T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ KULLANILARAK ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKSİYON İŞLEMİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Naciye ÜNVER

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

ŞANLIURFA

2018

Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK danışmanlığında, Naciye ÜNVER'in hazırladığı **"Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi Kullanılarak Zeytin Yaprağı Ekstraksiyon İşleminin Optimize Edilmesi"** konulu bu çalışma 04/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

İmza

Danışman : Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK .....

Üye : Prof. Dr. İbrahim HAYOĞLU .....

Üye : Prof. Dr. İhsan Güngör ŞAT .....

Bu Tezin Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. Halil Murat ALĞIN
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma HÜBAK Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: 17119

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
ŞEKİLLER DİZİNİ iv
ÇİZELGELER DİZİNİ v
SİMGELER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR 5
2.1. Zeytin Yaprağında Bulunan Fenolik Bileşikler 5
2.1.1. Zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi 11
2.1.2. Zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan etkisi 13
2.2. Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler 16
2.3. Yanıt Yüzey Metadolojisi 20
3. MATERYAL ve YÖNTEM 24
3.1. Materyal 24
3.2. Yöntem 24
3.3. Yapılan Analizler 29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA 32
4.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon ve Optimizasyon Sonuçları 32
4.1.1. Bağımsız değişkenlerin araştırılan parametreler üzerindeki etkisi 33
4.1.1.1. Toplam fenolik madde miktarı 33
4.1.1.2. Ekstraksiyon verimi 38
4.1.1.3. EC_{50} değeri 41
4.1.2. Optimum çalışma şartlarının belirlenmesi 44
4.2. Optimize Şartlarda ve Sabit Çözücü Miktarında Araştırılan Parametrelere Çözücü Konsantrasyonunun Etkisi 46
4.3. Optimize Şartlarda ve Sabit Çözücü Konsantrasyonunda Araştırılan Parametrelere Çözücü Miktarının Etkisi 50
4.4. Optimize Şartlarda Sabit Çözücü Miktarı ve Etanol Konsantrasyonunda Araştırılan Parametrelere Yaprak Çeşidi ve Kurutma İşleminin Etkisi 54
4.5. Zeytin Yaprağı Ekstraktının Bazı Ticari Antioksidan Maddelerle Karşılaştırılması 58
4.6. Ekstraksiyon Metodunun Araştırılan Parametrelere Etkisi 59
4.7. Katı Fazın Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi 61
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 63
KAYNAKLAR 66
ÖZGEÇMİŞ 72
EKLER 73

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ULTRASON DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ KULLANILARAK ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKSİYON İŞLEMİNİN OPTİMİZE EDİLMESİ

Naciye ÜNVER

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK
Yıl:2018, Sayfa: 75

Bu çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının ultrason destekli ekstraksiyonunun optimize edilmesinde sıcaklık, süre ve ultrasonik güç olmak üzere üç farklı bağımsız değişken kullanılmış ve bu değişkenlerin, ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve EC_{50} değeri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yanıt Yüzey Metodolojisine göre Box-Behnken Tasarım Modeli ile yapılan değerlendirme sonucunda ultrason destekli ekstraksiyonunun optimize edilmesinde optimum koşullar 62.94 °C, 50.67 dk ve %64.65 ultrasonik güç olarak belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının toplam fenolik madde miktarı ve EC_{50} değeri açısından %60 ve 80 etanol çözeltileriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonda istatistiksel olarak farklılık olmadığı ($P>0.05$), diğer konsantrasyon oranları ile tüm çözücü miktarları açısından istatistiksel olarak farklılığın önemli olduğu ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Ekstraksiyon verimi bakımından araştırılan tüm konsantrasyon oranları ile çözücü miktarları açısından farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.01$). Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ve çalışılan diğer parametreler açısından değerlendirildiğinde, diğer yöntemlere göre ultrason destekli ekstraksiyonun, fenolik maddelerin çözücüye geçişini hızlandırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca kuru yaprak ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitesi daha yüksek bulunmuştur. Elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının ticari olarak kullanılabilir olduğu, ancak gıda katkı maddesi olarak kullanılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu sonucuna varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Box Behnken Tasarım Modeli, EC_{50}, fenolik madde, optimizasyon, zeytin yaprağı

ABSTRACT

MSc Thesis

OPTIMIZATION OF OLİVE LEAF EXTRACTION PROCESS BY USING ULTRASOUND ASSISTED EXTRACTION METHOD

Naciye ÜNVER

Harran University
Graduate School of Naturel and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof.Dr. Şerafettin ÇELİK
Year: 2018, Page: 75

In this study, the effects of three different independent variables as temparature, time and ultrasonic power on the total phenolic substance content, extraction yield and IC_{50} value of extracts were investigated in the optimization of ultrasonic assisted extraction of olive leave. According to response surface methodology as a result of the evaluation made with Box-Behnken Design Model that optimum conditions were determined as 62.94 °C, 50.67 min, 64.65% ultrasonic power. There was no statistically significant difference ($P>0.05$) on the total amount of phenolic substances and IC_{50} value between 60% and 80% ethyl alcohol solutions, and there was statistically significant difference between other concentration values and all solvent amounts ($P<0.05$). Changes in extraction yield value according to all investigated concentrations and solvent amounts parameters were important statistically ($P>0.01$). When it was evaluated in terms of SEM images and investigated other parameters, it was concluded that ultrasonically assisted extraction accelerated the transition of phenolic substances to solvent according to other methods. In addition, it has been determined that the total phenolic matter, extraction yield and antioxidant capacity of dry leaf extracts are higher than the fresh leaves extracts. It has been concluded that the obtained olive leaf extract can be used commercially but it is necessary to make more researches in order to be used as a food additive.

KEY WORDS: Box-Behnken Design Model, IC_{50}, olive leaf, optimization, phenolic matter

TEŞEKKÜR

Bu çalışma konusunun belirlenmesinde, yürütülmesinde ve değerlendirilmesinde benden yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Şerafettin ÇELİK'e; zeytin yapraklarının temini ve sınıflandırılmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Ebru SAKAR'a, optimizasyon çalışmasında bilgilerini ve tecrübelerini paylaşan Arş. Gör. Bülent BAŞYİĞİT'e ve manevi anlamda benden desteğini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma ve aileme teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı: (a) Hidroksibenzoik asit, (b) Hidroksisinamik asit 6
Şekil 2.2. Flavanoitlerin genel yapısı 7
Şekil 2.3. Oleuropein kimyasal yapısı 8
Şekil 2.4. Oleuropein biyosentezi 9
Şekil 2.5. Hidroksitirozol kimyasal yapısı 10
Şekil 2.6. Antioksidanlar genel etki mekanizması 14
Şekil 3.1. Zeytin yaprağından ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakt elde etme aşamaları 26
Şekil 3.2. İnfüzyon yöntemi ile zeytin yaprağından ekstrakt elde etme aşamaları 29
Şekil 3.3. Konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi ile zeytin yaprağından ekstrakt elde etme aşamaları 29
Şekil 4.1. Toplam fenolik madde miktarı ile ilgili deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki 35
Şekil 4.2. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) Sabit ekstraksiyon süresinde (59.86 dk), (B) Sabit ekstraksiyon sıcaklığında (65.91 °C), (C) Sabit ultrasonik güçte (% 83.33) TFM için yanıt yüzey grafiği 38
Şekil 4.3. Ekstraksiyon verimi için deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki 39
Şekil 4.4. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) Sabit ekstraksiyon süresinde (51.74 dk), (B) Sabit ultrasonik güçte (%95.43), (C) Sabit ekstraksiyon sıcaklığında (68.6 °C) ekstraksiyon verimi için yanıt yüzey grafiği 40
Şekil 4.5. EC_{50} değeri için deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki 41
Şekil 4.6. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) Sabit ultrasonik güçte (% 67.28), (B) Sabit ekstraksiyon süresinde (39.70 dk), (C) Sabit ekstraksiyon sıcaklığında (55 °C) EC_{50} değeri için yanıt yüzey grafiği 43
Şekil 4.7. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) Sabit ultrasonik güçte (%64.65), (B) Sabit ekstraksiyon süresinde (50.67 dk), (C) Sabit ekstraksiyon sıcaklığında (62.94 °C) istenirlik değeri için yanıt yüzey grafiği 45
Şekil 4.8. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı toplam fenolik madde miktarının değişimi 48
Şekil 4.9. Optimize şartlarda ve sabit çözücü konsantrasyonunda çözücü konsantrasyona bağlı olarak ekstraksiyon veriminin değişimi 49
Şekil 4.10. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak EC_{50} değeri değişimi 50
Şekil 4.11. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının değişimi 52
Şekil 4.12. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak ekstraksiyon verimi değişimi 53
Şekil 4.13. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak EC_{50} değerinin değişimi 54
Şekil 4.14. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının değişimi 58
Şekil 4.15. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak ekstraksiyon veriminin değişimi 57
Şekil 4.16. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak EC_{50} değerinin değişimi 58
Şekil 4.17.Taramalı elektron mikroskobu görüntüleri A: İşlem görmemiş katı faz, B: İnfüzyon sonrası katı faz, C: Konvansiyonel ekstraksiyon sonrası katı faz, D: Ultrasonik ekstraksiyon sonrası katı faz 63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Ülkemizde yetiştirilen zeytin çeşitlerinin bölgelere göre dağılımı 1
Çizelge 2.1. Zeytin yaprağı fenolik madde içeriği 7
Çizelge 2.2. Zeytin yaprağında bulunan fenolik maddelerin antioksidan kapasitesi 10
Çizelge 3.1. Ultrason destekli ekstraksiyon için Box-Behnken tasarım modeline göre oluşturulan deneme planı 27
Çizelge 4.1. Ultrason destekli ekstraksiyon ile Box-Behnken Tasarım Modeli kapsamında araştırılan parametrelere ait deneysel ortalama değerler 33
Çizelge 4.2. Toplam fenolik maddde miktarı için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları 34
Çizelge 4.3. Model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkenleri üzerine etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları 35
Çizelge 4.4. Ekstraksiyon verimi için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları 38
Çizelge 4.5. EC_{50} değeri için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları 41
Çizelge 4.6. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları 48
Çizelge 4.7. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar 48
Çizelge 4.8. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarı değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları 51
Çizelge 4.9. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar 52
Çizelge 4.10. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda yaş yaprak çeşidi değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları 55
Çizelge 4.11. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru yaprak çeşidi değişimine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarı varyans analiz sonuçları 55
Çizelge 4.12. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda yaprak çeşidi ve kurutma işleminin etkisine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar 56
Çizelge 4.13. Deneme zeytin yaprağı ekstraktları ile bazı ticari antioksidan maddelere ait EC_{50} değerleri 59
Çizelge 4.14. Ekstraksiyon metodunun araştırılan parametrelere etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları 60
Çizelge 4.15. Ekstraksiyon metoduna bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar 61

SİMGELER DİZİNİ

ANOVA: Varyans Analizi
BHA: Bütillenmiş Hidroksianizol
BHT: Bütillenmiş Hidroksitoluen
CAT: Katalaz
CUPRAC: Bakır İndirgeme Antioksidan Kapasitesi
DAD: Diode Array Detection
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FAO: Food and Agricultural Organization
FRAP: Demir İndigeyici Antioksidan Kapasitesi
GAE: Gallik Asit Eşdeğer
HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KHz: Kilohertz
W: Watt
L: Litre
mmol: Milimol
µ: Mikro
PG: Propil Gallat
ppm: Milyonda Bir ($mg.L^{-1}$)
rpm: Dakikadaki Devir Sayısı
SEM: Taramalı elektron mikroskobu
SOD: Süperoksit Dismutaz
SPSS: Sosyal Bölümler için İstatiksel Paket Programı
TEAC: Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi
TBHQ: Tersiyer Bütilhidroksikinon
TFM: Toplam Fenolik Madde
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Genellikle Akdeniz havzasında, subtropikal ve tropikal iklim bölgelerinde yetişmekte olan zeytin, hem meyvesi hem de yağ içeriği yönünden önemli bir bitki türüdür. Ülkemizde başta Ege Bölgesi olmak üzere Akdeniz, Marmara ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde zeytin tarımı yapılmaktadır. Yıllık ortalama 1.350.000 ton üretimle Dünya zeytin üretiminde 4. sırada yer alan ülkemizde üretilen zeytinlerin yaklaşık %30'u sofralık olarak değerlendirilirken geri kalan kısmı yağ üretiminde kullanılmaktadır (Anonim, 2016a; Anonim, 2016b; Efe ve ark., 2013). Çizelge 1.1.'de ülkemizde yetiştirilen zeytin çeşitlerinin bölgelere göre dağılımı verilmiştir (Anonim, 2006). Bu çeşitlerden en çok Gemlik, Domat, Memecik, Uslu, Ayvalık, Edincik-Su, Kan, Halhalı, Tavşan Yüreği, Çelebi ve Yamalak Sarısı yetiştirilmektedir. Ülkemizde zeytin çeşitlerinin 2014-2015 döneminde dağılım istatistiklerine göre; toplam zeytin ağacı varlığımızın %48.71'i Gemlik, %20.66'sı Ayvalık, %19.11'i Memecik, %7.56'sı Domat ve %3.73'ü diğer zeytin çeşitlerinden oluştuğu tespit edilmiştir (Anonim, 2016c).

Çizelge 1.1. Ülkemizde yetiştirilen zeytin çeşitlerinin bölgelere göre dağılımı

Bölge	**Zeytin çeşitleri**
Marmara Bölgesi	Çelebi, Gemlik, Karamürsel Su, Samanlı, Siyah Salamuralık, Beyaz Yağlık, Çizmeli, Eşek Zeytini, Erder Yağlık, Edincik, Su Zeytini, Şam İznik, Samanlı.
Ege Bölgesi	Ayvalık, Çakır, Çekişte, Çilli, Domalan, Edincik Su, Erkence, İzmir Sofralık, Kiraz, Yağ Zeytini.
Akdeniz Bölgesi	Büyük ve Küçük Topak Ulak, Sarı Haşebi, Sarı Ulak, Saurani, Tavşan Yüreği, Çelebi, Halhalı, Sayfi, Karamani, Elmacık, Yağlık Sarı ve Siyah Zeytin, Ağaç no 6.
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Eğri Burun, Halhalı, Kalembezi, Kan Çelebi, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Yuvarlak Halhalı, Yün Çelebi, Zoncuk, İri Yuvarlak.
Karadeniz Bölgesi	Samsun Tuzlamalık, Samsun Yağlık, Görvele, Tuzlamalık, Trabzon Yağlık, Marantelli, Hastos, Butko, Ağaç no 1, 2, 4, 5, 6.

Bu çalışmaya konu olan Halhalı zeytin çeşidinin anavatanı Mardin ili Derik ilçesi olmasına rağmen ülkemizde Kilis, Nizip ve Hatay illerinde de yetiştirilmektedir. Bu çeşidin meyveleri orta boy iriliktedir ve %21-22 oranında yağ içermektedir. İçerdiği yüksek oranda klorofil ve karetenoidler sayesinde bu çeşitten elde edilen

zeytinyağının rengi oldukça koyudur. Ayrıca meyvelerinin orta büyüklükte olması bu çeşidin hem sofralık hem de yağlık olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (Anonim, 2016d).

Marmara bölgesinin ve ülkemizin başta gelen siyah sofralık çeşitlerinden biri olan Gemlik zeytini; meyveleri orta büyüklükte ve yuvarlak, çekirdekler orta irilikte, üzerleri pürüzlü ve oval görünümde olan bir zeytin çeşididir. Bu çeşidin soğuğa kısmen dayanıklı olduğu ve meyvesinin erken olgunlaştığı bilinmektedir (Anonim, 2016c). Bu çeşit sofralık bir çeşit olmakla birlikte yağ oranının yüksek olması nedeniyle yağlık olarak da değerlendirilebilmektedir. Bu çeşidin orijinal yetişme alanı, Bursa ilinin Gemlik ilçesi olmasına rağmen ülkemizin batısından doğusuna birçok bölgesinde tarımı yapılabilmektedir (Gönenç, 2011).

Ayvalık zeytin çeşidinin kökeni, Balıkesir ili Edremit ilçesidir ve Ege bölgesindeki zeytin ağacı varlığının %25'ini oluşturmaktadır. Meyve büyüklüğü orta olup şekli yuvarlağa yakın, silindiriktir. Ayvalık zeytin çeşidi sofralık ve yağlık olarak değerlendirilmekte ve bu çeşitten elde edilen yağ duyusal özellikleri bakımından orta düzeyde meyvemsiliğe sahip olduğu için tüketiciler tarafından tercih edilmektedir. Ayvalık zeytinyağı, 18.03.2004 tarihinden geçerli olmak üzere coğrafi işaret tescili almıştır (Anonim, 2016c).

Zeytin hasadında ve zeytinlerin yağa işlenmesinde toplam zeytin miktarının %10'unu oluşturan zeytin yaprağı, çoğunlukla hayvan yemi olarak değerlendirilmektedir (Guinda ve ark., 2004; Sevim ve Tuncay, 2012). Zeytin hasadından sonra ağaç üzerinde kalan yapraklar ise değerlendirilmemekte ve üreticiye ekonomik bir kazanç sağlamamaktadır. Bilimsel araştırmalar zeytin yaprağının yağ asitleri, mineraller, vitaminler ve elementlerden oluşan yüzden fazla bileşen içerdiğini belirtmektedir. Zeytin yaprağının bu kimyasal bileşimi ağacın türü, yaşı, iklim koşulları, toprak yapısı, hasat sonrası koşullar, yetişme şartları ve mevsim gibi birçok faktöre bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Belirtilen bu bileşenler arasında en dikkat çekici olanı, yaprağın fenolik madde içeriğidir. Yapılan çalışmalar yaprağın fenolik madde içeriğine bağlı olarak zeytin yaprağı ekstraktlarının çeşitli ürünlerde

antioksidan madde olarak kullanılabileceğini belirtmektedir (Lee ve ark., 2009; Benavente-García ve ark., 2000; Lee ve Lee, 2010; Sevim ve Tuncay, 2012; Özcan ve Matthäus, 2017). Zeytin yaprağının fenolik madde içeriği; yaprağa uygulanan ön işlemler, ekstraksiyon tekniği, çözücü, zaman ve sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Armutçu ve ark., 2011). Zeytin yaprağının antioksidatif, antimikrobiyel ve terapatik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar zeytin yaprağına olan ilgiyi arttırmıştır. Bunun sonucu olarak zeytin yaprağı; kozmetik, tıp ve gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılabilen ucuz ve güvenilir bir kaynak haline dönüşmüştür (Boudhrioua ve ark., 2009).

Ekstraksiyon teknikleri geleneksel ve yeni yöntemler olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde daha uzun süre ve fazla miktarda çözücüye ihtiyaç duyulmakta iken yeni yöntemlerin kullanımı ile ekstraksiyon süresi kısalmakta ve organik solvent tüketimi azalmaktadır. Çözücü miktarının azalması ve atıkların daha kolay değerlendirilmesine paralel olarak, çevre kirliliği de azalmakta veya önlenmektedir. Ultrason destekli, mikrodalga destekli, süperkritik ve hızlandırılmış ekstraksiyon sistemleri bu yeni ekstraksiyon tekniklerinin bazılarıdır (Tavman ve ark., 2009; Kutlu ve ark., 2017).

Ultrason destekli ekstraksiyon sistemi ucuz, basit ve verimli bir ekstraksiyon tekniğidir. Ultrasonik dalgalar, katı-sıvı ekstraksiyonunda reaksiyon hızını arttırarak verim artışı sağlamaktadır. Ayrıca bu ekstraksiyon tekniği, sıcaklığa duyarlı maddelerin ekstrakte edilmesinde tercih edilen bir yöntemdir (Tavman ve ark., 2009). Ultrasonik dalgalar, saniyede 20.000 veya daha fazla titreşime sahip ses dalgalarının oluşturduğu bir enerji türüdür. Başka bir deyişle, titreşim sıklığı insan kulağı tarafından algılanamayacak düzeyde olan bir enerji türüdür. İnsanlar sadece 20-20.000 Hz aralığındaki ses dalgalarını işitmektedirler. Ultrason destekli ekstraksiyonda ise temel olarak yüksek frekansa sahip ses dalgalarının oluşturduğu mekanik titreşimlerin mekanik basınç dalgalarına dönüşerek enerjiyi ortama, ortamdan da dalgayla temas eden maddeye aktarması prensibine dayanmaktadır. Gıda endüstrisinde ultrason tekniği kurutma, filtrasyon, dondurma, mikrobiyal inaktivasyon, enzim inhibisyonu, ekstraksiyon ve daha birçok proseste yardımcı uygulama olarak kullanılmaktadır.

Yağlar, esansiyel yağlar ve antioksidanlar gibi çeşitli bileşenlerin ekstraksiyonunda ultrason destekli ekstraksiyondan faydalanılmaktadır (Tavman ve ark., 2009; Nip, 2007). Ultrasonik dalgalar bitkisel dokulardaki hücre duvarı yapısını parçalayarak hücre içinde ekstrakte edilebilir bileşenlerin çözücü fazına geçişini hızlandırmaktadır. Yüksek enerjili ve düşük enerjili ultrason teknolojisi, materyale farklı genlik değerlerinde uygulanabilmektedir. Genlik (amplitude); ses dalgasının tepesi ile dalga çukuru arasındaki mesafenin yarısına denilmektedir. Ultrasonik ses dalgalarının genliği arttıkça sesin enerjisi ve şiddeti de artmaktadır (Crowell, 2002).

Bu çalışmada, öncelikle zeytin yaprağı kullanılarak ultrasonik su banyosunda gerçekleştirilen ekstraksiyon prosesinde, çalışma parametrelerinin (sıcaklık, süre ve genlik) optimizasyonunu gerçekleştirmek, daha sonra optimum çalışma şartlarında çözücü miktarı, çözücü konsantrasyonunu, yaprak çeşidi ve kurutma parametrelerinin, ekstraktların fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca bu işlemler sonucunda en iyi verim elde edilen parametreler kullanılarak gerçekleştirilecek ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile geleneksel yöntemlerden infüzyon ve konvansiyonel ekstraksiyon yöntemlerinin mukayesesinin yapılması da amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

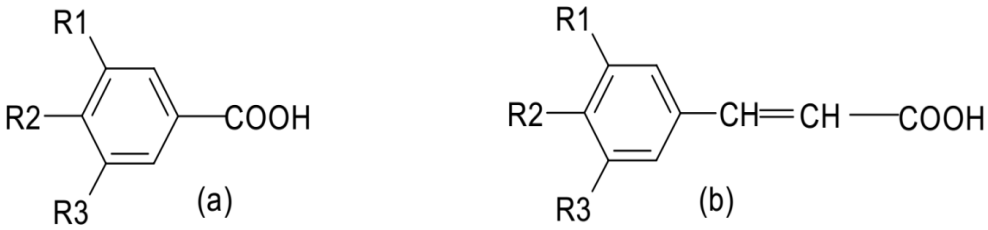
2.1. Zeytin Yaprağında Bulunan Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler (polifenoller), bir veya birden fazla hidroksil grubunun bağlı bulunduğu benzen halkası ihtiva eden bitki hücrelerinin sekonder metabolitlerine verilen isimdir (Cemeroğlu, 1992). Polifenoller, isimlerini yapısında bulunan hidroksi benzen halkasından diğer adıyla fenol halkasından alırlar ve birden fazla hidroksi benzen ihtiva etmeleri sebebiyle poli- ekini alarak adlandırılmışlardır. Fenolik bileşikler; genellikle bitkilerin meyve, sebze, tohum, çiçek ve yapraklarında glikozitler şeklinde, odunsu dokularında aglikonlar şeklinde, çekirdeklerinde ise her iki formda da bulunabilmektedirler (Shahidi ve Naczk, 1995). Bu bileşiklerin bitkiyi dış etkilerden koruma, renk, tat, koku oluşumu ve besinsel kalite üzerinde önemli işlevleri bulunmaktadır. Ayrıca antioksidan aktiviteleri, antimutajenik, antikarsinojenik, antibakteriyel, antiviral, antitümör, antiimflamatuvar özelliklere sahip oldukları çeşitli bilimsel çalışmalarda ifade edilmektedir.

Fenolik bileşikler; başlıca fenolik asitler ve flavanoitler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Fenolik asitler; hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit olmak üzere iki alt gruba, flavonoitler ise flavonlar, flavonoller, flavanonler, flavanoller, izoflavonlar ve antosiyaninler şeklinde altı alt gruba ayrılmaktadır.

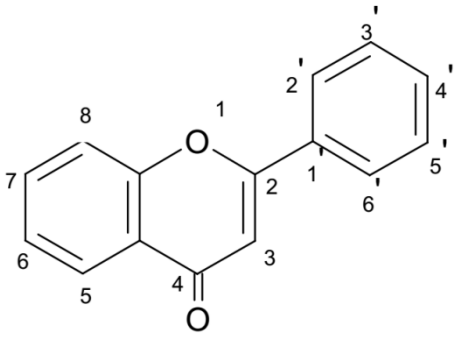
Fenolik asitlerin alt grubu olan hidroksinamik asitler, bitkisel dokularda serbest halde bulunmayan ancak bu materyallerin işlenmesiyle gerçekleşen hidroliz reaksiyonu sonucu ortaya çıkan ve genellikle ester formda bulunan C_3-C_6 iskeletine sahip yapılardır (Şekil 2.1b). Bu asitlerin çeşitliliği, fenilpropan halkasına bağlı bulunan hidroksil grubunun sayısı ve konumuna bağlı olarak değişmektedir. Ferulik asit, kafeik asit, *o*- kumarik asit, *p*- kumarik asitler, hidroksisinamik asitlere örnek olarak verilebilir. Hidroksibenzoik asitler ise hidroksisinamik asitlerden yağ asitlerinin β-oksidasyonu ile gerçekleşen bir reaksiyon zinciri sonucunda oluşmakta ve bitkisel dokularda iz miktarda bulunan C_1–C_6 yapısına sahip bileşiklerdir (Şekil 2.1a). Gallik

asit, *p*- hidroksibenzoik asit, vanilik asit, şirinjik asitler bu asitlere örnek olarak verilebilir (Bravo, 1998; Acar ve Gökmen, 2016).



Şekil 2.1. Fenolik asitlerin genel yapısı: (a) Hidroksibenzoik asit, (b) Hidroksisinamik asit

Flavonoitler; C_6-C_3-C_6 difenilpropan yapısında ve doğada en fazla bulunan fenolik bileşiklerdir (Şekil 2.2). Antosiyanidinler; genellikle şekerler ile oluşturdukları antosiyanin adı verilen glikozit formda, kırmızıdan mora kadar değişen tipik renkleri olan bileşiklerdir. Antosiyaninler; bir aglikon (antosiyanidin), şeker ve bazen fenolik ve minör organik asitlerden oluşmaktadır. Orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda hidrojen, flavonollarda hidroksi grubu bağlanan açık sarı renkli bileşiklerdir. Antosiyanidinler gibi bunlarda şekerlere glikozit halde bağlanmış olarak bulunurlar. Kuersetin, luteolin ve kamferol, flavonlar-flavonollar grubunda yer almaktadır. Flavanonlar; orta halkada çift bağ bulundurmayan ve özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunan acımsı (bitter) tadı olan bileşiklerdir. Naringin, hesperidin ve naringenin flavanonlar grubunda yer alan en bilinen bileşiklerdir. Flavanoller (Kateşinler); gıdalarda en yaygın olarak bulunan genellikle buruk tadın oluşumundan sorumlu renksiz bileşiklerdir. Flavanoller, üçüncü karbon atomunda bir OH grubu içermeleri sebebiyle flavon-3-ol olarak adlandırılırlar. İzoflavonoidler bazı meyve ve sebzelerde, başta soya fasulyesi olmak üzere çeşitli baklagillerde bulunan bileşiklerdir ve fitoostrojenler alt grubunda yer alırlar (Acar ve Gökmen, 2016).



Şekil 2.2. Flavanoidlerin genel yapısı

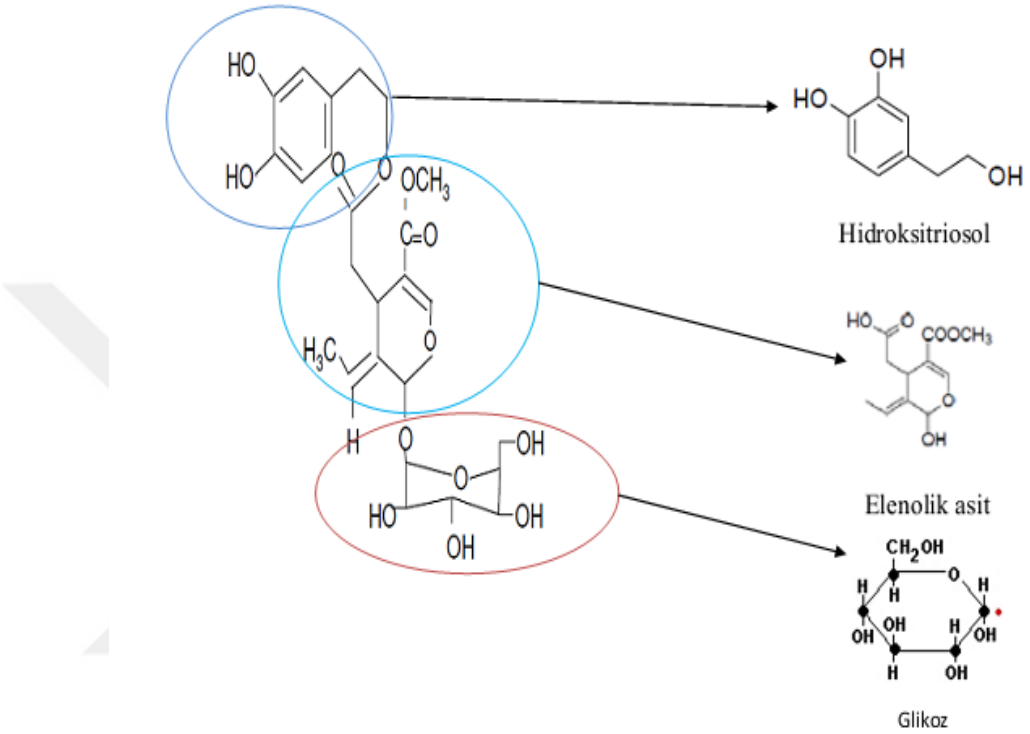
Zeytin ağacının en yüksek fenolik madde içeriğine (%1-14) sahip kısmı olan zeytin yaprağı; oleuropeositler, flavonlar, flavonoller, flavan-3-oller, sübstitüe fenoller olmak üzere başlıca beş farklı fenolik bileşik grubu içermektedir. Ayrıca oleuropein ve ligstrositinin değişik formları olan oleocanthal ve oleacein, zeytin yaprağında bulunabilmektedir. Bu gruplarda yer alan bileşenler, Çizelge 2.1'de özetlenmiştir (Özcan ve Matthäus, 2017):

Çizelge 2.1. Zeytin yaprağı fenolik madde içeriği

Oleuropeositler	**Flavonlar**	**Flavonoller**	**Flavan-3-oller**	**Sübstitüe fenoller**	**Diğer**
Oleuropein, Verbascoside	Luteolin-7-glukozit Apigenin-7-glukozit Diosmetin-7-glukozit Diosmetin	Rutin	Kateşin	Tirozol Hidroksitirozol Vanilin Vanilik asit Kafeik asit	Oleocanthal Oleacein

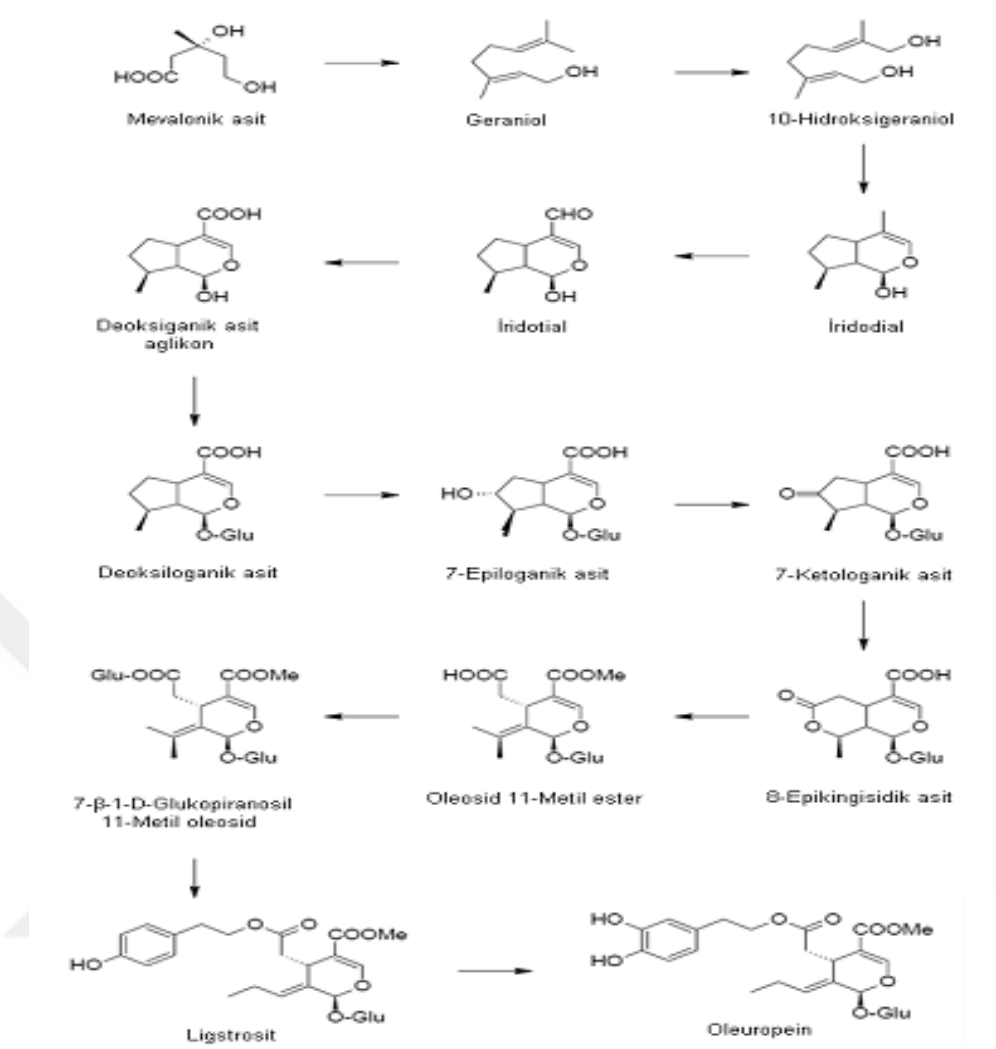
Bunlardan oleuropein, zeytin yaprağında en fazla bulunan fenolik bileşiktir. Oleuropein miktarının yeşil ve genç sürgünlerin oluştuğu ilkbahar aylarında daha yüksek; yaprakların dökülme durumuna dönüştüğü sonbahar aylarında ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Ranalli ve ark., 2006). Tarihte oleuropein üzerine ilk çalışma, Bourquelot ve Vintilesco tarafından 1908 yılında yapılmıştır ve bu bileşik ancak 1960 yılında tanımlanabilmiştir (Panizzi ve ark., 1960; Yıldız ve Uylaşer, 2011). Kimyasal yapısı bakımından tanımlamak gerekirse oleuropein, elenolik asit, glikoz ve hidroksitriosolün heterosiklik esteridir. Zeytin yaprağında 4.3-9.2 mg g^{-1} kuru yaprak düzeyinde bulunan oleuropein, kendine has acı bir tada sahiptir (Tayoub ve ark., 2012). Bu acı tat, siklopentanopiran halkasına sahip monoterpen lakton olan iridoitlerden

kaynaklanmaktadır. Bu bileşenlerin ağız mukozasında proteinler ve polisakkaritler ile etkileşimi sonucu acı/buruk tat oluşmaktadır (Acar ve Gökmen, 2016). Hidoksitirozol, elanoik asit ve glikozdan oluşan oleuropeinin yapısı Şekil 2.3'deki gibi gösterilmiştir (Winkelhausen ve ark., 2005).



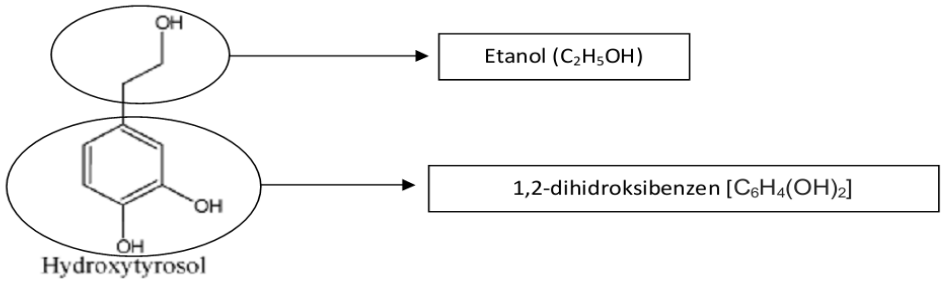
Şekil 2.3. Oleuropein kimyasal yapısı

Oleuropeinin biyosentezi, mevalonik asitle başlayan ve birçok ara basamak içeren kompleks bir oluşumdur. Bu aşamalar Şekil 2.4.'de özetlenmiştir (Damtoft ve ark., 1992; Yıldız ve Uylaşer, 2011):



Şekil 2.4. Oleuropein Biyosentezi

Hidroksitirozol (Dihidroksifeniletanol), Şekil 2.5'de görüldüğü gibi kateşol (1,2-dihidroksibenzen) ve etanolün birbirine bağlanmasıyla oluşan bir fenolik bileşiktir (Ranalli ve ark., 2006). Hidroksitirozol, oleuropeinin parçalanma ürünü olduğu için üründeki oleuropein miktarını azaltan kimyasal ve enzimatik reaksiyonlar hidroksitirozol miktarını arttırmaktadır (Yıldız ve Uylaşer, 2011; Fernández-Mar ve ark., 2012). Bu reaksiyonlar meyvenin olgunlaşması ve yaprağın mevsimsel değişimi sırasında daha çok β-glikozidaz ve esteraz enzimleri tarafından katalize edilmektedir. Bu sebeple işlenmiş ürünlerde hidroksitirozol miktarı daha yüksek iken; işlenmemiş ürünlerde oleuropein miktarı daha yüksektir. Ayrıca hidroksitirozol, oleuropeinden (%24.54) sonra zeytin yaprağında (%1.46) en çok bulunan bileşiktir (Özcan ve Matthäus, 2017; Armutçu ve ark., 2011; Benavente-García ve ark., 2000).



Şekil 2.5. Hidroksitirozol kimyasal yapısı

Zeytin yaprağıyla ilgili yapılan bilimsel çalışmalarda, zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin (1.58 mmol TEAC/L) zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşenlerin tek başlarına göstermiş olduğu antioksidan aktiviteden daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durumun fenolik bileşenlerin kendi içlerinde sinerjistik etkiye sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Fenolik bileşenlerin antioksidatif etkileri kendi içinde kıyaslandığında Çizelge 2.2'de görüldüğü gibi en yüksek antioksidatif aktiviteyi *o*-dihidroksil yapısı içeren rutin, kateşin ve luteolin gösterirken, en düşük antioksidatif aktiviteyi apigenin-7-glukosit göstermektedir. Oleuropeinin hidroksitirozolden daha düşük antioksidan kapasite göstermesinin, molekül ağırlığının daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Benavente-García ve ark., 2000). Nitekim bu kompleks yapı, oleuropeinin bağırsaklardan emilimini de zorlaştırmaktadır. Besinlerle alınan oleuropein, vücutta kalsiyum elenolata çevrilmektedir (Khayyal, 2002).

Çizelge 2.2. Zeytin yaprağında bulunan fenolik maddelerin antioksidan kapasitesi

Fenolik Bileşikler	**Miktar (mmol *TEAC/L)**	**% Oranı**
Rutin	2.75	0.05
Kateşin	2.28	0.04
Luteolin	2.25	0.21
Hidroksitirozol	1.57	1.46
Diosmetin	1.42	0.05
Kafeik asit	1.37	0.34
Verbascoside	1.02	1.11
Oleuropein	0.88	24.54
Luteolin-7-glukosit	0.71	1.38
Apigenin-7-glukosit	0.42	1.37

* TEAC: Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi

2.1.1. Zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyal etkisi

Zeytin yaprağı ve zeytin ekstraktlarından elde edilebilen oleuropein; bazı bakteri, virüsler ve küflere karşı antimikrobiyel etki gösterdiği, Gram (+) bakterilerden *Staphylococcus aureus, Micrococcus luteus, Streptococcus faecalis, Bacillus subtilis, Micrococcus sp;* Gram (-) bakterilerden ise *Escherichia coli, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas fluorescens, Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus* üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir (Keskin ve ark., 2012; Sabry, 2014). Oleuropeinin antimikrobiyel etkisinin mikroorganizmaların hücre duvarında bulanan fosfat grupları ile etkileşimi sonucu oluştuğu, hücre duvarında fosfolipid-su etkileşimini değiştirdiği ve bunun sonucu olarak hücre duvarında bozulmalar oluşturduğu bildirilmiştir (Li ve ark., 2006).

Lee ve Lee (2010) yapmış oldukları çalışmada, zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler arasında sinerjistik etki tespit etmişlerdir. Araştırıcılar oleuropein, rutin, vanillin ve kafeik asit karışımının, *Bacillus cereus ve Salmonella enteritidis bakterilerine* karşı tek başlarına gösterdikleri inhibitör etkiden daha yüksek inhibitör etki gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Pereira ve ark. (2007) farklı konsantrasyonlardaki zeytin yaprağı ekstraktlarının, bazı bakteri (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae)* ve küfler (*Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*) üzerindeki antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada kafeik asit, verbascoside, oleuropein, luteolin 7-*O*-glucoside, rutin, apigenin 7-*O*-glucoside ve luteolin 4-*O*-glucoside olmak üzere 7 fenolik bileşik tespit edildiği, *Bacillus cereus ile Candida albicans* için IC_{25} (bakterilerin %25'ini inhibe etmek için gerekli ekstrakt konsantrasyonu) değerinin en az olduğu saptanmıştır. Araştırıcılar zeytin yaprağı ekstraktlarına karşı mikroorganizma duyarlılıklarının sırasıyla en fazla *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Cryptococcus neoformans/ Klebsiella pneumoniae/ Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis* şeklinde olduğu tespit etmişlerdir.

Sudjana ve ark. (2009) yapmış oldukları çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının geniş spektrumlu antibakteriyel etki göstermediğini ve söz konusu ekstraktlardan en az etkilenen mikroorganizma türlerinin, *Bacillus subtilis, Candida spp., Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Serratia marcescens* olduğunu; en çok etkilenen türlerin ise *Campylobacter jejuni, Helicobacter pylori ve* metisiline dayanıklı *Staphylococcus aureus* olduğunu bildirmişlerdir.

Zorić ve ark. (2016) zeytin yaprağı ekstraktlarında oleuropein, hidroksitirozol, tirozol, pinoresinol, protokatechuic asit ve apigenin olmak üzere 6 fenolik bileşik tespit ettiklerini ve zeytin yaprağı ekstraktında en fazla bulunan fenolik bileşiğin oleuropein olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar, *Candida albicans ATCC 10231* için zeytin yaprağı ekstraktının en düşük inhibitör konsantrasyonunun *C. dubliniensis* CBS 7987*'e* göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu mikroorganizmalara karşı hidroksitirozolün, zeytin yaprağı ekstraktından daha etkili olduğunu bildirilmişlerdir.

Khemakhem ve ark. (2017a) yapmış oldukları çalışmada mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve nanofiltrasyon kombinasyonu kullanılarak zeytin yapraklarından elde edilen oleuropeinin; Gram (+) bakterilere nazaran Gram (-) bakteriler üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir. Araştırıcılar, bu durumun Gram (+) bakterilerin hücre duvarı kalınlığından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Medina-Martínez ve ark. (2016) hidroksitirozolün bazı bakteri türlerine karşı antimikrobiyel etkisini araştırdıkları çalışmada Gram (+) ve Gram (-) bakteriler arasında herhangi bir farklılık tespit edilmediğini, hidroksitirozole karşı en duyarlı türlerin *E. coli ve Staphylococcus aureus* olduğu bildirmişlerdir.

Bisignano ve ark. (1999) yapmış oldukları çalışmada, oleuropeinin ve hidroksitirozolün invitro şartlarda antimikrobiyel aktivitelerinin mikroorganizma türüne göre farklılık gösterdiğini, hidroksitirozolün *Haemophilus infuenzae ve Moraxella catarrhalis*'e karşı etkili olduğunu, ancak oleuropeinin bu bakterilere karşı

etkisinin neredeyse bulunmadığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, *Salmonella typhi, Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Vibrio cholerae ve Vibrio alginolyticus'a* karşı ise hidroksitirozolün oleuropeinden daha etkili olduğunu, ayrıca hidroksitirozolün laktik asit bakterileri gibi yararlı mikroorganizmalar üzerinde de inhibitör etkisinin bulunduğunu belirtmişlerdir (Medina ve ark., 2007).

Model sistemde salamura veya sıcaklık uygulamasına tabi tutulan çözeltide bulunan oleuropeinin parçalanması sonucu antimikrobiyel etkinin arttığı belirtilmektedir (Tassou ve Nychas, 1984). Hidroksitirozol gibi oleuropein parçalanma ürünlerinin, oleuropeinden daha çok antimikrobiyel etki gösterme sebebinin oleuropeinin kompleks yapısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Oleuropeinin yapısındaki glikozidik grubun, hücre membranına penetrasyonunu azalttığı ve böylece antimikrobiyel etkiyi zayıflattığı düşünülmektedir (Bisignano ve ark., 1999).

2.1.2. Zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidatif etkisi

Antioksidan maddeler, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücreyi oksidatif stresten koruyan, dolayısıyla gıdalarda oksidasyon sonucu oluşabilecek acılaşmayı ve tat - renk değişimini önleyen ve besin ögelerini koruyan bileşiklerdir. Antioksidan maddeler, bazı gıdaların tüketimiyle vücuda alınabildikleri gibi, insanlarda metabolik olarak da sentezlenebilmektedirler (Acar ve Gökmen, 2016; Kayahan ve Tekin, 2009). Serbest radikaller, bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip stabil olmayan yapılar olup süperoksit anyon (O_2^-), hidroksi radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksi radikali (ROO^-) vb. reaktif oksijen türlerinden bazılarıdır. İnsan vücudunda çeşitli metabolik faaliyetler sonucunda oluşan reaktif bileşiklerden en çok süperoksit ve hidroksi radikaline rastlanmaktadır (Halliwell, 2011). Süperoksit radikali, oksijen molekülüne sonradan bir elektron eklenmesi sonucu oluşurken; hidroksi radikali su molekülünün X-ray ışınlarına maruz bırakılması veya hidrojen peroksit molekülünün metallerle etkileşimi sonucu oluşmaktadır. Bu bileşiklerin oluşumu süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi endojen enzimler tarafından kontrol edilmektedir (Sabry, 2014). Her ne kadar bağışıklık sisteminin vücudu bakteri ve virüslere karşı korumada serbest radikallere ihtiyacı olsa da serbest radikal miktarının aşırı artışı hücrelere zarar

vermektedir (Karakaya, 2011). Bu radikal gruplar, hücreden uzaklaştırılamadıklarında hücre membranı yapısında ve hücre içindeki biyomoleküllere zarar vererek, hücrenin ölümüne sebebiyet vermektedirler. Gıda sistemlerinde ise bu reaktifler ransit tat ve istenmeyen koku oluşumuna sebep olmakta ve gıdanın kalitesini olumsuz etkilemektedirler. Bu reaktifler, ancak antioksidan maddeler tarafından bağlanarak hücreden uzaklaştırılmaktadırlar.

Antioksidanlar, yükseltgenebilen maddeler olduğundan, ortama hidrojen atomu vererek ortamdaki serbest radikalleri bağlarlar (Şekil 2.6) ve oksidasyondaki zincir tepkimelerinin kırılmasına sebep olurlar (Kayahan ve Tekin, 2009).

$$RO^* + AH \rightarrow ROH + A^*$$
$$ROO^* + AH \rightarrow ROOH + A^*$$
$$RO^* + A \rightarrow ROA$$
$$ROO^* + A \rightarrow ROOA$$

Şekil 2.6. Antioksidanlar genel etki mekanizması

Antioksidan maddeler, yapay ve doğal kaynaklı antioksidanlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Doğal kaynaklı antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılmaktadır. Enzimatik antioksidanlar, hücre içinde çeşitli metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikalleri gidermektedir. Süperoksit dismutaz (SOD), Katalaz (CAT), Glutatyon peroksidaz, Glutatyon redüktaz ve Glutatyon-S-transferaz enzimatik antioksidanlardır. Enzimatik olmayan doğal antioksidanlar; bitkisel ve hayvansal dokularda doğal olarak bulunan bileşikleridir. Fenolik bileşikler, doğal antioksidanlar arasında en çok bulunan ve en fazla bilinenleridir. Fenolik bileşiklerin dışında C (askorbik asit) vitamini, E (α-tokoferol) vitamini ve karetenoidler doğal antioksidanlar grubunda yer almaktadır (Yavaşer, 2011). En çok kullanılan yapay antioksidanlar BHA (Bütillenmiş Hidroksianizol), BHT (Bütillenmiş Hidroksitoluen), TBHQ (Tersiyer Bütilhidroksikinon) ve PG (Propil Gallat)'dır. Bilimsel çalışmalar sonucunda yapay antioksidanların kanserojenik etki gösterebilecek olması bu antioksidanların gıdalarda kullanımında yeni düzenlemeler yapılamasına sebep olmuştur. Örneğin; 1995 yılında FAO/WHO tarafından alınan karara göre, bu katkıların insan sağlığı üzerinde kanserojenik etki göstermediği savunularak yapay antioksidanların ADI (Günlük

kabul edilebilir alım miktarı) değerinin 0-0.125 mg/kg'dan 0-0.3 mg/kg vücut ağırlığına yükseltilmiştir (Acar ve Gökmen, 2016).

Günümüzde tıpkı beslenmede olduğu gibi, doğal ürünlere talebin artmasından ve yapay katkıların kanserojen olduğu hususundaki süregelen şüphelerden dolayı doğal kaynaklı antioksidanlar daha çok rağbet görmektedir. Bu bağlamda, doğal bir antioksidan kaynağı olan zeytin yaprağından bu bileşenlerin eldesi ve farklı alanlarda kullanımı güncelliğini koruyan bir konudur (Lee ve ark., 2009). Literatürde zeytin yaprağında bulunanan fenolik bileşiklerden; oleuropein, hidroksitirozol, kafeik asit ve tirozolun antioksidatif etkisinin bulunduğu belirtilmektedir (Visioli ve ark., 2002).

Paiva-Martins ve ark. (2007) zeytin yaprağı ekstraktı ilavesiyle, rafine zeytinyağının toplam fenolik madde içeriğini zengileştirerek, natürel sızma zeytinyağına benzer stabilite ve besinsel içeriğe sahip ürün elde etmeyi denemişlerdir. Araştırıcılar, 1 kg zeytin yaprağından elde edilen ekstraktını rafine zeytinyağına ilave ederek, 50-320 litre rafine zeytinyağının stabilitesini, natürel sızma zeytinyağına benzer hale getirilebildiklerini bildirmişlerdir.

Lee ve Lee (2010) zeytin yaprağından biyoaktif bileşenlerce zengin ekstrakt elde etme metodunu geliştirmek amacıyla çeşitli ekstraksiyon uygulamalarını denemişlerdir. Araştırıcılar, etil alkol, hekzan, kloroform, bütanol, etilasetat ve su ile elde ettikleri ekstraktlardan, en yüksek toplam fenolik madde miktarına bütanol ve etilasetat (150-200 mg/g tannik asit eşdeğeri) ile ulaştıklarını, soya yağının oksidatif stabilitesi üzerine bu ekstraktların etkilerini, BHT ve α-tokoferol ile karşılaştırmışlardır. Çalışmada zeytin yaprağı ekstraktları ile zenginleştirilmiş yağlarda peroksit değerinin BHT ve α-tokoferol ile zenginleştirilmiş yağlara göre daha düşük olduğu, zeytin yaprağı ile zenginleştirilmiş örneklerin 48 saatlik oksidasyon sonrasında konjuge dien değerlerinin, α-tokoferol ve kontrolden daha düşük olduğu sonucuna varılmıştır.

Ranalli ve ark. (2006) 8 farklı İtalyan zeytin ağacı türünden toplanan zeytin yapraklarının oleuropein içeriklerini, antioksidan kapasitelerini ve rafine

zeytinyağının oksidatif stabilitesini araştırmışlardır. Araştırıclar, zeytin çeşidi, yaprak rengi ve yaprak yaşına göre oleuropein miktarının değiştiğini, derim zamanının ise oleuropein miktarı üzerinde önemli bir fark oluşturmadığını saptamışlardır.

Fabbri ve ark. (2004) zeytin yaprağının fenolik madde içeriği üzerine zeytin çeşidi, yaş, dal tipi, derim zamanı ve yerden yüksekliğinin etkisini araştırmışlardır. Araştırıcılar, zeytin çeşidine bağlı olarak sekoroidler, flavonol ile flavon glikozitler içeriğinin farklılık gösterdiğini, zeytin yaprağı yaşı ve dal tipine (zayıf, orta, kuvvetli) göre oleuropein içeriğinin değiştiğini saptamışlardır. Ayrıca en yüksek oleuropein konsantrasyonunun, Kasım ayında toplanan yapraklarda tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Salah ve ark. (2012) mikrodalga fırında (2500 MHz) kuruttukları 8 değişik varyateye ait zeytin yapraklarında, toplam fenolik madde, toplam flavanoid miktarı, antioksidan kapasite ve fenolik bileşiklerin bileşimini araştırmışlardır. Araştırıcılar, fenolik madde içeriğinin zeytin çeşidine bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ve oleuropeinin tüm zeytin yaprağı ekstraktlarında majör bileşen olduğunu, 4 çeşitte oleuropein içeriğiyle antioksidan aktivite arasında negatif bir korelasyon (r=-0.94) olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırıcılar ayrıca bu çeşitlerin antioksidan kapasitesini, sentetik bir antioksidan olan BHT ile karşılaştırmış ve bazı zeytin yaprağı çeşitlerinin BHT ile eşdeğer düzeyde, bazı çeşitlerin ise BHT'den daha az antioksidan etki gösterdiğini bidirmişlerdir.

2.2. Fenolik Maddelerin Ekstraksiyonunda Kullanılan Yöntemler

Ekstraksiyon, bir veya birden fazla bileşenin çözünürlük özelliklerinden faydalanılarak hammaddeden ayrılması işlemidir. Fenolik maddelerin çözünürlükleri; protein ve karbonhidratlar gibi diğer bileşiklere bağlı halde bulunma durumu, polimerizasyon derecesi ve ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücü tipi (çözücünün polaritesine), miktarı ve konsantrasyonu ile asitliğine bağlıdır. Ekstraksiyon işlemi için çözücü seçiminde ucuz, toksik olmayan, yanmaz ve uçucu olmayan özellikler taşıyan çözücülerin kullanılmasına dikkat edilmelidir. Ancak, günümüzde ekstraksiyon işleminde kullanılan çözücülerin (hekzan, kloroform, eter, aseton, metanol, etanol vb.)

bu özelliklerin tümünü taşımadığı bilinmektedir. Bu açıdan bakıldığında gliserol, toksik ve uçucu özellik göstermemesi, kolay alev alabilir olmaması ve ucuz bir kaynak olması sebebiyle ekstraksiyon ortamı için gerekli olan şartları sağlamaktadır. Her ne kadar yakın zamanda bazı araştırıcılar, gliserol-su karışımlarını kullanarak çeşitli materyallerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu üzerinde çalışmış olsalar dahi, bu konuda yapılan çalışmalar Gıda Bilimi ve Teknolojisi açısından sınırlıdır (Apostolakis ve ark., 2014; Karakashov ve ark., 2015a, b; Shehata ve ark., 2015; Nisar ve ark., 2017).

Fenolik maddelerin ekstraksiyonu, geleneksel yöntemler ve geleneksel yöntemlere alternatif olarak geliştirilen yeni yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Geleneksel yöntemlerin uzun süre gerektirmesi, düşük verime sahip olması, kullanılan çözücü miktarının fazla olması gibi pek çok dezavantajı bulunmaktadır. Klasik çözücü ekstraksiyonu, soxhelet ekstraksiyonu, dekoksiyon ve infüzyon geleneksel ekstraksiyon yöntemlerindendir. Ultrason destekli, mikrodalga destekli, süperkritik ve hızlandırılmış ekstraksiyon sistemleri ise yeni geliştirilmiş ekstraksiyon sistemleridir (Tavman ve ark., 2009; Kutlu ve ark., 2017).

Klasik çözücü ekstraksiyonu (katı-sıvı ekstraksiyonu) temel olarak, katı örnekle çözücünün belli bir süre teması sonucu katı örnekten ayrılması istenilen bileşik veya bileşiklerin çözücü fazına geçişine, ardından çözücünün uzaklaştırılması işlemine dayanmaktadır. Bu süreç; çözücünün katı madde dokusuna girişi, çözücünün seçiciliğine bağlı olarak bileşiklerin çözücü içerisinde çözünmesi, eksrakte edilen çözünen bileşenlerin katı maddenin dış yüzeyinden çözeltiye aktarılması ve ekstraktan çözücünün çeşitli yöntemlerle uzaklaştırılması şeklindedir. Hammaddeden tek seferde klasik çözücü ekstraksiyonuyla, %100 verimle ekstraksiyon gerçekleştirilmesi imkânsızdır. Çünkü hammaddeyle çözücünün teması sonrası, ekstrakt hammaddeden ayrılırken bir miktar çözünmüş bileşik içeren çözücü de hammadde dokusunda kalmaktadır. Bu sebeple en iyi ekstraksiyon veriminin sağlanması için, aynı hammadde üzerinde klasik çözücü ekstraksiyonunun 2 veya 3 kez tekrarlanması tavsiye edilmektedir (Büyüktuncel, 2012).

İnfüzyon (demleme) metodu, genellikle bitkisel dokulardan tıbbi amaçlı ekstrakt veya bitkisel çay hazırlamada kullanılan basit, maliyeti düşük, uzun zaman gerektirmeyen ve su kullanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir (Baydar, 2005). Bu yöntemde çözücü olarak suyun kullanılması, toksik özellik gösterebilen çeşitli kimyasalların kullanımının şart olduğu diğer yöntemlerle kıyaslandığında, avantaj sağlarken ekstraksiyon veriminin diğer yöntemlere göre daha düşük olmasına sebep olmaktadır. Çözücü-katı madde oranı, katı madde partikül boyutu ve demleme suyunun sıcaklığı, bu metotta ekstraksiyon verimini etkileyen en önemli faktörlerdir. Çözücü-katı madde oranı, ekstrakte edilecek bileşikleri katı madde içerisinden ayırabilecek azami düzeyde olmalıdır. Katı madde partikül boyutu küçüldükçe, suyun doku içerisine difüzyonu artmakta ve dolayısıyla ekstraksiyon verimi artmaktadır. Ayrıca demleme suyu sıcaklığının, ekstrakte edilecek bileşiklere zarar vermeyecek düzeyde olmasına dikkat edilmelidir (Jeszka-Skowron ve Zgoła-Grześkowiak, 2014).

Ultrason destekli ekstraksiyon, 20 kHz üstündeki frekansa sahip ses dalgalarının sıvı ortama iletilmesi sonucu, sıvı ortamda moleküller arasında kavitasyon (boşlukların) oluşması ve oluşan bu kavitasyon gücünün sıvı içerisindeki katı fazı oluşturan hücre duvarı parçalaması, ekstrakte edilebilir bileşenlerin ayrılması şeklinde gerçekleşmektedir. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi genellikle ultrasonik prob veya ultrasonik banyo kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ultrasonik probe kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda, probun örnek içeren ortama daldırılması sonucu ultrasonik güç direkt olarak ekstraksiyon ortamına aktarılmaktadır. Ultrasonik banyo sisteminde ise, ultrasonik güç önce banyo içerisindeki sıvıya, ardından ekstraksiyonun gerçekleştirileceği kabın dış yüzeyine, kabın dış yüzeyinden de ekstraksiyon ortamına aktarılması şeklinde dolaylı olarak gerçekleşmektedir. Ekstraksiyon direkt olarak ultrasonik banyo içerisindeki sıvı ortamda da gerçekleştirilir, ancak bu çalışmalarda ekstrakte edilecek katı madde: çözücü oranının banyo hacmine göre iyi ayarlanması gerekmektedir. Ayrıca, bu tip çalışmalarda çözücülerin uçucu özelliği göz önünde bulundurulduğunda, ekstraksiyon boyunca çözücü konsantrasyonunun sabit tutulması zorlaşmaktadır. Genel olarak probe ve banyo sistemlerinin olumlu ve olumsuz tarafları bulunmaktadır. Probe kullanılan sistemlerde, ekstraksiyon verimi banyo sistemlerine göre 100 kat daha etkilidir. Ancak

probe kullanılan ekstraksiyonda, probun aşınması sonucu örneğe metal bulaşması ve bu sistemlerin açık sistemler olması sebebiyle uçucu bileşiklerin kaybı söz konusu olabilmektedir (Santos ve Capelo, 2007).

Ahmad-Qasem ve ark. (2013) ultrason destekli ekstraksiyon uygulamasının, zeytin yaprağında bulunan biyoaktif bileşikler üzerindeki etkisini ekstraksiyon kinetiği ve ekstrakt bileşimi yönünden değerlendirmişlerdir. Çalışma %40, 60, 80 ve 100 genlikteki ultrason dalgaları ile 12.6, 3.8 ve 1.5 cm^2'lik emitör (yayıcı) yüzey alanı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırıcılar, çalışma sonucu 3.8 cm^2'lik emitör yüzey alanı ve %100 genlikte gerçekleştirilen fenolik madde ekstraksiyonunun en iyi düzeyde sonuç verdiğini, emitör yüzey alanı ve elektiriksel gücün fenolik madde ekstraksiyonunda önemli ($P<0.05$) etkisinin olduğunu, sıcaklığın ise fenolik madde ekstraksiyonunda net bir etkisinin saptanamadığını bildirmişlerdir. Sıcaklığın toplam fenolik madde miktarı ve içeriği üzerinde önemli düzeyde ($P<0.05$) etkili olduğunu bildirilmiştir. Araştıcılar, bu durumun ultrasonik gücün sıcaklığın etkisini maskelemesinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, konvansiyonel metotla 24 saat süreyle, elde edilen fenolik madde içeriğinin, ultrason destekli ekstraksiyonla 15 dakika içinde elde edilen ekstraktın fenolik madde içeriğine eşdeğer olduğunu bildirmişledir.

Yateem ve ark. (2014) çözücü tipi ve konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve ekstraksiyon tipinin (Soxhelet ve maserasyon yöntemi) zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein miktarı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Araştırıcılar, çözücü olarak su, metanol (%80 ve 100), etanol (%50, 80 ve 100) ve asetonitril (%20) kullanırken; ekstraksiyon işlemini 25, 40 ve 60 °C olmak üzere 3 farklı ekstraksiyon sıcaklığında ve pH 3, 5, 7 ve 9 olmak üzere 4 farklı asitlik değeri şartlarında gerçekleştirmişlerdir. Bu parametreler kullanılarak gerekleştirilen ekstraksiyon işlemlerinde en yüksek oleuropein miktarına; %80 etanol, 60 °C ve asitliğin pH 3.00 şartlarında ulaşılmıştır. Ekstraksiyon tipinde ise, en yüksek ekstraksiyon veriminin soxhlet ekstraksiyon ile elde edildiğini bildirmişlerdir. Saf çözücüler (%100) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilen oleuropein miktarının, sulu çözeltilere oranla daha düşük

olduğu, çözücü tipi ve konsantrasyonunu ile sıcaklık ve pH'nın oleuropein miktarı üzerindeki etkisinin istatiksel olarak $P<0.05$ düzeyde önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Khemakhem ve ark. (2017b) farklı sıcaklıklarda (10, 20, 30, 50 ve 70 ˚C) su kullanarak gerçekleştirdikleri ultrason destekli ve konvansiyonel ekstraksiyon yöntemleri sonucu elde ettikleri zeytin yaprağı ekstraktlarında toplam fenolik madde, antioksidan kapasite ve oleuropein miktarını araştırmışlardır. Araştırıcılar, sıcaklık arttışına paralel olarak her iki ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, antioksidan kapasite ve oleuropein miktarının da arttığını bildirmişlerdir. Araştırıcılar, 5. dakikadan sonra ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarının, konvansiyonel ekstraksiyona oranla, daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Yüksek sıcaklıkta (70 ˚C) ekstraksiyon işleminin başlangıcında (1.dk), ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen ekstraktın, toplam fenolik madde miktarının konvansiyonel ekstraksiyona oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Xie ve ark. (2015) zeytin yapraklarından konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu, düşük basınçlı kaynayan su ekstraksiyonu, ultrason destekli ekstraksiyon ve düşük basınçlı ultrason destekli ekstraksiyon ile elde edilen oleuropein miktarı ve verimini değerlendirmişlerdir. Araştırıcılar, en yüksek oleuropein miktarı (%7.08) ile oleuropein verimini (%92.3) düşük basınçlı ultrason destekli ekstraksiyon ile elde ettiklerini; bu metotla ekstraksiyon süresinin, diğerlerine göre daha kısa olduğunu bildirmişlerdir. Ultrason destekli ekstraksiyon ile 5 dk'da %6.35, düşük basınçlı kaynayan su ekstraksiyonu ile 30 dk'da %6.28, konvansiyonel çözücü ekstraksiyonu ile 3 saatte %5.71 oleuropein elde ettiklerini bildirmişlerdir.

2.3. Yanıt Yüzey Metodolojisi

Günümüzde bilim ve teknoloji insan hayatında büyük ölçüde zamandan, iş gücünden ve enerjiden tasarruf sağlayacak yönde ilerlemektedir. İhtiyaç duyulan kaynaklara erişim kısa zamanda ve kolay bir biçimde gerçekleşmekte ve insanlara daha konforlu bir yaşam sunulmaktadır. Bunun bir sonucu olarak sanayi, tarım, gıda, kimya ve bunun gibi pekçok sektörde ürün kalitesini arttırmak amacıyla kaynakların

daha etkin bir biçimde kullanılması yönünde önemli bir rekabet söz konusu olmaktadır. Bu konuda gelişme sağlayabilmek adına deney tasarımı ve optimizasyon yöntemleri geliştirilmiştir.

Deney tasarımı ilk olarak 1920'lerde tarımda verimlilik incelemelerinde R. A. Fisher ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Basit bir deney tasarımı; cevap değişkeni ve bu cevap değişkenini etkilediği düşünülen etkenlerden oluşmaktadır. Etkenler, deneyi yapan kişinin kontrol edebildiği bağımsız değişkenlerdir. Cevap değişkeni ise deney tasarımında etken değerlerine göre artıp azalabilen ve deneyin verimliliğini belirlemede dikkate alınan bir parametredir. Deney tasarımlarında öncelikle problemin tanımlanması, cevap değişkeni ve etkenlerin belirlenmesi gerekmektedir. Etkenlerin düzeyleri belirlendikten sonra deney tasarımı için en uygun modelin seçimi ve sonuçların yorumlanması yapılmaktadır (Şirvancı, 1997; Hicks, 2009). Optimizasyon çalışması için planlanan deney tasarımında bağımsız değişkenlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve bu bağımsız değişkenlerin cevap değişkeni üzerindeki etkileri büyük önem taşımaktadır. Yanıt Yüzey Yöntemi, deney tasarımında bağımsız değişkenler arasındaki ilişki ve cevap değişkeni(leri) üzerinde oluşturdukları etkiyi belirlemek için kullanılan matematiksel ve istatistiksel modelleme tekniklerinin kullanılması sonucu gerçekleştirilen optimizasyondur. Yanıt Yüzey Yöntemi ilk olarak Box ve Wilson tarafından 1951 yılında, endüstriyel deneyler için geliştirilmiştir (Montgomery, 2005).

Gıdaların yapısında çok sayıda ve birbiriyle etkileşim halinde olan karmaşık yapıda bileşenlerin bulunması, gıda sektöründeki proseslerde yanıt yüzey yöntemlerinin kullanılmasının önünü açmıştır. Gıda sektöründeki proseslerde Yanıt Yüzey Yöntemlerinden en çok Merkezi Tümleşik Tasarım (Central Composite Design) ve Box-Behnken Tasarım (Box-Behnken Design) modelleri kullanılmaktadır. Merkezi Tümleşik Tasarım Modelinde her bir faktörün beş seviyesi kullanılırken, Box-Behnken tasarım modelinde her bir faktörün üç seviyesi kullanılmaktadır. Box-Behnken Tasarım Modeli için deneme noktası sayısı (N), $N=2k(k-1)+n_c$ denklemiyle belirlenmektedir. Bu denklemde k bağımsız değişken sayısını, n_c merkezi deneme sayısını belirtmektedir. Box-Behnken Tasarım Modeli, 1960 yılında Box ve Behnken

tarafından geliştirilmiştir. Box-Behnken tasarım modelleri, Merkezi Tümleşik Tasarım Modellerine göre, daha az deneme noktası ile çalışılabilmesinden dolayı daha çok tercih edilmektedir (Koç ve Kaymak-Ertekin, 2010).

Chen ve ark. (2012) çörek mantarı misellerinden ultrason destekli ekstraksiyon yöntemiyle, suda çözünen polissakkaritlerin ekstraksiyonunda, katı madde: çözücü oranı (X_1: 1:40–1:60), ekstraksiyon süresi (X_2: 6-10 dk) ve sıcaklığının (X_3: 50–70 °C) etkisini Box–Behnken Tasarım Modeli ile incelemişlerdir. Çalışmada sıcaklık, süre ve katı madde: çözücü oranı x sıcaklık etkileşiminin, polisakkarit verimi üzerindeki etkisini $P<0.05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Araştırıcılar, optimum ekstraksiyon şartlarının 56 °C, 1:55 katı madde: çözücü oranı ve 8.4 dakika süre olarak tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Karakashov ve ark., (2015a) *Hypericum triquetrifolium* Turra bitkisinden gliserol-su karışımı (%10, w/v) kullanarak gerçekleştirdikleri ekstraksiyon işleminde sıcaklık (50, 60 ve 70 °C) ve sürenin (5, 50 ve 95 dk) toplam fenolik madde miktarı üzerindeki etkisini Merkezi Tümleşik Tasarım Modeli ile araştırmışlardır. Araştırıcılar, optimum çalışma şartlarını 70 °C'de 68.7 dk, gliserol-su karışımı ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilen fenolik madde miktarının (53.49 mg GAE/ g kurumadde), su ekstraksiyonu ile elde edilen fenolik madde miktarından (44.21 mg GAE/g kurumadde) daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Goldsmith ve ark. (2014) zeytin yaprağının su ile ekstraksiyonunda sıcaklık, süre ve çözücü: katı madde oranı olmak üzere 3 farklı bağımsız değişkenin, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisini Box–Behnken Tasarım Modeli ile incelemişlerdir. Araştırıcılar, DPPH ve CUPRAC yöntemiyle tespit edilen antioksidan kapasitesi üzerine sıcaklık ($P<0.05$ ve $P<0.001$) ve çözücü: katı madde oranı ($P<0.05$ ve $P<0.001$) etkisinin önemli, sıcaklık ($P<0.01$), süre ($P<0.05$) ve çözücü: katı madde oranının ($P<0.05$) FRAP yöntemiyle elde edilen antioksidan kapasitesi üzerinde etkisinin önemli, toplam fenolik madde üzerinde ise sadece çözücü: katı madde oranının ($P<0.05$) etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar optimum çalışma şartlarını sırasıyla FRAP metoduyla

gerçekleştirilen antioksidan kapasite sonuçlarına göre 90 °C, 1:100 g/mL katı madde: çözücü oranı ile 70 dk'lık ekstraksiyon süresi; DPPH metoduyla gerçekleştirilen antioksidan kapasite sonuçlarına göre 90 °C, 1:20 g/mL katı madde: çözücü oranı ile 70 dk'lık ekstraksiyon süresi; CUPRAC metoduyla gerçekleştirilen antioksidan kapasite sonuçlarına göre ise 90 °C, 1:60 g/mL katı madde: çözücü oranı ile 70 dk'lık ekstraksiyon süresi olarak bildirmişlerdir. Sonuç olarak çözücü sarfiyatını en düşük düzeyde tutmak ve en yüksek antioksidan kapasite değerini yakalayabilmek için optimum çalışma şartları 1:60 g/mL katı madde:çözücü oranı, 90 °C'de 70 dk'lık ekstraksiyon süresi olarak belirlenmiştir.

Şahin ve Şamlı (2013) Tavşan yüreği zeytin yaprağından ultrason destekli ekstraksiyonda, süre (20, 40 ve 60 dk), etanol konsantrasyonu (%0, 50 ve 100) ve çözücü: yaprak oranının (500:10, 500:15, 500:20) ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasitesi üzerine etkisinin incelendiği optimizasyonu çalışmasında; ekstraksiyon verimi 36.16-248.84 mg/g kuru yaprak, toplam fenolik madde miktarı 5.18-20.31 mg GAE/ g kuru yaprak, antioksidan kapasitesini ise %86.31-97.97 olarak belirlemişlerdir. Araştırıcılar, optimum çalışma şartlarını ise 500:10 mg/mL çözücü: yaprak oranı, %50 etanol ve 60 dk süre olarak belirlemişlerdir.

Kuo ve ark. (2013) *Polygonum cuspidatum* adlı bitki kökünden ultrason destekli ekstraksiyon çalışmasında sıcaklık (30-70 °C), etanol konsantrasyonu (%40-80) ve ultrasonik gücün (90-150 W) elde edilen ekstraktlardaki piceid, resveratrol ve emodinin miktarı üzerindeki etkisini yanıt yüzey yöntemini kullanarak Box–Behnken Tasarım Modeli ile araştırmışlardır. Çalışmada sıcaklık ve etanol konsantrasyonun piceid ve emodinin miktarı; sıcaklık, etanol konsantrasyonu ve ultrasonik gücün resveratrol miktarı üzerindeki etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Araştırıcılar, optimum ekstraksiyon şartlarını piceid miktarı için 57.8 ˚C, %49.75 etanol ve 120 W güç; resveratrol miktarı için 70 ˚C, %58.51 etanol ve 120 W güç; emodin miktarı için 70 ˚C, %71.06 etanol ve 120 W güç olarak belirlemişlerdir. Araştırıcılar belirledikleri bu optimum şartlarda gerçekleştirilen deneylerde en yüksek piceid, resveratrol ve emodin miktarının sırasıyla 10.77, 3.82 ve 11.72 mg/g olarak tespit etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan Halhalı çeşidine ait zeytin yaprakları Mardin ili Derik İlçesinden, Ayvalık ve Gemlik çeşidine ait zeytin yaprakları ise Harran Üniversitesi Osmanbey Kampüsünden Nisan ayında toplanmıştır. Ticari zeytin yaprağı ekstraktı Immunant firmasından (Bodrum, Muğla), çay poşetleri Silva Tekstil firmasından (Sefaköy-Beşyol, İstanbul) temin edimiştir. Ayrıca çalışmada BHT (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya), α-tokoferol (Sigma Aldrich, Steinheim, Almanya) ve teflon filtreler (Minisart Sartorius RC, Gottingen, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Zeytin yapraklarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan zeytin yaprakları dal, sap vb. kısımlarından ayrıldıktan sonra musluk suyu ile yıkanmıştır. Kurutma işlemi etüvde kontrollü şartlarda 30 °C'de 2 gün süre ile gerçekleştirildikten sonra, zeytin yaprakları kahve öğütücüsü (SCM 2934, Sinbo) yardımıyla 1-2 mm parçacık büyüklüğü elde edilinceye kadar öğütülmüştür. Kurutulan örnekler polietilen poşetlere doldurulup aliminyum folyaya sarılarak ekstraksiyon işlemine kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan Gemlik, Ayvalık ve Halhalı zeytin çeşitlerinin yapraklarına ait kuru madde oranları sırasıyla (%)70.13, 65.85 ve 70.39 olarak tespit edilmiştir.

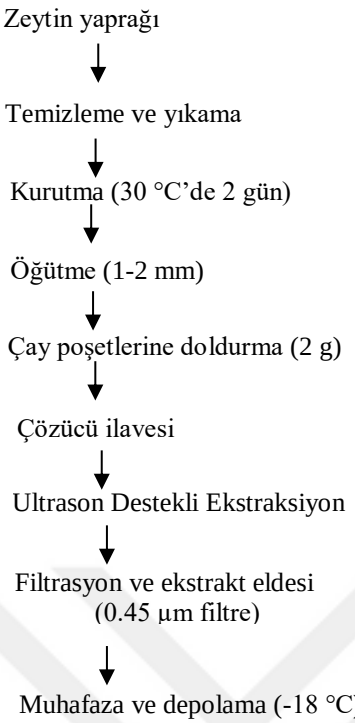
3.2.2. Ultrason destekli ekstraksiyon ve optimizasyon çalışması

Literatürde zeytin yaprağı ekstraksiyonunda çözücü olarak su (Cebe ve ark., 2012; Goldsmith ve ark., 2014), etil alkol-su karışımı (Stamatopoulos ve ark., 2013; Bilek, 2010), metil alkol-su karışımı (Malik ve Bradford, 2006; Doğan, 2017), asitlendirilmiş metil alkol (Fabbri ve ark., 2004), hekzan (Brahmi ve ark., 2012), kloroform (Lee ve ark., 2009), gliserol-su (Apostolakis ve ark., 2014), asetonitril-su (Yateem ve ark., 2014) karışımları kullanılmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda zeytin

yaprağı ekstraktının gıdalarda doğal antioksidan olarak kullanılacağı göz önüne alınarak, düşük toksisitesi ve fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda yüksek verim alınması sebebiyle optimizasyon aşamasında çözücü olarak literatür bilgileri doğrultusunda %60 etanol kullanılmasına karar verilmiştir.

Bitkisel çaylar genellikle 2 g kurutulmuş ürün içerecek şekilde üretilip paketlendiği için çalışmada katı madde miktarı 2 g olarak belirlenmiştir. Çözücü miktarı ise ön denemeler sonucunda ekstraksiyon ve analizler için yeterli olacak en az miktar (40 mL) esas alınarak belirlenmiştir. Literatürde zeytin yaprağının ultrason destekli ekstraksiyonunda; ekstraksiyon sıcaklığının 10-90 °C (Goldsmith ve ark., 2014; Khemakhem ve ark., 2017b), ekstraksiyon süresinin 5-60 dakika (Ahmed-Qasem ve ark., 2013; Goldsmith ve ark., 2014; Şahin ve Şamlı, 2013) ve ultrasonik gücün %30-100 (Ahmed-Qasem ve ark., 2013; Xie ve ark., 2015) olarak değiştiği görülmektedir. Zeytin yaprağından ultrason destekli ekstraksiyonunun optimizasyonunda yukarıda bildirilen literatür çalışmaları, labaratuvar imkanları ve ön denemeler doğrultusunda bağımsız değişkenlerin alt ve üst limitleri aşağıda ifade edilidiği şekilde belirlenmiştir.

Ultrason Destekli Ekstraksiyonda çalışma şartlarının optimizasyonu için literatür bilgileri doğrultusunda (Ahmad-Qasem ve ark., 2013; Khemakhem ve ark., 2017b; Goldsmith ve ark., 2014) 3 farklı bağımsız değişken; ekstraksiyon sıcaklığı (X_1) (30, 50 ve 70 °C), ekstraksiyon süresi (X_2) (20, 40 ve 60 dk) ve ultrasonik güç (X_3) (%40, 70 ve 100) kullanılmıştır. Ultrason Destekli Ekstraksiyon, 40 kHz frekansa, 320 W ultrasonik güce sahip su banyosunda (ISOLAB 621.06.010, Almanya) 200 mL shot şişeleri içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada öncelikle en yüksek verimde ekstrakt elde edebilmek için ultrasonik su banyosunda çalışma parametrelerinin (sıcaklık, süre ve ultasonik güç) yanıt yüzey yöntemiyle optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnek miktarı (2 g), çözücü miktarı (40 mL) ve çözücü konsantrasyonu (%60 etanol) sabit olacak şekilde optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1). Ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilen ekstraktlar tek kullanımlık teflon filtreden (0.45 µm, Minisart Sartorius RC, Gottingen, Almanya) geçirilmiş ve analizlere kadar -18 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Zeytin yaprağından ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakt elde etme aşamaları

Zeytin yaprağından fenolik madde ekstraksiyonunun optimizasyonu Yanıt Yüzey Yöntemine (Response Surface Methodology) göre 3 faktör ve 3 düzeyli Box-Behnken Tasarım Modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimizasyonda ekstraksiyon sıcaklığı (30, 50, 70 °C), ekstraksiyon süresi (20, 40, 60 dk) ve ultrasonik güç (%40, 70, 100) olmak üzere 3 bağımsız değişken seçilerek Box-Behnken Tasarım Modeline göre toplamda 17 ayrı deneme ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1).

Box-Behnken Tasarım Modeli ile oluşturulan deneme planına göre elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarında ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde miktarı ve EC_{50} değeri araştırılmış ve elde edilen bu cevap değişkenlerine ait veriler Box-Behnken Tasarım Modelinde giriş yapılmıştır. Söz konusu deneme planına göre elde edilen verilerin istatistiksel analizi ile bağımsız değişkenler (sıcaklık, süre ve ultrasonik güç) optimize edilmiştir. Ardından optimize edilen şartlarda (sıcaklık, süre ve güç) çözücü miktarı (40, 70 ve 100 mL), çözücü konsantrasyonu (%0, 20, 40, 60, 80), yaprak çeşidi (Gemlik, Ayvalık ve Halhalı) ve kurutma işleminin (kuru ve yaş

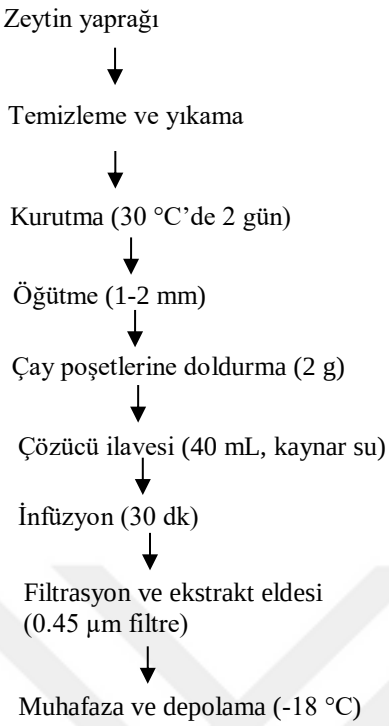
yaprak) ekstraktların antioksidan kapasitesi, ekstraksiyon verimi ve fenolik madde miktarı üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çizelge 3.1. Ultrason destekli ekstraksiyon için Box-Behnken Tasarım Modeline göre oluşturulan deneme planı

Deney no	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Ultrasonik güç (%)
1	50	40	70
2	30	20	70
3	70	40	100
4	50	60	40
5	30	40	100
6	50	20	40
7	70	20	70
8	50	60	100
9	50	40	70
10	50	20	100
11	30	40	40
12	70	40	40
13	70	60	70
14	30	60	70
15	50	40	70
16	50	40	70
17	50	40	70

3.2.3. İnfüzyon metodu ile ekstraksiyon

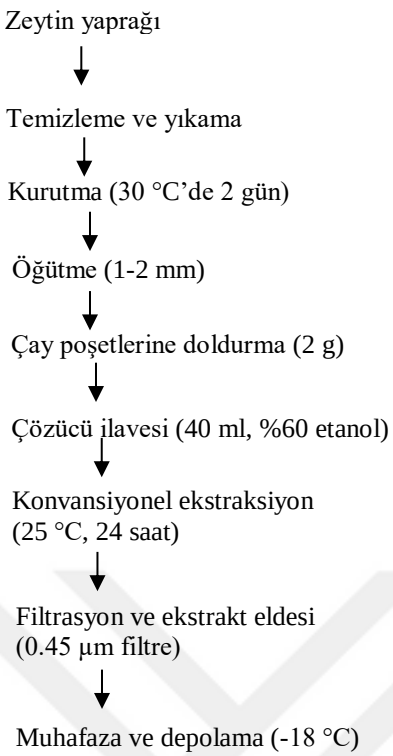
Çay poşeti içerisine konulan 2 g kurutulmuş zeytin yaprağı üzerine, 40 mL kaynatılmış içme suyu (~ 98 °C) ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk boyunca demlenmeye bırakılmıştır. Süre sonunda elde edilen ekstrakt tek kullanımlık teflon filtreden (45 µm) geçirilmiş ve analizlere kadar -18 °C'de amber renkli şişede muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İnfüzyon yöntemi ile zeytin yaprağından ekstrakt elde etme aşamaları

3.2.4. Konvansiyonel ekstraksiyon

Çay poşeti içerisine konulan 2 g kurutulmuş zeytin yaprağı üzerine 40 mL %60'lık etanol çözeltisi ilave edilerek 24 saat süre ile oda sıcaklığında (25 °C) bekletilmiştir. Süre sonunda elde edilen ekstrakt 45 µm tek kullanımlık teflon filtreden geçirilmiş ve analizler yapılana kadar -18 °C derin dondurucuda amber renkli şişede muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi ile zeytin yaprağından ekstrakt elde etme aşamaları

3.3. Yapılan Analizler

3.3.1. Toplam fenolik madde miktarı tayini

Toplam fenolik madde tayini gallik asit standartı kullanılarak Folin Ciocalteu metoduna göre belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965). Bu amaçla uygun oranda seyreltilmiş 0.3 mL ekstrakt alınarak sırasıyla üzerine 1.5 mL Folin-Ciocalteu çözeltisi ve 1.2 mL doygun Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiş ve 120 dakika bekletildikten sonra 765 nm de absorbansı ölçülmüştür. Gallik asitle çizilen standart eğriden yararlanılarak hesaplama yapılmış, sonuçlar gallik asit cinsinden mg GAE/g kuru yaprak olarak verilmiştir.

3.3.2. Antioksidan kapasite tayini ve EC_{50} değerinin hesaplanması

Zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasiteleri Blois (1958) tarafından geliştirilen yöntem kullanılarak, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radikali indirgeme metoduna göre yapılmıştır. Bu amaçla seyreltilerek farklı

konsantrasyonlarda hazırlanan örnek ekstraktı ve standart çözeltiden 0.1 mL alınarak ayrı tüpler içerisine ilave edilmiş, üzerine 3.9 mL DPPH (10^{-4} M) çözeltisi eklenmiş ve karanlıkta 40 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin ardından örneklerin absorbansı 515 nm'de ölçülmüştür. Kontrol için 0.1 mL ekstraksiyon çözücüsü kullanılmış ve örnekler için gerçekleştirilen adımlar aynen uygulanmıştır. Sonuçlar aşağıdaki denkleme göre % inhibisyon değeri olarak hesaplanmıştır (Denklem 3.1).

$$\%\ İnhibisyon = \frac{Kontrol\ örneğinin\ absorbans\ değeri - Örneğin\ absorbans\ değeri}{Kontrol\ örneğinin\ absorbans\ değeri} * 100 \quad (3.1)$$

Elde edilen % inhibisyon sonuçları konsantrasyona karşı grafiğe aktarıldıktan sonra DPPH radikalinin %50'nin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon (EC_{50}) değeri µg/mL olarak belirlenmiştir.

3.3.3. Ekstraksiyon verimi tayini

Önceden sabit tartıma getirilen cam kab içerisine 5 mL zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilerek, 105 ± 2 °C'de etüvde çözücü tamamen uzaklaştırılıncaya kadar kurutulmuş ve daha sonra desikatörde soğutularak tartılmıştır. Bu işlem iki tartım arasındaki fark 0.002 gr olana dek tekrarlanmıştır. Kurumadde üzerinden ekstraksiyon verimi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır (Velioğlu, 2007) (Denklem 3.2).

$$Ekstraksiyon\ verimi\ (\%) = \frac{A}{B} x \frac{C}{D} x \frac{100}{KM} x 100 \quad (3.2)$$

KM: Örneğin kurumadde oranı (%)
A: Kalıntı miktarı (g)
B: Deneyde kullanılan ekstrakt miktarı (mL)
C: Ekstraksiyon hacmi (mL)
D: Ekstraksiyonda kullanılan örnek miktarı (g)

3.3.4. Taramalı elektron mikroskobu ile hücre parçalanmasının görüntülenmesi

Ekstraksiyon yöntemleri arasındaki farklılığın görsel olarak incelenmesi amacıyla katı fazda taramalı elektron mikroskobu ile hücre parçalanması görüntülenmiştir. Bu amaçla ekstraksiyonu tamamlanan örneklerden elde edilen çay poşetleri içerisindeki zeytin yaprakları etüvde 30 °C'de nemi tamamen uzaklaşıncaya

kadar kurutulmuştur. Taramalı elektron mikroskobunda (SEM, ZEIS EVO 50) incelenmek üzere SEM staplarına yerleştirilen örneklerin üzerini iletkenliğin sağlanması için altınla kaplanmıştır. Çok küçük bir alana odaklanan yüksek enerjili elektronlar ile yüzeyin taranması sonucu elde edilen örnek görüntüleri bilgisayar ortamına aktarılmıştır (Xie ve ark., 2015).

3.3.5. İstatiksel analizler

Deneme planı oluşturulmasında Yanıt Yüzey Metadolojisine göre, Box Behnken Tasarım Modelinden yararlanılmıştır. Bu işlem için Design Expert (7.0.0.) programı kullanılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA kullanılmış ve SPSS (9.0) paket programından faydalanılmıştır. İstatistiksel olarak önemli çıkan ortalamalar arasındaki farklılık Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir. Çalışma iki tekerrürlü, üç paralelli olarak yürütülmüştür.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon ve Optimizasyon Sonuçları

Bağımsız değişkenlerin optimizasyonunda Box-Behnken Tasarım Modeli uygulanarak oluşturulan deneme planına göre elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasiteleri (EC_{50}) incelenmiştir. Bu bağlamda hazırlanan Box-Behnken Tasarım Modeline göre oluşturulan deneme planı sonuçları Çizelge 4.1 'de verilmiştir. EC_{50} değeri, DPPH radikalinin %50'sini indirgemek için gerekli olan ekstrakt konsantrasyonunu ifade ettiği için en yüksek antioksidan kapasiteye sahip ekstrakt, en düşük EC_{50} değerine sahiptir. Bu sebeple bu çalışmada EC_{50} değerinin en düşük olması, Folin-Ciocalteu yöntemiyle gallik asit eşdeğeri cinsinden hesaplanan toplam fenolik madde miktarı ve kurumadde üzerinden yüzde kalıntı miktarı baz alınarak hesaplanan ekstraksiyon veriminin en yüksek olması istenmektedir. Bu bağlamda bağımsız değişkenlerin araştırılan cevap değişkenleri üzerinde ayrı ayrı optimum noktaları belirlenirken, programda toplam fenolik madde miktarı için "maximize" diğerleri için "in range", ekstraksiyon verimi için "maximize" diğerleri için "in range" ve EC_{50} değeri için "minimize" diğerleri için "in range" seçeneği kullanılmıştır. Özetle tüm sonuçların optimizasyonunda ise toplam fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimi için "maximize", EC_{50} değeri için "minimize" seçeneği kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Ultrason Destekli Ekstraksiyon ile Box Behnken Tasarım Modeli kapsamında araştırılan parametrelere ait deneysel ortalama değerler

	Bağımsız değişkenler			Cevap değişkenleri		
No	**T (°C) (X_1)**	**t (dk) (X_2)**	**P (%) (X_3)**	**TFM (mg GAE/ g kuru yaprak) (Y_1)**	**Ekstraksiyon verimi (%) (Y_2)**	**EC_{50} değeri (µg/mL) (Y_3)**
1	50	40	70	38.77	25.99	127.44
2	30	20	70	20.57	13.83	142.03
3	70	40	100	48.83	26.66	156.17
4	50	60	40	48.07	25.77	149.77
5	30	40	100	23.13	14.27	155.98
6	50	20	40	32.90	13.38	151.31
7	70	20	70	36.61	20.63	140.02
8	50	60	100	46.89	26.15	152.98
9	50	40	70	39.03	22.27	132.97
10	50	20	100	37.85	18.68	152.18
11	30	40	40	21.66	12.16	157.42
12	70	40	40	51.49	25.97	143.10
13	70	60	70	53.89	27.74	140.00
14	30	60	70	25.29	15.23	146.79
15	50	40	70	43.32	24.19	129.76
16	50	40	70	49.80	23.91	137.32
17	50	40	70	44.65	24.12	128.15

T: Sıcaklık, t: süre, P: Ultrasonik güç, TFM: Toplam fenolik madde miktarı

4.1.1. Bağımsız değişkenlerin araştırılan parametreler üzerindeki etkisi

4.1.1.1. Toplam fenolik madde miktarı

Çalışmada Box-Behnken Tasarım Modeli kapsamında toplam fenolik madde miktarının hesaplanması için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede toplam fenolik madde miktarı için quadratik ($P<0.05$) ve lineer modelin ($P<0.01$) önemli olduğu saptanmıştır. Uyum eksikliği (lack of fit) değerleri incelendiğinde ise quadratik modele ait değerin $P>0.05$ düzeyinde önemsiz olduğu görülmektedir. Zira bir model önemli düzeyde model uygunsuzluğu içeriyorsa bu model sonuçlar için iyi bir gösterge değildir ve bunun üzerinden de sonuçlar yorumlanamaz (Yağcı ve Göğüş, 2008). Buna göre optimizasyon programının önerdiği en yüksek dereceli polinomial denklem, model olarak seçilmiştir.

Çizelge 4.2. Toplam fenolik maddde miktarı için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KO	F	P	
Model					
Lineer	3	1522.04	16.97	< 0.0001	
Quadratik	3	234.29	5.4	0.0307	Önerilir
Kalıntı hatası	4	82.69			
Toplam	17	27749.26			
Uyum eksikliği					
Lineer	9	305.93	1.64	0.3330	
Quadratik	3	18.55	0.3	0.8255	Önerilir
Saf hata	4	82.69			

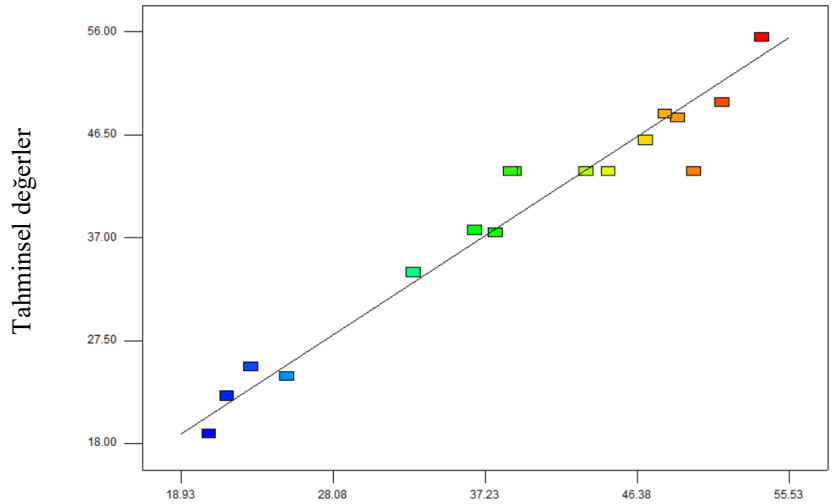
SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, toplam fenolik madde ile bağımsız değişkenler arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir (Denklem 4.1).

$$Y_1 = 43.11 + 12.52X_1 + 5.78X_2 + 0.32X_3 + 3.14X_1X_2 - 1.03X_1X_3 - 1.53X_2X_3 - 7.09X_1^2 - 1.94X_2^2 + 0.25X_3^2 \quad (4.1)$$

Regresyon analizi sonucunda ikinci dereceden polinomial model ile elde edilen tahminsel veriler ve deneysel veriler arasındaki ilişki Şekil 4.1'de verilmiştir. Söz konusu veriler arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) 0.9470 olup modelin, deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir.

Çalışmada her bir bağımsız değişkenin toplam fenolik madde üzerine etkisi varyans analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Toplam fenolik madde miktarı (Y_1) üzerine oluşturulan modelin ($P<0.001$), X_1 ($P<0.0001$), X_2 ($P<0.05$) ve X_1^2 ($P<0.01$) etkisi önemli bulunurken, X_3 ve diğer değişkenlerin etkisi ($P>0.05$) önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.1. Toplam fenolik madde miktarı ile ilgili deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki

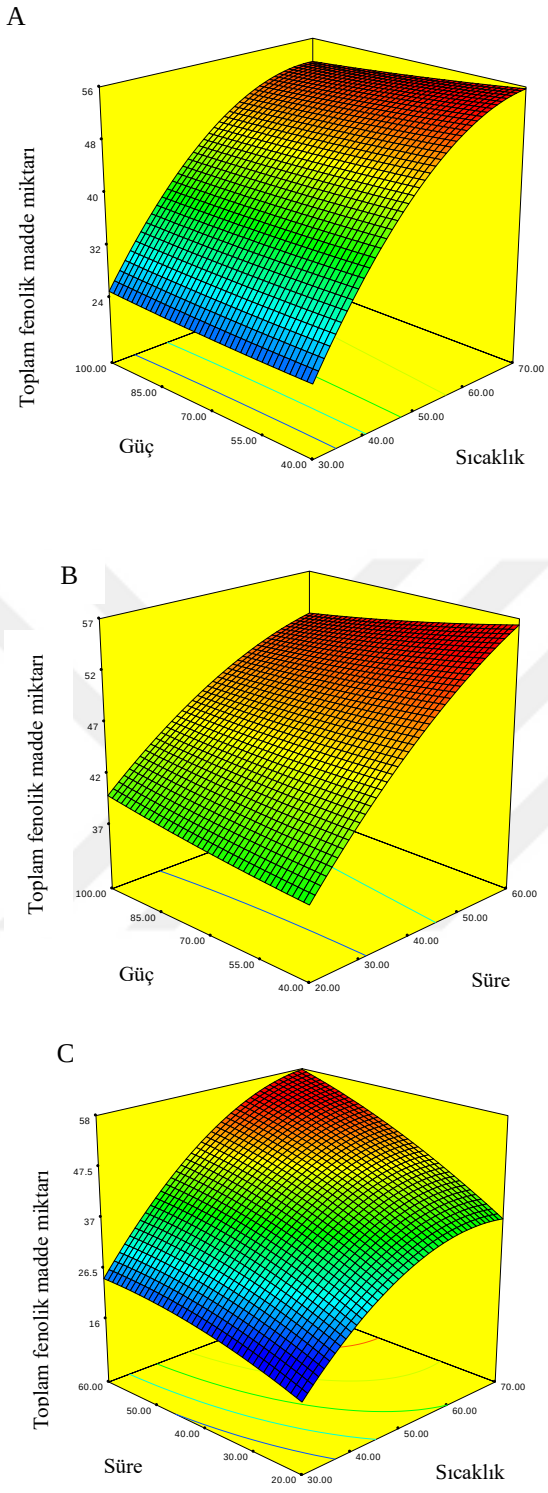
Çizelge 4.3. Model ve bağımsız değişkenlerin cevap değişkenleri üzerine etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

		Toplam fenolik madde		**Ekstraksiyon verimi**		**EC_{50} değeri**	
Değişkenler	**SD**	**KO**	**P**	**KO**	**P**	**KO**	**P**
Model	9	201.05	0.0011**	49.68	0.0020**	173.68	0.0008***
X_1	1	1254.29	< 0.0001***	258.86	0.0001***	65.70	0.0482*
X_2	1	266.91	0.0036*	100.68	0.0019*	2.01	0.6885
X_3	1	0.83	0.8170	8.99	0.1909	30.87	0.1454
$X_1 X_2$	1	39.46	0.1426	8.15	0.2105	5.72	0.5034
$X_1 X_3$	1	4.24	0.6052	0.5	0.7419	52.69	0.0696
$X_2 X_3$	1	9.39	0.4469	6.04	0.2739	1.37	0.7405
X_1^2	1	211.50	0.0065*	37.53	0.0212*	169.50	0.0064**
X_2^2	1	15.80	0.3307	12.99	0.1253	94.55	0.0241*
X_3^2	1	0.27	0.8959	7.60	0.2247	1037.09	< 0.0001***
Kalıntı	7	14.46		4.29		11.50	
Uyum eksikliği	3	6.18	0.8255	7.69	0.0921	4.81	0.8306
Saf hata	4	20.67		1.73		16.52	
Toplam hata	16						

*** : P<0.001 düzeyde önemli, ** : P<0.01 düzeyde önemli, * : P<0.05 düzeyde önemli
X_1: Sıcaklık, X_2: Süre, X_3: Ultrasonik güç, SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Toplam fenolik madde miktarı için çizilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, Şekil 4.2 A ve B'de ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi arttıkça toplam

fenolik madde miktarı için optimum nokta olarak belirlenen 65.91 °C ve 59.86 dakikaya kadar toplam fenolik madde miktarının hızlı bir şekilde arttığı, bu sıcaklık derecesinden sonra ise artış hızının düştüğü görülmektedir. Ultrasonik gücün ise toplam fenolik madde miktarı üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 4.2 C'de ise ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin artmasına bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının arttığı, sıcaklıktaki artışın süredeki artışa göre toplam fenolik madde miktarı üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar literatür çalışmalarını destekler niteliktedir (Khemakhem ve ark., 2017b; Zhang ve ark., 2011). Her ne kadar sıcaklık artışının, kimyasal ve enzimatik degredasyona bağlı olarak toplam fenolik madde miktarında azalmaya sebep olduğu bilinse de ekstraksiyon sıcaklığındaki artışın zeytin yaprağından fenolik madde eldesinde olumsuz bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu durumun yüksek sıcaklığın, çözücü viskozitesini ve yüzey gerilimini azaltarak fenolik maddelerin çözünürlüğünü arttırdığı, dolayısıyla da bu maddelerin difüzyon ve ekstraksiyon hızını arttırmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.2. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) sabit ekstraksiyon süresinde (59.86 dk), (B) sabit ekstraksiyon sıcaklığında (65.91 °C), (C) sabit ultrasonik güçte (% 83.33) TFM için yanıt yüzey grafiği

4.1.1.2. Ekstraksiyon verimi

Bağımsız değişkenlerin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir. Ekstraksiyon verimi için elde edilen quadratik ve lineer modelin önemli olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Uyum eksikliği (lack of fit) değerleri incelendiğinde ise quadratik modele ait değerin $P>0.05$ düzeyinde önemsiz olması, çalışmada quadratik modelin kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Ekstraksiyon verimi için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KO	F	P	
Model					
Lineer	3	368.53	14.70	0.0002	Önerilir
Quadratik	3	63.94	4.97	0.0372	Önerilir
Kalıntı hatası	4	6.94			
Toplam	17	8141.19			
Uyum eksikliği					
Lineer	9	101.72	6.52	0.0434	
Quadratik	3	23.08	4.44	0.0921	Önerilir
Saf hata	4	6.94			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

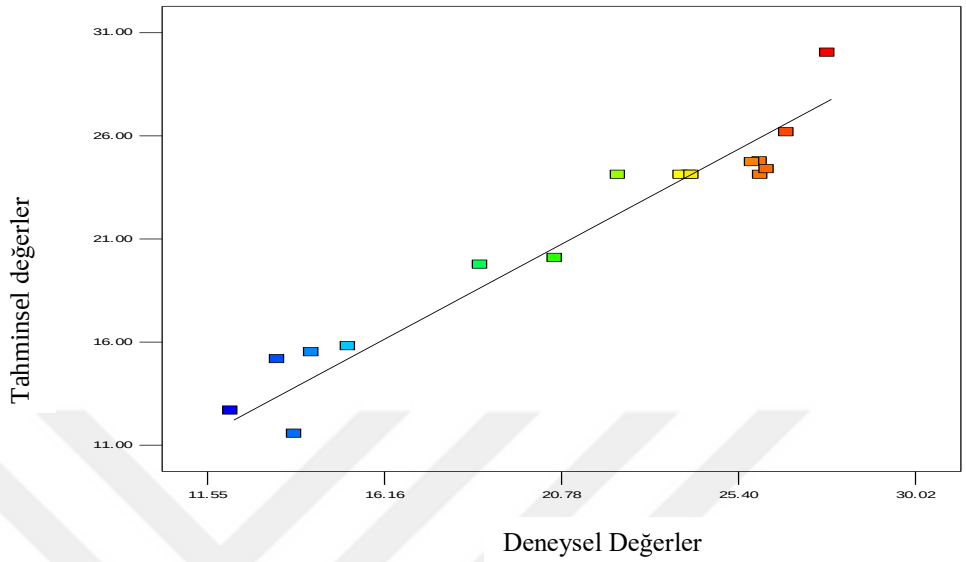
Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, ekstraksiyon verimi ve bağımsız değişkenler arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan kodlanmış değişkenler cinsinden aşağıdaki regresyon denklemi elde edilmiştir (Denklem 4.2).

$$Y_2 = +43.11 + 12.52X_1 + 5.78X_2 + 0.32X_3 + 3.14X_1X_2 - 1.03X_1X_3 - 1.53X_2X_3 - 7.09X_1^2 - 1.94X_2^2 + 0.25X_3^2 \quad (4.2)$$

Regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomial model ile elde edilen tahminsel değerler ve deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.3'de verilmiştir. Söz konusu veriler arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) 0.9371 olup modelin, deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir.

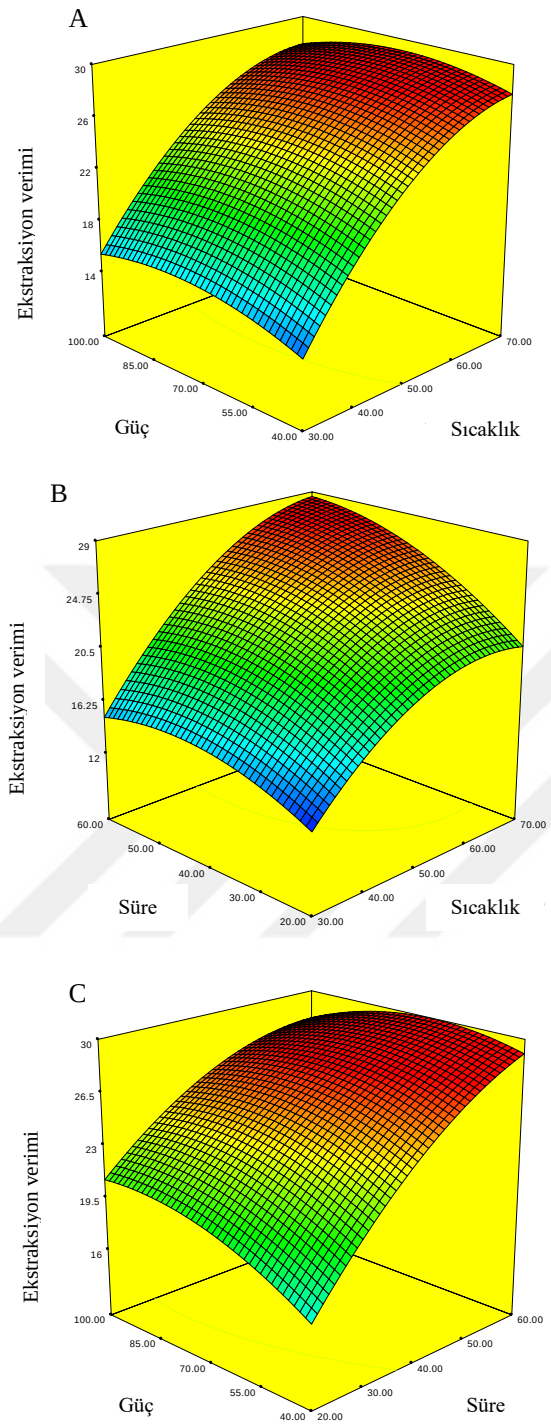
Çalışmada her bir bağımsız değişkenin ekstraksiyon verimine etkisi varyans analizi ile belirlenmiş olup her bir katsayının önemini gösteren P değerleri Çizelge 4.3' de gösterilmiştir. Ekstraksiyon verimi üzerine oluşturulan modelin ($P<0.01$), X_1

($P<0.0001$), X_2 ($P<0.05$) ve X_1^2 ($P<0.05$) etkisi önemli bulunurken, X_3 ve diğer parametrelerinin etkisi ($P>0.05$) önemsiz bulunmuştur.



Şekil 4.3. Ekstraksiyon verimi için deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki

Ekstraksiyon verimi için çizilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, Şekil 4.4 A ve C'de ekstraksiyon sıcaklığı ve ekstraksiyon süresi arttıkça ekstraksiyon verimi için optimum nokta olarak belirlenen 68.6 °C sıcaklık ve 51.74 dakikaya kadar hızlı bir şekilde arttığı; bu sıcaklık derecesi ve süreden sonra ise artış hızının nispeten düştüğü görülmektedir. Ultrasonik gücün ise ekstraksiyon verimi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Şekil 4.4 B'de ekstraksiyon sıcaklığı ve süresinin artmasına bağlı olarak ekstraksiyon veriminin arttığı ve sıcaklıktaki artışın süredeki artışa göre ekstraksiyon verimi üzerinde daha etkili olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar daha önceki literatür çalışmaları ile paralellik göstermektedir (Şahin ve Şamlı, 2013).



Şekil 4.4. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) sabit ekstraksiyon süresinde (51.74 dk), (B) sabit ultrasonik güçte (%95.43), (C) sabit ekstraksiyon sıcaklığında (68.6°C) ekstraksiyon verimi için yanıt yüzey grafiği

4.1.1.3. EC_{50} değeri

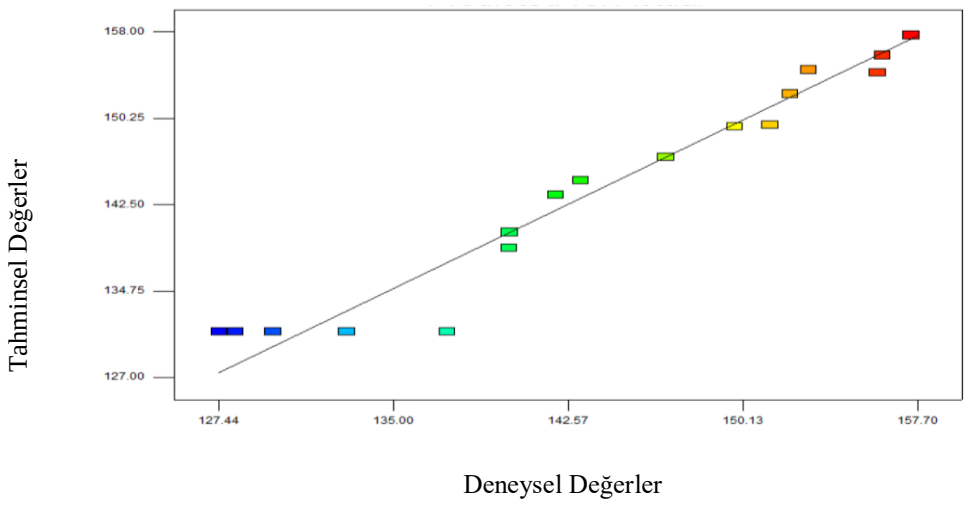
Bağımsız değişkenlerin EC_{50} değeri üzerindeki etkisi ile ilgili varyans analizi sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir. EC_{50} değeri için elde edilen quadratik modelin önemli olduğu görülmektedir ($P<0.05$). Uyum eksikliği (lack of fit) değerleri incelendiğinde ise quadratik modele ait değerin ($P>0.05$) düzeyinde önemsiz olması quadratik modelin kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5. EC_{50} değeri için uygun model tespiti ile ilgili varyans analiz sonuçları

Kaynak	SD	KO	F	P	
Model					
Lineer	3	98.58	0.28	0.8413	
Quadratik	3	1404.79	40.71	<0.0001	Önerilir
Kalıntı hatası	4	66.08			
Toplam	17	3.528E+005			
Uyum eksikliği					
Lineer	9	1479.01	9.95	0.0205	
Quadratik	3	14.44	0.29	0.8306	Önerilir
Saf hata	4	66.08			

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması

Regresyon analizi sonucunda ikinci dereceden polinomial model ile elde edilen EC_{50} değerine ait tahminsel değerler ve deneysel değerler arasındaki ilişki Şekil 4.5 te verilmiştir. Söz konusu veriler arasındaki korelasyon katsayısı (R^2) 0.9510 olup modelin, deneysel veriler ile tutarlı olduğunu göstermektedir.



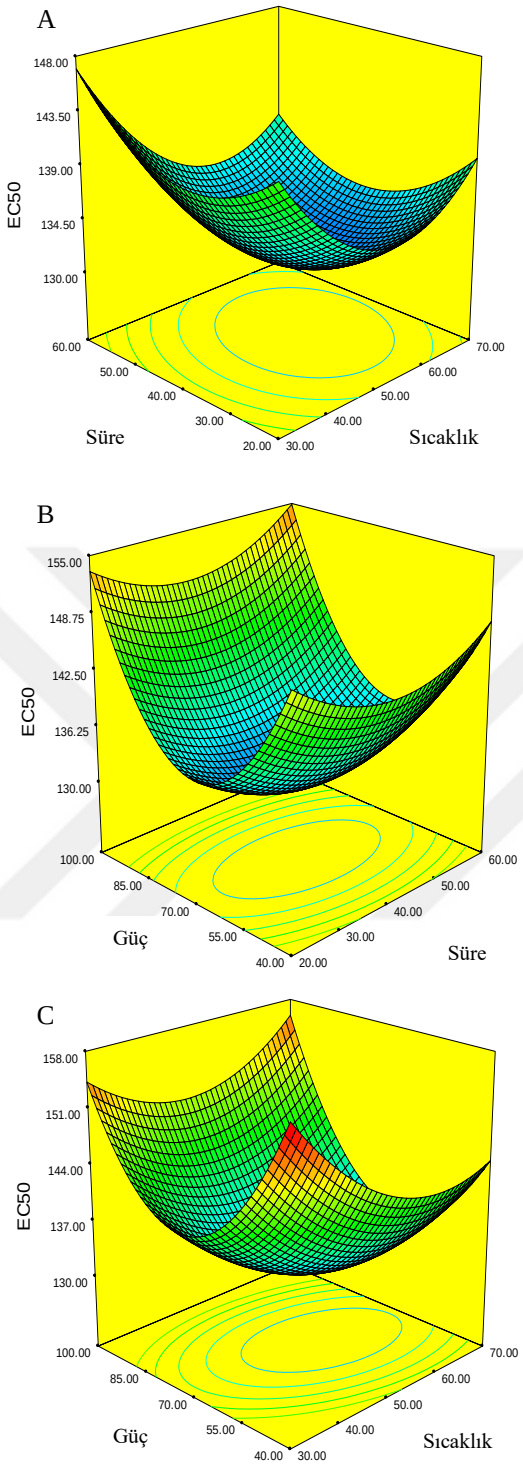
Şekil 4.5. EC_{50} değeri için deneysel ve tahminsel değerler arasındaki ilişki

Çalışmada her bir bağımsız değişkenin EC_{50} değeri üzerine etkisi varyans analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 4.3). EC_{50} değeri üzerine oluşturulan model ($P<0.001$), X_1 ($P<0.05$), X_1^2 ($P<0.01$), X_2^2 ($P<0.05$), X_3^2 ($P<0.001$) önemli bulunurken; X_2, X_3 ve diğer parametrelerinin etkisi ($P>0.05$) önemsiz bulunmuştur.

Yanıt yüzey yöntemi uygulaması sonucunda, EC_{50} değeri ve bağımsız değişkenler arasındaki empirik ilişkiyi ortaya koyan aşağıdaki kodlanmış değişkenler cinsinden regresyon denklemi elde edilmiştir (Denklem 4.3).

$$Y_3 = +131.13 - 2.87X_1 + 0.05X_2 + 1.96X_3 - 1.20X_1X_2 + 3.63X_1X_3 + 0.58X_2X_3 + 6.34X_1^2 + 4.74X_2^2 + 15.69\,X_3^2 \quad (4.3)$$

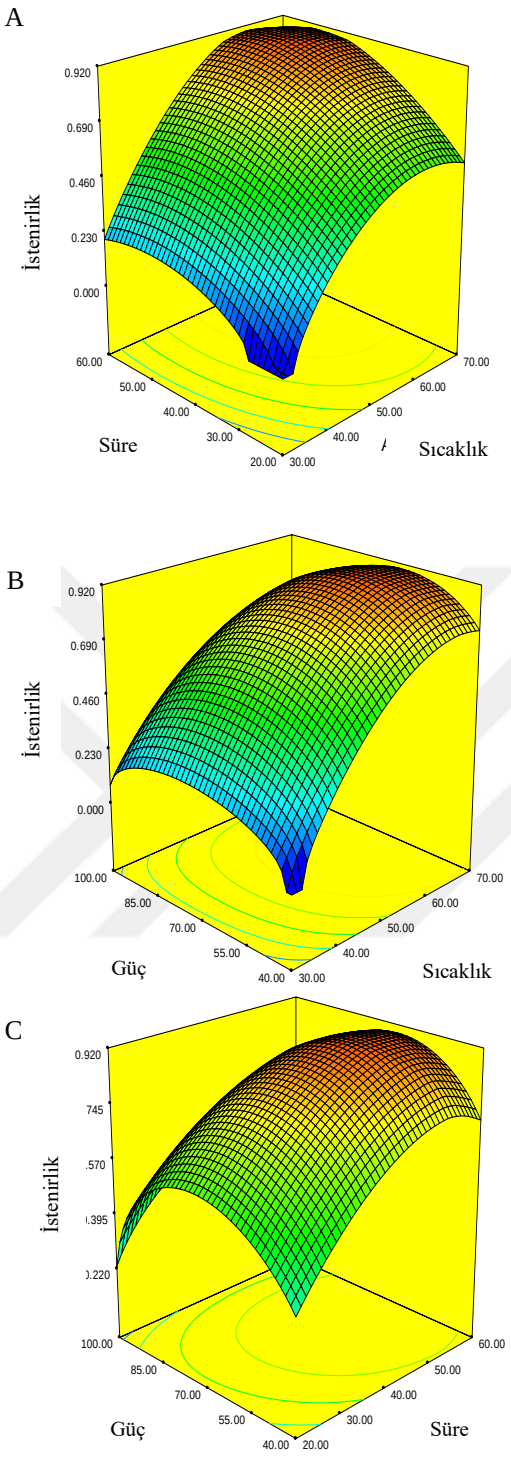
EC_{50} değeri için çizilen üç boyutlu yanıt yüzey grafikleri incelendiğinde, Şekil 4.6 A'da ekstraksiyon sıcaklığı ve süresi arttıkça ekstraksiyon verimi için optimum nokta olarak belirlenen 55 °C sıcaklık ve 39.70 dakikaya kadar azaldığı bu sıcaklık derecesi ve süreden sonra ise arttığı görülmektedir. Şekil 4.6 B ve C'de EC_{50} değeri için optimum nokta olan %67.28 ultrasonik güce kadar bu ultrasonik güç değerinden sonra ise arttığı görülmektedir.



Şekil 4.6. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) sabit ultrasonik güçte (% 67.28), (B) sabit ekstraksiyon sıcaklığında (55 °C), (C) sabit ekstraksiyon süresinde (39.70 dk) EC_{50} değeri için yanıt yüzey grafiği

4.1.2. Optimum çalışma şartlarının belirlenmesi

Yanıt yüzey yöntemiyle yapılan optimizasyonda toplam fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimi 'maximize', EC_{50} değeri 'minimize' seçeneği kullanılarak optimum çalışma şartları belirlenmiş ve istenilirlik fonksiyonu yaklaşımıyla elde edilen grafikler Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Çalışmada araştırılan 3 cevap değişkeni aynı anda değerlendirildiğinde optimize koşullar 62.94 °C, 50.67 dk, %64.65 ultrasonik güç ve istenirlik değeri 0.919 olarak belirlenmiştir. Ancak deneylerde kullanılan ultrasonik su banyosunun güç ayarı %40, 70 ve 100 olarak değiştiği için bu aşamadan sonra diğer parametrelerin etkisini incelemek için deneyler 62.64 °C, 50.67 dk, %70 ultrasonik güç sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyon çalışmasında ultrasonik gücün, toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve EC_{50} değeri üzerinde dikkate değer bir etki oluşturmamasının sebebi; ekstraksiyonun gerçekleştirildiği shot şişelerinin çeper kalınlığından ve ultrasonik güce dirençli cam malzemeden yapılmış olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çalışmada ultrasonik gücün etkisini gözlemleyebilmek için ultrasonik güce daha az dirençli ekstraksiyon şişelerinin ve ultrasonik gücü daha yüksek bir su banyosunun veya ultrasonik probe sistemininin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.7. Ultrason destekli ekstraksiyonda, (A) sabit ultrasonik güçte (% 64.65), (B) sabit ekstraksiyon süresinde (50.67 dk), (C) sabit ekstraksiyon sıcaklığında (62.94 °C) istenirlik değeri için yanıt yüzey grafiği

4.2. Optimize Şartlarda ve Sabit Çözücü Miktarında Araştırılan Parametrelere Çözücü Konsantrasyonunun Etkisi

Çözücü konsantrasyonunun etkisini gözlemleyebilmek için optimize şartlarda çözücü miktarı (40 mL) sabit tutularak 2 gr kurutulmuş yaprak üzerine etanolün %20, 40, 60 ve 80 sulu çözeltileri ve saf su (%0) ilave edilerek deney gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi etil alkol konsantrasyonu bakımından gruplar arasındaki farklılık $P<0.01$ düzeyinde çok önemli bulunmuştur. Yüksek konsantrasyonlarda (%60 ve 80) etil alkol çözeltileriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonlar arasında toplam fenolik madde miktarı açısından istatistiksel olarak fark olmadığı, düşük konsantrasyon değerleri arasında ise istatistiksel olarak fark olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Şekil 4.8 incelendiğinde ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarının, %60 etil alkol konsantrasyonuna kadar arttığı, %80 etil alkol uygulamasında ise istatistiksel olarak önemli olmamakla birlikte azaldığı görülmektedir. Bu durumun protein denatürasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Çözünür fenolik maddeler hücre kofullarında bulunmakta iken; çözünmeyen fenolik maddeler olan flavonoidler ve lignin genellikle hücre zarında protein ve polisakkaritlere bağlı olarak bulunmaktadırlar (Yang ve ark., 2010). Bu varsayıma göre; düşük etanol konsantrasyonu ile çözünen ve çözünmeyen fenoliklerin ekstrakte edilmesi mümkün iken; yüksek etanol konsantrasyonlarında çözünmeyen fenoliklerin bağlı halde bulunduğu protein yapıda denatürasyon oluşmasından kaynaklı ekstrakte edilebilen fenolik madde miktarı azalmaktadır (Dahmoune ve ark., 2015). Benzer sonuçlar, çeşitli araştırıcılar (Japón-Lujan ve ark., 2006; Stamatopoulos, 2013; Xie ve ark., 2015) tarafından da bildirilmiştir. En düşük toplam fenolik madde miktarının (27.24 mg GAE/ g kuru yaprak) su ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu elde edildiği görülmektedir (Çizelge 4.7). Fenolik bileşiklerin büyük çoğunluğu polar özellikte olmaları nedeniyle polar çözücülerde daha çok çözünmektedirler. Ancak su polar bir çözücü olmasına rağmen viskozitesinin yüksek olması nedeniyle su ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda iyi verim alınamadığı ve bu bağlamda çözücü ortamın viskozitesinin yükselmesinin ekstraksiyonda kütle transferini azalttığı bildirilmektedir (Şahin ve Şamlı, 2013).

Çizelge 4.6. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonunun değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları

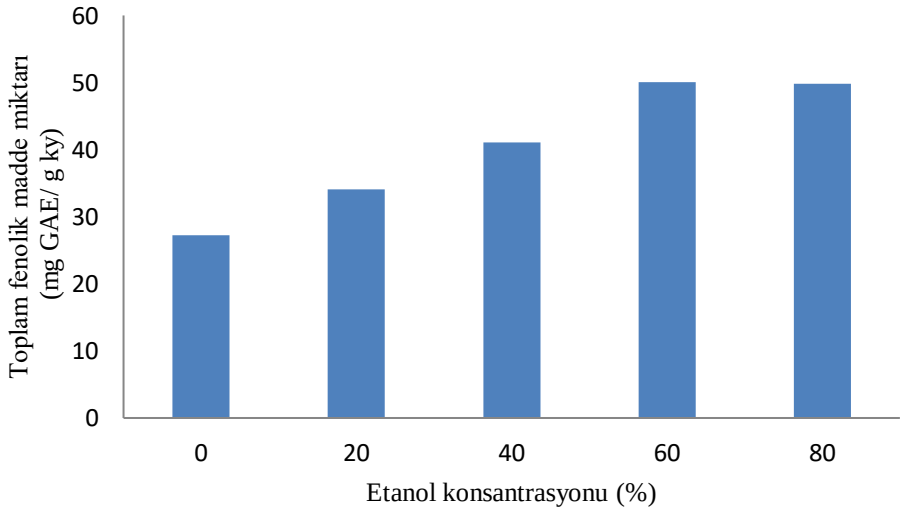
	TFM (mg GAE/g ky)		Ekstraksiyon verimi (%)		EC_{50} (µg/mL)	
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**
Gruplar arası	4	401.06**	4	85.24**	4	2348.431**
Grup içi	15	1.0**	25	0.181**	15	3.682**

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, **: P<0.01 düzeyde önemli

Çizelge 4.7. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Etil alkol konsantrasyonu (%)	TFM (mg GAE/g ky)	Ekstraksiyon Verimi (%)	EC_{50} (µg/mL)
0	27.24 ± 0.28^{a}	20.07 ± 0.13^{a}	154.45 ± 1.11^{d}
20	34.06 ± 0.17^{b}	21.51 ± 0.33^{b}	104.42 ± 0.95^{c}
40	41.04 ± 0.91^{c}	22.56 ± 0.12^{c}	95.09 ± 0.13^{b}
60	50.03 ± 0.33^{d}	27.09 ± 0.04^{d}	73.81 ± 1.66^{a}
80	49.84 ± 0.46^{d}	29.30 ± 0.11^{e}	68.28 ± 0.47^{a}

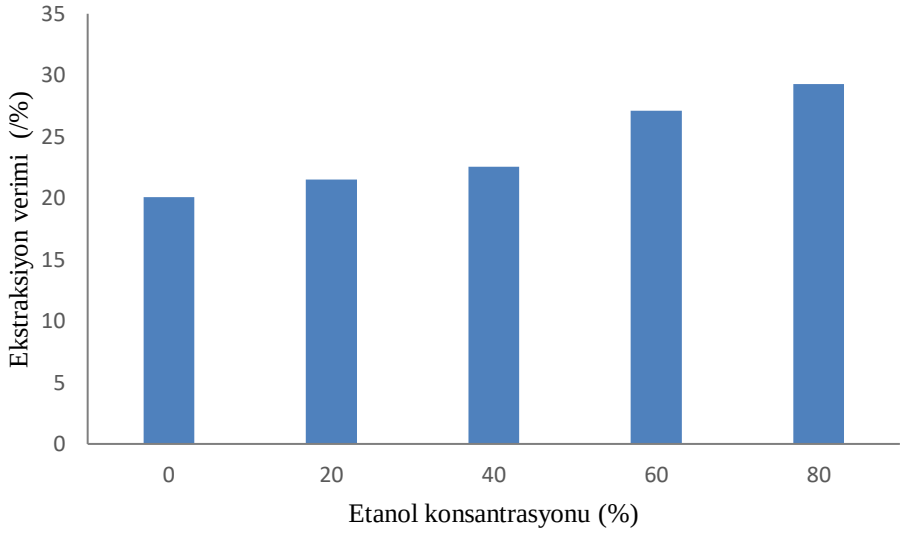
*Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.8. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı toplam fenolik madde miktarının değişimi

Çözücü konsantrasyonu bakımından ekstraksiyon verimine ait ortalamalar arasındaki farklılık P<0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.6). Şekil 4.9 incelendiğinde etanol konsantrasyonunun yükselmesi sonucu ektraksiyon veriminin arttığı görülmektedir. Toplam fenolik madde miktarından farklı olarak ekstraksiyon veriminin etanol konsantrasyonu arttıkça sürekli olarak artması; ekstrakte edilebilen

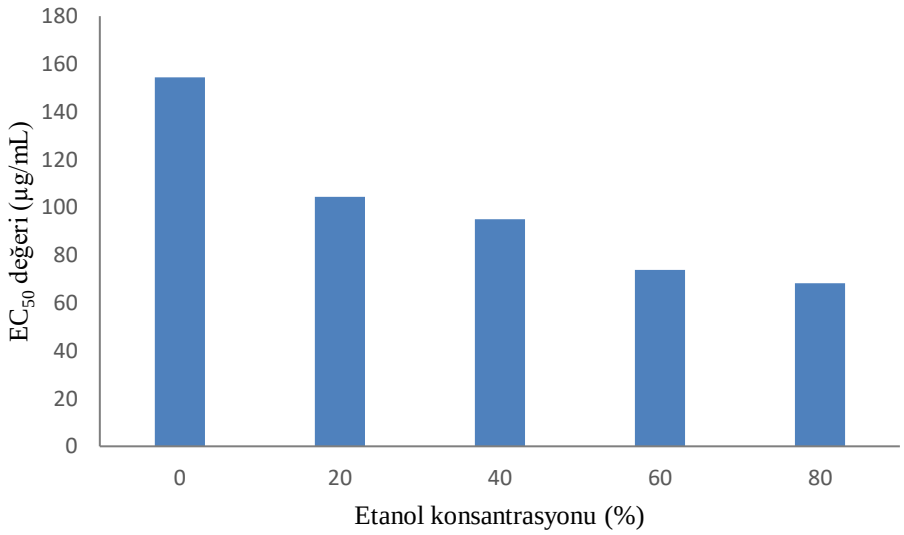
bileşiklerin hepsinin fenolik bileşik grubunda yer almadığını göstermektedir. En düşük ekstraksiyon verimi saf su (%20.07) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda, en yüksek ekstraksiyon verimi ise %80'lik etanol çözeltisi (%29.30) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Garcia-Salas ve ark. (2010) ultrason destekli ekstraksiyon ile %6-35 ekstraksiyon verimi sağlanabileceğini bildirmektedirler. Bu bağlamda çalışmada elde edilen ekstraksiyon verimi sonuçlarının literatürle uyumlu olduğu görülmektedir.



Şekil 4.9. Optimize şartlarda ve sabit çözücü konsantrasyonunda çözücü konsantrasyona bağlı olarak ekstraksiyon veriminin değişimi

Çözücü konsantrasyonu açısından ortalama EC_{50} değerleri arasındaki farklılık çok önemli ($P<0.01$) bulunmuştur (Çizelge 4.6). Şekil 4.10 incelediğinde etanol konsantrasyonu arttıkça ekstraktların antioksidan kapasitesini ifade eden EC_{50} değerinin azaldığı görülmektedir. En yüksek EC_{50} değeri saf su (154.45 µg/mL) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda, en düşük EC_{50} değeri ise %80 etil alkol (68.28 µg/mL) ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.7). DPPH radikalinin %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyonu ifade eden EC_{50} değeri ne kadar düşük olursa antioksidan kapasitenin de o kadar yüksek olduğu bilinmektedir. Ekstraksiyon verimi ve toplam fenolik madde miktarı arttıkça EC_{50} değerinin azalması beklenmektedir. Bu bağlamda çalışmada elde edilen sonuçlar ekstraksiyon verimi değerleriyle uyumlu iken toplam fenolik madde miktarı ile %60'lık etanol konsantrasyonuna kadar benzerlik göstermektedir. Çizelge 4.7'de %60 ve 80 etil alkol

çözeltileriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonla elde edilen ekstraktların EC_{50} değerleri arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ($P>0.05$), düşük konsantrasyon değerleri (%20, 40 ve 60) arasında ise istatistiksel olarak fark olduğu ($P<0.01$) görülmektedir. %60 etanol ile %80 etanol çözeltisi kullanılarak elde edilen ekstraktların EC_{50} değerlerinin birbirine çok yakın değerler (73.81 ve 68.28 µg/mL) olduğu görülmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlara benzer olarak Şahin ve Şamlı (2013) zeytin yapraklarından fenolik madde optimizasyonunda etanol konsantrasyonu %0-50 arasında arttıkça ekstraktların antioksidan kapasitesinin hızla, etanol konsantrasyonu %50-100 arasında arttıkça ekstraktların antioksidan kapasitesinin daha yavaş arttığını bildirmişlerdir. Çalışmada elde edilen EC_{50} değerlerinden farklı olarak Radojkovic ve ark (2012) siyah dut yapraklarından elde ettikleri ekstraktların optimizasyonunda en yüksek antioksidan kapasite (EC_{50}) değerine %60 etanol çözeltisi ile gerçekleştirdikleri ekstraksiyonda ulaştıklarını bildirmişlerdir. Do ve ark. (2014) çözücü konsantrasyonunun *Limnophila aromatica* bitki ekstraktının antioksidan kapasitesi (EC_{50}), toplam fenolik madde ve flavonoid madde miktarı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, etanolün %50, 75 ve 100 konsantrasyonu ile ekstraksiyon işlemini gerçekleştirmişlerdir. Araştırıcılar en yüksek antioksidan kapasiteye %100 etanol ekstraksiyonunda (EC_{50}: 70.06 µg/mL) ulaştıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada çözücü konsantrasyonu arttıkça antioksidan kapasiteyle birlikte toplam fenolik madde ve flavonoid madde miktarı ile ekstraksiyon veriminin de arttığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.10. Optimize şartlarda ve sabit çözücü miktarında çözücü konsantrasyonuna bağlı olarak EC_{50} değeri değişimi

İstatistiksel açıdan çözücü konsantrasyonunun araştırılan parametreler üzerindeki etkisi bir arada değerlendirildiğinde, çözücü sarfiyatını en aza indirgeyerek ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi amacıyla bundan sonraki aşamalarda çözücü konsantrasyonu için en uygun oranın %60 olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda elde edilen veriler çalışmanın başlangıcında gerçekleştirilen optimizasyon aşamasında literatür bilgilerine göre karar verilen çözücü konsantrasyonunu doğrular niteliktedir.

4.3. Optimize Şartlarda ve Sabit Çözücü Konsantrasyonunda Araştırılan Parametrelere Çözücü Miktarının Etkisi

Çözücü miktarının araştırılan parametrelere etkisini gözlemleyebilmek için optimize şartlarda etanol konsantrasyonu (%60) sabit tutularak 2 gr kurutulmuş yaprak üzerine 40, 70 ve 100 mL olmak üzere 3 farklı miktarda çözücü ilave edilerek ekstraksiyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çözücü miktarı bakımından ortalama toplam fenolik madde miktarları arasındaki farklılık istatatistiksel olarak $P<0.01$ düzeyinde çok önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Şekil 4.11 incelendiğinde artan çözücü miktarına bağlı olarak elde edilen ekstrakt bileşiminde toplam fenolik madde miktarının arttığı görülmektedir. En yüksek toplam fenolik madde miktarına 100 mL çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda (65.91 mg GAE/g kuru yaprak) en düşük toplam fenolik madde miktarına ise 40 mL çözücü kullanılarak

gerçekleştirilen ekstraksiyonda (52.30 mg GAE/g kuru yaprak) ulaşılmıştır (Çizelge 4.9). İlbay ve ark. (2014), zeytin yapraklarından ultrason destekli ekstraksiyonda katı madde: çözücü oranı (500:10, 500:15, 500:20 mg/mL), pH (3, 7 ve 11), sıcaklık (30, 45 ve 60 °C) ve süre (20, 40 ve 60 dk) olmak üzere 4 farklı bağımsız değişkenin toplam fenolik madde miktarı üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada optimum katı madde: çözücü oranını 500 mg / 19.78 mL olarak belirlemiştir. Luo (2011), katı madde: çözücü oranı (20:1 ve 30:1 (w/w)), sıcaklık (20 ve 40 °C) ve etanol konsantrasyonu (%60, 70 ve 80) olmak üzere 3 farklı bağımsız değişkenin zeytin yaprağı ekstraksiyonunda toplam fenolik madde ve oleuropein miktarı üzerindeki etkisini yanıt yüzey yöntemini kullanarak incelemiştir. Araştırıcı katı madde: çözücü miktarının toplam fenolik madde ve oleuropein miktarı üzerinde istatistiksel olarak $P<0.05$ düzeyde önemli etkisinin olduğunu ve katı madde oranı sabit tutularak çözücü miktarının arttırılmasının ekstraksiyonda toplam fenolik madde ve oleuropein miktarını arttırdığını bildirmiştir. Şamlı ve Şahin (2013) katı madde: çözücü oranı (500:10, 500:15 ve 500:20 mg/mL), süre (20, 40 ve 60 dk) ve etanol konsatrasyonu (%0, 50 ve 100) olmak üzere 3 farklı bağımsız değişkenin zeytin yaprağı ekstraksiyonunda toplam fenolik madde, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitesi üzerindeki etkisini yanıt yüzey yöntemini kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada optimum katı madde: çözücü oranını 500:10 mg/mL olarak belirlemişlerdir. Araştırıcılar katı madde: çözücü oranının artmasıyla toplam fenolik madde ve ekstraksiyon veriminin de arttığını, ancak antioksidan kapasitenin ise değişmediğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.8. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarı değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları

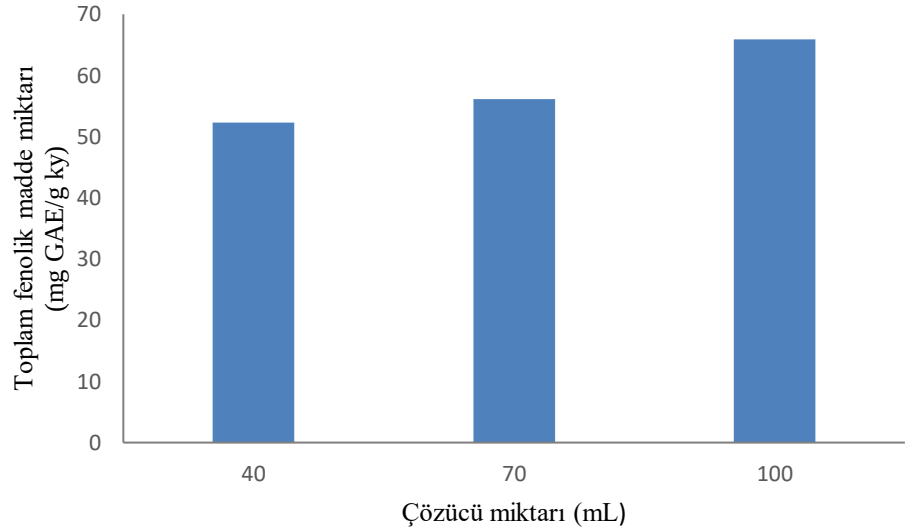
	TFM (mg GAE/g ky)		Ekstraksiyon verimi (%)		EC_{50} (µg/mL)	
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**
Gruplar arası	2	196.68**	2	16.90**	2	527.59**
Grup içi	9	2.12**	15	0.89**	3	0.055**

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, TFM: Toplam fenolik madde, **: $P<0.01$ düzeyinde önemli

Çizelge 4.9. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

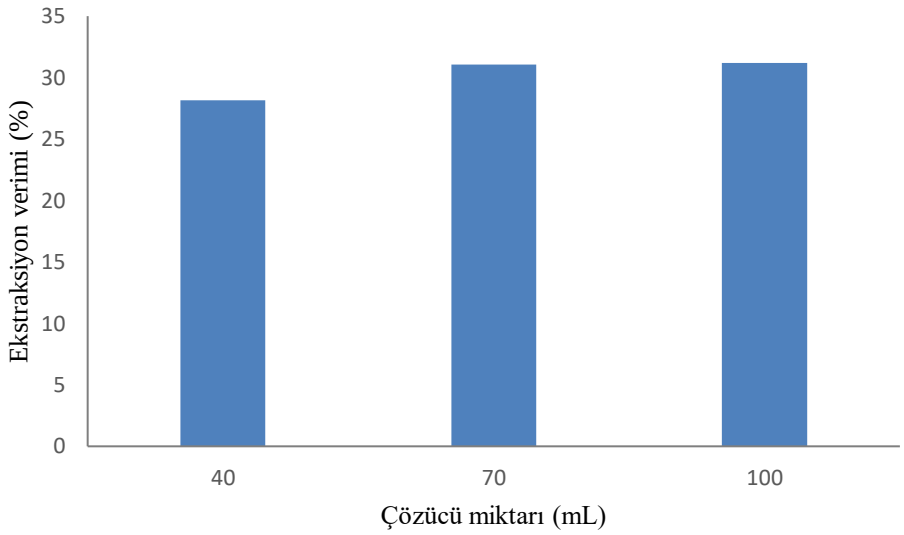
Çözücü miktarı (mL)	TFM (mg GAE/g ky)	Ekstraksiyon verimi (%)	EC_{50} (µg/mL)
40	52.30 ± 0.37^{a}	28.14 ± 0.10^{a}	102.62 ± 0.06^{c}
70	56.17 ± 0.61^{b}	31.06 ± 0.11^{b}	80.98 ± 0.03^{b}
100	69.91 ± 1.04^{c}	31.19 ± 0.27^{c}	70.82 ± 0.28^{a}

*Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde önemlidir.



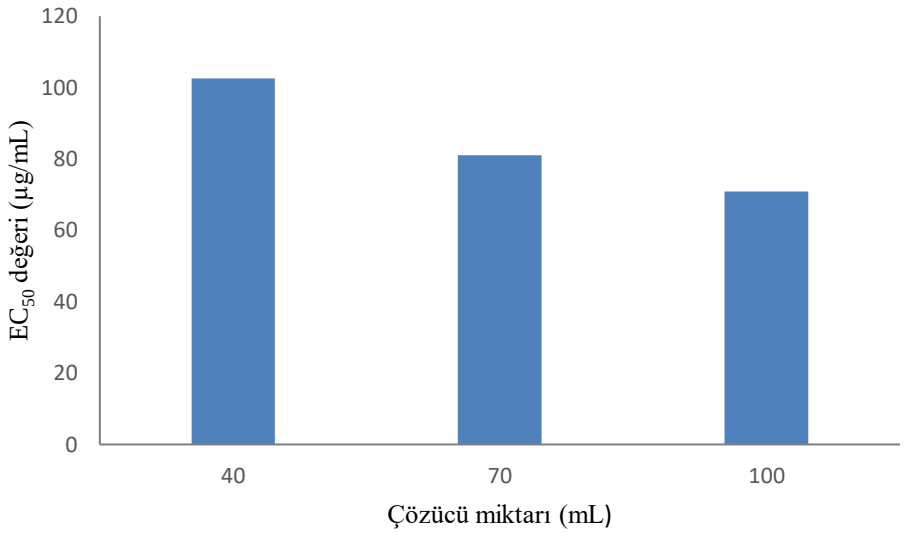
Şekil 4.11. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının değişimi

Çözücü miktarı bakımından ekstraksiyon verimine ait ortalamalar arasındaki farklılık P<0.01 düzeyinde çok önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Toplam fenolik madde miktarına benzer şekilde artan çözücü miktarına bağlı olarak ekstraksiyon veriminin arttığı görülmektedir (Şekil 4.12). Ancak 100 mL çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyonda 70 mL çözücü kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyona oranla daha yüksek toplam fenolik madde miktarı tespit edilirken; 70 mL ile 100 mL çözücü kullanılarak elde edilen ekstraktlarda ekstraksiyon verimlerinin birbirlerine yakın değerler olması ekstrakte edilen bileşiklerin tümünün fenolik bileşik grubunda yer almadığını göstermektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlara benzer şekilde Şamlı ve Şahin (2013), optimum şartlarda gerçekleştirilen ultrasonik destekli ekstraksiyon ile 201.22 mg ekstrakt/g kuru yaprak ekstraksiyon verimini elde ettiklerini bildirmişlerdir.



Şekil 4.12. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak ekstraksiyon verimi değişimi

Çözücü miktarı açısından ortalama EC_{50} değerleri arasındaki farklılık $P<0.01$ düzeyinde çok önemli bulunmuştur (Çizelge 4.8). Şekil 4.13 incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı ile uyumlu bir şekilde artan çözücü miktarıyla birlikte ekstraktların antioksidan kapasitesini gösteren EC_{50} değerinin de azaldığı görülmektedir. En yüksek EC_{50} değeri 102.62 µg/mL olarak 40 mL çözücü ilavesiyle gerçekleştirilen ekstraksiyonda, en düşük EC_{50} değeri 70.82 µg/mL olarak 100 mL çözücü ilavesiyle gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara benzer olarak, Radojkovic ve ark (2012), çözücü: katı madde oranı arttıkça antioksidan aktivitenin arttığını, elde ettikleri grafiklerden EC_{50} değerinin düşük çözücü miktarı:katı madde oranı değerleri (10-20 mL/g) arasında azaldığı, yüksek çözücü miktarı:katı madde oranı değerleri (20-30 mL/g) arasında ise çok değişmediği görülmektedir.



Şekil 4.13. Optimize şartlarda ve sabit etanol konsantrasyonunda çözücü miktarına bağlı olarak EC_{50} değerinin değişimi

Her ne kadar 100 mL çözücü miktarıyla araştırılan parametreler için en iyi sonuçlar elde edilmiş olsa da çözücü sarfiyatını en aza indirgeyerek ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi için bundan sonraki aşamalarda katı madde oranı sabit (2 g) tutularak 40 mL çözücü kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

4.4. Optimize Şartlarda Sabit Çözücü Miktarı ve Etanol Konsantrasyonunda Araştırılan Parametrelere Yaprak Çeşidi ve Kurutma İşleminin Etkisi

Yaprak çeşidi ve kurutmanın etkisini gözlemleyebilmek için optimize şartlarda ve çözücü miktarı (40 mL) ile etanol konsantrasyonu (%60) sabit tutularak Gemlik, Ayvalık ve Halhalı zeytin yapraklarının yaş ve kurutulmuş örnekleri kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15 incelendiğinde kurutulmuş yaprak ekstraksiyonunda yaş yaprak ile gerçekleştirilen ekstraksiyona göre daha yüksek toplam fenolik madde, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasite gösteren ekstraktlar elde edildiği görülmektedir. Nitekim bitkisel materyallerden fenolik bileşiklerin ekstraksiyonundan önce bitkisel materyalin fenolik bileşiklere zarar vermeyecek düzeyde kurutma işlemine tabi tutulması önerilmektedir. Çünkü kurutma ile fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimini azaltan bitkisel dokudaki su uzaklaşmakta ve çözücünün bitkisel dokuya nüfuzu kolaylaşmaktadır (Boudhrioua ve ark., 2009; Erbay ve İçier, 2009).

Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11 incelendiğinde toplam fenolik madde miktarı sonuçlarına göre kuru ve yaş yaprak çeşidi grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak P<0.01 düzeyinde çok önemli olduğu görülmektedir. Şekil 4.14 ve Çizelge 4.12 incelendiğinde, toplam fenolik madde içeriklerinin kurutulmuş örneklerde sırasıyla Ayvalık>Gemlik>Halhalı, yaş örneklerde ise Ayvalık>Halhalı>Gemlik olarak değiştiği görülmektedir. Kurutulmuş ve yaş örnekler arasında sıralamadaki bu farklılığın başta yaprakların nem içerikleri olmak üzere, yaprakların yetiştiği ağacın türünden, yetişme koşullarından, iklim şartları vb. pek çok faktörden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlardan farklı olarak Bahloul ve ark. (2009) dört farklı zeytin yaprağı çeşidi kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada, zeytin yaprağının yaş halde ekstraksiyonu sonucu elde ettikleri toplam fenolik madde miktarının kurutma işleminin ardından azaldığını bildirmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar zeytin yaprağına uygulanan kurutma sıcaklığı ve süresindeki artışa paralel olarak kurutma hızındaki azalışın, elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarında azalışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.10. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda yaş yaprak çeşidi değişimine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait varyans analiz sonuçları

	TFM (mg GAE/g ky)		**Ekstraksiyon verimi (%)**		**EC_{50} (µg/mL)**	
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**
Gruplar arası	2	129.07**	2	36.72**	2	1074.80**
Grup içi	9	0.36**	15	0.41**	3	2.09**

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, TFM: Toplam fenolik madde, **: P<0.01 düzeyde önemli

Çizelge 4.11. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru yaprak çeşidi değişimine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarı varyans analiz sonuçları

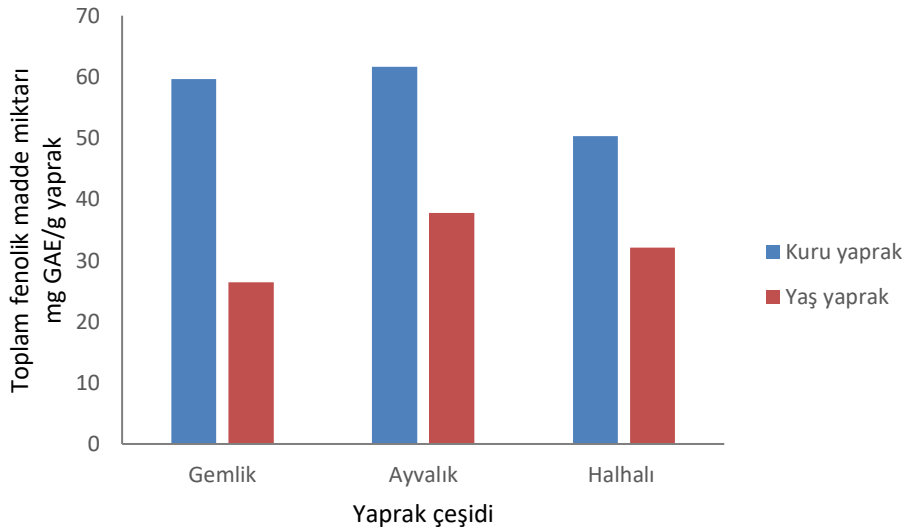
	TFM (mg GAE/g ky)		**Ekstraksiyon verimi (%)**		**EC_{50} (µg/mL)**	
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**
Gruplar arası	2	146.07**	2	27.67**	2	31.18**
Grup içi	9	0.42**	15	0.13**	3	0.12**

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, **: P<0.01 düzeyde önemli

Çizelge 4.12. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda yaprak çeşidi ve kurutma işleminin etkisine bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

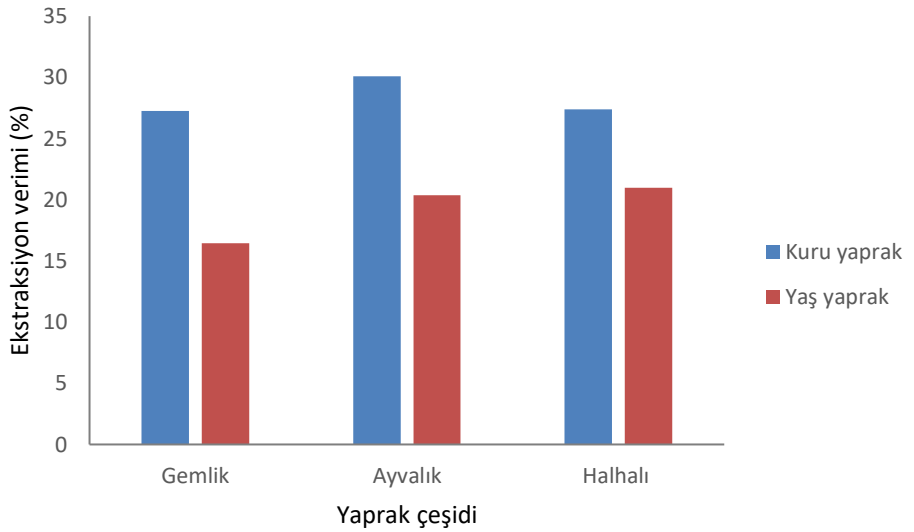
Yaprak çeşidi	TFM (mg GAE/g ky)	Ekstraksiyon verimi (%)	EC_{50} (µg/mL)
Yaş Yaprak			
Gemlik	26.42 ± 0.30[a]	16.42 ± 0.34[a]	185.88 ± 1.35[c]
Ayvalık	37.78 ± 0.24[c]	20.39 ± 0.19[b]	140.07 ± 1.82[a]
Halhalı	32.05 ± 0.35[b]	20.97 ± 0.51[b]	169.16 ± 1.07[b]
Kuru Yaprak			
Gemlik	59.65 ± 0.38[b]	27.24 ± 0.08[a]	78.94 ± 0.51[c]
Ayvalık	61.62 ± 0. 82[c]	30.10 ± 0.07[b]	72.45 ± 0.07[b]
Halhalı	50.31 ± 0. 65[a]	27.40 ± 0.19[a]	71.80 ± 0.31[a]

*Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak P<0.05 düzeyinde önemlidir.



Şekil 4.14. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak toplam fenolik madde miktarının değişimi

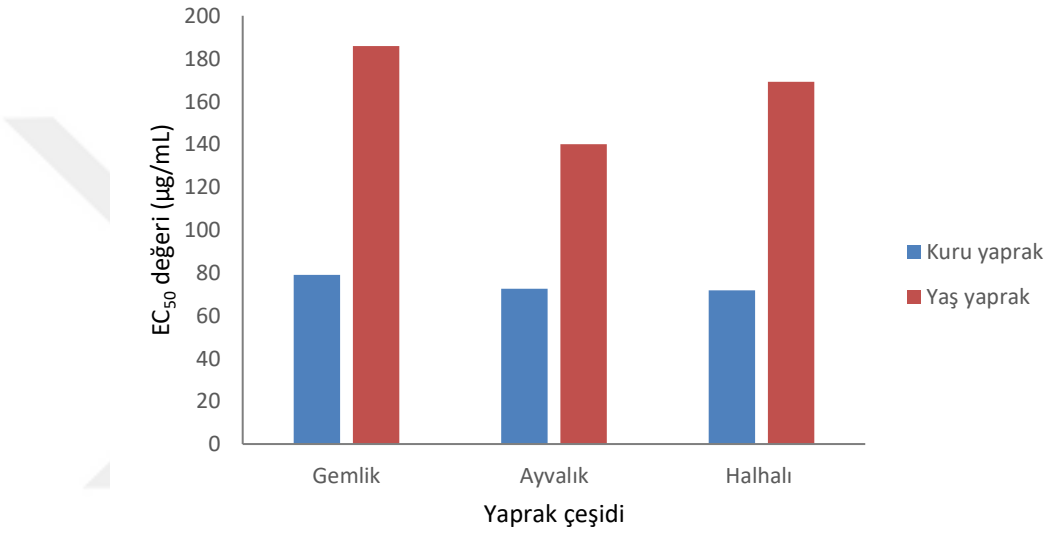
Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11 incelendiğinde ekstraksiyon verimi sonuçlarına göre kuru ve yaş yaprak çeşidi grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli (P<0.01) olduğu görülmektedir. Kurutulmuş yaprakta Gemlik ve Halhalı, yaş yaprakta ise Ayvalık ve Halhalı arasında istatistiksel olarak fark olmadığı (P>0.05), diğerleri arasında ise istatistiksel olarak farkın önemli olduğu (P<0.05) tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Ekstraksiyon verimi sonuçlarının kurutulmuş örneklerde sırasıyla Gemlik<Halhalı<Ayvalık, yaş örneklerde ise Gemlik<Ayvalık<Halhalı olarak değiştiği görülmektedir (Şekil 4.15). Ekstraksiyon verimi sonuçları arasındaki bu farklılığın yapraklarının nem içeriği, ağaç türü, yaşı, iklim ve toprak koşulları gibi pek çok faktörden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4.15. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak ekstraksiyon veriminin değişimi

Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11 incelendiğinde EC_{50} sonuçlarına göre kuru ve yaş yaprak çeşidi grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($P<0.01$) olduğu görülmektedir. EC_{50} değeri açısından Ayvalık ve Halhalı kurutulmuş yaprakları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı ($P>0.05$), diğerleri arasında ise istatistiksel olarak farkın önemli olduğu ($P<0.05$) tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). Şekil 4.16 incelendiğinde EC_{50} değerinin sırasıyla kurutulmuş yaprakta Halhalı<Ayvalık<Gemlik, yaş yaprakta ise Ayvalık< Halhalı < Gemlik olduğu görülmektedir. Yaprak çeşidi açısından incelendiğinde EC_{50} değerlerinin toplam fenolik madde sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmektedir. Literatür çalışmaları incelendiğinde çeşitli yöntemlerle elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının EC_{50} değerlerinin geniş bir skalada değiştiği görülmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar ile benzer şekilde Bahloul ve ark. (2009) dört farklı zeytin yaprağı çeşidinden yaş halde ve farklı sıcaklık ve sürelerde kurutma sonrası elde ettikleri zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin (EC_{50}) en düşük 39.40 µg/mL, en yüksek 179.40 µg/mL olduğunu bildirmişlerdir. Xynos ve ark. (2014) basınçlı sıvı ekstraksiyon yöntemiyle elde ettikleri zeytin yaprağı ekstraktlarının optimizasyon çalışmasında en düşük EC_{50} değerini 105.6 µg/mL, en yüksek EC_{50} değerini ise 167.6 µg/mL olarak bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlardan farklı olarak Salah ve ark. (2012) 1:20 (g/mL) katı madde:çözücü oranı ile %70'lik etanolde 1 hafta boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekleterek hazırlamış oldukları Tunus'ta yetişen

8 farklı zeytin yaprağı çeşidi ekstraktlarının antioksidan kapasitelerini incelemişlerdir. Araştırıcılar, ekstraktların antioksidan kapasite (EC_{50}) değerlerinin en düşük 7.9 µg/mL, en yüksek 16.1 µg/mL olduğunu bildirmişlerdir. Harp ve Keçeli Mutlu (2011) Gemlik, Domat, Adana Topağı ve Adana Yerli zeytin yapraklarını kullanarak %78'lik etanol çözeltisinde 24 saatlik ekstraksiyon sonunda, ekstraktların antioksidan kapasitelerinin (EC_{50}) en düşük 0.97 µg/mL en yüksek 1.57 µg/mL olduğunu bildirmektedirler.



Şekil 4.16. Optimize şartlarda sabit çözücü miktarı ve etanol konsantrasyonunda kuru ve yaş yaprak değişimine bağlı olarak EC_{50} değerinin değişimi

4.5. Zeytin Yaprağı Ekstraktının Bazı Ticari Antioksidan Maddelerle Karşılaştırılması

Çalışma bütün olarak ele alındığında en yüksek antioksidan kapasitenin optimize şartlarda (62.64 °C, 50.67 dk, %70 ultrasonik güç), çözücü miktarı 40 mL ve %60 etanol konsantrasyonu sabit tutularak, kurutulmuş Halhalı zeytin yaprağı kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon sonrasında elde edildiği görülmektedir. Çizelge 4.13'de bu sonuç ile piyasadan temin edilen ticari zeytin yaprağı ekstraktının, gıdalarda doğal antioksidan olarak kullanılan α-tokoferol ve yapay antioksidan olarak kullanılan BHT'nin EC_{50} değerleri görülmektedir.

Çizelge 4.13. Deneme zeytin yaprağı ekstraktları ile bazı ticari antioksidan maddelere ait EC_{50} değerleri

Ürün	EC_{50} değeri (µg /mL)
Zeytin yaprağı ekstraktı	
- Gemlik	78.94 ± 0.51
- Ayvalık	72.45 ± 0.07
- Halhalı	71.80 ± 0.31
Ticari zeytin yaprağı ekstraktı	71.95 ± 2.72
BHT	27.33 ± 1.05
α-tokoferol	302.52 ± 3.39

Çizelge 4.13 incelendiğinde bu çalışmada elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan kapasitesinin piyasadan temin edilen zeytin yaprağı ekstraktına yakın, α-tokoferolden çok yüksek, BHT'den ise çok daha düşük antioksidan kapasite gösterdiği görülmektedir. Bu bağlamda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının ticari anlamda kullanılabilir olduğu ancak gıda katkı maddesi olarak kullanılabilmesi için ileri düzeyde bilimsel çalışmaların yapılması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Salah ve ark. (2012) Tunus'ta yetişen 8 farklı zeytin yaprağı çeşidinden elde ettikleri ekstraktların bir çeşit haricinde (Chemlali, EC_{50}: 7.9 µg/mL) antioksidan kapasitelerinin BHT'nin antioksidan kapasitesinden (EC_{50}: 17.02 µg/mL) daha düşük olduğunu bildirmektedirler. Harp ve Keçeli Mutlu (2011) Gemlik, Domat, Adana Topağı ve Adana Yerli zeytin yapraklarını kullanarak %78'lik etanol çözeltisinde 24 saatlik ekstraksiyon sonucu elde ettikleri ekstraktların antioksidan kapasitelerinin ticari zeytin yaprağı ekstraktlarından daha düşük, BHT ve BHA'dan daha yüksek olduğunu bildirmektedirler.

4.6. Ekstraksiyon Metodunun Araştırılan Parametrelere Etkisi

Ekstraksiyon yöntemi bakımından ortalama toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve EC_{50} değeri arasındaki farklılık istatatistiksel olarak $P<0.01$ düzeyinde çok önemli bulunmuştur (Çizelge 4.14). İnfüzyon sonrası elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitesinin diğer iki yönteme göre çok daha düşük olduğu görülmektedir (Çizelge 4.15). Bu durumun en önemli sebebinin infüzyon metodunda çözücü olarak su kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim ultrason destekli ekstraksiyonda etanol konsantrasyonun etkisi incelenirken de etanol içeren

çözücülerle elde edilen ekstraktların saf su ile gerçekleştirilen ekstraktlardan daha yüksek fenolik madde miktarına, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir. Oda şartlarında 24 saat süreyle gerçekleştirilen konvansiyonel ekstraksiyon ile ultrason destekli ekstraksiyon sonuçlarının (62.64 °C, 50.67 dk, %70 ultrasonik güç, 2 g kuru Halhalı zeytin yaprağı, %60 etanol ve çözücü miktarı 40 mL) birbirine çok yakın değerler olduğu görülmektedir. Bu durum, ultrasonik gücün etkisiyle ekstraksiyon işleminin çok daha kısa sürede tamamlanabileceğini göstermektedir. Yağcıoğlu (2015), klasik çözücü, ultrason ve mikrodalga destekli ekstraksiyon ile adaçayından antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonunun Yanıt Yüzey Yöntemi ile optimizasyonunu gerçekleştirmiştir. Araştırıcı kullandığı bu üç yöntemden mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi ile en yüksek fenolik ve flavanoid madde miktarına ulaştığını, ultrason destekli ve klasik çözücü ekstraksiyonuna göre mikrodalga destekli ekstraksiyon ile daha iyi sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir. Odabaş (2013) fındık zarından antioksidan bileşiklerin klasik çözücü, soxhelet, ultrason ve mikrodalga destekli, süperkritik akışkan yöntemleri ile ekstraksiyonu sonucu elde ettiği ekstraktları toplam fenolik madde miktarı, FRAP ve EC_{50} değerleri açısından karşılaştırmıştır. Araştırıcı, en yüksek toplam fenolik madde miktarını 20 ˚C, 45 dakika ve %69.12 etil alkol konsantrasyonu şartlarında gerçekleştirilen ultrason destekli ekstraksiyon ile elde ettiğini, en yüksek antioksidan kapasiteye (EC_{50} değeri) ise mikrodalga destekli ekstraksiyon ile ulaştığını bildirmiştir.

Çizelge 4.14. Ekstraksiyon metodunun araştırılan parametrelere etkisi ile ilgili varyans analiz sonuçları

	TFM (mg GAE/g ky)		**Ekstraksiyon verimi (%)**		**EC_{50} (µg/mL)**	
Varyasyon Kaynağı	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**	**SD**	**KO**
Gruplar arası	2	1096.733**	2	793.849**	2	34.834**
Grup içi	9	1.099**	15	0.443**	3	0.024**

SD: Serbestlik derecesi, KO: Kareler ortalaması, TFM: Toplam fenolik madde

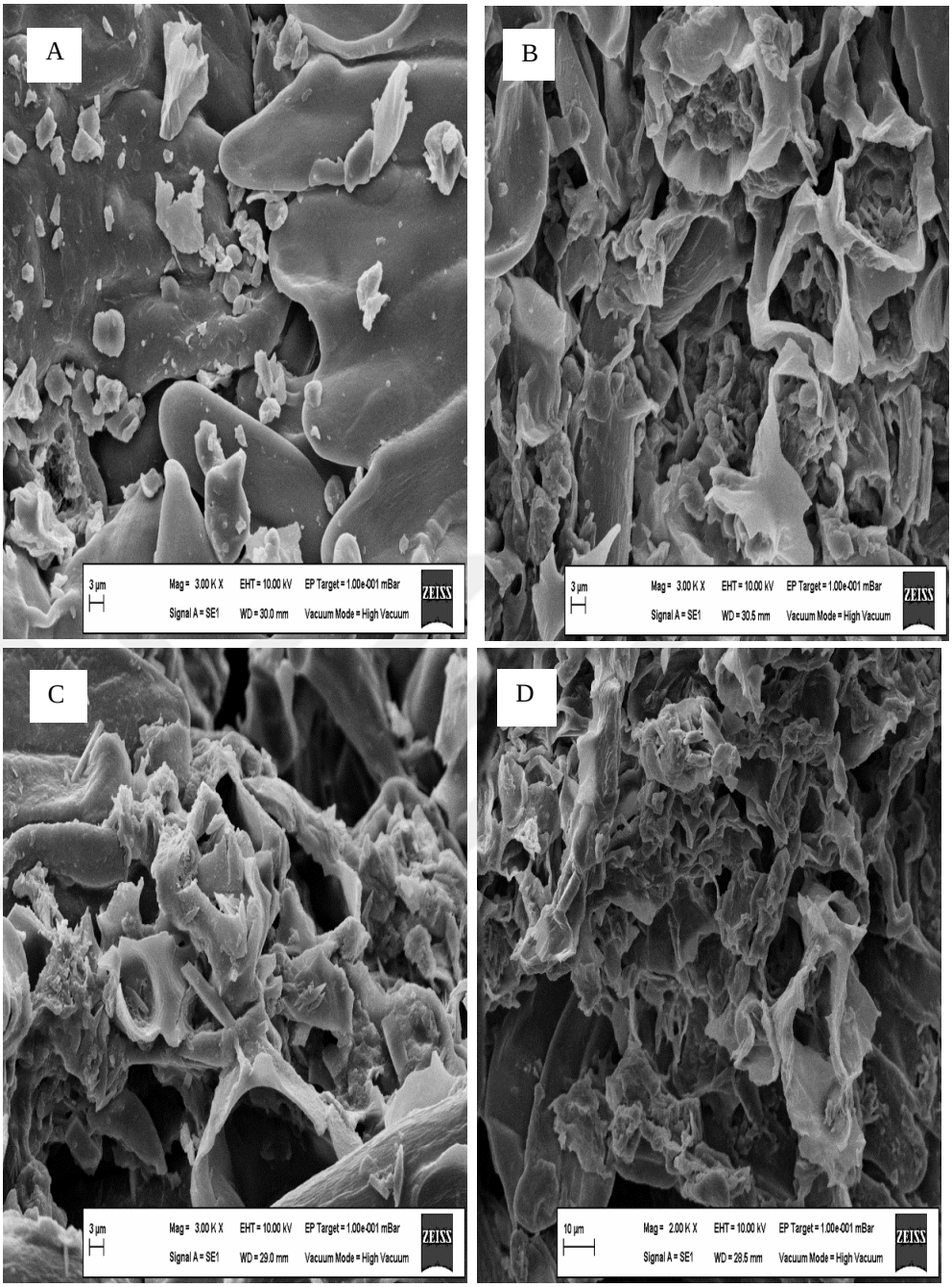
Çizelge 4.15. Ekstraksiyon metoduna bağlı olarak araştırılan parametrelere ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Ekstraksiyon metodu	Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g ky)	Ekstraksiyon verimi (%)	EC_{50} değeri (µg/mL)
İnfüzyon	22.26 ± 1.53^{a}	11.28 ± 0.07^{a}	235.23 ± 5.14^{c}
Konvansiyonel ekstraksiyon	52.59 ± 0.70^{c}	30.34 ± 0.45^{b}	89.24 ± 1.30^{a}
Ultrason destekli ekstraksiyon	48.93 ± 0.69^{b}	31.97 ± 0.10^{c}	92.07 ± 0.60^{b}

*Farklı harfler ile gösterilen ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak $P<0.05$ düzeyinde önemlidir.

4.7. Katı Fazın Taramalı Elektron Mikroskobu ile Analizi

Farklı ekstraksiyon yöntemlerinin hücre duvarı parçalanması üzerindeki etkisini incelemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile ekstraksiyon öncesi ve sonrası katı fazın mikroyapıları incelenmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyon, konvansiyonel ekstraksiyon ve infüzyon yöntemleri ile elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekil 4.17 A'da görüldüğü gibi herhangi bir ekstraksiyon işlemi uygulanmamış zeytin yaprağı örneğinde yüzey görüntüsü sağlam ve pürüzsüzdür. Şekil 4.17 B'de oda sıcaklığında 30 dk'lık infüzyon sonrasında yapıda az da olsa parçalanmalar görülmektedir. Konvansiyonel ekstraksiyon (25 °C, 1 gün, %60 etanol çözeltisi) sonrasında, infüzyon ile elde edilen yapıdaki parçalanmadan daha yüksek oranda parçalanmalar görülmektedir (Şekil 4.17 C). Optimize edilen sonuçlar kullanılarak gerçekleştirilen (60.21 °C, 48.96 dk, %70 ultrasonik güç, 2 g kuru yaprak, 40 mL çözücü ve %60 etanol, kurutulmuş Halhalı zeytin yaprağı) ultrason destekli ekstraksiyon sonrasında ise katı fazdaki parçalanmaların en yüksek düzeyde olduğu görülmektedir (Şekil 4.17 D).



Şekil 4. 17. Taramalı Elektron Mikroskobu görüntüleri A: İşlem görmemiş katı faz, B: İnfüzyon sonrası katı faz, C: Konvansiyonel ekstraksiyon sonrası katı faz, D: Ultrasonik ekstraksiyon sonrası katı faz

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu çalışmada zeytin yapraklarının ultrason destekli ekstraksiyonunun optimizasyonunda sıcaklık, süre ve ultrasonik güç olmak üzere üç farklı bağımsız değişkenin ekstraktların toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve EC_{50} değeri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Çalışmada bağımsız değişkenlere ait optimizasyon verileri kullanılarak çözücü konsantrasyonu ve çözücü miktarı, yaprak çeşidi ve ekstraksiyon yönteminin araştırılan parametreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Ayrıca elde edilen deneme ekstraktlarının antioksidan kapasitesi gıda endüstrisinde kullanılan bazı antioksidan maddeler ve piyasadan temin edilen ticari zeytin yaprağı ekstraktıyla karşılaştırılmıştır.

Cevap değişkeni olarak belirlenen toplam fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimi maksimum, EC_{50} değeri minumum tutularak elde edilen optimum koşullar 62.94 °C, 50.67 dk ve %64.65 ultrasonik güç olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ve ekstraksiyon verimi üzerinde etkili en önemli parametre sıcaklık, ardından süre; EC_{50} değeri üzerinde etkili en önemli parametre ise sıcaklık olarak tespit edilmiştir.

Çözücü konsantrasyonu bakımından en yüksek toplam fenolik madde miktarının %60 etanol konsantrasyonu ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda, en yüksek ekstraksiyon verimi ile en yüksek antioksidan kapasitenin %80 etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edildiği tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarı ve EC_{50} değeri üzerine %60 ve 80 etanol çözeltileriyle gerçekleştirilen ekstraksiyonda istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde çözücülerin maliyeti, geri kazanımı ve toksik etkileri göz önünde bulundurulduğunda %60 etanol konsantrasyonu ile çalışmanın daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

Çözücü miktarının etkisi incelendiğinde en yüksek toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitenin 100 mL etanol kullanılarak

gerçekleştirilen ekstraksiyonda elde edildiği tespit edilmiştir. Çözücü miktarının artışına bağlı olarak ekstraksiyon işlemi daha maliyetli hale gelmektedir. Ayrıca çözücüler içerisinde etanol her ne kadar düşük toksik özelliğe sahip bir çözücü olsa da, elde edilen ekstraktın gıdalarda kullanılabilmesi veya takviye edici gıda olarak tüketilebilmesi için mutlaka etanolün uzaklaştırılması gerekmektedir. Etanolün uzaklaştırılması da ekstra maliyet oluşturacağı için çalışmada etanol miktarını arttırmak yerine katı madde oranını arttırmanın daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır.

Ekstraksiyon yöntemi açısından en yüksek toplam fenolik madde miktarına ve en yüksek antioksidan kapasite sonucuna oda sıcaklığında 24 saatlik konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi ile, en yüksek ekstraksiyon verimine 62.94 °C sıcaklıkta, %70 ultrasonik güç ve 50.67 dk süre sonunda gerçekleştirilen ekstraksiyon ile (ultrason destekli ekstraksiyon) ulaşılmıştır. En düşük toplam fenolik madde miktarı, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasite sonucu ise infüzyon yönteminde elde edilmiştir. Bu sonuçlar ve katı fazın taramalı elektron mikroskobu analizleri karşılaştırıldığında, ultrason destekli ekstraksiyon ile ekstraksiyon süresinin kısaldığı, ultrason yönteminin konvansiyonel ekstraksiyon yöntemi kadar etkili, demleme (infüzyon) yöntemine göre ise çok daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Ülkemiz yaklaşık 800 bin hektar zeytinlik alanı ve toplam 159 milyonluk zeytin ağacı ile zeytin ve zeytinyağı üretiminde Dünyada ilk sıralarda yer alan bir ülke konumundadır. Zeytin meyveleri sofralık/yağlık olarak değerlendirilmeden önce yapraklarından ayrılmaktadır. Ayrılan bu yapraklar daha çok hayvan yemi olarak tüketilmektedir. Bu çalışmada orijini Güneydoğu Anadolu Bölgesi olan Halhalı zeytin ağacı yapraklarının antioksidan ve fenolik madde içeriği, ülkemizde en çok yetiştirilen zeytin ağaçlarından olan Gemlik ve Ayvalık zeytin ağacı yapraklarıyla kıyaslanmıştır. Ayrıca kuru yaprak kullanılarak elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde, ekstraksiyon verimi ve antioksidan kapasitelerinin yaş yaprak kullanılarak elde edilen ekstraktlara göre daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Deneme zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitelerinin, piyasadan temin edilen zeytin yaprağı

ekstraktına yakın, doğal bir antioksidan α-tokoferolden yüksek ve sentetik bir antioksidan olan BHT'den ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan tüm değerlendirmeler ışığında, elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının ticari anlamda kullanılabilir olduğu, ancak gıda katkı maddesi olarak değerlendirilebilmesi için toksikolojik çalışmalarının yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca elde edilen ekstraktların gıda komponentleri ile etkileşimini, gıdanın raf ömrü ve kalitesi üzerine etkisini gözlemleyebilmek için bir gıda sisteminde denenmesinin bilimsel bir zorunluluk olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

ACAR, J. ve GÖKMEN, V., 2016. Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası. Ed: Saldamlı, İ., Hacettepe Üniversitesi Yayınları. Ankara, 557-591.

AHMAD-QASEM, M. H., CÁNOVAS, J., BARRAJÓN-CATALÁN, E., MICOL, V., CÁRCEL, J. A., GARCÍA-PÉREZ, J. V., 2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 17: 120-129.

ANONİM, 2006. http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-106.pdf. Erişim Tarihi: 26.12.2016.

ANONİM,2016a.http://rapory.tuik.gov.tr/26-12-201618:29:417838378251562941986629935 27.html. Erişim Tarihi:26.12.2016.

ANONİM, 2016b. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize. Erişim Tarihi:26.12.2016.

ANONİM, 2016c. http://www.marmarabirlikakademi.com/ContentImages Erişim Tarihi:26.12.2016.

ANONİM, 2016d. http://zeytindostu.org.tr/zeytin/zeytin-cesitleri. Erişim Tarihi:26.12.2016.

APOSTOLAKIS, A., GRIGORAKIS, S., and MAKRIS, D. P., 2014. Optimisation and comparative kinetics study of polyphenol extraction from olive leaves (Olea europaea) using heated water/glycerol mixtures. Separation and Purification Technology, 128: 89-95.

ARMUTÇU, F., AKYOL, S., HASGÜL, R., ve YIĞITOĞLU, M. R., 2011. Zeytin Yaprağının Biyolojik Etkileri ve Tıpta Kullanımı. Spatula DD, 1(3): 159-65.

BAHLOUL, N., BOUDHRIOUA, N., KOUHILA, M., KECHAOU, N., 2009. Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (Olea europaea L.). International Journal of Food Science & Technology, 44(12): 2561-2567.

BAYDAR, H., 2005. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No:51, Isparta, 288s.

BENAVENTE-GARCÍA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUNO, A., DEL RIO, J. A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. Food Chemistry, 68(4): 457-462.

BİLEK, S.E., 2010. The effects of time, temperature, solvent: solid ratio and solvent composition on extraction of total phenolic compound from dried olive (olea europaea l.) leaves. GIDA, 35 (6): 411-416.

BISIGNANO, G., TOMAINO, A., CASCIO, R. L., CRISAFI, G., UCCELLA, N. and SAIJA, A. 1999. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 51(8): 971-974.

BOUDHRIOUA, N., BAHLOUL N., SLIMEN, I.B, AND KECHAOU, N., 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. Industrial Crops and Products, 29(2): 412-419.

BRAHMI, F., MECHRI, B., DABBOU, S., DHIBI, M., HAMMAMI, M., 2012. The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. Industrial Crops and Products 38: 146–152.

BRAVO, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews, 56(11): 317–333.

BÜYÜKTUNCEL, E., 2012. Gelişmiş Ekstraksiyon Teknikleri I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi, 32(2): 209-242.

CEBE, G.E., KONYALIOĞLU, S., ZEYBEK, U., 2012. Olea europaea var. europaea (Zeytin) Yaprak İnfüzyonunun Antioksidan Etkisi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49 (3): 209-212.

CEMEROĞLU, B., 1992. Meyve ve sebze işleme endüstrisinde temel analiz metotları. Biltav Yayınları, Ankara, 338-351.

CHEN, W, WANG, W.P., ZHANG, H.S., HUANG, Q., 2012. Optimization of ultrasonic assited extraction of water soluble polysaccharides from Boletus edulis mycelia using response surface methodology. Carbonhydrate Polymers, 87 (1): 614-619.

CROWELL, B., 2002. Light and Matter physics series, Vibrations and Waves, 3: 107.

DAHMOUNE, F., NAYAK, B., MOUSSI, K., REMINI, H., & MADANI, K., 2015. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from Myrtus communis L. leaves. Food Chemistry, 166: 585-595.

DAMTOFT, S., FRANZYK, H. and JENSEN, S. R., 1992. Excelsioside, a secoiridoid glucoside from Fraxinus excelsior. Phytochemistry, 31(12): 4197-4201.

DO, Q. D., ANGKAWIJAYA, A. E., TRAN-NGUYEN, P. L., HUYNH, L. H., SOETAREDJO, F. E., ISMADJI, S., JU, Y. H., 2014. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of Limnophila aromatica. Journal of Food and Drug analysis, 22(3): 296-302.

DOĞAN, C., ÇELİK, Ş., ve DOĞAN, N., 2017. Siirt Bölgesi Menengiçlerinin Toplam Fenolik Madde Miktarları ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 21(3): 293-298.

EFE, R., SOYKAN, A., CÜREBAL, İ., SÖNMEZ, S., 2013. Dünyada, Türkiye'de Edremit Körfezi Çevresinde Zeytin ve Zeytinyağı, 2. Basım, Balıkesir. 15s.

ERBAY, Z. ve ICIER, F., 2009. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. Journal of Food Engineering, 91: 533–541.

FERNÁNDEZ-MAR, M. I., MATEOS, R., GARCÍA-PARRILLA, M. C., PUERTAS, B. ve CANTOS-VILLAR, E. 2012. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. Food Chemistry, 130(4): 797-813.

FABBRI, A., GALAVERNA, G. ve GANINO, T., 2004. Polyphenol composition of olive leaves with regard to cultivar, time of collection and shoot type. In V International Symposium on Olive Growing 791: 459-464.

GARCIA-SALAS, P., MORALES-SOTO, A., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A., 2010. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. Molecules, 15(12): 8813-8826.

GOLDSMITH, C.D., VUONG, Q.V., STATHOPOULOS, C.E., ROACH, P.D., SCARLETT, C.J., 2014. Optimization of the Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from Olive Leaves. Antioxidants, 3(4): 700-712.

GÖNENÇ, 2011. TR63 Bölgesi Zeytincilik Sektör Raporu ve Fizibilite Çalışması. Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı (DOĞAKA), Osmaniye.

GUINDA, Á., PÉREZ-CAMINO, M. C., AND LANZÓN, A. 2004. Supplementation of oils with oleanolic acid from the olive leaf (Olea europaea). European Journal of Lipid Science and Technology, 106(1): 22-26.

HALLIWELL, B., 2011. Free radicals and antioxidants–quo vadis?. Trends in

Pharmacological Sciences, 32(3): 125-130.
HARP, F. ve MUTLU, T. K., 2011. The Antioxidant Activity of Some Olive Leaves Grown in Turkey1. Ç.Ü Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 26(2): 155-162.
HICKS, C.R., 2009. Deney Düzenlemede İstatistiksel Yöntemler, Çeviri: MULUK, F.Z., TOKTAMIŞ, Ö., KURT, S. VE KARAAĞAOĞLU, E. Gazi Kitapevi, Ankara (II. Baskı), 267s.
İLBAY, Z., ŞAHIN, S., BÜYÜKABASAKAL, K., 2014. A novel approach for olive leaf extraction through ultrasound technology: Response Surface Methodology versus Artificial Neural Networks. Korean J. Chem. Eng., 31(9): 1661-1667.
KARAKASHOV, B., GRIGORAKIS, S., LOUPASSAKI, S., MOURTZINOS, I., MAKRIS D.P., 2015a. Optimisation of organic solvent free polyphenol extraction from Hypericum triquetrifolium Turra using Box–Behnken experimental design and kinetics. International Journal of Industrial Chemistry, 6(2): 85–92.
KARAKAYA, A., 2011. Purification of polyphenolic compounds from crude olive leaf extract. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İzmir. 113s.
KAYAHAN, M. ve TEKİN, A., 2009. Zeytinyağı Üretim Teknolojisi. TMMOB Gıda Mühendisleri Odası, Seri 15, Ankara.
KESKİN, D., CEYHAN, N., UĞUR, A. ve DBEYS, A. D., 2012. Antimicrobial activity and chemical constitutions of West Anatolian olive (Olea europaea L.) leaves. Journal of Food, Agriculture & Environment, 10(2): 99-102.
KHAYYAL, M. T., EL-GHAZALY, M. A., ABDALLAH, D. M., NASSAR, N. N., OKPANYİ, S. N. ve KREUTER, M. H., 2002. Blood Pressure Lowering Effect of an Olive Leaf Extract {Olea europaed) in L-NAME Induced Hypertension in Rats. Arzneimittelforschung, 52(11): 797-802.
KHEMAKHEM, I., GARGOURI, O. D., DHOUIB, A., AYADI, M. A. ve BOUAZIZ, M., 2017a. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. Separation and Purification Technology, 172: 310-317.
KHEMAKHEM, I., AHMAD-QASEM, M.H., CATALÁN, E.B., MICOL, V., GARCÍA-PÉREZ, J.V., AYADI, M.A., BOUAZIZ, M. 2017b. Kinetic improvement of olive leaves' bioactive compounds extraction by using power ultrasound in a wide temperature range. Ultrasonics Sonochemistry, 34: 466-473.
KUO, C. H., CHEN, B. Y., LIU, Y. C., CHANG, C. M. J., DENG, T. S., CHEN, J. H., SHIEH, C. J., 2013. Optimized ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from Polygonum cuspidatum. Molecules, 19(1): 67-77.
KOÇ, B., KAYMAK-ERTEKİN, F., 2010. Yanıt Yüzey Yöntemi ve Gıda İşleme Uygulamaları. Gıda Dergisi, 35 (1): 63-70.
KUTLU, N., YEŞİLÖREN, G., İŞCİ, A., ve ŞAKIYAN, Ö., 2017. Konvansiyonel Ekstraksiyona Alternatif: Yeşil Teknolojiler. Gıda Dergisi, 42(5): 514-526.
JAPÓN-LUJÁN, R., LUQUE-RODRÍGUEZ, J. M. ve DE CASTRO, M. L., 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. Journal of Chromatography A, 1108(1): 76-82.
JESZKA-SKOWRON, M. and ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A., 2014. Analysis of Antioxidant Activity, Chlorogenic Acid, and Rutin Content of Camellia

sinensisInfusions Using Response Surface Methodology Optimization. Food Analytical Methods, 7(10): 2033 –2041.

LEE, O. H. ve LEE, B. Y., 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in Olea europaea leaf extract. Bioresource Technology, 101(10): 3751-3754.

LEE, O. H., LEE, B. Y., LEE, J., LEE, H. B., SON, J. Y., PARK, C. S., SHETTY, K., KIM, Y. C., 2009. Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities. Bioresource Technology, 100(23): 6107-6113.

LI, Y., GUO, C., YANG, J., WEI, J., XU, J. ve CHENG, S., 2006. Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. Food Chemistry, 96(2): 254-260.

LUO, H., 2011. Extraction of antioxidant compounds from Olive (Olea europaea) leaf. Technology in Food Technology, Master Thesis. Massey University, Albany, New Zealand.161 p.

MALIK, N. S. A., ve BRADFORD, J. M., 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. Scientia Horticulturae, 110(3): 274-278.

MEDINA-MARTÍNEZ, M. S., TRUCHADO, P., CASTRO-IBÁÑEZ, I. ve ALLENDE, A., 2016. Antimicrobial activity of hydroxytyrosol: a current controversy. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 80(4): 801-810.

MEDINA, E., BRENES, M., ROMERO, C., GARCÍA, A. and CASTRO, A. D., 2007. Main antimicrobial compounds in table olives. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(24): 9817-9823.

MONTGOMERY, D.C. 2005. Design and Analysis of Experiments, 6thed., John Wiley&Sons.

NIP, W.K., 2007. Fundamentals of food manufacturing. In: Handbook of Food Products Manufacture (edited by Y.H. Hui), Hoboken, NJ, USA: John Wiley and Sons Inc., 5–44s.

NISAR, A., MAMAT, A. S., HATİM, M. I., ASLAM, M. S., AHMAD, M. S., 2017. Antioxidant and Total Phenolic Content of Catharanthus roseus Using Deep Eutectic Solvent. Recent Advances in Biology and Medicine, 3: 7-10.

ODABAŞ, H.İ., 2013. Farklı yöntemlerle fındık zarından antioksidan ekstraksiyonunun optimizasyonu. Ondokuz Mayis Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115 s.

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.

PAIVA-MARTINS, F., CORREIA, R., FÉLIX, S., FERREIRA, P., GORDON, M. H., 2007. Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(10): 4139-4143.

PANIZZI, L., SCARPATI, M. L. ve ORIENTE, G., 1960. The constitution of oleuropein, a bitter glucoside of olive with hypo-tensive activity. Gazzette Chimica Italiana, 90: 1449-1485.

PEREIRA, A. P., FERREIRA, I. C. R. F., MARCELINO, F., VALENTAO, F., ANDRADE, P. B., SEABRA, R., ESTEVINHO, L., BENTO A. ve PEREIRA, J. A., 2007. Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of Olive (Olea

europaea L. Cv. Cobrançosa) Leaves. Molecules. 12(5) :1153- 1162.
RADOJKOVIC, M., ZEKOVIC, Z., JOKIC, S., VIDOVIC, S., LEPOJEVIC, Z., MILOSEVIC, S., 2012. Optimization of solid-liquid extraction of antioxidants from black mulberry leaves by response surface methodology. Food Technology and Biotechnology, 50(2): 167-176.
RANALLI, A., CONTENTO, S., LUCERA, L., DI FEBO, M., MARCHEGIANI, D. ve DI FONZO, V., 2006. Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(2): 434-440.
SABRY, O. M., 2014. Review: Beneficial health effects of olive leaves extracts. Journal of Natural Sciences Research, 4(19): 1-9.
SALAH, M. B., ABDELMELEK, H., and ABDERRABA, M. 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. Medicinal Chemistry, 2(5): 107-111.
SANTOS, H. M. and CAPELO, J. L., 2007. Trends in ultrasonic-based equipment for analytical sample treatment. Talanta, 73(5): 795-802.
SEVIM, D. ve TUNCAY, Ö., 2012. Ayvalık ve Memecik Zeytin Çesitlerinin Yaprağı ve Meyvelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarı ve Antioksidan Aktiviteleri. Gıda, 37 (4): 219-226.
SHAHIDI, F. and NACZK, M., 1995. Method of analysis and quantification of phenolic compound. In Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lanchester, PA. USA: Technomic Publishing Company, pp 287–293.
SHEHATA, E., GRIGORAKIS, S., LOUPASSAKI, S., MAKRIS, D.P., 2015. Extraction optimisation using water/glycerol for the efficient recovery of polyphenolic antioxidants from two Artemisia species. Separation and Purification Technology 149: 462–469.
SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, American Journal of Enology and Viticulture, 16: 144-158.
SUDJANA, A. N., D'ORAZİO, C., RYAN, V., RASOOL, N., NG, J., ISLAM, N., RİLEY, T.V. ve HAMMER, K. A., 2009. Antimicrobial activity of commercial Olea europaea (olive) leaf extract. International Journal of Antimicrobial Agents, 33(5): 461-463.
STAMATOPOULOS, K., CHATZILAZAROU, A., AND KATSOYANNOS, E., 2013. Optimization of multistage extraction of olive leaves for recovery of phenolic compounds at moderated temperatures and short extraction times. Foods, 3(1): 66-81.
ŞAHİN, S. ve ŞAMLI, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. Ultrasonics Sonochemistry 20(1): 595–602.
ŞİRVANCI, M. 1997. Kalite İçin Deney Tasarımı. Literatür Yayınları, İstanbul, 110s.
TASSOU, C. C. and NYCHAS, G. J. E., 1994. Inhibition of Staphylococcus aureus by olive phenolics in broth and in a model food system. Journal of Food Protection, 57(2): 120-124.
TAVMAN, Ş., KUMCUOĞLU, S. ve AKKAYA, Z., 2009. Bitkisel Ürünlerin Atıklarından Antioksidan Maddelerin Ultrason Destekli Ekstraksiyonu. Gıda Dergisi, 34(3): 175-182.

TAYOUB, G., SULAIMAN, H., HASSAN, A. H. and ALORFI, M., 2012. Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. International Journal of Medicinal Plants, 2(3): 428-433.

VELİOĞLU, S., 2007. Farklı Çay Ekstraktlarının Antioksidan, Antibakteriyal Etkileri ve Fenolik Madde Dağılımının HPLC ile Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

VISIOLI, F., POLI, A. ve GALL, C., 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews, 22(1): 65-75.

XIE, P. J., HUANG, L. X., ZHANG, C. H., YOU, F., ZHANG, Y. L. 2015. Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (Olea europaea L.) with ultrasound assistance. Food and Bioproducts Processing, 93: 29-38.

XYNOS, N., PAPAEFSTATHIOU, G., GIKAS, E., ARGYROPOULOU, A., ALIGIANNIS, N., SKALTSOUNIS, A. L., 2014. Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. Separation and Purification Technology, 122: 323-330.

WINKELHAUSEN, E., POSPIECH, R. and LAUFENBERG, G. 2005. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia, 24(1): 41-46.

YAĞCI, S., and GÖĞÜŞ, F., 2008. Response Surface Methodology for Evaluation of Physical and Functional Properties of Extruded Snack FoodsDeveloped from Food-by-Products. Journal of Food Engineering, 86: 122-132.

YAĞCIOĞLU, P., 2015. Farklı Ekstraksiyon Metotları İle Adaçayı (salvia Officinalis L.) Bitkisinden Antioksidan Ekstraksiyonunun Optimizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 97 s.

YANG, Y., LI, J., ZU, Y., FU, Y., LUO, M., WU, N., LIU, X. L., 2010. Optimisation of microwaveassisted enzymatic extraction of corilagin and geraniin from Geranium sibiricum Linne and evaluation of antioxidant activity. Food Chemistry, 122(1): 373– 380.

YATEEM, H., AFANEH, I. and AL-RIMAWI, F., 2014. Optimum conditions for oleuropein extraction from olive leaves. International Journal of Applied, 4(5): 153-157.

YAVAŞER, R., 2011. Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 103s.

YILDIZ, G. ve UYLAŞER, V., 2011. Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1): 131-142.

ZHANG, G., HE, L., and HU, M., 2011. Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from Prunella vulgaris L. and evaluation of antioxidant activities in vitro, Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12(1): 18–25.

ZORIĆ, N., KOPJAR, N., KRALJIĆ, K., ORŠOLIĆ, N., TOMIĆ, S. ve KOSALEC, I., 2016. Olive leaf extract activity against Candida albicans and C. dubliniensis–the in vitro viability study. Acta Pharmaceutica, 66(3): 411-421.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** Naciye Ünver

Uyruğu **:** T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi **:** Konya / 1991

Telefon **:** +90414 318 15 81

e-mail **:** unver.naciye@harran.edu.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl Bitirme Yılı	Bitirme Yılı
Lisans Eğitimi (Üniversite)	: Ankara Üniversitesi, Ankara	2014
Yüksek Lisans Eğitimi (Üniversite)	: Harran Üniversitesi, Şanlıurfa	2017

İŞ DENEYİMLERİ

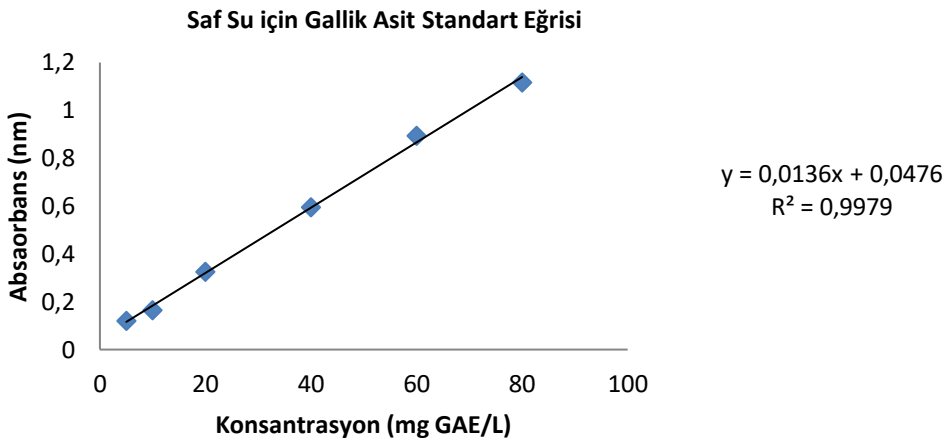
Yıl	Kurum	Görevi
2016 - Devam	Harran Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

UZMANLIK ALANI: Yağ Teknolojisi.

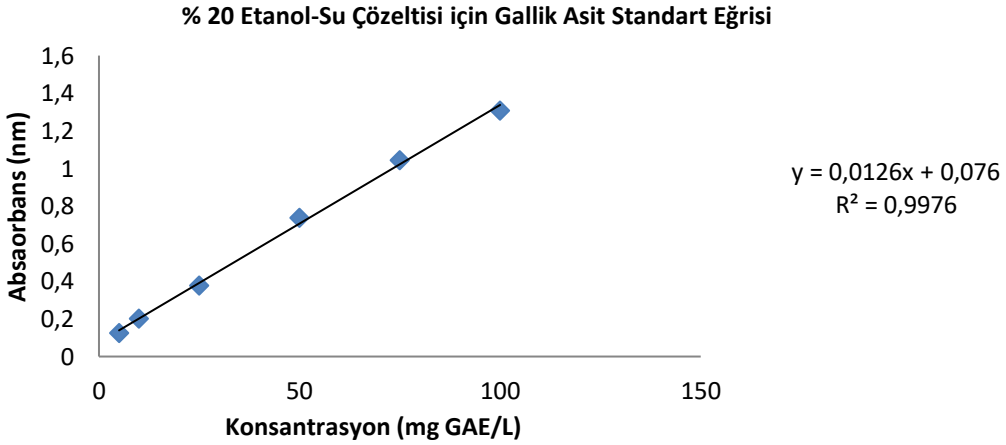
YABANCI DİLLER: İngilizce.

EKLER

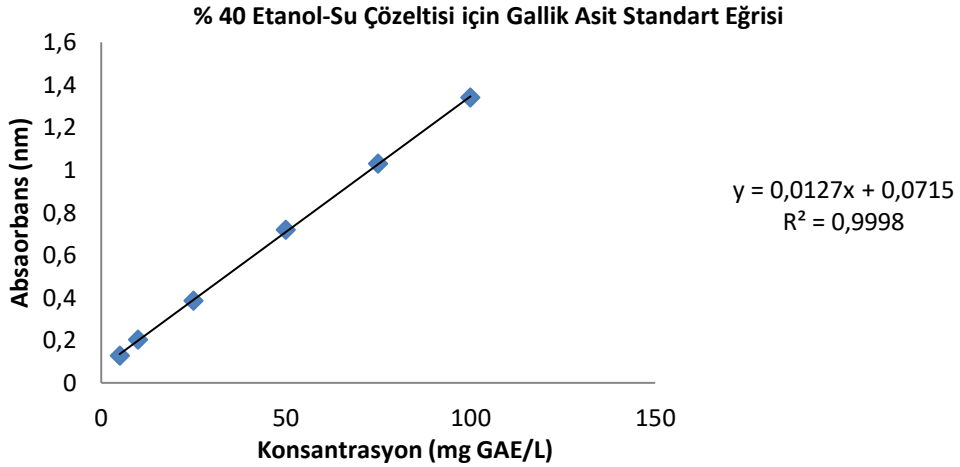
EK 1. Saf su için gallik asit standart eğrisi



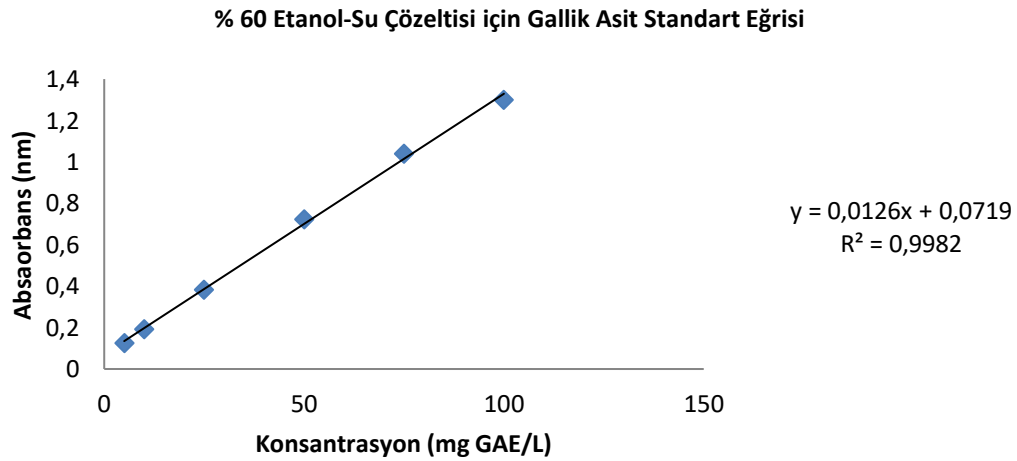
EK 2. %20 etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi



EK 3. %40 etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi



EK 4. %60 etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi



EK 5. %80 etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi

