023

Beyza isil DEDE

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
BEYAN FORMU	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zeytin Ağacı ve Tarihçesi.....	3
2.2. Dünya’da ve Türkiye’de Zeytincilik.....	4
2.3. Zeytin yaprağı	7
2.4. Zeytin Yaprak Ekstraktı.....	8
2.4.1 Ekstraksiyon Çeşitleri	10
2.4.1.1. Maserasyon	10
2.4.1.2. Demaserasyon.....	10
2.4.1.3. Dekoksiyon	11
2.4.1.4. İnfüzyon	11
2.4.1.5. Dijestiyon.....	11
2.4.1.6. Perkolasyon.....	11
2.4.1.7. Sokslet Ekstraksiyonu.....	11
2.4.1.8. Refluks (Geri Dönüştürücü) Sistemi.....	12
2.5. Zeytin Yaprakındaki Sekonder Metabolitler	13
2.5.1. Terpenler.....	14
2.5.1.1. Hemiterpenler	14

2.5.1.2. Monoterpenler.....	14
2.5.1.3. Seskiterpenler.....	15
2.5.1.4. Diterpenler	15
2.5.1.5. Triterpenler	15
2.5.1.6. Tetraterpenler.....	15
2.5.1.7. Meroterpenler.....	16
2.5.2. Alkoloitler.....	16
2.5.3. Fenolik Bileşikler.....	17
2.5.3.1.Flavon ve Flavonoller	18
2.6. Zeytin Yaprığında Bulunan Etken Madde Oleuropein	18
2.7. Serbest Radikaller	20
2.7.1. Oksidatif Stres.....	21
2.7.2. Antioksidanlar.....	21
2.8. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Biyolojik Aktiviteleri	22
2.8.1. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antioksidan Aktivitesi	22
2.8.2. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antimikrobiyal Aktivitesi	25
2.8.3. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antikanser Aktivitesi	25
2.8.4. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antiviral Aktivitesi	26
2.9. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Gıdalarda Kullanımı	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	28
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar	28
3.1.3. Bitkisel Gereçler	29
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Zeytin Yapraklarında Ekstraksiyon Hazırlanması	30
3.2.1.1. Zeytin Yaprığından 40 °C’de Ekstrakt Hazırlama Prosedürü	30

3.2.1.2. Zeytin Yaprğından 20 °C’de Ekstrakt Hazırlama Prosedürü	31
3.2.1.3. Zeytin Yaprğı Ekstraksiyon Verim Oranının Hesaplanması	32
3.2.2. Kromatografik yöntemler	33
3.2.2.1. İnce tabaka kromatografisi (Prep. İTK)	33
3.2.2.2. Kolon (Sütün) Kromatografisi	34
3.2.2.3. Zeytin Yaprğı Ekstraktının Safılaştırma Verim Oranı	35
3.3. Zeytin Yaprakları ve Safılaştırılmış Ekstraktların HPLC Karakterizasyonu ve Oleuropein Miktar Tayini	36
3.3.1. Kullanılan Ekipmanlar	36
3.3.2. Kromatografik Koşullar	36
3.3.3. Kalibrasyon	36
3.3.4. Oleuropein HPLC Metodu	37
3.4. Oleuropeinin Antioksidan Aktivitesi Hesaplanması	37
3.4.1. 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Aktivite	37
3.4.2. Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Aktivitesi	37
4. BULGULAR	39
4.1. Zeytin Yaprğı Ekstraktlarının Verimi ve Oleuropein İeriğı	39
4.2. Zeytin Yaprğı Ekstraktlarının ve Oleuropein’in Antioksidan Özellikleri	40
4.2.1. FRAP Analizleri Sonuçları	41
4.2.2. DPPH Analizleri Sonuçları	41
4.3. Zeytin Yaprğı Ekstraktlarının ve Oleuropein’in HPLC Analizleri	41
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
6. ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54
EKLER	63
Ek 1. Özgeçmiş	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Zeytin yaprağı bileşenleri tablosu	7
Tablo 2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemelerin Özellikleri	28
Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar Üretim Yerleri ve Kodları	28
Tablo 4. Numune isimlerinin kısaltılmış kodları	30
Tablo 5. Zeytin yapraklarının ekstraksiyon tablosu.....	32
Tablo 6. Zeytin yaprağı ekstraksiyon verim tablosu.....	33
Tablo 7. Zeytin ekstraktlarından kolon kromatografisi sonuçları.....	35
Tablo 8. Kolondan elde edilen oleuropeinin verim tablosu.....	36
Tablo 9. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde verimi ve yüzde oleuropein içeriği	39
Tablo 10. Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) testi ve DPPH radikal süpürme testi ile Zeytin yaprakları ve saflaştırılmış ekstraktlarının antioksidan aktivitesi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n= 3).	41
Tablo 11. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Kolondan Geliş Yüzdeleri	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İbadet temsil eden zeytin ağacı resmi.....	4
Şekil 2. Türkiye’de zeytin ağacı bulunan iller haritası (TÜİK, 2019).....	6
Şekil 3. Sokslet ekstraksiyonu görüntüsü	12
Şekil 4. Refluks sistemi görüntüsü	13
Şekil 5. Oleuropein yapısı.....	19
Şekil 6. Ege bölgesine ait zeytin yaprağı örnekleri	29
Şekil 7. Aydın-Çine’ye ait zeytin yaprağı 40 °C’de ekstraksiyon görüntüsü	31
Şekil 8. Balıkesir-Edremit’e ait zeytin yaprağı 20 °C’de ekstraksiyon görüntüsü.....	31
Şekil 9. Kolondan elde edilen oleuropeinin İTK görüntüsü; 254 nm	34
Şekil 10. Kolon kromatografisi.....	35
Şekil 11. Kalibrasyon doğru grafiği.....	37
Şekil 12. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde verim tablosu	40
Şekil 13. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde oleuropein tablosu	40
Şekil 14. HPLC sonucu alınan kromatogram görüntüleri	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%: Yüzde Değer

β : Beta

g: Gram

L: Litre

mg: Miligram

mL: Mililitre

μ M: Mikrometre

μ L: Mikrolitre

Kısaltmalar

ABTS: 2,2-azinobis (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit)

BHT: Bütünlenmiş hisroksituluen

CAT: Katalaz

CVD: Konjuge dien değerleri

DNA. Deoksiribonükleik asit

DPPH: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

FRAP: Demir indirgeyici antioksidan güç

GE10H: 10-hidroksilaz

GES: Geraniol sentaz

GPP: Granil pirofosfat

GT:	Glikosiltransferaz
HOCl:	Hipokloröz asit
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography
IC ₅₀ :	Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
LAMT:	Loganoat metiltransferaz
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOO:	Lipid peroksil
MDA:	Malondialdehit
NADH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NO:	Nitrik asit
NO ₂ :	Nitrojen dioksit
N ₂ O ₃ :	Dinitrojen trioksit
O ²⁻ :	Oksijen
OH:	Hidroksil
ONOO ⁻ :	Peroksinitrit
PCO:	Protein karbonilleri
pH:	Potansiyel Hidrojen
POV:	Peroksit değeri
ppm:	Parts per million
RNS:	Reaktif azot türleri
ROO:	Peroksil
ROS:	Reaktif oksijen türleri
SLS:	Sekologanin sentaz

SOD:	Süperoksit dismutaz
TBARS:	Tiyobarbürük asit
TEAC:	Trolox eşdeğer antioksidan kapasite testi
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
UV:	Ultraviyole
VHSV:	Viral hemorajik septisemi rabdovirüs



1. GİRİŞ

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L., *Oleaceae*) Akdeniz ülkelerindeki en önemli ağaçlardan biridir. Tüm Akdeniz bölgesinde ve Güney Avrupa ülkelerinin çoğunda yetişir. Ayrıca zeytin ağacı yenilebilir meyve olarak ve yağ elde etmek amacıyla yetiştirilmektedir. Akdeniz bölgesinde yaklaşık sekiz milyon hektar ekili zeytin ağacı bulunmaktadır. 1854 yılında zeytin yaprağı ekstresinin ateş ve sıtmayı tedavi etmede etkili olduğu araştırılmıştır. O zamandan beri, birçok araştırmacı hipotansif, hipoglisemik, koroner dilatör, antiaritmik, antiüremik, antioksidan, anti-tamamlayıcı, antimikrobiyal, tiroid uyarıcı, antiviral ve anti-HIV aktivitelerini zeytin yaprağı ekstraktını incelemiştir (Altınyay, 2006).

Oleuropein, kumarin benzeri bileşenler sınıfına ait olan sekoiridoidlerin bir üyesidir. *Oleaceae*, *Gentianales*, *Cornales* familyasının bitkilerinde bol miktarda bulunan bir sekoiridoid glikozittir. Zeytin ağacının (*Olea europaea* L.) yapraklarında bulunan en yaygın aktif bileşiklerden biridir. Arkeolojik kalıntılara göre M.Ö. 6000 yılına kadar uzanmaktadır. Zeytin "Akdeniz diyeti" ile ilişkili ana lipid kaynağı olan sızma zeytinyağı üretmek için kullanılmaktadır. Düşük kardiyovasküler hastalık insidansı dahil olmak üzere çeşitli sağlık yararlarına faydaları ile ilişkilendirilir. Bu faydalar, genellikle sızma zeytinyağının uygun yağ asidi bazlı bileşimi ve benzersizliğinden sorumludur. Bunlar çeşitli küçük bileşenlerin (örneğin, karotenoidler ve polifenoller) oluşumudur. Sızma zeytinyağı, zeytinlerin mekanik veya diğer yöntemlerle ezilmesiyle elde edilir. Oleuropeini oluşturan bileşikler: hidroksitirosol (3,40 dihidroksifeniletanol), elenolik asit ve glikoz. Ağaçta, oleuropeinin şifa verdiği inanıldığı bilinmektedir. Ayrıca ağaçta böcek ve enfeksiyonlara karşı direnç sağladığı belirtilmiştir. Özellikle Akdeniz'de üretilen en önemli tarım ürünlerinden biri olan Zeytin (*Olea europaea*), dünyanın en dayanıklı ağaçlarından biridir. Yüzyıllardır dünyada yetiştirdiği tüm bölgelerde insanlar çeşitli hastalıkları tedavi etmek için geneleksenel tıpta zeytin yaprağını kullanmışlardır. Akdeniz ülkeleri dünya zeytin üretiminin yaklaşık yarısını karşılamaktadır. Bölge halkına önemli ekonomik faydalar ve gerekli besin maddelerini sağlar. (Soni, 2006).

Türkiye'nin zeytin üretim istatistiklerine göre TÜİK, 2019 yılında 182 milyon zeytin ağacından 28 milyonunun kıraç yaşta olduğunu ve toplam üretimin 1,5 milyon ton olduğunu bildirdi. Son zamanlarda pek çok bilimsel araştırmanın zeytin ağacı, özellikle zeytin, zeytinyağı ve zeytin yaprağı gibi ürünler üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir (El, 2009) Zeytin, proteinler, vitaminler, mineraller gibi insanın günlük beslenmesi için

gerekli besinleri içermektedir ve su vücudun emilen besinlerden daha iyi yararlanmasını sağlar. Ayrıca antimikrobiyal ve antioksidan etkilerinden dolayı sağlık üzerinde olumlu etkilere sahiptirler (Yamankaradeniz, 1981).

Zeytinyağı üretiminin yan ürünleri, zeytin yaprağı, zeytin prina ve zeytin atığı (karasu) olarak alt bölümlere ayrılabilir. Toplanan zeytinlerden yağ elde etmek için değirmende işlenirken elde edilen zeytinlerin ağırlığının %5'i kadar olan zeytin ağaçlarından hasat ve harman işleminden sonra 25 kg zeytin yaprağı elde edilmektedir (Delgado-Pertinez, 1998). Araştırmalar, zeytinyağı çıkarma işlemi sırasında elde edilen zeytin yapraklarının ham protein değerinin düşük, selüloz ve lignin kimyasal bileşiminin yüksek olduğu, saman ve saman kısımlarını ayırarak hayvan yemlerinin besin değerini artırdığını göstermiştir (Alibes, 1982; Amici, 1982). Bununla birlikte zeytin yapraklarının besleyici değerine iyileştirme yapılarak ruminant hayvanların rasyonuna kaba yem kaynağı olarak kullanılabilmesi ve bu konuda yapılan çalışmaların az olması nedeniyle deneysel yönüyle incelenmesi gerektiği bildirilmiştir (Amici, 1982). Zeytin yaprağının bölgesel olarak çoğunlukla hayvanların beslenmesinde, kırsal bölgelerde ve yerel işletmelerde yakıt (prinaya katkı malzemesi) olarak kullanımında değerlendirildiği görülmektedir. Bunun haricinde çok büyük bir kısmı da doğada yok olup gitmektedir. Ülkemiz, zeytincilik ve zeytinden elde edilen ürünler açısından dünya üzerinde çok önemli bir coğrafi konuma sahip olup fakat zeytin yaprakları yeteri kadar değerlendirilememektedir. Özellikle içeriğinde yer alan oleuropeinin endüstriyel olarak elde edilmesi gereken çok kıymetli bir etken maddedir. Oleuropein; kimyasal ham madde üretiminde yerli kaynakların değerlendirilmesi, gıda analizlerinde standart madde olarak üretilmesi, gıdalarda takviye edici gıda veya gıda katkı maddesi olarak kullanılması ve kalp-damar (Hansen, 1996) hastalıklarına yönelik tedavi süreçlerinde kullanılması gibi önemli etki değerine sahip bir ham maddedir. Bu açıdan katma değeri yüksek endüstriyel ürün olarak üretilmesi ve bu alana yatırım yapılması hem ülke ekonomisine hem de yerli hammadde üretimine önemli katkı sağlayacaktır.

Çalışmamızda Ege bölgesinde özellikle Muğla, Aydın ve Balıkesir yörelerinde yetiştirilen zeytin yapraklarındaki oleuropein miktarını belirlemek amacıyla numuneler temin edildi. Zeytin yapraklarından dekoksasyon ve maserasyon yöntemleri ile ekstraksiyon hazırlanmış olup ekstraksiyonların saflaştırılmasıyla zenginleştirilmiş oleuropein elde edilmiştir. Zeytin yaprağı ekstraksiyonları ve saflaştırılmış ekstraktlarının HPLC ile karakterizasyonu belirlenmiştir. DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri hesaplanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zeytin Ağacı ve Tarihçesi

İsminin kökeni Yunanca *elaia* ve Latince *olea*'dan gelen zeytin, *oleaceae* familyasına aittir. Zeytin ağacı yüzyıllardır var olmuş bilinen en eski bitkilerden biridir. Kökünden gövdesine, dalından yaprağına, çiçeğinden meyvesine her bölgesi ayrı zenginlikte olan bu bitki pek çok farklı coğrafyalarda yetişmiş ve halen yetişmektedir. Çoğunlukla 2-10 metre arasında boy veren zeytin ağacı 15-20 metreye kadar da çıkabilir. Önceleri meyveleri yeşilken ekim-kasım ayları arasında morararak olgunlaşır. Genellikle 300-400 yıl yaşayabilen zeytin ağacının 2000 yıl gibi uzun ömürlü olması kuraklıktan etkilenmeyen bir bitki olduğunu kanıtlar niteliktedir. Güneş gören verimli killi toprakta iyi yetişebildiği gibi fakir toprağa da dayanabilmektedir (Kaplan ve Arıhan, 2012)

İnsanlarla aynı tarihi paylaşan zeytin ağacının ilk olarak nerede ortaya çıktığı bilinmemekle birlikte, Ege Denizi'ndeki Anadolu, Girit ve Kiklad Adaları'ndan dünyaya yayıldığı tahmin ediliyor. Zeytin ağaçlarıyla ilgili en eski veriler Ege Denizi'ndeki Santorini adasında bulunurken, arkeolojik kazılarda 39.000 yıllık zeytin yaprağı fosilleri keşfedilmiştir. Kuzey Afrika'nın Sahra bölgesinde yapılan arkeolojik çalışmalarda M.Ö. 12.000 yıllarına tarihlenen zeytin ağaçları bulunmuştur. Ayrıca 39.000 yıl öncesine Anadolu'nun batı kıyılarına yerleşen Akhaların önemli bir gıda olarak zeytinden yararlandıkları bilinmektedir (Yurtoğlu, 2019).

Zeytin yetiştiricilerinin yıllar içindeki gözlemleri zeytin ağacının gövdesindeki her nokta, yerin altındaki kısım ve etrafındaki sırtlar köklenme özelliğine sahiptir. Bir zeytin ağacı yaşlansa, gövdesi çürüse veya kısmen kurusa bile filizler canlanacak ve yeni fidanlar oluşturacaktır. Orman yangınlarında bile yanmış zeytin ağaçlarının kısa sürede filizlendiği görülmüştür. Zeytin ağacı meyve vermekten fazlasını yapar. Dalları, yağı, kökleri ve yapraklarıyla da atalarına katkı sağlar. Zeytin ağacı yapraktan çekirdeğe birçok yönden değerlendirilir. Zeytin ağacı o kadar değerlidir ki hiçbir elementi kaybolmaz. Geçmişte süs, yiyecek ve yakıt olarak kullanılmıştır. Günümüzde ilaç ve kozmetikte giderek artan bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Tarbiat, 2022). Tabaklar, kaşıklar, çatallar, masa ve zeytin odunu bunlara örnektir. Sofralık zeytinin meyve çeşitlerinden, zeytin çekirdeklerinden yapılan tespihler, bilezikler ve kolyeler bulunmaktadır. Zeytinyağından, besin maddelerinden, gıda koruyucularından ve sabunlardan, küspesinden gübre ve yakıt elde edilir. Zeytin ağacı sert ve dayanıklıdır. Zeytin ağacının

budanmasından sonra oluşan odun yağları göz önüne alındığında, yakacak odun esaslı en kalorili ağaçtır (İlgar, 2016).

Zeytinin ülkemize Güneydoğudan, Suriye üzerinden ve Akdeniz kıyıları boyunca yayıldığına inanılmaktadır. Zeytin, Güneydoğu Anadolu'da Mardin'in güneyinden başlayarak, Akdeniz, Ege ve Marmara'nın kıyı kesimleri ve ovaları ile Karadeniz kıyılarındaki yerleşimler olmak üzere ülkemizde yayılış alanı bulabilmiştir. Rakımının düşük olması nedeniyle iç kesimlerde (Kahramanmaraş, Karaman, Burdur, Denizli, Bilecik, Adıyaman, Eskişehir, Isparta) zeytin yetiştiriciliğine uygun iklim koşullarına sahip sınırlı sayıda zeytinlik bulunmaktadır. Türkiye'de Akdeniz bitkisi zeytinin gelişimini ve yetiştiriciliğini iklim faktörleri belirlemektedir. İklim, sıcaklık ve yağış; kar, bağıl nem, sis, dolu ve rüzgâr faktörleriyle birleştiğinde zeytin yetiştiriciliğini büyük ölçüde etkiler (Meltem ve Varol, 2015).



Şekil 1. İbadet temsil eden zeytin ağacı resmi

2.2. Dünya’da ve Türkiye’de Zeytincilik

Zeytin ağacı 25 cins ve 600 türden oluşur ve yaprak dökmeyen bir bitki olarak tanımlanmaktadır. Dünyada 2019 yılında 20 milyon ton zeytin üretimi yaklaşık 10 milyon hektarlık alanda yapılmıştır (Salık ve Çakmakçı, 2021). Akdeniz bölgelerinde makilerde doğal olarak yetişmektedir ve bu iklime sahip ülkelerde kültürü yapılmaktadır. Dünyada zeytin üreticiliğinin %82.98’i Akdeniz bölgesinden oluşmaktadır. İspanya, İtalya,

Yunanistan, Türkiye, Tunus, Portekiz, Fas, Suriye ve Cezayir zeytin üretiminin en çok olduğu ülkeler arasında gösterilmektedir (Arslan ve ark., 2017; ve Ghomari ve ark.2020).

İçerdiği fizyolojik olarak aktif polifenoller sayesinde zeytin, beslenme açısından Akdeniz diyeti içerisinde önemli bir konuma sahiptir ve bu özelliklerinden yola çıkarak zeytin yaprağı özütü de halk sağlığında kullanılmıştır (Altıok ve ark., 2008).

Türkiye'de zeytinin Ege, Akdeniz, Marmara, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde uygun ekolojik koşullarda yetiştirilmesi dikkat çekmektedir (Tablo 1). Türkiye'nin zeytincilik alanı, toplam tarım alanının %2.3'ünü oluşturmakta olup, bağ ve bahçelik alanında dokuzuncu sırada yer almaktadır (Başaran, 2019).

Zeytin üretimi ile ilgili olarak, Türkiye dünyadaki diğer zeytin üreten ülkeler arasında zeytin ağacı yoğunluğu açısından önemli bir konuma sahiptir. Bu nedenle sayılı ülkelere göre bir halini almıştır. Türkiye'nin farklı bölgeleri farklı zeytin türleri üretir. Dünyadaki toplam zeytin üretiminin çoğu Akdeniz ülkelerinde gerçekleşmektedir. Yani zeytin ağaçları en yaygın olarak Akdeniz'dedir. Zeytin, Güneydoğu Anadolu'da Mardin'in güneyinden başlayarak Akdeniz, Ege, Marmara'nın kıyı ve ova bölgeleri ile Karadeniz kıyılarındaki yerler olmak üzere ülkemizde yayılım alanları bulabilmiştir. Kıyı bölgeleri dışında, alçak rakım nedeniyle iklim koşullarının zeytin yetiştirmeye elverişli olduğu iç kesimlerde sınırlı miktarda zeytinlik bulunabilir (Koca, 2004).

Zeytin, dünyada bilinen ilk ağaçlardan biridir. Ülkemizdeki elverişli koşullar sayesinde zeytin üretimi gerçekleşmektedir. Her bölgenin toprak yapısı ve iklim koşulları gibi özellikleri farklı zeytin türlerinin yetiştirilmesine imkân vermektedir. Kültür zeytini; sofralık zeytin ve yağlık zeytin başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır.



Şekil 2. Türkiye’de zeytin ağacı bulunan iller haritası (TÜİK, 2019)

Türkiye'nin en önemli zeytin üretim bölgelerinden biri olan Ege Bölgesi, ülke üretiminin %7'sini karşılamaktadır (Tablo 1). Çoğu zeytin yağ olarak kullanılır. Zeytin Marmara bölgesinde yetiştirilmekle birlikte genel olarak sofralık zeytin üretimi yapılmaktadır. Merkez Gemlik ilçesidir. Akdeniz, ülkenin üretimini karşılıyor. Güneydoğu Anadolu bölgesinde üretim, daha küçük ölçekte de olsa, Akdeniz iklimine sahip bölgelerde gerçekleşmektedir. Bu bölgeden çoğu ürün petrol olarak kabul edilir. Karadeniz bölgesinin iklim şartlarından dolayı zeytin üretimi %0.6 civarında olabilmektedir (Dülger, 2004).

Zeytin yaprağının Türkiye’de idrar sökücü, iştah açıcı, ateş düşürücü ve kabız gibi %5’lik infüzyon halinde dâhilen kullanılmaktadır. Şeker hastalığına karşı kullanımı da mevcuttur. İltihaplı yaraların temizlenmesi ve pansumanında da kullanıldığı bilinmektedir (Arslan ve ark., 2017). Ayrıca obezite problemlerine karşı koruma sağlamak için de lipid metabolizmasını geliştirir ve protein sindiriminin bir aktivatörü olan triaçilgliserol emiliminin inhibitörü gibi görünmektedir (Bahşi ve ark., 2016).

2.3. Zeytin yaprağı

Zeytin yaprağı (*Olea europaea* L.), iklim şartları, toprak, olgunluk derecesi ve depolanma koşulları gibi farklı etkenlere bağlı olarak ve zeytin ağacının çiçekleri ve meyvelerinden farklı olarak önemli miktarda fenolik bileşik içermektedir (Benavente-García ve ark., 2000; Ranalli ve ark, 2006). Zeytin yaprağındaki en baskın bileşiğin oleuropein olduğu bilinmektedir. Bourquelot ve Vintilesco tarafından ilk kez 1908 yılında keşfedilmiştir ancak yapısı 1960 yılında tanımlanmıştır. Hidroksitirozol, luteolin ve apijenin flavon-7-glikozitleri ve verbaskozit ise oleuropeini takip eder. Hidroksitirozol, oleuropein için temel parçalama ürünüdür (Bayram ve ark., 2020; ve Yıldız ve Uylaşer, 2011).

Tablo 1. Zeytin yaprağı bileşenleri tablosu



Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin büyük bir kısmının güçlü bir radikal süpürücü etkiye sahip olduğu, kan basıncını düşürdüğü, koroner arterdeki kan akışını arttırdığı ve bağırsak spazmlarını önlediğine dair veriler bulunmaktadır (Benavente-García ve ark., 2000; Şahin ve Şamlı., 2013; Ghanem ve ark., 2019).

Fenolik asitlerin bileşiklerinin bazıları; flavonoidler (apigenin 7-O-glukozit, rutin, luteolin 4-O-glukozit, lutein 7-O-glukozit), fenolik alkoller (tirosol ve hidroksitirosol) ve sekoiridoidler (oleuropein)dir. Feniletanoidler grubuna ait olan oleuropein, zeytin meyvelerinde, yapraklarında ve zeytin preslerinde en bol bulunan fenolik bileşiktir. Zeytinyağı %0,005-0,12 oleuropein, %0,9'a kadar zeytinyağı ve %1-14 zeytin yaprağı içerir. (Caporaso ve ark., 2018). Olgunlaşmamış zeytine acı tadını veren oleuropeinin antibakteriyel, antitümör, antikanser, kalp koruyucu, hipotansif ve hipolipidemik etkileri çeşitli araştırmalarla saptanmıştır (Benavente-García ve ark., 2000; Rahmanian ve ark., 2015; Ghanem ve ark., 2019).

Zeytin yaprağının kimyasal bileşimi; ağaç türü, yetiştirme iklimi, bölge, dal ve ağaç ilişkisi gibi parametrelere göre değişmektedir. Zeytin yaprakları esas olarak tanenler, uçucu yağlar, reçineler ve organik asitler içerir. Birçok fenolik bileşik hem zeytinde hem de zeytin yaprağında bulunur. Oleuropein bileşiği zeytin meyvesinin tüm kısımlarında (çekirdek, kabuk, küspe) bulunmasına rağmen, en yüksek konsantrasyon zeytin yapraklarındadır. Zeytin yaprağı çayının içerdiği fenolik bileşikler nedeniyle önemli antioksidan kapasitesi ile DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ve hidrojen peroksit radikallerine karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Sarı, 2017).

Zeytin yaprağı, zeytin hasadı sırasında atık yan ürün olarak kullanılan maddelerden biridir, ağaçların budanması ve zeytinyağının ekstraksiyonu öncesi yapılan işlemler sırasında elde edilir (Bahşi ve ark., 2016). Zeytinyağı işleme sırasında açığa çıkan yan ürünler ve atıklar biyoaktif bileşenler bakımından önemli potansiyel kaynaklardır (Salık ve Çakmakçı, 2021).

2.4. Zeytin Yaprağı Ekstraktı

Zeytin yaprağı ekstraktının ana bileşeni olan oleuropein, zeytin ağacı yapraklarında büyük miktarlarda ve zeytinyağında düşük miktarlarda bulunan kompleks bir fenoldür ve zeytinyağının acı tadı ve keskin aromasından sorumludur. *İn vitro* çalışmalar, oleuropeinin bir antitümör bileşik gibi davrandığını, trombosit aktive edici faktör aktivitesini inhibe ettiğini, fare makrofajları tarafından nitrik oksit üretimini arttırdığını ve inflamatuvar mediatör üretimini azalttığını göstermiştir (Mourtzinou ve ark., 2007).

Haddadin (2010) tarafından yapılan araştırmada farklı çözücüler ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktları ve bağırsak kaynaklı mikroorganizmalar olan *Bifidobacterium infantis*, *Lb. acidophilus* eklenmiştir. Mikroorganizma sayısı ve kısa zincirli yağ asitlerinin üretimindeki artışını izlemek için zeytin yaprağı ekstraktları kullanılmıştır. Ekstrakt ilavesi ile kısa zincirli yağ asidinin ve mikroorganizma sayısının arttığı gözlemlenmiştir. Ekstrakt ilaveleri yapıldığında her üç ekstraktın kontrol gruplarına nazaran kısa zincirli yağ asidi ve mikroorganizma sayısının arttığı görülmüştür. Bahsedilen iki bakteri türü içinde zeytin yaprağının etanol ile ekstre edildiği tespit edilmiştir. Araştırmada, sonuç olarak zeytin yaprağında ekstresinde bulunan polifenol bileşiklerin probiyotik bakterilerin etkenliğini geliştirdiği vurgulanmıştır. Bu sebeple günlük diyeteye zeytin yaprağı ekstraktı ilave edildiğinde sağık üzerinde pozitif etkiler oluşturabileceğine, zararlı bakteri olarak bilinen *Clostridium spp* ve *E. Coli* 'nin etkenliğini engelleyebileceğini ve bağırsak mikroflorasını düzenleyebileceğini öne sürülmüştür (Topuz, 2019).

Zeytin yaprağı ekstraktının kanın pıhtılaşmasını düzenlemesi, kan dolaşımını rahatlatması ve kalbe giden damarlardaki kanın akışını arttırması gibi sebeplerle kalp krizi ve rahatsızlığı risklerini önlediğı bunun yanı sıra LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein)'nin oksidasyonunu inhibe ederek kalp-damar hastalıkları riskini azalttığı ve kan basıncına sebep olan adrenaline etki ettiğı tespit edilmiştir. Ayrıca zeytin yaprağı ekstraktının bağırsak ritim bozukluklarını azalttığı ve kas kasılmalarını önlediğı bilmekte ve anti-tümör nekrozis faktör etkisi nedeniyle alerji tedavisinde önerilmektedir (Peker, 2012).

Soni ve ark. (2006) sıçanlarda yapılan bir gelişimsel toksisite çalışmasında, zeytin özü ekstraktının 2000 mg/kg/gün'e kadar (test edilen en yüksek doz) düzeylerde doğum/doğum sonrası veya gelişimsel toksisiteye neden olmadığını gözlemlemişlerdir. Sıçanlarda yapılan bir oral doz aralığında üreme çalışmasında, 500 ila 2000 mg/kg/gün arasında değışen ekstrakt dozları, ebeveynin üreme performansı parametrelerinin hiçbirini (östrus döngüsü, çiftleşme, doğurganlık, doğum, emzirme, anne davranışı) veya doğumdan sonraki bir hafta boyunca yavruların canlılığı, büyümesi veya gelişmesi incelenmiştir. Bir *in vitro* mutajenite çalışmasında, sulu zeytin posası ekstraktı, *S. typhimurium* TA97 ve TA1535 suşlarında metabolik aktivasyon varlığında veya yokluğunda mutajenik bulunmazken, TA98 ve TA100 suşlarında sonuçlar şüpheliyken

E. coli ile yapılan genotoksisite deneylerinde mutajenite sonucu kaydedilmemiştir. Çin hamsterı yumurtalık hücrelerinde yapılan kromozom aberasyon çalışmalarında, ekstrakt, metabolik aktivasyon varlığında 1000 µg/ml'de anormal hücrelerde artışlar ortaya çıkarmıştır. *İn vitro* pozitif sonuçların aksine, bir *in vivo* mikronükleus deneyinde, farelerin ekstrakta maruz kalması kemik iliğinde polikromatik eritrositlerde artışa neden olmadığı sonucuna ulaşmıştır (Soni ve ark. 2006).

2.4.1 Ekstraksiyon Çeşitleri

Ekstraksiyon Latince “*Extrahere*” (çekip çıkarma) olarak tanımlanmaktadır ve bu isimden türetilen bir kelimedir. Ekstraksiyon basamağı, analitik işlemlerin vazgeçilmez ve atlanamaz bir parçası olarak yer alır. Başta alkol, su, organik çözücüler kullanılarak bitkisel, hayvansal ve/veya sentetik hammaddelerin saflaştırılmasında, bileşenlerinin arındırılmasında ve kararlılığının artırılması amaçlarıyla belirli sıcaklık ve basınçta gerçekleştirilen bir işlem çeşididir. Karışımındaki maddenin bir fazdan diğer faza basınç ile geçirilmesi işlemine dayanır. Kalitatif ve kantitatif çalışmalarda örnek hazırlama basamağı oldukça önemli rol oynar (Eskilsson ve Björklund, 2000). Bu nedenle kullanılacak ekstraksiyon tekniği oldukça yüksek öneme sahiptir. Ancak bunun yanı sıra her bir tekniğin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Ekstre edilecek numune içerisindeki bileşiklerin kimyasal yapısı göz önünde bulundurularak ekstraksiyon sırasında; sıcaklık, zaman, çözücü miktarı gibi parametreler ekstraksiyon verimini negatif veya pozitif yönde etkilemektedir (Cujic, 2016).

2.4.1.1. Maserasyon

Madde uygun boyuta getirildikten sonra ağzı kapalı bir kaptaki, oda ısısında 24 saat ile 10 gün arasında ara sıra çalkalanarak bekletilir. Genellikle tentür, ekstre ve sıvı ekstrelerin hazırlanmasında kullanılır.

2.4.1.2. Demaserasyon

Birbirini takiben iki kez maserasyona tabi tutulması işlemine dimaserasyon denmektedir.

- 1.Maserasyon; 6 saat-2 gün arasında sürer. Acı maddeler bulunur.
- 2.Maserasyon; 12 saat-3 gün sürer. 2 maseratta da eterik yağlar bulunur.

2.4.1.3. Dekoksiyon

Ekstraksiyon sonucu elde edilen drogların soğuk suya ilave edilerek ısıtılması maserasyonu ile elde edilmektedir. Su banyosunda sık sık karıştırılarak yarım saat tutulur ve sıcaklığı yüksek dereceye ulaştığında daha fazla tutulmadan alınır.

2.4.1.4. İnfüzyon

Kaynamış su ile kısa süreli temas halinde tutarak elde edilen maserasyon çeşididir. Su banyosunda sık sık çalkalanarak maksimum beş dakika tutulması gerekmektedir. Doğal droglar hemen çözünen bileşikler ve bileşenleri içeren çözelti olarak tespit edilmiştir.

2.4.1.5. Dijestiyon

40-60°C arasındaki sıcakta yapılan maserasyondur. Süre biraz daha uzun tutulur.

2.4.1.6. Perkolasyon

Perkolatör adlı cam, porselen, emaye ve paslanmaz çelikten yapılmış çeşitli büyüklükteki cihazlarda perkolasyon işlemi yapılmaktadır. Cihazın içine yerleştirilmiş boyutta ve çeşitlilikte uygun drog üzerinden, drog içindeki maddeleri çözebilen çözücü geçirilerek yapılan bir ekstraksiyon çeşitidir. İşlem sonucunda elde edilen ürüne Perkolat ismi verilmektedir.

2.4.1.7. Sokslet Ekstraksiyonu

Sokslet ekstraksiyonu özel ve maliyeti yüksek bir cam malzeme de gerçekleştirilmektedir. Katı ve yarı-katı numuneler için kullanılabilir. Sokslet ekstraktörü olarak bilinen cihaz en eski ekstraksiyon yöntemlerinden birisi olarak aramızda yer almakta ve hala laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmaktadır. Sokslet ekstraktörü, bir solvent şişesinin içerisinde orta çemberde sıvı akış borusu (sifon), soğutucu görevi gören kondansör cam malzemesi (yoğuşturucu) ve ısıtma sisteminden oluşmaktadır (Hotplate-Isıtıcı Yüzey). Katı örnek orta çemberdeki ekstraksiyon bölgesinin içerisine yerleştirilir ardından solvent kısmına çözücü solvent aktarılır. Solventin kaynama derecesinin üzerinde sistem ısıtılır ardından ısınan solvent buharlaşarak kondansatöre hareket eder; yoğunlaşma oluşur ve örneğe doğru damlama gerçekleşir. Yoğunlaşan solvent örneği ıslatır ve solvent seviyesinin sifonun tepesine ulaştığında, solvent tüm örnek bölgesine boşaltarak solvent şişesine geri damlamaya başlar. Böylece sıcak solvent örnek içerisinde birkaç kere sirkülasyonu gerçekleşir. Ekstrakte olan çözelti solvent şişesinde kalırken sadece temiz solvent buharlaştığından

her sirkülasyonda taze solvent kullanılmaktadır. Çevrilme sayısı ve ekstraksiyonun gerçekleştirildiği zaman rapor edilerek kaydedilmesi karşılaştırılma yapılması için önemlidir.



Şekil 3. Sokslet ekstraksiyonu görüntüsü

2.4.1.8. Refluks (Geri Dönüştürücü) Sistemi

Sıvı olan maddelerin gaz fazına geçirilip ardından tekrardan sıvı faz haline getirilmesi için kullanılan ekstraksiyon yöntemidir. Geri dönüştürücü soğutucu olarak da adlandırılabilir. Genel olarak iç içe geçirilmiş cam borulardan oluşmaktadır. Dışta bulunan borudan soğutmayı gerçekleştirmesi için soğuk su geçer, içteki borunun ise alt ve üst tarafında açık çıkışlar bulunmaktadır. Bir ucu reaksiyonun gerçekleştiği kaba takılarak maddenin yoğunlaştırılmasında kullanılmaktadır. Düşük kaynama noktası bulunan maddeler ile çalışırken en çok uzun boyunlu borular tercih edilmektedir.

- Isıya ve hemen hemen her kimyasala dayanıklı ‘Borosilikat’tan camlar üretilir.
- Yan kolları tercihe göre cam veya plastikten oluşmaktadır.
- Propilen yan kol vida bağlantısını ile gövdeye daha kolay ve emniyetli bağlantı sağlar ve bu da bizi olası durumlardan korumaktadır. İnce uzun çubuk şeklinde ortası boş ve bu boşluğun çevresinden soğuk su geçecek şekilde ayarlanmış bir ekstraksiyon düzeneğidir.



Şekil 4. Refluks sistemi görüntüsü

2.5. Zeytin Yaprağındaki Sekonder Metabolitler

Bitkiler, büyüme ve gelişme üzerinde doğrudan etkisi olan veya olmayan çok çeşitli organik bileşikler üretir. Primer metabolitler (nükleotidler, amino asitler ve organik asitler) bitkinin asli fonksiyonlarını doğrudan etkilerken, sekonder metabolitler bitkinin asli fonksiyonlarına göre doğrudan etkili olmayan bileşiklerdir. İkincil bileşikler üzerine yapılan araştırmaların ilk yıllarında bu maddelerin "işlevsiz ve atık" olduğu ileri sürülmüştür (Paech, 1950; Mothes, 1955). İlerleyen yıllarda birçok bilim insanı bu bileşenlerin bitkinin savunma sistemi için çok önemli olduğunu açıkladı (Stahl, 1888; Fraenkel, 1959; Levin, 1976; Levinson, 1976; Schildknecht, 1977; Rosenthal ve Janzen, 1979; Harborne, 1986). Sekonder metabolitler, hastalığa ve olumsuz çevre koşullarına karşı direnç sağladıkları ve bazı yabancı otlar üzerinde allelopatik etkiler gösterdikleri için, temel bitki işlevleri için en az birincil metabolitler kadar önemlidir (Seigler, 1998). Sekonder metabolitler ayrıca endüstriyel alanlarda boyalar, elyaflar, yapıştırıcılar, yağlar, parfümler, parfümler ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Birkaç ikincil metabolitin biyolojik özelliklerinin tanımlanması, yeni ilaçlar, antibiyotikler, insektisitler ve herbisitler için araştırmalarını arttırmıştır (Zinkel ve Russell, 1989; Dawson, 1994). Özellikle küresel bir pandemi ilan edilen yeni koronavirüsün proteaz enzimini inhibe etmek için sekonder metabolitlerin enzim kanadının esansiyel amino asitleri ile etkileşime girebileceğinin bulunması nedeniyle bu bileşiklerin önemi anlaşılmıştır (Mohammadi ve Shaghaghi, 2020).

2.5.1. Terpenler

2.000'den fazla bileşik tanımlanmıştır (Connolly ve Hill, 1991). Bu bileşikler, bitki hormonlarında (gibberellinler, absisik asit), fotosentetik pigmentlerde (fitol, karotenoidler) ve zarların yapısal bileşenlerinde (fitosterol) rol oynar. Terpen adı, grubun ilk üyelerinin terebentin'den (Almanca "terebentin") izole edilmiş olmasından gelir. Sadece hidrokarbon içeren terpenler olabileceği gibi oksijen içeren terpenler de vardır. Oksijenli terpenlere "terpenoidler" de denir. Terpenler genellikle bitki dokularında serbest olarak, bazen organik asitlerin glikozitleri veya esterleri olarak ve bazen de proteinlerle birleştirilmiş olarak bulunur (Boiteau ve ark., 1969). Bu grubun bileşikleri koku potansiyeli açısından oldukça önemlidir (Özkaya ve ark., 2018). Terpenler, izopren birimlerinin (beş karbon) sayısına göre sınıflandırılır. İzopren birimleri baştan sona bağlanarak düz zincirler oluşturabilir veya baştan başa, baştan ortaya bağlanarak halkalar oluşturabilirler (Croteau ve ark., 2000).

2.5.1.1. Hemiterpenler

Hemiterpenler bir izopren birimi içerir ve en küçük terpen grubunu oluşturur. En iyi bilinen hemiterpen, fotosentetik olarak aktif dokulardan salınan uçucu bir ürün olan izoprendir. Birçok C₃ bitki türünün folioplastidlerinde izopren enzim sentezi bulunmaktadır (Croteau ve ark., 2000).

2.5.1.2. Monoterpenler

İki izopren biriminden oluşan C₁₀ terpenoidlerin 1850'lerde terebentin'den izole edilen ilk terpenoidler olduğu bilinmektedir (Ludwiczuk ve ark., 2017). Monoterpenler damıtma veya ekstraksiyon yoluyla ayrılır ve aroma ve parfümeri gibi önemli endüstrilerde kullanılır. Bu bileşikler genellikle anjiyosperm esansiyel yağı ve anjiyosperm reçinesi olarak izole edilmiştir. Pinenler; daha çok çam, ladin, köknar gibi ağaçların ürettiği bir monoterpendir. Bu bileşikler, kabuk böcekleri (*Scolytidae spp.*) ve patojenik mantarlar için toksiktir (Tiring ve ark., 2020). Dünya çapında kozalaklı türlerde ciddi hasara neden olur. Kozalaklı türlerin çoğu, pressimen istilasına monoterpen üretimini artırarak yanıt verir (Langenheim, 1994). Çiçekler tarafından salınan monoterpenler linalool ve 1,8-sineol, arılar da dahil olmak üzere tozlayıcılar için cezbedici görevi görür. 1,8-sineol ayrıca tavşanlar ve geyikler gibi büyük otçullara karşı bir yaprak besleme inhibitörü görevi görür. Ayrıca bu bileşik, bazı kapalı tohumlu türlerle rekabet eden bitki türleri üzerinde allelopatik etkiye sahiptir (Croteau ve ark., 2000). Bu grubun önemli bileşikleri

olan limonen ve γ -terpen turunçgiller grubunun en önemli uçucu bileşenleridir (Özkaya ve ark., 2019).

2.5.1.3. Seskiterpenler

C15 terpenoidler, üç izopren biriminden oluşur ve 15 karbon atomu içerir (Ludwiczuk ve ark., 2017). Monoterpenlere benzer şekilde, seskiterpenler uçucu yağlarda bol miktarda bulunur. Seskiterpenler yaygın olmasına rağmen, bitkisel yağlardan küçük bir oran elde edilir. Çoğu tatlandırmak için kullanılır (örneğin zencefil ve karanfil yağı). Çok sayıda seskiterpenoid, bitkiler tarafından mikrobiyal etkiye yanıt olarak üretilen antibiyotik bileşikler olarak işlev görür (Croteau ve ark., 2000). Bitki hormonu absisik asit yapısal olarak bir seskiterpendir.

2.5.1.4. Diterpenler

C20 terpenoidler dört izopren biriminden oluşur ve 20 karbon atomu içerir (Ludwiczuk ve ark., 2017). Diterpenoidler 3 gruba ayrılır. Bunlar, reçine diterpenleri, toksik diterpenleri ve giberellinleri içerir. Bazı gibberellinler sadece 19 karbon atomuna sahiptir ve norditerpenoidler olarak kabul edilirler çünkü metabolik bölünme reaksiyonu sırasında bir karbon kaybederler (Croteau ve ark., 2000).

2.5.1.5. Triterpenler

30 karbon atomlu triterpenler, her biri üç baştan sona izopren birimi oluşturan iki C15 zincirinin birleştirilmesiyle sentezlenir (Ludwiczuk ve ark., 2017). Bu büyük molekül sınıfı, brassinosteroidleri, fitosterol membran bileşenlerini, bazı fitoaleksinleri, çeşitli toksinleri, besin inhibitörlerini, oleanolik asidi ve yüzey mumlarının bileşenlerini içerir. Hemen hemen tüm *Salvia* spp. (adaçayı) türleri (Moridi Farimani ve ark., 2013). Triterpenoid grubuna ait olan saponinler ve kardenolitler birçok böcek için zehirlidir. Bu böceklerin çoğalmasını engeller. Balık ve salyangoz zehiri olarak da bilinirler (Croteau ve ark., 2000).

2.5.1.6. Tetraterpenler

Tetraterpenler olarak da adlandırılan karotenoidler, yağda çözünen maddeler olarak bilinir. Bu maddelerin bitkilerde çift işlevi vardır, fotosentezi teşvik eder ve çiçek ve meyveleri renklendirir. Tetrapenler sebze ve meyvelere (biberiye, domates) kırmızı ve turuncu renk verir; çiçekler sarı tonlarda (nergis, menekşe, nergis) renklindedir (Harborne, 1988).

2.5.1.7. Meroterpenler

Kısmen terpenoidlerden türetilen biyosentetik olarak karıştırılmış doğal ürünlere genellikle meroterpenler denir. Antikanser ilaçları vincristine ve vinblastine dahil olmak üzere bazı alkaloidler yapılarında terpenoidler içerir (Croteau ve ark., 2000).

2.5.2. Alkaloitler

Alkaloidler insanlar tarafından 3000 yıldır kullanılmaktadır. İnsanlık tarihi boyunca bitki özleri tıpta ve zehirlerde kullanılmıştır. Doğu Akdeniz'de afyon (*Papaver somniferum*) lateksinin kullanımı en az M.Ö. 1400-1200 yıllarına aittir. Eski insanlar yılan ısırığı, ateş ve delilik gibi birçok rahatsızlığı tedavi etmek için bitki özlerini kullandılar. Şifalı otların kullanımı Arabistan ve Avrupa'ya yayıldığında ünlü olaylarda yerini almıştır. M.Ö MÖ 399'da filozof Sokrates'in infazı sırasında. Conine içeren bir baldıran özü (*Conium maculatum*) içti. M.Ö Geçen yüzyılda Kraliçe Kleopatra, göz bebeklerini büyütme ve erkek politik muhaliflere daha çekici görünmek için atropin içeren banotu (*Hyoscyamus*) özü kullandı. Alkaloidler uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, terim ilk olarak 1819'da Almanya, Halle'de yerleşik bir farmakolog olan Carl Meissner tarafından kullanılmıştır (Croteau ve ark., 2000).

Alkaloidler, aktif nitrojen içeren bazik bileşikler olarak tanımlanır. Böcekler bu bileşiklerin bazılarını savunma amaçlı kullanırlar. Bazı böcek türleri, bitkilerde bulunan pirolizidin alkaloidlerine uyum sağlamış ve bu alkaloidleri kullanmak için mekanizmalar geliştirmiştir. *Tyria jacobaea* (Lepidoptera: Erebidæ) larvası genellikle sedum (*Senecio jacobaea*) yer. Bu bitkide bulunan pirolizidin alkaloidleri *T. Jacobea*'yı yırtıcıları için itici kılar (Naumann ve ark., 2002).

Koruyucu bir alkaloidin başka bir örneği, *Solenopsis invicta* olarak bilinen ateş karıncalarında (Hymenoptera: Formicidae) bulunur. Bu tür, yeni yuvalar inşa ederken kraliçesini korumak için zehirli alkaloidini kullanır. Böylece zehir keselerindeki alkaloidler ateş karıncalarının dünyaya yayılmasını sağlar (Fox ve ark., 2019). Savunma amaçlı kullanılan bir diğer örnek ise Amerikan lale ağacında bulundu. Bu türün ürettiği aporfin alkaloidi onu parazitik mantarlara karşı korur (Diyoke, 2014). Koruma için bir diğer önemli bileşik ise kinolizidin alkaloidleridir. Kinolizidin alkaloidleri, özellikle koyunlar olmak üzere otlayan hayvanlar için toksiktir. *Lupinus* türlerinde bulunurlar ve acı bakla alkaloidleri olarak adlandırılırlar. Acı tatları sayesinde, acı bakla gıda inhibitörleri olarak işlev görür. Tatlı ve acı bakla popülasyonuna dayanarak, tavşanların acıyı değil tatlıyı kolayca yedikleri bulunmuştur (Rosenthal ve Janzen, 1979).

Bazı böcekler alkaloidleri feromon olarak kullanır. *Cretonotos transiens*'in (Lepidoptera: Erebidæ) tane boyutu, larva döneminde beslendiği pirolizidin alkaloidlerinin içeriği ile doğru orantılıdır. Çekirdekler feromonlar için önemlidir. Bu nedenle erkek kelebeklerin çiftleşme başarısı bitkilerden elde ettikleri alkaloidlere bağlıdır.

Alkaloidler ayrıca böcek öldürücü olarak da kullanılır. Tütündeki nikotin, insanlar tarafından kullanılan ilk pestisitlerden biriydi ve en etkili olanlardan biri olmaya devam ediyor. Bir diğer etkili insektisit ise kakao, kahve, kola ve çayın tohum ve yapraklarında bulunan kafeindir. Taze kahve çekirdekleri veya çay yapraklarındaki kafein, *Manduca sexta*'nın (Lepidoptera: Sphingidae) hemen hemen tüm larvalarını 24 saat içinde öldürür (Rosenthal ve Janzen, 1979).

2.5.3. Fenolik Bileşikler

Bitkiler birkaç çeşit fenolik bileşik içerir ve bunların kaynağı su ortamındadır. Bitkilerin toprağa evrimsel adaptasyonunda "fitofenolik" bileşiklerin rolü çok önemlidir. Fenoller, aromatik halkada bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren bileşiklerdir (Shahidi ve Nacz, 1995). Bitki fenollerini havaya maruz kaldıklarında kolayca oksitlenirler ve kahverengiye dönerler. Bu bileşikler, proteinlerle kompleks oluşturan ve enzim aktivitesini engelleyen ürünler üretir. Fenolik bileşikler bitkilerin büyümesinde, gelişmesinde, döllenesinde ve korunmasında önemli rol oynamaktadır. Antioksidan görevi gören fenolikler açısından zengin bitkiler, insan hücrelerindeki mutasyonları azaltmanın yanı sıra kalp hastalıklarını, iltihaplanmayı, kanseri ve diyabeti önlemede önemlidir (Karakaya, 2010).

Son zamanlarda Çin'de ortaya çıkan ve ardından birçok ülkeye yayılan COVID-19 tüm dünya ülkeleri için potansiyel bir tehdit haline geldi. Şu anda bu hastalığı tedavi etmek için onaylanmış bir ilaç yoktur. Şu anda, COVID-19 tedavisi için kullanılan ilaçlar esas olarak ana proteazı (Mpro) etkiler.

Khaerunnisa ve ark. (2020), 15 farklı sekonder metabolit üzerinde yapılan bir çalışmada, nelfinavir ve lopinavir'in yanı sıra kaempferol, quercetin, luteolin-7-glucoside, dimetoxyscurcumin, naringenin, apigenin-7-glucoside, oleuropein, curcumin, catechin'in de potansiyel terapötik seçenekleri temsil edebileceğini göstermiştir. . . En popüler bileşiklerin potansiyel COVID-19 inhibitörleri olduğunu bildirdiler.

Mohammad ve Shaghghi (2020), tarafından sekiz sekonder metabolit üzerine yapılan bir çalışmada, bir proteaz enzimi olan zerdeçaldaki fenolik bileşik kurkuminin

COVID-19 ile güçlü bir etkileşime sahip olduğunu bulmuşlardır. Adem ve ark. (2020), 80 farklı flavonoid bileşiğinin bağlanma enerjilerini COVID-19'un proteaz enzimleriyle karşılaştırdı. Bu sonuçlara göre hesperidin, rutin, diosmin, apiin ve diasetil kurkumin, COVID-19'a karşı nelfinavir'den daha etkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Fenolik bileşikler, bitkilerde bazı yönden patojen ve böcek istilası, UV radyasyonu ve hasarı gibi ekolojik ve fizyolojik streslere yanıt olarak sentezlenir. Bitki fenolik bileşikleri iki ana yolla sentezlenir: şikimik asit ve malonik asit. Sikimik asit bitki fenolik biyosentezi için daha önemliyken, malonik asit mantar ve bakteri fenolik biyosentezi için daha önemlidir. Bu sentezin önemli bir basamağı, fenilalaninin bir amonyak molekülünü uzaklaştırarak sinamik aside dönüştürülmesidir (Özeker, 1999).

2.5.3.1.Flavon ve Flavonoller

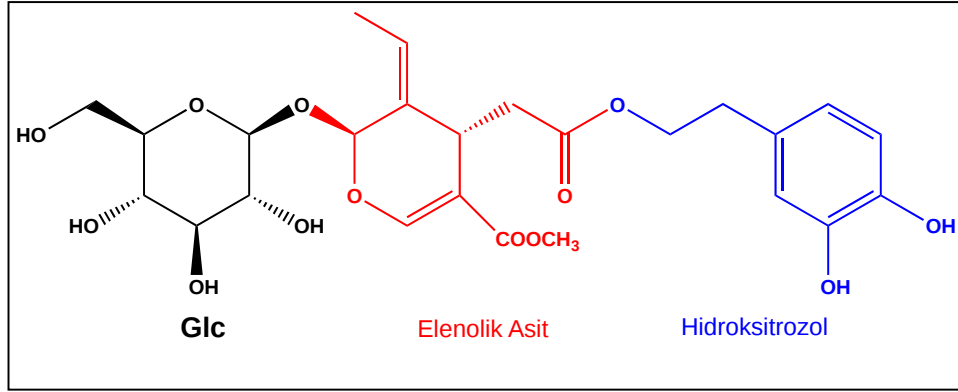
Bitkilerde yaklaşık 200 flavonol ve 100 flavon tanımlanmıştır (Shahidi ve Naczki, 2003). Çiçeklerde bulunan flavonoidler genellikle ışığı antosiyaninlerden daha kısa bir dalga boyunda emer ve bu nedenle insan gözü tarafından görülmez. Arılar tarafından görülebilen ışık dalga boyu aralığı insanlarınkinden daha büyük olduğu için flavonlara ve flavonollere karşılık gelirler. Flavonlar ve flavonoller sadece çiçeklerde değil, tüm yeşil bitkilerin yapraklarında da bulunur. Bu iki flavonoid sınıfı, hücreleri aşırı UV radyasyonuna karşı korur (Caldwell ve ark., 1983). Ayrıca baklagil kökleri tarafından toprağa salgılanan flavonlar ve flavonoller, nodül azotu sabitleyen bakterilerde gen ekspresyonunu düzenler (Rolfe ve Gresshoft, 1988). Flavonlar ve flavonoller gıdalarda aglikonlar (glikozitin karbonhidrat olmayan kısmı) olarak bulunur.

2.6. Zeytin Yaprığında Bulunan Etken Madde Oleuropein

Esas olarak Oleuropein bileşiği *Oleaceae* familyasında bulunur ve bu familyanın alt sınıflandırmasında kemotaksonomik bir belirteç olarak kabul edilir (Jansen ve ark., 2002). Zeytin ağacı (*Olea europaea*) yapraklarının en bol bulunan biyoaktif bileşenlerinden biridir. Oleuropein içeriği zeytinin çeşidine, organına, zeytin ürününe, iklime, hasat olgunluğuna ve kullanılan işleme sistemine bağlı olarak değişir (Hassen ve ark.,2015). Oleuropein, süperoksit anyonlarını ve hidroksil radikallerini temizler ve nötrofillerin ve hipokloröz asit kaynaklı radikallerin solunum patlamasını inhibe ederek oksidatif stresi engeller (Alirezai ve ark., 2012).

En önemli fenolik bileşiklerden biri olan ve polifenoller olarak da bilinen oleuropein, tüm bitkisel gıdalarda az ya da çok miktarda bulunur ve zeytin yaprağı 60-90

mg/g oleuropein içerir. Oleuropein meyve ve sebzelerde acı tada neden olur ve bu özellik onlarda antioksidan aktivite görülmesine neden olur (Ersus ve Esen, 2008).



Şekil 5. Oleuropein yapısı

Zeytin yaprağı ekstraktının tıbbi özelliklerinin oleuropeinden kaynaklandığı ilk kez 1908 yılında tespit edilmiştir (Walter ve ark. 1973). Daniel Hambury ilk olarak 1843'te İngiltere'de sıtma ateşini tedavi etmek için zeytin yapraklarını kullanmıştır (Le Floch ve ark. 1998). Son yüzyılda zeytin yaprağının antioksidan, antimikrobiyal, antiviral, hipoglisemik ve antitümör etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır.

Olgunlaşmanın ilk evrelerinde oleuropein oldukça yüksek miktarda (kuru meyvenin %14'ü) bulunmaktadır. Yeşil olgunlaşma fazının başlangıcında azalma ile oleuropeinin glikozit türevlerinin oluşumu söz konusudur (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Fazla olgunlaşan zeytin meyvesinde oleuropein miktarı azaldığı için son üründe istenmeyen tat değişimi de görüldüğü için zeytinyağı üretiminde %2~3 oranında zeytin yaprağının meyvelere karıştırıldığı eskiden beri uygulanan bir yöntemdir. Zeytin yaprakları ucuz, alternatif ve etkili bir antioksidandır. Bu nedenle raf ömrünü uzatma ve nitelikli korumada önemli bir rol oynamaktadır (Doğru ve ark., 2021). Oleuropein, elonolik asit ve 3,4-dihidroksifeniletanolün heterozidik esteridir ve hidroksitirozol olarak adlandırılan 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol, elonolik asit olarak anılan sekoiridoit ve glikoz molekülü olmak üzere üç yapısal birimden oluşur. Oleuropein yapısal formülü C₂₅H₃₂O₁₃ ve molekül ağırlığı 540.518 g/mol'dür (Bayram ve ark., 2020).

Sızma zeytinyağından elde edilen fenoliklerin biyoyararlanımlarının yüksek olduğu bilinmektedir. Uygulanan insan deneklerinde ligistrosid-aglikon, hidroksitirozol, tirozol ve oleuropein-aglikonun emiliminin %50~60 olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda, fenoliklerin metabolizmasında önemli bir adımının oleuropein-glikozitlerinin oleuropein ve ligistrosid-aglikonların hidroksitirozol ve tirozole dönüşmesi olduğu düşünülmektedir. Bu hipotez, sağlıklı insan deneklerinde oleuropein-glikozit takviyesinin

%15'inin idrarla hidroksitirozol ve tirozol olarak atıldığı bulunarak desteklenmiştir. Başka yapılan iki çalışmada oleuropeinin oral uygulamadan sonra hızlı emildiği ve uygulamadan 2 saat sonra plazma konsantrasyonunun maksimum seviyeye ulaştığı gözlemlenmiştir (Omar, 2010).

Çalışmalar oleuropein tüketiminin etkilerini değerlendirmiş olsa da az sayıda çalışmada oleuropeinin kullanım ve izole edilmiş bileşiğinin sistemik etkisi analiz edilmiştir. *In vivo* çalışmalardaki analizler oleuropeinin nasıl davrandığını açıklamaya yardımcı olur ancak organizmanın nasıl etkilendiğine dair bir görüş sağlamaz (Menezes ve ark., 2021).

Oleuropein, geranil pirofosfattan (GPP) türetilen ligustroside türetilmiştir. Metabolik yoldaki ilk adım, geraniol sentaz (GES) tarafından katalize edilir ve ürün geraniol'dür. Geraniol, 10-hidroksilaz (GE10H) (GE10H = CYP76B alt ailesine ait sitokrom P 50 monooksijenaz) tarafından 10-hidroksigeraniol'e dönüştürülür. NADH dehidrojenazın (NDHI) biyokimyasal aktivitesi, 10-hidroksigeraniol'ü deoksiloganat aglikona dönüştürür. Deoksiloganoik asitler (çeşitli monoterpen indol alkaloidler ve oleuropeinin öncülleri) oluşturmak için deoksiloganat aglikonlardan glikosil transferi, glikosiltransferazlar (GT) aracılığıyla gerçekleşir. Deoksiloganoik asit, 7-epiroganik asit oluşturmak üzere siklopentan halkasının 7-a-hidroksilasyonuna uğrar ve bu, hidroksil grubunun NDHI tarafından oksidasyonu ile 7-ketorganik aside dönüştürülür. 7-ketorganin oluşumuna yol açan 7-ketorganik asidin metilasyonu daha sonra loganoat metiltransferaz (LAMT) tarafından katalize edilir. Bu noktada sekologanın sentaz (SLS), oleoside-11-metil ester GT tarafından 7-β-1-D-glikopiranosil-11-metil oleoside glikosile edilen oleoside-11-metil ester üretir. Bu son bileşen, ligstrosid oluşturmak için tirozol ile bir esterleşme reaksiyonuna ve son adımda oleuropein oluşturmak için bir hidroksilasyon reaksiyonuna girer (Topuz, 2019).

2.7. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan yüksek enerjili atomlar veya moleküller olarak tanımlanır. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektronlara sahip oldukları için diğer maddelerle kolayca reaksiyona girebilirler. Eşleşmemiş elektronlara sahip atomlar veya moleküller kararlı bir yapıya sahip olduklarından, diğer moleküllerle reaksiyona girme eğilimleri serbest radikallerinki kadar büyük değildir. Bu nedenle, radikal olmayanlar, kararlı, eşleşmemiş elektronları olmayan ve radikaller dışındaki maddelerle daha az güçlü reaksiyona giren moleküller olarak

tanımlanır. Serbest radikaller oksijen ve nitrojenden kaynaklanabilir. Oksijenden türetilen maddelere reaktif oksijen türleri (ROS) ve azottan türetilen maddelere reaktif azot türleri (RNS) denir (Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller arasında hidroksil (OH^*), süperoksit (O_2^{*-}), nitrik oksit (NO^*), nitrojen dioksit (NO_2^*), peroksil (ROO^*) ve lipid peroksil (LOO^*) başlıca olarak bulunmaktadır. Oksidan olarak bilinen hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), hipokloröz asit (HOCl), nitroz asit (HNO_2), peroksinitrit (ONOO^-), dinitrojen trioksit (N_2O_3), serbest radikal değildir. Canlı organizmalarda kolayca serbest radikal reaksiyonlar üretildiği söylenmektedir. Ayrıca birçok ciddi hastalıkta önemli rol oynayan oksijen içeren serbest radikaller, DNA (deoksiribonükleik asit), proteinler karbonhidratlar ve lipitler olan hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hipoklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit radikalidir. Biyolojik olarak önemli moleküllere zarar verme kapasitelerinin yüksek olması nedeniyle çekirdeklerde ve hücre zarlarında oldukça reaktif türlerdir (Ünver, 2021).

2.7.1. Oksidatif Stres

Oksidatif Stres, antioksidanların noksan kalması sonucu hücrel metabolizma sırasında oluşan hidroksil radikalleri, süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) artması ve antioksidanların eksikliği sonucu oksidatif dengenin bozulmasından kaynaklanır. Onları detoksifiye etmek olarak tanımlanır. Artan oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türleri, hücre içi lipid ve protein yapılarındaki çift bağ içeren gruplara ve DNA'daki baz çift bağlarına saldırarak hidrojen atomlarını parçalanması ve zincir oksidasyon reaksiyonlarını katalize etmeye başlar. Bu, hücre içi lipidler, proteinler ve DNA gibi makromoleküllere zarar vererek hücre hasarına veya hücre ölümüne neden olur. Oksidatif hasarın varlığı, malondialdehit (MDA), protein karbonilleri (PCO) ve 8-hidroksiguanin (8-OHG) gibi ürünler ölçülerek saptanır. Serbest radikallerin etkisiyle makromoleküllere oksidatif hasar vermenin bir sonucu olarak salınırlar. (Özcan e ark., 2015).

2.7.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bu maddelerin neden olduğu hasarı önlemek, detoksifikasyon sağlamak için vücutta çalışan savunma sistemlerine "antioksidanlar" denir. Otoksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önlemek için antioksidanlar, radikallerle hızlı bir şekilde tepkimeye girer. Antioksidanların rolü, aşırı serbest

radikalleri nötralize etmeyi, hücreleri serbest radikallerin toksik etkilerinden korumayı ve hastalıkları önlemeye yardımcı olmayı içerir (Karabulut ve Gülay, 2016).

2.8. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Biyolojik Aktiviteleri

Olea europaea Linn. Akdeniz bölgesinde yaygın olarak ‘Zaytoon’ olarak bilinir. Meyveleri ve yağı, Akdeniz diyetlerinin temel bileşenleridir. Zeytin ağacı yaygın bir bitki türü olup, Akdeniz bölgesinin önemli kültür bitkilerinden biridir (Abaza ve ark., 2015). Zeytin ağacının, tarihi ve dini metinlerde tekrar tekrar ortaya çıkması ve geleneksel bitkisel ilaçlara dahil edilmesi nedeniyle zeytin ağacı insanlığa özeldir (Kaniewski ve ark., 2012). Zeytinin başlıca fito-bileşenleri fenolikler ve lipidler sınıfına aittir. Zeytinlerin fenolik bileşikler, kimyasal özelliklerine göre başlıca fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler ve sekoiridoidler olarak sınıflandırılır (Esti, Cinquanta ve La Notte, 1998).

Oleuropein, ilgili bileşiklerle birlikte yararlı etkilerinden büyük ölçüde sorumlu olduğu belirtilen zeytinin fenolik bir bileşenidir. Ayrıca zeytinin kemotaksonomik belirteci olduğu bildirilmektedir (Panza ve diğerleri, 2004; Ryan ve diğerleri, 1999). Son klinik öncesi ve klinik çalışmalar, oleuropeinin çeşitli insan hastalıklarına karşı yararlı etkilerini tanımlamıştır. Oleuropein, antidiyabetik (Al-Azzawie & Alhamdani, 2006), kardiyoprotektif (I. Andreadou ve ark., 2007), hipolipidemik (F. Hadrich ve ark., 2016) ve antiiskemik (I. Andreadou ve ark., 2006), antioksidan (Yoon, 2018), antikanser (De Marino ve ark., 2014), nöroprotektif (Moosmann ve Behl, 1999) ve hepatoprotektif eylemler (Barbaro ve ark., 2014) gibi faydalı biyolojik ve farmakolojik etkiler sergiler.

2.8.1. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antioksidan Aktivitesi

Eskiden Sendrom X olarak adlandırılan metabolik sendrom, bir enerji metabolizması ve depolanması hastalığıdır. Metabolik sendromu tanımlarken en sık göz önünde bulundurulmuş metabolik faktörler hiperglisemi/bozulmuş glukoz toleransı, dislipidemi, hipertansiyon ve obezitedir (Parikh & Mohan, 2012). Epidemiyolojik olarak, halihazırda kullanılan tanımların bir kombinasyonu kullanılarak, 18-30 yaş arası kişilerde dünya çapındaki yaygınlığının %5.2 olduğu tahmin edilmektedir (Nolan ve ark., 2017). Prevalans çalışmaları, yaş ile metabolik sendrom insidansı arasında pozitif bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Amerika gibi batı ülkelerinde insidans nispeten daha yüksektir ve bazı tahminler %33~39 kadar yüksek olduğunu göstermektedir (O'Neill & O'Driscoll, 2015).

Zeytinyağı ve zeytinyağı özü ile de güçlü bir antioksidan etki gözlemlenmiştir (Rosillo ve ark., 2014). Antioksidan etkisi, 2,20-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil süpürücü aktivitesi ile $O_2^{\cdot-}$ (Oksijen), HOCl (Hipokloros Asit) ve NO (Nitrik Oksit) serbest radikalleri ile gösterilmiştir. Biyolojik oksidatif süreçlerde var olan radikallerin daha iyi bir temsilidir. Bu çalışma ayrıca, en yüksek ağırlık bileşeni oleuropein olan zeytinyağı ekstraktının, 25 µg/ml konsantrasyonunda 2,20-Azobis(2-amidinopropan) dihidroklorürün eritrositlerde neden olduğu morfolojik değişiklikleri önlediğini kanıtlamıştır (Benavente-Garcia ve ark., 2000). Ayrıca tiyobarbitürik asit reaktif madde (TBARS) seviyelerini ve oksihemoglobinin oksidasyonunu azalttı. Başka bir çalışmada, basınç ülserlerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini ve ayrıca nitrotirozin, lipid hidroperoksitleri ve karbonillenmiş protein miktarlarını azalttı ancak bu etkiler yalnızca 7 günlük tedaviden sonra tespit edildi (Donato-Trancoso ve ark., 2016). Tedavinin umut verici yara iyileştirme özelliğine sahip olduğu bulundu. Oleuropein, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite testinde 2,20-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikallerini temizlemeyi başardı (Benavente-Garcia ve ark., 2000; Jemai ve ark., 2008; Ivanov ve ark., 2018) ve demiri azaltan antioksidan güç testinde C vitamininden %50 daha etkili antioksidandı (Ivanov ve ark., 2018). Kalp, karaciğer, böbrekler, aort dokularında oleuropein ile indirgenmiş tiobarbitürik asit reaktif maddeler ve farelerde karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktivitesinde artışa rastlanmıştır (Jemai ve ark., 2008).

Oleuropeinin kardiyoprotektif antioksidan etkilerini araştıran bir çalışmada, oleuropeinin izole sıçan kalplerinde oksidatif strese bağlı kardiyak reperfüzyon yaralanmalarını azaltan etkili bir antioksidan olduğu bulunmuştur. Bu glutatyon, oksitlenmiş glutatyon ve TBARS'ta önemli bir azalma ile karakterize edilmiştir (Manna ve ark., 2004). Oleuropein, hücreleri c2c12 miyoblast hücrelerinde hidrojen peroksitin neden olduğu strese karşı korumuştur (Hadrach, ve ark., 2016) ve oleuropeinin *in vivo* kardiyak iskemi ve reperfüzyon modellerinde enfarktüs boyutunu küçültme yeteneğinin aşağıdakilerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Derin ven trombozu olan hastalarda (Ekim ve ark., 2014) biraz artmış oksidatif stres durumunun mevcut olduğu ve ayrıca kardiyovasküler sistemin diğer bölümlerinde reperfüzyona yardımcı olabileceği gösterilmiştir.

Literatürde oleuropeinin, antioksidan etki göstererek hücrelerin zarar görmesini engellediği, kalp damar hastalıkları ve kanser riskini azalttığı, lipoprotein oksidasyonunu

önlediği ve lipoglisemik etkilere sahip olduğu gibi olumlu etkilerinin bulunduğu raporlanmıştır (Türköz ve ark., 2008). Dolayısı ile oleuropeinin; hipoglisemik, antioksidan, antimikrobiyal, antimikroplazmal, antiviral, antitümör ve antiyojenik gibi önemli özelliklere sahiptir (Altınyay ve Altun, 2006). Fenolik bir bileşik olan oleuropeinin HeLa hücrelerinde apoptozu indüklediği de yapılan bazı çalışmalarda gözlemlenmiştir (Kaya ve Demir, 2020).

Çin’de yapılan bir araştırmada zeytin ağaçlarının budanması sırasında ortaya çıkan atıkların yakılmasının hem kaynak israfına hem ekolojik çevreye verdiği kirlilik fark edilmiştir (Yu ve ark., 2021). Oleuropeinin serbest radikal süpürücüsü olarak güçlü bir antioksidan aktivitesi de olduğu bilinen belirgin bir özelliktir. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarla bu özellik kanıtlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, oleuropein ve oleuropein açısından zengin özütlerin, sentetik antioksidan BHT (bütillenmiş hidroksitoluen)’nin, 2,2-difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) radikalini temizleme yeteneğinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkinin öncelikli sebebi elektron verme yetenekleriyle ilişkilendirildi. Kapsamlı bir şekilde oleuropeinin süpürücü aktivitesi araştırılmış olup β -karoten ağartmada linoleik asitten üretilen Trolox-eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC), yapı-aktivite ilişkisi, süperoksit ve hidrojen peroksit gibi farklı deneysel modeller ile incelenmiştir. Süperoksit dismutaz (SOD), konjuge dien değerleri (CDV), peroksit değeri (POV) metallerle ilgili yöntem olan demir indirgeyici antioksidan güç (FRAP) ile tahlil edilmiştir. Oleuropeinin antioksidan aktivitesinin güçlü olmasının asıl nedeni yapısındaki hidroksil gruplarından (özellikle 1,2-dihidroksibenzen) kaynaklanmaktadır. Hidroksil grupları, oksidasyonu önlemek için hidrojen verebilirler (Hassen ve ark., 2015).

Koşullara bağlı olarak antioksidanların birçok tanımı bulunmaktadır. Antioksidanlar, oksitleyici maddeyi önleyen veya karşı koyan madde şeklinde tanımlanabilir. *In vitro* çalışmalarında bu tanım geçerli olabilir fakat fizyolojik ve biyolojik olarak yetersizdir. Oksitleyici maddenin zarar verme etkisini önleyen, doğal veya yapay bir madde olarak da antioksidanlar tanımlanabilir. Ayrıca reaktif oksijen türleri veya reaktif nitrojen türleri de eklenerek bu tanım daha da kapsamlandırılabilir (Huang ve Prior, 2015).

Antioksidanlar iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Bunlardan ilki önleyici antioksidanlardır. Oksidatif türleri zarar vermeden durdurmaktadır. Bir diğeri zincir-kıran antioksidanlar ise öncelikle oksidatif türlere zarar vermeye başlayarak yavaşlatmakta veya durdurmaktadır. Önleyici antioksidanlar, birçok mekanizma ile ilk oksidan atağını önleme özelliğine

sahiptir (Gella ve Durany, 2009). Bu tez çalışmasında tercih edilen oleuropein içerdği zengin bileşikler sayesinde, gıdalarda önemli bir yere sahiptir.

Çalışmamızda da Ege Bölgesinin belirli yerlerinden temin edilen zeytin yapraklarından zenginleştirilmiş oleuropeinin elde edilecek olması ve antioksidan özelliklerinin değerlendirilmesinin yapılacak olması literatüre önemli bir katkı sağlayacaktır. Ayrıca sektörel bazlı düşünce olursak zeytin yaprağından elde edilen zenginleştirilmiş oleuropeinin gıda sektöründe raf ömrünü arttıran gıda katkı maddesi olarak da değerlendirilebilmesine dair önemli kazanımlar sağlayacaktır.

2.8.2. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Oleuropein ile muamele görmüş kültürler yaşlanma morfolojisinin görünümünde gecikme sergiler ve yaşam ömrü yaklaşık olarak %15 uzama göstermektedir. Deneysel bir çalışmada oleuropeinin spontan olarak tümörler geliştiren farelere oral yoldan uygulandığı zaman geri dönüşümsüz şekilde yuvarlanmış kanser hücrelerinin çoğalmasını, motilitesinin ve invazyonunu önlediği görülmüştür (Gökalp, 2017).

Doğal antimikrobiyal hücreler arasında da gösterilen oleuropeinin, mikroorganizmaların gelişme hızını geciktirdiği ve inhibe ettiği de bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda oleuropeinin ve parçalanma ürünlerinin, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus plantarum*, *Moraxella catarrhalis*, *Pseudomonas fragi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus carnosus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* ve küfler üzerinde inhibisyon gösterdiği ifade edilmiştir (Bilgiç ve Uğur, 2015).

Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalarda zeytin ve türevleri olan tirozol, hidroksitirozol ve oleuropeinin osteoartrit gelişimi üzerinde faydalı etkileri de gösterilmiştir. *In vitro* çalışmalar zeytinyağındaki polifenollerin otofajinin artırılması ve inflamasyonun baskılanması bu bileşenlerin kondroprotektif etkilerine katkı göstereceği bulunmuştur (Bonechi ve ark., 2015).

2.8.3. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antikanser Aktivitesi

Boss ve ark. (2016) zeytin polifenollerinin ve özellikle zeytin yaprağında bulunan kombinasyonun, moleküler yolları modüle edebildiğini ve bunlarla etkileşime girebildiğini ve bunu yaparken kanserin ilerlemesini ve gelişimini engelleyebileceğini gösteren hücre modellerinden güçlü kanıtlarının var olduğunu savunmuştur.

2.8.4. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Antiviral Aktivitesi

Pek çok çalışma, oleuropeinin güçlü bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir ancak bu özellik doğrudan antiviral etkisiyle ilişkili görünmemektedir. Öte yandan oleuropeinin fosfolipid çift katmanlarının yüzeyi ile etkileşimi daha önce bildirilmiştir. Viral hemorajik septisemi rabdovirüs (VHSV), zeytin yaprağı ekstraktı veya oleuropein ile önceden inkübe edildiğinde, enfekte olmamış hücrelerde VHSV tarafından düşük pH'ta indüklenen hücreden hücreye füzyon %25~30'a düşürüldü, dolayısıyla oleuropeinin mevcut lipid/protein bileşenleri üzerindeki etkisi VHSV zarfı üzerinde ve membran füzyonunda yer alması mümkün olabileceği gözlemlenmiştir. Rhabdovirüslerin G glikoproteininin hücre zarlarının anyonik fosfolipid bileşenleri ile etkileşiminin başarılı bir viral füzyon için gerekli bir adım gibi görüldüğü daha önce yayınlanmıştır. Bu şekilde oleuropein, glikoprotein G'nin membranların anyonik fosfolipid alanları ile etkileşimini engelleyebilecek ve bu nedenle erken füzyon adımlarını engelleyebilecek VHSV zarfı üzerinde değişikliklere neden olabilmeyi amaçlamıştır. Bu sonuçlar, zeytin yaprağı ekstraktlarının, su ürünleri yetiştiriciliği için potansiyel bir antiviral ajan kaynağı olarak kabul edilebileceğini göstermektedir (Micol ve ark., 2005).

2.9. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Oleuropeinin Gıdalarda Kullanımı

Zeytin yaprağı ekstraktlarının birçok gıdada zenginleştirilmesi ve kapsüllenmesi, zeytin yan ürünleri alanındaki bilim adamlarının ilgisini çekmiştir (Souilem ve ark., 2017). Zeytin yaprağı özütündeki oleuropein, zeytine acı bir tat veririr. *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori* ve *Campylobacter jejuni* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı güçlü *in vitro* inhibitör aktivite sağlar (Sudjana, 2009).

Yağların oksidasyon stabilitesi ve antioksidan kapasitesini arttırmak için rafine yağlara (mısır, soya fasulyesi, yağ bakımından zengin ayçiçeği, ayçiçeği, zeytinyağı, kanola yağı, kanola ve vb.) zeytin yaprağı ekstraktı ve hidrolizatları eklemeleri yapılabilir. Rafine zeytinyağının oksidatif stabilizasyonu zeytin yaprağı kullanılarak sağlanabilir. Ayrıca zeytin yaprağı ekstresi, çoklu doymamış yağ asitlerine karşı daha iyi koruma sağlayarak soya fasulyesi ve yemeklik yağların raf ömrünü uzatabilir. Zeytin yaprağı ekstraktı ve oleuropein, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinden dolayı et ürünlerinde doğal koruyucu olarak kullanılabilir (Bayram ve ark., 2020).

Zeytinin yapısında bulundurduğu oleuropeinin fenolik bileşiğindeki acı elementler antibakteriyel etkiye de sahip olan bileşikler fermantasyon öncesi ve sırasında hidrolize edilmelidir ve bazı gıda patojenleri üzerindeki etkileri birçok çalışmada tartışılmıştır. Oleuropeinin β -glukosidaz enzimi (EC. 3.2.1.21) tarafından hidrolizinin, acı maddeler içermeyen 2-diastereomerik aglikonların oluşumuyla sonuçlandığı bulunmuştur. Günümüzde β -glukosidaz enzimi gıda endüstrisinde, özellikle detoksifiye edici bir enzim olarak kullanılmaktadır (Sargın ve ark., 2005).

Yapılan çalışmalarda oleuropeinin hem immünomodülatör olarak umut verici bir ajan olduğu hem de bağışıklığı desteklemek için fagositozu artırdığı gözlemlenmiştir. Bütün canlılarda hayatta kalmanın temel unsuru beslenme, bağışıklık, üreme gibi faktörlerdir. Memeliler ve böcekler, eski bir doğal bağışıklık sistemi olan humoral ve hücrel tepkileri paylaşırlar. Bu durum doğuştan gelen immün sistemini anlamak için bir fırsat sağlar (Kaya ve Demir, 2020).

Kan lipidlerinin oksidatif strese korunmasına da zeytinyağı polifenolleri katkı sağlar. Hidroksitirozol ve türevlerinde (oleuropein kompleksi ve trizol gibi) ise bu istem 20 g zeytinyağında en az 5 mg olarak kullanılır. Günlük 20 gr zeytinyağı alımı ile tüketiciye talebin karşılanacağı bilgisi verilir. Besinsel ve ekonomik açıdan öneme sahip olan zeytinin yaprağı da önemli bir yem kaynağıdır ve yan ürünlerinin besin değeri değerlendirilmiştir. Etlik piliçlerde %10 fermente zeytin yaprağı ile yem takviyesi yapıldığında protein kullanımına teşvik artmıştır (Shan ve Miao, 2022).

Gıda endüstrisi ve teknolojisinin gelişmesiyle birlikte bilimsel araştırmalar sonucunda çeşitli şekil/formlardaki zeytin ağacı yan ürünleri, gıda endüstrisinin çeşitli alanlarında gıda formülasyonlarına katılarak insan beslenmesinde kullanılma potansiyeline sahiptir (Salık ve Çakmakçı, 2021).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Tablo 2. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemelerin Özellikleri

Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	Üretici Firma
Buzdolabı (+4 °C)	Profilo
Cam vial (5 mL)	Agilent Technologies
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Manyetik karıştırıcı	Termal
Saf su arıtma cihazı	Kros
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810,
Rotary Evaporator	Heidolph
Filtre Kâğıdı	İsolab
Vortex	Genius 3
0,45µm filter ucu	İsolab
Filtre Kâğıdı	İsolab
HPLC Analiz Cihazı	Shimadzu (Japan) LC-2050C 3D
Mikropipet	Isolab
Spektrofotometre	Thermo Scientific/Multiskan Go
Eppendorf (2ml/1.5ml)	Isolab
Falkon (15ml / 50ml)	Isolab

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3. Kullanılan Kimyasallar Üretim Yerleri ve Kodları

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici Firma/Kodu
Etanol	Merck, Almanya CAS: 64-17-5
Metanol	Merck, Almanya CAS: 67-56-1
Distile su	Nüve ND8, Türkiye
Trifloroasetik Asit.	İsolab, Almanya CAS: 76-05-1

Etilasetat	Merck 109623
DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)	Sigma Aldrich
Askorbik Asit	Sigma Aldrich
Silika Gel	Silica gel 60 HF254
Hekzan	Merck, Almanya CAS: 110-54-3
TLC Plate	Merck KGaA, Almanya A02763/3

3.1.3. Bitkisel Gereçler

Araştırmada, ülkemizin Ege bölgesinde yer alan Balıkesir'in iki ayrı yerleşim yeri olan Edremit ve Gönen, Aydın'ın Çine, Muğla'nın Fethiye ilçesinde iki farklı tür olan Memecik ve Delice olarak farklı zeytin yaprakları 2022 yılında özenle toplanıp oda ısısında (20-25 °C) gölgede bir hafta kurutulmuştur. Aydın Çine'den alınan zeytin yaprakları Adnan Menderes Üniversitesi Çine Meslek Yüksekokulu ve çevresindeki ağaçlardan Dr.Öğr. Üyesi Hafize Ayla Sarı tarafından toplanmıştır. Kilitli poşetler ile Üsküdar Üniversitesi SHMYO Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir. Zeytin yaprakları ekstraksiyon işlemine kadar kilitli poşetlerde laboratuvar şartlarında saklanmıştır.



Şekil 6. Ege bölgesine ait zeytin yaprağı örnekleri

Tablo 4. Numune isimlerinin kısaltılmış kodları

Numune İsimleri	Kısaltmaları
Aydın-Çine (40 °C)	AÇ-1
Aydın-Çine (20 °C)	AÇ-2
Balıkesir-Edremit (40 °C)	BE-1
Balıkesir-Edremit (20 °C)	BE-2
Balıkesir-Gönen (40 °C)	BG-1
Balıkesir-Gönen (20 °C)	BG-2
Muğla-Delice (40 °C)	MD-1
Muğla-Delice (20 °C)	MD-2
Muğla-Memecik (40 °C)	MM-1
Muğla-Memecik (20 °C)	MM-2
Aydın-Çine (20 °C) Saflaştırmadan Elde Edilen	OL-1
Muğla-Delice (20 °C) Saflaştırmadan Elde Edilen	OL-2
Muğla-Memecik (20 °C) Saflaştırmadan Elde Edilen	OL-3
Balıkesir-Gönen (20 °C) Saflaştırmadan Elde Edilen	OL-4
Balıkesir-Edremit (20 °C) Saflaştırmadan Elde Edilen	OL-5

3.2. Yöntem

3.2.1. Zeytin Yapraklarında Ekstraksiyon Hazırlanması

Ege bölgesinden toplanan ve kurutulmuş zeytin yaprakları bitki değirmeni ile öğütülerek toz haline getirildi. Yüzey alanı küçültülmüş bitki materyalinden (zeytin yaprağı) maserasyon ve dekoksasyon yöntemleri takip edilerek etanol içerisinde ekstre işlemine tabi tutulmuştur.

3.2.1.1. Zeytin Yaprağından 40 °C’de Ekstrakt Hazırlama Prosedürü

Kurutulmuş öğütülmüş ve ekstre edilmeye hazır olan zeytin yaprağı 50 gram tartılıp 500 mL etanol (C_2H_5OH) ile birleştirildi (1/10 oranında). 500’lük balon içerisine alınıp reflüks düzeneği kuruldu. Manyetik karıştırıcının üzerine silikon yağ havuzu yerleştirildi. Isıtıcı sıcaklığı 80 °C ve 770 rpm hıza ayarlandı. Balon içerisindeki ısı 40 °C olarak ölçüldü. Deney dekoksasyon yöntemine tabi tutuldu. 48 saat sonra düzeneden alınıp filtre yardımıyla süzüldü. Darası alınmış balona alınan zeytin yaprağı ekstarktından, rotary evaporatörde düşük basınçta (-1 atm) ve düşük sıcaklık (40 °C) altında etanol

uzaklaştırıldı. Tüm etanolün uzaklaştığına emin olduğunda madde miktarları tartıldı. Ekstarktlar koyu yeşil renkte, katı madde olarak elde edildi ve buzdolabı koşullarında (+4 °C) ağzı kapatılarak saklandı.



Şekil 7. Aydın-Çine’ye ait zeytin yaprağı 40 °C’de ekstraksiyon görüntüsü

3.2.1.2. Zeytin Yaprığından 20 °C’de Ekstrakt Hazırlama Prosedürü

Kurutulup öğütülmüş ve ekstre edilmeye hazır olan zeytin yaprağı 50 gram tartılıp 500 mL etanol (C_2H_5OH) ile birleştirildi (1/10 oranında). 800’lük beher içerisine alınıp manyetik karıştırıcıda oda ısısında 770 rpm hıza ayarlandı ve maserasyon işlemi başlatıldı. Beher içindeki ısı 20 °C olarak ölçüldü. 48 saat boyunca karıştırılmaya bırakıldı. 48 sonunda düzenekten alınan zeytin yaprağı filtre yardımı ile süzüldü. Darası alınmış balon içerisine alınıp Rotary Evaporatör’de düşük basınçta (-1 atm) ve düşük sıcaklık (40 °C) altında etanol uzaklaştırıldı. Tüm etanolün uzaklaştığına emin olduğunda madde miktarları tartıldı. Ekstarktlar koyu yeşil renkte, katı madde olarak elde edildi ve saflaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere buzdolabı koşullarında (+4 °C) ağzı kapatılarak saklandı.



Şekil 8. Balıkesir-Edremit’e ait zeytin yaprağı 20 °C’de ekstraksiyon görüntüsü

Tablo 5. Zeytin yapraklarının ekstraksiyon tablosu

Ege Bölgesinden Elde Edilen Zeytin Yaprakları	Hot plate Isısı	Çözelti Isısı	Hot plate rpm Hızı	Öğütülmüş Zeytin Yaprığı Miktarı (Gram)	İlave Edilen Etanol Miktarı (mL)	Ekstraksiyon Süresi	Ekstraksiyon Çeşidi	Elde Edilen Madde Miktarı (Gram)
Aydın-Çine	80 °C	40 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Dekoksiyon	13.524 g
Aydın-Çine	0	20 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Maserasyon	8.883 g
Balıkesir-Edremit	80 °C	40 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Dekoksiyon	16.634 g
Balıkesir-Edremit	0	20 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Maserasyon	10.935 g
Balıkesir-Gönen	80 °C	40 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Dekoksiyon	7.482 g
Balıkesir-Gönen	0	20 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Maserasyon	10.127 g
Muğla-Fethiye (Memecik)	80 °C	40 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Dekoksiyon	13.005 g
Muğla-Fethiye (Memecik)	0	20 °C	770	50 g	500 mL	48 Saat	Maserasyon	10.228 g
Muğla-Fethiye (Delice)	80 °C	40 °C	770	20 g	200 mL	48 Saat	Dekoksiyon	5.788 g
Muğla-Fethiye (Delice)	0	20 °C	770	20 g	200 mL	48 Saat	Maserasyon	4.636 g

3.2.1.3. Zeytin Yaprığı Ekstraksiyon Verim Oranının Hesaplanması

Öğütülen zeytin yaprağı 50 g tartıldı ve 500 mL metanol ile 24 saat ekstraksiyona bırakıldı. Elde edilen ekstrakt filtre kağıdı ile süzüldü ve süzüntü balona alındı. Darası alınan balon içindeki etanol Rotary Evaporatör (40 °C) yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen ekstraktın verimi aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\text{Verim} = (E_2 - E_1) / E_T \cdot 100$$

E_T : Alınan toplam kuru yaprak miktarı (gram)

E_1 : Boş balon ağırlığı (gram)

E_2 : Ekstrakla dolu balon ağırlığı (gram)

Tablo 6. Zeytin yaprağı ekstraksiyon verim tablosu

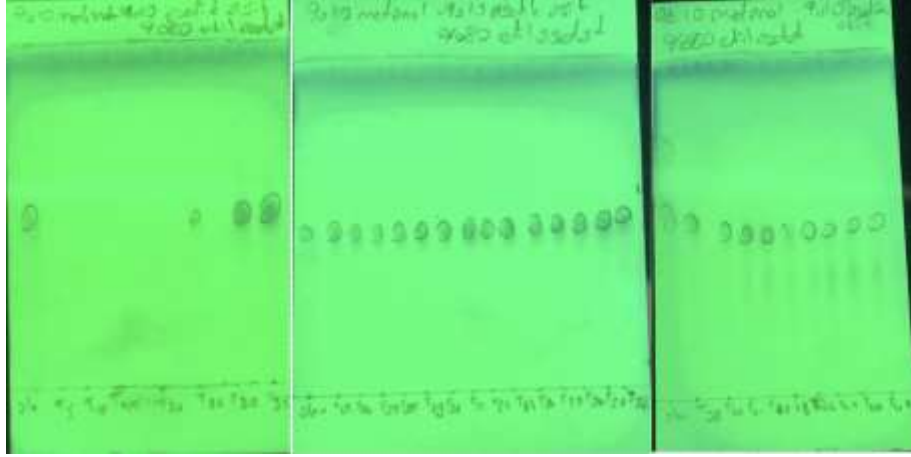
Bölge	Sıcaklık	Kullanılan Gram	Elde Edilen Ekstrakt	Yüzde Verim Oranı
Aydın-Çine	40 °C	50 g	13.524 g	27.048
Aydın-Çine	20 °C	50 g	8.883 g	17.766
Balıkesir-Edremit	40 °C	50 g	16.634 g	33.268
Balıkesir-Edremit	20 °C	50 g	10.935 g	21.87
Balıkesir-Gönen	40 °C	50 g	7.482 g	14.964
Balıkesir-Gönen	20 °C	50 g	10.127 g	20.254
Muğla-Fethiye (Memecik)	40 °C	50 g	13.005 g	26.01
Muğla-Fethiye (Memecik)	20 °C	50 g	10.228 g	20.456
Muğla-Fethiye (Delice)	40 °C	20 g	5.788 g	28.94
Muğla-Fethiye (Delice)	20 °C	20 g	4.636 g	23.18

3.2.2. Kromatografik yöntemler

3.2.2.1. İnce tabaka kromatografisi (Prep. İTK)

Merck, Silica gel F254 (105554), 60-200 mesh partikül boyutunda adsorban içeren 20x20 cm² boyutlarında alemünyum sheet tabakalar kullanıldı. Numuneler plaklara 1 cm yukarıdan düz çizgi halinde tatbik edildi ve mobil faz olarak en uygun çözücü sistemleri belirlendi. Sürüklemeye işlemi bittikten sonra plaklar çeker ocakta kurutuldu, oluşan bantlar UV ışığı (254 ve 365 nm) altında işaretlendi. Preparatif İTK için cam üzerine ince film şeklinde serilmiş adsorban içeren plaklar kullanıldı. Cam plakların kenarlarından 1 cm hizasında maddelerin ekimi yapıldı.

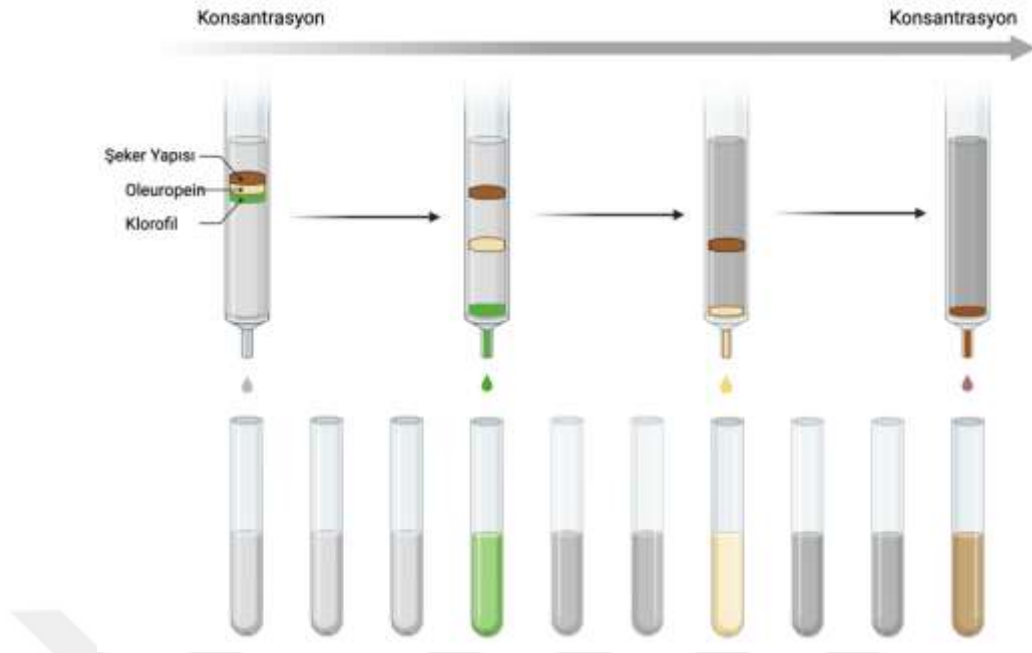
Preparatif İTK’da kullanılacak mobil faz sistemleri Etil Asetat/Metanol/Asetik Asit olarak belirlendi (sırasıyla 8/1/1 mL oranında).



Şekil 9. Kolondan elde edilen oleuropeinin İTK görüntüsü; 254 nm

3.2.2.2. Kolon (Sütün) Kromatografisi

Adsorbant mobil faz olarak kullanılan çözücü ile karıştırılarak süspansiyon haline getirildi ve kolon içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde dikkatlice döküldü. Süspansiyon kolona aktarılırken aynı zamanda kolonun musluğu açıldı ve eşit aralıklarla damlar halinde mobil fazın akışına müsaade edildi. Adsorbanın kolana iyice yerleşmesi (partiküllerin sıkı istiflenmesi) beklendi. Zeytin yaprağı ekstraktları 20 gram silika jel ile karıştırılıp kolona dikkatlice tatbik edildi. Kolona maddenin ekimi yapılırken her yerine eşit miktarda ilave edilmesine ve tek bir hat (faz çizgisi) oluşmasına dikkat edildi. Daha sonra kolondan mobil faz geçirilerek maddelerin polaritesine, molekül büyüklüklerine ve adsorbant madde içerisindeki tutunma özelliklerine göre düşük polariteden artan polariteye göre gradient, izokrotik solvent sistemleri geçirilerek saflaştırma işlemine tabi tutuldu. Burada oleuropeinin oluşturulan mobil faz sisteminde veya adsorban içerisindeki fizikokimyasal tavrı dikkate alınarak metot oturtuldu. Kolondan alınan fraksiyonlar İTK ile UV ışığı (254 nm kısa dalga/ 366 nm uzun dalga) altında incelendi. Benzer alkaloit karışımlarını içeren fraksiyonlar birleştirildi. Özellikle standart oleuropeine göre aynı yürüyen ve oleuropein içerdiğine kesin kanaat getirilen fraksiyonlar bir araya toplandı. Organik çözücü, evaporatörden uçurularak daha yapı karektrizasyonu ve antioksidan aktivite tayinleri yapılmak üzere saklandı. Oleuropeince zenginleştirilmiş ekstraktlar açık sarı renkte katı madde olarak elde edildi.



Şekil 10. Kolon kromatografisi

Tablo 7. Zeytin ekstraktlarından kolon kromatografisi sonuçları

Sentez İçin Alınan Bölgeler	Alınan Numunenin Ekstrakt Isısı	Kolona Verilen Ekstrakt Miktarı (gram)	Silika Jel Miktarı (gram)	Kolondan Elde Edilen Oleuropein Miktarı (gram)
Aydın-Çine	20 °C	5 g	100 g	0.613 g
Balıkesir-Edremit	20 °C	5 g	100 g	1.728 g
Balıkesir-Gönen	20 °C	5 g	100 g	1.04 g
Muğla-Fethiye (Memecik)	20 °C	5 g	100 g	1.233 g
Muğla-Fethiye (Delice)	20 °C	2.5 g	100 g	0.753 g

3.2.2.3. Zeytin Yapağı Ekstraktının Saflaştırma Verim Oranı

Zeytin yapağından elde edilen her bir ekstrakt için 5 ayrı kolon kromatografisi kuruldu.

$$\text{Verim} = (E_2 - E_1) / E_T \cdot 100$$

E_T : Kolona verilen zeytin yapağı ekstraktı (gram)

E_1 : Boş balon ağırlığı (gram)

E_2 : Ekstraktla dolu balon ağırlığı (gram)

Tablo 8. Kolondan elde edilen oleuropeinin verim tablosu

Bölge	Sıcaklık	Saflaştırılan Madde	Saflaştırmadan Elde Edilen	Saflaştırma Yüzde Verim Oranı
Aydın-Çine	20 °C	5 g	0.613 g	12.26
Balıkesir-Edremit	20 °C	5 g	1.728 g	34.56
Balıkesir-Gönen	20 °C	5 g	1.04 g	20.9
Muğla-Fethiye (Memecik)	20 °C	5 g	1.233 g	24.66
Muğla-Fethiye (Delice)	20 °C	2.5 g	0.753 g	30.12

3.3. Zeytin Yaprakları ve Saflaştırılmış Ekstraktların HPLC Karakterizasyonu ve Oleuropein Miktar Tayini

3.3.1. Kullanılan Ekipmanlar

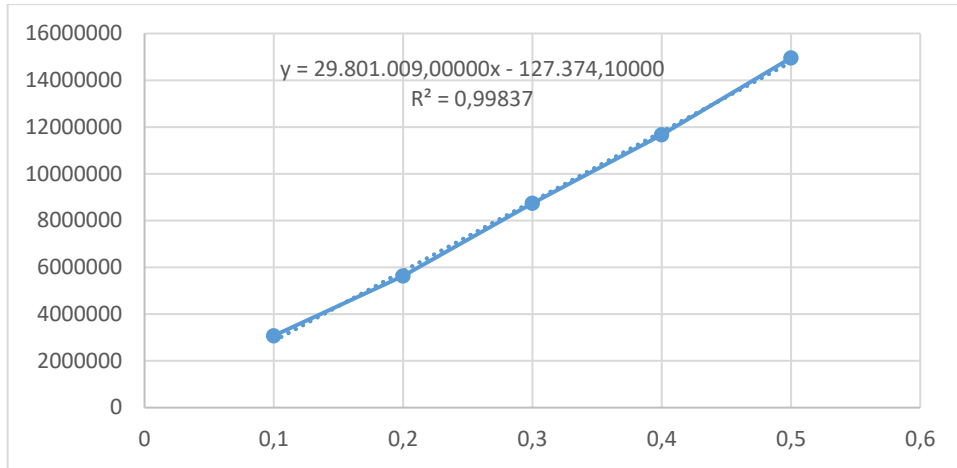
HPLC analizi Shimadzu (Japan) LC-2050C 3D modeli ile yapılmaktadır. UV dedektör ile 20 µL’lik otomatik enjeksiyonların pik alanları LC solution bilgisayar yazılımı ile hesaplandı. Kromatografik ayırım C18 (5 µm, 250 x 4.6 mm) kolonu kullanılarak optimize edildi. Miktar tayinlerinin tümü kromatogram pik alanları hesaplanarak yapıldı.

3.3.2. Kromatografik Koşullar

HPLC kromatografik ayırımlar için izokratik koşulları kullanıldı. Kolon sıcaklığı (25 °C), akış hızı (1.0 mL/dk), mobil faz derişim (Trifloroasetik asit:Metanol:Su (1:400:600) – İzokratik) optimizasyonu yapıldıktan sonra uygun dalga boyunda (233 nm) gerçekleştirildi. Tüm çözeltiler 0.45 µm filtrelerden süzöldükten sonra ultrasonik banyoda gaz giderimi yapılarak HPLC analizine hazır hale getirildi.

3.3.3. Kalibrasyon

1000 ppm derişimde stok standart oleuropein çözeltisi 3 mg hassas terazide tartılıp 10 mL etanol ile seyreltildi. Stok çözeltiden mobil faz ile 10 ppm, 50 ppm ve 100 ppm derişimde çözeltiler hazırlandı. Alan verilerinin konsantrasyona bağılı olarak lineer matematiksel denklemleri oluşturularak kalibrasyon eğrisinden kalibrasyon katsayısı hesaplamaları yapıldı ve doğrusallık hesaplandı (doğrusallık 0.995’den büyük olmalıdır).



Şekil 11. Kalibrasyon doğru grafiği

3.3.4. Oleuropein HPLC Metodu

Zeytin yaprağı ekstraktları ve saflaştırılmış ekstraktlar tartılarak 10 mL (%50, 1/1, v/v) metanol/su ile seyreltildi. 15 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. 0.45 µm filtrelerden 10 mL balon jojeye süzüldü. Hazırlanan numuneler HPLC analizleri için cihaza 3 tekrarlı okumaları yapıldı.

3.4. Oleuropeinin Antioksidan Aktivitesi Hesaplanması

3.4.1. 1,1-Difenil-2-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Aktivite

Antioksidan, stabil bir serbest radikal olan DPPH* ile reaksiyona girerek DPPH'ye indirgenmektedir. Bunun sonucunda soğurma derecesi, DPPH* radikalinden DPPH-H formuna kadar düşer. Ekstraktların antioksidan bileşiklerinin süpürücü potansiyeli, hidrojen verme yeteneği açısından, renk değiştirme derecesini belirtir. Analiz, Villano ve ark., (2007) metodu ile belirtildiği gibi uygulandı. Tüm ekstrakt ve saflaştırma örnekleri 0.01/1 ml Metanol içerisinde çözdürülmüştür. Yapılan çözeltiler 50µl, 100µl ve 150µl olarak 3 ayrı dozda hazırlanıp üzerine 4 mL saf su çözeltisi eklendi. Hazırlanan çözeltilere, 1 mL DPPH* çözeltisi eklendi. Karışım çalkalanarak ve 20°C'de 30 dakika beklemeye bırakıldı. Elde edilen çözeltinin absorbansı, spektrofotometre ile 517 nm olarak ölçümleri yapıldı.

3.4.2. Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Aktivitesi

Zeytin yaprağı ekstraktlarının ve bunların saflaştırılmış ekstraktlarının indirgeme gücünün analizi, ferrisiyanür yöntemi (Oyaizu, 1986) kullanılarak hesaplanmıştır. İndirgenme potansiyeline sahip maddeler, potasyum ferrosiyanür (Fe^{+3}) ile reaksiyona

girerek potasyum ferrosiyanür (Fe^{+2}) halinde indirgenme gerçekleştirir. Ferrosiyanür daha sonra ferrik klorür ile reaksiyona girerek 700 nm'de absorpsiyonlu bir ferrik ferröz kompleksi oluşturur. 0.1 ila 1.5 mg arasında değişen konsantrasyonlara sahip ekstraktlar, 1 mL su içinde 2.5 mL fosfor tamponu ile karıştırıldı. Karışım 50°C'de 20 dakika inkübe edildi. 3000 rpm'de 10 dakika sentrifuj edilmiş trikloro asetik asit alikotları (2.5 mL) karışıma eklendi. Çözeltilinin üst kısmı (2.5 mL), damıtılmış su (2.5 mL) ve yeni hazırlanmış ferrik klorür çözeltisi (0.5 mL) ile karıştırıldı. 700 nm'de soğurma dereceleri ölçüldü, askorbik asit ve E vitamin (0.1~1.0 mg) standart olarak kullanıldı. Reaksiyon karışımının artan soğurma derecesi artan indirgenme gücünü belirtmektedir.



4. BULGULAR

4.1. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının Verimi ve Oleuropein İçeriği

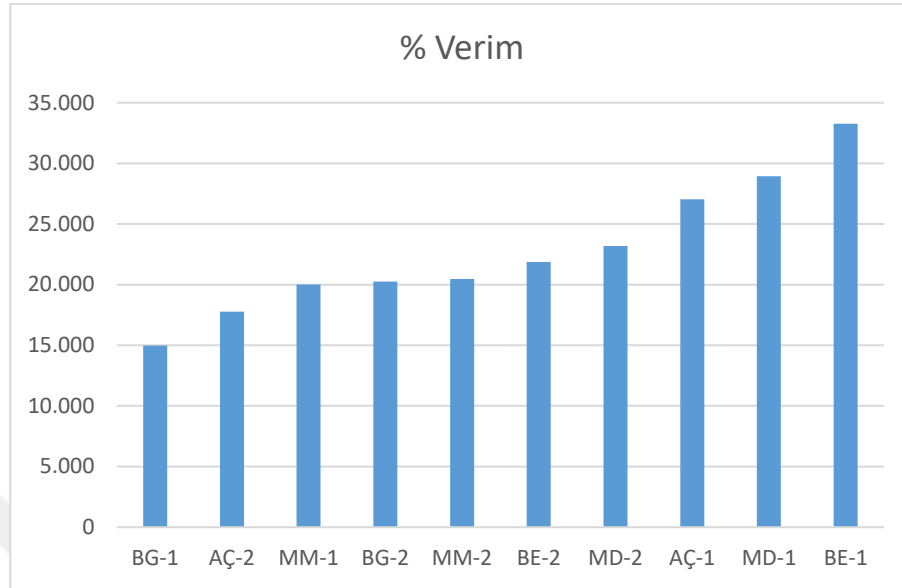
Zeytin yaprağı ekstraktlarının verim yüzde sonuçları ve HPLC sonucu oranlandığında yüzde oleuropein miktarına ulaşılmıştır.

Tablo 9. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde verimi ve yüzde oleuropein içeriği

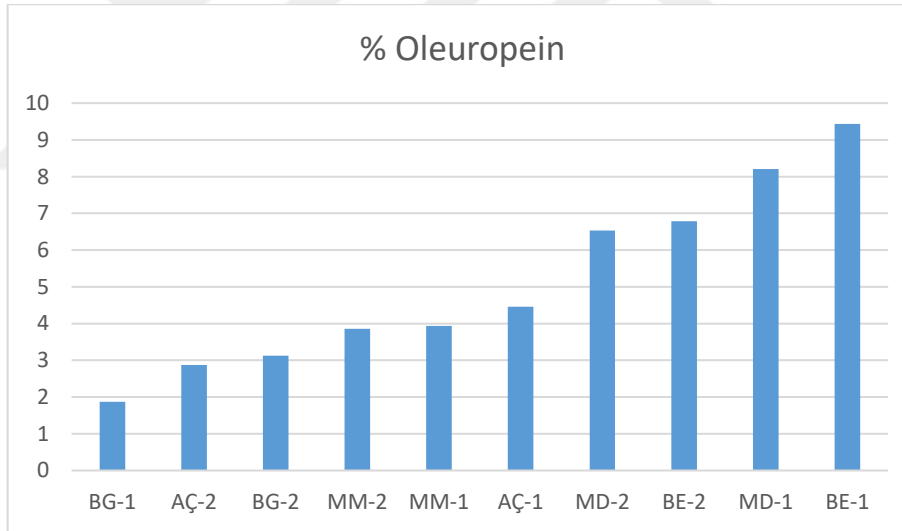
Bölgeler	Ekstraktı Yapılan Zeytin Yaprağı Mikrarı (gr)	Ekstrakt	% Verim	HPLC (mg/ml)	% Oleuropein
Aydın-Çine (40°C)	50 g	13.524 g	27.048	0.395769	4.46
Aydın-Çine (20°C)	50 g	8.883 g	17.766	0.382116	2.87
Balıkesir-Edremit (40°C)	50 g	16.634 g	33.268	0.519166	9.438
Balıkesir-Edremit (20°C)	50 g	10.935 g	21.87	0.558583	6.786
Balıkesir-Gönen (40°C)	50 g	7.482 g	14.964	0.266488	1.872
Balıkesir-Gönen (20°C)	50 g	10.127 g	20.254	0.322542	3.125
Muğla-Fethiye (Memecik) (40°C)	50 g	13.005 g	26.01	0.29495	3.935
Muğla-Fethiye (Memecik) (20°C)	50 g	10.228 g	20.456	0.369395	3.857
Muğla-Fethiye (Delice) (40°C)	20 g	5.788 g	28.94	0.578576	8.207
Muğla-Fethiye (Delice) (20°C)	20 g	4.636 g	23.18	0.558302	6.536

Yaptığımız çalışmada Ege Bölgesinden temin edilen zeytin yapraklarının dekoksasyon ve maserasyon yöntemleri ile elde edilen ekstraktlar ve ekstrakt verimleri hesaplanmıştır. Yapılan üç tekrarlı HPLC analizi sonucu ekstraktlar içerisinde bulunan oleuropein miktarı tespit edildi ve oleuropein yüzdesi hesaplandı (Tablo 9). Balıkesir Edremit yöresine ait numune için (BE-1) 50 gram zeytin yaprağından dekoksasyon yöntemiyle 16.634 gram (%33.26 verimle) ham ekstrakt elde edildi. HPLC analizi sonucunda ekstrakt (1.83 mg/ml) içerisinde ortalama 0.51916 mg/ml (%28.37) oleuropein olduğu tespit edildi. Toplamda Balıkesir Edremit yöresine ait zeytin yaprağının %9.438 verimle en yüksek oleuropein içeriğine sahip olduğu tespit edilmiş ve %1.87 verimle en düşük oleuropein yüzdesi ise Balıkesir Gönen yöresine ait olduğu belirlenmiştir. Buna göre tüm bölgelerden temin edilen zeytin yaprağı numunelerinde oleuropein yüzdeleri azalan değerlerde sırasıyla: Balıkesir Edremit (40°C) için %9.438; Muğla Fethiye (Delice) (40°C) için %8.207; Balıkesir Edremit (20°C) için %6.786; Muğla Fethiye (Delice) (20°C) için %6.536; Aydın Çine (40°C) için %4.46; Muğla Fethiye (Memecik) (40°C) için %3.935; Muğla Fethiye

(Memecik) (20⁰C) için %3.857; Balıkesir Gönen (20⁰C) için %3.125; Aydın Çine (20⁰C) için %2.87; Balıkesir Gönen (40⁰C) için %1.872 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 12. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde verim tablosu



Şekil 13. Zeytin yaprağı ekstraktlarının yüzde oleuropein tablosu

4.2. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropein'in Antioksidan Özellikleri

Ege bölgesinden temin edilen zeytin yapraklarının ve saflaştırılmış ekstraktların antioksidan kapasitesi iki ayrı test ile tespit edilmiştir. Tablo 7'de test sonuçları IC₅₀ değeri olarak yer almaktadır.

Tablo 10. Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) testi ve DPPH radikal süpürme testi ile Zeytin yaprakları ve saflaştırılmış ekstraktlarının antioksidan aktivitesi. Değerler ortalama $\pm$ standart sapmadır (n= 3).

Örnekler	Demir İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) mg Ekuvalens /mmol AA	DPPH Radikal Temizleme Etkinliği IC ₅₀ Values (µg/ml)
AC-1	34.38 $\pm$ 0.1	4.71 $\pm$ 0.24
AC-2	37.13 $\pm$ 0.2	4.87 $\pm$ 0.13
BE-1	21.28 $\pm$ 0.15 ^a	12.93 $\pm$ 0.23*
BE-2	21.68 $\pm$ 0.11 ^a	7.93 $\pm$ 0.22
BG-1	40.387 $\pm$ 0.2	3.02 $\pm$ 0.3
BG-2	39.71 $\pm$ 0.15	3.75 $\pm$ 0.11
MD-1	27.77 $\pm$ 0.13	10.49 $\pm$ 0.31
MD-2	31.055 $\pm$ 0.18	2.1 $\pm$ 0.19
MM-1	45.24 $\pm$ 0.17	2.67 $\pm$ 0.2
MM-2	44.05 $\pm$ 0.22	3.91 $\pm$ 0.24
OL-1	8.9 $\pm$ 0.25	2.46 $\pm$ 0.3
OL-2	10.92 $\pm$ 0.31	4.03 $\pm$ 0.3
OL-3	18.63 $\pm$ 0.12	4.41 $\pm$ 0.15
OL-4	14.28 $\pm$ 0.3 ^b	13.11 $\pm$ 0.33
OL-5	14.18 $\pm$ 0.26 ^b	4.24 $\pm$ 0.3
Kontrol (Askorbik asit)	-	7.92 $\pm$ 0.1*
* ile işaretlenen numune, DPPH testinde kontrolden önemli ölçüde farklılık göstermemektedir. Üst simge harfleri olan örnek çiftleri, FRAP testinde önemli ölçüde farklılık göstermemektedir (p < 0.05).		

4.2.1. FRAP Analizleri Sonuçları

15 çeşit zeytinin yaprağı ekstraktları ve saflaştırılmış ekstraktlar antioksidan kapasitesi, (Benzie ve Strain, 1996) tarafından tarif edildiği gibi FRAP testi ile ölçüldü ve askorbik asit eşdeğerleri olarak hesaplandı. Tablo 7'de sunulan veriler, $8,9 \pm 0,25$ ila $45,24 \pm 0,17$ mmol AA/mg Eşdeğerlik arasında değişen ekstraktların mmol askorbik asit eşdeğerlerini/mg kuru ağırlığını (DW) göstermektedir. Tüm ekstraktlar, askorbik asitten yaklaşık 4 ila 20 kat daha güçlü antioksidan kapasite görülmektedir.

4.2.2. DPPH Analizleri Sonuçları

Zeytin yaprağı ve saflaştırılmış ekstraktlar, kararlı DPPH radikalini sarı renkli difenilpikrilhidrazine indirgemedi oldukça etkili olduğu gözlemlenmiştir. DPPH radikal yakalama aktivitesi için IC₅₀ değerleri, $2,1 \pm 0,19$ ila $13,11 \pm 0,33$ (µg/ml) arasında yer almaktadır ve bu durum ekstraktların DPPH radikallerini çok güçlü bir şekilde yakalayabildiğini gösteriyor. Önemli antioksidan aktivitesi ile bilinen askorbik asit referans olarak kullanılmıştır. (IC₅₀ = $7,92 \pm 0,1$ µm/ml).

4.3. Zeytin Yaprağı Ekstraktlarının ve Oleuropein'in HPLC Analizleri

Ege bölgesinden temin edilen zeytin yapraklarının ve saflaştırılmış ekstraktlarının oleuropein analizlerinin belirlenebilmesi için etanol karışımından oluşan çözücü

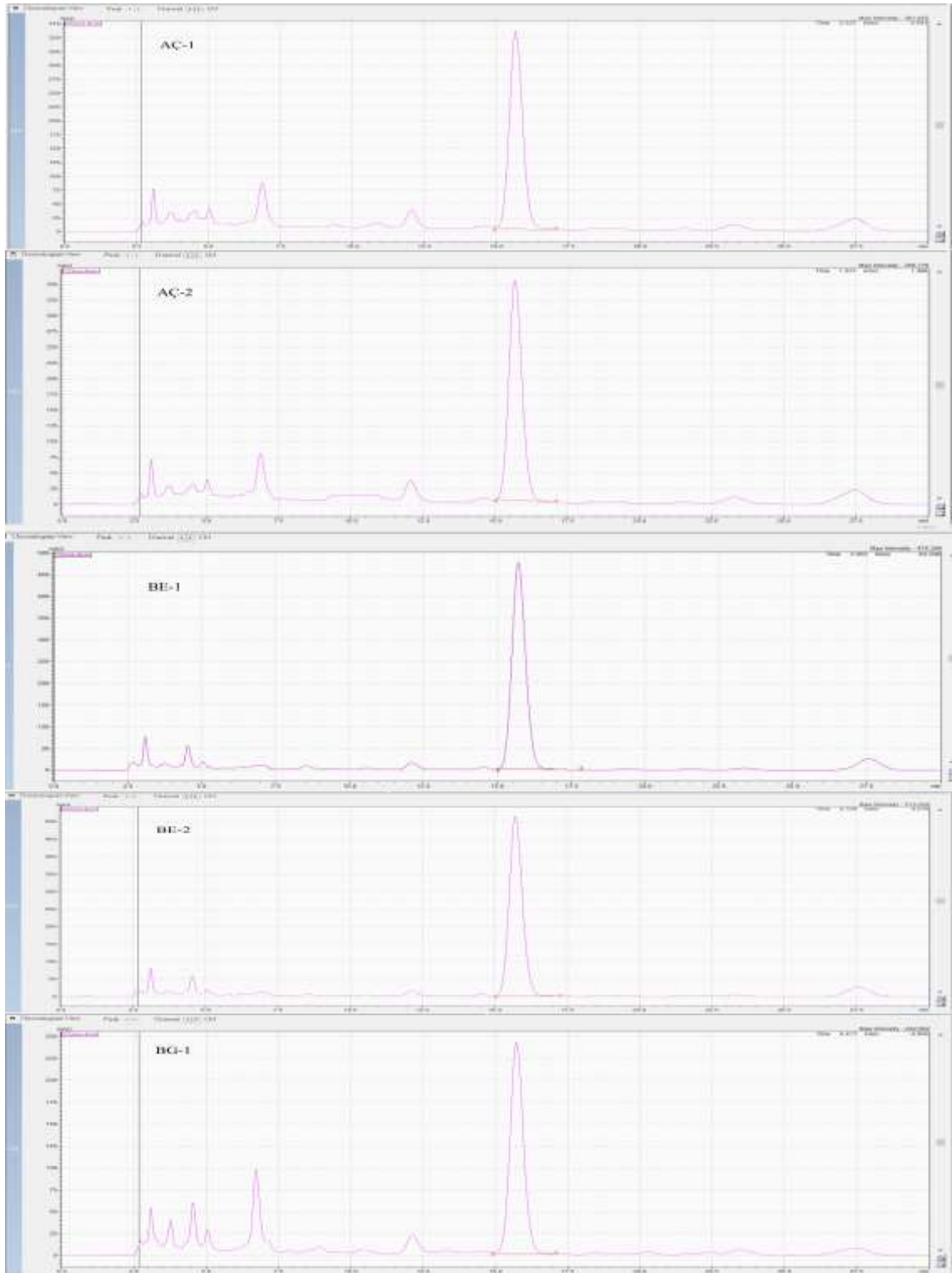
sistemleriyle ekstraktlar hazırlandı ve ekstraktların bu solvent ve/veya solvent karışımlarında çözünürlükleri, çözelti içerisinde kuru madde miktarları ve çözünen maddelerin verimleri dikkate alınarak çözeltiye geçebilecek oleuropein bileşiğinin analizleri araştırılmıştır.

Standart maddenin (Oleuropein) HPLC cihazına tanıtılarak her birinin HPLC kolonundan geliş yüzdeleri ve kromatogramları belirlenerek karakterizasyon çalışmaları yapıldı.

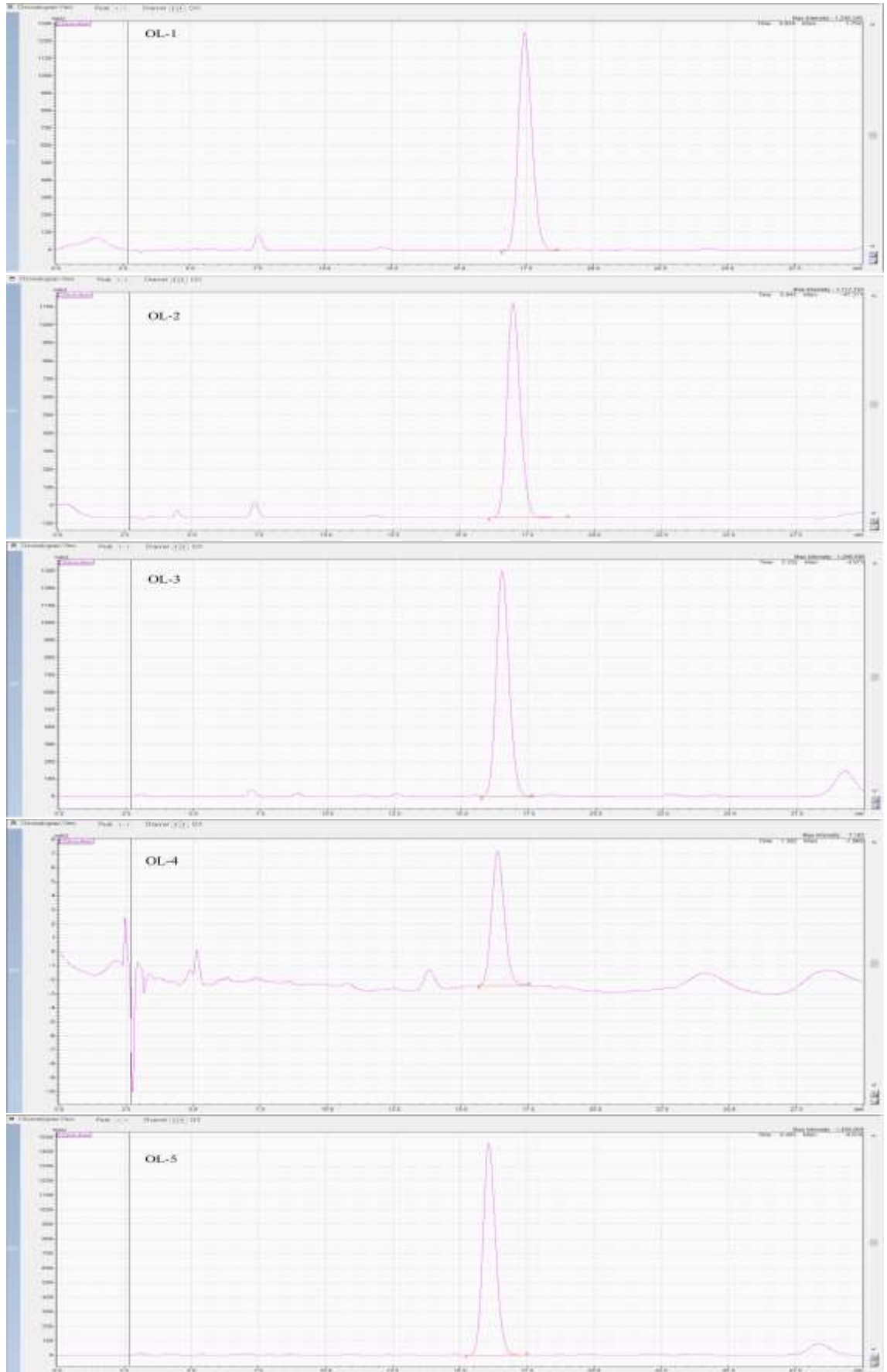
Tablo 11. Zeytin Yaprığı Ekstraktlarının ve Kolondan Geliş Yüzdeleri

Seri	mg/10 ml	Konsantrasyon(mg/ml)	Ortalama Alan	Numune Alanları			y Alan	mg/ml	%
OL-1	22,5	2,25	44461845	44496230	44464811	44424494	44461845	1,496232	66.50
OL-2	18,2	1,82	41142707	41072487	41152583	41203051	41142707	1,384855	76.09
OL-3	24,6	2,46	44037481	44073222	44191084	43848136	44037481	1,481992	60.24
OL-4	20,7	2,07	45667958	45649953	45658675	45695245	45667958	1,536704	74.24
OL-5	20,0	2,00	47500724	47480378	47504431	47517362	47500724	1,598204	79.91
AÇ-1	24,0	2,40	11666950	11632664	11678704	11689482	11666950	0,395769	16.49
AÇ-2	23,6	2,36	11260060	11261559	11253603	11265018	11260060	0,382116	16.19
BE-1	18,3	1,83	15344301	15351462	15330523	15350917	15344301	0,519166	28.37
BE-2	18,0	1,80	16518951	16520298	16517573	16518983	16518951	0,558583	31.03
BG-1	21,3	2,13	7812479	7814246	7813641	7809549	7814246	0,266488	12.51
BG-2	20,9	2,09	9484692	9481637	9484403	9488036	9484692	0,322542	15.43
MD-1	20,4	2,04	17114770	17077604	17132103	17134602	17114770	0,578576	28.36
MD-2	19,8	1,98	16510575	16509234	16513173	16509318	16510575	0,558302	28.20
MM-1	19,5	1,95	8662443	8715283	8635824	8636223	8662443	0,29495	15.13
MM-2	22,2	2,22	10880964	10901722	10867841	10873328	10880964	0,369395	16.64

HPLC Oleuropein Kromotogramları







Şekil 14. HPLC sonucu alınan kromotogram görüntüleri

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Esas olarak Oleuropein bileşiği *Oleaceae* familyasında bulunur ve bu familyanın alt sınıflandırmasında kemotaksonomik bir belirteç olarak kabul edilir (Jansen ve ark., 2002). Oleuropein içeriği zeytin çeşidine, organına, zeytin ürününe, iklime, hasat olgunluğuna ve kullanılan işleme sistemine bağlı olarak değişir (Hassen ve ark.,2015). Son yıllarda oleuropein, elenolik asit ve hidroksitirisol ile ilgili araştırmalar polifenollerin antioksidan özelliklerinin anlaşılmasının ardından önem kazanmıştır. Bu maddelerin antiviral, hipoglisemik, antimikrobiyal ve antioksidan gibi birçok özelliği laboratuvar koşullarında kanıtlanmıştır. Bu özellikleri ile doğal bir antibiyotik olduğu bilinmektedir (Ersus ve Esen, 2008). Son zamanlarda oleuropein ve zeytin yaprağı ekstraktları üzerine gerçekleştirilen çalışmalar hız kazanmıştır.

Yapılan çalışmalar arasında 2006 yılında Altınyay ve Altun zeytin yaprağındaki oleuropeinin HPLC analizini incelemişlerdir. Balıkesir Edremit'e ait zeytin yapraklarındaki oleuropeinin miktarını %3.506 olarak tespit etmişlerdir (Altınyay ve Altun, 2006). Balıkesir yöresinden temin edilen zeytin yapraklarından alınan etanol ekstraktında HPLC sonuçlarına göre BE-1 için (40°C, dekoksiyon) 283,69 mg/g ve toplam oleuropein içeriği %9,44 verimle ve BE-2 için (20°C, maserasyon) 310 mg/g ve toplam oleuropein içeriği %6,9 verimle elde edilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde sıcaklık arttıkça çözücü içerisinde çözünen selülozik yapılarla beraber oleuropein içeriğinde arttığı ve toplam çözünen katı madde miktarında artış olduğu da görülmektedir. Balıkesir-Edremit yöresinde BE-1 için elde edilen ekstrak verimi %33.2 (16,634g/50g) iken düşük sıcaklıkta BE-2 için ekstrak verimi %21.87 (10,935g/50g) olarak tespit edilmiştir.

Avusturyada yapılan farklı bir çalışmada, 2009 yılında Lee ve arkadaşları Yeni Güney Galler bölgesinden topladıkları zeytin yapraklarının fraksiyon sisteminde ekstraktnı gerçekleştirmişlerdir. Analizlerini HPLC ve DPPH ile gerçekleştirmişlerdir. %80 Etanol ekstraktlarının HPLC analizinde 102.11 ± 0.02 mg/g tespit etmişlerdir. Ayrıca DPPH analizi sonucunda %87.0 giderme olarak tespit etmişlerdir (Lee ve ark., 2009). 2010 yılında Tokuşoğlu ve arkadaşları, Gemlik bölgesinden elde ettikleri zeytin yapraklarının ekstraktlarını HPLC ile karakterizasyonunu ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. HPLC karakterizasyonu sonucu oleuropein miktarını 778.6 ± 0.06 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Elde ettikleri ekstraktların antioksidan testlerini FRAP olarak 17.238 ± 0.47 mmol/g olarak tespit etmişlerdir (Tokuşoğlu ve ark., 2010).

2010 yılında Cioffi ve arkadaşları, İtalya'nın Campania'nın La Pepa bölgesinden elde ettikleri zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan etkisini hesaplamışlardır. HPLC analizleri sonucunda 140 ± 2.99 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Antioksidan testlerini DPPH ile gerçekleştirmişler ve elde ettikleri sonuç 42.3 IC₅₀ olarak tespit edilmiştir (Cioffi ve ark., 2010). 2012 yılında Scognamiiglio ve arkadaşları, Cilento Ulusal Parkı'nda (İtalya) Rotondella bölgesinde yetiştirilen *Olea europaea* çeşitlerinin polifenol karakterizasyonu ve antioksidan değerlendirmesini gerçekleştirmişlerdir. HPLC analizleri sonucunda 4.9 ± 0.7 mg/g olarak tespit etmişlerdir (Scognamiiglio ve ark., 2012). 2013 yılında Quirantes-Pine ve arkadaşları, zeytin yaprağı ekstraktlarının HPLC-ESI-QTOF-MS analizlerini gerçekleştirmişlerdir. HPLC sonucunda Oleuropein miktarını 0,1 ppm olarak tespit etmişlerdir (Quirantes-Pine ve ark., 2013). 2018 yılında Doğanğün, meyve tutumundan hasada kadar geçen sürede gemlik çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite ve fenolik bileşiklerindeki değişimin belirlenmesini incelemiştir. DPPH serbest radikali süpürücü aktivite değerlerinin %91.45-93.86 arasında, HPLC ile yapılan analizler sonucunda tüm örneklerde en fazla miktarda (94.21 - 860.21 mg/kg) bulunan fenolik bileşiğin oleuropein olduğunu tespit etmişlerdir (Doğanğün, 2018).

Yaptığımız çalışmada HPLC ile karakterizasyonunu gerçekleştirdiğimiz zeytin yaprağı ekstraktlarının elde edilen oleuropein değerleri; AÇ-1 için $164,90$ mg/g; AÇ-2 için $161,91$ mg/g; BE-1 için $283,69$ mg/g; BE-2 için $310,32$ mg/g; BG-1 için $125,11$ mg/g; BG-2 için $154,33$ mg/g; MD-1 için $283,61$ mg/g; MD-2 için $281,97$ mg/g; MM-1 için $151,26$; MM-2 için $166,39$ mg/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 11).

Ayrıca 20 °C'deki meserasyon yöntemiyle elde edilen ekstraktların saflaştırma çalışmalarında OL-1 için $664,992$ mg/g, %66.50 saflıkta; OL-2 için $760,91$ mg/g, %76.09 saflıkta; OL-3 için $602,44$ mg/g, %60.24 saflıkta; OL-4 için $742,37$ mg/g, %74.24 saflıkta; OL-5 için $799,102$ mg/g, %79.91 saflıkta oleuropein içeren ürünler elde edilmiştir. Balıkesir Edremit'e ait zeytin yaprağı ekstraktının saflaştırılmasından elde edilen OL-5 örneğine baktığımızda en yüksek oleuropein miktarının burada olduğunu, akabinde onu takip eden Muğla Delice'ye ait zeytin yaprağı ekstraktının saflaştırılmasından elde edilen OL-2 örneğinin olduğu tespit edilmektedir.

Sonuç olarak ekstraksiyon çalışmalarında zeytin yapraklarında yer alan toplam oleuropein içeriğine bakıldığında: AÇ-1 için %4.46; AÇ-2 için %2.87; BE-1 için %9.438; BE-2 için %6.786; BG-1 için %1.872; BG-2 için %3.125; MM-1 için %3.3.935; MM-2 için %3.857; MD-1 için %8.207; MD-2 için %6.536 oleuropein içerdiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda toplam %9.438 verimle en yüksek oleuropein içeriğine sahip tür Balıkesir Edremit yöresinden temin edilen zeytin yapraklarına aittir.

Oleuropein ve zeytin yapraklarının ekstraktları üzerine gerçekleştirilen fenolik bileşiklerin tayini ve karakterizasyonu çalışmaları ardından oleuropein ve ekstraktların antimikrobiyal yönü, antidiyabetik yönü ve antioksidan yönünü gözlemlemek amaçlı çalışmalar yapılmıştır. Antioksidan özelliklerini belirlemek için farklı analiz teknikleri olan DPPH, ROS, ABTS ve FRAP yöntemleri kullanılan birçok çalışma literatürde bulunmaktadır. Çalışmamızda bu farklı tekniklerden olan DPPH ve FRAP yöntemleri seçilerek analizlerimiz gerçekleştirilmiştir. Bu analizler ile ilgili literatür verileri değerlendirildiğinde 2010 yılında Kiritsakis ve arkadaşları, Yunan zeytin yapraklarının (Metanol/Su) ekstraktlarını oluşturup antioksidan analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Gerçekleştirilen analizlerden DPPH sonucunu 27.50 ± 1.44 IC₅₀ olarak bulmuşlardır (Kiritsakis ve ark., 2010). Biz de yaptığımız DPPH radikal giderme analizinde kontrol olarak kullanılan Askorbik Asite (IC₅₀ değeri 7.92 ± 0.10) karşı ekstraktların radikal giderme etkinlikleri belirlenmiştir. Buna göre BE-1 ve MD-1 hariç diğer tüm ekstraktları askorbik asitten daha iyi radikal giderme etkinliği göstermiştir. Ekstarklar arasında en iyi sonuç Muğla Delice (MD-2, 20°C, maserasyon, IC₅₀ değeri 2.10 ± 0.19) zeytin yaprağından alınan ürüne aittir (diğer IC₅₀ değeri için Tablo 10 bakınız).

Yine 2011 yılında Hayes ve arkadaşları tarafından yapılan farklı bir çalışmada zeytin yaprağı eksraktının ABTS ve FRAP yöntemi ile antioksidan aktiviteleri incelemişlerdir. FRAP yöntemi sonucu 30.3 ± 0.1 IC₅₀ ve ABTS 37.93 ± 0.23 IC₅₀ olarak bulmuşlardır (Hayes ve ark., 2011). 2011 yılında Abaza ve arkadaşları Chétoui çeşidine ait zeytin yapraklarını 4 farklı çözücü kullanarak ekstrakt elde etmişlerdir ve bu ekstraktların ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin $629.87-1064.25$ µmol TE/g kuru yaprak aralığında değişiklik gösterdiğini belirtmişlerdir (Abaza ve ark., 2011). 2012 yılında Czerwinska ve arkadaşları, Oleuropein ve zeytinyağından elde edilen dialdehid türevi oleacein'in antioksidan aktivitelerinin karşılaştırılması adlı çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. ROS yöntemiyle gerçekleştirmiş oldukları antioksidan etki çalışmasında 5 µM oleuropein'in %40 etki gösterdiğini tespit etmişlerdir (Czerwinska ve ark., 2012). 2013 yılında Ahmad-Qasem ve arkadaşları, zeytin yapraklarının dondurulmasının ve dehidrasyonunun ekstrakt bileşimi ve antioksidan potansiyeli üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Karakterizasyonda oleuropein miktarını 108.6 ± 1.6

mg/g olarak tespit etmişlerdir. Gerçekleştirdikleri FRAP analizi sonucunda 109 ± 5 mg/g olarak tespit etmişlerdir (Ahmad-Qasem ve ark., 2013). Aynı zamanda 2013 yılında Kara, farklı kurutma yöntemlerinin zeytin yaprağındaki fenolik madde dağılımına ve antioksidan kapasitesine etkisini araştırmıştır. Antioksidan aktivite için DPPH yöntemi kullanmışlardır. Gemlik türü zeytin yaprağında antioksidan kapasitesinin %92.76 tespit etmişlerdir (Kara, 2013). 2016 yılında Moudache ve arkadaşları, zeytin yan ürünlerini ve zeytin yaprağı ekstrelerinin antioksidan aktivitelerini DPPH yöntemi ile incelemişlerdir. Zeytin yaprağı ekstraksiyonunun (etanol/su) antioksidan aktivitesi 95.4 ± 0.3 IC₅₀ olarak bulmuşlardır (Moudache ve ark., 2016).

2016 yılında Blasi ve arkadaşları İtalya’da yetiştirilen farklı zeytin yaprağı çeşidini farklı mevsimlerde toplayıp ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Antioksidan aktivitelerinin Lecino çeşidinin eylül ayından toplanan zeytin yapraklarından 44.8 mg TE/g kuru yaprak, Dolce Agogia çeşidinin aralık ayında 99.8 mg TE/g kuru yaprak olduğunu belirtmişlerdir (Blasi ve ark. 2016). 2016 yılında Kurtulmuş, Edremit körfezi zeytin yapraklarının antioksidan özellikleri ile fenolik ve mineral bileşimleri üzerine mevsim ve yükselti faktörlerinin etkilerini incelemiştir. Yaprakların DPPH radikallerini indirgeme özelliği %93.80 ile %95.43 arasında olduğunu tespit etmiştir (Kurtulmuş, 2016). 2017 yılında Difonzo ve arkadaşları Coratina zeytin çeşidi yaprakları ile farklı çözücüler kullanarak elde ettikleri ekstraktları ABTS yöntemi kullanarak antioksidan aktivitesini 385.0-908.0 μ mol TE/g aralığında tespit etmişlerdir (Dizonfo ve ark., 2017). 2022 yılında Kocatürk ve arkadaşları, Zeytin yaprağı (domat)’nın antioksidan ve sitotoksik aktivitelerini incelemişlerdir. Etanollü ekstraktlarının DPPH sonucunu $0,16 \pm 0.02$ IC₅₀, ABTS sonucunu 0.023 ± 0.002 IC₅₀ olarak bulmuşlardır (Kocatürk ve ark., 2022).

Sonuç olarak bizde yaptığımız çalışmalarda DPPH yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz zeytin yaprakları ekstraktları ve ekstraktların saflaştırılmasından yapılan antioksidan çalışmaları sonucunda; AÇ-1 için 4.71 ± 0.24 IC₅₀; AÇ-2 için 4.87 ± 0.13 IC₅₀; BE-1 için 12.93 ± 0.23 IC₅₀; BE-2 için 7.93 ± 0.22 IC₅₀; BG-1 için 3.02 ± 0.3 IC₅₀; BG-2 için 3.75 ± 0.11 IC₅₀; MD-1 için 10.49 ± 0.31 IC₅₀; MD-2 için 2.1 ± 0.19 IC₅₀; MM-1 için 2.67 ± 0.2 IC₅₀; MM-2 için 3.91 ± 0.24 IC₅₀ olarak belirtilmiştir. FRAP yöntemi ile gerçekleştirdiğimiz zeytin yaprakları ekstraktları ve ekstraktların saflaştırılmasından yapılan antioksidan çalışmaları sonucunda; AÇ-1 için 34.38 ± 0.1 mg

ekivalent/mmol AA; AÇ-2 için 37.13 ± 0.2 mg ekuivalent/mmol AA; BE-1 için 21.28 ± 0.15 mg ekuivalent/mmol AA; BE-2 için 21.68 ± 0.11 mg ekuivalent/mmol AA; BG-1 için 40.387 ± 0.2 mg ekuivalent/mmol AA; BG-2 için 39.71 ± 0.15 mg ekuivalent/mmol AA; MD-1 için 27.77 ± 0.13 mg ekuivalent/mmol AA; MD-2 için 31.055 ± 0.18 mg ekuivalent/mmol AA; MM-1 için 45.24 ± 0.17 mg ekuivalent/mmol AA; MM-2 için 44.05 ± 0.22 mg ekuivalent/mmol AA; OL-1 için 8.9 ± 0.25 mg ekuivalent/mmol AA; OL-2 için 10.92 ± 0.31 mg ekuivalent/mmol AA; OL-3 için 18.63 ± 0.12 mg ekuivalent/mmol AA; OL-4 için 14.28 ± 0.3 mg ekuivalent/mmol AA; OL-5 için 14.18 ± 0.26 mg ekuivalent/mmol AA olarak tespit edilmiştir (Tablo 10).

Gerçekleştirilen son araştırmalar, bitki ve gıdaların fitokimyasal özelliklerine odaklanmıştır. Bu özelliklerin en göze çarpan özelliği antioksidan kapasiteleridir ve antioksidanlar arasında en çok çalışılan ve araştırılan moleküller fenolik moleküllerdir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada, Aydın Çine, Muğla Delice, Muğla Memecik, Balıkesir Gönen ve Balıkesir Edremit'den iki farklı sıcaklıkta (20°C ve 40°C) etanol içerisinde ekstrakte edilen beş çeşit zeytin yaprağının antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda Balıkesir Edremit ve Muğla Delice yörelerine ait zeytin yaprakları örneğinde düşük sıcaklıkta elde edilen ekstraktlarda daha iyi antioksidan etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Özellikle Muğla Delice (MD-2, 20°C , maserasyon, IC_{50} değeri 2.10 ± 0.19) yöresinden temin edilen zeytin yaprağı ekstraktı en yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduğu belirlenmiştir.

HPLC analizi ile doğrulanan yüksek oleuropein içeriğine sahip 20°C 'de ekstrakte edilen çeşitlerin silika jel kolon fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi de değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda; OL-1 için $2.46 \pm 0.3 \text{ IC}_{50}$; OL-2 için $4.03 \pm 0.3 \text{ IC}_{50}$; OL-3 için $4.41 \pm 0.15 \text{ IC}_{50}$; OL-4 için $13.11 \pm 0.33 \text{ IC}_{50}$; OL-5 için $4.24 \pm 0.3 \text{ IC}_{50}$ DPPH sonuçları elde edilmiştir (Tablo 10). Çalışmamızda tüm ekstraksiyon adımları için fenolik bileşiklerin maksimum ekstraksiyon verimleri ve en yüksek anti-radikal aktivite gösterebilecek metodolojiye öncelik verilmiştir. Bunun için oda sıcaklığı (20°C , maserasyon) ve daha yüksek sıcaklıkta (40°C , dekoksasyon) yöntemleri tercih edilmiştir. Yüksek sıcaklığın bitki içerisinde bulunan fenolik bileşiklerin bozulmasına neden olabileceği düşünüldüğünde, maksimum madde miktarının çözücü ortamına geçebileceği ve antioksidan aktivitenin yüksek olması amacıyla en yüksek sıcaklık 40°C ' olacak şekilde belirlenmiştir. Sıcaklığın ekstrakt verimi, ekstraktlar içerisindeki

oleuropein içeriği ve biyolojik aktiviteler üzerine etkilerini incelediğimizde, sıcaklık arttıkça ekstraksiyon veriminin arttđđını ve genel olarak ekstraktlar içersinde oleuropein içeriğinin artış gösterdiği görülmektedir. Biyolojik aktivite çalışmalarında ise yapılan iki farklı antioksidan tahlilinden elde ettiğimiz bulgular dahilinde, Muğla-Memecik, Aydın-ine bölgelerinden temin edilen zeytin yapraklarından (MM-1, A-1) 40 C sıcaklıkta elde edilen etanol ekstraktının, 20C'de ekstrakte edilen ekstraktından (MM-2, A-2) daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği görülmüştür. Bu durum ekstraksiyon yöntemi üzerindeki sıcaklığın etkisi ile ilgili olabilir. Fenolik asitler ve flavonoidler gibi ikincil metabolitlerin bitkilerden izolasyonu ve saflaştırılması için ekstraksiyon yöntemi, bunların tanımlanması ve karakterizasyonundanncekinemli adımdır.

Beş farklı bölgeden elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarında oleuropein içeriği Balıkesir Gönen hariç, 40 C de elde edilen ekstraktlarda daha fazla olduğu görüldü. Antioksidan sonuç tablosuna göre de, Balıkesir-Edremit yöresinden elde edilen ekstraktlarının FRAP ve DPPH yöntemleriyle en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte Balıkesir Gönen ve Muğla Memecik türlerinden 40C de elde edilen (BG1, BG-2, MM-1, MM-2) ekstraktların 20 C de elde edilen ekstraktlarından hem FRAP yönteminde hemde DPPH yönteminde daha yüksek antioksidan kapasite gösterdiği görülmüştür. Fakat Muğla Delice türlerinden 20 C de elde edilen ekstraktların ise 40 C de olanlarında daha iyi anti-oksidan aktivite gösterdiği görülmektedir (Tablo 10). Bu nedenle sıcaklığın etkisi tam olarak anti oksidan aktiviteye olumlu bir etki sağlamıştır veya sağlamamıştır demek doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Bitkinin trene göre (lokasyon, tarımsal tedbirler, bölge rakımı, sıcaklı vb.) sıcaklıkla birlikte daha fazla çözünen flavonoid yapısındaki fenolik bileşiklerin artış veya azılışına göre antioksidan aktivitede olumlu veya olumsuz bir etki yaptđđı söylemek daha doğru olacaktır. En yüksek aktivitenin görüldüğü MD-2, MM-1 ve MM-2 (DPPH radikal gidermede) ekstraktlarda oleuropein ile birlikte matrik içerisinde olabilecek fenolik yapıdaki bileşiklerinde sinerjistik bir etki sağlamış olabileceği düşünülmektedir. Literatüre göre (Capasso ve ark., 1994), başlıca biyoaktif bileşenlerden oluşan zeytin yaprağı ekstresi; oleuropein ligstroside, nuzhenide, nuzhenide oleoside ve dimetiloleuropein (L. Cecchi, Migliorini, Zanoni, Breschi, & Mulinacci, 2018) ayrıca tirozol, hidroksitirozol ve ilgili bileşikler gibi diğer küçük bileşenler, tirozol ve hidroksitirozol gibi küçük bileşenlerin güçlü antioksidan moleküller olduğu

bilinmektedir. Bu nedenle yukarıda bahsedilen oleuropein dışındaki biyomoleküllerin antioksidan aktivite üzerine sinerjistik veya antagonistic etkileri göz ardı edilmemelidir.

Tüm bu durumları dikkate aldığımızda ekstraktları kendi içinde kıyaslayacak olursak, DPPH radikal giderme analizinden elde edilen sonuçlar, FRAP sonuçlarına benzer şekilde AC-2'nin %66.5 oleuropein fraksiyonu olan OL1 ve BE-2'nin %79.91 oleuropein fraksiyonu olan OL-5'in ham ekstraktlarından daha yüksek antiradikal aktivite sergilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, sırasıyla MD2, MM2 ve BG2'den izolasyonu yapılan oleuropein fraksiyonları olan OL-2, OL3 ve OL4, ilgili ham ekstraktlarından daha düşük antiradikal aktivite göstermiştir.

Sonuç olarak 3 farklı ile ait 5 farklı bölgeden temin edilen tüm ekstraktların ve bu ekstraktlardan izole edilen yüksek oleuropein içerikli izolatların standart olarak kullanılan Askorbik Asitten 4 ila 20 kat daha yüksek antioksidan aktivite sergilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte ekstraktlar arasında en yüksek verim ve oleuropein içeriğine sahip olan zeytin yaprağı %9.438 ile Balıkesir-Edremit bölgesine ait ham ekstraktlardır. FRAP yönteminde; ekstraktlar arasında en yüksek antioksidan aktivite Balıkesir-Edremit (BE-1) için 21.28 ± 0.15 mg ekuvalent/mmol AA, izolatlar arasında en yüksek antioksidan aktivite Aydın-Çine eskaktına ait OL-1 8.9 ± 0.25 mg ekuvalent/mmol AA olduğu tespit edilmiştir. DPPH yönteminde ise; ekstraktlar arasında en yüksek antioksidan aktivite Muğla-Delice (MD-2) için 2.1 ± 0.19 IC₅₀ olduğu, izolatlar arasında ise en yüksek antioksidan aktivite Aydın-Çine eskaktına ait OL-1 için 2.46 ± 0.3 IC₅₀ olduğu tespit edilmiştir.

6. ÖNERİLER

Türkiye’de zeytincilik endüstriyel bir önem taşımaktadır ve ülkemizde zeytincilik ve zeytin yağı üretimi çok daha fazla öne çıkmaktadır. Buna karşılık Zeytin (*Olea europaea L.*) Yaprığı Ekstresi üretimi avrupada daha yaygındır ve gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır. Özellikle ateroskleroz gibi kardiyovasküler rahatsızlıkların riskini azaltması, kan basıncını düşürmesi, hipertansiyonu dengelemesi, tip-2 diyabet tedavisine yardımcı olması, serbest radikalleri söndürmesi, antioksidan özelliğe sahip olması ve bağışıklık sistemini kuvvetlendirmesi gibi amaçlarla %20’lik ekstraktları gıda alanında kullanım alanına sahiptir. Ülkemizde avrupada olduğu kadar yaygın bir kullanıma sahip olmayıp, acımsı tadı ve tekstür özelliklerinden dolayı da pek tercih edilmemiş fakat son yıllarda bu ürüne ilginin giderek arttığı görülmektedir. Ayrıca oleuropein içeriğine sahip ekstraktların herpes virüsleri üzerinde etkili olması, uçukların tedavisinde kullanılması ve antienflammatuar aktiviteye sahip olması nedeniyle kozmetik ve ilaç sanayinde de kendine önemli bir yer edinecektir. Ülkemizin zeytin cenneti olması, zeytin ağaçlarının ölümsüz ağaç olarak tüm Ege ve Akdeniz kıyılarında yayılım göstermesi bu ağca ve ağaçtan elde edilen zeytin yapraklarına daha fazla önem verilmesi ve yüksek katma değerli ürünlerin üretilmesi amacıyla kimyasal hammadde sanayisi için büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., & Zarrouk, M. (2015). *Olive tree (Olea europae L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds*. Antioxidants (Basel), 4(4), 682–698.
- Abaza, L., Youssef, N. B., Manai, H., Haddada, F. M., Methenni, K., & Zarrouk, M. (2011). Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y aceites*, 62(1), 96-104.
- Adem, S., Eyupoglu, V., Sarfraz, I., Rasul, A. and Ali, M. 2020. *Identification of potent COVID-19 main protease (Mpro) inhibitors from natural polyphenols: An in silico strategy unveils a hope against CORONA*.
- Ahmad-Qasem, M. H., Barrajon-Catalán, E., Micol, V., Mulet, A., & García-Pérez, J. V. (2013). *Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential*. *Food Research International*, 50(1), 189-196.
- Al-Azzawie, H. F., & Alhamdani, M. S. (2006). *Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits*. *Life Sciences*, 78, 1371–1377.
- Alibes, X., Munoz, S., Faci, R., Perez-Lanzac, J., Gonzalez, C.A., 1982. *Valor alimenticio para rumiantes de la hoja de olivo*. XX Reunion Cientifica de la SINA, Zaragoza, 10.
- Alirezaei, M., Dezfoulan, O., Neamati, S., Rashidipour, M., Tanideh, N., & Kheradmand, A. (2012). *Oleuropein prevents ethanol-induced gastric ulcers via elevation of antioxidant enzyme activities in rats*. *Journal of physiology and biochemistry*, 68(4), 583-592.
- Altinyay, Ç., & Levent Altun, M. (2006). *HPLC analysis of oleuropein in Olea europaea L.* *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 35(1), 1-11.
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., & Ülkü, S. (2008). *Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (Olea europaea L.) by adsorption on silk fibroin*. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 342-348.
- Amici, A., Verna, M., Martillotti, F., 1991. *Olive byproducts in animal feeding: Improvement and Utilization*. *Options Mediterraneennes-Serie Seminaires*, 16, 149-152.
- Andreadou, I., Sigalam, F., Iliodromitis, E. K., Maria, P., Sigalas, C., Aligiannis, N., ... Kremastinos, D. T. (2007). *Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 42(3), 549–558.
- Arslan, A. K. K., Öztürk, E., Yerer, M. B., & Koşar, M. (2017). *Zeytin yaprağındaki oleuropein ve farmakolojik etkileri*. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26(1), 89-93.
- Bahşi, M., Ciftçi, M., Şimşek, Ü. G., Azman, M. A., Özdemir, G., Yılmaz, Ö., & Dalkilic, B. (2016). *Effects of olive leaf extract (oleuropein) on performance, fatty acid levels of breast muscle and some blood parameters in Japanese quail (Coturnix coturnix Japonica) reared in different stocking densities*. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 63(1), 61-68.
- Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello, M., Tarocchi, M., Galli, A., & Balsano, C. (2014). *Effects of the olive-derived polyphenol oleuropein on human health*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18508–18524. <https://doi.org/10.3390/ijms151018508>

- Bayram, M., Topuz, S., & Kaya, C. (2020). *Antioxidant, antimicrobial activity of Olive Leaf Extract and Oleuropein, Their Possibilities Usage in Foods*. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 8(2), 337-347.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J.A., 2000. *Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves*. Food Chemistry, 68(4), 457–462.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bilgiç, M., & Uğur, Ş. S. (2015). *Antimikrobiyal medikal tekstil ürünleri için oleuropein*
- Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M. S., Chiesi, C., & Cossignani, L. (2016). Seasonal variations in antioxidant compounds of Olea europaea leaves collected from different Italian cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89.
- Boiteau, P., Pasich, B. And Ratsimamanga, R(Les). 1969. *Triterpenoides*. Gauthier-Villars Paris, p 3-5.
- Bonechi, C., Donati, A., Tamasi, G., Pardini, A., Rostom, H., Leone, G., ... & Rossi, C. (2019). *Chemical characterization of liposomes containing nutraceutical compounds: Tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein*. Biophysical chemistry, 246, 25-34.
- Boss, A., Bishop, K. S., Marlow, G., Barnett, M. P., & Ferguson, L. R. (2016). *Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions*. Nutrients, 8(8), 513.
- Capasso, R., Evidente, A., Tremblay, E., Sala, A., Santoro, C., Cristinzio, G., & Scognamiglio, F. (1994). Direct and mediated effects on Bactrocera oleae (Gmelin)(Diptera; Tephritidae) of natural polyphenols and some of related synthetic compounds: Structure-activity relationships. *Journal of chemical ecology*, 20, 1189-1199.
- Caldwell, M.M., Robberecht, R. and Flint, S.D. 1983. *Internol filters: Prospects for UVacclimation in higher plants*. Physiol. Plant 58: 445-450.
- Caporaso, N., Formisano, D., Genovese, A., 2018. *Use of phenolic compounds from olive mill wastewater as valuable ingredients for functional foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58(16), 2829–2841.
- Cecchi, L., Migliorini, M., Zanoni, B., Breschi, C., & Mulinacci, N. (2018). An effective HPLC-based approach for the evaluation of the content of total phenolic compounds transferred from olives to virgin olive oil during the olive milling process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(10), 3636-3643.
- Cioffi, G., Pesca, M. S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., & De Tommasi, N. (2010). *Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity*. Food Chemistry, 121(1), 105-111.
- Cioffi, G., Pesca, M. S., De Caprariis, P., Braca, A., Severino, L., & De Tommasi, N. (2010). *Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity*. Food Chemistry, 121(1), 105-111.
- Connolly, J.D. and Hill, R.A. 1991. Dictionary of Terpenoids. (London: Chapman and Hall). Cordell, G. A. (1976). *Biosynthesis of sesquiterpenes*. Chemical Reviews, 76(4), 425-460.

- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G. 2000. *Natural products (secondary metabolites)*. Biochemistry and molecular biology of plants, 24, 1250-1319.
- Czerwińska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 131(3), 940-947.
- Czerwińska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 131(3), 940-947.
- Dawson, F.A. 1994. *The amazing terpenes*. Naval Stores Rev. March/April, 6-12.
- De Marino, S., Festa, C., Zollo, F., Nini, A., Antenucci, L., Raimo, G., & Iorizzi, M. (2014). Antioxidant activity and chemical components as potential anticancer agents in the olive leaf (*Olea europaea* L. cv *Lec-cino*) decoction. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14(10), 1376–1385.
- Delgado-Pertinez, M., Chesson, A., Provan, G.J., Garrido, A., Gomez-Cabrera, A., 1998. *Effect of different drying systems for the conservation of olive leaves on their nutritive value for ruminants*. *Acta Veterinaria*, 47, 141-150.
- Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V. M., Ranieri, M., Pasqualone, A., ... & Caponio, F. (2017). Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 31, 63-70.
- Diyoke, O.I. 2014. *Antioxidant and toxicologic properties of methanol leaf extract of stephania dinklagei in wistar albino rats*.
- Doğangün, E. (2018). *Meyve tutumundan hasada kadar geçen sürede gemlik çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite ve fenolik bileşiklerindeki değişimin belirlenmesi* (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).
- Doğru, E., Çelik, Ş., Yakar, Y., & Ünver, N. (2021). Zeytin yaprağı ilavesinin zeytinyağının bazı karakteristik özelliklerine etkisi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(1), 72-85.
- Donato-Trancoso, A., Monte-Alto-Costa, A., & Romana-Souza, B. (2016). Olive oil-induced reduction of oxidative damage and inflammation promotes wound healing of pressure ulcers in mice. *Journal of Dermatological Science*, 83(1), 60–69.
- Ebel, J. and Grisebach, H. 1988. Defense strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*: A molecular analysis. *Trends Biochem. Sci.* 13: 23-27.
- Ekim, M., Sekeroglu, M. R., Balahoroglu, R., Ozkol, H., & Ekim, H. (2014). Roles of the oxidative stress and ADMA in the development of deep venous thrombosis. *Biochemistry Research International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/703128>
- El, S.N. and Karakaya, S., 2009. Olive tree (*Olea europaea*) Leaves: Potential beneficial effects on human health. *Nutrition Reviews*, 67, 632-638.
- Esti, M., Cinquanta, L., & La Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 32–35.
- Fox, E.G., Wu, X., Wang, L., Chen, L., Lu, Y.Y. and Xu, Y. 2019. Queen venom isosolenopsin A delivers rapid incapacitation of fire ant competitors. *Toxicon*, 158, 77-83.
- Fraenkel, G. 1959. The raison d'etre of secondary substances. *Science* 129: 1466-1470.

- Gella, A., & Durany, N. (2009). *Oxidative stress in Alzheimer disease*. Cell adhesion & migration, 3(1), 88-93.
- Ghanem, M.T.M., Tawfik, W.A., Mahdy, E.S.M., Abdelgawad, M.E., Abdel-Azim, N.S., El-Missiry, M.M., 2019. *Chemical and biological evaluation of olive leaves as a waste by-product of olive oil industry*. Egyptian Pharmaceutical Journal, 18(2), 172–177.
- Ghomari, O., Merzouki, M., & Benlemlih, M. (2020). *Optimization of bioconversion of oleuropein, of olive leaf extract, to hydroxytyrosol by Nakazawaea molendini-olei using HPLC-UV and a method of experimental design*. Journal of Microbiological Methods, 176, 106010.
- Gökalp, F. (2017). *Zeytin etken maddesi olan oleuropein'in kimyasal aktivitesinin teorik olarak araştırılması*. Marmara Fen Bilimleri Dergisi, 29(2), 77-81.
- Hansen, K., Adersen, A., Brogger Christensen, S., Rosendal Jensen, S., Nyman, U., Wagner Smitt, U.: Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europea* and *Olea Lancea*. *Phytomedicine* 2(4), 319-325, 1996.
- Harborne, J.B. 1986, Recent advances in chemical ecology. Nat Prod Rep 3:323-344. Harborne, J.B. 1988. *Introduction to ecological biochemistry* (3rded.). London: Academic Press. Harborne, J.B., Simmonds, N.W. (1964). In *Biochemistry of Phenolic Compounds*, p.79 [J. B. Harborne, editor]. London: Academic Press.
- Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). *Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation–A mini-review*. Journal of Functional Foods, 18, 926-940.
- Hayes, J. E., Allen, P., Brunton, N., O'grady, M. N., & Kerry, J. P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126(3), 948-955.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of agricultural and food chemistry, 53(6), 1841-1856.
- Ilgar, R. (2016). *Çanakkale ilinde zeytin yetiştiriciliği ve yaşanan sorunlar*. Coğrafya Dergisi, (32), 19-32.
- Ivanov, M., Vajic, U. J., Mihailovic-Stanojevic, N., Miloradovic, Z., Jovovic, D., Grujic-Milanovic, J., ... Dekanski, D. (2018). *Increase blood-flow to brain. Highly potent antioxidant Olea europaea L. leaf extract affects carotid and renal haemodynamics in experimental hypertension: The role of oleuropein*. EXCLI Journal, 17, 29–44.
- Jemai, H., El-Feki, A., Sayadi, S., 2009. *Antidiabetic and antioxidant effect of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 57, 8798-8804.
- Jensen, S. R., Franzyk, H., & Wallander, E. (2002). *Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers*. Phytochemistry, 60(3), 213-231.
- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J. F., Khadari, B., & Besnard, G. (2012). *Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: Palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East*. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 87(4), 885–899.
- Kaplan, M., & Arihan, S. K. (2012). *Antikçağdan günümüze bir şifa kaynağı: Zeytin ve zeytinyağının halk tıbbında kullanımı*. Ankara Üniversitesi Dil ve Tarih-Coğrafya Fakültesi Dergisi, 52(2), 1-15.

- Kara, S. (2013). *Farklı kurutma yöntemlerinin zeytin yaprağındaki fenolik madde dağılımına ve antioksidan kapasitesine etkisinin araştırılması* (Master's thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Antioksidanlar. *Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University*, 1(1), 65-76.
- Karabulut, H., & Gülay, M. Ş. (2016). Serbest radikaller. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 4(1).
- Karakaya, S. 2004. *Bioavailability of phenolic compounds*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453-464.
- Kaya, S., & Demir, N. (2020). *Zeytin (Olea europaea) yaprağı ekstraktının model organizma galleria mellonella hemosit aracılı bağışıklık tepkileri üzerine etkileri*. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(3), 646-653.
- Khaerunnisa, S., Kurniawan, H., Awaluddin, R., Suhartati, S. and Soetjipto, S. 2020. *Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro) From Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study*. Prepr. Doi 10.20944/preprints202003.0226.v1, 1-14.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., & Kiritsakis, A. (2010). *Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4), 369-376.
- Kocatürk, B., Doğan, S., Bayhan, H., & Diken, M. E. (2022). *Antioxidant and cytotoxic activities of olea europea l. 'domat'*. *Journal of International Scientific Publications*, 332-341.
- Kurtulmuş, H. (2016). *Edremit Körfezi zeytin yapraklarının antioksidan özellikleri ile fenolik ve mineral bileşimleri üzerine mevsim ve yükselti faktörlerinin etkileri* (Master's thesis, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Lee, O. H., Lee, B. Y., Lee, J., Lee, H. B., Son, J. Y., Park, C. S., ... & Kim, Y. C. (2009). *Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities*. *Bioresource technology*, 100(23), 6107-6113.
- Levin, D.A. 1976). *The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores*. *Ann Rev Ecol Syst* 7:121-159.
- Levinson, H.Z. 1976. *The defensive role of alkaloids in insects and plants*. *Experientia* 32:408-411.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K. and Georgiev, M.I. 2017. *Terpenoids*. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- M. Scognamiglio et al., “Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of *Olea europaea* varieties cultivated in Cilento National Park (Italy),” *Food Research International*, vol. 46, no. 1, pp. 294–303, 2012.
- Manna, C., Migliardi, V., Golino, P., Scognamiglio, A., Galletti, P., Chiariello, M., & Zappia, V. (2004). *Oleuropein prevents oxidative myocardial injury induced by ischemia and reperfusion*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(8), 461–466. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.12.010>
- Meltem, A. Y. A. Z., & Varol, N. (2015). *İklim parametrelerindeki değişimlerin (sıcaklık, yağış, kar, nispi nem, sis, dolu ve rüzgar) zeytin yetiştiriciliği üzerine etkileri*. *Zeytin Bilimi*, 5(1), 33-40.

- Menezes, R. C. R., Peres, K. K., Costa-Valle, M. T., Faccioli, L. S., Dallegrave, E., Garavaglia, J., & Dal Bosco, S. M. (2021). *Oral administration of oleuropein and olive leaf extract has cardioprotective effects in rodents: A systematic review*. *Revista Portuguesa de Cardiologia*.
- Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., & Estepa, A. (2005). *The olive leaf extract exhibits antiviral activity against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV)*. *Antiviral research*, 66(2-3), 129-136.
- Mohammadi, N. and Shaghaghi, N. 2020. *Inhibitory effect of eight Secondary Metabolites from conventional Medicinal Plants on COVID_19 Virus Protease by Molecular Docking Analysis*.
- Moosmann, B., & Behl, C. (1999). *The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8867–8872. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.16.8867>
- Moridi Farimani, M., Nejad Ebrahimi, S., Salehi, P., Bahadori, M.B., Sonboli, A., Khavasi, H.R. and Hamburger, M. 2013. *Antitrypanosomal triterpenoid with an ϵ -lactone E-ring from Salvia urmiensis*. *Journal of Natural Products*, 76(9), 1806-1809.
- Mothes, K. 1955. *Physiology of alkaloids*. *Annu Rev Plant Physiol* 6: 393-432.
- Moudache, M., Colon, M., Nerin, C., & Zaidi, F. (2016). Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry*, 212, 521-527.
- Mourtzinou, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., Karathanos, V. T. (2007). *Encapsulation of Olive Leaf Extract in β -Cyclodextrin*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8088-8094.
- Naumann, C., Hartmann, T. and Ober, D. 2002. *Evolutionary recruitment of a flavin-dependent monooxygenase for the detoxification of host plant-acquired pyrrolizidine alkaloids in the alkaloid-defended arctiid moth Tyria jacobaeae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6085-6090.
- Nolan, P. B., Carrick-Ranson, G., Stinear, J. W., Reading, S. A., & Dalleck, L. C. (2017). *Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults: A pooled analysis*. *Preventive Medicine Reports*, 7, 211–215.
- O'Neill, S., & O'Driscoll, L. (2015). *Metabolic syndrome: A closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. *Obesity Reviews*, 16(1), 1–12.
- Omar, S. H. (2010). *Oleuropein in olive and its pharmacological effects*. *Scientia pharmaceutica*, 78(2), 133-154.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307–315.
- Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., & Yönden, Z. (2015). Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(3), 331-336.
- Özeker, E. 1999. *Phenolic compounds and their importance*. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 9(2).
- Özkaya, O., Şen, K., Aubert, C., Dündar, Ö. and Gunata, Z. 2018. *Characterization of the free and glycosidically bound aroma potential of two important tomato cultivars grown in Turkey*. *Journal of Food Science and Technology*, 55(11), 4440-4449.

- Özkaya, O., Yabaci Karaoglan, S., Incesu, M. and Yesiloglu, T. 2019. *The general and volatile properties and the quality of two newly selected Satsuma clones (11/1 Izmir and 30/Izmir) grown under Mediterranean ecological conditions*, Food Science and Technology, 39(2),451-457.
- Paech K. 1950. *Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe*. Springer, Berlin Heidelberg.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Colacicco, A. M., D'Introno, A., Capurso, C., Torres, F., ... Capurso, A. (2004). *Mediterranean diet and cognitive decline*. Public Health Nutrition, 7, 959–963. <https://doi.org/10.1079/ PHN2004561>
- Parikh, R. M., & Mohan, V. (2012). *Changing definitions of metabolic syndrome*. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism, 16(1), 7–12.
- Peker, H. (2012). *Keçiboynuzu gamı kullanılarak az yağlı yoğurt ve zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak fonksiyonel meyveli yoğurt üretimlerinin araştırılması (Master's thesis)*, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). *HPLC–ESI–QTOF–MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts*. Phytochemical Analysis, 24(3), 213-223.
- Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). *HPLC–ESI–QTOF–MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts*. Phytochemical Analysis, 24(3), 213-223.
- Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A., 2015. *Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves*. Trends in Food Science and Technology, 42(2), 150–172.
- Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., 2006. *Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 434–440.
- Rolfe, B.G. and Gresshoff, P.M. 1988. *Genetic analysis of legume nodule initiation*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39: 297-319.
- Rosenthal, G.A. and Janzen, D.H. 1979. *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, London New York.
- Rosillo, M. A., Alcaraz, M. J., Sanchez-Hidalgo, M., Fernandez-Bolanos, J. G., Alarcon-de-la-Lastra, C., & Ferrandiz, M. L. (2014). *Anti-inflammatory and joint protective effects of extra-virgin olive-oil polyphenol extract in experimental arthritis*. Journal of Nutritional Biochemistry, 25(12), 1275–1281. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.07.006>
- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., & Antolovich, M. (1999). *Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from Olea europaea*. Journal of Chromatography A, 855(2), 529–537. [https://doi.org/10.1016/ S0021-9673\(99\)00719-0](https://doi.org/10.1016/ S0021-9673(99)00719-0)
- Salık, M. A., & Çakmakçı, S. (2021). *Zeytin (olea europaea l.) yaprağının fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli*. Gıda, 46(6), 1481-1493.
- Sargın, S., Öngen, G., Tetik, D., & Timur, K. Ö. S. E. *Sofralık yeşil zeytin işlemede β -glukozidaz enziminin kullanımı*. Akademik Gıda, 3(2), 11-15.

- Schildknecht, H. 1977. *Protective substances of arthropods and plants*. Pontif Accad Sci 3: 59-107.
- Scognamiglio, M., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Fiumano, V., De Luca, P. F., Monaco, P., & Fiorentino, A. (2012). *Polyphenol characterization and antioxidant evaluation of Olea europaea varieties cultivated in Cilento National Park (Italy)*. *Food Research International*, 46(1), 294-303.
- Seigler, D.S. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Springer, US.
- Shahidi, F. and Naczk, M. 1995. *Methods of analysis and quantification of phenolic compounds*. Food phenolic: Sources, chemistry, effects and applications, 287-293.
- Shahidi, F. and Naczk, M. 2003. *Phenolics in food and nutraceuticals*. CRC press.
- Shan, C., & Miao, F. (2022). *Immunomodulatory and antioxidant effects of hydroxytyrosol in cyclophosphamide-induced immunosuppressed broilers*. *Poultry Science*, 101(1), 101516.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Christian, M.S., Bitler, C.M., Crea, R., 2006. *Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods*. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 903-915.
- Souilem S, Fki I, Kobayashi I, Khalid N, Neves MA, Isoda H, Sayadi S, Nakajima M. 2017. *Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries*. *Food and Bioprocess Technology*, 10(2): 229-248.
- Stahl, E. 1888. *Pflanzen und Schnecken*. Jena Z Naturwiss 22,557.
- Sudjana, A. N., Orazio, C. D., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., & Islam, N. (2009). *Antimicrobial activity of commercial Olea europaea (olive) leaf extract*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 461–463.
- Şahin, S., Şamlı, R., 2013. *Ultrasonics sonochemistry optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595–602.
- Tarbiat, S., Yener, F. G., Kashefifahmian, A., & Mohseni, A. R. (2022). *Antiaging Effects of Oleuropein Combined with Helichrysum Italicum or Kumquat Essential Oils in Cosmetic Lotions*. *Current Topics in Nutraceutical Research*, 20(2).
- There is a EFSA approved health claim on olive oil polyphenols (Commission Regulation (EU) 432/2012)
- Tiring, G., Satar, S. and Özkaya, O. 2020. *Use of Monoterpenes in the Control of Bark Beetles (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae) in Forest Areas*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(7), 1522-1527.
- Tokuşoğlu, Ö., Alpas, H., & Bozoğlu, F. (2010). *High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives*. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(2), 250-258.
- Tokuşoğlu, Ö., Alpas, H., & Bozoğlu, F. (2010). *High hydrostatic pressure effects on mold flora, citrinin mycotoxin, hydroxytyrosol, oleuropein phenolics and antioxidant activity of black table olives*. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(2), 250-258.
- Topuz, S. (2019). *Farklı zeytin çeşidi yapraklarından oleuropeinin ekstraksiyonu, kısmi saflaştırılması, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi* (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).

- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2019. *Türkiye zeytin ağacı sayısı ve zeytin üretimi*.
<https://data.tuik.gov.tr/Search/Search?text=zeytin&dil=1>
- Türköz, G., Baydar, T., Sözbilen, M., & Hışıl, Y. (2008). *Oleuropein ve ekstraksiyon yöntemleri*. I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi, 17-18.
- uygulaması. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(2), 104-110.
- Ünver, D. (2021). *Piper cubeba*'de yer alan fitokimyasalların izolasyonu, karakterizasyonu ve *in-vitro* alzheimer modelinde koruyucu etkisinin incelenmesi (Master's thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Villano D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. *Talanta*, 71(1): 230-235.
- Yamankaradeniz, R., 1981. *Beslenme ve sağlık yönünden meyvelerin önemi*. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12(1), 183-193.
- Yıldız, G., & Uylaşer, V. (2011). *Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein*. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1), 131-142.
- Yoon, S. K. (2018). *Oleuropein as an antioxidant and liver protect*. In *The Liver, Oxidative Stress and Dietary Antioxidants* (pp. 323–335). XXX: XXX. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803951-9.00027-6>
- Yu, Q., Gan, H., Feng, N., Li, Y., & Han, Y. (2021). *Hydroxytyrosol magnetic molecularly imprinted polymers as the sorbent for solid-phase extraction for selective recognition of hydroxytyrosol from Chinese olive leaves*. *Materials Today Communications*, 29, 102992.
- Yurtoğlu, N. (2019). *Türkiye Cumhuriyeti'nde zeytin ve zeytinyağı üretimi ile ticareti üzerine tarihsel bir bakış (1923-1960)*. *Vakanüvis-Uluslararası Tarih Araştırmaları Dergisi*, 4(1), 472-510.
- Zinkel, D.F. and Russell, J. 1989. *Naval Stores: Production, Chemistry, Utilization*. (New York: Pulp Chemicals Association).