

**PİRİNA ve ZEYTİN YAPRAĞINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI
ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU**

Göksu GENÇTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berrin BOZAN

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Eylül 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Göksu GENÇTÜRK'ün PİRİNA ve ZEYTİN YAPRAĞINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU başlıklı tezi 12/09/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Kimya Mühendisliği Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye

:

Prof. Dr. Berrin BOZAN

Üye

:

Doç. Dr. Alev Akpınar BORAZAN

Üye

:

Dr. Öğr. Üyesi Emir Zafer HOŞGÜN

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

DANIŞMAN ONAYI

DaniŐmanlıđını yuruttuğum yuğsek lisans oğrencisi Goksu GENÇTÜRK, PİRİNA ve ZEYTİN YAPRAĞINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU başlıklı tez çalıŐmasını tamamlamıŐtır. HazırlamıŐ olduğu tez tarafımda incelenmiŐ ve oğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez DaniŐmanı
Prof. Dr. Berrin BOZAN

ÖZET

ZEYTİN PİRİNASI ve ZEYTİN YAPRAĞINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU

Göksu GENÇTÜRK

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Temel İşlemler ve Termodinamik Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Eylül 2022

Danışman: Prof. Dr. Berrin BOZAN

Bu çalışmanın amacı; basınçlı solvent ekstraksiyon yöntemi ile zeytinin üretim süreci atıkları olan pirina ve zeytin yaprağından polifenollerin geri kazanılmasıdır. Çözücü olarak %50 etanol kullanılarak, 1500psi basınçta basınçlı sıvı ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve pH), Oleuropein ve fenolik bileşiklerin kalitesi ve miktarı ile DPPH radikal süpürme aktivitesi üzerindeki etkisi, yanıt yüzeyi deneysel tasarımı kullanılarak araştırılmıştır. Sonuçlar ekstraksiyon veriminin zeytin yaprağında %22,55-36,5 pirinada %2,54-17, toplam fenol veriminin zeytin yaprağında %9,77-41,52 pirinada %0,5-4,68, toplam flavonoid veriminin zeytin yaprağında %1,42-6,19 pirinada %0,25-1,92 arasında değiştiğini göstermiştir. 11,24µg yaprak ekstresi/ml (EC₅₀) olarak en yüksek DPPH süpürme potansiyeli ile 75°C, pH 4,5 ve 22,5 dakikalık zeytin yaprağı ekstraksiyon koşulunda elde edilmiştir. Toplam fenol verimleri hem yaprakta hem de pirinada sıcaklık arttıkça artmış, ekstraksiyon zamanı fenolik bileşenler üzerine negatif etki göstermiş ve pH 4-5 aralığında maksimuma ulaşmıştır.

Anahtar Kelimeler: Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu, Pirina, Zeytin yaprağı, Zeytinyağı proses atığı, Polifenol, Antioksidan aktivite.

ABSTRACT

PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION OF POLYPHENOLS FROM OLIVE LEAF AND OLIVE POMACE

Göksu GENÇTÜRK

Department of Chemical Engineering

Programme in Unit Operations and Thermodynamics

Eskişehir Technical University, Graduate School of Sciences, September 2022

Supervisor: Prof. Dr. Berrin BOZAN

The aim of this study was to obtain polyphenols from Pirina and olive leaves by pressurized solvent extraction method. Using 50% ethanol as solvent and an extraction pressure of 1500psi, the influence of the parameters of pressurized liquid extraction parameters (temperature, extraction time, and pH) on the quality and quantity of oleuropein and phenolic compounds, as well as on the activity of DPPH radical scavenger was studied by response surface design. The results showed that the extraction yield varied between 22.55-36.5% for olive leaves and 2.54-17% for pirina, the total phenolic yield varied between 9.77-41.52% for olive leaves and 0.5-4.68% for pirina, and the total flavanol yield varied between 1.42-6.19% for olive leaves and 0.25-1.92% for pirina. The highest DPPH scavenging activity of 11.24 μ g leaf extract/ml (EC50) was obtained at 75°C, pH 4.5 and for 22.5 min.

Keywords: Pressurized liquid extraction, Polyphenol, Antioxidant activity, Olive pomace, Olive leaves.

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimim boyunca danışmanlığımı yapan, tez konusunun belirlenmesinden, tezin hazırlanmasına kadar her aşamada emeği geçen sayın hocam Prof. Dr. Berrin BOZAN'a,

Yüksek Lisans eğitimimin her aşamasında benimle yakından ilgilenen ve hiçbir zaman desteğini eksik etmeyen sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Emir Zafer HOŞGÜN'e,

Hayatımın her döneminde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman benim yanımda olan annem Hacer GENÇTÜRK, babam Nezih GENÇTÜRK ve ablam Aysun GENÇTÜRK'e en içten duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Göksu GENÇTÜRK

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı” ile tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Göksu GENÇTÜRK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
PİRİNA ve ZEYTİN YAPRAĞINDAN POLİFENOLLERİN BASINÇLI ÇÖZÜCÜ EKSTRAKSİYONU	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	ii
DANIŞMAN ONAYI	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜRLER	vi
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. ZEYTİN AĞACI	3
2.1. Zeytin Yaprağı	4
2.2. Zeytin Pirinası	6
2.3. Zeytin Ağacında Bulunan Biyoaktif Bileşikler	8
2.3.1. Sekoiridoidler	8
2.3.1.1. Basit sekoiridoidler	9
2.3.1.2. Konjuge sekoiridoidler	10
2.3.1.3. 10-Oleosid sekoiridoidlerin oksitürevi	10
2.3.1.4. Z-Sekoiridoidler	10
2.3.1.5. Secologanosidler ve oksitlenmiş sekologanosid sekoiridoidler	10
2.3.2. Polifenoller	11
2.3.3. Fenolik asit ve türevleri	12

2.3.4. Flavonoidler	14
2.3.4.1. Flavanoller	15
2.3.4.2. Flavonoller	18
2.3.4.3. Flavonlar	19
2.4. Oleuropein	20
2.4.1. Oleuropein ve sağlık	22
2.4.1.1. Antioksidan aktivite.....	22
2.4.1.2. Anti-inflamatuar	23
2.4.1.3. Anti-kanser etki.....	23
2.4.1.4. Antimikrobiyal etki.....	24
2.4.1.5. Antiviral etki	24
2.4.1.6. Cilt koruyucu.....	25
2.4.1.7. Yaşlanma karşıtı	25
2.4.1.8. Nöroprotektif aktivite.....	26
2.4.1.9. Anti-aterojenik ve kardiyoprotektif etki	26
2.4.1.10. Diğer aktiviter	27
2.5. Hidroksitirozol.....	27
2.5.1. Hidroksitirozol ve sağlık	28
2.5.1.1. Antioksidan aktivite.....	28
2.5.1.2. Anti-inflamatuar	29
2.5.1.3. Anti-kanser aktivite	29
2.5.1.4. Antimikrobiyal etki.....	29
2.5.1.5. Antiviral etki	30
2.5.1.6. Cilt koruyucu.....	30
2.5.1.7. Nöroprotektif aktivite.....	31
2.5.1.8. Anti-aterojenik ve kardiyoprotektif etki	31
2.5.1.9. Antifungal etki.....	31

2.5.1.10. Obezite	31
2.5.1.11. Diğer aktiviteler	32
3. EKSTRAKSİYON	33
3.1. Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyon	33
3.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu	34
3.2.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyonu nedir?.....	34
3.2.1.1. Sıcaklık.....	35
3.2.1.2. Basınç	35
3.2.1.3. Çözücü bileşimi	36
3.2.1.4. Statik ekstraksiyon döngüleri	36
3.2.2. Basınçlı çözücü ekstraksiyon prosesi nasıl çalışır?.....	36
3.3. Zeytin Pirinasi ve Yaprağının Ekstraksiyonu ile İlgili Yapılmış Çalışmalar	38
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
4.1. Hammadde.....	42
4.2. Öğütme.....	42
4.3. Pirina ve Zeytin Yaprağından Polifenolik Maddelerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu.....	42
4.4. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı	43
4.5. Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi	45
4.5.1. Toplam fenolik (TP) bileşen tayini.....	45
4.5.2. Toplam flavonoid miktarı analizi.....	46
4.5.3. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayini.....	47
4.5.4. Yüksek basınçlı çözücü kromatografisi ile leuropein miktar tayini	48
5. DENEYSEL BULGULAR	50
5.1. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı ile Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu	50
5.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Zeytin Yaprağının ve Pirinanın Ekstre Verimi Üzerine Etkisi	50

5.2.1. Zeytin yaprağı ekstraksiyon verimine etkisi.....	50
5.2.2. Pirina ekstre verimine etkisi.....	55
5.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Bileşen Verimi Üzerine Etkisi	59
5.3.1. Zeytin yaprağının toplam fenolik bileşen verimine etkisi.....	59
5.3.2. Pirinanın toplam fenolik bileşen verimine etkisi	63
5.4. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Flavonoid Verimi Üzerine Etkisi	67
5.4.1. Zeytin yaprağının toplam flavonoid verimine etkisi	67
5.4.2. Pirinanın toplam flavonoid verimine etkisi.....	71
5.5. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite (EC₅₀, µg/ml) Üzerine Etkisi	75
5.5.1. Yaprak ekstresindeki dpph serbest radikal süpürücü aktivite (EC ₅₀ , µg/ml).....	75
5.5.2. Pirina ekstresindeki dpph serbest süpürücü aktivite (EC ₅₀ , µg/ml).....	79
5.6. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Zeytin Yaprağı Ekstresinde Oleuropein Üzerine Etkisi	83
5.6.1. Yaprak ekstresindeki oleuropein miktarına etkisi.....	83
5.6.2. Ekstraksiyon parametrelerinin zeytin yaprağından oleuropein verimine etkisi	87
6. TARTIŞMA VE YORUM.....	91
KAYNAKÇA.....	100
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Zeytinin bilimsel sınıflandırılması.	3
Çizelge 2.2. Bitkilerde mevcut olan fenolik bileşiklerin karbon atomu sayısına göre ana sınıfları.	11
Çizelge 2.3. Gıda kaynaklarındaki flavonoidlerin alt sınıfları.	15
Çizelge 4.1. Basınçlı Çözücü ekstraktöründe çalışılan parametreler.	43
Çizelge 4.2. Ekstraksiyon çalışmasında incelenen parametreler ve seviyeleri.....	44
Çizelge 4.3. Ekstraksiyon çalışmasında bağımsız değişken istatistiksel kombinasyonu. .	45
Çizelge 5.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstre verimine etkisi. .	51
Çizelge 5.2. Yaprak ekstre verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	52
Çizelge 5.3. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstre verimine etkisi. ..	56
Çizelge 5.4. Pirina Ekstre verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	56
Çizelge 5.5. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki toplam fenolik bileşen verimine etkisi.	60
Çizelge 5.6. Yaprak toplam fenol verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	60
Çizelge 5.7. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstresindeki toplam fenolik bileşen verimine etkisi.	64
Çizelge 5.8. Pirina Ekstresindeki toplam fenol verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	64
Çizelge 5.9. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki toplam flavonoid verimine etkisi.	68
Çizelge 5.10. Yaprak Ekstresindeki toplam flavonoid verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	68
Çizelge 5.11. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirinadan toplam flavonoid verimine etkisi.	72
Çizelge 5.12. Pirina Ekstresindeki toplam flavonoid verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	72
Çizelge 5.13. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi.	76
Çizelge 5.14. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	76

Çizelge 5.15. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstresindeki DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi.	80
Çizelge 5.16. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	80
Çizelge 5.17. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının ekstredeki Oleuropein miktarına etkisi.....	84
Çizelge 5.18. Oleuropein miktarı için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	84
Çizelge 5.19. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının Oleuropein verimine etkisi. ..	88
Çizelge 5.20. Oleuropein verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.	88
Çizelge 6.1. Model eşitliklerine ait istatistik verileri.	96
Çizelge 6.2. Minitab istatistik programı ile maksimum cevapların (EC ₅₀ için minimum) elde edilebilmesi için parametrelerin optimizasyonu.....	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Zeytin yaprağının kimyasal içeriği.....	6
Şekil 2.2. Zeytinde bulunan biyoaktif bileşikler.....	8
Şekil 2.3. Genel sekoiridoid iskeler yapısı.	9
Şekil 2.4. Oleaceae familyasının bitkilerinden izole edilen basit sekoiridoid yapıları.....	9
Şekil 2.5. Fenolik asitlerin genel yapısı; A) Benzoik asit türevleri, B) Sinamik asit türevleri.	13
Şekil 2.6. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı. Üç halka normal olarak kabul edilir ve A, B ve C harfleriyle etiketlenir. Heterosiklik halka, C olarak etiketlenir. Oksijen atomu, ilk konum olarak numaralandırılmıştır ve kalan karbon atomları, C2'den C10'a kadar.	14
Şekil 2.7. Monomerik birim olan kateşin ve epikateşin.	16
Şekil 2.8. Proksiyanidinler.....	17
Şekil 2.9. Flavonollerin temel kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.10. Quercetin'in kimyasal yapısı.	18
Şekil 2.11. Flavonol örnekleri.	19
Şekil 2.12. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı.....	19
Şekil 2.13. Flavonların temel kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.14. Apigenin ve Luteolin'in kimyasal yapısı.	20
Şekil 2.15. Oleuropein'in hidroksitirosol'e hidrolizi.....	21
Şekil 2.16. Hidroksitirosol'ün kimyasal yapısı.	27
Şekil 3.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon cihazı.	35
Şekil 3.2. Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu çalışma şeması.	37
Şekil 4.1. Gallik asitin toplam fenol analizi kalibrasyon eğrisi.	46
Şekil 4.2. Quercetin toplam flavonoid analizi kalibrasyon eğrisi.....	46
Şekil 4.3. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.	47
Şekil 4.4. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi.....	48

Şekil 4.5. Oleuropein kalibrasyon eğrisi	49
Şekil 4.6. Oleuropein standartının (A) ve yaprak ekstresinin (B) HPLC kromatogramları.....	49
Şekil 5.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstre verimine tekli ve ikili etkileri.	53
Şekil 5.2. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	54
Şekil 5.3. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin pirinanın ekstre verimine tekli ve ikili etkileri.	57
Şekil 5.4. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstre verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	58
Şekil 5.5. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g yaprak) tekli ve ikili etkileri.	61
Şekil 5.6. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak ekstresindeki toplam fenolik bileşik verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.....	62
Şekil 5.7. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g pirina) tekli ve ikili etkileri.....	65
Şekil 5.8. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstresindeki toplam fenol miktar verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	66
Şekil 5.9. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam flavonoid verimine (mg Quercetin/g yaprak) tekli ve ikili etkileri.	69
Şekil 5.10. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak ekstresindeki toplam flavonoid verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri. 70	
Şekil 5.11. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam flavonoid verimine (mg Quercetin/g pirina) tekli ve ikili etkileri.....	73
Şekil 5.12. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstresindeki toplam flavonoid verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri. 74	
Şekil 5.13. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine tekli ve ikili etkileri.	77
Şekil 5.14. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	78
Şekil 5.15. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine tekli ve ikili etkileri.	81
Şekil 5.16. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	82
Şekil 5.17. Basınçlı Çözücü ekstraksiyon parametrelerinin Oleuropein miktarına tekli ve ikili etkileri.....	85

Şekil 5.18. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin Oleuropein miktarı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	86
Şekil 5.19. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin Oleuropein verimine tekli ve ikili etkileri.....	89
Şekil 5.20. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin Oleuropein verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.	90
Şekil 6.1. Yaprak ekstresinin DPPH aktivitesinin ekstredeki toplam fenolik bileşen miktarı ile değişimi.	94
Şekil 6.2. Pirina ekstresinin DPPH aktivitesinin ekstredeki toplam fenolik bileşen miktarı ile değişimi.	94
Şekil 6.3. DPPH aktivitesinin ekstredeki Oleuropein miktarı ile değişimi.	95



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DPPH	:	2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz Enzimi
İNOS	:	İndüklenebilir Nitrik Asit Sentaz Enzimi
AIDS	:	Kazanılmış Bağışıklık Yetersizliği Sendromu
HIV	:	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
UVB	:	Ultraviyole B
DNA	:	Deoksiribo Nükleik Asit
ROS	:	Reaktif Oksijen
A β	:	Amiloid Beta Peptidi
BHT	:	Bütillenmiş Hidroksitoluen
LDL	:	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
ATCC	:	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
°C	:	Celcius
HCl	:	Hidroklorik Asit
HNO ₃	:	Nitrik Asit
H ₂ SO ₄	:	Sülfürik Asit
μ m	:	Mikrometre
GA	:	Gallik Asit
AlCl ₃	:	Alüminyum Klorür
DAD	:	Diode Array Dedektör
TF	:	Fenolik Bileşen
TFL	:	Toplam Flavonoid
R ²	:	Lineer İlişki Katsayısı
YE	:	Yaprak Ekstre
PE	:	Pirina Ekstre
Y	:	Zeytin Yaprığı
P, OP	:	Zeytin Pirinası

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda bitkilerde bulunan aktif maddeleri oluşturan fenolik bileşiklerin araştırılmasına yönelik ilginin arttığı gözlemlenmiştir. Bunun başlıca nedeni, insan beslenmesinde bol miktarda bulunmaları ve kanser, kardiyovasküler, nörodejeneratif ve oksidatif stresle ilişkili enflamatuvar hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların önlenmesindeki olası rolleridir. Hem tüketicilerin hem de gıda ve ilaç sektörünün de bu konuya ilgi duyması dikkat çekicidir. Antioksidan özelliklerine ek olarak, polifenoller, çok çeşitli enzimlerin ve hücre reseptörlerinin aktivitesinin modülasyonu ve birkaç hücre zarı taşıyıcısının aktivitesi ve ekspresyonu ile etkileşim gibi başka spesifik biyolojik etkilere de sahiptir [1]. Bu bileşikler, kimyasal yapılarına göre farklılaşan heterojen bir molekül grubu oluşturur ve yapılarının önemli çeşitliliği nedeniyle polifenoller, diğer antioksidanlardan bile daha etkili olarak kabul edilir [2].

Zeytin (*Olea europaea L.*), Akdeniz bölgesinden yayılan yaygın bir bitkidir. Akdeniz bölgesindeki uygarlık tarihi boyunca zeytin yaprağı halk hekimliğinde kullanılmış ve meyvesi kendine özgü lezzeti ve besleyiciliği ile dünya çapında değer verilen “sıvı altın” olarak adlandırılan zeytinyağının üretilmesine hizmet etmiştir [3]. Zeytin ağacı, dünyada başta Avrupa olmak üzere (%65), Asya (%16) ve Afrika (%15)’da en çok üretilen zirai ürünlerden biridir. Zeytinin işlenmesinden sonra genellikle atılan yaprak ve pirina, ekonomik ve sürdürülebilir bir hammaddedir. Bu hammaddenin gıda ve nutrasötik ürünlerde endüstriyel olarak değerlendirilebilmesi hem atıkların giderilmesi hem de katma değerli ürün üretilmesi açısından önemlidir [4].

Zeytin, içeriğindeki tekli doymamış yağ asitleri ve (poli)fenoller ve pentasiklik triterpenler gibi biyoaktif bileşenler nedeniyle sağlıklı bir gıda olarak kabul edilmektedir [3]. Zeytin ağacı, zeytin meyvesi, zeytinyağı ve zeytin işleme yan ürünlerinde (zeytin ağacı yaprakları ve zeytin pirinası) bulunan triterpenler ve fenolik bileşikler güçlü serbest radikal süpürme kapasitelerine sahiptirler ve oksidatif hasarlara ve hücresel yaşlanmaya karşı korumada önemli bir rol oynarlar. Zeytin yan ürünlerinden elde edilen ekstraktlar lipid oksidasyonunu önleme ve gıdalara besleyici değer katma yeteneği ile gıda koruyucuları olarak da kullanılabilir [4].

Bitkilerden biyolojik olarak aktif bileşenlerin eldesi için kullanılan ayırım işlemi katı-sıvı ekstraksiyonudur. Her bitki materyalinde farklı yapıda ve miktarda aktif bileşen bulunduğundan, çözücü ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Ekstraksiyonun başarısı yüksek ekstraksiyon veriminin yanında, ekstre edilecek aktif

bileşiklerin stabilitesi ve aktivitesi üzerindeki etkisine bağlıdır ve ekstraksiyon tipi, pH, çözücü, sıcaklık ve ekstraksiyon süresi gibi çok sayıda proses parametresinden etkilenir. Bu nedenle, ekstraksiyon sırasında aktif bileşiklerin stabilitesini destekleyecek, çevre dostu, verimli ve uygun maliyetli olacak yeni ekstraksiyon teknolojilerin değerlendirilmesi önemlidir. Son yıllarda geleneksel çözücü ekstraksiyon tekniğine göre daha az organik çözücü tüketiminden dolayı, Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu, yeşil ekstraksiyon tekniği olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle zeytin yapraklarından polifenollerin geri kazanılması için umut verici yenilikçi bir ekstraksiyon teknolojisi olarak kabul edilir [4].

Basınçlı Çözücü ekstraksiyonunda (BSE), yüksek sıcaklık ve basınç ekstraksiyonu hızlandırmak için kullanılmakta ve bitkilerden fenolik bileşiklerin hassas olduğu atmosfer ve ışık şartlarından koruyarak ekstraksiyonu gerçekleştirmektedir [5].

Bu çalışmada, pirina ve zeytin yaprakları %50 etanol ile 1500psi basınçta farklı asidik pH, sıcaklık ve ekstraksiyon zamanlarında basınçlı çözücü ekstraksiyonu tekniği ile ekstre edilmiş ve Cevap Yüzey Deney Tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerinin, pirina ve zeytin yaprağında bulunan toplam fenolik bileşen, toplam flavonoid ve ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkileri incelenmiştir.

2. ZEYTİN AĞACI

Zeytingiller (*Oleaceae*) ailesinden gelen zeytin (*Olea europaea*) Akdeniz iklimine özgü ve meyvesi yenen bir bitkidir [6]. Dünya çapında 8 milyondan fazla zeytin ağacı yetiştirilmektedir bunların neredeyse %98'i Akdeniz havzasındadır. Zeytin ağacı, bilinen en eski kültür bitkilerinden biridir [7]. Zeytinin insanlığın ortaya çıkması ile birlikte var olduğu düşünülmektedir ve eski zamanlardan beri zeytin yaprağı sağlık ve barışın sembolü olmuştur [8].

Çizelge 2.1. Zeytinin bilimsel sınıflandırılması [6].

Alem	Plantae
Bölüm	Magnoliophyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	Magnoliopsida (İki çenekliler)
Takım	Lamiales
Familiya	Oleaceae (Zeytingiller)
Cins	Olea
Tür	Olea europae
İkili Adı	Olea europaeal

Zeytin ağacı, zeytingiller ailesinde 24 cins/615-800 tür arasındaki yaprak dökmeyen bir ağaçtır [9]. Zeytin ağacının boyu 10 metreye kadar uzayabilmektedir. Her mevsim yeşil yapraklı olan ağacın dalları sık ve geniştir. Ağacın tacı, boyunun uzamasıyla orantılı olarak her yıl genişler. Zeytin ağacı yapraklarının üst kısmı koyu yeşil, alt kısmı ise gümüş renklidir. Yapraklar müthiş bir ahenk ile dalın iki yanından karşılıklı olarak çıkarlar. Genişliği 40-50cm olan zeytin ağacının gövdesi çürümeye karşı çok dayanıklıdır. Gövdesi yaş aldıkça kalınlaşır ve çatlaklar, bu çatlak ve yumrularla yeni tomurcuklanmalar oluşur ve gövde bu şekilde kendini yeniler. Uzun ömürlü olan bu ağaç 2000 yıl kadar yaşayabilmektedir [10]. İlk büyük mahsulünü vermesi için 8-10 sene geçmesi gerekmektedir ancak 4-6 sene içinde mahsul veren çeşitleri de vardır [11]. Zeytin ağacının verimi değişimlidir yani 1 yıl çok verim verirken bir sonraki yıl verim vermez ya da az verim verir [12].

Zeytin ağacı ülkemizde Ege Bölgesinde (Balıkesir, Manisa, İzmir, Aydın, Denizli, Muğla illerinde), Karadeniz Bölgesinde (Trabzon, Samsun ve özellikle Artvin-Yusufeli

yöresindeki Çoruh vadisinde), Marmara Bölgesinde (Gemlik ve Mudanya), Akdeniz Bölgesinde (Hatay, Adana ve kıyı şeridinde), Güneydoğu Anadolu Bölgesinde (Kahramanmaraş, Nizip, Kilis ve Gaziantep) yetişmektedir [13].

Meyvesi ve yağı için yetiştirilen zeytin ağacının atık gibi düşünülen zeytin çekirdeği ve yaprağı da geleneksel olarak halk hekimliğinde uzun yıllardır kullanılmakta [8]. Aslında, potansiyel sağlık yararları nedeniyle zeytin biyofenolleri, zeytin üreten ülkelerde çevresel bir sorun olan atık ürünlere değer katma fırsatı sunar [14].

2.1. Zeytin Yaprağı

Zeytin ağaçlarının budanması ve meyve hasadı zamanında elde edilen yaprak ile dalların bütünü için 'zeytin yaprağı' terimi kullanılır [15]. Yetişkin bir zeytin ağacının yaprak ömrü 3 sene kadardır, gölgede kalan yaprak ise genellikle 2. senesinde düşer. Zeytin yapraklarını, yeni sezon ve eski sezon olarak ikiye ayırabiliriz. Mevcut yıldaki sürgünün ucuna doğru büyüyenler yeni yapraklar, aynı sürgünün orta ve iç kısımlarında bulunanlar ise olgun yapraklardır. Ortalama yaprak uzunluğu 5-11cm, genişliği de 1-3cm'dir [16].

Yüzyıllardır zeytin yaprakları ve özleri sağlıkla ilişkilendirilmiştir [17]. Zeytin yaprağı ilk defa eski Mısır'da tıbbi olarak kullanıldı [18]. Yapraktan elde edilen yağı mumyalama törenlerinde koruyucu olarak, halk hekimliğinde de ateş ve sıtma gibi diğer hastalıkların tedavisinde kullandılar ve zeytin yaprağı ilahi gücün simgesi oldu [17, 18]. Günümüzde de Akdeniz halkı arasında iyileştirici etkisi olan geleneksel bir bitki çayı olarak ya da çiğnenerek kullanılır [15]. Zeytin yaprağı Akdeniz kültüründe bir halk ilacı olarak grip, soğuk algınlığı, sıtma, şiddetli ishal, diş, kulak, idrar yolları ve cerrahi enfeksiyonların tedavisinde de faydalı olmuştur. Ayrıca bazı çalışmalar zeytin yaprağı özütünün hayvanlarda kan basıncını düşürme ve koroner arterlerdeki kan akışının artırma, aritmiyi hafifletme ve bağırsak kas spazmlarını, solunum yolu enfeksiyonlarını tedavi etme kapasitesine sahip olduğunu belirtti. Ek olarak, yaprak dermatolojik hastalıklar için kullanılmıştır [18].

Epidemiyolojik çalışmalar, Akdeniz ülkelerinde koroner kalp hastalıklarının ve belirli kanser türlerinin düşük olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar da Akdeniz diyetinin insan sağlığına faydalı etkileri olduğu hipotezine yol açmıştır [19]. Akdeniz diyeti, yaşam kalitesini arttırmaya yarayan modern bir beslenme biçimidir [20].

Bitki özleri, bilinen tıbbi özellikleri veya geleneksel kullanım geçmişi olan bitkilerin meyvelerinden, yapraklarından, çiçeklerinden, ağaçlarından, köklerinden, reçinelerinden veya tohumlarından elde edilir. Bitki özlerindeki değerli bileşikler birçok sağlık yararından sorumludur [18]. Bu bileşikler bitkilerde yüksek antioksidan kapasite gösteren bir savunma mekanizması olarak mikroorganizmalara, böcek yaralanmalarına ve UV radyasyonuna karşı yanıt olarak sentezlenen polifenollerdir [15, 18]. Güneş ışığı fenolik bileşiklerin sentezini aktive eder ve bu bileşikler zeytin gibi koyu meyvelerde veya zeytin yaprağı gibi kalın yapraklarda bozulmadan korunmak için depolanır [19]. Zeytin yan ürünleri, antioksidan, anti-inflamatuar ve antimikrobiyal etkilere sahip bol miktarda biyoaktif fenolik bileşikleri içermektedir [21]. Biyofenollerin çok çeşitli biyoaktiviteleri vardır ve zeytin yaprağı özütü kozmetikte, farmasötiklerde, lipid peroksidasyon sürecini geciktirerek gıda raf ömrünü iyileştirmede ve fonksiyonel gıdalar geliştirmek için kullanılabilir [17, 22]. Zeytin yapraklarında tanımlanan ana bileşikler basit fenolikler, flavonoidler ve sekoiridoidler sınıfındadır [23].

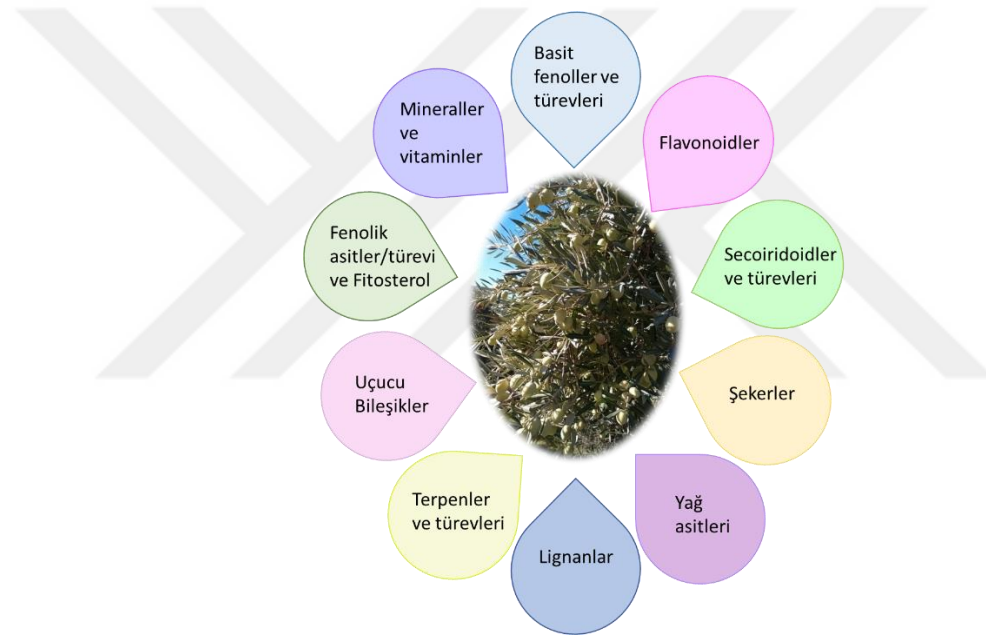
Tüketicilerin daha sağlıklı yiyeceklere olan talebinin artmasıyla birlikte endüstri ve bilim dünyası, yiyecek ve içecekler için yeni fonksiyonel içerikler üretmeye başlamıştır [21]. Zeytin yapraklarının biyolojik aktivitesi, onların fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak kabul edilmelerini sağlar [24]. Zeytin bitkisinin yaprakları, zeytin meyvesi ve yağından çok daha yüksek konsantrasyonda fenolik bileşikler içerir (1450mg toplam fenolik/ 100g taze yaprak ve 110mg/100g meyve ve 23mg/100ml zeytin yağı) [25].

Yapraklardan biyoaktif bileşenlerin geri kazanılmasına olan ilgi son yıllarda artmıştır [26]. Bu durum nedeniyle zeytin ağaçlarının ekonomik önemi de artmıştır [19].

Zeytinyağının insan sağlığı için faydaları iyi bilindiğinden önümüzdeki yıllarda tüketiminde (ve buna bağlı olarak üretiminde) sürekli bir artış olması beklenmektedir [21]. Ancak zeytin ağacı yetiştiriciliği ve zeytin yağı ekstraksiyonu her yıl önemli miktarlarda yan ürünlerin oluşmasına da neden olmaktadır [6]. Oluşan bu yan ürün kalıntıları yüksek toksisiteleri ve biyolojik bozulmaya karşı dirençleri nedeniyle arıtılmadan deşarj edildiklerinde çevre üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir [21]. Neyse ki, zeytin yaprakları daha karlı ve çevre dostu başka amaçlar için kullanılabilir. Bu nedenle, zeytin yaprağı sadece bir yan ürün olarak değil, aynı zamanda bu tür bileşiklerin mükemmel bir kaynağı olarak kabul edilir [27]. Zeytin yaprağının yüksek katma değerli ürünlerin üretimi için bol, yenilenebilir ve düşük maliyetli bir kaynak olarak kullanılması,

ek gelir elde etmek, uzun vadeli üretim maliyetlerini azaltmak ve sürdürülebilir bir üretim zincirinin geliştirilmesine katkıda bulunmak için güvenli bir alternatiftir [26].

Zeytin ağacının yapraklarına ya zeytin bahçesinden ya da tarımsal ve endüstriyel yan ürünlerden sonra kalan atığa kolayca ulaşılır [28]. Budamadan elde edilen zeytin yaprağının zeytin ağacı başına 25kg olduğu tahmin edilirken, yağ değirmeninde toplanan hasat edilmiş zeytinlerin ağırlığının %5'ine ek olarak, zeytinyağı endüstrilerine gelen zeytinlerin toplam ağırlığının yaklaşık %10'u zeytin yaprağıdır [29]. Şu anda tüm dünyada 8 milyon hektardan fazla alanı kaplayan yaklaşık 900 milyon zeytin ağacı bulunmaktadır ve bunların yaklaşık %98'i Akdeniz ülkelerindedir [19].



Şekil 2.1. Zeytin yaprağının kimyasal içeriği [29].

2.2. Zeytin Pirinası

Pirina zeytinyağının elde edilmesiyle arta kalan bir ürün olması sebebiyle pirinanın üretildiği yer zeytinyağı fabrikası olmaktadır [30]. Zeytinyağı üretimi sonucu oluşan atıklar, sıvı atık ve katı atık olarak ikiye ayrılmaktadır. Sıvı atıklar yıkama suyu ve karasu, katı atıklar ise pirina olarak adlandırılmaktadır [31]. Natürel pirina, değirmende işlenen zeytinlerin toplam ağırlığının %35-40'ını temsil eden zeytinyağı üretiminin en bol yan ürünüdür [32]. Zeytin posası (OP), zeytinyağı üretim sürecinin katı atığıdır ve esas olarak zeytin çekirdekleri, zeytin kabuğu, su, küspe ve yağdan oluşur [12].

Katı ve sıvı Zeytin Değirmeni Atıkları koyu renkli atıklardır ve yüksek miktarda organik madde içerirler [11]. Bu nedenle, bu kalıntıların uygun kullanımı, zeytinyağı üreticilerinin ekonomik durumunu olumlu yönde etkileyebilir ve çevreye olan olumsuz etkiyi azaltabilir [33].

Zeytin prinası, Akdeniz bölgesindeki en kirletici tarımsal yan ürünlerden biri olan zeytin kabuğunu ve zeytin atık suyunu içerir [21]. Özellikle zeytinyağı üretiminin yüksek olduğu bölgelerde pirina üretim miktarı yüksektir [12]. Zeytinyağı üretiminin en önemli çıktılarından biri olan pirina, çevre dostu bir sistem olmasına rağmen yüksek fenolik ve yağ asitlerinin içeriği nedeniyle fitotoksik olarak kabul edilmektedir [34, 35]. Ayrıca toprak kalitesini etkilerler, bitki yaşamı için toksiktirler ve toprağa atıldıklarında koku rahatsızlığı yaratırlar [11].

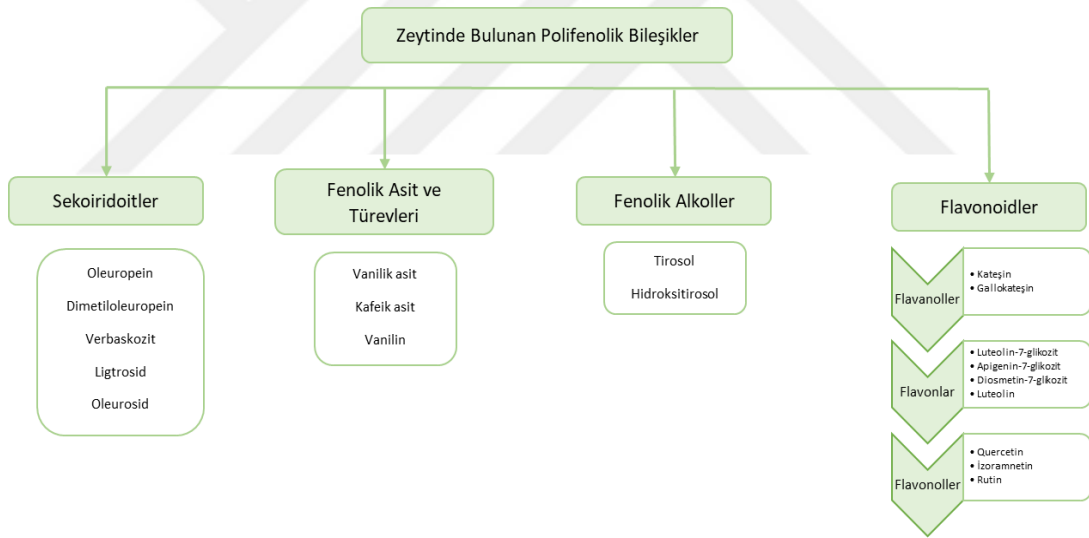
Çıkarılan zeytin pirinası genellikle zeytin pirina yağı çıkarma tesislerinde ve zeytin değirmenlerinde doğrudan yakma için katı biyoyakıt olarak veya tesislerde kullanan diğer biyokütle yakıtlarıyla kullanılan, değeri bilinmeyen bir kalıntıdır [36]. Pirina çok yönlü kullanılabilir bir proses yan ürünüdür. Gerçekte pirinanın değerli bir madde olması nedeniyle pek çok bilim adamı bu maddeye “atık” yerine “artık” ifadesini kullanmaktadır [37]. Pirinanın fenolik açısından zenginliği ve insan sağlığı açısından önemi göz önüne alındığında, bu doğal mevcut kaynağın değerlendirilmesi gerekmektedir [35]. Zeytin pirinasından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, bu atık fraksiyonunun neden olabileceği çevresel zararı bir miktar sınırlama potansiyeline sahiptir ve hatta zeytinyağı üreticileri için ek bir gelir kaynağı sağlayabilir [38]. Bu nedenle fenolik bileşiklerin geri kazanılması sadece ekonomik bir fırsat sağlamakla kalmaz, aynı zamanda atık suyun çevresel yükünü de azaltır [39].

Günümüzde tüketiciler, yapay muadillerine göre daha güvenli kabul edildikleri için gıda ürünlerine eklenecek doğal katkı maddelerini tercih etmektedirler. Fenolik bileşikler, bu katkı maddelerinin bazılarının değiştirilmesinde kullanılacak umut verici biyoaktif moleküller olarak kabul edilir [40]. Polifenoller özellikle bol miktarda bulunur, çünkü bunların sadece %2'si üretim sırasında zeytinyağına aktarılır ve geri kalanı pirinada tutulur, bu da onu ilginç bir fenolik bileşik kaynağı haline getirir. Fenolik bileşikler, pirinadaki ana antioksidan bileşiklerdir [33]. Pirina yüksek fenolik bileşik içeriği nedeniyle ekonomik ve doğal bir antioksidan kaynağı olabilir [39]. Zeytin pirinasından elde edilen fenolik bileşikler, toksik olmadıkları düşünüldüğünden, biyoaktif özellikler sağlamak ve gıda ürünlerine ek değer getirmek için uygun adaylar olabilir [40].

Pirina yaklaşık olarak %75-80 kuru madde, %3-5 kül, %35-50 selüloz, %5-10 protein ve %8-15 ham yağ içeriğine sahiptir. Zeytinyağı üretimi sırasında 100kg zeytinden ortalama 15-22kg zeytinyağı, 35-45kg pirina; 100kg pirinadan ise ortalama 6-7,5kg pirina yağı ve 60-70kg kuru pirina elde edilmektedir. Geleneksel ve modern sistemlerde elde edilen pirinalar sırasıyla %25-30 ve %45-55 nem içeriğine sahip olmakla birlikte modern sistemlerde elde edilen pirina daha az yağ içermektedir [41].

2.3. Zeytin Ağacında Bulunan Biyoaktif Bileşikler

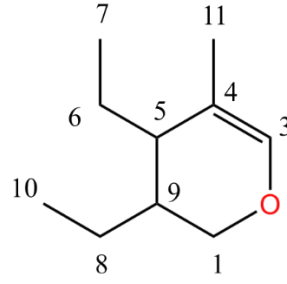
Zeytin yaprağında ve pirinada bulunan fenolik asitler, fenolik alkoller ve flavonoidler çeşitli botanik ailelere ait birçok meyve ve sebze bulunurken, sekoiridoidler sadece *Olea europaea* L.'yi içeren Oleaceae familyasına ait bitkilerde bulunur [42]. *O. europaea* L. bitkisinin yapraklarında, meyvelerinde ve çekirdeklerinde bulunan fenolik bileşiklerin çeşidi ve miktarı farklılık gösterebilmektedir [13].



Şekil 2.2. Zeytinde bulunan biyoaktif bileşikler [13].

2.3.1. Sekoiridoidler

Sekoiridoidler, siklometen oksim bileşiklerinin C-7 ve C-8'de bölünmesiyle oluşturulan siklopentan monoterpen türevlerindeki bir bileşik sınıfıdır (7,8-sekosiklopenta[c]-piranoid iskeletine dayalı monoterpenoidler) [43].

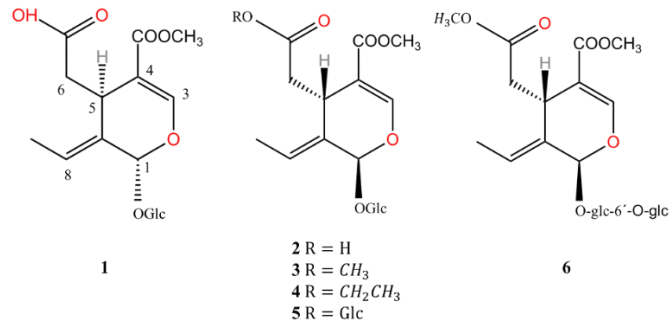


Şekil 2.3. Genel sekoiridoid iskeleler yapısı [43].

Oleaceae familyasının 9 cinsinden izole edilmiş toplam 232 sekoiridoid (glikozitler, aglikonlar, türevler ve dimerler) izole edilmiştir. Bu cinsler Fontanesia, Fraxinus, Jasminum, Ligustrum, Olea, Osmanthus, Phillyrea, Picconia ve Syringa'yı içerir. Bu sekoiridoitler, sekoiridan iskeletlerinde bulunan karbon sayılarına ve oksidasyon derecelerine göre basit sekoiridoidler, konjuge sekoiridoidler, oleosit sekoiridoidlerin 10-oksitürevi, Z-sekoiridoidler, sekologanosidler ve oksitlenmiş sekologanosid sekoiridoitler olmak üzere 5 gruba ayrılmaktadır [43].

2.3.1.1. Basit sekoiridoidler

Genel olarak, basit sekoiridoidler, C-7 ve C-11 pozisyonları ya serbest bir karboksilik asit grubuna ya da asidin bir metil etil ester türevine sahiptir. Ek olarak, C-1 ve C-5 konumlarının konfigürasyonları S'dir. Ancak jaspolisidin (1) C-1 ve C-5 konumlarının konfigürasyonları R'dir [43].



Şekil 2.4. Oleaceae familyasının bitkilerinden izole edilen basit sekoiridoid yapıları [43].

2.3.1.2. Konjuge sekoiridoidler

Bu bileşik grubu, Oleaceae familyasından izole edilen sekoiridoidlerin çoğunluğunu oluşturur. Sınıfın adı, sekoiridoid çekirdeğe bağlı veya konjuge olan bileşik türünden kaynaklanmaktadır. Buna dayanarak, sınıf ayrıca aromatik-konjuge, şeker-konjuge, terpen-konjuge, siklopentan-konjuge, kumarinle konjuge, lignanlarla konjuge ve diğerleri sekoiridoidler. Konjugasyonların çoğu C-7’de meydana gelir. C-7 pozisyonu genellikle bir karboksilik aside oksitlenir ve farklı gruplarla esterleştirilir. C-8 ve C-9 konumları ile C-8 konumundaki hidrojen arasındaki çift bağ, bir metil grubu ile değiştirilir. Ayrıca, aromatik-konjuge sekoiridoidlerin çoğu aynı zamanda C-11’de ya serbest olabilen ya da 1,2-dihidroksifeniletanol ya da p-hidroksifeniletanol ile esterlenmiş olabilen karboksilik asitlere oksitlenir [43].

2.3.1.3. 10-Oleosid sekoiridoidlerin oksitürevi

Bu sınıf, belirgin yapısal farklılıklara sahip oleosit çekirdeğine sahiptir. C-8 ve C-9 pozisyonları çift bağ olarak bulunur ve C-8 pozisyonundaki hidrojenin yerini bir hidroksi grubu alır veya farklı gruplara sahip bir oksijen atomu tarafından bir ester oluşturulur. Bu gruplar tipik olarak bir asetil ve fenolik kısımlar içerir. Oleaceae familyasından 34 monomerik ve 6 dimerik sekoiridoid glukozit dahil olmak üzere toplam 40 adet oleozid sekoiridoid izole edilmiştir [43].

2.3.1.4. Z-Sekoiridoidler

Oleaceae familyasından izole edilen sadece beş bileşik, Z konfigürasyonunda C-8’de bir çift bağ geometrisine sahiptir [43].

2.3.1.5. Sekologanosidler ve oksitlenmiş sekologanosid sekoiridoidler

Bu sınıftaki bileşiklerin çoğu, sekologanosid çekirdeğine dayanmaktadır. Bu sınıfın benzersiz yapısal özellikleri şunlardır: çoğu bileşikte karbon karbon çift bağının konumu C-8 ve C-10 arasındadır ve C-10’un oksidasyon seviyesi [43].

Oleaceae familyasından, sekologanosidler ve glikozidik olmayan sekologanosidler dahil olmak üzere kırk dört sekologanosid ve oksitlenmiş sekologanosid glikozit izole edilmiştir [43].

2.3.2. Polifenoller

Polifenoller, fenolik maddelerle ilgili kimyasal özelliklere ve güçlü antioksidan özelliklere sahip, yalnızca bitkiler tarafından sentezlenen doğal bileşiklerdir. Bu moleküller veya madde sınıfları esas olarak meyvelerde, sebzelerde, yeşil çayda ve tam tahıllarda bulunur [44].

Diyet fenolikleri veya polifenoller, bitkilerde en çok sayıda ve yaygın olarak dağıtılan doğal ürün gruplarından birini oluşturur. Şu anda 8000'den fazla fenolik yapı bilinmektedir ve bunların arasında 4000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır. Polifenoller kimyasal olarak fenolik yapısal özelliklere sahip bileşikler olarak nitelendirilse de bu doğal ürünler grubu oldukça çeşitlidir ve birkaç fenolik bileşik alt grubunu içerir. Meyveler, sebzeler, tam tahıllar ve çay, çikolata ve şarap gibi diğer yiyecek ve içecekler zengin polifenol kaynaklarıdır. Bitkilerde polifenollerin çeşitliliği ve geniş dağılımı, bu doğal olarak oluşan bileşiklerin farklı kategorilere ayrılmasına yol açmıştır. Polifenoller köken kaynaklarına, biyolojik işlevlerine ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılmıştır. Ayrıca, bitkilerdeki polifenollerin çoğu, farklı şeker birimlerine sahip glikozitler ve polifenol iskeletlerinin farklı pozisyonlarında asillenmiş şekerler olarak bulunur [45].

Çizelge 2.2. Bitkilerde mevcut olan fenolik bileşiklerin karbon atomu sayısına göre ana sınıfları [29].

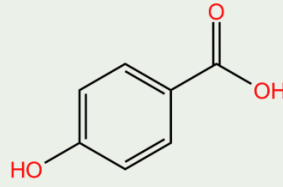
Karbon atomu sayısı	Temel iskelet	Sınıf
6	C_6	Basit fenoller, Benzokuinonlar
7	C_6-C_1	Fenolik asitler
8	C_6-C_2	Asetofenonlar, Tirozin türevleri
9	C_6-C_3	Hidroksisünamik asit, Kumarinlar
10	C_6-C_4	Naftokinonlar
13	$C_6-C_1-C_6$	İksantonlar
14	$C_6-C_2-C_6$	Stilbenler
15	$C_6-C_3-C_6$	Flavonoidler
18	$(C_6-C_3)_2$	Lignanlar
30	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Bioflavonoidler
N	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Yoğunlaştırılmış tanenler

Polifenolik bileşikler, doğal antioksidanların en önemli gruplarından biridir. Polifenoller, her biri bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren birden fazla aromatik

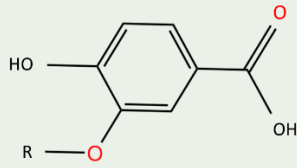
halka içerir. Öte yandan, en az bir hidroksil grubuna sahip bir aromatik halkadan oluşan fenoller. Hidroksil grupları 'asidik' özellikler gösterir, bu da 'asidik' fenolik hidroksil grubunun elektron verme aktivitesi nedeniyle fenolik bileşikleri mükemmel antioksidanlar yapar. Flavonoidler, polifenollerde en bol bulunan gruplardan biridir [46].

2.3.3. Fenolik asit ve türevleri

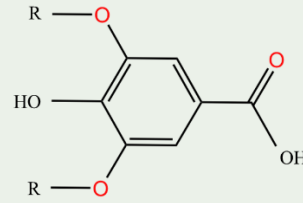
Fenolik asitler, C1–C6 ve C3–C6 omurgalarına dayalı olarak iki ana tipe, benzoik asit ve sinnamik asit türevlerine ayrılabilen flavonoid olmayan polifenolik bileşiklerdir [45]. Bitkisel gıdalarda iz miktarda bulunan hidroksibenzoik asit, C6-C1 fenilmetan yapısındadır. Salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, gallik asit, vanilik asit bu asitlerdendir. Hidroksisinamik asitler C6-C3 fenilpropan yapısına sahiptir. Fenilpropan halkasına bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellikler gösterir. Kafeik asit, ferulik asit, p-kumarik asit ve o-kumarik asit en çok bulunan asitlerdendir. Genellikle bitkilerde organik asitler ve şekerlerle esterleşmiş halde bulunurlar [47]. Meyve ve sebzeler birçok serbest fenolik asit içerirken, tahıllarda ve tohumlarda (özellikle kepek veya kabukta) fenolik asitler genellikle bağlı formdadır. Bu fenolik asitler, yalnızca asit veya alkali hidroliz üzerine veya enzimler tarafından serbest bırakılabilir veya hidrolize edilebilir [45]. Fenolik asitlerin kimyasal yapısı Şekil 2.5'de gösterilmiştir [47].

A

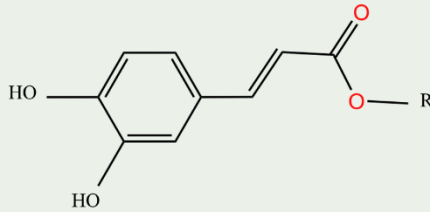
p-hidroksibenzoik asit



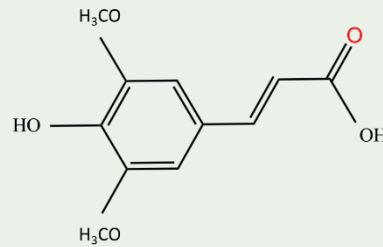
Asit	R
Pirokate Şuik	H
Vanilik	CH ₃ O



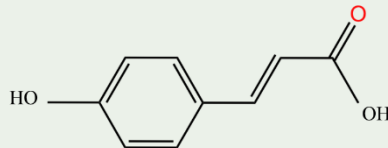
Asit	R
Gallik	H
Siringik	CH ₃ O

B

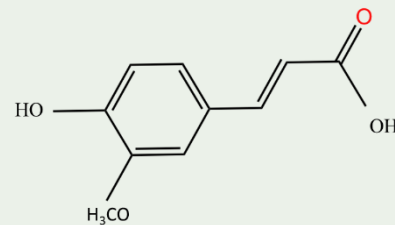
Asit	R
Kafeik	H
Klorojenik	5-quinoyl
Kriptoklorojenik	4-quinoyl
Neoklorojenik	3-quinoyl



Sinapik asit



p-kumarik asit

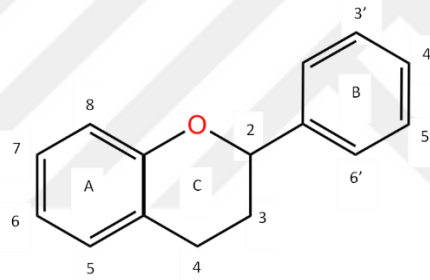


Ferulik asit

Şekil 2.5. Fenolik asitlerin genel yapısı; A) Benzoik asit türevleri, B) Sinnamik asit türevleri [45, 47].

2.3.4. Flavonoidler

Çoğu bitki polifenolik bileşikler olan flavonoidlere sahiptir. Flavonoidler, üç halka halinde düzenlenmiş 15 karbon atomu içeren C₆-C₃-C₆ (difenilpropan) formuna sahiptir. Ana kimyasal yapı Şekil 2.6'da gösterilmektedir [46]. Reaktif özelliklerinden dolayı flavonoidlerin yapısındaki OH grupları kolaylıkla glikozitlenir. Yaklaşık 6500 farklı flavonoid bulunmuştur [47]. Flavonoidler, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar, flavonoller, flavanoller ve antosiyaninler gibi birkaç alt gruba ayrılabilir. Okanin, bütein gibi 3,4-dihidroksikalkonlar, isovitexin, luteolin gibi flavonlar, malvidin-3-glukozit, siyanidin-3-glukozit gibi antosiyaninler, genistein, daidzein, dihidroflavonoller, dihidroquercetin, flavomikininler, ferulinsit gibi izoflavonlar asit, kafeik asit, prosiyanidin B-1, flavonoidlere ait doğal antioksidanların örnekleridir. Çizelge 2.3'de gıda kaynaklarındaki flavonoidlerin alt grupları sunulmaktadır [46].



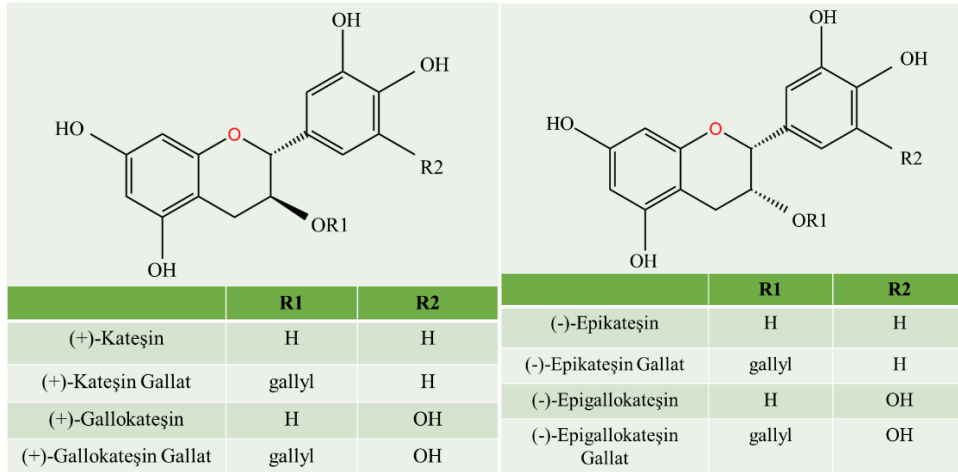
Şekil 2.6. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı. Üç halka normal olarak kabul edilir ve A, B ve C harfleriyle etiketlenir. Heterosiklik halka, C olarak etiketlenir. Oksijen atomu, ilk konum olarak numaralandırılmıştır ve kalan karbon atomları, C2'den C10'a kadar [44].

Çizelge 2.3. *Gıda kaynaklarındaki flavonoidlerin alt sınıfları [46].*

Flavonoid Alt Grupları	Ana Flavonoidler	Meyveler/Sebzeler
Flavonlar	Apigenin	Pancar, Biber, Brüksel lahanası, Lahana, Karnabahar, Kereviz, Frenk soğanı, Lahana, Marul, Ispanak, Biber, Domates, Su teresi, Narenciye
	Luteolin	
	Tangeretin	
	Nobiletin	
Flavonoller	Quersetin	Elma, Çilek, Brokoli, Lahana, Frenk Soğanı, Kızılcık, Üzüm, Kale, Soğan, Biber, Ispanak, Pazi, Domates, Su teresi
	Kaempferol	
	Myricetin	
Flavanonlar	Naringenin	Portakal ve Diğer Narenciyeler
	Hesperetin	
Flavanonoller	Taksifolin	Turunçgiller
Antosiyanidinler	Siyanidin	Yaban mersini, Böğürtlen, Kızılcık, Patlıcan, Nar, Erik, Ahududu, Kırmızı soğan, Kırmızı patates, Kırmızı üzüm, Kırmızı turp, Çilek, Diğer Kırmızı-mor meyve ve sebzeler
	Delphinidin	
	Malvidin	
	Pelargonidin	
	Peonidin	
	Petunidin	
Flavanoller/Prosiyanidinler	Catechin	Elma, Kiraz, Çilek, Üzüm
	Kateşin	
	Gallik Asit Esterleri	
	Monomerler	
	Dimerler (Prosiyanidin B1, B2)	
	Oligomerler	
Kalkonlar	Ksantohumol	Şerbetçiotu, elma
	Floretin	
İzoflavonoidler	Daidzein	Soya filizi
	Genistein	

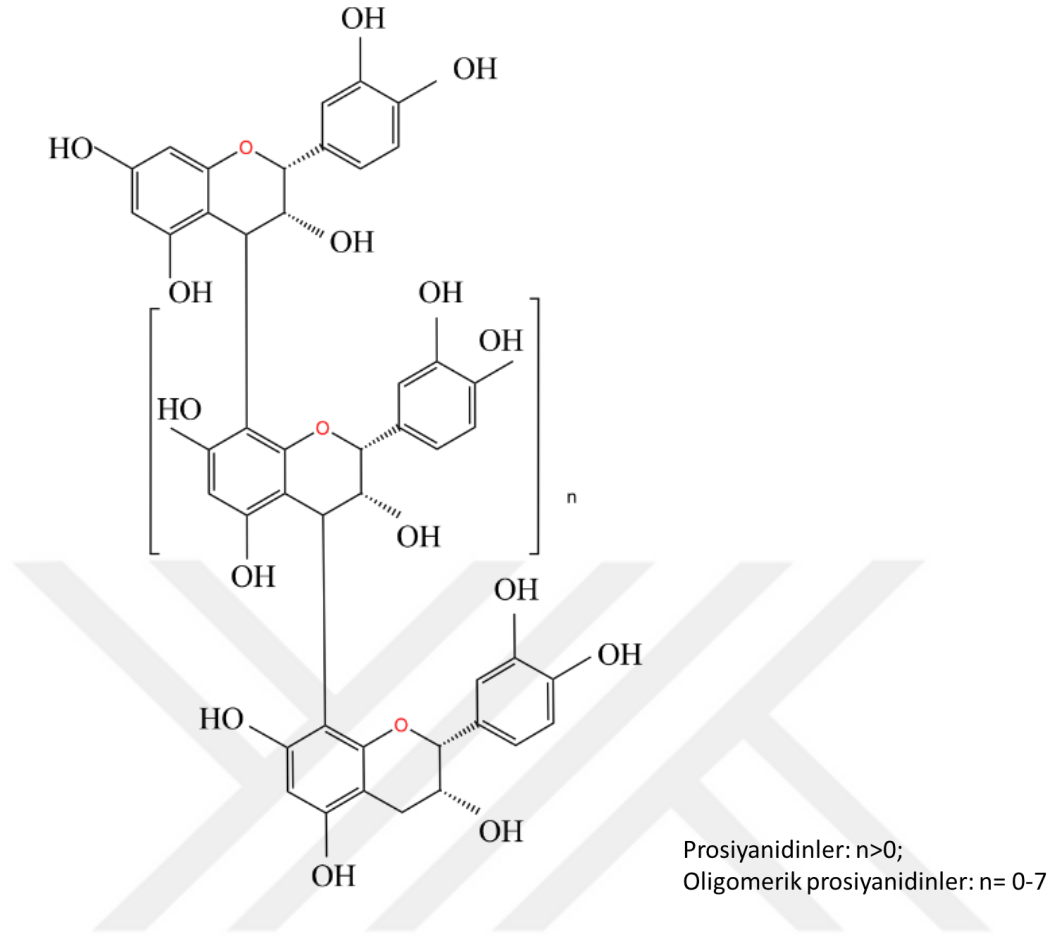
2.3.4.1. Flavanoller

Flavanoller veya flavan-3-oller genellikle kateşinler olarak adlandırılır [45]. En bol bulunan flavanol türüdür [46]. Çoğu flavonoidden farklı olarak, C2 ve C3 arasında çift bağ yoktur ve flavanollerin C Halkasında C4 karbonil yoktur. Flavanoller birçok meyvede, özellikle üzüm, elma ve yaban mersini kabuğunda bulunur [45]. Diğer flavonoid sınıflarından farklı olarak, flavanoller gıdalarda yalnızca aglikonlar olarak bulunur (glükosillenmiş durum hariç tutulur). Ek olarak, kateşinler ve epikateşinler olarak adlandırılan monomerik birimler (Şekil 2.7) ve tanenler olarak adlandırılan polimerik formlar olarak bulunabilirler [44]. Monomerik flavanoller (kateşin ve epikateşin), bunların türevleri (örneğin, gallokateşinler) çay yaprakları ve kakao çekirdeğindeki (çikolata) başlıca flavonoidlerdir [45].



Şekil 2.7. Monomerik birim olan kateşin ve epikateşin [45, 47].

Polimerik flavanollerle ilgili olarak, bu yapılar iyi suda çözünürlük ve nispeten yüksek moleküler ağırlık sergiler; tanenler olarak bilinirler. Alkaloidler, polisakkaritler ve proteinlerle komplekslerde bulunan tanenler, hidrolize edilebilir tanenler ve yoğun tanenler (proantosiyanidinler olarak da bilinir) olarak alt bölümlere ayrılabilir [44]. Kateşin ve epikateşin, polimerik zincirlerin asit katalizli bir bölünmesi antosiyanidinler ürettiği için genellikle proantosiyanidinler olarak adlandırılan polimerler oluşturabilir [45].

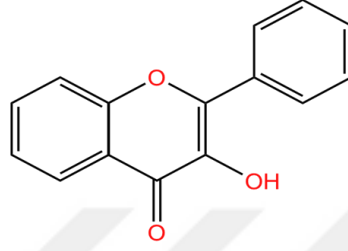


Şekil 2.8. Prosiyanidinler [45].

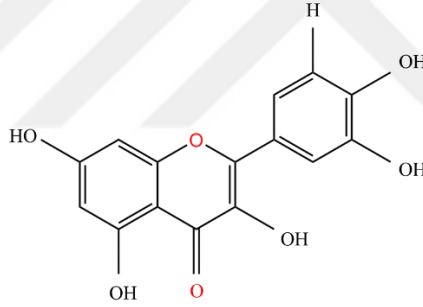
Geleneksel olarak yoğunlaştırılmış tanenler olarak adlandırılan kateşin, epikateşin ve/veya lökoantosiyanidin polimerleri, odunsu bitkilerde en bol bulunan polifenollerdir. Yoğunlaştırılmış tanenler, oksidatif koşullar altında antosiyanidinlere dönüşebilme yeteneklerinden dolayı proantosiyanidinler olarak isimlerini almıştır. Gallik ve ellagik asitlerin esterleri hidrolize olabilen tanenler olarak bilinir. Bir glikoz molekülü, hidrolize edilebilir tanen molekülünün merkezidir, burada hidroksil grubu gallik veya ellagik asit ile esterlenir ve sırasıyla allotaninler veya ellagitanninler verir [44].

2.3.4.2. Flavonoller

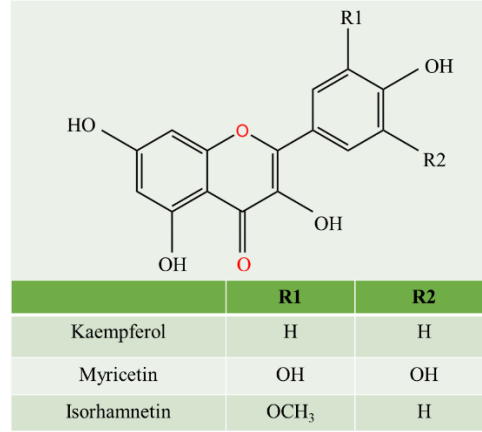
Temel flavanol iskeleti, 3 konumunda –OH ve 4 konumunda =O'a sahiptir. C halkasında 2 ve 3 numaralı karbonlar arasında bir çift bağ içermesiyle de flavanollerden farklıdır. Şekil 2.9'da temel kimyasal yapısı yer almaktadır. En belirgin flavanol, Quercetin, soğan gibi birçok bitki ve gıdada bulunur [46].



Şekil 2.9. Flavonollerin temel kimyasal yapısı [46].

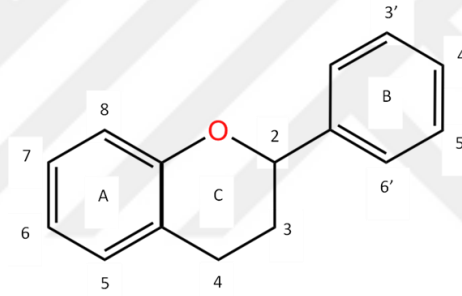


Şekil 2.10. Quercetin'in kimyasal yapısı [45].



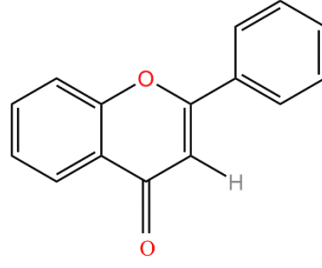
Şekil 2.11. Flavonol örnekleri [45].

2.3.4.3. Flavonlar

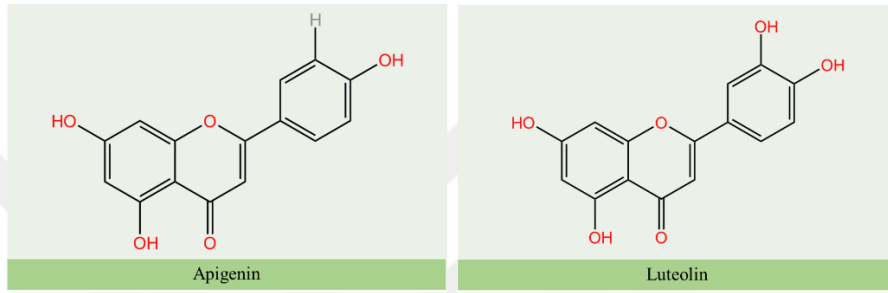


Şekil 2.12. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı [46].

Flavonlarla ilgili olarak, C4 konumunda bir karbonil grubu bulunur ve B halkası, C2 konumunda heterosiklik halkaya bağlanır; ayrıca C2 ve C3 atomları arasında çift bağ vardır. En önemli flavonlar luteolin ve apigenindir. Ayrıca, C4 pozisyonuna bir oksijen atomu yerleştirilir ve diğer sınıflarda olduğu gibi C2 yerine heterosiklik halkaya (C3 pozisyonu) B halkası (izoflavonlarda) bağlanır [44].



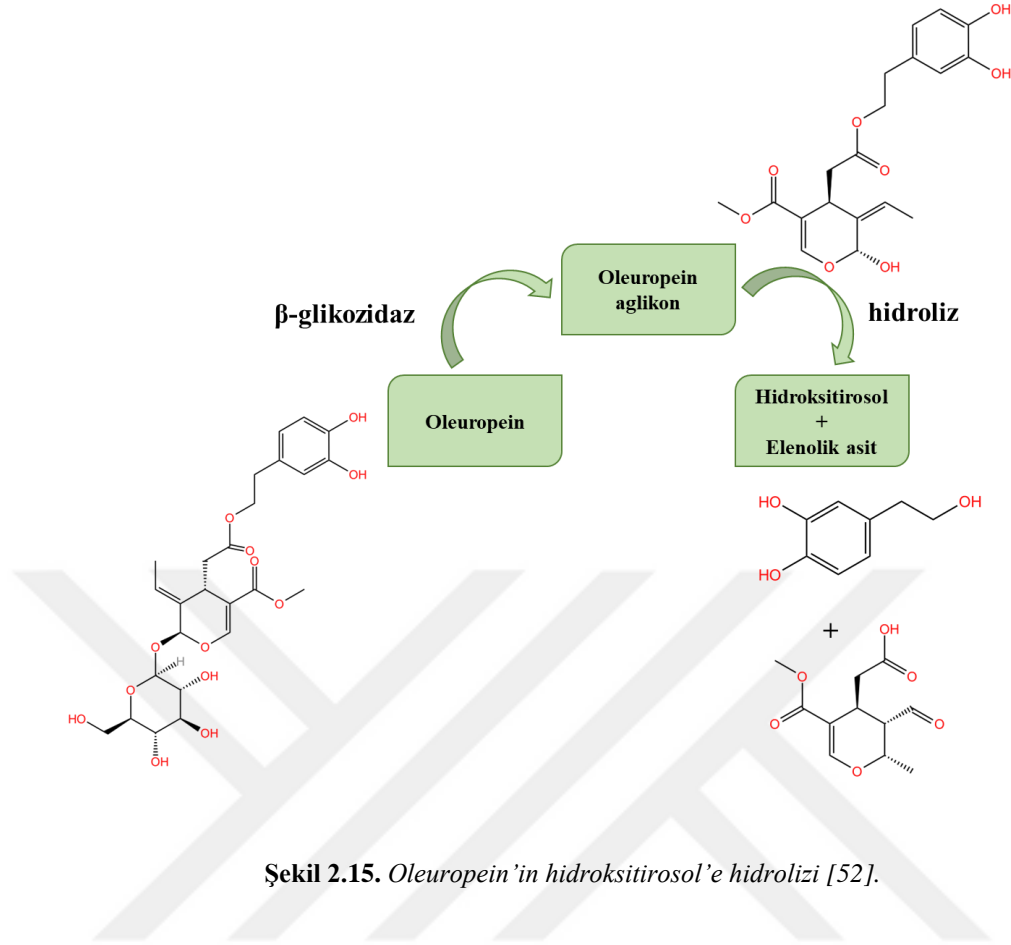
Şekil 2.13. Flavonların temel kimyasal yapısı [44].



Şekil 2.14. Apigenin ve Luteolin'in kimyasal yapısı [45].

2.4. Oleuropein

Oleuropein, zeytinlere özgü olup bozulmamış zeytin meyvesinde, kabuğunda ve zeytin yapraklarında en bol bulunan acı tadı veren elenoik asit ve dihidroksifeniletanolün heteroksidik esteri olan bir bileşiktir [19, 39, 48, 49, 50]. Zeytin ağacında bulunan ana aktif bileşen oleuropeindir [17, 51]. Bilimsel çalışmalar, zeytin meyvesinin ve yağının yüksek oranda Oleuropein etken maddesi içerdiğini; hatta zeytin yaprağının ihtiva ettiği Oleuropein maddesinin diğer kısımlarına oranla daha yüksek olduğunu göstermiş ve aktif bir fitokimyasal olduğunu ortaya koymuştur [8]. Zeytinin yaprak, meyve ve çekirdeklerinde fenolik bileşik türleri ve düzeyleri farklıdır. Olgunlaşma döneminde yaprak ve meyvelerde fenolik bileşiklerde önemli değişiklikler olmaktadır [49]. Oleuropein olgunlaşma sırasında hidrositirosole metabolize olur ve miktarı azalır.



Şekil 2.15. *Oleuropein'in hidroksitirosol'e hidrolizi [52].*

Bu nedenle en çok zeytin yapraklarında yoğunlaşmaktadır. Oleuropein miktarı genetik faktör, hasat mevsimi ve yaprakların olgunluğu vb. etkiler ile değişmektedir [19].

Oleuropeinin zeytin ağacının çeşitli streslere (güneş ışığı, tuzluluk, soğuk vb.) karşı korunmasında yer alan ana fenolik bileşik olduğu bilinmektedir. Yüksek güneş ışığı ve tuzluluk stresinin fenolik bileşiklerin ve özellikle flavonoidlerin biyosentezinde bir artış ortaya koyduğu gösterilmiştir. Örneğin tam güneş ışığı alan yapraklar gölgede kalan yapraklardan önemli ölçüde daha fazla Oleuropein ve flavonoid konsantrasyonuna sahiptir [53].

Oleuropein açısından zengin özler, temel olarak güçlü biyolojik ve farmakolojik özellikler sunduklarına inanıldığından tarımsal gıda endüstrisinde, gıdalarda doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılmıştır [54]. Farmasötik araştırmalarda oleuropein'deki birincil bileşen olan kalsiyum elenolat aktif madde olarak kullanılmaktadır [11].

Çeşitli ticari isimler altında pazarlanan bu bileşen, geniş bir hastalığa neden olan patojenlerle mücadelede ve böylece bağışıklık sistemini güçlendirmede oynayabileceği önemli rol nedeniyle yaygın olarak tanınmaktadır [11].

Flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik alkoller çeşitli meyve ve sebzelerde bulunurken Oleuropein gibi sekoiridoidler sadece Oleaceae familyasına ait bitkilerde bulunur [18]. Fenolik bileşiklerin alt grubu olan sekoiridoitler moleküler yapılarında elenoik asit veya türevlerinin varlığı ile karakterize edilir [55]. Oleuropein, sekoiridoidler grubunun bir parçasıdır ve bir glikoz kısmı ile elenolik aside bağlı bir hidroksitirozol esterinden oluşur [56]. Eşsiz sekoiridoid yapısı nedeniyle, organoleptik olarak güçlü bir acılık ile karakterizedir [28]. Suda ve alkolde çözünür, eterde çözünmez. Polar bir bileşik olduğu için polar olmayan zeytin yağından daha çok zeytin değirmeni atık suyunda rastlanır [18]. Oleuropeinin hidrolizi ile elenoik asit, hidroksitirozol, tirozol ve glikoz oluşur [57]. Ligustrum, jasminum ve syringa da oleuropein kaynağıdır. Oleuropeinin moleküler formülü $C_{25}H_{32}O_{13}$ ve moleküler ağırlığı $540,514 \text{ mol}^{-1}$ dir [18].

Son yıllarda bazı gıdaların hastalıkların doğal yollarla önlenmesi ve tedavisinde etkinliğinin bilimsel olarak ortaya konulması, insan sağlığının korunması için beslenme desteğinin öneminin artmasına neden olmuştur. Bu nedenle fonksiyonel gıdaların nutrasötik ve tedavi edici kullanımları giderek artmaya başlamıştır. Özellikle Akdeniz ülkelerinde çok farklı amaçlarla kullanılan zeytin ve çeşitli ürünleri profilaktik açıdan önemlidir [49]. Oleuropein ve metabolitlerinin toksik etkileriyle ilgili çeşitli çalışmalarda, bu bileşiklerin farklı hayvan türlerinde tamamen toksik olmadığı kanıtlanmıştır [15].

2.4.1. Oleuropein ve sağlık

2.4.1.1. Antioksidan aktivite

Vücutta üretilmiş serbest radikaller oksidatif stres oluşturmaktadır. Bu stres biyolojik sistemlerde DNA, protein ve lipid hasarına neden olmaktadır. Antioksidanlar bu serbest radikalleri tutup oksidatif stresin oluşmasını önlemektedir [29]. Örneğin Oleuropein donma stresinin bitkiye verebileceği oksidatif hasara karşı koruma sağlayabilir [53].

Ortodifenolik (katekolik) bir yapıyı paylaşan bileşiklerin antioksidan aktiviteye sahip olduğu yaygın olarak bilinmektedir ve oleuropeinin yüksek antioksidan kapasitesinin ana nedeni o-dihidroksi (katekol) yapısının varlığıdır [19]. Hidroksil grupları oksidasyonu engellemek için kendi hidrojenlerini vererek serbest radikalleri

nötralize etmektedir [13]. Oleuropein ve Oleuropein açısından zengin özlerin, sentetik antioksidan Bütül hidroksi tolüen (BHT)'den daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirildi [21]. Zeytin yaprağı ekstresinin antioksidan kapasitesinin saf oleuropeinden, saf hidroksitirosoleden, güçlü bir antioksidan olan C ve E vitamininden daha yüksek olduğu bildirilmiştir [19].

Göreceli serbest radikal süpürme aktivitelerinin sırası: rutin> kateşin=luteolin> OLE=hidroksitirozol> diosmetin> kafeik asit> verbascoside> 23leuropein> luteolin-7-glukozit=vanilik asit=diosmetin-7-glukozit> apigenin-7-glukozit> tirozol> vanilin olarak bildirilmiştir. Oleuropein, hidroksitirozol ve verbascoside in vivo ve in vitro olarak indüklenen lipid peroksidasyonunun yüksek derecede inhibe etmişlerdir. Son araştırmalar zeytin fenoliklerinin ve Oleuropein karıştırıldıklarında, antioksidan özellikleri açısından sinerjistik bir davranış sergilediklerini göstermiştir [58].

2.4.1.2. Anti-inflamatuar

İnflamasyon, inflamatuvar bir tepkiye cevap olarak elde edilen dinamik olaylar zinciridir. Nitrik oksit (NO) inflamasyonun birçok aşamasında rol oynadığı bilinen mediatörlerden biridir. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenmektedir [59]. Oleuropeinin, lipopolisakkarit ile tehdit edilen makrofajlarda nitrik oksit sentaz enziminin indiklenebilir formunu (iNOS) indüklemesi sonucu NO üretimini arttırdığı kanıtlanmıştır [60].

2.4.1.3. Anti-kanser etki

Araştırmalar Oleuropein aglikonunun meme kanseri hücre canlılığını azaltmada en güçlü bileşik olduğunu gösterdi [60]. Oleuropeinin hücre çoğalma hızını inhibe ederek ve programlı hücre ölümünü indükleyerek insan meme kanseri hücrelerinin sayısını azalttığı bildirilmiştir [56, 60]. Ayrıca oleuropein, tamoksifen toksisitesine (meme kanseri tedavisinde anti-neoplastik ilaç olarak kullanılan, sıklıkla menopoz semptomlarına neden olan bir ilaç) karşı toksisitesini 9 kat azaltarak yüksek bir koruyucu güç gösterdi ve güçlü olduğu kanıtlandı [53]. Baskın bileşiği Oleuropein olan ham özütlerin ve fitokimyasalların insan idrar kesesi karsinomasının ve sığır beyin kılcal endotelyalinin hücre çoğalma hızını azalttığı bildirilmiştir [60]. Ayrıca kanser hastalarında enzimleri korur [18].

2.4.1.4. Antimikrobiyal etki

Oleuropein'e benzer yapıdaki bileşikler, antibakteriyel etkisini bakteri zarına zarar vererek ve/veya hücre peptidoglikanlarını bozarak üretiliyor gibi görünmektedir [60]. Oleuropein içindeki elenolik asidin bu aktivite üzerinde sinerjik etki yaptığı in vitro olarak bulunmuştur. Hidroliz ile elde edilen kalsiyum elenolat'ın ayrıca antiviral ve antibakteriyel aktiviteleri olduğu kanıtlanmıştır [18]. Oleuropein'in antimikrobiyal aktivitesinin mekanizması hala tam olarak kurulamamıştır. Bu yüzden bazı mekanizmalar önerilmiştir. Bileşikteki glikozit grubunun hücre zarına nüfus etme ve hedef bölgeye ulaşma yeteneğini değiştirdiğini öne sürdüler. Spesifik mikroorganizmaların büyümesi için gerekli olan belirli aminoasitlerin üretim prosedürlerine etkili müdahale de önerilmiştir. Önerilen bir başka mekanizma da bağışıklık sisteminin her türden mikroplara tepkisi olarak fagositozun doğrudan uyarılmasıdır [60].

Oleuropein virüs, bakteri, retrovirüs, maya, mantar, küf ve diğer parazitlere karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir [18, 19].

Oleuropein ve hidroliz ürünleri metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tarafından enterotoksin B'nin gelişimini ve üretimini, *Salmonella enteritidis*'in gelişimini, *Bacillus cereus*'un da sporlarının çimlenmesini ve buna bağlı olarak gelişmesini engelleyebilir. Oleuropein ve diğer fenolik bileşikler (p-hidroksibenzoik, vanilik ve p-kumarik asitler vb.) *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *B. cereus* gelişimini tamamen engeller [60]. Ticari zeytin yaprağı ekstraktının (bol miktarda oleuropein) *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir [19, 60]. Bu ekstraktların ayrıca *H. pylori* ve *C. jejuni* düzeylerini seçici olarak azaltarak mide florasının bileşimini düzenlemede rol oynadığı bildirilmiştir [60]. Hem Oleuropein hem de hidroksitrolsolün ATCC (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) bakteri suşlarına ve klinik bakteri suşlarına (*Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Salmonella typhi*, *Vibro parahaemolyticus* ve *Staphylococcus aureus* vb.) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtildi [19]. Oleuropein gram-negatif, gram-pozitif bakterilere ve ayrıca mikoplazmaya karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [60].

2.4.1.5. Antiviral etki

Son zamanlarda, Oleuropein bir ABD patentinde herpes mononükleoz, hepatit virüsü, rotavirüs, sığır rinovirüsü, köpek parvovirüsü ve kedi lösemi virüsüne karşı güçlü

antiviral aktivitelere sahip olduğunu iddia etmiştir. Araştırmalar ayrıca zeytin yapraklarının anti-HIV etkisine odaklanmıştır. Bu çalışmalar, Oleuropein ve hidroksitirosolün, AIDS virüsüne karşı birden fazla etki gösterebilen ilk küçük molekül grubu olduğunu hem viral girişi hem de hücrel ortamların dışında ve içinde entegrasyonu inhibe ederek bu küçük moleküllere viral dirence karşı benzersiz faydalar sağladığını göstermiştir [19]. Zeytin yaprağı ekstraktı sayesinde HIV'in hücreden hücreye geçişi doza bağımlı bir şekilde engellendi ve HIV replikasyonu bir in vitro deneyde engellendi. Çalışmalar ayrıca oleuropeinin solunum sinsityal virüsüne ve para-influenza tip 3 virüsüne karşı önemli bir antiviral aktivite sergilediğini göstermiştir [60].

2.4.1.6. Cilt koruyucu

Çalışmalar oleuropeinin cilt üzerinde özellikle cilt seviyesinde serbest radikal süpürücü olarak hareket eden bir antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının ve oleuropeinin UVB ışınlarından kaynaklanan cilt hasarı, kanserojen ve tümör büyümesi üzerinde önleyici etkisi de çalışmalarda araştırılmıştır [60]. Antioksidan özelliği ile serbest radikal tarafından DNA hasarını engellemesi ile UVB'nin neden olduğu murin cilt tümörlerini azaltabileceğini bildirmişlerdir [58].

2.4.1.7. Yaşlanma karşıtı

Normal insan fibroplastları (bağ dokunun temel hücreleri) hem genetik hem de çevresel faktörler nedeniyle replikatif yaşlanmaya (belirli bir bölünme sayısından sonrası DNA zincirinin kısalması sonucu hücrenin bölünememesi) uğrar. Proteazomların genel görevi, hasar görmüş veya işe yaramayan proteinleri proteoliz adı verilen enzim ile vücuttan atmaktır. Yaşlanma sırasında proteazomun işlevi bozulurken, artan ekspresyonu insan fibroplastlarında yaşlanmayı geciktirir. Yapılan çalışmalar oleuropeinin, in vitro olarak bilinen diğer kimyasallardan daha etkili bir şekilde proteazom aktivitelerini arttırdığını göstermektedir. Ayrıca erken geçiş insan embriyonik fibroblastlarının Oleuropein ile sürekli tedavisi sonucu hücre içi ROS (reaktif oksijen) seviyelerini azaltır. Artan proteazom sayesinde reaktif oksijen ile oksitlenmiş proteinlerin miktarını azaltır ve replikatif yaşlanma sırasında proteazom fonksiyonunu korur. Oleuropein ile muamele edilmiş kültürler yaşlanma morfolojisinin ortaya çıkmasında bir gecikme sergiler ve ömürleri yaklaşık %15'e kadar uzar [60].

2.4.1.8. Nöroprotektif aktivite

Serbest radikal teorisine göre yaşlanma, bireyin yaşamı boyunca maruz kaldığı oksidatif hasarın sonucudur. Oksidatif hasarın bir kısmı önlenemez bu da hücrel işlev bozukluğuna yol açar. Mitokondriyal membranlar bilişsel ve nörodejeneratif hastalıklara neden olan serbest radikal saldırılarına karşı çok hassastır. In vitro ve epidemiyolojik çalışmalar, doğal olarak ekstrakte edilen polifenollerin demans gibi yaşa bağlı bozuklukların insidansı üzerindeki olumlu etkisine işaret etmiştir. Bir çalışma oleuropeinin Alzheimer hastalığına özgü olan A β (amiloid beta peptidi) agregasyonunu azalttığını ve hatta önlediğini bildirmiştir [60].

Oleuropeinin Alzheimer'a olan potansiyel etkisi damar sertliğindeki hastalığındaki etkisi ile benzerdir çünkü her iki hastalık da normal bir metabolitin (sırasıyla A β ve kolesterol) anormal birikmesiyle hastalığa yol açtığı yaşa bağlı hastalıklardır. Kalp hastalığı ile Alzheimer hastalığı arasındaki bu benzer mekanizma, oleuropeinin kolesterole olan müdahalelerindeki koşulların Alzheimer'daki A β birikiminde de etkili olabileceğine dair koşullu kanıtlara ışık tutmuş. Bu koşullu kanıtlar Oleuropein'in Alzheimer tedavisinde umut verici olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca anti-inflamatuar ajanların Alzheimer'a karşı koruyucu etkisinin epidemiyolojik kanıtı ile birleştiğinde Oleuropein gibi polifenolik doğal özün yaşa bağlı hastalıklara karşı etkili olduğunu kanıtlayabilir [60].

2.4.1.9. Anti-aterojenik ve kardiyoprotektif etki

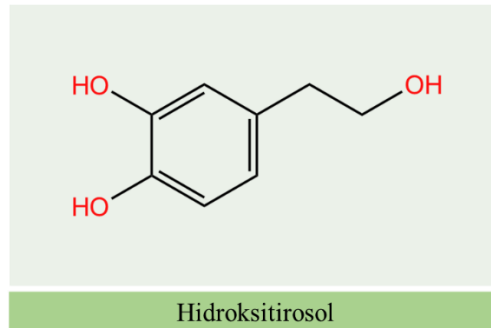
Oleuropeinin anti-aterojenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Uyarılmış endoteliuma monositoid hücre yapışmasını, vasküler hücre yapışmasını ve proteini azalttığı bildirilmiştir [60]. Oleuropeinin bir başka özelliği de kan basıncını düşürücü etkisidir. Oleuropeinin hipotalamusun paraventriküler çekirdeğini oksidatif stresten koruyabildiğini hem hipertansiyonu önlemek hem de tedavi etmek için umut verici bir strateji olduğu bildirilmiştir [21]. Oleuropein, koroner dilatasyonda etkili olan membran lipid oksidasyona karşı korur böylece kardiyolojik hastalıklarda etkilidir [18, 57]. Önceden tedavi edilen iskemik kalplerdeki yeni akışta oksitlenmiş glutatyon hızlı salınımı oluşmaktaydı Oleuropein bu salınımı önemli ölçüde azalttı. Ayrıca oleuropeinin akut adriyamisinine kardiyotoksitesine karşı kardiyoprotektif olduğu bildirilmiştir [60].

2.4.1.10. Diğer aktiviteler

Oleuropeinin vazodilatör, anti-trombosit agresyonu, Hipotansif, Anti-romatizmal, idrar söktürücü, ateş düşürücü etkileri ile diyabetik sıçanlarda anti-hiperglisemik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir [60]. Hepatositlerde hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz aktivasyonunu azaltarak serbest yağ asidi kaynaklı lipogenezi azalttığı gösterilmiştir [61]. Kan şekeri ve kolesterol seviyesini dengelemeye yardımcı olduğu bildirilmiştir [62]. Gıdaların işlenmesi ve depolanması sürecinde meydana gelen lipid peroksidasyonunu geciktirir raf ömrünü arttırır [13], enzim modülatörü olarak kullanıldığı, endokrin-hormonel [10] ve antifungal [63] aktiviteleri rapor edilmiştir. Obezite problemlerinin üstesinden gelmek için lipid metabolizmasını geliştirir [18]. Sıçan obezite modelinde vücut ağırlığı artışı ve metabolik bozulma üzerindeki koruyucu etkisi bildirilmiştir [51].

2.5. Hidroksitirozol

Olea europaea'da bulunan fenolik alkollerin başlıca temsilcisi hidroksitirozol, oleuropeinden farklı olarak bu botanik aile ile sınırlı değildir [28, 64]. Hidroksitirozol, Oleuropein'in başlıca hidroliz (esteraz enzimi ile) ürünüdür bu nedenle zeytindeki veya zeytin yapraklarındaki miktarı olgunlaşma veya zeytin işleme sırasında artarken Oleuropein miktarı azalır [13, 19, 51]. Hidroksitirozol bağırsaklarda emilir ve taşınması çift yönlü pasif difüzyon mekanizması ile gerçekleşir [19]. Hidroksitirozol aynı zamanda Uluslararası Avrupa Birliği tarafından 3,4-dihidro-ksifeniletanol (DOPET), 3,4-dihidroksifenol etanol (3,4-DHPEA) veya 4-(2-hidroksietil)-1,2-benzendiol olarak da bilinir [21]. Hidroksitirozol'un kimyasal yapısı Şekil 2.16'da gösterilmektedir [19, 64].



Şekil 2.16. Hidroksitirozol'un kimyasal yapısı [65].

Hidroksitirosol yapısındaki bir katekol sayesinde suda ve yağda çözünebilen bir moleküldür [66]. Hidroksitirosol'ün özelliği güçlü antioksidan kapasitesidir. Bu özelliği hidroksitirosol'ün önemini artırsa da doğal bir kaynaktan saf hidroksitirosol'ün ekstrakte edilmesini zorlaştırmakta ve maliyetini arttırmaktadır [19]. Bu nedenle son zamanlarda doğal kaynaklardan elde edilmesine ve bir Oleuropein kaynağından hidroksitirosol üretimine odaklanan çalışmalar önerilmiştir [64].

Çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma, Oleuropein ve türevi hidroksitirosol'ün çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur [51]. Hidroksitirosol oksitlenmiş fosfolipid oluşumuna karşı en yüksek korumayı göstermiştir [64].

Amfipatik karakteri nedeniyle, hidroksitirosol sadece zeytin ve zeytin yaprağında değil, aynı zamanda zeytinyağı yan ürünlerinde serbest formda asetat formor olarak oleacein, verbascoside ve Oleuropein gibi daha karmaşık bileşiklerin bir parçası olarak bulunabilir [21].

2.5.1. Hidroksitirosol ve sağlık

2.5.1.1. Antioksidan aktivite

Hidroksitirosol'ün antioksidan aktivitesi, hidrojen bağışına ve hidroksil grubunun serbest hidrojeni ile fenoksil radikalleri arasında molekül içi bir hidrojen bağı oluşturarak serbest radikalleri temizleme yeteneğine atfedilir [64]. Hidroksitirosol; bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), troloks, C ve E vitamininden daha yüksek antioksidan potansiyali olan doğal olarak elde edilen en güçlü antioksidanlardan biridir [21]. Oleuropein için 7, BHT için 2 olan inhibisyon katsayısı hidroksitirosol için 5'tir [64]. Yenilikçi uygulamalarda hidroksitirosol yüksek antioksidan aktivitesi nedeniyle gıda, kozmetik formülasyonlarında doğal katkı/içerik maddesi olarak kullanılmaktadır [34]. Hidroksitirosol açısından zengin zeytinyağları, sağlıklı LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) kolesterol seviyesini ve lipid antioksidasyonunu koruma yetenekleri nedeniyle Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi tarafından onaylanmıştır [15].

Yapılan çalışmalarda hidroksitirosol, ambalajlama materyallerinde antioksidan olarak kullanılmış ve aktif ambalajlama teknolojisinde alternatif doğal bir kaynak olabileceği bildirilmiştir [13].

Hidroksitirosol'ün antioksidan özelliği sıçanların plazmasında ve karaciğerinde kanıtlanmıştır. Diğer o-fenolik bileşiklerle (oleuropein, kafeik asit vb.) birlikte in vitro

olarak düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir ve insan eritrositlerini ve DNA'sını oksidatif etkilere karşı korumak için düşük konsantrasyonlarda en etkili olabileceği ortaya çıkmıştır [15]. Ek olarak toksisite kanıtı olmaksızın lökositlerle etkileşime girerek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebildiği bulunmuştur [61].

2.5.1.2. Anti-inflamatuar

Hidroksitirozol in vitro anti-inflamatuar etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, Murin makrofaj hücreleri, hidroksitirozol ilaveli ve ilavesiz lipopolisakkarit kullanılarak uyarılmış ve inflamatuvar sitokinler (nitrik oksit (NO), prostaglandin E2 (PGE2), sitokinler) salınımı sağlanmış ve Hidroksitirozolün, NO ve PGE2'ye karşı önemli inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir [15].

2.5.1.3. Anti-kanser aktivite

Oleuropein ve hidroksitirozol gibi zeytin biyofenollerinin meme kanserinde tümör büyümesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Tümör hacmini ve ağırlığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir [65]. Epidemiyolojik araştırmalara göre hidroksitirozol'un özellikle prostat ve kolon kanserine karşı etkisi olduğu düşünülmektedir [19].

2.5.1.4. Antimikrobiyal etki

Hidroksitirozol, çok çeşitli bakteri ve mantarların büyüme hızını inhibe edebilir veya geciktirebilir [67]. *Hidroksitirozol Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes ve Helicobacter pylori*'ye karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir [56, 66]. Hem Oleuropein hem de hidroksitirozol'un ATCC (Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu) bakteri suşlarına ve klinik bakteri suşlarına (*Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Salmonella typhi, Vibrio parahaemolyticus*) karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirledi [19]. Ayrıca *Bacillus subtilis, B. cereus, Staphylococcus aureus, Klebsiella Pneumoniae* ve *Vibro cholerae* gibi çeşitli insan bağırsak veya solunum yolu patojenlerinin büyüme hızını engellediği veya geciktirdiği kanıtlanmıştır [61, 66].

Hidroksitirosole bağlı olan dekarboksimetil elenolik asidin dialdehidik formu, en güçlü antilaktik asit bakteri aktivitesini göstermiştir ve zeytin salamuralarındaki

varlığından dolayı, zeytinlerin fermantasyonu sırasında bu bakterilerin büyümesinin inhibisyonunu da açıklamaktadır [65].

2.5.1.5. Antiviral etki

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonunu önlemek ve hatta HIV kaynaklı hastalıkları hafifletmek için hidroksitirozol kullanımı da özel ilgi görmüştür [21]. Bu çalışmalar, Oleuropein ve hidroksitirozolün, AIDS virüsüne karşı birden fazla etki gösterebilen ilk küçük molekül grubu olduğunu hem viral girişi hem de hücrel ortamların dışındaki ve içindeki entegrasyonu inhibe ederek viral dirence karşı benzersiz faydalar sunduğunu göstermiştir [19]. Bu bileşiğin, HIV-1 enfeksiyonlarına karşı önleyici tedavi olarak halihazırda kullanılan diğer ilaçlarla kombinasyonu da test edilmiştir. Lamivudin ve emtrisitabin ile aditif etkilerde bulunurken, tenofovir ile kombinasyonun sinerjistik olduğu görülmüştür. Bu bulgular, 5-hidroksitirozolün HIV enfeksiyonunu önlemek için etkili ve düşük maliyetli yeni bir mikrobisit olabileceğini göstermiştir [21].

Aktif maddeler olarak hidroksitirozol ve ksantohumol içeren bir intranazal sprey şeklinde bir formülasyon da astım ve rinit tedavisinin yanı sıra soğuk algınlığı tedavisi için patentlenmiştir [21].

2.5.1.6. Cilt koruyucu

Hidroksitirozol yaşlanmayı geciktirici ve aydınlatıcı/beyazlatıcı ve farklı kozmetik ürünlerde bir bileşen olarak kullanılmaktadır. Hidroksitirozol ile kozmetik ürünü üretmek için birkaç patent vardır. Hidroksitirozol'ün dermatolojik özelliklerinin, melanom hücrelerinde uzun dalga boylu ultraviyole radyasyonunun neden olduğu protein hasarını önlediği bildirilmiştir. Epidermal bariyer iyileştirmede, iltihaplanmayı önlemede ve cilt onarmada etkili olduğu bildirilmiştir [21].

Hidroksitirozol bakımından zengin formülasyon sedef hastalığı, egzama, alerjik dermatit, fotohipersensitivite dermatozu veya liken ürtiker gibi cilt iltihaplarını tedavi etmek için geliştirilen çalışmalar yapılmıştır [21].

2.5.1.7. Nöroprotektif aktivite

Hastalığın erken evrelerinde Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için hidroksitirozol (%40-%90) ve en az bir ek zeytin polifenolü içeren bir formülasyon geliştirilmiştir [21]. 30mg hidroksitirozol ve 72mg zeytin polifenolleri içeren kapsüller deneklere birkaç hafta süreyle verildikten sonra hareketlerinde önemli gelişmeler ve titremede azalma kaydedilmiştir [21, 68]. Hidroksitirozol'un ayrıca diyabetik nöropatiyi de önlediği bildirilmiştir [61].

2.5.1.8. Anti-aterojenik ve kardiyoprotektif etki

Hidroksitirozol'un kardiyoprotective etkisi insan hücreleri üzerinde başarıyla test edilmiştir [15]. Zeytin yaprağı ekstraktının adrenalin, aritmi ve bağırsak kas spazmları üzerindeki etkileri nedeniyle kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olduğu öne sürülmüştür [19]. Hidroksitirozol ateroskleroza (damar sertliği) karşı korur [61]. Hidroksitirozol'un fonksiyonel bir gıda bileşeni olarak uygulamalarına ilişkin kapsamlı bir incelemede hidroksitirozol açısından zengin bileşimlerin kardiyovasküler hastalıkları, arterlerde plak oluşumunu, arteriyel hipertansiyonu ve metabolik sendromu önlemek veya tedavi etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir [21].

2.5.1.9. Antifungal etki

Yapılan in vitro çalışmalar hidroksitirozol'un antifungal potansiyale sahip olduğunu göstermiştir [69]. *Candida spp* mayalarına en iyi inhibitör olduğu bildirilmiştir [66, 69].

2.5.1.10. Obezite

Hidroksitirozol'un alloxan ile indüklenen diyabetik sıçanlarda antidiyabetik etkisi, üzerine yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Ayrıca yapılan in vivo bir çalışmada hiperglisemi, artan lipid peroksidasyonu, hiperkolesterolemi ve antioksidan enzim aktivitelerinde azalma görülen sıçanlara muzdarip. Oleuropein ve hidroksitirozol bakımından zengin özütlerin uygulanmasından sonra, diyabetik sıçanların serum kolesterol ve glikoz seviyeleri önemli ölçüde düştüğü ve antioksidan enzimatik aktivitelerin arttığı görülmüştür. Oleuropein ve hidroksitirozol'un antidiyabetik etkisinin, diyabetin patolojik komplikasyonları ile yaygın olarak ilişkili olan oksidatif stresi dizginleme yeteneklerine bağlı olabileceği öne sürülmüştür [65]. Mevcut veriler

hidroksitirozol bakımından zengin zeytin yaprağı ekstrelerinin uygulanmasının vücut ağırlığını, kilo alımını ve epidimal yağ birikimini azalttığını göstermiştir [51]. Glisemik indeks ve yüksek kolesterol seviyelerinin kontrolü için bir diyet takviyesi veya metabolik hastalıkların tedavisi ve/veya önlenmesi için bir ilaç olarak kullanılacak bir aloe vera (%90-99,9) ve hidroksitirozol (%10-0,1) jel patentlenmiştir [21].

2.5.1.11. Diğer aktiviteler

Hidroksitirozol'un vazodilatatör [18] etkisi bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada kalsiyum birikimini uyardığından, osteoporozun önlenmesi ve tedavisinde hidroksitirozol kullanımı önerilmiştir. Ayrıca, hidroksitirozol içeren nutrasötik ve farmasötik bileşimler, eklemlerdeki kıkırdak yaralanmalarının rejenerasyonu ve onarımı için patentlenmiştir [21].

3. EKSTRAKSİYON

3.1. Klasik Çözücü (Katı-Sıvı) Ekstraksiyon

Katı-sıvı ekstraksiyonu katı içerisinde çözünen maddenin, katıyı çevreleyen sıvı çözücüye difüzyonla aktarılmasıdır. Katı-sıvı ekstraksiyonundaki itici güç, örnekteki ekstrakte edilecek maddenin konsantrasyonu ile ekstrakte edilen çözeltideki bu maddenin konsantrasyonu arasındaki farktır. Bu fark ne kadar büyük ise ekstraksiyon verimi de kadar yüksek olur [70].

Zeytin yapraklarından aktif bileşiklerin geri kazanılması için yaygın olarak kullanılan klasik çözücü ekstraksiyonun temeli genellikle organik çözücüler ile çalkalama-süzme ekstraksiyon yöntemine dayanır [28]. Katı sıvı ekstraksiyonunda bitkisel hammaddeden aktif bileşenlerin kütle transferini ve ekstraksiyon hızını etkileyen en önemli parametreler çözücü seçimi, sıcaklık, parçacık boyutu, katı-sıvı oranı ve ekstraksiyon süresidir [70].

Bitkisel materyalden bileşiklerin katı-sıvı ekstraksiyonunda iki fiziksel proses aynı zamanda gerçekleşir:

- Boyutu küçültme işlemi ile parçalanmış hücrelerin, çözücü ile yıkanarak hücrelerdeki çözünen maddelerin çözeltiye geçmesi,
- Parçalanmayan hücrelerdeki çözünebilen maddelerin, difüzyon yardımıyla çözeltiye geçmesi [70].

Parçalanmamış hücrelerin ekstraksiyonunda çözücü, hücreye difüzyon yardımı ile girer çözünen maddeleri çözer ve yine difüzyon yardımı ile çözünen maddeler çıkar. Bu süreçte difüzyonla kütle transferi çok yavaş olduğundan, ekstraksiyon hızı da çok yavaştır. Parçalanmış hücreleri ekstre etmek hızlı olacağından ekstraksiyon süresi de çok kısadır [70].

Çözücü seçimi, hedef bileşen ya da bileşenlerin çözünürlüğünü ve yayılımını optimize etmek için çok önemlidir [28]. Fenolik bileşikleri ekstre etmek için kullanılan çözücü, sadece ekstraksiyon verimliliğine göre değil aynı zamanda ekstre edilen bileşiklerin kimyasal yapılarına da uygun olmalıdır [56].

Ekstraksiyonda kullanılacak çözücülerde olması istenilen özellikler aşağıda verilmiştir [70].

- Örnekteki ekstrakte edilecek içerik maddelerinin seçici olması,
- Yüksek doygunluk konsantrasyonuna sahip olması,

- Düşük yüzey gerilimine ve düşük viskoziteye sahip olması,
- Kaynama noktası düşük ve donma noktası 0°C'nin altında olması,
- Düşük yoğunluğa sahip olması,
- Enerji ekonomisi açısından özgül sıcaklığı düşük olması,
- Aşındırıcı, zehirli ve patlayıcı olmaması,
- Taşınması, depolanması ve kullanılması kolay olması istenilmektedir [70].

Yukarıdaki özellikleri sağlayan ve en çok kullanılan çözücü sudur. Etil alkol, kloroform, aseton, heksan, petrol eteri gibi organik çözücüler de bazı bitkisel hammaddeler için tercih edilmektedir [70].

Etanol, metanol ve hidroalkolik çözücüler, zeytin yapraklarında çok çeşitli hidrofilik ve lipofilik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan en tipik çözücülerdir [28]. Laboratuvarında polifenoller genellikle metanol-su karışımları veya heksan gibi çeşitli ekstraktanlarla maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu içeren geleneksel yöntemler kullanılarak izole edilir. Ekstraksiyon işlemi endüstriyel ölçekte kullanılacaksa ve ürünler insan kullanımına yönelik olduğunda toksik çözücülerden kaçınmak önemlidir [71]. Elde edilen fenolik bileşiklerin gıda endüstrisinde kullanılması amaçlanıyorsa, son üründe çözücü kalıntısını minimuma indirmek gerekmektedir. Gıda ürünlerindeki metanol konsantrasyonu, 2009/32/EC sayılı Avrupa Yönetmeliği ile maksimum 10mg/kg konsantrasyonla sınırlandırılmıştır. Bununla birlikte, metanol, zeytin ürünlerinden fenolik bileşikleri çıkarmak için en yaygın çözücüdür [56].

3.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu

3.2.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyonu nedir?

Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu, katı ve yarı katı matrislerden çok kısa sürelerde (numune başına 12-20 dakika) ekstraksiyon elde etmek için yüksek sıcaklık ve basınç kullanan otomatik bir ekstraksiyon tekniğidir. Örneğin, 15ml'den daha az çözücü kullanılarak 15 dakikadan daha kısa bir sürede 10g numune ekstrakte edilebilir. Basınçlı Çözücü ekstraksiyonuna yardımcı olan, ekstraksiyon için gereken süreyi ve çözücü miktarını önemli ölçüde azaltan birkaç fizikokimyasal faktör vardır ve her biri aşağıda açıklanmıştır [72].



Şekil 3.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon cihazı [72].

3.2.1.1. Sıcaklık

Basınçlı Çözücü ekstraksiyonunda kullanılan en önemli parametre sıcaklıktır. Sıcaklık arttıkça, çözücünün viskozitesi azalır, böylece bitki matrisini ıslatma ve hedef bileşikleri çözme yeteneği artar. Bu, çözücünün matrisin gözeneklerine daha kolay nüfuz etmesini sağlar. Sıcaklığın artması da daha hızlı difüzyon hızlarına yol açar. Bu, bileşiklerin ekstre edildikleri matristen daha yüksek sıcaklıklarda çözücüye daha hızlı hareket ettikleri anlamına gelir. Artan sıcaklık ayrıca çözünen-matris etkileşimlerini (dipol çekimleri, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı vb.) bozmayı ve bileşikleri matristen çıkarmayı kolaylaştırır. Net etki, ekstraksiyonların yüksek sıcaklıklarda yapılmasının, ekstraksiyonların çok daha hızlı gerçekleşmesi ve daha az solvent kullanılması anlamına gelmesidir [72].

3.2.1.2. Basınç

Ekstraksiyonlarda kullanılan organik çözücülerin çoğu nispeten düşük sıcaklıklarda kaynadığından, sıcaklık tek başına verimli ekstraksiyon gerçekleştirmek için yeterli değildir. Klasik çözücü ekstraksiyonunda ekstraksiyonların gerçekleştiği en yüksek sıcaklık çözücünün kaynama noktasıdır. Ekstraksiyonlar sırasında çözücü üzerine yeterli basınç uygulanırsa, kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklar kullanılabilir. Bu, yüksek sıcaklıkta çalışmanın tüm avantajlarının, nispeten düşük kaynama noktalarına sahip çözücülerle bile gerçekleştirilebileceği anlamına gelir. Yüksek basınçlarda çalışmak, ekstraksiyon işleminin daha hızlı gerçekleşmesine de yardımcı olur. Basınçlı çözücü,

numune matrisinin gözeneklerine girmeye zorlanır ve bu alanlardaki bileşiklerle yakın temasa geçer. Bu nedenle, yükseltilmiş sıcaklık ve basıncın kombinasyonu, ekstraksiyonların hızlı ve yüksek verimde gerçekleşmesine yardımcı olur [72].

3.2.1.3. Çözücü bileşimi

Etkili bir ekstraksiyon için kullanılan çözücü, bitkisel materyalde ekstre edilmesi hedeflenen bileşikleri çözebilmelidir. Ekstraksiyon çözücünün polaritesi, hedef bileşiklerin polaritesi ile benzer olmalıdır. [72].

Çözücü seçimi, hedef bileşikler ile birlikte ekstrakte edilebilirlerin seviyesini de belirleyecektir. Genel olarak, çözücü veya çözücü karışımı ne kadar polar olursa, ilgili bileşiklerin ekstraksiyonu için o kadar az seçici olacaktır. Klasik ekstraksiyon tekniğinde ortam koşullarında hedef bileşikler düşük verimde ekstre eden çözücüler basınçlı ortamda daha yüksek ekstre verimi ile ekstraksiyon gerçekleştirebilirler. Su ve tamponlu sulu karışımlar dahil olmak üzere çoğu organik çözücü, basınçlı çözücü ekstraksiyonunda kullanılabilir. Kuvvetli asitlerin (HCl, HNO₃, H₂SO₄) paslanmaz çelik hücrelerle kullanılması, hücrelere zarar verebileceğinden önerilmez. Ancak zirkonyum bazlı hücrelerin ortaya çıkmasıyla bu asitlerin küçük miktarları kullanılabilir. Gerektiğinde asetik veya fosforik gibi zayıf asitler kullanılabilir [72].

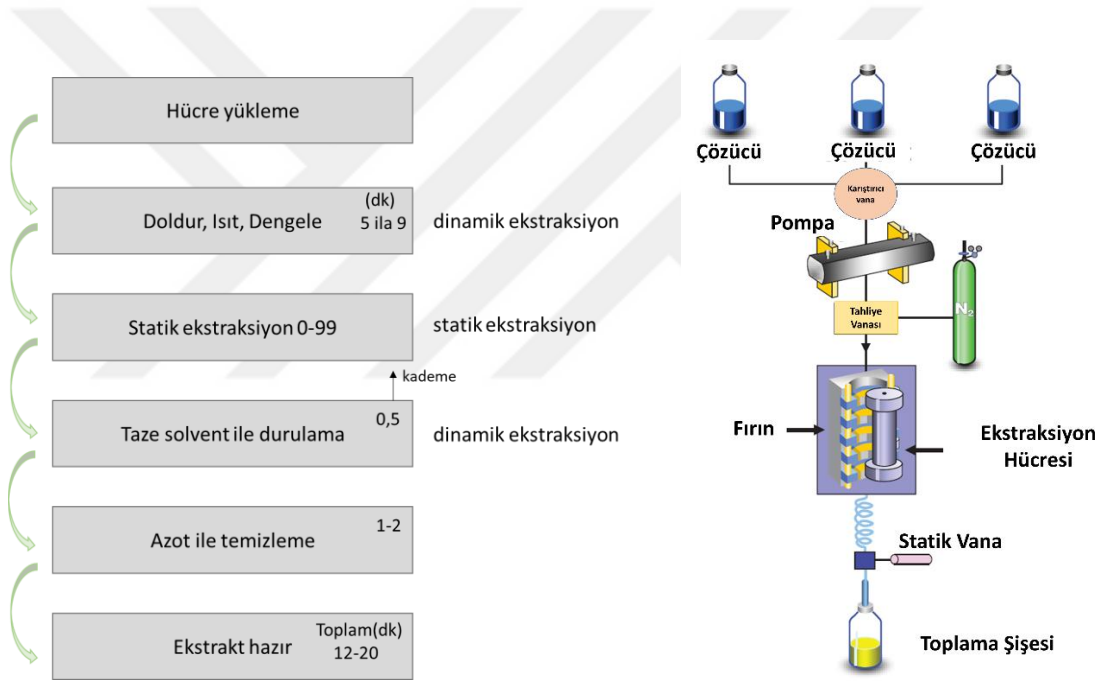
3.2.1.4. Statik ekstraksiyon döngüleri

Statik ekstraksiyon döngülerinin kullanımı, ekstraksiyon işlemi sırasında uygun ekstraksiyon dengesinin korunmasına yardımcı olan taze çözücüyü eklemek için geliştirilmiştir. Statik döngülerin, çok yüksek bileşik konsantrasyonuna sahip numune türleri ve ayrıca nüfuz etmesi zor matrislere sahip numuneler için etkili olduğu bilinmektedir. Statik ekstraksiyon süresi, toplam ekstraksiyon süresini en aza indirecek şekilde ayarlanabilir. Örneğin, 10 dakikalık bir statik adım yerine üç adet 3 dakikalık statik döngü kullanılabilir. [72].

3.2.2. Basınçlı çözücü ekstraksiyon prosesi nasıl çalışır?

Şekil 3.2, Basınçlı çözücü ekstraksiyon işleminin bir şemasını göstermektedir. Bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için katı numune bir ekstraksiyon hücresine yüklenir ve uç kapaklar hücrelere elle sıkılır. Doldurulan numune hücreleri bir hücre tepsisine yüklenir ve toplama kapları (şişeler) bir toplama tepsisine yüklenir. Robotik bir kol, ekstraksiyon

için her hücreyi ayrı ayrı fırına aktarır. Fırın, ekstraksiyonlar boyunca seçilen çalışma sıcaklığında tutulur (oda sıcaklığı ile 200°C). Ekstraksiyon hücresi çözücülerini kaynama noktalarının üzerindeki sıcaklıklarda sıvı olarak tutmak için ekstraksiyonların yüksek basınçlarda (1500psi) çalışmasına izin verir. Sıcaklık ve basınç, kullanılan çözücü, numunenin nem veya mineral içeriği veya gerçek ekstraksiyon sıcaklığını etkileyebilecek matrisin herhangi bir özelliğinden bağımsız olarak her hücre için bağımsız olarak kontrol edilir. Hücre fırına yerleştirildiğinde, pompa hemen seçilen çözücüye numune hücresine iletmeye başlar. Tekli çözücüler veya önceden karıştırılmış çözücüler, tek bir toplama kabından kullanılabilir veya üçe kadar farklı çözücünün herhangi bir kombinasyonu programlanabilir [72].



Şekil 3.2. Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu çalışma şeması [72].

Çözücü numune hücresinden geçip toplama kabına ulaştığında, hücrenin basınçlandırılmasını sağlamak için statik valf kapanır. Çözücü ısındıkça genleştiği için statik valf kapandığında hücre içindeki basınç artacaktır. Basınç, ayar noktasının 200psi üzerine ulaştığında, statik valf, basıncı tahliye etmek için hızla açılır ve ardından tekrar kapanır. Pompa ayrıca, basıncı ayar noktası değerine döndürmek için hücreye taze çözücü verir. Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu sırasında bu taze çözücü ilavesi, Soxhlet ekstraksiyonu sırasında yoğunlaştırıcıdan ekstraktöre damlayan taze çözücüye benzer. Isınma süresi olarak adlandırılan bir çalışmanın ilk aşaması sırasında, hücre içeriği fırın

tarafından seçilen çalışma sıcaklığına ısıtılır. Isınma süreleri 100°C için 5 dakika, 200°C için 9 dakika arasında değişmektedir. Isınma süresinden sonra, ekstraksiyon, kullanıcı tarafından seçilen bir süre ile statik bir periyoda girer. Tipik statik süreler 5 dakikadır, ancak 0 ile 2000 dakika arasında değişebilir. Statik sürenin ardından, numune ve çözücü hala sıcakken ekstrakte edilen bileşenleri uzaklaştırmak için hücre içinden taze çözücü pompalanır. Kullanıcı, örneğin statik modda kaç kez olacağını seçebilir ve bunu statik döngü sayısı olarak girebilir [72].

Son çözücüyle durulamanın ardından, çözücü önceden belirlenmiş bir süre boyunca hücreden (1500psi'de nitrojen kullanılarak) temizlenir. Ekstraksiyon için toplam süre genellikle 15 dakikadan azdır ve kullanılan çözücü miktarı, numune hücresinin hacminin yaklaşık 1,5 katıdır (örneğin, 10ml'lik bir hücre için yaklaşık 15ml). Ekstre çözeltisi bir filtre aracılığıyla toplama kaplarına iletilir ve çoğu durumda analizden önce herhangi bir ek hazırlığa ihtiyaç duymaz. Temizleme adımının sonunda hücre tepsiyeye geri döndürülür ve bir sonraki numune tekrar ekstraksiyon işlemine başlamak için fırına alınır [72].

Basıncılı çözücü ekstraksiyon akımı hem yöntem kontrolü (her numune aynı koşullar kullanılarak ekstre edilir) hem de tekrar kontrolü (her hücre, farklı çözücülerle farklı koşullar kullanılarak ekstre edilebilir) sunar. Basıncılı çözücü ekstraksiyon cihazı, çözücülerin yüksek sıcaklık ve basınçlarda kullanılmasıyla ilgili güvenlik sorunlarını en aza indirmek için tasarlanmış birçok özelliği de içerir. Uygulanmakta olan güvenlik önlemleri arasında yangıcı buhar sensörleri, sıvı sızıntı dedektörleri, toplama kabı aşırı doluluk koşulları için kontroller, üç seviyeli aşırı basınç önleme (elektronik ve mekanik), çözücü akışı izleme ve pnömatik basıncı izleme yer alır [72].

3.3. Zeytin Pirinası ve Yaprağının Ekstraksiyonu ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Yapılan çalışmalarda metanol ve etanol ile ekstraksiyonun toplam fenolik içerik için en iyi ekstraksiyon oranlarını gösterdiğini ve elde edilen ekstraktların en yüksek antioksidan aktiviteyi sunduğu gözlemlenmiştir [73]. Örneğin zeytin pirinasından fenoller çıkarılmak için asitlendirilmiş (pH 2) su-metanol karışımları (80:20) kullanılmışlardır [74]. Etanol, metanolden daha az polardır ve tercihen daha fazla lipofilik ve yapısal olarak karmaşık fenolik bileşikler çıkarır. Fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek ve böylece fenolik bileşiklerin daha yüksek geri kazanımlarını sağlamak için bazı yazarlar, daha yüksek sıcaklık ve basınçta ekstraksiyon sistemlerinde etanol kullanımını tercih etmişlerdir. Çözücü olarak etil asetat, düşük veya orta moleküler kütleli

fenolik bileşikler için oldukça seçici olduğundan bazı yazarlar tarafından zeytin değirmeni atık sularında ve zeytin pirinasından ayrılan bitkisel sularda da kullanılmıştır. Düşük toksisitesi ve alımı nedeniyle etil asetat kullanımını güvenli kabul edilir; ancak bu çözücü numunelerde organik bir koku bırakır ve bu da gıda maddelerinde hoş olmayan bir özelliktir [56]. Kloroform da zeytin yaprağı ve posasından fenoliklerin çıkarılması için kullanılmıştır. Kloroform:metanol (9:1) ve metanol test edilmiştir ancak yalnızca metanol özütle antioksidan aktivite göstermiştir [75]. Herhalükarda kloroformun kanserojen olması nedeniyle gıda ürünlerinde kullanımını sınırlandırılmıştır. Sonuç olarak kloroform gıda uygulama amaçları için değil bileşiklerin tanımlanması ile ilgili araştırmalar için kullanılmaktadır [56].

Diğer çalışmalar;

- Çalışma 1: Zeytin yapraklarından Oleuropein'i geri kazanmak ve konsantre etmek için solvent ekstraksiyonu ve membran ayırma teknolojisinin entegrasyonu kullanılmış. Bu çalışmada, zeytin yapraklarından ekstrakte edilen toplam fenolik bileşiklerin içeriğine ekstraksiyon çözücüsünün (tipi, bileşimi) etkisini araştırmışlardır. Çözücü ekstraksiyonu ve membran ayırma teknolojisinin entegrasyonunun, zeytin yapraklarından oleuropein ve fenolik bileşiklerin geri kazanımı ve konsantrasyonu için verimli olduğu sonucuna varılabileceği bildirilmiştir [76].

- Çalışma 2: Zeytin yapraklarından fenolik bileşikler ve elenoik asitlerin yüksek bir geri kazanımını elde etmek için basınçlı sıvı ekstraksiyonu kullanılmış. En yüksek basit fenol içeriğini elde etmek için sıcaklık (50–200°C), %etanol-su (%0-100) ve ekstraksiyon süresi (5–20 dakika) basınçlı sıvı ekstraksiyonu koşullarını optimize etmek için bir Box-Behnken tasarımı yapılmış. Zeytin yaprağı ekstreleri, kütle spektrometrisi (HPLC-MS) ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile analiz edilmiş. 138°C'lik optimum sıcaklık, büyük bir fenolik geri kazanım göstermiştir ve %100 etanolün gıda endüstrisinde kullanım için güvenli bir çözücü olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, kısa ekstraksiyon süreleri (5 dakika), daha düşük enerji tüketimi ve daha düşük maliyetler anlamına gelmektedir. Bu nedenle, bu basınçlı sıvı ekstraksiyonu optimum koşullarının endüstriyel ölçekte uygulanabilir olduğu bildirilmiştir [77].

- Çalışma 3: Bu çalışmanın amacı, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon kullanılarak zeytin yapraklarından toplam fenolik bileşikler ve antioksidan aktivite üzerindeki farklı ekstraksiyon parametrelerinin etkilerini değerlendirmektir. Zeytin yapraklarının yüksek antioksidan aktiviteye sahip iyi bir

fenolik bileşik kaynağı olduğu gösterilmiştir. Daha yüksek bir sıcaklıkta (86°C) mikrodalga destekli ekstraksiyon, kısa ekstraksiyon süresi (3 dakika) ile toplam fenolik bileşen verimi açısından daha verimli bulunmuş. Çözücü olarak su ile gerçekleştirilen mikrodalga destekli ekstraksiyon, zeytin yaprağı hücrelerinin parçalanmasında etkiliydi ve böylece bileşiklerin salınmasını teşvik etmiş. Ek olarak, biyoaktif bileşiklerin geri kazanımını iyileştirmek için ultrason destekli ekstraksiyona bir ön işlem olarak mikrodalga destekli ekstraksiyonun kullanılmasının potansiyel faydası rapor edilmiştir ve ekstraksiyon prosesini yoğunlaştırmanın bir aracı olarak kullanılabilir olduğu bildirilmiştir [78].

- Çalışma 4: Bu çalışmada, kolin klorür ([Ch]Cl) ve dört (poli-)karboksilik asit ile hazırlanan derin ötektik çözücüler (DES) ile pirinadan fenolik bileşik ekstraksiyonu değerlendirilmiştir. Sıcaklık, çözücüye su ilavesi ve katı-sıvı oranı, kontrol olarak DES ve etanol ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik içeriği ve antioksidan aktivitesinde değerlendirilmiştir. Ayrıca solvent ve ekstraktların antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. DES özü ile su içinde yağ emülsiyonu hazırlanmış, karakterize edilmiş ve oksidatif stabilitesi analiz edilmiş. Toplam fenolik içeriği en yüksek olan ekstraktın [Ch]Cl:malonik asit ile elde edildiği bildirilmiştir. Optimal koşullar altında, DES etanolden %9 daha fazla toplam fenolik içerik çıkarmış. DES ekstraktı etanolik ekstraktan üstün antibakteriyel aktivite göstermiş ve su içinde yağ emülsiyonundaki varlığı, su ile hazırlanana kıyasla indüksiyon süresini 10 kat arttırmış. Bu sonuçlar, DES'in, antibakteriyel ve teknolojik faydalar ile zeytin pirinasından fenolik bileşik ekstraksiyonu için potansiyel bir çözücü olduğu bildirilmiştir [79].

- Çalışma 5: Enzimlerin (selülaz, pektinaz ve tanaz) eşzamanlı kullanımı ve mikrodalga işleme, zeytin pirinası fenolik ekstrakte edilebilirlik ve bileşim açısından değerlendirilmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon, solvent olarak su kullanan geleneksel solvent ekstraksiyonuna benzer fenolik ekstrakte edilebilirlik, daha yüksek bir katı-sıvı oranı (1:15'e karşı 1:50, g/ml) ve daha kısa reaksiyon süresi (17'ye karşı 120 dakika) göstermiş. Mikrodalga işlemi sırasında enzimlerin kullanılması, fenoliklerin daha yüksek ekstraksiyon sıcaklığında (60°C) ve daha hızlı ısıtma stratejisinde (5 dakika rampa süresi) artan ekstrakte edilebilirliğine yol açmıştır. Mikrodalga enzim destekli ekstraksiyon ve enzim destekli ekstraksiyon, daha yüksek konsantrasyonda fenolik alkoller (22-48 mg/kg) ve asitler (hidroksitirozol dahil) (17-26 mg/kg) içeren fenolik ekstraktlar üretmiş [80].

• Çalışma 6: Zeytin pirinasından hidroksitirosol, maslinik asit ve oleanolik asit ekstraksiyonunu geliştirmek için ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon ve solvent ekstraksiyon tekniği kullanılmıştır. Süreç parametreleri, kinetik, termodinamik ve ayrıca yeşillik değerlendirme analizi aracılığıyla değerlendirip karşılaştırılmış. Sonuçlar, ultrason destekli ekstraksiyonun güçlü bir kavitasyon etkisi ve kinetik sabitleri (h , C_e ve K) ve termodinamik parametreleri (ΔH , ΔS ve ΔG) içeren en güçlü kütle ve ısı transferi verimliliği nedeniyle maksimum bileşikleri verdiğini bildirmiştir [81].



4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, basınçlı çözücü ekstraksiyonu ile %50 etanol pirina ve zeytin yaprağından Oleuropein ve polifenoller kullanılarak, sıcaklık (°C), zaman (dk) ve pH bağımsız değişkenleri kullanılarak deney tasarımı yapılmış ve bu faktörlerin ekstraksiyon verimi, polifenolik madde miktarı ve verimi, ekstrelerin antioksidan aktivitesi (DPPH serbest radikal süpürücü etki) üzerine etkisi incelenmiştir.

4.1. Hammadde

Çalışmada İzmir'in Bergama ilçesinde üretim yapan zeytinyağı fabrikasından sağlanan zeytin pirinası ve aynı yöreden toplanan zeytin yaprakları kullanılmıştır. Kurutulan hammaddelerden pirinanın nemi %5,71, zeytin yaprağının nemi %4,94 olarak ölçülmüştür. Ekstraksiyon işleminden önce hammaddenin boyutu öğütme işlemi ile küçültülmüştür.

4.2. Öğütme

Çalışmada pirina ve zeytin yaprağı kahve öğütücüsü ile öğütülüp elek serisi kullanılarak elenmiş ve ortalama parçacık boyutu 0,5mm olacak şekilde kullanılmıştır. Pirina ve zeytin yapraklarının içerdiği nem sırası ile %5,7 ve %5 olarak ölçülmüştür.

4.3. Pirina ve Zeytin Yaprağından Polifenolik Maddelerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu

Dionex ASE 350® Basınçlı çözücü ekstraksiyon sistemi ile yapılan çalışmalarda, 2,5g hammadde (zeytin yaprağı ve pirina) 22ml'lik ekstraksiyon hücrelerinde ekstre edilmiştir. Hammadde ekstraksiyon hücresine yerleştirildikten sonra boş kısım cam bilyeler ile doldurulmuştur. Çizelge 4.1'de verilen ekstraksiyon parametreleri kullanılarak ekstraksiyonlar yapılmıştır. Ekstre çözeltilerindeki organik çözücüler 40°C'de vakum altında döner buharlaştırıcıda (Buchi vacuum pump V-300) uzaklaştırılmıştır. Sulu kısım dondurulduktan sonra liyofilizatörde (Christ Alpha 2-4 LD) kurutulup ham ekstre elde edilmiştir. Ham ekstrelerde toplam fenol miktarı, toplam flavonoid miktarı, DPPH antioksidan aktivitesi ve Oleuropein miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Basınçlı Çözücü ekstraktöründe çalışılan parametreler.

pH	1,97/3/4,5/6/7 (Fosforik Asit)
Sıcaklık	25°C/50°C/75°C/100°C/117°C
Ekstraksiyon Zamanı	10dk/15dk/23dk/30dk/35dk
Uygulanan Basınç	1500psi sabit
Kullanılan Çözücü	Etanol:Su (50:50)
Cycle (kademe) Sayısı	1
Yıkama Çözücü	Ekstraktör hacminin %100'ü
Kullanılan Çözücü	30-35 (yıkama çözücüsü dahil)
Hammadde Miktarı	2,5g

4.4. Cevap Yüzey Yöntemi ile Deney Tasarımı

Pirina ve Zeytin Yaprağı numunelerinin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonunda kullanılan parametrelerin birbirleri üzerindeki etkileşimini görebilmek ve maksimum cevabı bulabilmek için Cevap Yüzey Yöntemi (Response Surface Methodology-RSM) yöntemi kullanılarak deney tasarımı yapılmıştır [70].

Cevap Yüzey Yöntemi ilgilenilen cevabın birkaç parametre tarafından etkilendiği problemlerin modellenmesi ve analiz için kullanılan matematik ve istatistik tekniklerinin birleşimidir. Amacı cevabı optimize edebilecek modeli geliştirmektir. Yöntemin temeli, çok sayıda bağımsız değişken ve bunlara bağlı bir ya da birkaç ölçülen cevap (bağımlı değişken) arasındaki ilişkinin belirlenmesi ve uygun bir fonksiyon yaklaşımı ile geliştirilen modelde optimum işletme koşullarını belirlemektir [70].

X_1, X_2, \dots, X_n ölçülebilir, sürekli ve kontrol edilebilir parametreleri ve Y cevap değişkenini göstermek üzere cevap yüzeyi şu şekil ifade edilebilir.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_n) \quad (4.1)$$

Bu denklemdaki f ile ifade edilen cevap yüzeyi fonksiyonu birinci derece veya ikinci derece bir fonksiyon olabilir.

Örneğin fonksiyon yaklaşımı ikinci derece polinom alınırsa;

$$y = \beta_0 + \beta_i X_i + \beta_{ii} X_{i2} + \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (4.2)$$

eşitliği kullanılır.

ε , y cevabında gözlenen gürültü veya hatadır.

Bu eşitliklerde β değeri öngörülen modelde bulunan regresyon katsayıları X_i kullanılan faktörlerdir (parametreler).

Eğer cevap, bağımsız değişkenlerin lineer bir fonksiyonu ile iyi modelleniyorsa, yaklaşım fonksiyonu birinci derecedir;

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \dots + \beta_kx_k + \varepsilon \quad (4.3)$$

Eğer sistemde bir eğim açısı varsa, yüksek dereceli bir polinom kullanılmalıdır. Örneğin ikinci derece model;

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_j \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (4.4)$$

Bu çalışmada deney planı Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak ‘Merkezi Bileşen’ (Central Composite Design) yöntemi ile oluşturulmuştur. Tasarım değişken sayısı (n)=3 olmak üzere, 8 faktöriyel nokta (2^n), 6 eksenel nokta ($2n$) ve merkez noktada 6 tekrar deneyi ile toplam 20 deneyden oluşmaktadır. Çözücü karışımı %50 Etanol’ün kullanıldığı ve tek kademede gerçekleştirilen deneylerde incelenen sıcaklık (T, °C), Zaman (Z, dk) ve pH parametrelerin seviyeleri Çizelge 4.2’de, bağımsız değişkenlerin istatistiksel kombinasyonu Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Bağımsız değişkenlerin regresyon analizi, ana ve ikili etkilerinin belirlenmesi, kontur yüzeylerin çizimi için paket program MINITAB 17.00 sürümü kullanılmıştır [70].

Çizelge 4.2. Ekstraksiyon çalışmasında incelenen parametreler ve seviyeleri.

Faktörler	Seviyeler		
	-1	0	1
X1: Sıcaklık (°C)	50	75	100
X2: Zaman (dk)	15	23	30
X3: pH	3	4,5	6

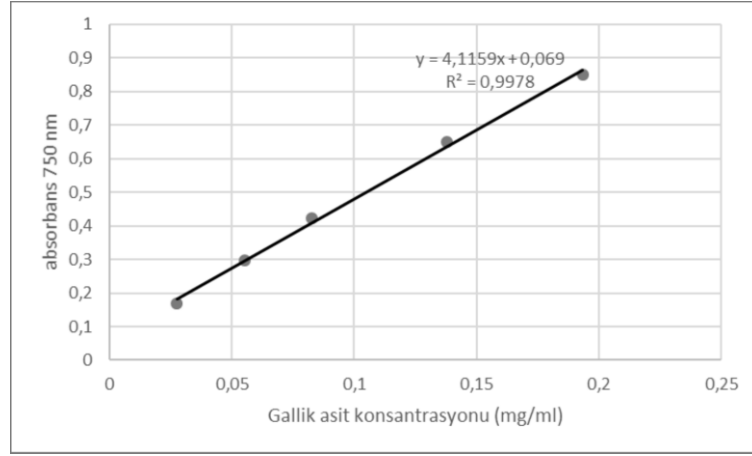
Çizelge 4.3. Ekstraksiyon çalışmasında bağımsız değişken istatistiksel kombinasyonu.

Deney No	T(°C)	Zaman (dk)	pH
1	75	9,89	4,5
2	100	15	6
3	50	15	3
4	100	30	6
5	50	30	3
6	75	35,11	4,5
7	117,04	22,5	4,5
8	75	22,5	4,5
9	50	30	6
10	32,96	22,5	4,5
11	75	22,5	7,02
12	100	30	3
13	75	22,5	1,98
14	75	22,5	4,5
15	75	22,5	4,5
16	75	22,5	4,5
17	75	22,5	4,5
18	50	15	6
19	100	15	3
20	75	22,5	4,5

4.5. Fenolik Bileşiklerin Miktarlarının Belirlenmesi

4.5.1. Toplam fenolik (TP) bileşen tayini

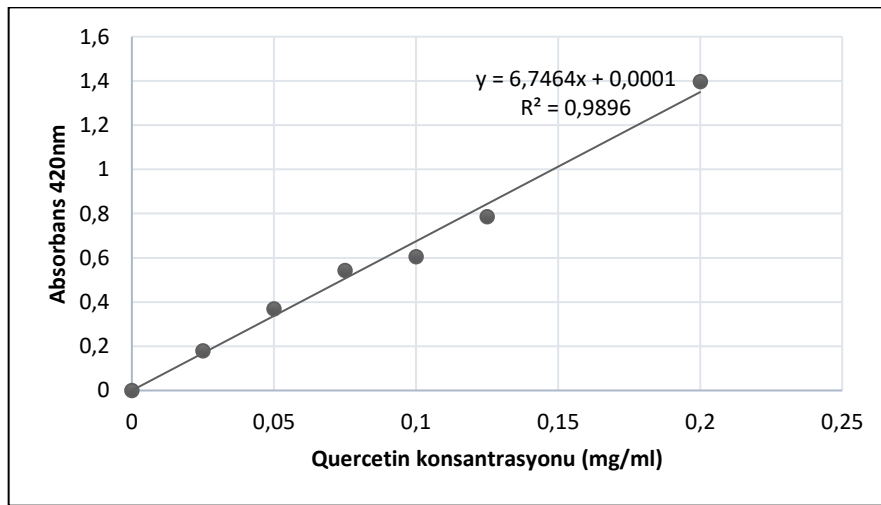
Ekstrelerin içermiş olduğu toplam fenolik madde miktarları Folin Ciocalteu yöntemi ile spektrofotometrik olarak gallik asit (GA) eşdeğeri üzerinden (g GAE/g) tayin edilmiştir. Kullanılan bu yöntem organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifini indirgeyip kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu reaktifi burada oksitleyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş reaktifin oluşturduğu mavi rengin absorbansının ölçülmesiyle analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Oluşan kompleksin renk şiddeti fenolik maddelerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır [82]. Liyofilize edilmiş numunelerden (mg/ml) 0,1 ml örnek çözeltisi, 0,5 ml Folin-Ciocalteu (%10) çözeltisi ve 1,5 ml Na₂CO₃ (%20) çözeltisi vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiş ve UV spektrofotometrede (Shimadzu UV-1800 UV-Vis Spectrophotometer) 750nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Kör olarak distile su kullanılmıştır. Sonuçlar gallik asit kalibrasyon eğrisi kullanılarak ($r^2=0,998$) gallik asit eşdeğer olarak mg GAE/g ekstre olarak hesaplanmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınmıştır.



Şekil 4.1. Gallik asitin toplam fenol analizi kalibrasyon eğrisi.

4.5.2. Toplam flavonoid miktarı analizi

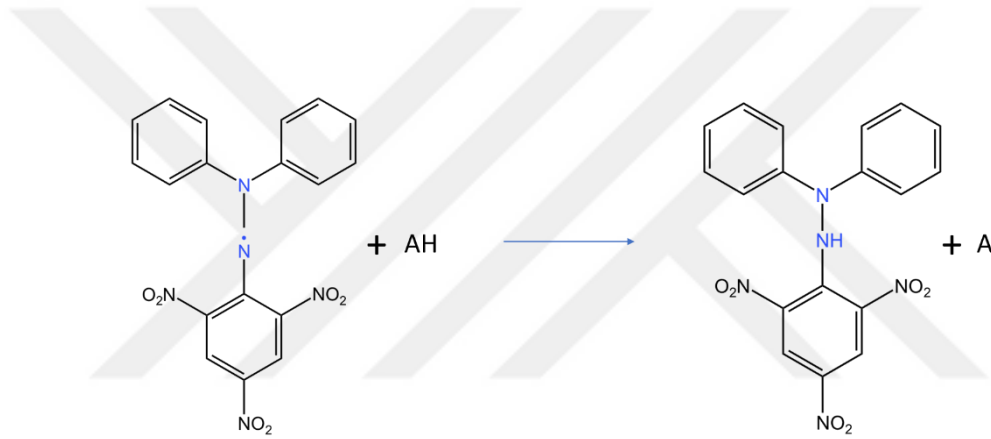
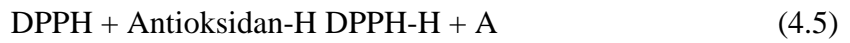
Uygun konsantrasyondaki analiz örneğinden deney tüpüne 0,5ml alınarak üzerine 1,5ml metanol ve 2,8ml distile su ilave edilmiştir. 0,1ml %10 $AlCl_3$ ve 0,1ml % 10 sodyum asetat ilave edilmiştir. 1 saat karanlıkta oda sıcaklığında bekletilip, karışımın adsorbansı 420nm’de absorbens değerleri okunmuştur. Kör olarak distile su kullanılmıştır. Standart flavonoid olarak Quercetin kullanılmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve sonuçların ortalaması alınmıştır.



Şekil 4.2. Quercetin toplam flavonoid analizi kalibrasyon eğrisi.

4.5.3. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite tayini

Kararlı bir organik azot radikal bileşiği olan 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali (DPPH), antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu yöntem DPPH'ın metanol yardımı ile hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanır.



Şekil 4.3. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.

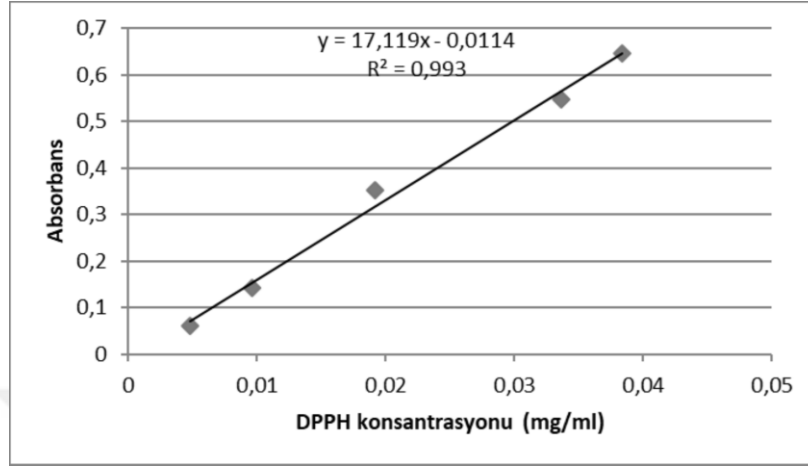
Metanol içerisinde hazırlanan örnek çözeltisi (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonu $1,25 \times 10^{-3} \text{ g/l}$) üzerine DPPH ($2 \times 10^{-2} \text{ g/l}$) çözeltisi ilave edilerek vorteks yardımı ile oda sıcaklığında ve karanlıkta 30dk bekletildikten sonra 517nm'de absorbans değeri okunmuştur. Kör olarak metanol kullanılmıştır. 1×10^{-3} ve $2 \times 10^{-2} \text{ g/l}$ konsantrasyon aralığında DPPH standardı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) hesaplanmıştır.

$$A_{517nm} = 17,119(\text{DPPH})_t + 0,01(R^2 = 0,996) \quad (4.6)$$

30 dakika sonunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{DPPH}_{kalan} = \frac{(\text{DPPH})_{t=30}}{(\text{DPPH})_{t=0}} * 100 \quad (4.7)$$

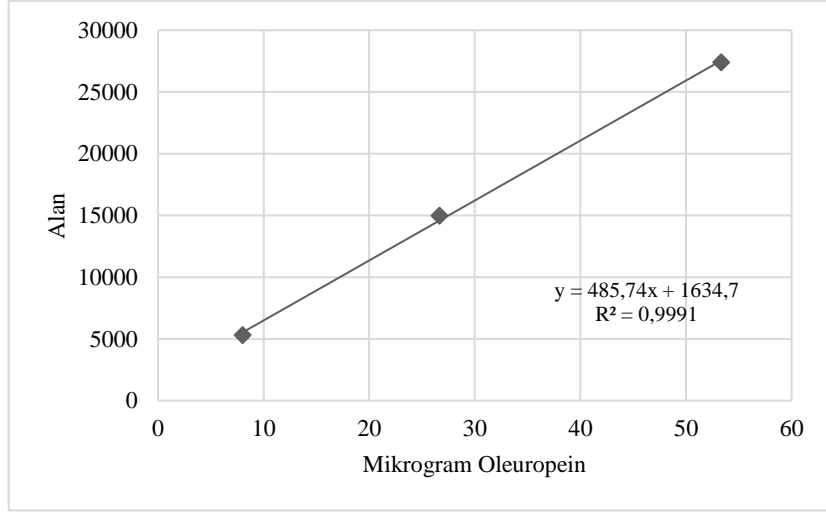
Sonuçlar DPPH'nin %50'sinin süpürüldüğü (inhibe edildiği) konsantrasyon (EC_{50} μ g/ml) cinsinden değerlendirilmiştir.



Şekil 4.4. DPPH konsantrasyon-absorbans kalibrasyon eğrisi.

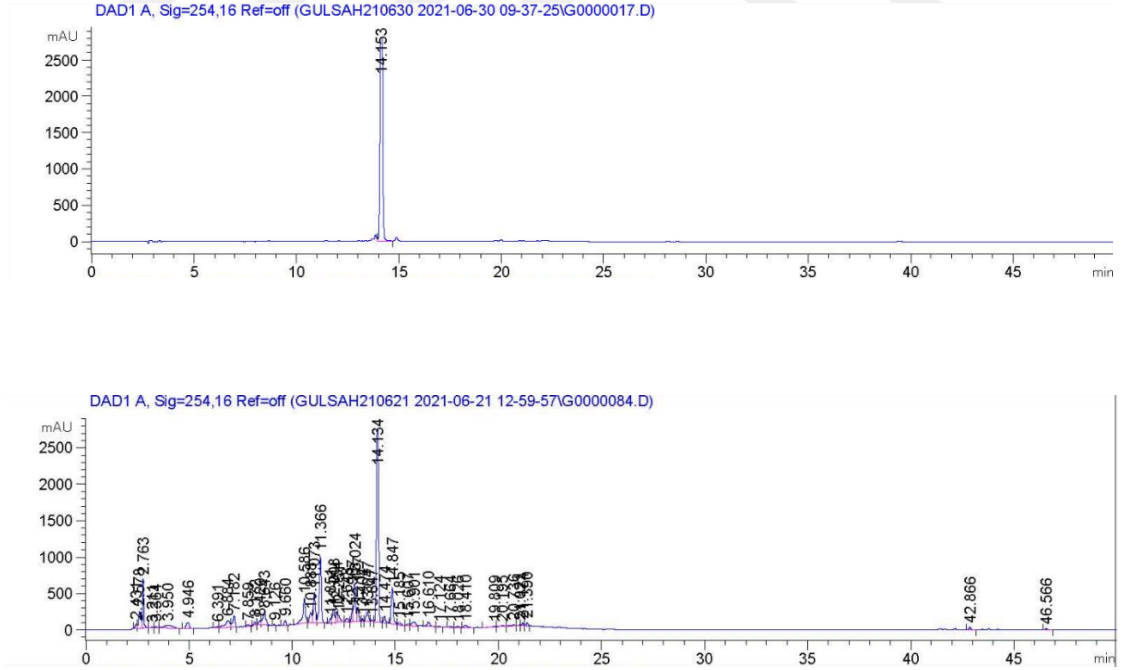
4.5.4. Yüksek basınçlı çözücü kromatografisi ile oleuropein miktar tayini

Oleuropein Yüksek Basınçlı Çözücü Kromatografisi yöntemi ile miktarlarının belirlenmesi çalışmalarında dörtlü pompa, Diode Array Dedektör (DAD), otomatik enjeksiyon ünitesi ve kolon fırınından oluşan Agilent 1100 serisi yüksek Basınçlı Çözücü kromatografi sistemi kullanılmıştır. Ayırımılar 30°C'de ters faz kolonda [250x4,6mm i.d., 5- μ m, Kromsil C₁₈ (Technocroma)] gradient çözücü sistemi ile gerçekleştirilmiş, kromatogramlar 254nm'de değerlendirilmiştir. 1ml/dk akış hızında, (A) Formik asit:su ve (B) asetonitril hareketli faz olarak kullanılmıştır. Gradient programı 0'dan %2 B'ye 2 dakikada, 2'den %10 B'ye 5 dakikada, 10'dan %30 B'ye 25 dakikada, 30'dan %50 B'ye 35 dakikada, 50'den %60 B'ye 40 dakikada, 60'dan %90 B'ye 45 dakikada artırılmış ve 2 dakikada başlangıç konsantrasyonuna dönmüştür. Miktar tayinleri ticari olarak sağlanan standart Oleuropein kalibrasyon eğrisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Oleuropein kalibrasyon eğrisi

Örnekler kolona verilmeden önce Nylon membran (40µm) filtrelerden süzölmüş ve iki enjeksiyonun ortalama değeri kullanarak miktar tayinleri gerçekleştirilmiştir. Standart Oleuropein ve ekstreye ait örnek kromatogramlar Şekil 4.6.'da verilmiştir.



5. DENEYSEL BULGULAR

Çalışmada Basınçlı Çözücü ekstraksiyonu tekniği ile zeytin yaprak ve pirinasından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı kullanılarak ekstraksiyon parametrelerinin (sıcaklık, pH, zaman) ekstredeki fenolik bileşen miktarı, flavonoid miktarı, Oleuropein miktarı ve ekstrenin antioksidan aktivitesi (DPPH) üzerine etkileri incelenmiştir.

5.1. Cevap Yüzey Yöntemi Deney Tasarımı ile Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu

Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu parametrelerinin ekstre edilen toplam fenolik bileşen ve DPPH aktivitesi ve en yüksek verimin ve antioksidan aktivitenin elde edildiği koşulları belirlemek için gerekli deney planının oluşturulması amacıyla Cevap Yüzey Yöntemi (RSM) uygulanmıştır. Bölüm 3.5’de açıklandığı gibi parametrelerin alt ve üst değerleri, sıcaklık için 50-100°C, zaman için 15-30dk ve pH için 3-6 seçilmiştir. Bağımsız değişkenlerin değerlerinin ve bu noktalarda yapılan deneylerden elde edilen cevapların (ekstre verimi (%), toplam fenolik bileşen (TF), Toplam flavonoid (TFL) verimleri, Oleuropein miktarı ve DPPH aktivite) ikinci derece polinom modeline uygunluğu ve parametrelerin tekli ve çoklu etkileri %5 ($\alpha=0,05$) anlamlılık seviyesinde varyans analizi (ANOVA) ile belirlenmiştir.

5.2. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Zeytin Yapağının ve Pirinanın Ekstre Verimi Üzerine Etkisi

5.2.1. Zeytin yapağı ekstraksiyon verimine etkisi

Ekstre verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak %22,55-36,50 arasında değişmiştir. En yüksek yaprak ekstre verimi (%36,5) 75°C, 22,5dk, pH 1,98’de ve en düşük verim ise (%22,55) 75°C, 22,5dk, pH 4,5’da elde edilmiştir.

Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonundan elde edilen ekstre verimleri (Çizelge 5.1) de verilmiştir. Ekstre verimleri sonuçları Bölüm 4.2’de verilen birinci ve ikinci derece polinom yaklaşımına uygulanmıştır. Ekstre verimleri için yapılan varyans analizi sonucunda %95 güven aralığında ($p=0,05$) sıcaklık haricinde hiçbir tekli veya ikili etkilerin verim üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Sıcaklık ise ekstraksiyon verimi üzerine doğrusal olarak etki etmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 5.2). Ekstraksiyon verimi için etkili ve etkisiz bütün parametrelerin kullanıldığı için ikinci derece polinom model eşitliği aşağıda verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$Z. \text{Yaprak Verimi}(\%) = 43,6 - (0,031 * T) - (0,403 * t) - (6,27 * pH) + (0,00075 * T^2) + (0,0112 * t^2) + (0,483 * pH^2) - (0,00084 * T * t) + (0,0141 * T * pH) - (0,0004 * t * pH) \quad (5.1)$$

Deneylerden elde edilen ekstre verimleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R^2) 0,7169 olarak bulunmuştur. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerdeki değişimin yaklaşık %72'sinin açıklanabileceğini ifade etmektedir. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz olduğu ($p < 0,05$) görülmüştür.

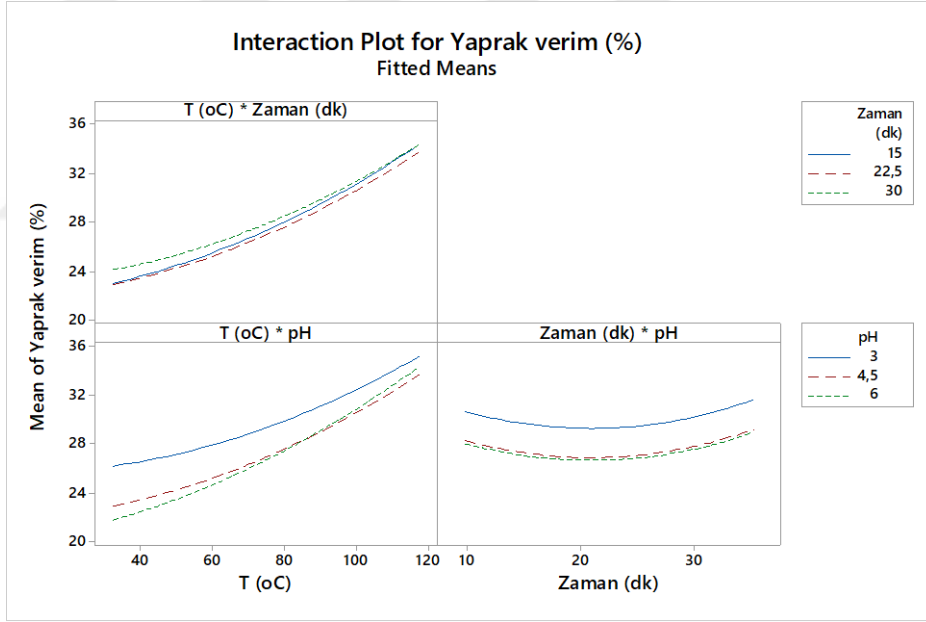
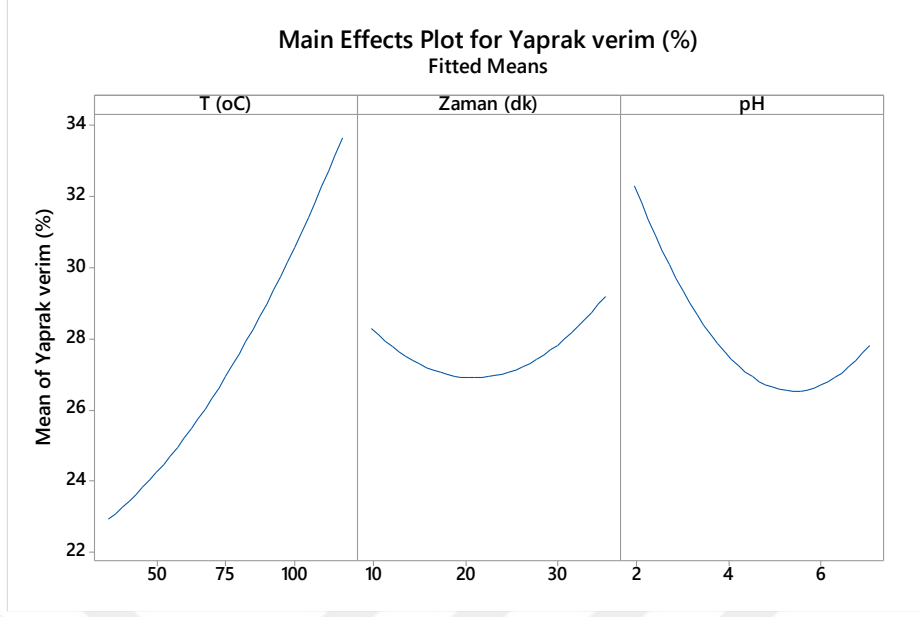
Çizelge 5.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstre verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Yaprak ekstre verimi (%)
1	75,00	9,89	4,50	28,52
2	100,00	15,00	6,00	32,67
3	50,00	15,00	3,00	25,85
4	100,00	30,00	6,00	32,14
5	50,00	30,00	3,00	25,97
6	75,00	35,11	4,50	30,26
7	117,04	22,50	4,50	34,51
8	75,00	22,50	4,50	28,00
9	50,00	30,00	6,00	25,68
10	32,96	22,50	4,50	23,37
11	75,00	22,50	7,02	24,86
12	100,00	30,00	3,00	31,10
13	75,00	22,50	1,98	36,50
14	75,00	22,50	4,50	27,13
15	75,00	22,50	4,50	22,55
16	75,00	22,50	4,50	27,93
17	75,00	22,50	4,50	28,25
18	50,00	15,00	6,00	24,80
19	100,00	15,00	3,00	30,83
20	75,00	22,50	4,50	27,47

Çizelge 5.2. Yaprak ekstre verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

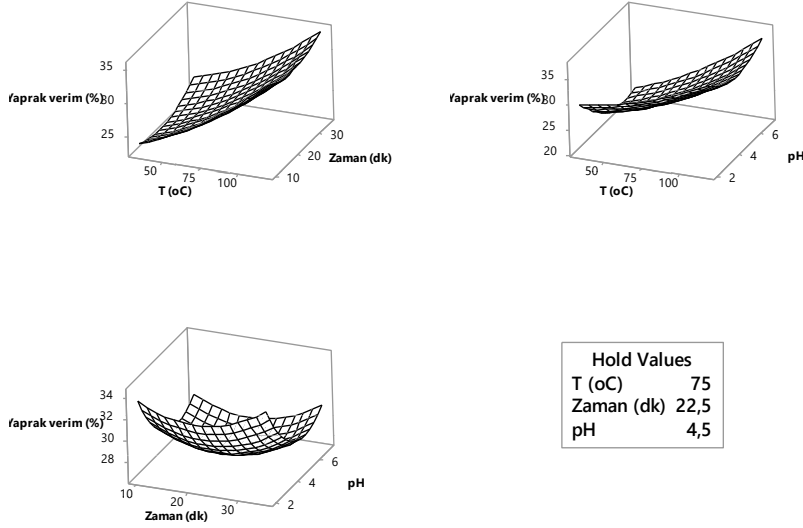
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	186,085	20,676	2,82	0,061
Linear	3	161,231	53,744	7,33	0,007
T (°C)	1	136,424	136,424	18,60	0,002
Zaman (dk)	1	0,986	0,986	0,13	0,722
pH	1	23,822	23,822	3,25	0,102
Square	3	22,426	7,475	1,02	0,425
T (°C)*T (°C)	1	3,188	3,188	0,43	0,525
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	5,713	5,713	0,78	0,398
pH*pH	1	17,004	17,004	2,32	0,159
2-Way Interaction	3	2,427	0,809	0,11	0,952
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,199	0,199	0,03	0,872
T (°C)*pH	1	2,228	2,228	0,30	0,594
Zaman (dk)*pH	1	0,000	0,000	0,00	0,996
Error	10	73,348	7,335		
Lack-of-Fit	5	49,964	9,993	2,14	0,212
Pure Error	5	23,384	4,677		
Total	19	259,433			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
2,70828	71,73%	46,28%	0,00%		

Yapraktan basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstre verimine tekli ve ikili etkileri Şekil 5.1, yüzey ve kontur grafikleri Şekil 5.2’de verilmiştir. Beklendiği üzere sıcaklığın ekstre verimi üzerine doğrusal etkisi görülmüştür. Ekstre verimi pH azaldıkça artmaktadır.

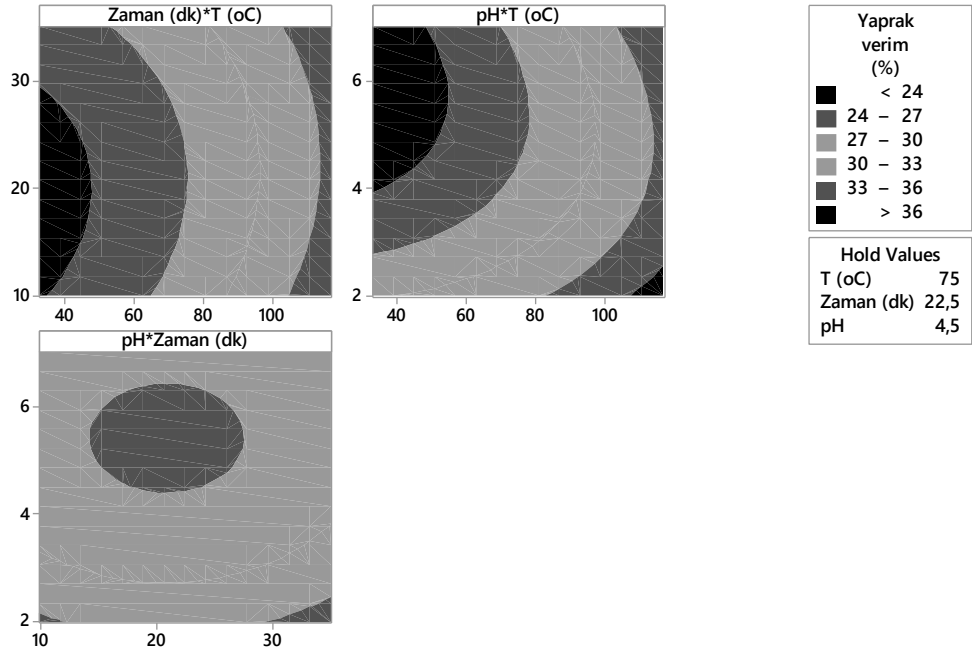


Şekil 5.1. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstre verimine tekli ve ikili etkileri.

Surface Plots of Yaprak verim (%)



Contour Plots of Yaprak verim (%)



Şekil 5.2. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.2.2. Pirina ekstre verimine etkisi

Pirinanın basınçlı çözücü ekstraksiyonunda ekstre verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak %2,54-17,0 arasında değişmiştir. En yüksek pirina ekstre verimi (%17) 75°C, 22,5dk pH 1,98'de ve en düşük verim ise (%2,54) 32,96°C, 22,5dk, pH 4,5'de elde edilmiştir (Çizelge 5.3).

Pirinanın ekstraksiyonunda pH'ın doğrusal ve kuadratik etkisi görülmüştür ($p < 0,05$) (Çizelge 5.4). Toplam ekstre verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir ($T(^{\circ}C)$, $t(dk)$, pH).

$$\begin{aligned} \text{Pirina verimi (\%)} = & 19,1 + (0,083 * T) + (0,267 * t) - (7,84 * pH) - \\ & (0,000984 * T^2) - (0,01146 * t^2) + (0,672 * pH^2) + (0,00330 * T * t) + \\ & (0,0089 * T * pH) - (0,0064 * t * pH) \end{aligned} \quad (5.2)$$

Pirinanın ekstre verimleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R^2) 0,7851 olarak bulunmuştur. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerdeki değişimin %79'unun açıklanabileceğini ifade etmektedir. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemli olduğu ($p < 0,05$) görülmüştür.

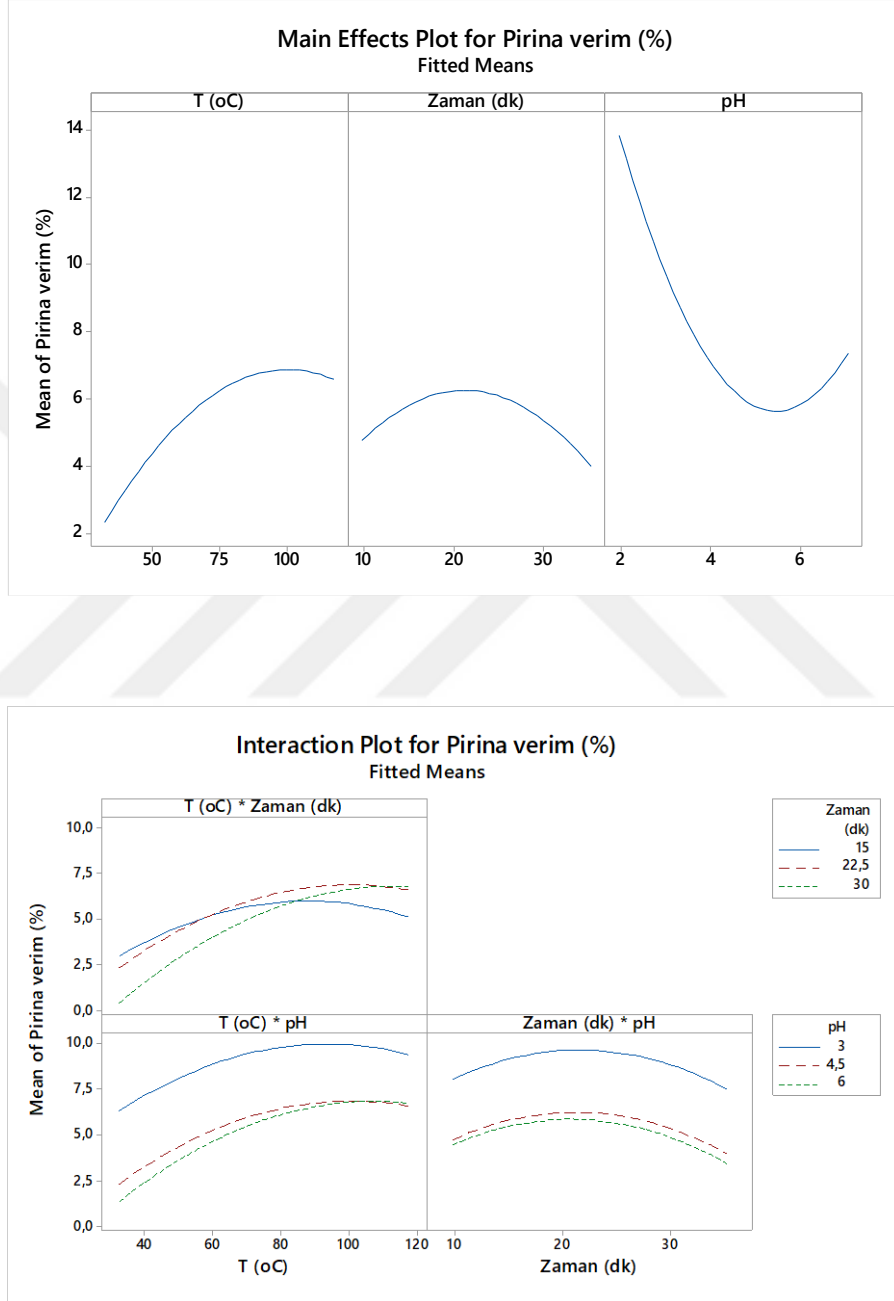
Çizelge 5.3. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstre verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Pirina ekstre verimi (%)
1	75,00	9,89	4,50	4,58
2	100,00	15,00	6,00	6,88
3	50,00	15,00	3,00	6,91
4	100,00	30,00	6,00	7,41
5	50,00	30,00	3,00	5,26
6	75,00	35,11	4,50	4,83
7	117,04	22,50	4,50	7,03
8	75,00	22,50	4,50	6,46
9	50,00	30,00	6,00	2,81
10	32,96	22,50	4,50	2,54
11	75,00	22,50	7,02	4,60
12	100,00	30,00	3,00	7,88
13	75,00	22,50	1,98	17,00
14	75,00	22,50	4,50	5,72
15	75,00	22,50	4,50	5,28
16	75,00	22,50	4,50	6,53
17	75,00	22,50	4,50	6,43
18	50,00	15,00	6,00	5,39
19	100,00	15,00	3,00	7,70
20	75,00	22,50	4,50	6,88

Çizelge 5.4. Pirina Ekstre verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

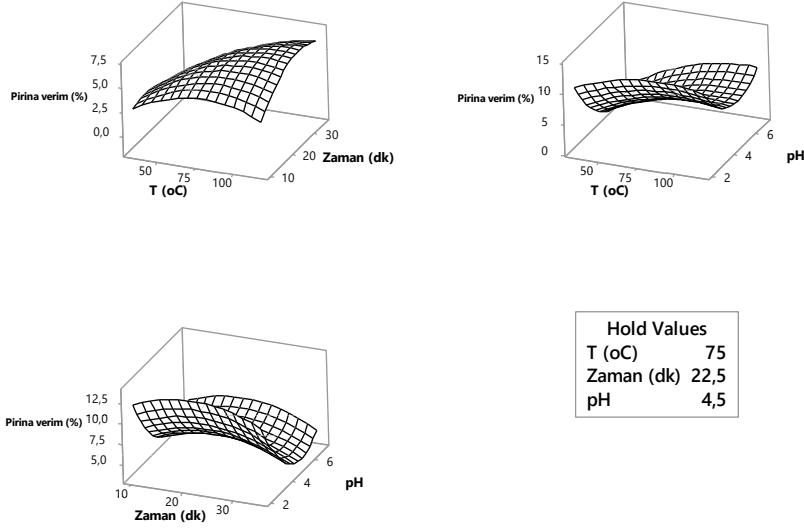
Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	125,129	13,9032	4,07	0,020
Linear	3	71,993	23,9977	7,03	0,008
T (°C)	1	21,327	21,3267	6,24	0,032
Zaman (dk)	1	0,697	0,6967	0,20	0,661
pH	1	49,970	49,9697	14,63	0,003
Square	3	49,146	16,3819	4,80	0,025
T (°C)*T (°C)	1	5,456	5,4557	1,60	0,235
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	5,985	5,9853	1,75	0,215
pH*pH	1	32,900	32,9002	9,63	0,011
2-Way Interaction	3	3,990	1,3300	0,39	0,763
T (°C)*Zaman (dk)	1	3,055	3,0546	0,89	0,367
T (°C)*pH	1	0,894	0,8943	0,26	0,620
Zaman (dk)*pH	1	0,041	0,0410	0,01	0,915
Error	10	34,158	3,4158		
Lack-of-Fit	5	32,397	6,4794	18,39	0,003
Pure Error	5	1,761	0,3523		
Total	19	159,287			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
1,84820	78,56%	59,26%	0,00%		

Pirinanın ekstraksiyon verimleri için ekstraksiyon parametrelerinin ekstre verimine tekli ve ikili etkileri Şekil 5.3, yüzey ve kontur grafikleri Şekil 5.4’de verilmiştir. Sıcaklık arttıkça pirina verimi artarken, pH arttıkça pirina ekstre verimi azalmıştır.

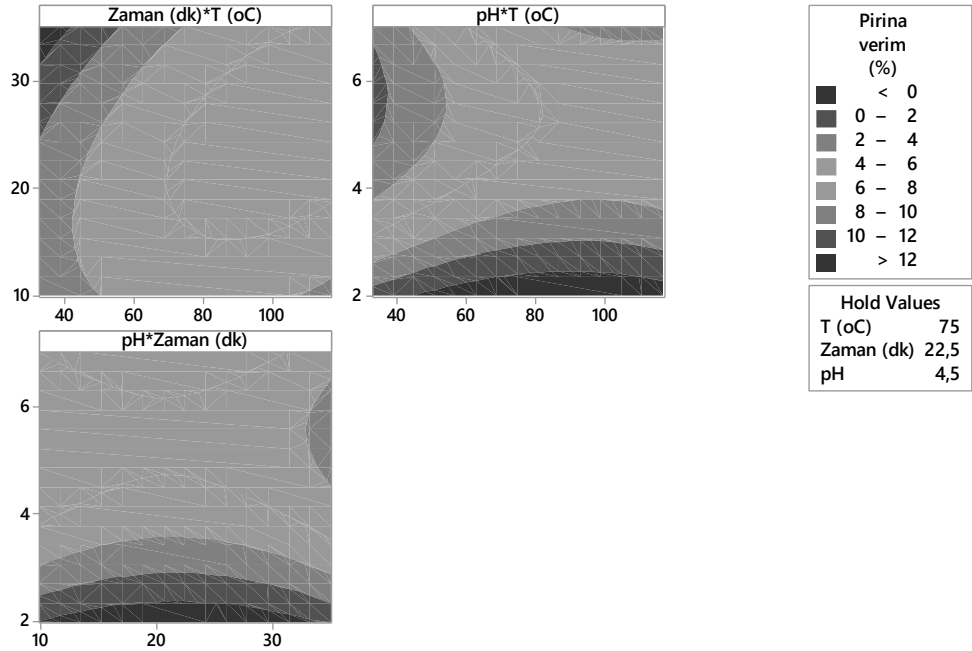


Şekil 5.3. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin pirinanın ekstre verimine tekli ve ikili etkileri.

Surface Plots of Pirina verim (%)



Contour Plots of Pirina verim (%)



Şekil 5.4. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstre verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.3. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Fenolik Bileşen Verimi Üzerine Etkisi

5.3.1. Zeytin yaprağının toplam fenolik bileşen verimine etkisi

Yaprak ekstresindeki fenolik bileşen verimi, parametrelere bağlı olarak 9,77-41,52 (mg GA/g yaprak) arasında değişmiştir. En yüksek fenolik bileşen verimi 75°C, 9,89 dk, pH 4,5’da en düşük fenolik bileşen verimi 75°C, 22,5dk, pH 1,98’de elde edilmiştir (Çizelge 5.5).

Toplam fenolik bileşen verimi için yapılan varyans analiz sonucunda pH’ın ikinci derece polinom etkisinin anlamlı olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur (Çizelge 5.6). Toplam fenolik bileşen verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir ($T(^{\circ}C)$, $t(dk)$, pH).

$$\begin{aligned} \text{Toplam Fenol Verimi} \left(\frac{mg \text{ GA}}{g \text{ Yaprak}} \right) = & -13,9 + (0,052 * T) - (2,51 * t) + \\ & (34,08 * pH) - (0,00047 * T^2) + (0,0362 * t^2) - (3,328 * pH^2) + (0,0133 * T * \\ & t) - (0,0485 * T * pH) - (0,101 * t * pH) \end{aligned} \quad (5.3)$$

Yaprak ekstresindeki toplam fenol verimi ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı R^2 0,8005 olarak bulunmuştur. Uyum eksikliği (lack of fit) ise önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$). Modeldeki bağımsız değişkenler verileri %80 oranında açıklamaktadır.

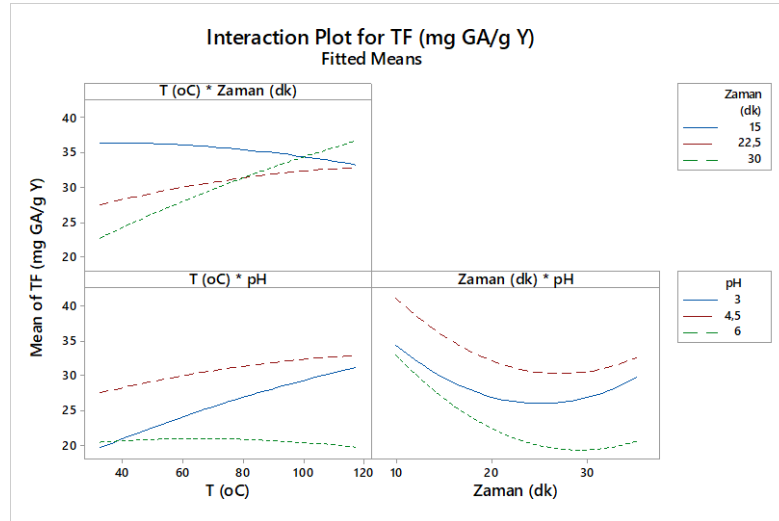
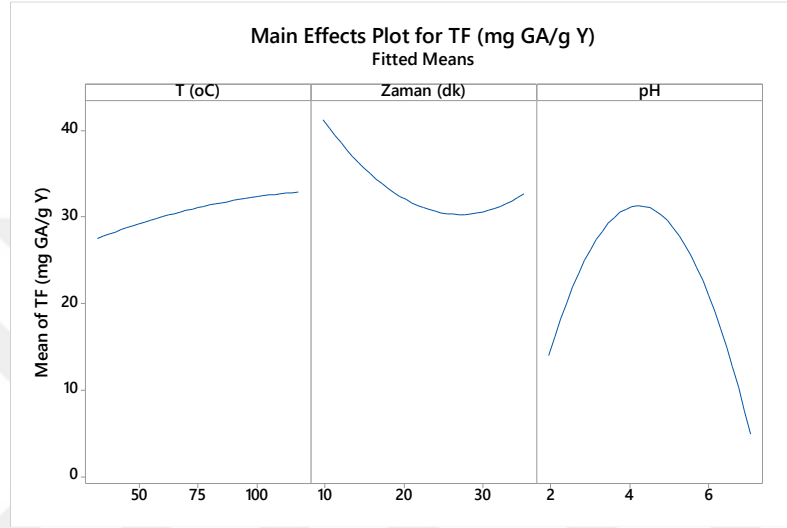
Çizelge 5.5. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki toplam fenolik bileşen verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	TF (mg GA/g yaprak)
1	75,00	9,89	4,50	41,52
2	100,00	15,00	6,00	17,23
3	50,00	15,00	3,00	31,24
4	100,00	30,00	6,00	17,01
5	50,00	30,00	3,00	25,55
6	75,00	35,11	4,50	34,32
7	117,04	22,50	4,50	39,19
8	75,00	22,50	4,50	33,00
9	50,00	30,00	6,00	14,23
10	32,96	22,50	4,50	23,46
11	75,00	22,50	7,02	12,17
12	100,00	30,00	3,00	30,32
13	75,00	22,50	1,98	9,77
14	75,00	22,50	4,50	28,30
15	75,00	22,50	4,50	24,33
16	75,00	22,50	4,50	32,97
17	75,00	22,50	4,50	34,80
18	50,00	15,00	6,00	29,72
19	100,00	15,00	3,00	31,30
20	75,00	22,50	4,50	32,70

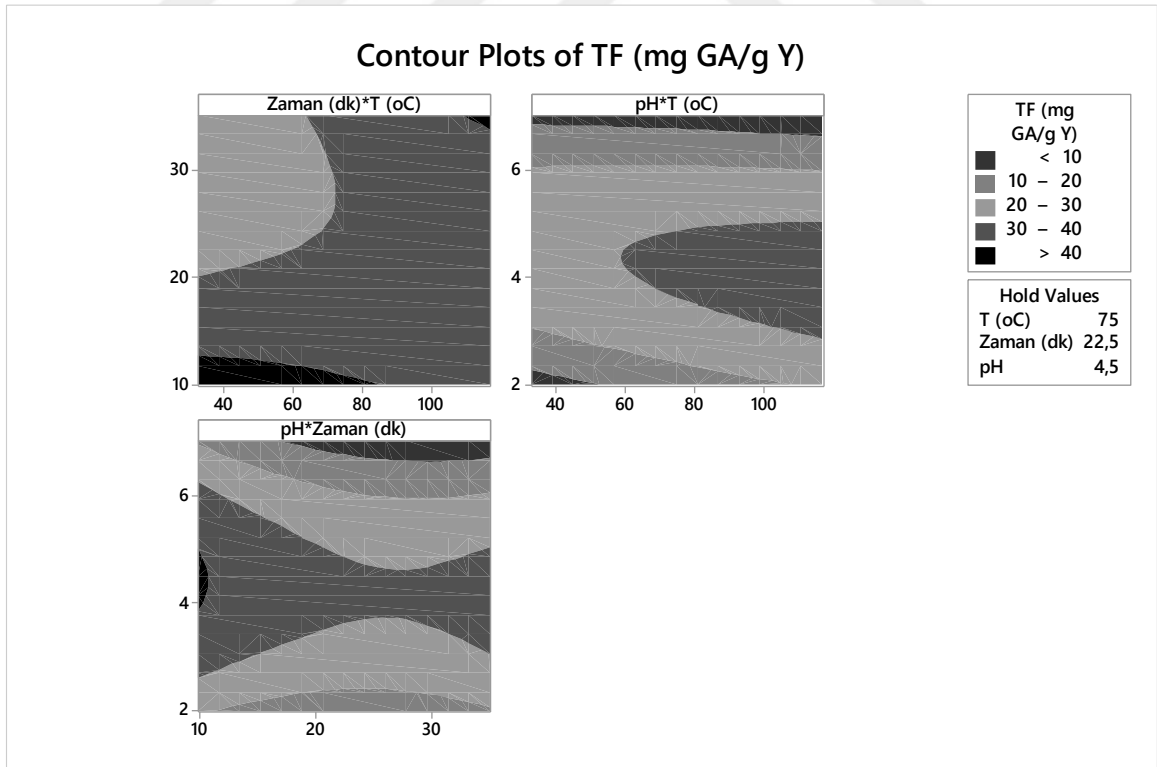
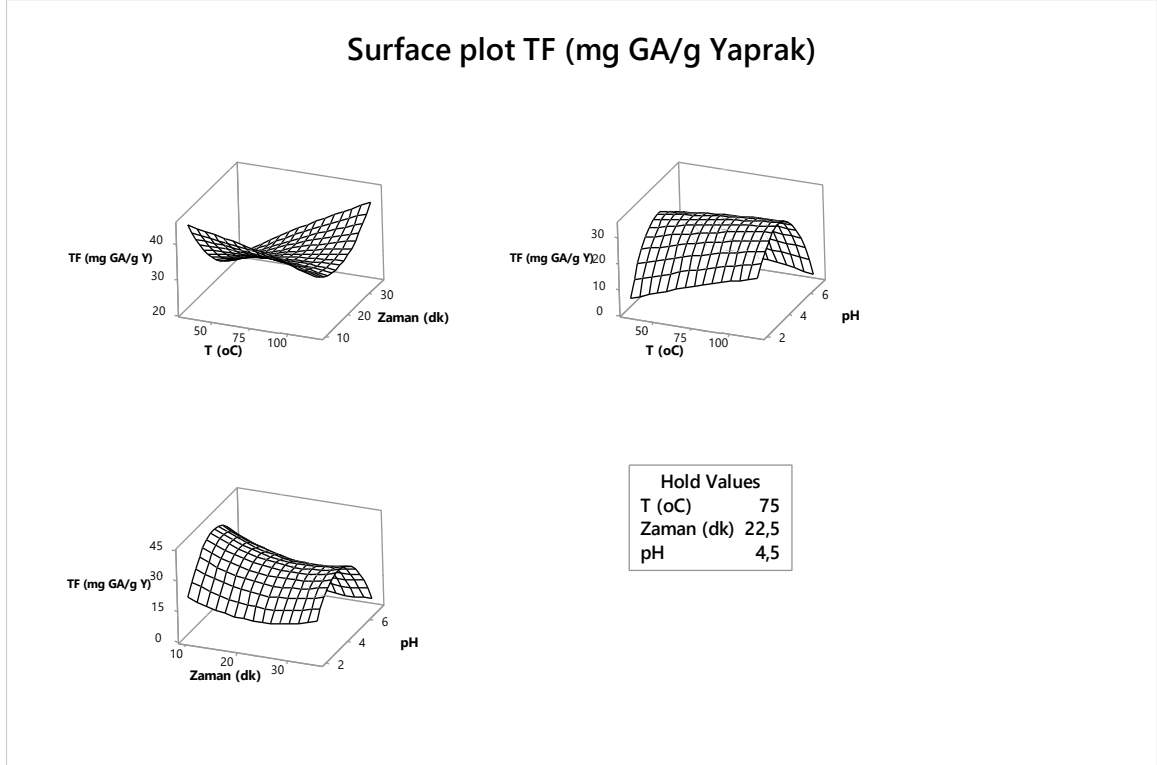
Çizelge 5.6. Yaprak toplam fenol verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	1225,04	136,116	4,45	0,014	
Linear	3	217,09	72,365	2,37	0,132	
T (°C)	1	34,11	34,112	1,12	0,316	
Zaman (dk)	1	87,06	87,062	2,85	0,122	
pH	1	95,92	95,921	3,14	0,107	
Square	3	921,36	307,121	10,05	0,002	
T (°C)*T (°C)	1	1,25	1,245	0,04	0,844	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	59,89	59,888	1,96	0,192	
<ph*ph< p=""></ph*ph<>	1	808,13	808,130	26,43	0,000	
2-Way Interaction	3	86,59	28,862	0,94	0,456	
T (°C)*Zaman (dk)	1	49,92	49,922	1,63	0,230	
T (°C)*pH	1	26,42	26,424	0,86	0,374	
Zaman (dk)*pH	1	10,24	10,239	0,33	0,576	
Error	10	305,73	30,573			
Lack-of-Fit	5	228,66	45,732	2,97	0,129	
Pure Error	5	77,07	15,414			
Total	19	1530,77				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
5,52929	80,03%	62,05%	0,00%			

Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g yaprak) tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.5 ve 5.6'da verilmiştir. Sıcaklık arttıkça toplam fenol verimi artmış, ekstraksiyon zamanı fenolik bileşenler üzerine negatif etki göstermiştir. TF verimi pH 4-5 aralığında maksimuma ulaşmıştır.



Şekil 5.5. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g yaprak) tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.6. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak ekstresindeki toplam fenolik bileşik verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.3.2. Pirinanın toplam fenolik bileşen verimine etkisi

Pirinanın %50 etanol ile basınçlı çözücü ekstraksiyonu sonucunda toplam fenolik bileşen verimi, parametrelere bağlı olarak 0,5-4,68 mg GA/g pirina arasında değişmiştir. En yüksek fenolik bileşen verimi 100°C, 30dk, pH 6'da en düşük fenolik bileşen verimi 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de elde edilmiştir (Çizelge 5.7).

Pirina ekstresindeki Toplam Fenolik Bileşen verimi için yapılan varyans analiz (Çizelge 5.8) sonucunda %95 güven aralığında (p=0,05), sıcaklık ve pH'ın toplam fenolik bileşen verimi üzerine doğrusal etkilerinin ve pH'ın sıcaklık ve zaman ile ikili etkilerinin anlamlı olduğu (p<0,05) bulunmuştur. Toplam fenolik bileşen verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$\begin{aligned} \text{Pirina Toplam Fenol Verimi} \left(\frac{\text{mg GA}}{\text{g Pirina}} \right) = & 0,18 - (0,0783 * T) + (0,027 * t) + \\ & (1,062 * pH) + (0,000166 * T^2) + (0,00019 * t^2) - (0,0959 * pH^2) + \\ & (0,001518 * T * t) + (0,01224 * T * pH) - (0,0301 * t * pH) \end{aligned} \quad (5.4)$$

Pirina ekstresindeki toplam fenol verimleri ekstraksiyon parametreleri arasındaki regresyon katsayısı R² 0,9262 olarak bulunmuştur. Bu değer modeldeki değişkenlerin deneysel verilerdeki değişimin %93'ünü açıklayabileceğini ifade etmektedir. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemli olduğu (p<0,05) görülmüştür.

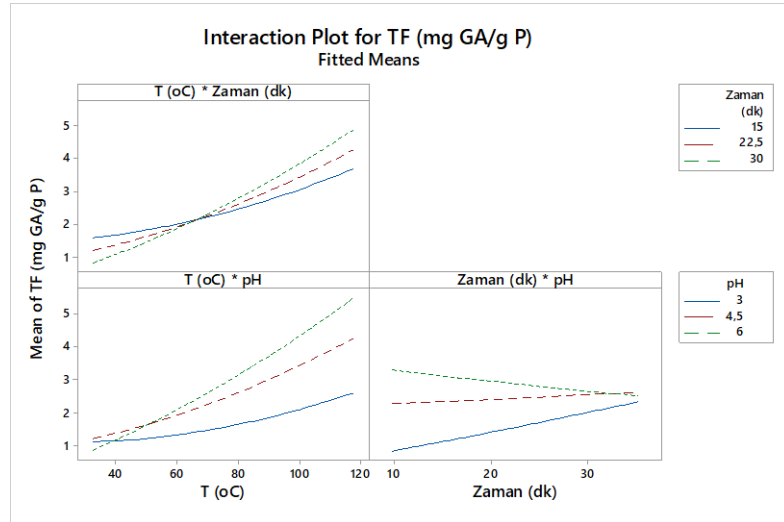
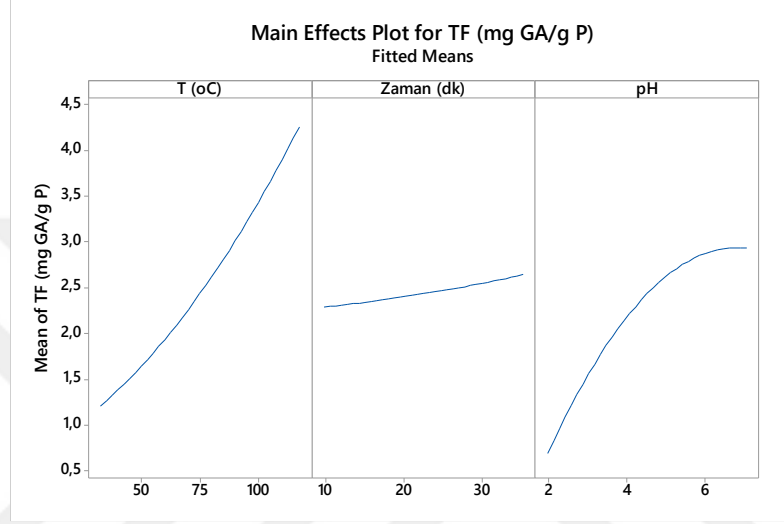
Çizelge 5.7. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstresindeki toplam fenolik bileşen verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	TF (mg GA/g pirina)
1	75,00	9,89	4,50	1,70
2	100,00	15,00	6,00	4,55
3	50,00	15,00	3,00	1,25
4	100,00	30,00	6,00	4,68
5	50,00	30,00	3,00	1,59
6	75,00	35,11	4,50	2,59
7	117,04	22,50	4,50	3,93
8	75,00	22,50	4,50	2,58
9	50,00	30,00	6,00	1,16
10	32,96	22,50	4,50	0,88
11	75,00	22,50	7,02	2,50
12	100,00	30,00	3,00	2,77
13	75,00	22,50	1,98	0,50
14	75,00	22,50	4,50	2,34
15	75,00	22,50	4,50	2,07
16	75,00	22,50	4,50	2,53
17	75,00	22,50	4,50	2,53
18	50,00	15,00	6,00	2,68
19	100,00	15,00	3,00	1,80
20	75,00	22,50	4,50	2,66

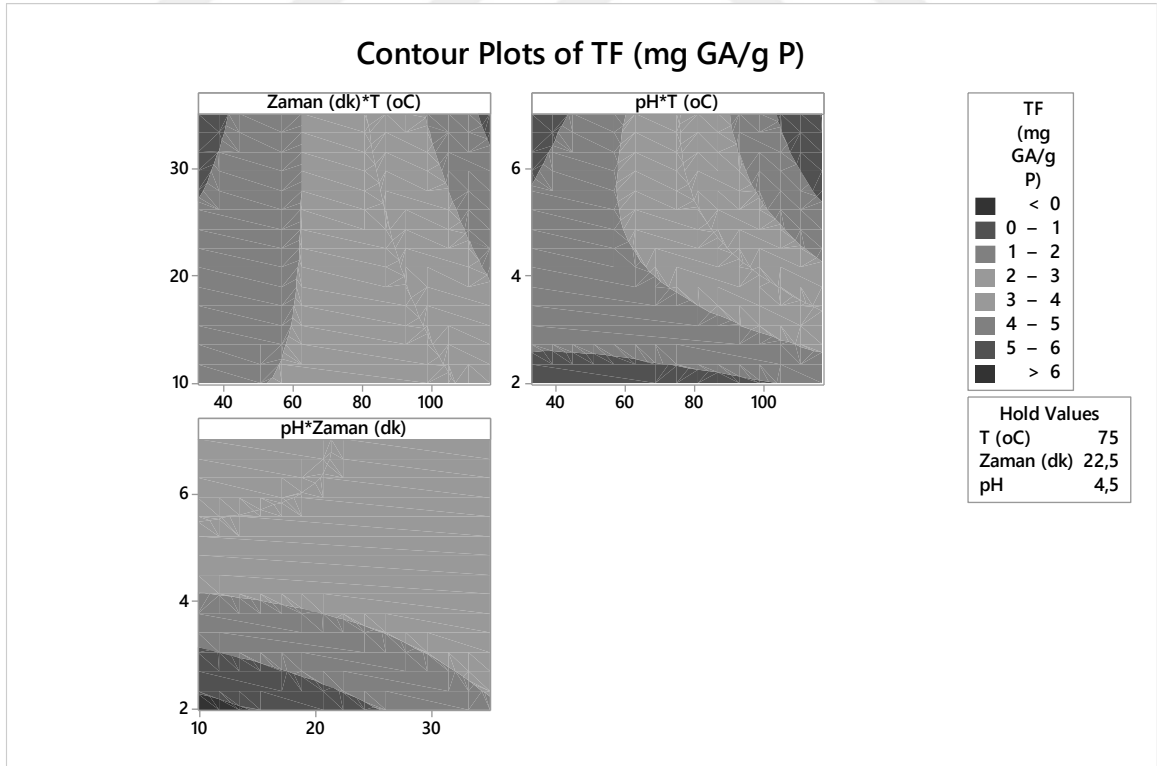
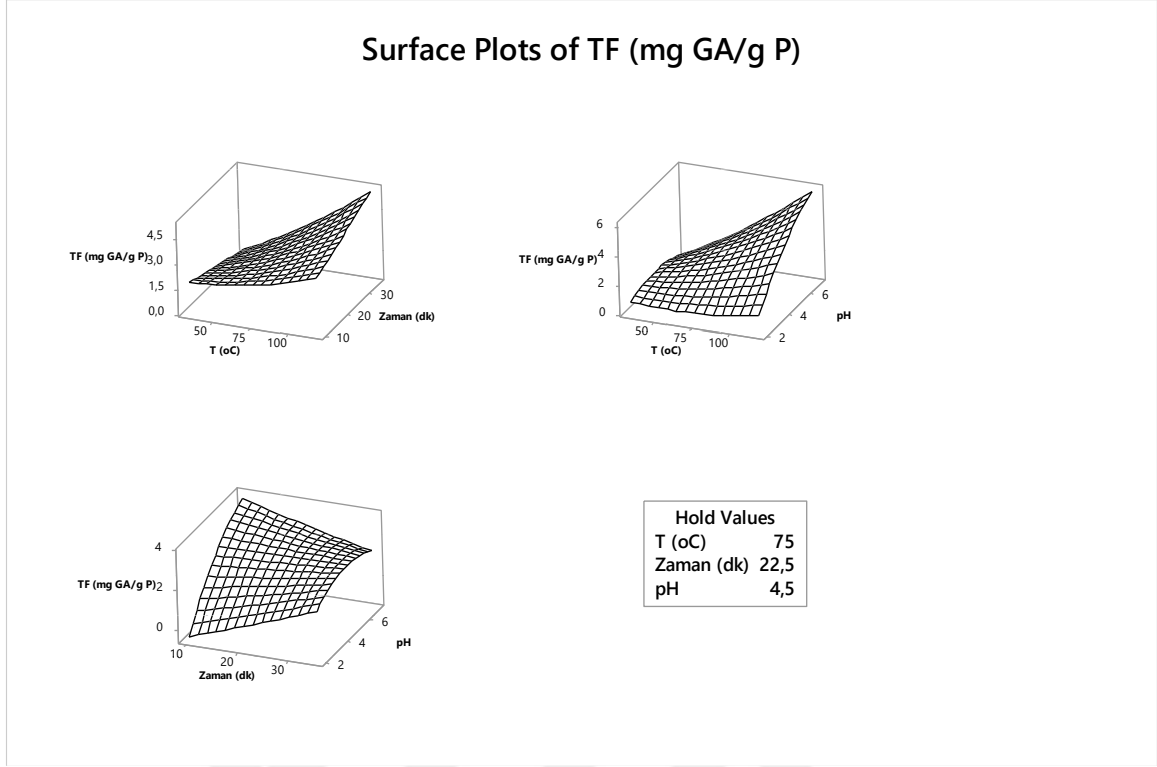
Çizelge 5.8. Pirina Ekstresindeki toplam fenol verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	21,2843	2,3649	13,94	0,000	
Linear	3	17,1278	5,7093	33,65	0,000	
T (°C)	1	11,0257	11,0257	64,98	0,000	
Zaman (dk)	1	0,1483	0,1483	0,87	0,372	
pH	1	5,9538	5,9538	35,09	0,000	
Square	3	0,9057	0,3019	1,78	0,215	
T (°C)*T (°C)	1	0,1558	0,1558	0,92	0,361	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	0,0017	0,0017	0,01	0,923	
pH*pH	1	0,6704	0,6704	3,95	0,075	
2-Way Interaction	3	3,2508	1,0836	6,39	0,011	
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,6477	0,6477	3,82	0,079	
T (°C)*pH	1	1,6864	1,6864	9,94	0,010	
Zaman (dk)*pH	1	0,9167	0,9167	5,40	0,042	
Error	10	1,6968	0,1697			
Lack-of-Fit	5	1,4645	0,2929	6,30	0,032	
Pure Error	5	0,2324	0,0465			
Total	19	22,9812				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
0,411927	92,62%	85,97%	49,46%			

Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g yaprak) tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.7 ve Şekil 5.8’de verilmiştir. Bu şekillerden de görülebileceği gibi, sıcaklık arttıkça toplam fenol verimi doğrusal olarak artmıştır. pH’ın etkisinin de pH 4,5-5’e kadar doğrusal olduğu görülmüştür.



Şekil 5.7. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam fenol verimine (mg GA/g pirina) tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.8. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstresindeki toplam fenol miktar verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.4. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Toplam Flavonoid Verimi Üzerine Etkisi

5.4.1. Zeytin yaprağının toplam flavonoid verimine etkisi

Zeytin yaprağından ekstre edilen flavonoid verimi, 1,42-6,19 (mg Quercetin/g yaprak) arasında değişmiştir. Yaprak ekstresindeki en yüksek flavonoid verimi (6,19mg Quercetin/g yaprak) 117,04°C, 22,5dk, pH 4,5’da ve en düşük flavonoid verimi (1,42mg Quercetin/g yaprak) 75°C, 22,5dk, pH 1,98’de elde edilmiştir (Çizelge 5.9).

Zeytin yaprağı ekstresindeki toplam flavonoid verimi için yapılan varyans analiz (Çizelge 5.10) sonucunda sıcaklığın toplam flavonoid verimi üzerine doğrusal etkisinin ve pH’ın kuadratik etkisinin anlamlı olduğu ($p < 0,05$) bulunmuştur. Toplam flavonoid verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir ($T(^{\circ}C)$, $t(dk)$, pH).

$$\begin{aligned} \text{Yaprak Toplam Flavonoit verimi} \left(\frac{\text{mg Quercetin}}{\text{g yaprak}} \right) = & -3,18 + (0,0215 * T) - \\ & (0,012 * t) + (2,4 * pH) - (0,000008 * T^2) + (0,00078 * t^2) - (0,2539 * pH^2) + \\ & (0,00012 * T * t) + (0,00268 * T * pH) - (0,0044 * t * pH) \end{aligned} \quad (5.5)$$

Zeytin yaprağı ekstresindeki toplam flavonoid verimi değerleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki regresyon (R^2) 0,7514 olarak bulunmuştur. Bu değer modeldeki değişkenlerin deneysel verilerdeki değişimin %75’ini açıklayabileceğini ifade etmektedir. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz olduğu ($p > 0,05$) görülmüştür.

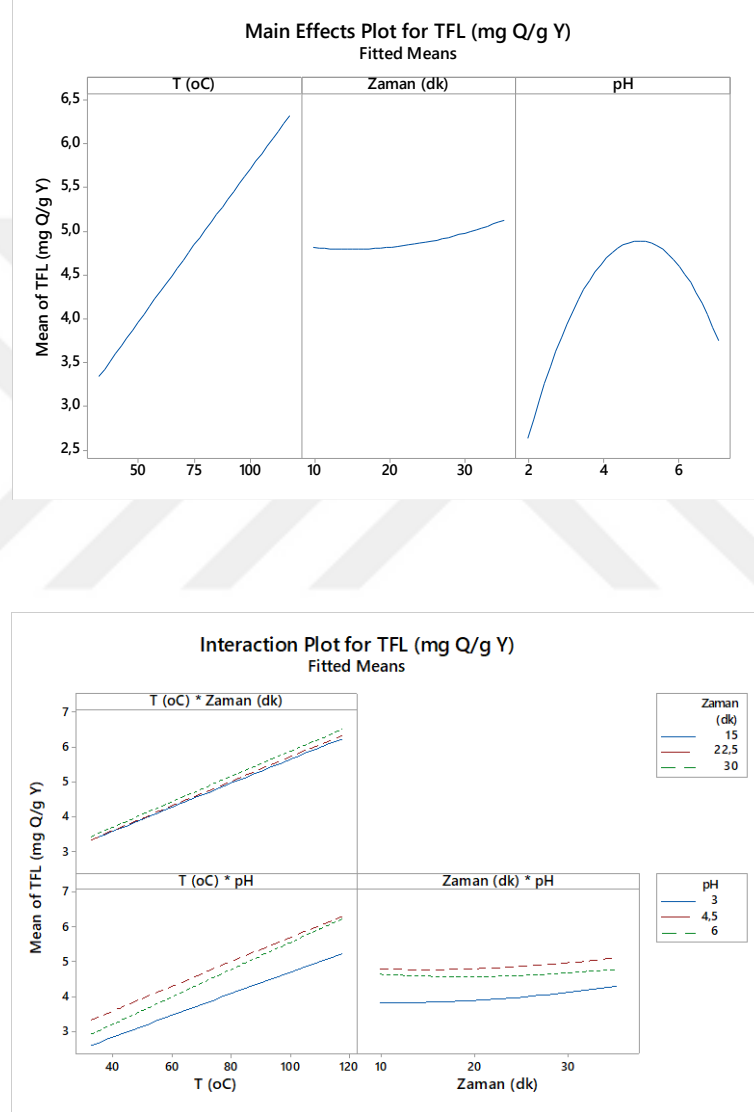
Çizelge 5.9. Basıncılı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki toplam flavonoid verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	TFL (mg Q/g yaprak)
1	75,00	9,89	4,50	4,35
2	100,00	15,00	6,00	5,31
3	50,00	15,00	3,00	3,80
4	100,00	30,00	6,00	5,56
5	50,00	30,00	3,00	4,17
6	75,00	35,11	4,50	4,72
7	117,04	22,50	4,50	6,19
8	75,00	22,50	4,50	4,79
9	50,00	30,00	6,00	3,68
10	32,96	22,50	4,50	2,60
11	75,00	22,50	7,02	4,17
12	100,00	30,00	3,00	5,35
13	75,00	22,50	1,98	1,42
14	75,00	22,50	4,50	4,30
15	75,00	22,50	4,50	4,75
16	75,00	22,50	4,50	5,49
17	75,00	22,50	4,50	5,35
18	50,00	15,00	6,00	3,81
19	100,00	15,00	3,00	5,19
20	75,00	22,50	4,50	4,50

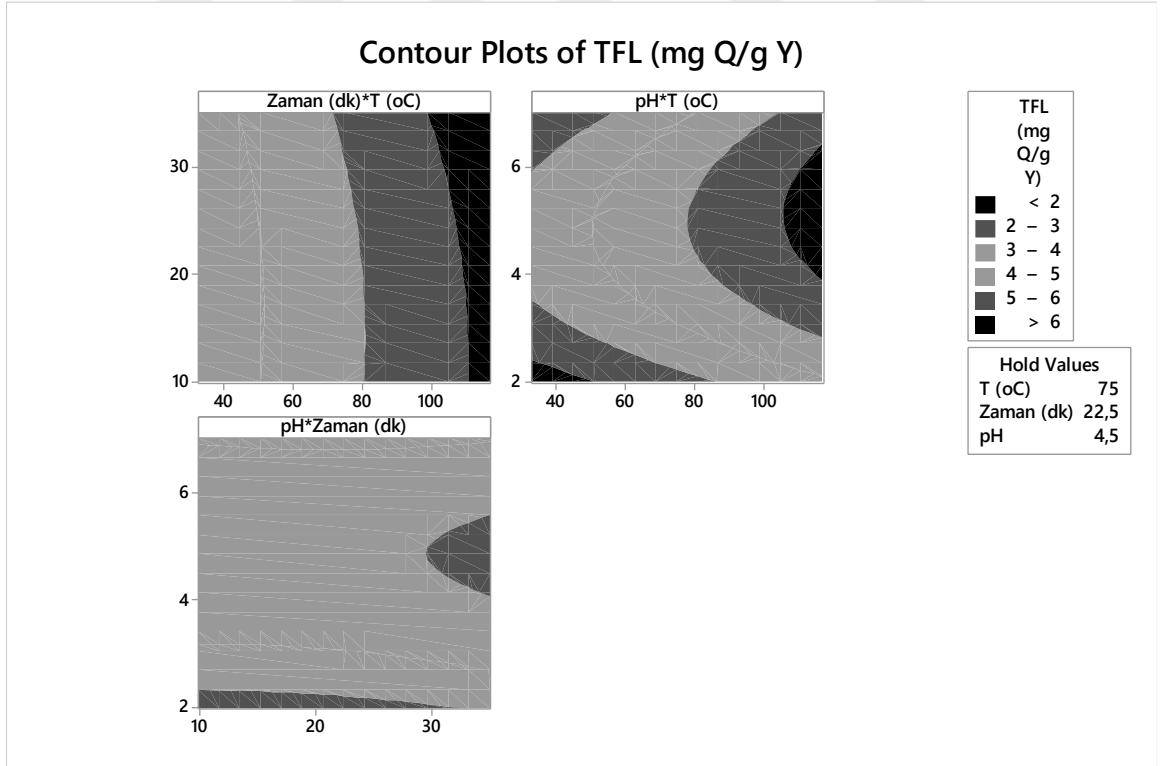
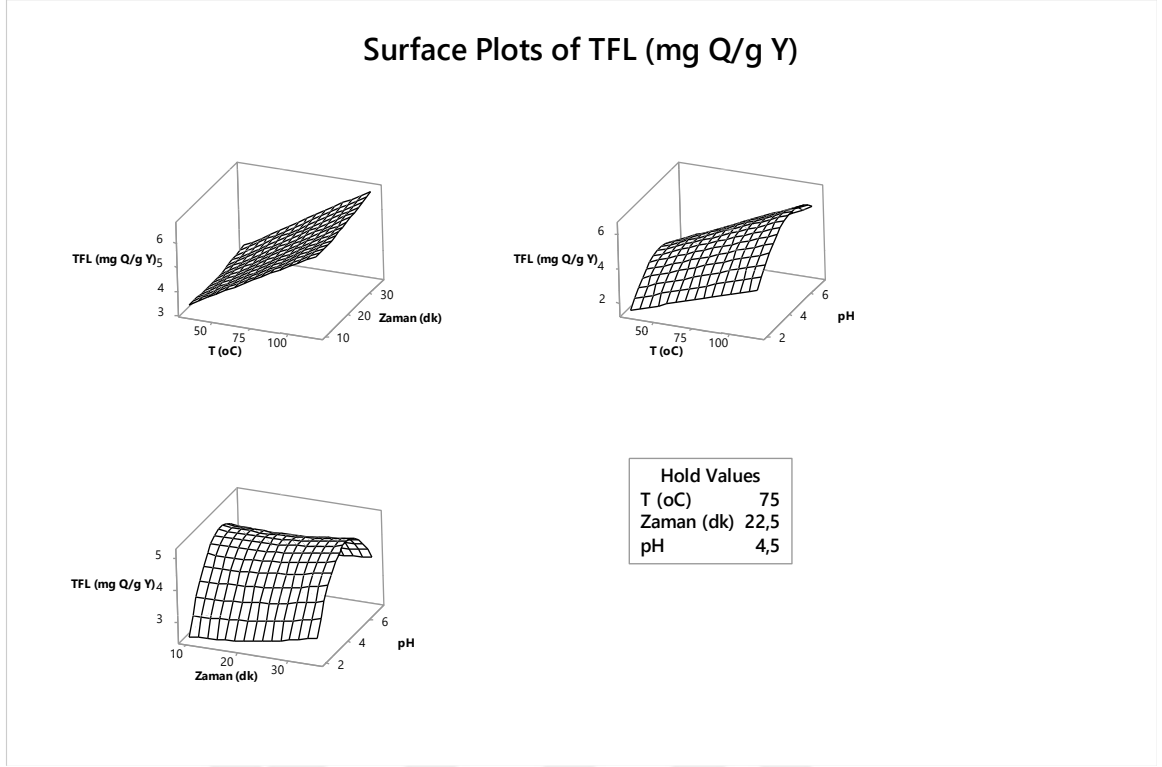
Çizelge 5.10. Yaprak Ekstresindeki toplam flavonoid verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	17,0681	1,8965	3,36	0,036	
Linear	3	12,0873	4,0291	7,14	0,008	
T (°C)	1	10,5049	10,5049	18,62	0,002	
Zaman (dk)	1	0,1182	0,1182	0,21	0,657	
pH	1	1,4641	1,4641	2,60	0,138	
Square	3	4,8758	1,6253	2,88	0,089	
T (°C)*T (°C)	1	0,0004	0,0004	0,00	0,980	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	0,0281	0,0281	0,05	0,828	
pH*pH	1	4,7014	4,7014	8,33	0,016	
2-Way Interaction	3	0,1050	0,0350	0,06	0,979	
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,0042	0,0042	0,01	0,933	
T (°C)*pH	1	0,0809	0,0809	0,14	0,713	
Zaman (dk)*pH	1	0,0199	0,0199	0,04	0,855	
Error	10	5,6415	0,5641			
Lack-of-Fit	5	4,5412	0,9082	4,13	0,073	
Pure Error	5	1,1003	0,2201			
Total	19	22,7095				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
0,751098	75,16%	52,80%	0,00%			

Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki flavonoid (mg Quercetin/g yaprak) tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da verilmiştir. Bu şekillerden de görülebileceği gibi, sıcaklık arttıkça flavonoid verimi doğrusal olarak artmıştır. pH'ın etkisinin de pH 4,5-5'e kadar doğrusal olduğu görülmüştür.



Şekil 5.9. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam flavonoid verimine (mg Quercetin/g yaprak) tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.10. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin yaprak ekstresindeki toplam flavonoid verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.4.2. Pirinanın toplam flavonoid verimine etkisi

Zeytin pirinasından flavonoid verimi, 0,25-1,92 (mg Quercetin/g pirina) arasında değişmiştir. Pirinadan en yüksek flavonoid verimi (1,92 mg Quercetin/g pirina) 100°C, 15dk, pH 6'da ve en düşük flavonoid verimi (0,25mg Quercetin/g yaprak) 50°C, 15dk, pH 3,0'da elde edilmiştir (Çizelge 5.11). Pirinadan toplam flavonoid verimi için yapılan varyans analiz (Çizelge 5.12) sonucunda sadece sıcaklığın toplam flavonoid verimi üzerine etkisinin anlamlı olduğu ($p < 0,05$) görülmüştür. Toplam flavonoid verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir ($T(^{\circ}C)$, $t(dk)$, pH).

$$\begin{aligned} \text{Pirina Toplam Flavonoit Verimi} \left(\frac{\text{mg Quercetin}}{\text{g Pirina}} \right) = & -3,45 + (0,0639 * T) + \\ & (0,109 * t) + (0,069 * pH) - (0,000292 * T^2) - (0,00203 * t^2) - (0,0161 * \\ & pH^2) - (0,000279 * T * t) + (0,00099 * T * pH) + (0,0022 * t * pH) \end{aligned} \quad (5.6)$$

Pirina ekstresindeki toplam flavonoid verimi değerleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki regresyon katsayısı (R^2) 0,6446 olarak bulunmuştur. Bu değer, yüzey merkezli modelin deneysel verileri %64 oranında açıklayabileceğini ifade etmektedir. Ayrıca verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemli olduğu görülmüştür ($p < 0,05$).

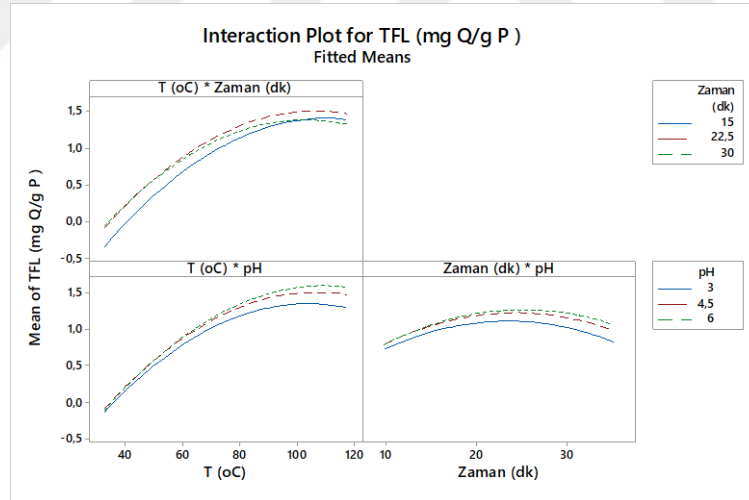
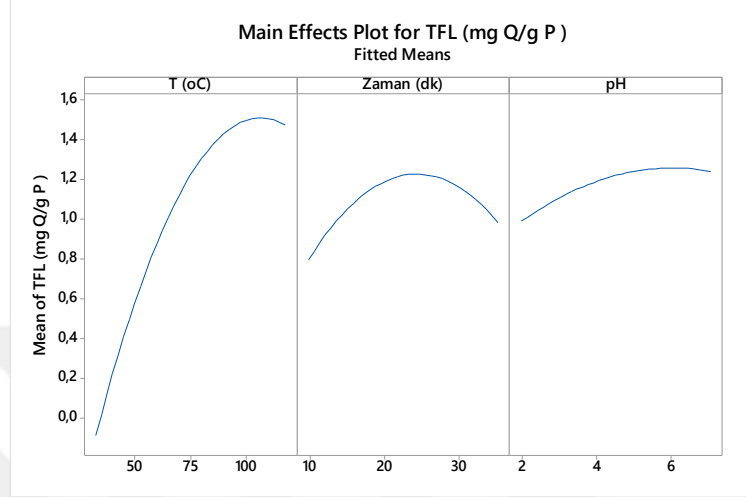
Çizelge 5.11. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirinadan toplam flavonoid verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	TFL (mg Q/g pirina)
1	75,00	9,89	4,50	0,38
2	100,00	15,00	6,00	1,92
3	50,00	15,00	3,00	0,25
4	100,00	30,00	6,00	1,87
5	50,00	30,00	3,00	0,32
6	75,00	35,11	4,50	0,94
7	117,04	22,50	4,50	0,66
8	75,00	22,50	4,50	1,28
9	50,00	30,00	6,00	0,44
10	32,96	22,50	4,50	0,28
11	75,00	22,50	7,02	0,94
12	100,00	30,00	3,00	1,49
13	75,00	22,50	1,98	0,82
14	75,00	22,50	4,50	1,05
15	75,00	22,50	4,50	1,09
16	75,00	22,50	4,50	1,24
17	75,00	22,50	4,50	1,18
18	50,00	15,00	6,00	0,38
19	100,00	15,00	3,00	1,75
20	75,00	22,50	4,50	1,55

Çizelge 5.12. Pirina Ekstresindeki toplam flavonoid verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

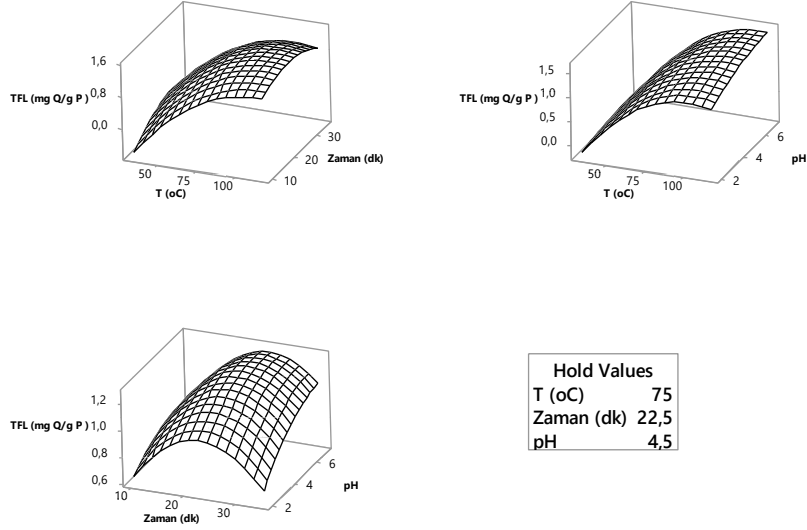
Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	3,64680	0,40520	2,02	0,144	
Linear	3	2,99500	0,99833	4,98	0,023	
T (°C)	1	2,87887	2,87887	14,37	0,004	
Zaman (dk)	1	0,04139	0,04139	0,21	0,659	
pH	1	0,07474	0,07474	0,37	0,555	
Square	3	0,61366	0,20455	1,02	0,424	
T (°C)*T (°C)	1	0,47860	0,47860	2,39	0,153	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	0,18713	0,18713	0,93	0,357	
pH*pH	1	0,01893	0,01893	0,09	0,765	
2-Way Interaction	3	0,03814	0,01271	0,06	0,978	
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,02192	0,02192	0,11	0,748	
T (°C)*pH	1	0,01112	0,01112	0,06	0,819	
Zaman (dk)*pH	1	0,00510	0,00510	0,03	0,876	
Error	10	2,00408	0,20041			
Lack-of-Fit	5	1,84517	0,36903	11,61	0,009	
Pure Error	5	0,15890	0,03178			
Total	19	5,65088				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
0,447669	64,54%	32,62%	0,00%			

Pirina ekstresindeki toplam flavonoid verimi için tekli ve ikili etkileri yüzey ve kontur grafikleri Şekil 5.11 ve Şekil 5.12’de verilmiştir. Flavonoid sıcaklıkla doğrusal olarak artmıştır.

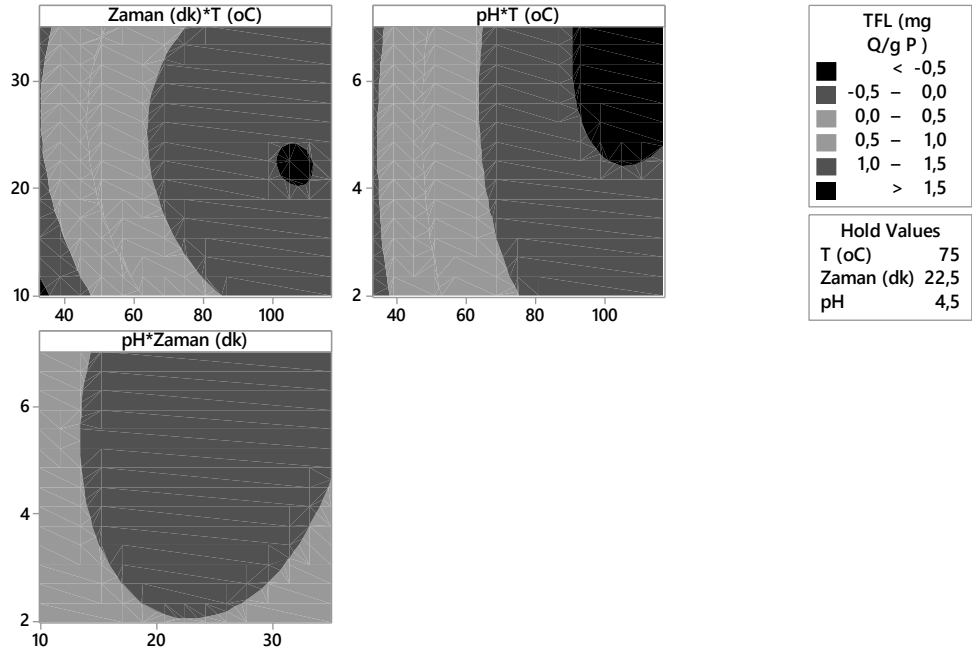


Şekil 5.11. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki toplam flavonoid verimine (mg Quercetin/g pirina) tekli ve ikili etkileri.

Surface Plots of TFL (mg Q/g P)



Contour Plots of TFL (mg Q/g P)



Şekil 5.12. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin pirina ekstresindeki toplam flavonoid verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.5. Basınçlı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite (EC₅₀, µg/ml) Üzerine Etkisi

5.5.1. Yaprak ekstresindeki dpph serbest radikal süpürücü aktivite (EC₅₀, µg/ml)

Basınçlı çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri DPPH'ın %50'sini inhibe edici ekstre konsantrasyonu yani EC₅₀ (µg/ml) olarak Çizelge 5.13'de verilmiştir. EC₅₀ değerinin düşük olması DPPH aktivitesinin fazla olmasını göstermektedir. DPPH değerleri parametrelere bağlı olarak 11,24-24,33(EC₅₀-µg/ml) arasında değişmiştir. En yüksek EC₅₀ değeri (24,33 µg/ml), 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de en düşük EC₅₀ değeri ise (11,24 µg/ml) 75°C, 22,5dk, pH 4,5'da elde edilen ekstrelerde gözlenmiştir.

DPPH değerleri için yapılan varyans analizi sonucunda, pH'ın kuadratik etkisinin anlamlı olduğu (p<0,05) görülmüştür (Çizelge 5.14). DPPH verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$EC_{50} \left(\frac{\mu g \text{ yaprak ekstre}}{ml} \right) = 30,4 + (0,029 * T) + (0,245 * t) - (8,32 * pH) - (0,000759 * T^2) - (0,0110 * t^2) + (0,857 * pH^2) + (0,00407 * T * t) - (0,0028 * T * pH) + (0,0089 * t * pH) \quad (5.7)$$

DPPH değerleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R²) 0,6511 olarak bulunmuştur. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemsiz olduğu (p>0,05) görülmüştür.

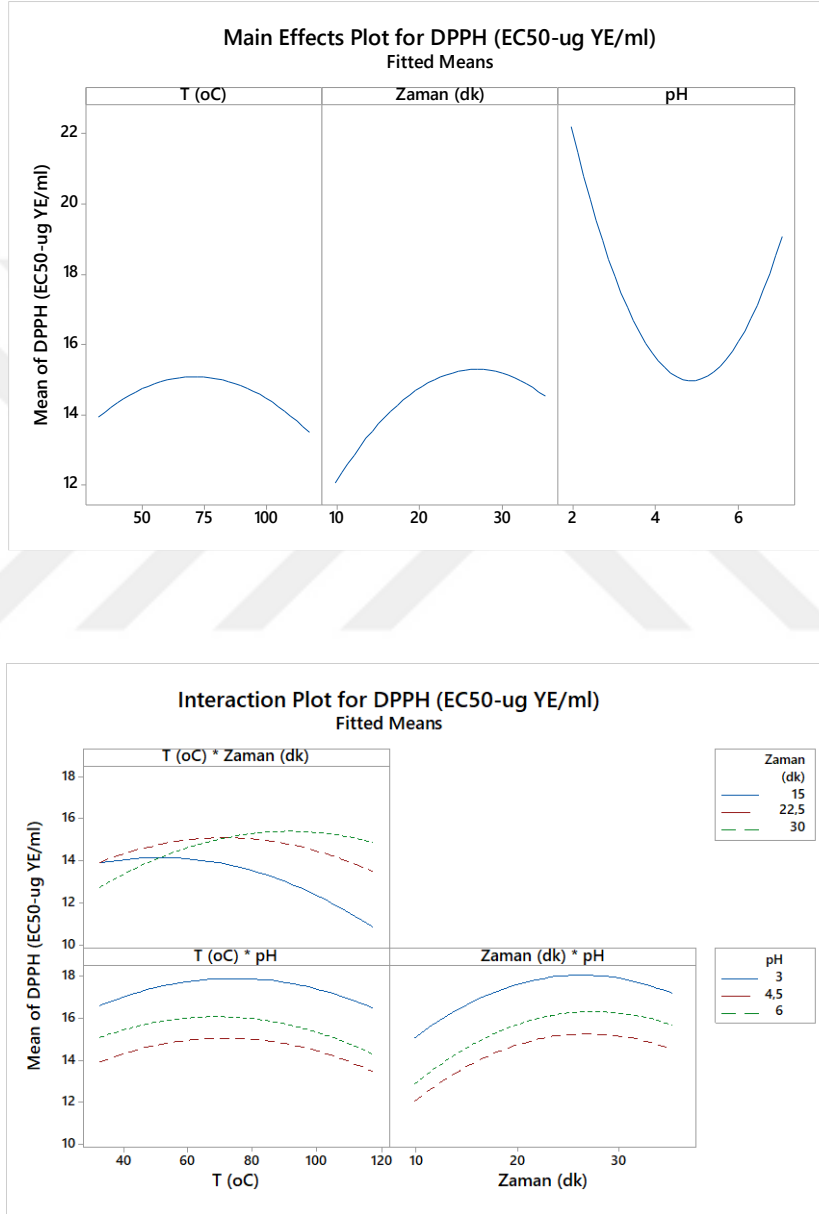
Çizelge 5.13. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının yaprak ekstresindeki DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Yaprak DPPH (EC ₅₀ -µg/ml)
1	75,00	9,89	4,50	12,55
2	100,00	15,00	6,00	13,54
3	50,00	15,00	3,00	16,15
4	100,00	30,00	6,00	16,23
5	50,00	30,00	3,00	15,38
6	75,00	35,11	4,50	15,44
7	117,04	22,50	4,50	14,28
8	75,00	22,50	4,50	16,30
9	50,00	30,00	6,00	15,55
10	32,96	22,50	4,50	14,53
11	75,00	22,50	7,02	18,07
12	100,00	30,00	3,00	17,06
13	75,00	22,50	1,98	24,33
14	75,00	22,50	4,50	13,29
15	75,00	22,50	4,50	11,24
16	75,00	22,50	4,50	14,09
17	75,00	22,50	4,50	18,75
18	50,00	15,00	6,00	15,33
19	100,00	15,00	3,00	14,19
20	75,00	22,50	4,50	16,53

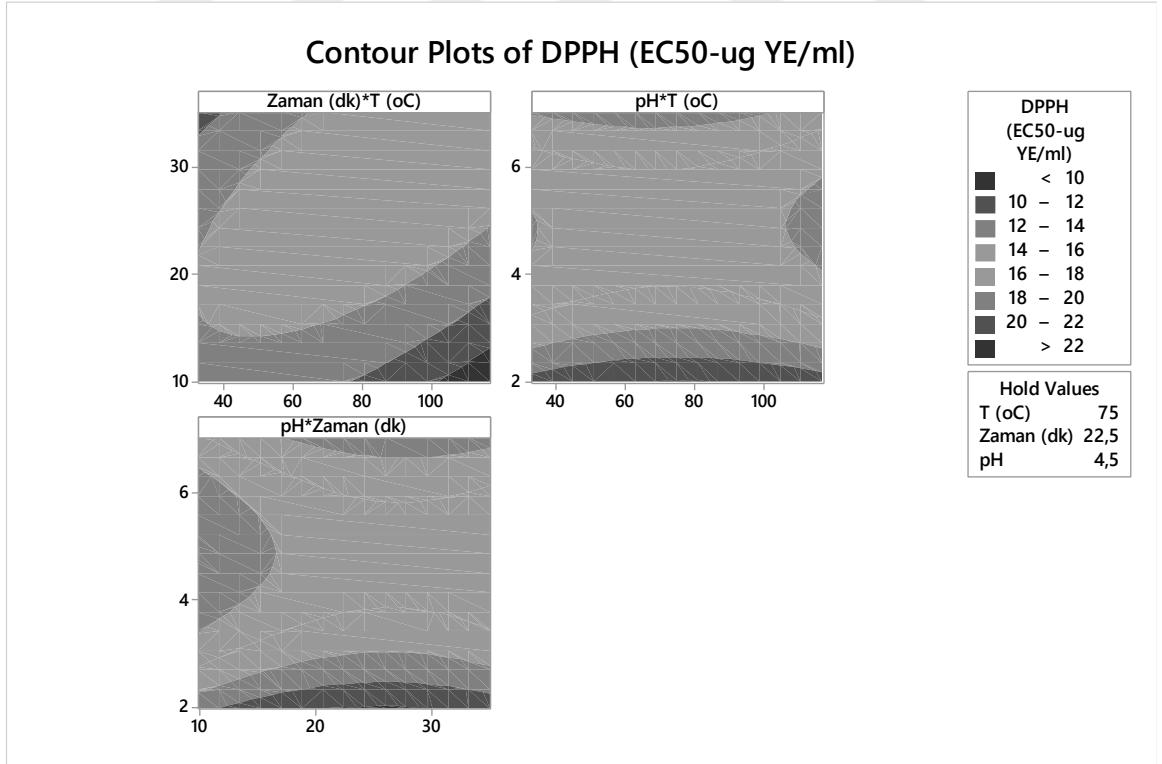
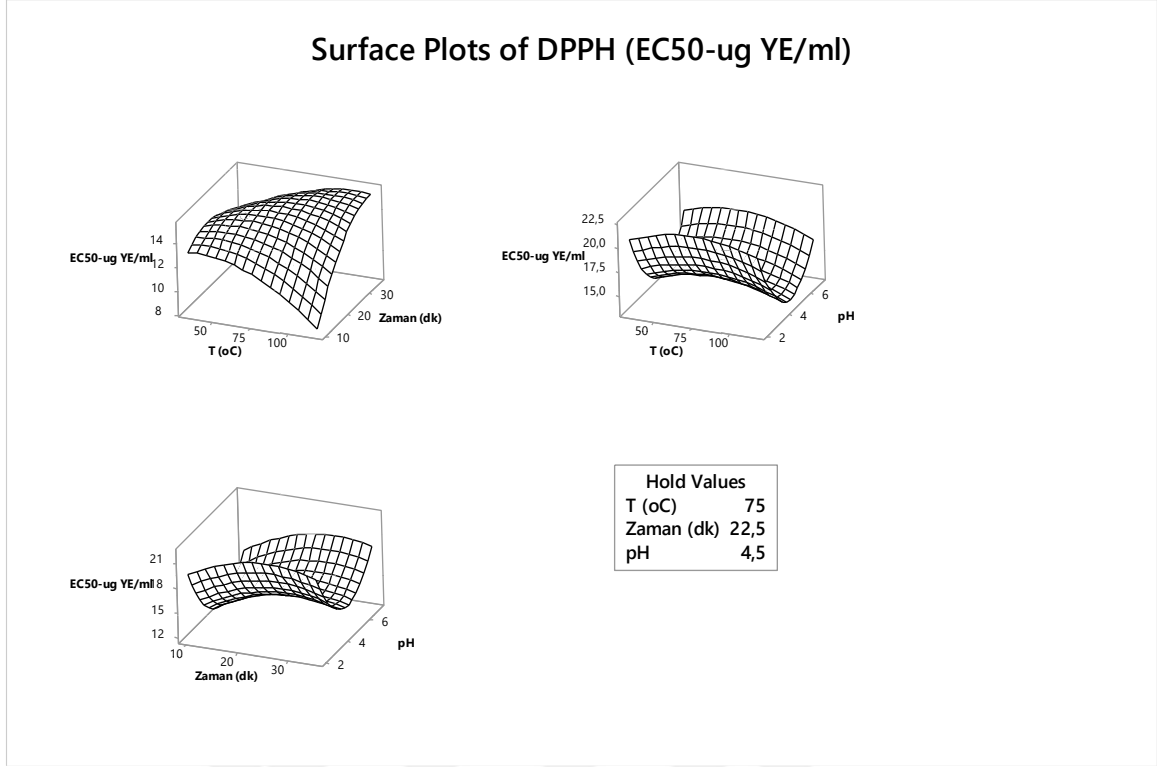
Çizelge 5.14. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	92,232	10,2480	2,07	0,136	
Linear	3	19,110	6,3701	1,29	0,331	
T (°C)	1	0,240	0,2404	0,05	0,830	
Zaman (dk)	1	7,158	7,1580	1,45	0,256	
pH	1	11,712	11,7120	2,37	0,155	
Square	3	68,282	22,7608	4,61	0,028	
T (°C)*T (°C)	1	3,242	3,2415	0,66	0,437	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	5,511	5,5112	1,12	0,316	
<p>pH*pH</p>	1	53,583	53,5832	10,85	0,008	
2-Way Interaction	3	4,839	1,6129	0,33	0,806	
T (°C)*Zaman (dk)	1	4,670	4,6697	0,95	0,354	
T (°C)*pH	1	0,088	0,0881	0,02	0,896	
Zaman (dk)*pH	1	0,081	0,0811	0,02	0,901	
Error	10	49,405	4,9405			
Lack-of-Fit	5	13,401	2,6802	0,37	0,849	
Pure Error	5	36,005	7,2009			
Total	19	141,637				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
2,22273	65,12%	33,72%	0,00%			

Ekstraksiyon parametrelerinin ekstraktın DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi üzerine tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.13 ve Şekil 5.14’da verilmiştir. Bu şekillerden düşük ve yüksek pH’larda elde edilen ekstraktın DPPH aktivitelerinin azaldığı görülmektedir.



Şekil 5.13. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstraktındaki DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.14. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.5.2. Pirina ekstresindeki dpph serbest süpürücü aktivite (EC₅₀, µg/ml)

Pirinanın basınçlı çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri (EC₅₀ (µg/ml)) Çizelge 5.15’de verilmiştir. DPPH değerleri 64,61-238 µg/ml arasında değişmiştir. En yüksek değer (238µg/ml) 75°C, 22,5dk, pH 1,98’de en düşük değer (64,61µg/ml) 117,04°C, 22,5dk, pH 4,5’da elde edilmiştir.

DPPH değerleri için yapılan varyans analizi sonucunda (Çizelge 5.16) sıcaklık, zaman ve pH’ın DPPH değerleri üzerine doğrusal etkisinin anlamlı olduğu (p<0,05), zaman ve pH ikili ikili etkisinin anlamlı olduğu (p<0,05) bulunmuştur. DPPH değerleri için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$EC_{50} \left(\frac{\mu\text{g pirina ekstre}}{\text{ml}} \right) = 773 - (2,47 * T) - (8,63 * t) - (184 * pH) - (0,00171 * T^2) - (0,0205 * t^2) + (12,33 * pH^2) + (0,0404 * T * t) + (0,302 * T * pH) + (1,129 * t * pH) \quad (5.8)$$

Pirina ekstrelerinin DPPH aktiviteleri ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R²) 0,9438 olarak bulunmuştur.

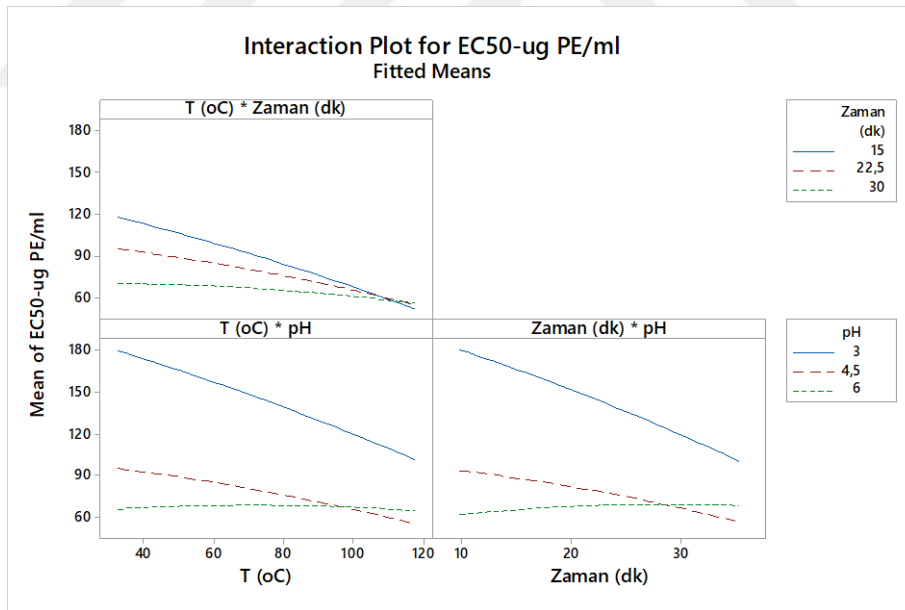
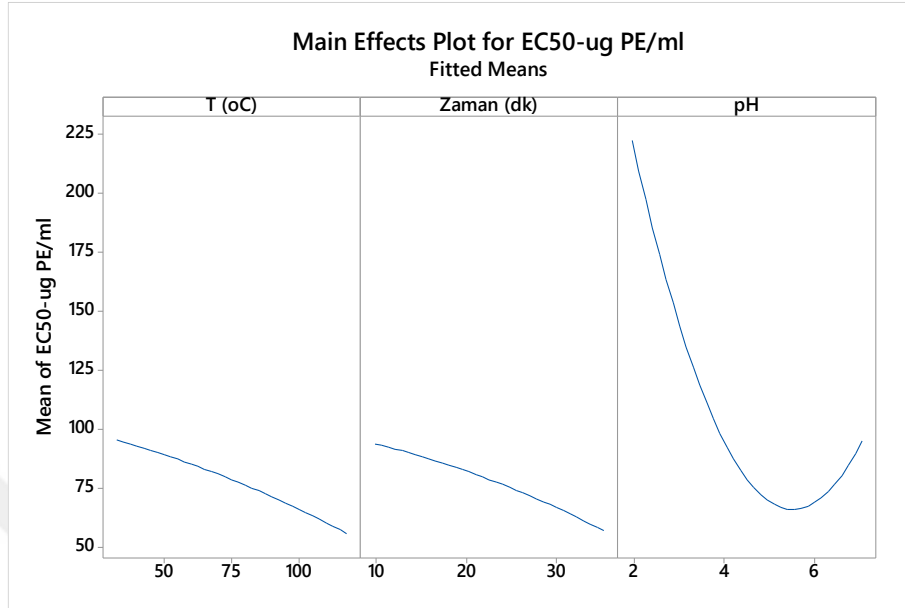
Ekstraksiyon parametrelerinin ekstrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi üzerine tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.15 ve Şekil 5.16’da verilmiştir. Bu şekillerden sıcaklık ve zaman arttıkça EC₅₀ değerlerinin azaldığı görülmektedir.

Çizelge 5.15. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının pirina ekstresindeki DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteleri üzerine etkisi.

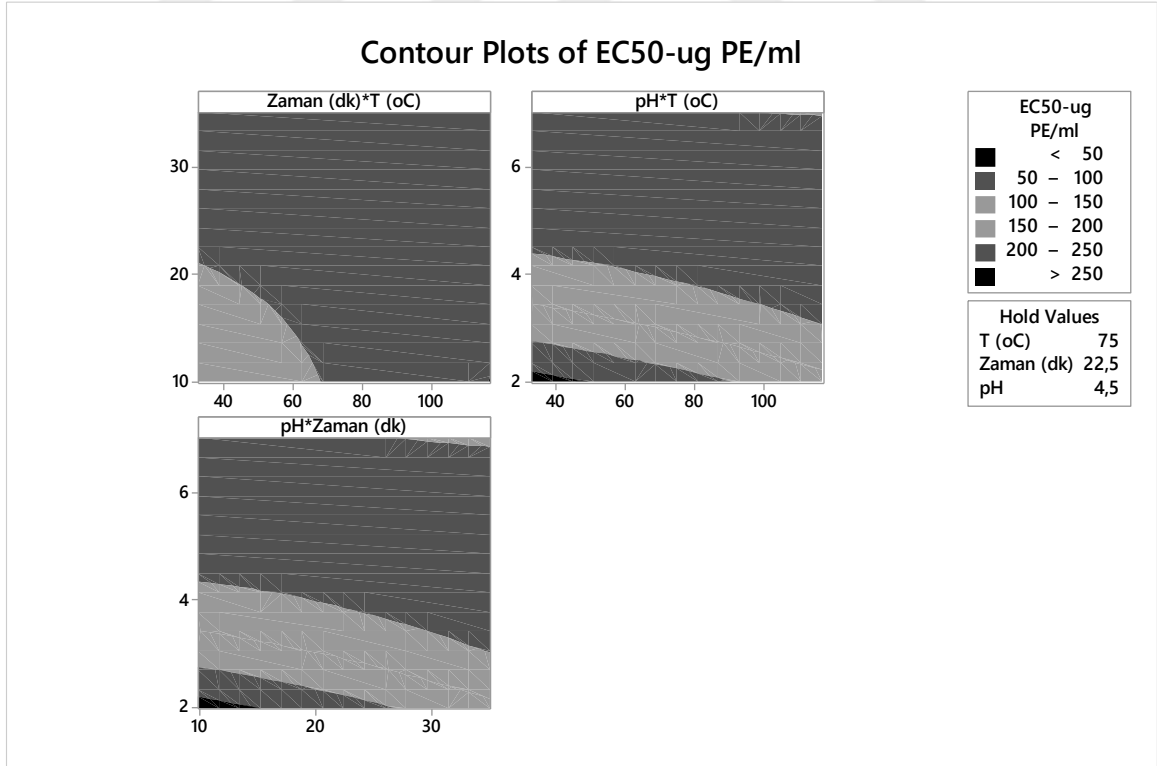
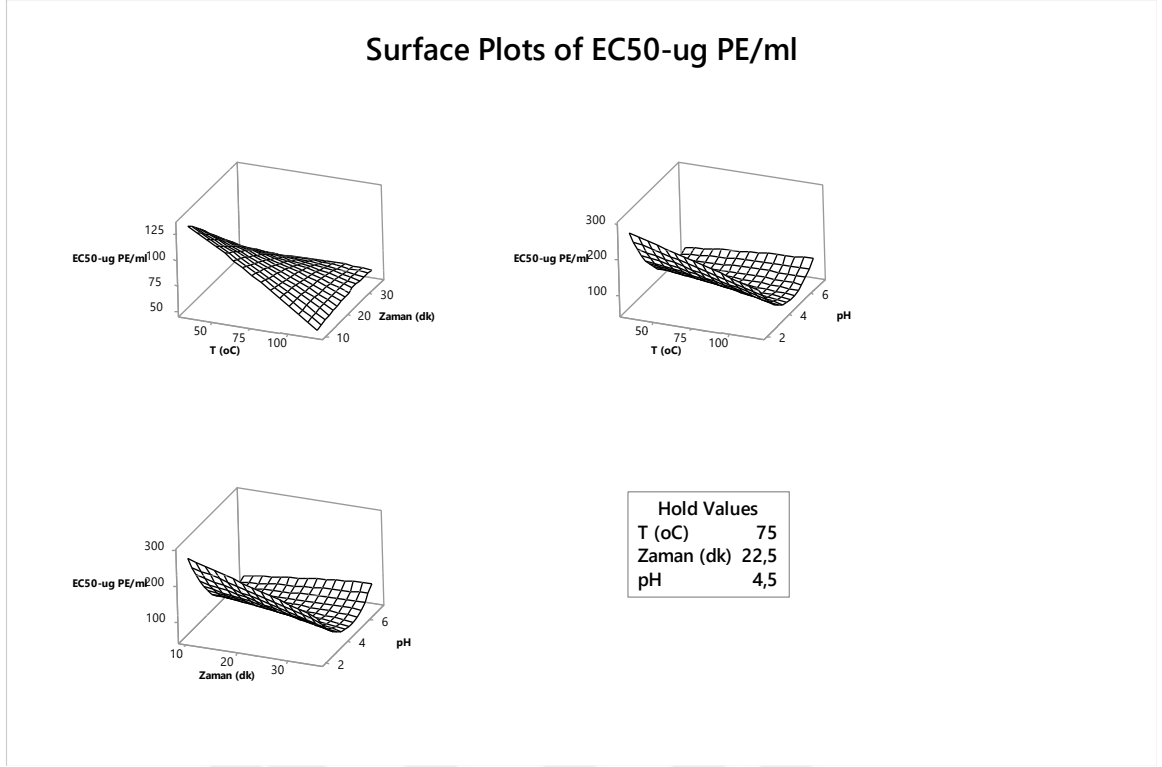
	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Pirina DPPH (EC ₅₀ -µg/ml)
1	75,00	9,89	4,50	79,75
2	100,00	15,00	6,00	69,67
3	50,00	15,00	3,00	200,89
4	100,00	30,00	6,00	70,01
5	50,00	30,00	3,00	120,14
6	75,00	35,11	4,50	71,79
7	117,04	22,50	4,50	64,61
8	75,00	22,50	4,50	81,02
9	50,00	30,00	6,00	68,80
10	32,96	22,50	4,50	87,40
11	75,00	22,50	7,02	76,98
12	100,00	30,00	3,00	88,96
13	75,00	22,50	1,98	238,00
14	75,00	22,50	4,50	74,96
15	75,00	22,50	4,50	77,28
16	75,00	22,50	4,50	79,75
17	75,00	22,50	4,50	87,62
18	50,00	15,00	6,00	85,85
19	100,00	15,00	3,00	126,54
20	75,00	22,50	4,50	71,02

Çizelge 5.16. DPPH serbest radikal süpürücü aktivite için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	36992,0	4110,2	18,70	0,000	
Linear	3	22730,1	7576,7	34,48	0,000	
T (°C)	1	1847,3	1847,3	8,41	0,016	
Zaman (dk)	1	1613,0	1613,0	7,34	0,022	
pH	1	19269,7	19269,7	87,68	0,000	
Square	3	11487,5	3829,2	17,42	0,000	
T (°C)*T (°C)	1	16,5	16,5	0,08	0,790	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	19,2	19,2	0,09	0,773	
pH*pH	1	11088,2	11088,2	50,45	0,000	
2-Way Interaction	3	2774,4	924,8	4,21	0,036	
T (°C)*Zaman (dk)	1	458,4	458,4	2,09	0,179	
T (°C)*pH	1	1024,9	1024,9	4,66	0,056	
Zaman (dk)*pH	1	1291,1	1291,1	5,87	0,036	
Error	10	2197,7	219,8			
Lack-of-Fit	5	2036,6	407,3	12,65	0,007	
Pure Error	5	161,0	32,2			
Total	19	39189,6				
Model Summary						
	S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
	14,8245	94,39%	89,35%	59,60%		



Şekil 5.15. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.16. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivite üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.6. Basıncılı Çözücü Ekstraksiyon Parametrelerinin Zeytin Yaprağı Ekstresinde Oleuropein Üzerine Etkisi

5.6.1. Yaprak ekstresindeki oleuropein miktarına etkisi

Yaprak ekstresindeki Oleuropein miktarı kullanılan parametrelere bağlı olarak 81,23-99,85 (mg/g yaprak ekstre) arasında değişmiştir. En yüksek değer (99,85mg/g yaprak ekstre) 75°C, 9,89dk, pH 4,5’da en düşük değer (81,23mg/g yaprak ekstre) 75°C, 22,5dk, pH 1,98’de elde edilmiştir (Çizelge 5.17). pH’ın ekstredeki oleuropein miktarına doğrusal etkisi olurken (Çizelge 5.18), sıcaklığın etkisi kuadrattır.

Zeytin yaprağı ekstresinde Oleuropein miktarı için ikinci derece polinom eşitliği verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$OLE \left(\frac{mg}{g \text{ yaprak ekstre}} \right) = 51,1 + (0,684 * T) - (1,083 * t) + (11,92 * pH) - (0,00326 * T^2) + (0,0266 * t^2) - (0,942 * pH^2) - (0,00146 * T * t) - (0,0221 * T * pH) - (0,008 * t * pH) \quad (5.9)$$

Ekstredeki Oleuropein miktarları ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R²) 0,7163 olarak bulunmuş. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %71,63 doğrulukta açıklanabildiğini ifade etmektedir.

Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki Oleuropein miktarı üzerine tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.17 ve Şekil 5.18’de verilmiştir. Ekstredeki Oleuropein miktarları yüksek sıcaklık (>80°C) ve pH (>5)’larda azalmıştır.

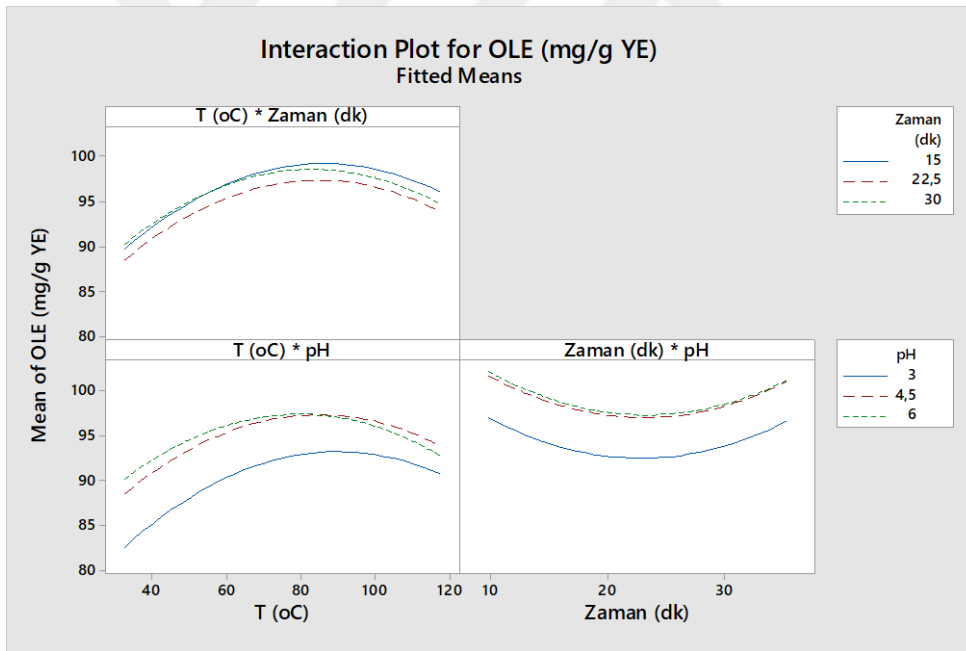
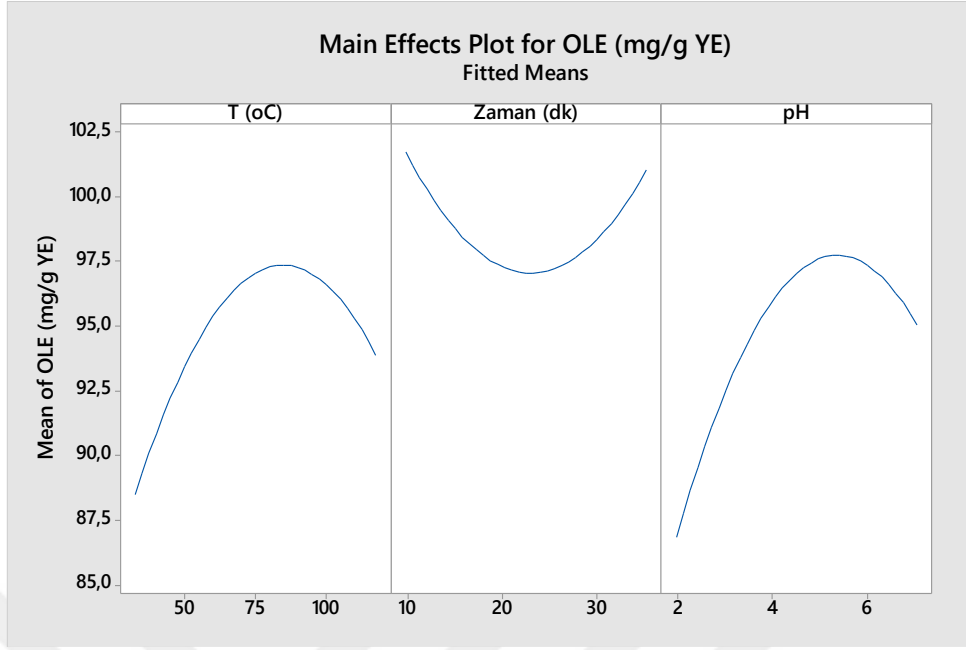
Ekstrelerdeki Oleuropein miktarları üzerine parametrelerin tekli ve ikili etkileri ve yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.17 ve Şekil 5.18’de verilmiştir. Bu şekillerden sıcaklık ve pH’ın kuadratik etkisi net bir şekilde görülmektedir.

Çizelge 5.17. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının ekstredeki Oleuropein miktarına etkisi.

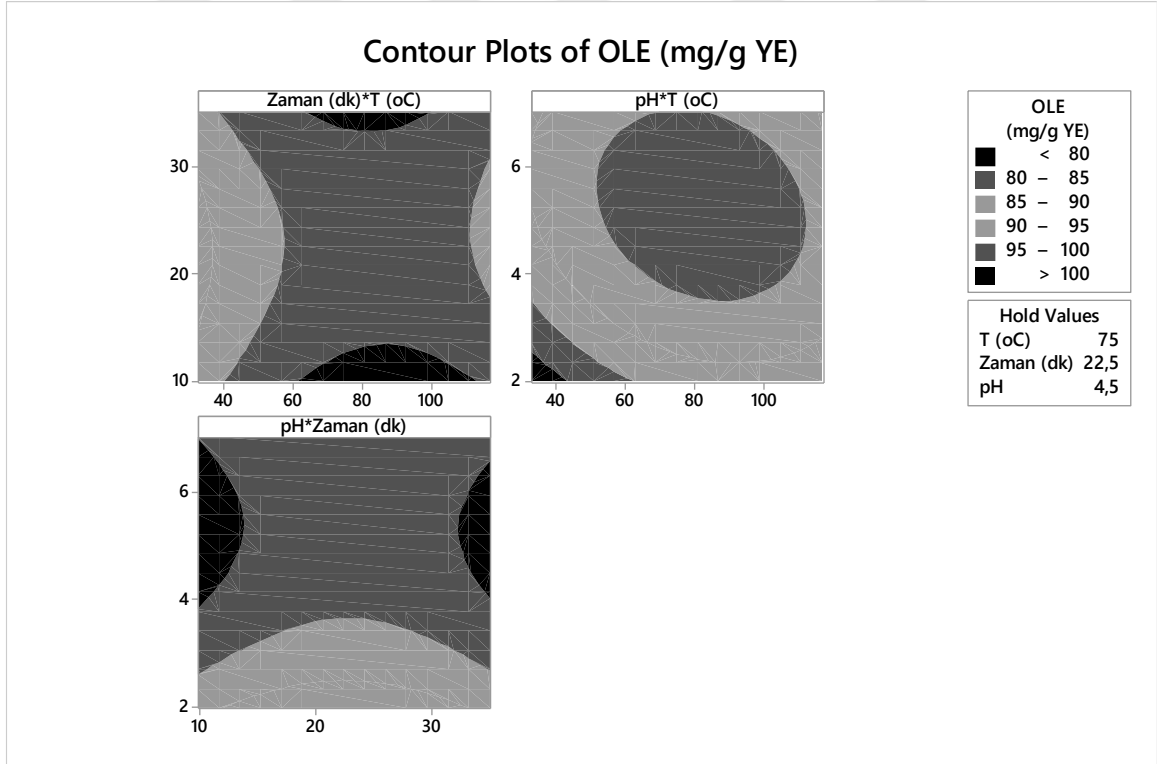
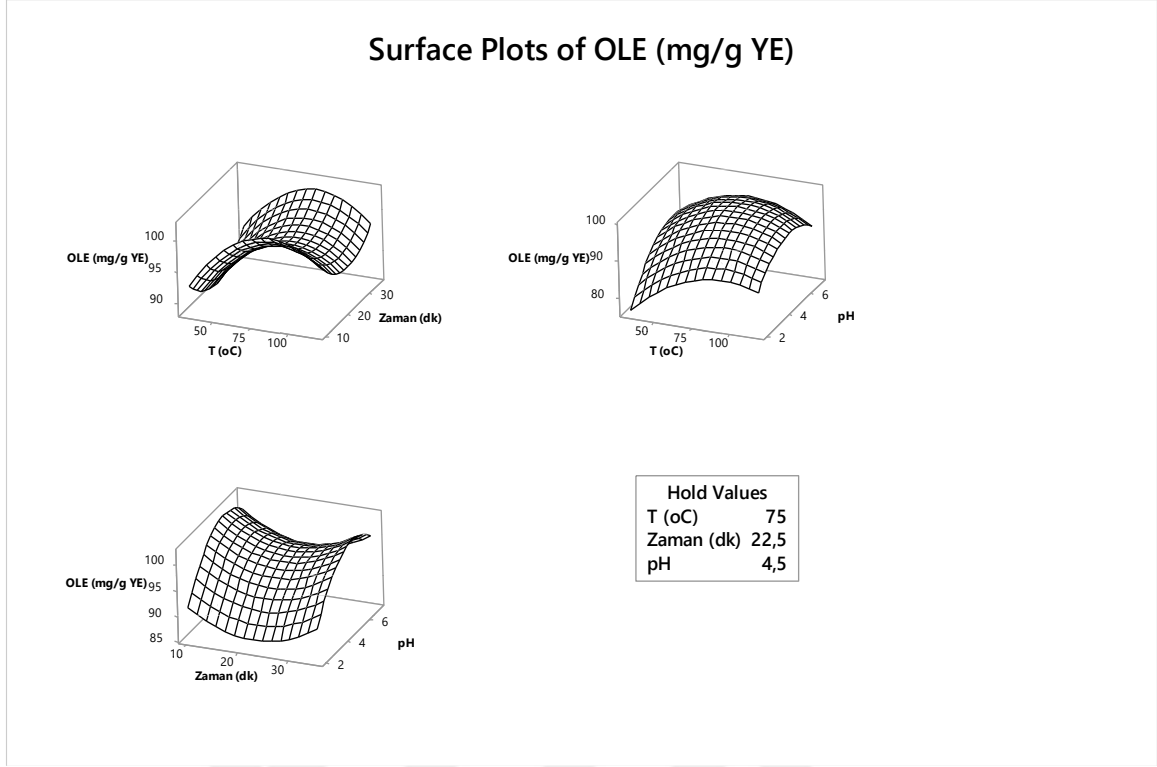
	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Oleuropein (mg /g yaprak ekstre)
1	75,00	9,89	4,50	99,85
2	100,00	15,00	6,00	96,67
3	50,00	15,00	3,00	93,20
4	100,00	30,00	6,00	95,93
5	50,00	30,00	3,00	93,90
6	75,00	35,11	4,50	98,90
7	117,04	22,50	4,50	94,43
8	75,00	22,50	4,50	97,70
9	50,00	30,00	6,00	96,69
10	32,96	22,50	4,50	84,32
11	75,00	22,50	7,02	97,04
12	100,00	30,00	3,00	95,88
13	75,00	22,50	1,98	81,23
14	75,00	22,50	4,50	97,09
15	75,00	22,50	4,50	97,80
16	75,00	22,50	4,50	98,52
17	75,00	22,50	4,50	95,73
18	50,00	15,00	6,00	96,91
19	100,00	15,00	3,00	96,84
20	75,00	22,50	4,50	96,13

Çizelge 5.18. Oleuropein miktarı için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance						
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value	
Model	9	285,401	31,7112	2,81	0,061	
Linear	3	114,511	38,1703	3,39	0,062	
T (°C)	1	34,307	34,3069	3,04	0,112	
Zaman (dk)	1	0,579	0,5786	0,05	0,825	
<p>pH</p>	1	79,625	79,6252	7,06	0,024	
Square	3	164,759	54,9196	4,87	0,024	
<p>T (°C)*T (°C)</p>	1	59,671	59,6707	5,29	0,044	
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	32,385	32,3847	2,87	0,121	
<p>pH*pH</p>	1	64,764	64,7636	5,74	0,038	
2-Way Interaction	3	6,132	2,0439	0,18	0,907	
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,596	0,5959	0,05	0,823	
T (°C)*pH	1	5,475	5,4751	0,49	0,502	
Zaman (dk)*pH	1	0,061	0,0606	0,01	0,943	
Error	10	112,740	11,2740			
Lack-of-Fit	5	107,077	21,4153	18,91	0,003	
Pure Error	5	5,663	1,1326			
Total	19	398,141				
Model Summary						
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)			
3,35767	71,68%	46,20%	0,00%			



Şekil 5.17. Basınçlı Çözücü ekstraksiyon parametrelerinin Oleuropein miktarına tekli ve ikili etkileri.



Şekil 5.18. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin Oleuropein miktarı üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

5.6.2. Ekstraksiyon parametrelerinin zeytin yaprağından oleuropein verimine etkisi

Oleuropein verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak 19,71-32,59 (mg/g yaprak) arasında değişmiştir. En yüksek değer (32,59mg/g yaprak) 117,04°C, 22,5dk, pH 4,5'da en düşük değer (19,71mg/g yaprak) 32,96°C, 22,5dk, pH 4,5'da elde edilmiştir (Çizelge 5.19). Kuru yaprak üzerinden 1 gram zeytin yaprağından ekstre edilen Oleuropein verimi sıcaklıkla beraber artmıştır. Ekstre içindeki Oleuropein miktarı pH ile değişmekle birlikte, ekstraksiyon verimine bağlı olarak yapraktan ekstre edilebilen Oleuropein miktarı üzerine daha çok sıcaklığın pozitif etkisi görülmüştür (Çizelge 5,20, Şekil 5.19, Şekil 5.20)

Oleuropein verimi için ikinci derece polinom eşitliği aşağıda verilmiştir (T(°C), t(dk), pH).

$$OLE \left(\frac{mg}{g \text{ yaprak}} \right) = 29 + (0,13 * T) - (0,73 * t) - (1,87 * pH) - (0,000005 * T^2) + (0,01914 * t^2) + (0,115 * pH^2) - (0,00125 * T * t) + (0,0079 * T * pH) - (0,0023 * t * pH) \quad (5.10)$$

Ekstredeki edilebilen Oleuropein miktarları ile ekstraksiyon parametreleri arasındaki çoklu regresyon katsayısı (R²) 0,8282 olarak bulunmuştur. Bu değer yüzey merkezli model ile deneysel verilerin %82,82 doğrulukta açıklanabildiğini ifade etmektedir.

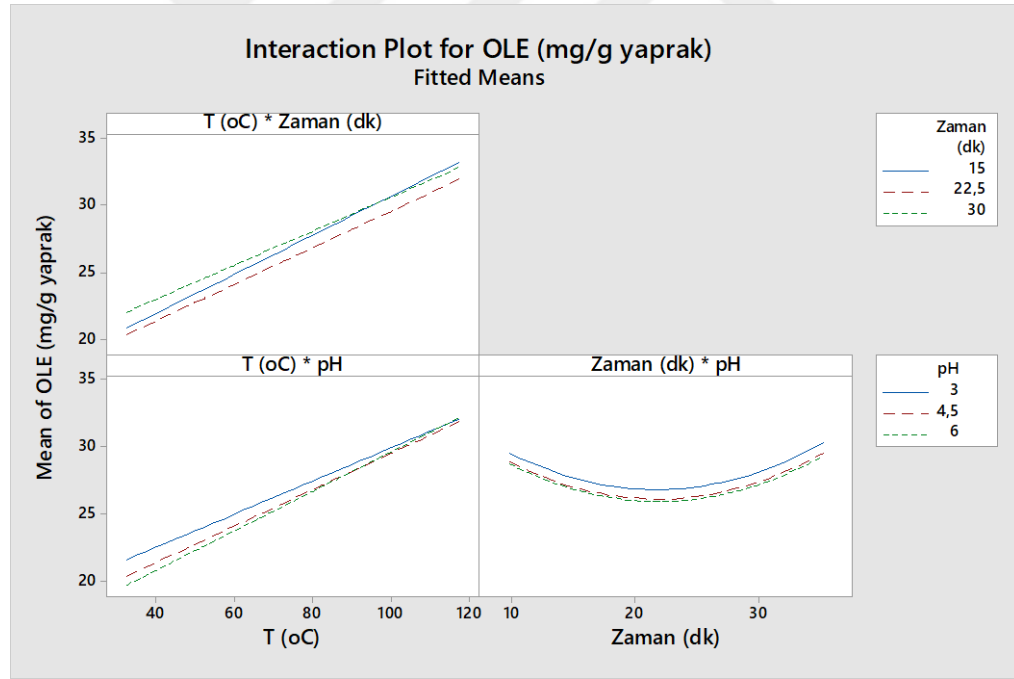
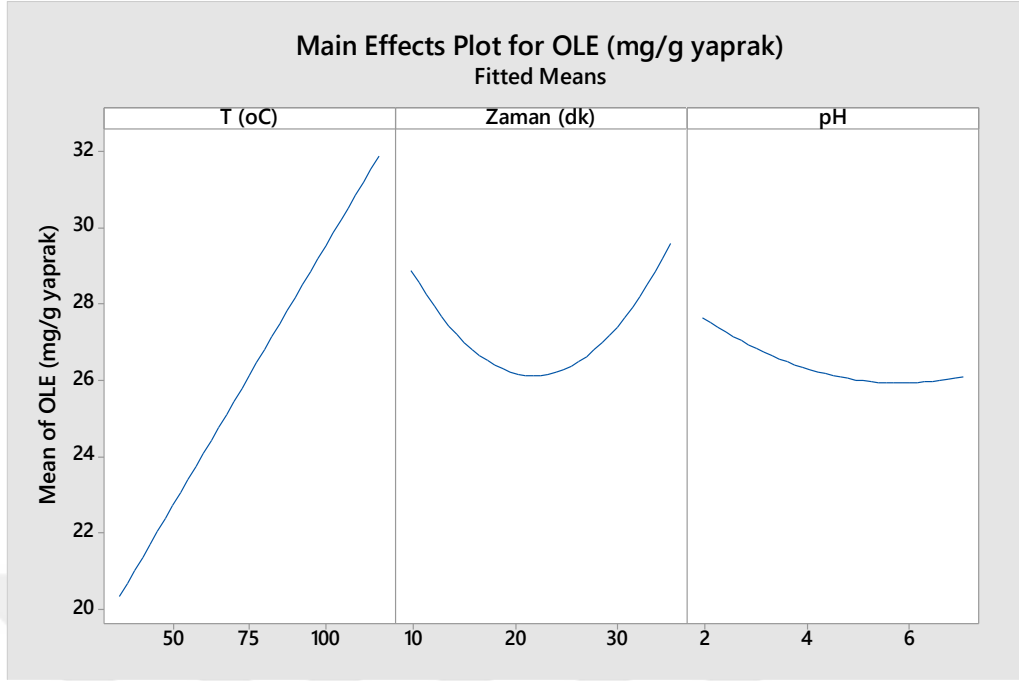
Modelden elde edilen Oleuropein verimleri ile deneysel olarak elde edilen verimler arasındaki lineer ilişki katsayısı (R²) 0,8282 olarak bulunmuştur. Verilerin önerilen modele uyum eksikliğinin (lack of fit) önemli olmadığı (p>0,05) görülmüştür.

Çizelge 5.19. Basınçlı çözücü ekstraksiyon koşullarının Oleuropein verimine etkisi.

	T (°C)	Zaman (dk)	pH	Oleuropein (mg /g yaprak)
1	75,00	9,89	4,50	28,48
2	100,00	15,00	6,00	31,58
3	50,00	15,00	3,00	24,09
4	100,00	30,00	6,00	30,83
5	50,00	30,00	3,00	24,39
6	75,00	35,11	4,50	29,92
7	117,04	22,50	4,50	32,59
8	75,00	22,50	4,50	27,35
9	50,00	30,00	6,00	24,83
10	32,96	22,50	4,50	19,71
11	75,00	22,50	7,02	24,13
12	100,00	30,00	3,00	29,82
13	75,00	22,50	1,98	29,65
14	75,00	22,50	4,50	26,34
15	75,00	22,50	4,50	22,05
16	75,00	22,50	4,50	27,52
17	75,00	22,50	4,50	27,04
18	50,00	15,00	6,00	24,03
19	100,00	15,00	3,00	29,85
20	75,00	22,50	4,50	26,41

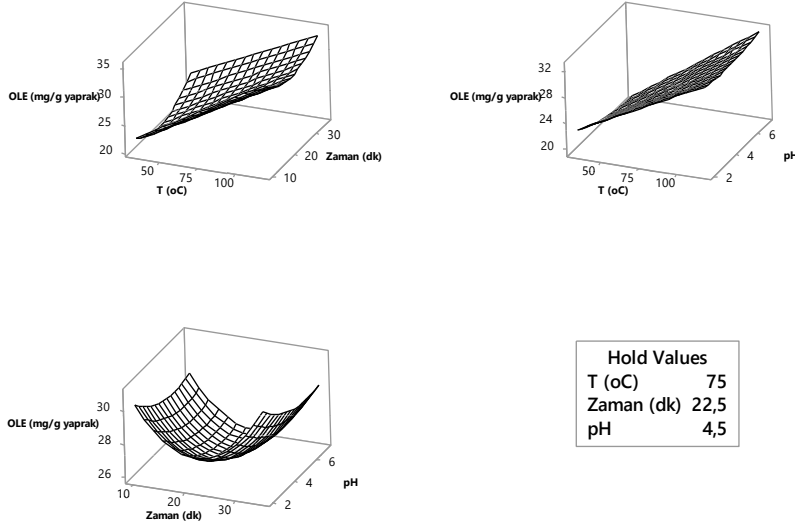
Çizelge 5.20. Oleuropein verimi için ikinci dereceden model denkleminin istatistiksel analizi.

Analysis of Variance					
Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	9	179,452	19,939	5,37	0,007
Linear	3	161,035	53,678	14,45	0,001
T (°C)	1	157,700	157,700	42,44	0,000
Zaman (dk)	1	0,552	0,552	0,15	0,708
pH	1	2,783	2,783	0,75	0,407
Square	3	17,275	5,758	1,55	0,262
T (°C)*T (°C)	1	0,000	0,000	0,00	0,995
Zaman (dk)*Zaman (dk)	1	16,713	16,713	4,50	0,060
pH*pH	1	0,968	0,968	0,26	0,621
2-Way Interaction	3	1,141	0,380	0,10	0,957
T (°C)*Zaman (dk)	1	0,442	0,442	0,12	0,737
T (°C)*pH	1	0,694	0,694	0,19	0,675
Zaman (dk)*pH	1	0,005	0,005	0,00	0,971
Error	10	37,160	3,716		
Lack-of-Fit	5	16,171	3,234	0,77	0,609
Pure Error	5	20,989	4,198		
Total	19	216,612			
Model Summary					
S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)		
1,92769	82,84%	67,41%	29,21%		

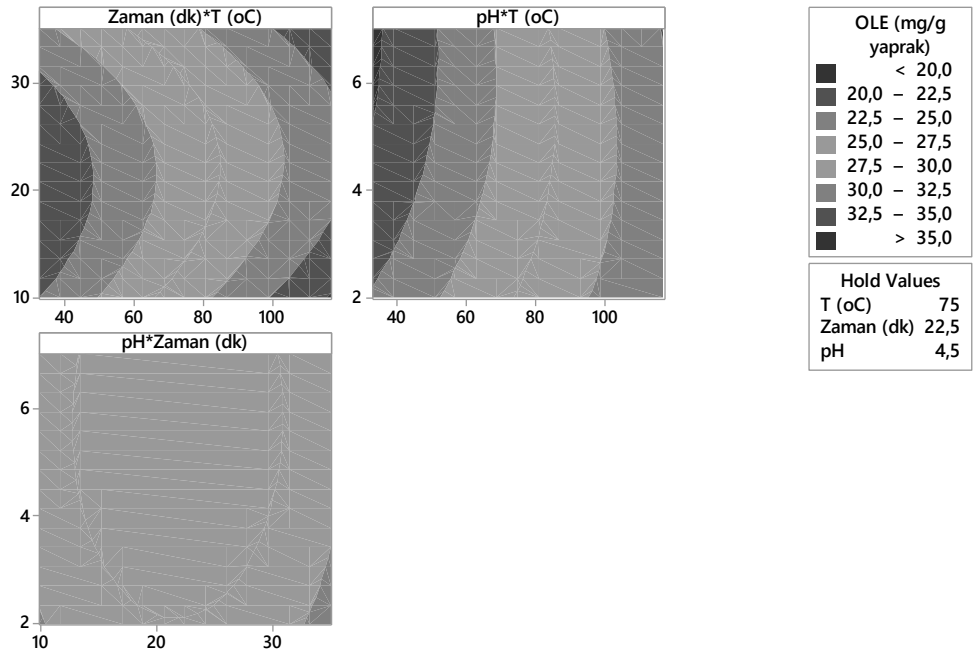


Şekil 5.19. Basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin Oleuropein verimine tekli ve ikili etkileri.

Surface Plots of OLE (mg/g yaprak)



Contour Plots of OLE (mg/g yaprak)



Şekil 5.20. Uygulanan model eşitliğine göre parametrelerin Oleuropein verimi üzerine etkisini gösteren üç boyutlu ve kontur grafikleri.

6. TARTIŞMA VE YORUM

Zeytin ağacı meyvesi ve zeytinyağı, Akdeniz bölgesinin başlıca gıda ürünlerinden ikisidir. Zeytin ağaçlarından toplanan zeytin meyvelerinden kalan yapraklar ve zeytinyağı üretiminden sonra katı atık olarak ortaya çıkan ve az miktarda zeytin yağı, zeytin çekirdeği ve meyve kabuklarını içeren zeytin prinasının değerlendirilebilmesi hem atıkların giderilmesi hem de katma değerli ürün üretilmesi açısından önemlidir. Günümüzde yaygın olarak yakıt, hayvan yemi olarak kullanılmakta ve ön arıtma yapılmadan doğrudan çevreye atılmaktadır. Zeytin yaprağı ise, zeytinyağı üretimi için toplanan zeytinlerin toplam biyokütlesinin yaklaşık %10'unu temsil eder ve ağaç budama sırasında zeytin ağacı başına yaklaşık 25kg yaprak kaybedilir [83]. Bu yan ürünün bir kısmı hayvan yemi veya biyoenerji için kullanılırken, zeytin yapraklarının çoğu atılır, bu nedenle hem yüksek bir maliyete hem de büyük bir çevresel etkiye neden olur.

Zeytin yaprağı ve zeytin pirinası antioksidan aktivitelerine atfedilen çeşitli faydalı özelliklere sahip polifenollerce zengindirler. Zeytinin toplam fenolik bileşik içeriğinin sadece %1-2'si mekanik ekstraksiyon üretim prosesi yoluyla zeytinyağına geçmektedir. Geri kalan polifenoller zeytin karasuyunda ve zeytin pirinasında bulunur. Zeytin yaprakları da başlıca önemli farmakolojik etkileri kanıtlanmış olan oleuropein ve hidroksitirosol içermektedir. Bu nedenle, zeytin pirinası ve zeytin yaprakları, nutrasötiklerin veya fonksiyonel gıdaların üretiminde kullanılan bileşenleri elde etmek için kullanılabilir.

Polifenoller zeytin yaprağı ve pirinasından katı-sıvı ekstraksiyonu ile geri kazanılmaktadır. Klasik katı-sıvı ekstraksiyonu genellikle organik çözücüler ile atmosferik basınçta, uzun ekstraksiyon sürelerinde ve yüksek miktarda çözücü kullanılarak gerçekleştirilir. Gelişen teknoloji ile son yıllarda klasik çözücü ekstraksiyon tekniğine alternatif olarak kullanılan basınçlı çözücü ekstraksiyonu ile daha kısa sürede ve daha yüksek verimde ekstraksiyon gerçekleştirmek mümkündür.

Zeytin pirinasından ve yaprağından polifenollerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu daha önce yapılmış olmasına rağmen, özellikle polifenollerin asidik ortamda ekstraksiyonuna ve çalışılan parametrelerin farklı fenolik bileşen grupları üzerine etkileriyle ilgili kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, basınçlı çözücü ekstraksiyon yöntemi ile zeytin yaprağı ve pirinasından polifenollerin ve oleuropeinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve Cevap Yüzey Yöntemi Deney tasarımı kullanılarak sıcaklık, ekstraksiyon zamanı ve pH'ın

ekstraksiyon verimi, içerdği polifenoller ve ekstrelerin antioksidan aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Zeytin yaprağından %50 etanol ile 1500 psi basınçta gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde ekstre verimleri kullanılan parametrelere bağlı olarak %22,55-36,50 arasında değişmiştir. En yüksek yaprak ekstre verimi (%36,5) 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de ve en düşük verim ise (%22,55) 75°C, 22,5dk, pH 4,5'de elde edilmiştir. Pirinanın basınçlı çözücü ekstraksiyonunda ekstre verimleri ise %2,54-17,0 arasında değişmiştir. En yüksek pirina ekstre verimi (%17) 75°C, 22,5dk pH 1,98'de ve en düşük verim ise (%2,54) 32,96°C, 22,5dk, pH 4,5'de elde edilmiştir. Yapraktan elde edilen ekstre verimleri pirinadan elde edilen verimlere göre çok daha fazladır. Bunun nedeni zeytin pirinasının daha çok büyük moleküllü polimerleri (selüloz, hemiselüloz ve lignin) içeren lignoselülozik yapıya sahip olan katı zeytin çekirdeklerince zengin olmasına atfedilebilir. Pirinada düşük pH (1,98)'larda ekstraksiyon işleminde de ekstraksiyon verimlerinin yüksek olması lignoselülozik yapıdaki polimerlerin parçalanarak küçük moleküllere dönüşmesi ile çözünürlüğünün artarak ekstre olması şeklinde açıklanabilir. Yapraktan ekstraksiyon verimine sadece sıcaklığın istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunurken, pirinanın ekstraksiyonuna ise sıcaklığın yanında pH etkisi de görülmüştür. Her iki hammaddede de sıcaklık arttıkça ve asidik pH'larda ekstraksiyon verimi artmıştır (Şekil 5.1-5.4).

Toplam ekstraksiyon verimlerinden daha önemli olan biyoaktif bileşiklerce zengin ekstre verimlerinin yüksek olmasıdır. Yüksek ekstraksiyon verimleri elde edilen ekstrenin biyoaktif bileşiklerce zengin olduğunu göstermez. Bu nedenle çalışmada, toplam fenolik bileşen, toplam flavonoid ve oleuropein verimleri de incelenmiştir.

Yaprak ekstresindeki fenolik bileşen verimi, parametrelere bağlı olarak 9,77-41,52 (mg GA/g yaprak) arasında bulunmuştur. En yüksek fenolik bileşen verimi 75°C, 9,89 dk, pH 4,5'de en düşük fenolik bileşen verimi 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de elde edilmiştir (Çizelge 5.5). Bu değerler pirinada 0,5-4,68 mg GA/g pirina arasında değişmiştir. En yüksek fenolik bileşen verimi 100°C, 30dk, pH 6'da en düşük fenolik bileşen verimi 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de elde edilmiştir (Çizelge 5.7). Yaprak ekstreleri beklendiği üzere fenolik bileşenlerce çok daha zengindir. Yaprak ekstraksiyonundan sıcaklık arttıkça toplam fenol verimi artmış, ekstraksiyon zamanı fenolik bileşenler üzerine negatif etki göstermiş ve verim pH 4-5 aralığında maksimuma ulaşmıştır (Şekil 5.5-5.6). Pirinanın

ekstraksiyonundan ise sıcaklık arttıkça ve artmış pH 4,5-5'e kadar toplam fenol verimi doğrusal olarak artmıştır (Şekil 5.7-5.8).

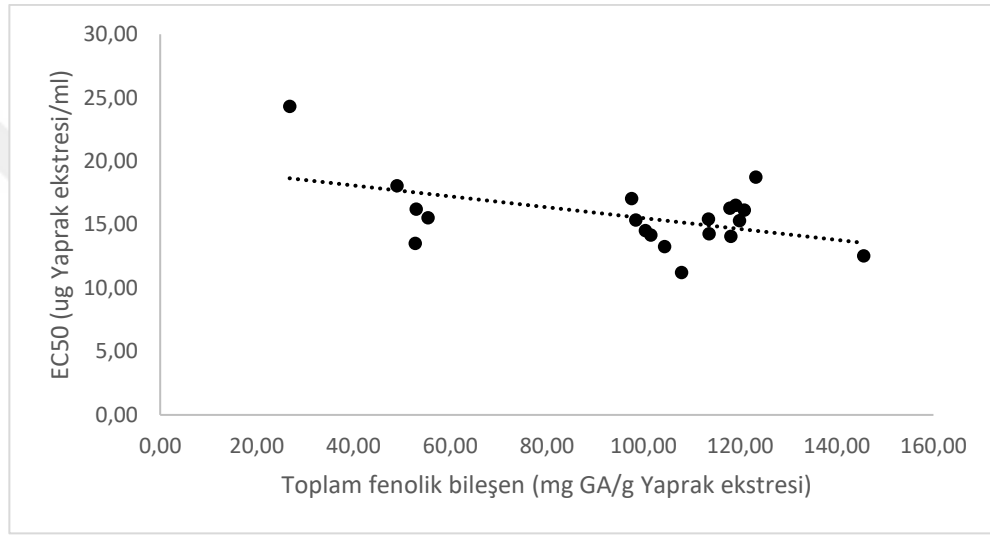
Zeytin yaprağından ekstre edilen flavonoid verimi, 1,42-6,19 (mg Quercetin/g yaprak) arasında değişmiştir. Yaprak ekstresindeki en yüksek flavonoid verimi (6,19mg Quercetin/g yaprak) 117,04°C, 22,5dk, pH 4,5'da ve en düşük flavonoid verimi (1,42mg Quercetin/g yaprak) 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de elde edilmiştir (Çizelge 5.9). Ekstraksiyon parametrelerinin ekstredeki flavonoid (mg Quercetin/g yaprak) tekli ve ikili etkileri ve için yüzey ve kontur grafikleri sırasıyla Şekil 5.9 ve Şekil 5.10'da verilmiştir. Bu şekillerden de görülebileceği gibi, sıcaklık arttıkça flavonoid verimi doğrusal olarak artmıştır. pH'nın etkisinin de pH 4,5-5'e kadar doğrusal olduğu görülmüştür.

Zeytin pirinasından flavonoid verimi, 0,25-1,92 (mg Quercetin/g pirina) arasında değişmiştir. Pirinadan en yüksek flavonoid verimi (1,92 mg Quercetin/g pirina) 100°C, 15dk, pH 6'da ve en düşük flavonoid verimi (0,25mg Quercetin/g yaprak) 50°C, 15dk, pH 3,0'da elde edilmiştir (Çizelge 5.11). Flavonoid miktarı sıcaklıkla doğrusal olarak artmıştır (Şekil 5.11-5.12).

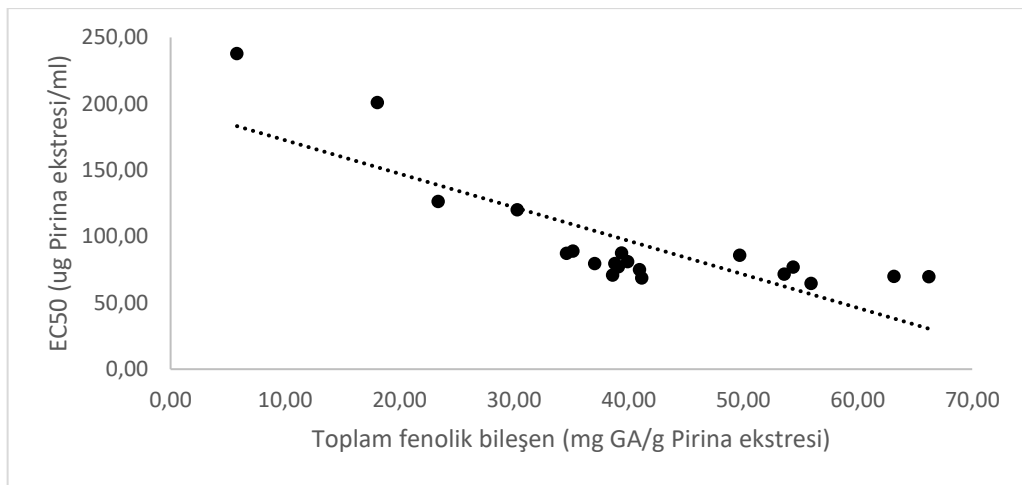
Zeytin ağacının ana bileşeni olan Oleuropein'in bu çalışmada sadece yaprak ekstrelerinde bulunduğu gözlenmiştir. Pirina ekstrelerinde Oleuropein'e rastlanmamıştır. Yaprak ekstresindeki Oleuropein miktarı kullanılan parametrelere bağlı olarak 81,23-99,85 (mg/g yaprak ekstre) arasında değişmiştir. En yüksek değer (99,85mg/g yaprak ekstre) 75°C, 9,89dk, pH 4,5'da en düşük değer (81,23mg/g yaprak ekstre) 75°C, 22,5dk, pH 1,98'de elde edilmiştir (Çizelge 5.17). pH'nın ekstredeki oleuropein miktarına doğrusal etkisi olurken, sıcaklığın etkisi kuadrattır (Çizelge 5.18, Şekil 5.17- 5.18). Oleuropein verimleri ise 19,71-32,59 (mg/g yaprak) arasında değişmiştir. En yüksek değer (32,59mg/g yaprak) 117,04°C, 22,5dk, pH 4,5'da en düşük değer (19,71mg/g yaprak) 32,96°C, 22,5dk, pH 4,5'da elde edilmiştir (Çizelge 5.19). Kuru yaprak üzerinden 1 gram zeytin yaprağından ekstre edilen Oleuropein verimi sıcaklıkla beraber artmıştır. Ekstre içindeki Oleuropein miktarı pH ile değişmekle birlikte, ekstraksiyon verimine bağlı olarak yapraktan ekstre edilebilen Oleuropein miktarı üzerine daha çok sıcaklığın pozitif etkisi görülmüştür (Çizelge 5,20, Şekil 5.19- 5.20)

Zeytin yaprağının basınçlı çözücü ekstraksiyonundan elde edilen ekstrelerin DPPH radikal süpürücü aktiviteleri DPPH'nın %50'sini inhibe edici ekstre konsantrasyonu (EC₅₀ (µg/ml)) olarak 11,24-24,33µg/ml arasında değişmiştir. EC₅₀ değerinin düşük olması DPPH aktivitesinin fazla olmasını göstermektedir. En yüksek DPPH aktivitesi (11,24

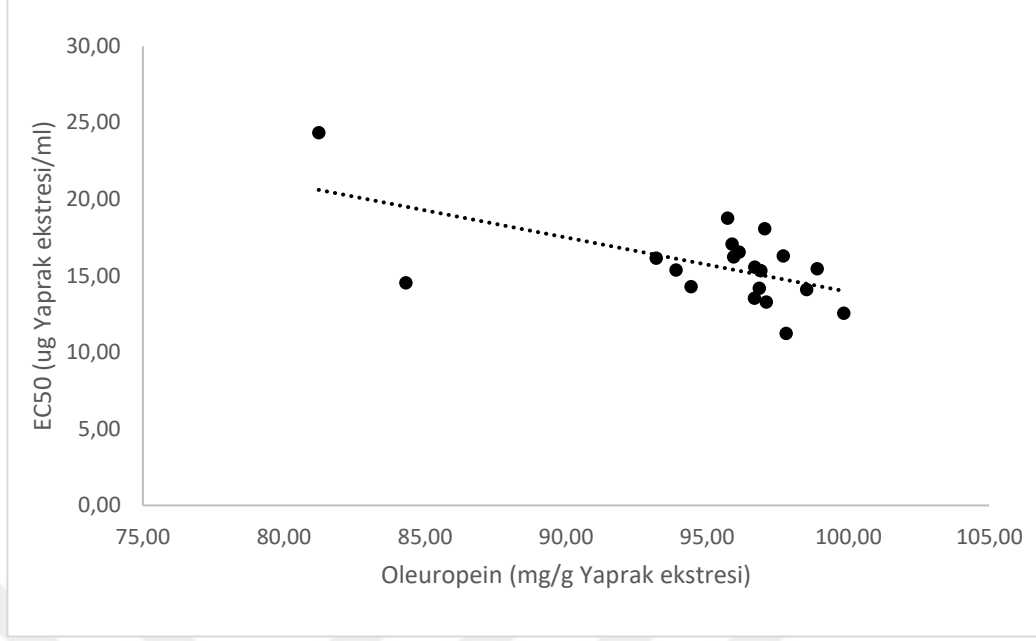
$\mu\text{g/ml}$) 75°C , 22,5dk, pH 4,5’da elde edilen ekstrelerde gözlenmiştir. Pirinadan elde edilen ekstrelerin DPPH aktiviteleri ise yaprak ekstre aktivitelerine göre çok daha düşük çıkmıştır (64,61-238 $\mu\text{g/ml}$). Bu sonuç aktivitenin fenolik bileşen miktarı ile de değiştiğini göstermektedir. DPPH aktivitesinin yaprak ve pirina ekstrelerinde toplam fenolik bileşen miktarları ile Şekil 6.1 ve 6.2’de, yaprak ekstresinde bulunan Oleuropein miktarı ile değişimi ise Şekil 6.3’de verilmiştir. Şekillerden görüleceği üzere ekstrelerdeki fenolik bileşen miktarı arttıkça DPPH serbest radikal süpürücü aktiviteler de artmaktadır.



Şekil 6.1. Yaprak ekstresinin DPPH aktivitesinin ekstredeki toplam fenolik bileşen miktarı ile değişimi.



Şekil 6.2. Pirina ekstresinin DPPH aktivitesinin ekstredeki toplam fenolik bileşen miktarı ile değişimi.



Şekil 6.3. DPPH aktivitesinin ekstredeki Oleuropein miktarı ile değişimi.

Çalışmada basınçlı çözücü ekstraksiyon parametrelerinin ekstre verimi, fenolik bileşen verimleri ve DPPH aktiviteleri üzerine etkilerini görebilmek ve maksimum cevabı bulabilmek için Cevap Yüzey Yöntemi kullanılarak deney tasarımı ve buna bağlı olarak cevapları optimize edebilecek ikinci derece polinom modelleri geliştirilmiştir. Elde edilen modellerin deneysel veriler ile uyumu %95 güven aralığında varyans analizi (ANOVA) test edilmiş ve test sonuçları çizelgeler halinde verilmiştir (Çizelge 5.2-5.18). Elde edilen modeller Eşitlik 5.1-5.10'da verilmiştir. Model eşitliklerine ait istatistik verileri Çizelge 6.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 6.1. Model eşitliklerine ait istatistik verileri.

Cevap	Model F	Model P	Uyum eksikliği (lack of fit)	R ²
YAPRAK				
Ekstre verim (g ekstre/100g yaprak)	2,82	0,061	0,212	0,7173
Toplam fenol verim (mg GA/g yaprak)	4,45	0,014	0,129	0,8003
Flavonoid verim (mg Q/g yaprak)	3,36	0,036	0,073	0,7516
DPPH- EC ₅₀ (µg yaprak ekstresi/ml)	2,07	0,136	0,849	0,6512
Oleuropein (mg OLE/g yaprak ekstre)	2,81	0,061	0,003	0,7168
Oleuropein verim (mg OLE/g yaprak)	5,37	0,007	0,609	0,8284
PİRİNA				
Ekstre verim (g ekstre/100g pirina)	4,07	0,020	0,003	0,7856
Toplam fenol verim (mg GA/g pirina)	13,94	0,000	0,032	0,9262
Flavonoid verim (mg Q/g pirina)	2,02	0,144	0,009	0,6454
DPPH- EC ₅₀ (µg pirina ekstresi/ml)	18,70	0,000	0,007	0,9439

Parametrelerin tüm etkilerinin (tekli, ikili ve kuadratik) kullanılarak geliştirilen model eşitliklerinin F değerleri 2,02-13,94 arasında bulunmuştur. Bazı eşitliklerin elde edilen verileri açıklamada yeterli olmadığı görülmüştür (Model P>0,05). Bazı model eşitliklerinde de uyum eksikliğinin anlamlı olduğu gözlenmiştir (p<0,05). Parametrelerin değişimi ile değişen cevaplar arası ilişki katsayısı (R²) 0,64-0,94 arasında değişmiştir.

Geliştirilen modellerin bazılarının deneysel verileri açıklamada yetersiz kalmasına rağmen özellikle yüksek F değerine sahip ($p < 0,05$) modellerin maksimum cevabı verecek şekilde parametrelerin optimizasyonunda kullanılabileceği öngörülebilir. Minitab istatistik programı kullanılarak tüm cevapların maksimize (DPPH-EC₅₀ hariç) edilecek şekilde optimizasyonu sonucu elde edilen maksimum cevaplar ve bu cevapların elde edildiği parametre değerleri Çizelge 6.2’de verilmiştir. EC₅₀ değeri ne kadar küçükse DPPH aktivitesi o kadar büyük olacağı için EC₅₀ değeri için cevaplar minimize edilecek şekilde optimize edilmiştir.



Çizelge 6.2. Minitab istatistik programı ile maksimum cevapların (EC_{50} için minimum) elde edilebilmesi için parametrelerin optimizasyonu.

Cevap	Maksimum	Sıcaklık (°C)	Ekstraksiyon zamanı (dk)	pH	İstenebilirlik (Desirability, d)	P
YAPRAK						
Ekstre verim (g ekstre/100g yaprak)	39,17	117,0	9,90	1,98	1,000	0,061
Toplam fenol verim (mg GA/g yaprak)	43,42	117,0	35,10	3,76	1,000	0,014
Flavonoid verim (mg Q/g yaprak)	6,72	117,0	35,10	5,04	1,000	0,036
Oleuropein (mg OLE/g yaprak ekstre)	102,71	84,77	9,90	5,27	1,000	0,061
Oleuropein verim (mg OLE/g yaprak)	36,07	117,0	9,90	5,04	1,000	0,007
PIRINA						
Ekstre verim (g ekstre/100g pirina)	13,95	91,5	24,20	1,98	0,788	0,020
Toplam fenol verim (mg GA/g pirina)	6,09	117,0	35,10	7,02	1,000	0,000
Flavonoid verim (mg Q/g pirina)	1,62	110,0	23,40	7,02	0,8184	0,144
	Minimum					
EC_{50} (μ g yaprak ekstresi/ml)	11,22	117,0	35,10	4,73	1,000	0,136
EC_{50} (μ g pirina ekstresi/ml)	35,30	117,0	9,90	5,27	1,000	0,000

Sonuç olarak, zeytinyağı üretiminde açığa çıkan katı atık olan zeytin pirinasının ve zeytin yapraklarının katma değerli ürünlere dönüştürülmesi için gerçekleştirilen %50 etanolün çözücü olarak kullanıldığı basınçlı çözücü ekstraksiyonunda, yaprakta polifenol verimlerinin yüksek sıcaklıklarda (>80°C) ve pH 3-5 aralığında arttığı, sıcaklık ve pH'ın ekstrede bulunan Oleuropein miktarı üzerine önemli etkisi olduğu ve yaklaşık olarak %3-4 verimle %10 Oleuropein ve %15 toplam fenol içeren ekstrelerin elde edilebildiği ve bu ekstrelerin de sahip oldukları içerikten dolayı DPPH serbest radikal süpürücü aktivitelerinin yüksek olduğu (EC₅₀ 11µg/ml) görülmüştür. Bu içeriğe sahip ekstreler nütrosötik ve fonksiyonel gıda ürünlerinde değerlendirilebilir. Pirinadan ise yaklaşık %0,5 verimle 100 gramda 60mg toplam fenol içeren ekstreler elde edilebilmiştir. Pirinadan düşük verim ve polifenol içeriğinden dolayı tek başına polifenollerin geri kazanımı prosesinin uygun olmayacağı ancak pirinanın biyorafineri yaklaşımı ile farklı ürünler için değerlendirilirken polifenollerin de elde edilebileceği önerilmektedir. Ayrıca basınçlı çözücü ekstraksiyonunun endüstriyel ölçekte kullanılabilmesi için bu parametrelere ilave olarak ekstraksiyon prosesinin teknolojik ve ekonomik olarak da tasarlanması ve parametrelerin tekrar değerlendirilmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- [1] Keating, E., Calhau, C., Faria, A., Martel, F. (2018). Chapter 23 - Interaction of Polyphenols With the Intestinal and Placental Absorption of Some Bioactive Compounds. R.R. Watson, V.R. Preedy, S. Zibadi (Editörler), *Polyphenols: Mechanisms of Action in Human Health and Disease* içinde (s. 321-336). Academic Press.
- [2] Belščak-Cvitanović, A., Durgo, K., Huđek, A., Bačun-Družina, V., Komes, D. (2018). 1 - Overview of polyphenols and their properties. C. M. Galanakis (Ed.), *Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications* içinde (s. 3-44). Woodhead Publishing.
- [3] Galmés, S., Reynés, B., Palou, M., Palou-March, A., Palou, A. (2021). Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of the Main Olive Tree Phenols and Polyphenols: A Literature Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (18), 5281-5296.
- [4] Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017). Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europea*). *Food and Bioprocess Processing*, 106, 19-28.
- [5] Santos-Buelga, C. ve Williamson, G. (2003). Polyphenol Extraction From Foods. M. T. Escribano-Bailon ve C. Santos-Buelga (Editörler), *Methods in Polyphenol Analysis* içinde (s.1-12). Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- [6] Sarı, H. (2017). *Zeytin Yaprağının Biyokütle Olarak Değerlendirilmesi ve Aktif Karbon Üretimi*. (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [7] Kashaninejad, M., Sanz, M. T., Blanco, B., Beltrán, S., Niknam, S. M. (2020). Freeze dried extract from olive leaves: Valorisation, extraction kinetics and extract characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 124, 196-207.
- [8] Gökçay, E. İ., Kılıç, E. ve Akalın, E. Covid-19&Zeytin Yaprağı. İstanbul Üniversitesi. <https://tibuad.istanbul.edu.tr/tr/> (Erişim tarihi: 01.11.2021).
- [9] Simpson, M. G. (2010). 8- Diversity and Classification of Flowering Plants: Eudicots. M. G. Simpson (Ed.), *Plant Systematics (Second Edition)* içinde (275-448). San Diego: Academic Press.
- [10] Saygın, B. (2009). *Zeytin yaprağındaki Başlıca Fenolik Bileşikler ve Bunların Antioksidan Kapasiteleri Üzerine Araştırmalar*. (Yüksek Lisans Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [11] Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoğlu, A., Şengül, F., Özer, A. (2004). A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 34 (3), 209-247.
- [12] Dinç, G. (2018). *Towards a Sustainable Waste Management In Olive Mill Through Olive Pomace Pyrolysis*. (Yüksek Lisans Tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [13] Topuz, S. (2019). *Farklı Zeytin Çeşidi Yapraklarından Oleuropeinin Ekstraksiyonu, Kısmi Saflaştırılması, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). Tokat: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- [14] De Leonardis, A. ve Macciola, V. (2010). Chapter 30- Olive Biophenols as Food Supplements and Additives. V. R. Preedy ve R. R. Watson (Editörler), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* içinde (s. 283-289). San Diego: Academic Press.
- [15] Kermanshah, Z., Samadanifard, H., Moghaddam, O. M., Hejrati, A. (2020). Olive leaf and its various health-benefitting effects: a review study. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 14, 1301-1312.
- [16] Tsimidou, M. Z. ve Papoti, V. T. (2010). Chapter 39- Bioactive Ingredients in Olive Leaves. V. R. Preedy ve R. R. Watson (Editörler), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* içinde (s. 349-356). San Diego: Academic Press.
- [17] Medina, E., Romero, C., Garcia, P., Brenes, M. (2019). Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food&function*, 10 (8), 4716-4724.
- [18] Şahin, S. ve Bilgin, M. (2018). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: A review. *Journal of the science of food and agriculture*, 1271-1279.
- [19] Erbay, Z. ve Icier, F. (2010). The Importance and Potential Uses of Olive Leaves. *Food Reviews International*, 26 (4), 319-334.
- [20] Homssi, H. ve Kosar, M. (2019). Oleuropein amounts of olive leaves from different regions of Northern Cyprus. *EMU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2 (2), 68-74.
- [21] Madureira, J., Margaça, F. M. A., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F., Verde, S. C., Barros, L. (2021). Applications of bioactive compounds extracted from olive industry wastes: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21 (1), 453-476.
- [22] Nicolí, F., Negro, C., Vergine, M., Aprile, A., Nutricati, E., Sabella, E., Miceli, A., Luvisi, A., De Bellis, L. (2019). Evaluation of Phytochemical and Antioxidant Properties of 15 Italian *Olea europaea* L. Cultivar Leaves. *Molecules*, 24 (10).
- [23] Lorini, A., Aranha, B. C., da Fonseca Antunes, B., Otero, D. M., Jacques, A. C., Zambiasi, R. C. (2021). Metabolic profile of olive leaves of different cultivars and collection times. *Food Chemistry*, 345, 128-158.
- [24] Orak, H. H., Karamac', M., Amarowicz, R., Orak, A., Penkacik, K. (2019). Genotype-Related Differences in the Phenolic Compound Profile and Antioxidant Activity of Extracts from Olive (*Olea europaea* L.) Leaves. *Molecules*, 24, 1420-1429.
- [25] Lockyer, S., Rowland, I., Spencer, J. P. E., Yaqoob P., Stonehouse, W. (2017). Impact of phenolic-rich olive leaf extract on blood pressure, plasma lipids and inflammatory markers: a randomised controlled trial. *European journal of nutrition*, 56, 1421-1432.
- [26] Canabarro, N. I., Mazutti, M. A. ve do Carmo Ferreira, M. (2019). Drying of olive (*Olea europaea* L.) leaves on a conveyor belt for supercritical extraction of bioactive compounds: Mathematical modeling of drying/extraction operations and analysis of extracts. *Industrial Crops and Products*, 136, 140-151.
- [27] Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaves extracts from

- six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food Chemistry*, 320, 126626.
- [28] Markhali, F. S., Teixeira, J. A. ve Rocha, C. M. R. (2020). Olive Tree Leaves-A Source of Valuable Active Compounds. *Processes*, 8.
- [29] Abdelillah Ali Elhoussein, A. (2018). *Zeytin Yaprağı Ekstraktının Fenolik Profiline Stabilitesinin İncelenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul: İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.
- [30] Tunalıoğlu, R. (1994). *Önemli Zeytin Üreticisi Ülkelerin Zeytinciliği İle Türkiye Zeytinciliğinin Bazı Yönlerden Karşılaştırılması*. (Doktora Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarım Ekonomisi Anabilim Dalı.
- [31] Kaynak Duman, A. (2020). *Zeytinyağı Endüstri Atıklarının Yaşam Döngüsü Değerlendirmesi*. (Doktora Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [32] Chanioti, S. ve Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228-239.
- [33] Vitali Čepo, D., Radić K., Jurmanović S., Jug M., Grdić Rajković, M., Pedisić, S., Moslavac, T., Albahari, P. (2018). Valorization of Olive Pomace-Based Nutraceuticals as Antioxidants in Chemical, Food, and Biological Models. *Molecules*, 23 (8).
- [34] Antónia Nunes, M., Costa, A. S. G., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C., Freitas, V., Oliveira, M. B. P. P. (2018). Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. *Science of The Total Environment*, 644, 229-236.
- [35] Páscoa, R. N. M. J., Nunes, M. A., Reszczyński, F., Costa, A. S. G., Oliveira, M. B. P. P., Alves, R. C. (2021). Near Infrared (NIR) Spectroscopy as a Tool to Assess Blends Composition and Discriminate Antioxidant Activity of Olive Pomace Cultivars. *Waste and Biomass Valorization*, 12 (9), 4901-4913.
- [36] Miranda, I., Simões, R., Medeiros, B., Nampoothiri, K. M., Sukumaran, R. K., Rajan, D., Pereira, H., Ferreira-Dias, S. (2019). Valorization of lignocellulosic residues from the olive oil industry by production of lignin, glucose and functional sugars. *Bioresource Technology*, 292, 121936.
- [37] T.C. Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı. (2021). Hatay İli Zeytin Atığından Enerji Üretim Tesisi Ön Fizibilite Raporu. Hatay: T.C. Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı.
- [38] Goldsmith, C. D., Vuong, Q. V., Stathopoulos, C. E., Roach, P. D., Scarlett, C. J. (2018). Ultrasound increases the aqueous extraction of phenolic compounds with high antioxidant activity from olive pomace. *LWT- Food Science and Technology*, 89, 284-290.
- [39] Caporaso, N., Formisano, D. ve 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.
- [40] Madureira, J., Dias, M. I., Pinela, J., Calhelha, R. C., Barros, L., Santos-Buelga, C., Margaça, F. M. A., Ferreira, I. C. F. R., Cabo Verde, S. (2020). The use of gamma radiation for extractability improvement of bioactive compounds in olive oil wastes. *Science of The Total Environment*, 727, 138706.

- [41] Kazan, A. (2014). *LignoSelülozik Biyokütlenin Yüksek Basınçlı Sıcak Su ile Hidrolizi ve Elde Edilen Ligninden Aerojel Üretimi*. (Yüksek Lisans Tezi). İzmir: Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [42] Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Coelho, A. V., Boas, L. V. (2006). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, 12 (5), 385-395.
- [43] Huang, Y.-L., Oppong, M. B., Guo, Y., Wang, L.-Z., Fang, S.-M., Deng, Y.-R., Gao, X.-M. (2019). The Oleaceae family: A source of secoiridoids with multiple biological activities. *Fitoterapia*, 136, 104155.
- [44] Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., Haddad, M. A., Al-Hiary, M. (2019). Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 102 (5), 1397-1400.
- [45] Tsao, R. (2010). Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients*, 2 (12), 1231-1246.
- [46] Karakaya, A. (2011). *Purification of Polyphenolic Compounds from Crude Olive Leaf Extract*. (Yüksek Lisans Tezi). İzmir: İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü.
- [47] Nizamlioğlu, N. M. ve Nas, S. (2010). Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5 (1), 20-35.
- [48] Aytul, K. K. (2010). *Antimicrobial and Antioxidant Activities of Olive Leaf Extract and Its Food Applications*. (Yüksek Lisans Tezi). İzmir: İzmir Yüksek Teknolojiler Enstitüsü.
- [49] Temiz, M. A. ve Temur, A. (2016). Effect of Solvent Variation on Polyphenolic Profile and Total Phenolic Content of Olive Leaf Extract. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 27 (1), 43-50.
- [50] Raina, B. L. (2003). Olives. B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* içinde (s. 4260-4267). Oxford: Academic Press.
- [51] Fki, I., Sayadi, S., Mahmoudi, A., Daoued, I., Marrekchi, R., Ghorbel, H. (2020). Comparative Study on Beneficial Effects of Hydroxytyrosol- and Oleuropein-Rich Olive Leaf Extracts on High-Fat Diet-Induced Lipid Metabolism Disturbance and Liver Injury in Rats. *BioMed Research International*.
- [52] Chen, C., Ai, Q.-d. ve Wei, Y.-h. (2021). Potential role of hydroxytyrosol in neuroprotection. *Journal of Functional Foods*, 82, 104506.
- [53] Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- [54] Jaski, J. M., Barão, C. E., Morais Lião, L., Silva Pinto, V., Zanoelo, E. F., Cardozo-Filho, L. (2019). β -Cyclodextrin complexation of extracts of olive leaves obtained by pressurized liquid extraction. *Industrial Crops and Products*, 129, 662-672.
- [55] Doğangün, E. (2018). *Meyve Tutumundan Hasada Kadar Geçen Sürede Gemlik Çeşidi Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivite ve Fenolik Bileşiklerindeki*

- Değişimin Belirlenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). Bursa: Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [56] Araújo, M., Pimentel, F. B., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P. (2015). Phenolic compounds from olive mill wastes: Health effects, analytical approach and application as food antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 45 (2), 200-211.
- [57] Žugčić, T., Abdelkebir, R., Alcantara, C., Collado, M. C., García-Pérez, J. V., Meléndez-Martínez, A. J., Režek Jambrak, A., Lorenzo, J. M., Barba, F. J. (2019). From extraction of valuable compounds to health promoting benefits of olive leaves through bioaccessibility, bioavailability and impact on gut microbiota. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 63-77.
- [58] Castillo, J. J., Alcaraz, M. ve Benavente-García, O. (2010). Chapter 102- Antioxidant and Radioprotective Effects of Olive Leaf Extract. V. R. Preedy ve R. R. Watson (Editörler), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* içinde (s. 951-958). San Diego: Academic Press.
- [59] Türk Farmakoloji Derneği. (2005). Nitrik Oksidin Farmakolojisi. *Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitim Sempozyumları Programı*. Mersin: Türk Farmakoloji Derneği.
- [60] Omar, S. H. (2010). Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, 78 (2), 133-154.
- [61] Özcan, M. M. ve Matthäus, B. (2017). A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243 (1), 89-99.
- [62] Karakulak, Ş. (2009). *Zeytin Yapraklarından Antioksidan Eldesinde Mikrodalga ve Etüv ile Kurutmanın Çözücü, Sıcaklık ve Zaman Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi.* (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul: İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [63] Fındık, S. (2017). *Farklı Çeşit Zeytin Meyvesi ve Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivite, Fenolik Bileşen ve Toplam Fenol İçerikleri Üzerine Hasat Zamanının Etkisi,* (Yüksek Lisans Tezi). Konya: Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [64] Rahmanian, N., Jafari, S. M. ve Wani, T. A. (2015). Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves. *Trends in Food Science & Technology*, 42 (2), 150-172.
- [65] Hashmi, M. A., Khan, A., Hanif, M., Farooq, U., Perveen, S. (2015). Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 29.
- [66] Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in Olive Leaf Extract. *Molecules*, 25 (24).
- [67] Hernández, V., Romero-García, J. M., Dávila, J. A., Castro, E., Cardona, C. A. (2014). Techno-economic and environmental assessment of an olive stone based biorefinery. *Resources, Conservation and Recycling*, 92, 145-150.
- [68] Özcan, M. M., Fındık, S., AlJuhaimi, F., Ghaffoor, K., Babiker, E. E., Adiamo, O. Q. (2019). The effect of harvest time and varieties on total phenolics, antioxidant

- activity and phenolic compounds of olive fruit and leaves. *Journal of food science and technology*, 56 (5), 2373-2385.
- [69] Zoric', N., Kopjar, N., Kraljic', K., Orsalic', N., Tomic', S., Kosalec, I. (2016). Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis* – the in vitro viability study. *Acta Pharmaceutica*, 66 (3), 411-431.
- [70] Güler, G. (2021). *Kırmızı Üzüm Proses Atıklarından Polifenollerin Basınçlı Çözücü Ekstraksiyonu*. (Yüksek Lisans Tezi). Bilecik: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [71] de Castro, M. D. L. ve Capote, F. P. (2010). Chapter 28- Extraction of Oleuropein and Related Phenols from Olive Leaves and Branches. V. R. Preedy ve R. R. Watson (Editörler), *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* içinde (s. 259-273). San Diego: Academic Press.
- [72] Kettle, A. (2014). Use of Accelerated Solvent Extraction to Improve Laboratory Workflow. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com>. (Erişim tarihi: 16.06.2022).
- [73] Lafka, T.-I., Lazou, A. E., Sinanoglou, V. J., Lazos, E. S. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*, 125 (1).
- [74] Alu'datt, M. H., Alli, I., Ereifej, K., Alhamad, M., Al-Tawaha, A. R., Rababah, T. (2010). Optimisation, characterisation and quantification of phenolic compounds in olive cake. *Food Chemistry*, 123 (1), 117-122.
- [75] 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.
- [76] Erragued, R., Braga, M. E. M., Bouaziz, M., Gando-Ferreira, L. (2022). Integration of solvent extraction and membrane processes to produce an oleuropein extract from olive leaves. *Separation and Purification Technology*, 299, 121-751.
- [77] Martín-García, B., Pimentel-Moral, S., Gómez-Caravaca, A. M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A. (2020). Box-Behnken experimental design for a green extraction method of phenolic compounds from olive leaves. *Industrial Crops and Products*, 154, 112741.
- [78] da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Garipey, Y., Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102234.
- [79] Pontes, P. V. d. A., Czaikoski, A., Almeida, N. A., Fraga, S., Rocha, S., L. d. O., Cunha, R. L., Maximo, G. J., Batista, E. A. C. (2022). Extraction optimization, biological activities, and application in O/W emulsion of deep eutectic solvents-based phenolic extracts from olive pomace. *Food Research International*, 161, 111753.
- [80] Macedo, G. A., Santana, Á. L., Crawford, L. M., Wang, S. C., Dias, F. F. G., de Moura Bell, J. M. L. N. (2021). Integrated microwave- and enzyme-assisted extraction of phenolic compounds from olive pomace. *LWT*, 138, 110621.
- [81] Xie, P., Huang, L., Zhang, C., Deng, Y., Wang, X., Cheng, J. (2019). Enhanced extraction of hydroxytyrosol, maslinic acid and oleanolic acid from olive pomace:

- Process parameters, kinetics and thermodynamics, and greenness assessment. *Food Chemistry*, 276, 662-674.
- [82] Karadeniz Teknik Üniversitesi. YENİ DENEY: DOĞAL ÜRÜNLERDE TOPLAM POLİFENOL TAYİNİ. <https://www.ktu.edu.tr>. (Erişim tarihi: 22.06.2022).
- [83] Khemakhem, I., Ahmad-Qasem, M. H., Catalán, E. B., Micol, V., García-Pérez, J. V., Ayadi, M. A., Bouaziz, M. (2017). Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 466-473.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Göksu GENÇTÜRK
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı :
E-Posta :

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2018, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, Kimya Mühendisliği
- 2022, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı