İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN YAPRAKLARINDAN ANTİOKSİDAN ELDESİNDE MİKRODALGA VE ETÜV İLE KURUTMANIN ÇÖZÜCÜ, SICAKLIK VE ZAMAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şafak KARAKULAK

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZEYTİN YAPRAKLARINDAN ANTİOKSİDAN ELDESİNDE MİKRODALGA VE ETÜV İLE KURUTMANIN ÇÖZÜCÜ, SICAKLIK VE ZAMAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Şafak KARAKULAK
(506071023)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Mayıs 2009
Tezin Savunulduğu Tarih : 05 Haziran 2009

Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Nursen İPEKOĞLU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Yüksel GÜVENİLİR (İTÜ)
Prof. Dr. Oya ATICI (İTÜ)

HAZİRAN 2009

Anneme ve babama,

ÖNSÖZ

Tarih boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan, zeytin üretimin önemli yan ürünlerinden olan zeytin yapraklarına olan ilgi yüksek fenolik madde içerekleri dolayısıyla giderek artmaktadır. Günümüzde tıp, gıda ve kozmetik sanayilerinde kullanım alanı bulan zeytin yapraklarının yüksek fenolik madde içerikli ticari ekstraktlarının üretiminde optimum çalışma şartlarının belirlenmesi ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, en uygun çalışma şartlarının belirlenmesi ve zeytin yapraklarına uygulanan kurutma işlemlerinin ekstraktların fenolik madde içerikleri üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım, öneri ve yönlendirmeleri ile yanımda olarak bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. A. Nursen İPEKOĞLU'na, araştırmalarım ve deneysel çalışmalarım sırasından hiçbir zaman değerli desteğini esirgemeyen Sayın Dr.Y. Volkan ARINCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca yüksek lisans bursiyeri olarak beni maddi ve manevi olarak desteklerek çalışmalarımı rahat bir ortamda yürütmemi sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu(TÜBİTAK)'na teşekkürü bir borç biliyorum.

Analizlerimi rahat bir ortamda gerçekleştirmeme olanak sunan Sayın Prof. Dr. Yüksel GÜVENİLİR'e, analiz yöntemleri hakkında bilgi veren ve hesaplamalarda yardımlarını esirgemeyen Sayın Araş. Gör. Mine GÜLTEKİN'e, analizlerin gerçekleştirilmesi sırasında değerli vakitlerini ayırarak yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Didem OMAY ve Sayın Araş. Gör. Andelip ERDOĞAN'a, yine deneysel çalışmalarım sırasında yardımcı olan Sayın Tek. Şener KARANCI'ya ve kendi lisans bitirme projesi kapsamında bazı deneyleri birlikte yaptığımız arkadaşım Sayın Fatih YAZICI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışmayı, tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, sabırları, anlayışları ve sevgileri ile bugünlere gelmemi sağlayan anneme ve babama ithaf ediyor ve kendilerine en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Haziran 2009

Şafak Karakulak

Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xii**
ÖZET ..... **xv**
SUMMARY ..... **xvii**
1. GİRİŞ **1**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**
2.1 Serbest Radikaller. 3
2.1.1 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları. 4
2.1.2 Reaktif oksijen radikallerinin etkileri 6
2.2 Antioksidan Savunma Sistemi 7
2.3 Reaktif Oksijen Radikalleri - Antioksidanlar Dengesi ve Oksidatif Stres. 8
2.4 Zeytin (Olea Europaea) 11
2.4.1 Zeytinin tarihçesi. 13
2.4.2 Türkiye'de ve dünyada zeytincilik 15
2.4.3 Zeytinin sağlık açısından yararları. 19
2.5. Zeytin Yaprağı, Sağlık Açısından Faydaları ve Kullanım Alanları. 20
2.5.1 Oleuropein. 20
2.5.2 Rutin 21
2.5.3 Hidroksitirosol 22
2.5.4 Kateşin. 23
3. DENEYSEL ÇALIŞMA **27**
3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Hammaddeler 27
3.2 Deneysel Çalışmada Kullanılan Yöntem 27
3.2.1 Ekstraksiyon 27
3.2.1.1 Katı- sıvı ekstraksiyonu 27
3.3 Deneysel Çalışmada Kullanılan Analiz Yöntemleri 29
3.3.1 Spektrofotometrik yöntem 29
3.4 Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar 31
3.4.1 Karıştırmalı ekstraktör 31
3.4.2 Sokslet ekstraktörü 32
3.4.3 Spektrofotometre 32
3.5 Deneysel Çalışmanın Aşamaları. 33
3.5.1 Hammadde ve kimyasalların hazırlanması 33
3.5.1.1 Zeytin yapraklarının hazırlanması 33
3.5.1.2 Folin-Ciacalteu fenol reaktifi çözeltisi hazırlanması 34
3.5.1.3 Gallik asit stok çözeltisi hazırlanması 34
3.5.1.4 Sodyum karbonat çözeltisi hazırlanması 34

3.5.1.5 2,2-difenil-1-pikril hidrazil(DPPH) reaktifi çözeltisi hazırlanması....34
3.5.2 Karıştırıcılı ekstraktör ile katı-sıvı ekstraksiyon işlemleri 34
3.5.2.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisinin incelenmesi.....34
3.5.2.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü etkisinin incelenmesi.....35
3.5.2.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisinin incelenmesi 35
3.5.2.4 Ekstraksiyon işlemine sıcaklık etkisi incelenmesi.....36
3.5.4. Toplam fenolik madde miktarı ve aktioksidan aktivitesi tayini 36
3.5.4.1 Toplam fenolik madde miktarı tayini (Folin-Ciacalteu yöntemi). 36
3.5.4.2 Aktioksidan aktivitesi tayini (DPPH yöntemi).....37
3.6 Kullanılan Bilgisayar Programları 38
4. SONUÇLAR.....39
4.1 Zeytin Yapraklarının Kuru Madde Miktarının Hesaplanması.....39
4.2 Zeytin Yapraklarının Ortalama Parçacık Boyutunun Tespiti 39
4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini 40
4.3.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisi incelenmesi deneyleri.....41
4.3.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin incelenmesi.....43
4.3.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisi incelenmesi 46
4.3.4 Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şekli etkisi incelenmesi 47
4.3.5 Ekstraksiyon işlemine sıcaklık etkisi incelenmesi.....49
4.3.6 En uygun ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilen deney 52
4.3.7 Gallik asit standart eğrileri 54
4.4 Aktioksidan Aktivitesi Tayini.....54
4.4.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisi incelenmesi deneyleri.....54
4.4.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin incelenmesi.....56
4.4.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisi incelenmesi 57
4.4.4 Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şekli etkisi incelenmesi 58
4.4.5 Ekstraksiyon işlemine sıcaklık etkisi incelenmesi.....60
4.4.6 En uygun ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilen deney 61
5. GENEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA. 63
KAYNAKLAR.....67
EKLER 73

KISALTMALAR

GAE : Gallic Asid Equivalent (Gallik Asit Eşdeğeri)
g-ky : g Kuru Yaprak
g-db : Gram Dry Basis Leaf (g Kuru Yaprak)
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
mtDNA : Mitokondriyal DNA
ETZ : Elektron Transport Zinciri
TİM : Türkiye İhracatçılar Meclisi
LDL : Low Density Lipoprotein
HDL : High Density Lipoprotein
UV : Ultraviolet Işını
CAE : Kafeik Asit Eşdeğeri
TA : Tannik Asit Eşdeğeri
DPPH : *2,2*-Difenil-1-Pikril Hidrazil
FCR : Folin-Ciacalteu Reagent (Folin-Ciacalteu Reaktifi)
SD : Standart Deviation (Standart Sapma)
GA : Gallik Asit

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Serbest radikal türleri.....5
Çizelge 2.2 : Antioksidan türlerinin sınıflandırılması.....9
Çizelge 2.3 : Sofralık zeytinin besin değeri.....13
Çizelge 2.4 : Yıllara göre Türkiye'de sofra zeytini pazarı. 17
Çizelge 2.5 : Dünyada zeytin üretimi.....18
Çizelge 2.6 : Dünyada zeytin ihracatı değerleri.....19
Çizelge 4.1 : Zeytin yapraklarının tanecik boyutu analizi sonuçları.....39
Çizelge 4.2 : 19 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri 42
Çizelge 4.3 : 1g/10g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri. 44
Çizelge 4.4 : 1g/25g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri. 44
Çizelge 4.5 : 1g/50g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.....45
Çizelge 4.6 : Farklı kurutma şekilleri ile kurutulma sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.....47
Çizelge 4.7 : Sokslet ve karıştırmalı ekstraktörden elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.. 48
Çizelge 4.8 : 25˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.....49
Çizelge 4.9 : 40˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.....50
Çizelge 4.10: 70˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.....50
Çizelge 4.11: Etüvde kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri 52
Çizelge 4.12: Mikrodalgada kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri 53
Çizelge 4.13: 16 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.....55
Çizelge 4.14: Farklı çözücü miktarları ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH yakalama aktivitesi değerleri. 56
Çizelge 4.15: Farklı kurutma şekilleriyle kurutulmuş yapraklar ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri. 58
Çizelge 4.16: Sokslet ve karıştıcılı ekstraktör ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri. 59

Çizelge 4.17: Farklı sıcaklıklarda ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.....60
Çizelge 4.18: Farklı kurutma şekilleriyle kurutulmuş yapraklar ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.....61
Çizelge B.1 : 19 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların 765nm de ölçülen absorbans değerleri.....85
Çizelge B.2 : 1g/10g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 86
Çizelge B.3 : 1g/25g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 87
Çizelge B.4 : 1g/50g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 87
Çizelge B.5 : Farklı kurutma şekilleri ile kurutulma sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri. 88
Çizelge B.6 : Sokslet ve karıştırmalı ekstraktörden elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 88
Çizelge B.7 : 25˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 89
Çizelge B.8 : 40˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri 89
Çizelge B.9 : 70˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri. 90
Çizelge B.10: Etüv ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.....90
Çizelge B.11: Mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.....91

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Moleküler oksijen. 3
Şekil 2.2 : Reaktif oksijen türlerinin oluşumu 6
Şekil 2.3 : Serbest oksijen radikallerinin hücreye etkileri 7
Şekil 2.4 : ROS-antioksidan dengesi ve oksidatif stres. 8
Şekil 2.5 : Mitokondriyel ROS, oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma. 10
Şekil 2.6 : Zeytin (Olea Europaea)....11
Şekil 2.7 : Zeytinin ortalama bileşimi.. 12
Şekil 2.8 : Çiçek açmış zeytin dalı....14
Şekil 2.9 : Türkiye'de zeytincilik yapılan yerlerin gösterimi. 16
Şekil 2.10: Dünyada zeytin üretimi değerleri ortalaması....16
Şekil 2.11: Dünyada zeytin ihracatı değerleri. 18
Şekil 2.12: Oleuropein'in kimyasal yapısı....21
Şekil 2.13: Rutin'in kimyasal yapısı....22
Şekil 2.14: Hidroksitirosol'un kimyasal yapısı. 22
Şekil 2.15: Kateşin'in kimyasal yapısı. 23
Şekil 3.1 : Katı-sıvı ekstraksiyonunun şematik gösterimi i 28
Şekil 3.2 : Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri.. 29
Şekil 3.3 : Spektrofotometrenin temel çalışma prensibi 30
Şekil 3.4 : Deneysel çalışmada kullanılan karıştırmalı ekstraksiyon düzeneği. 31
Şekil 3.5 : Deneysel çalışmada kullanılan sokslet ekstraktörü düzeneği....32
Şekil 3.6 : Deneysel çalışmada kullanılan spektrofotometre 33
Şekil 3.7 : Antioksidanların DPPH molekülüne etkisi....38
Şekil 4.1 : Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisinin gösterimi....41
Şekil 4.2 : Ekstraksiyon işlemine katı/çözücü oranı etkisinin grafiği....45
Şekil 4.3 : Ekstraksiyon işlemine kurutma şeklinin etkisi grafiği....46
Şekil 4.4 : Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şekli etkisinin grafiği....48
Şekil 4.5 : Ekstraksiyon işlemine sıcaklığın etkisinin grafiği. 51
Şekil 4.6 : Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisinin grafiği....52
Şekil 4.7 : Antioksidan aktivitesine çözücü etkisinin grafiği....53
Şekil 4.8 : Antioksidan aktivitesine katı madde/çözücü oranı etkisinin grafiği....56
Şekil 4.9 : Antioksidan aktivitesine kurutma şekli etkisinin grafiği. 57
Şekil 4.10: Antioksidan aktivitesine ekstraksiyon şekli etkisinin grafiği 59
Şekil 4.11: Antioksidan aktivitesine sıcaklık etkisinin grafiği.. 60
Şekil 4.12: Antioksidan aktivitesinin grafiksel gösterimi 61
Şekil A.1 : Saf aseton için gallik asit standart eğrisi....75
Şekil A.2 : %90 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi 75
Şekil A.3 : %80 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.. 76
Şekil A.4 : %70 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi 76
Şekil A.5 : %60 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 77
Şekil A.6 : %40 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi 77

Şekil A.7 : Saf etanol için gallik asit standart eğrisi. 78
Şekil A.8 : %90 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 78
Şekil A.9 : %80 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 79
Şekil A.10: %70 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 79
Şekil A.11: %60 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 80
Şekil A.12: %40 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 80
Şekil A.13: Saf Metanol için gallik asit standart eğrisi.....81
Şekil A.14: %90 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 81
Şekil A.15: %80 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 82
Şekil A.16: %70 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 82
Şekil A.17: %60 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 83
Şekil A.18: %40 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi. 83
Şekil A.19: Saf su için gallik asit standart eğrisi 84

ZEYTİN YAPRAKLARINDAN ANTİOKSİDAN ELDESİNDE, ETÜV VE MİKRODALGA İLE KURUTMANIN, ÇÖZÜCÜ, SICAKLIK VE ZAMAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Tarih boyunca çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan, zeytin üretimin önemli yan ürünlerinden olan zeytin yapraklarına olan ilgi yüksek fenolik madde içerekleri dolayısıyla giderek artmaktadır. Günümüzde tıp, gıda ve kozmetik sanayilerinde kullanım alanı bulan zeytin yapraklarının yüksek fenolik madde içerikli ticari ekstraktlarının üretiminde optimum çalışma şartlarının belirlenmesi ekonomik açıdan büyük önem arz etmektedir.

Zeytin yaprakları toplandıktan sonra çeşitli fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar ve aynı zamanda toz ve böcek gibi dış etkenler için açık hedef haline gelip önemli bileşenlerini kaybetme tehlikesi ile karşı karşıya kalırlar. Kurutma işlemi zeytin yapraklarının hasattan sonra bozunmadan depolanması ve yıl içinde istenildiği zaman kullanılabilmesi açısından çok önemlidir. Mikrodalga ve infrared ile kurutma gibi yöntemler geleneksel kurutma yöntemlerine oranla zaman ve enerji tasaruffu açısından büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

Zeytin yapraklarının fenolik madde içeriği, zeytinin çeşidine, uygulanan kültürel tedbirlere, yetiştiği bölgeye ve hasat zamanına göre farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada Dikili (İzmir, Türkiye) yöresinden toplanan, mikrodalga ve etüvde kurutulan zeytin yapraklarına; 19 farklı çözücü(saf aseton, saf etanol, saf metanol ve bu çözücülerin sulu çözeltileri ve saf su) ile, 3 farklı katı(kuru) yaprak/çözücü oranında(1 g/10 g, 1 g/25 g, 1 g/50 g), 3 farklı sıcaklıkta(25˚C, 40˚C, 70˚C) katı-sıvı ekstraksiyon işlemleri uygulanarak fenolik madde içerikli ekstraktlar elde edilmiştir. Bu ekstraklar toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri açısından analiz edilmişlerdir. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciacalteu yöntemi ile, antioksidan aktiviteleri ise % *2,2*-difenil-1-pikril hidrazil(DPPH) radikali yakalama aktivitesi yöntemi ile tayin edilmiştir. Ekstrakların toplam fenolik madde miktarları ve % DPPH radikali yakalama aktivitelerinin kurutma şekli, çözücü türü ve miktarı, ekstraksiyon şekli ve sıcaklıktan etkilendiği gözlenmiştir. Çalışılan tüm şartlarda toplam fenolik madde miktarlarının 15,87±1,02 mg GAE/g-ky ile 91,78 ±1,33 mg GAE/g-ky, yüzde DPPH radikali yakalama aktivitelerinin ise %3,24 ±0,72 ile %33,33 ±0,46 arasında değişim gösterdiği gözlenmiştir.

Deneysel bulgular ile yapılan değerlendirme sonucu, ekstraksiyon işleminin; çalışılan sistem için en uygun çözücü olan %60 etanol-su çözücüsü ile, en uygun katı madde/çözücü oranı olan 1 g katı/10 g oranında, mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40˚C'de, 4 saat süre ile gerçekleştirilmesininin uygun olduğuna karar verilmiştir.

Çalışmadan elde edilen en önemli sonuç; mikrodalga ile kurutmanın, ekstrakların fenolik madde içeriklerini ve antioksidan aktivitelerini pozitif yönde etkilediğinin gözlenmesidir. Bu sonuç ışığında, tıp, gıda ve kozmetik sanayilerinde kullanılan

zeytin yapraklarının hasattan sonra kullanılıncaya kadarki sürede mikrodalga ile kurutulurak saklanabileceğinin uygun olacağı düşünülmektedir.

EFFECT OF OVEN AND MICROWAVE DRYING ON SOLVENT, TEMPERATURE AND EXTRACTION TIME IN THE EXTRACTION OF ANTIOXIDANTS FROM OLEA EUROPAEA L. LEAVES

SUMMARY

The interest in leaves of *Olea europaea l.,* which were used as a medicine through the history and which was one of the most important by-products that produced in olive processing, has been increased due to their high phenolic content. Determination of the optimum conditions for the production of commercial olive leaf extracts, which are used in medicine, food and cosmetic industries today, has an economic importance.

Fresh olive leaves issued from oil industry are submitted under ambient conditions to chemical and physical reactions and can be rapidly deteriorated by dust and insects. It is so necessary to reduce the moisture content of the fresh leaves to improve their shelf life in the storage step preceding their processing. When compared to traditional drying methods microwave and IR drying are more efficient on reducing the drying time and on energy saving.

Phenolic content of olive leaves can vary with a lot of factors such as; specie of the olive, growth area, harvest period etc. Olive leaves, which were harvested from Dikili(Izmir, Turkey), have dried with microwave and oven and submitted to solid-phase extraction with 19 different solvents(pure aceton, pure ethanol, pure methanol and aqueous solutions of these solvents and destilled water), with 3 different solid(dry) leaf/solid solvent ratios(1 g/10 g, 1 g/25 g, 1 g/50 g) and on 3 different temperatures *(*25˚C, 40˚C, 70˚C) in order to get phenolic extracts. Total phenolic content of the extracts were determined with Folin-Ciacalteu method and antioxidant activity of the extracts were determined with %*2,2*-difenil-1-pikril hidrazil(DPPH) radical scavenging activity method. The total phenolic content and the antioxidant activity of the extracts were influenced by drying method, type of solvent and its amount, type of extraction and temperature. The extracted total polyphenols were in the range from 15,87±1,02 mg GAE/g-db ile 91,78 ±1,33 mg GAE/g-db**,** and the antioxidant activity of the extracts were in the range from %3,24 ±0,72 to %33,33 ±0,46 under experimental conditions.

Optimum determined conditions for this extraction system was %60 ethanol-water solution as solvent, 1 g/10 g as solid leaf/solvent ratio, microwave drying as drying method, 40˚C as extraction temperature and 4 h as the extraction period.

The most important conclusion of this study was drying with microwave did not reduce the phenolic content of the extracts in fact drying with microwave had a positive effect on phenolic content and antioxidant activity of the extracts. By the help of this conclusion we can say that microwave drying can be suggested for drying process of the olive leaves for preservation of their quality before preceding their further processing.

1. GİRİŞ

Zeytin ağacı (Olea europaea L.) en eski çağlardan beri Akdeniz medeniyetinin simgesi olmuş, Akdeniz ülkelerinde yetiştirilen en önemli meyve ağaçlarından biridir. Akdeniz ülkelerinin 8×10^6 hektarını kaplayan zeytinlikler bu ülkeler için çok önemli sosyal ve ekonomik değer taşımaktadır. Bu kadar büyük bir üretimin olduğu bir alandan doğacak her yan ürünün faydalı olarak kullanılması önem taşımaktadır. Toplam zeytin ağırlığının %10'nuna karşılık gelen zeytin yaprakları, zeytin üretiminde ele geçen önemli yan ürünlerden biridir [1].

Tarih boyunca zeytin yapraklarının çeşitli hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ancak bu konuda yayınlanmış ilk resmi çalışma 1854 yılında, zeytin yaprağının ateş ve sıtma tedavisinde etkili olduğu üzerinedir. Zeytin yapraklarında bakteri ve mantarlar üzerinde güçlü antimikrobiyel özellik gösteren maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler ayrıca antioksidan ve anti-fenflamatuvar etkiler gösterirler [2]. Yapılan çalışmalarda zeytin yaprağı ekstratının hayvanlarda kan basıncını düşürücü [3], koroner atar damarlarda kan akışını hızlandırıcı [4] ve bağırsaklarda kas kasılmasını önleyici etkileri olduğu görülmüştür.

Vucüdun serbest radikallerle savaşarak onları ortadan kaldıran savunma mekanızmalarına antioksidanlar adı verilmektedir. Vucütta oksijenli solunum, radyasyon vb. sonucu ortaya çıkan serbest radikallerin, hücre hasarı meydana getirerek yaşlanma sürecini hızlandırdığı, Parkinson, bronşit, alkolik karaciğer hastalığı, diyabet ve Down sendromu gibi birçok hastalığın ortaya çıkma nedenleri arasında olduğu düşünülmektedir [5,6]. Oleuropein, hidroksityrosol, rutin, verbaskosid, kateşin gibi antioksidanları bünyesinde barındıran zeytin yaprağının serbest radikallerle savaşta önemli bir rol oynadığından bahsedilmektedir.

20. yy'ın ikinci yarısından itibaren, içinde barındırdığı sağlık açısından oldukça faydalı maddeler dolayısıyla zeytin yaprağına olan ilgi artmış ve bu alanda ticari gelişmeler yaşanmıştır. Bu sayede zeytin yaprağı ekstratı kozmetik ve ilaç sanayiinde kendine kullanım alanı bulmuştur.

Bu çalışma kapsamında, insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olan serbest radikaller ile bunların olumsuz etkilerini metabolize eden antioksidanlar hakkında literatür araştırması yapılmış, ayrıca önemli miktarda antioksidan içeriğe sahip olan zeytin bitkisi hakkında genel bilgiye yer verilmiştir. Deneysel çalışmada, Türkiye'nin Ege bölgesi Dikili yöresinden temin edilen zeytin yapraklarından katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi ile antioksidan içerikli ekstrakt faz elde edilmiş ve bu içerik toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi açısından spektrofotometrik yöntem ile analiz edilerek incelenmiştir.

Deneysel çalışma kapsamında ilk önce aseton, etanol, metanol ve bu çözücülerin belirli oranlardaki sulu çözeltileri ve saf su çözücü olarak kullanılarak uygun bir çözücü türü belirlenmeye çalışılmıştır. Daha sonra seçilen çözücü için sıcaklık, çözücü oranı ve zaman parametrelerinin ekstratın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışma kapsamında Sokslet ekstraktörü ve karıştırmalı ekstraktör ile çalışmanın da ekstratın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkilerileri de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yapılan çalışmada ayrıca mikrodalga ve etüv ile kurutmanın ekstratın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çalışmanın amacı, zeytin yapraklarından antioksidan eldesinde çalışmada kullanılan ekstraksiyon sistemine ait parametrelerinin tespiti ve mikrodalga ile kurutmanın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkilerinin incelenmesidir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

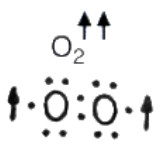
2.1 Serbest Radikaller

Yaşam, üç buçuk milyar yıl kadar önce serbest oksijenin bulunmadığı bir ortamda başlamıştır. 2 milyar yıl önce ilk kez mavi-yeşil alg bünyesinde fotosentezin gerçekleşmesi ile de serbest oksijen açığa çıkmıştır. Klorofilin evrimi ile güneş ışınlarının enerjisinden yararlanan bitkiler suyun yapısında bulunan O_2'i serbestleştirirlerken, yaşamın kaynağı olacak yüksek enerjili karbon bağlarını sentezlemişlerdir. Serbest oksijenin atmosferdeki oranı 1.3 milyar yıl önce % l'e, 500 milyon yıl önce ise % 10'a çıkmıştır [7].

Tüm canlılar, oksijenli atmosfere uyum göstermek zorunda kalmışlardır. Oksijenli atmosfere adaptasyonda en önemli aşama O_2'nin karbon bağlarının parçalanmasında kullanılması idi. Bunu başarabilen canlılar oksijenli fosforilasyonunda onlara kazandırdığı avantaj sayesinde, solunumla toksik bir madde olan oksijeni hücrelerinin içine kadar alıp, onu bir dizi indirgeyici reaksiyonda kullanmaya başlamışlardır. Moleküler oksijenin (O_2) dört elektron alarak H_2O'ya kadar indirgendiği bu sürecin her aşamasında serbest oksijen radikalleri üretilmeye başlamıştır [7].

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller "serbest radikal" olarak tanımlanırlar. Eşleşmemiş bu elektrondan dolayı oldukça reaktif hale gelen serbest radikaller, hem organik hem de inorganik moleküller halinde bulunabilmektedir.

Moleküler oksijen (O_2), Şekil 2.1'de de görüldüğü gibi paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir [8,9].



Şekil 2.1 : Moleküler oksijen.

Fe^{3+}, Cu^{2+}, Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, reaktif oksijen radikalleri ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılırlar.

Moleküler oksijen, yüksek derecede "reaktif oksijen türleri (ROS)" oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri (ROS) normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^{*-}), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^*)'dir [10].

2.1.1 Reaktif oksijen türlerinin kaynakları

Hücrede birçok anabolik ve katabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda enzimlerin aktif merkezlerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller oluşabilir. Bazen bu serbest radikal ara ürünler enzimlerin aktif merkezlerinden sızarlar, moleküler oksijenle rastgele etkileşirler ve sonuçta ROS oluşur. Bu türler Çizelge 2.1 de görülmektedir [11].

ROS kaynakları şöyle sıralanabilir:

I- Normal biyolojik işlemler

1- Oksijenli solunum

2- Katabolik ve anabolik işlemler

II- Oksidatif stres yapıcı durumlar

1- İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite -intoksikasyo

2- Ksenobiotik maddelerin etkisi

a- İnhale edilenler

b- Alışkanlık yapan maddeler

c- İlaçlar

3- Oksidan enzimler

a- Ksantin oksidaz

b- İndolamin dioksigenaz

c- Triptofan dioksigenaz

Çizelge 2.1 : Serbest radikal türleri tablosu.

Adı	Simgesi	Açıklama
Hidrojen radikali	H^*	Bilinen en basit radikal
Süperoksit radikali	O_2^{*-}	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil radikali	OH^*	En toksik (reaktif) oksijen metaboliti radikali
Hidrojen peroksit	H_2O_2	Reaktivitesi çok düsük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet oksijen	$_1O_2$	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksi radikali	HO_2^*	Lipidlerde hızlı çözünerek lipid peroksidasyonunu artırmaktadır
Peroksil radikali	ROO^{*-}	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipidlere lokalize olma yeteneği
Triklorometil radikali	CCl_3^*	CCl_4 metabolizması ürünü, karacigerde üretilen bir radikal
Tiyil radikali	RS^*	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil radikali	RO^*	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen oksijen metaboliti
Azot monoksit	NO^*	*L* – argininden *in vivo* üretilir
Azot dioksit	NO_2	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

3- Oksidan enzimler(Devamı)

d- Galaktoz oksidaz

e- Siklooksigenaz

f- Lipooksigenaz

g- Monoamino oksidaz

4- Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu

5- Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma(nötrofil, makrofaj, endotelyal hücreler)

6- Uzun süreli metabolik hastalıklar

7- Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

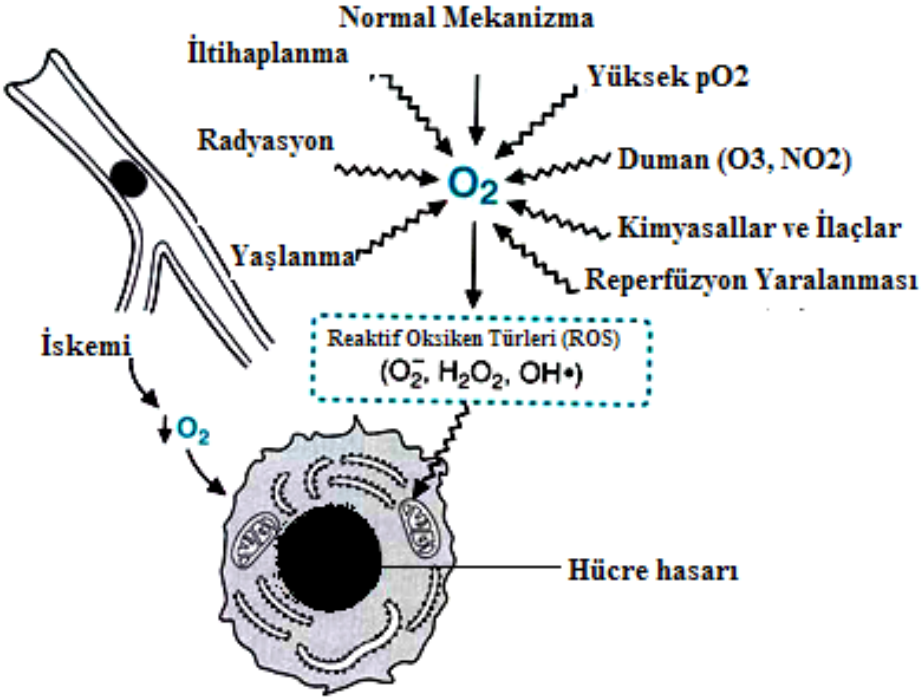
III- Yaşlanma süreci.

2.1.2 Reaktif oksijen radikallerinin etkileri

ROS oluşumu Şekil 2.2'te de görüldüğü üzere enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek kısmi oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit (NO_2), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar.

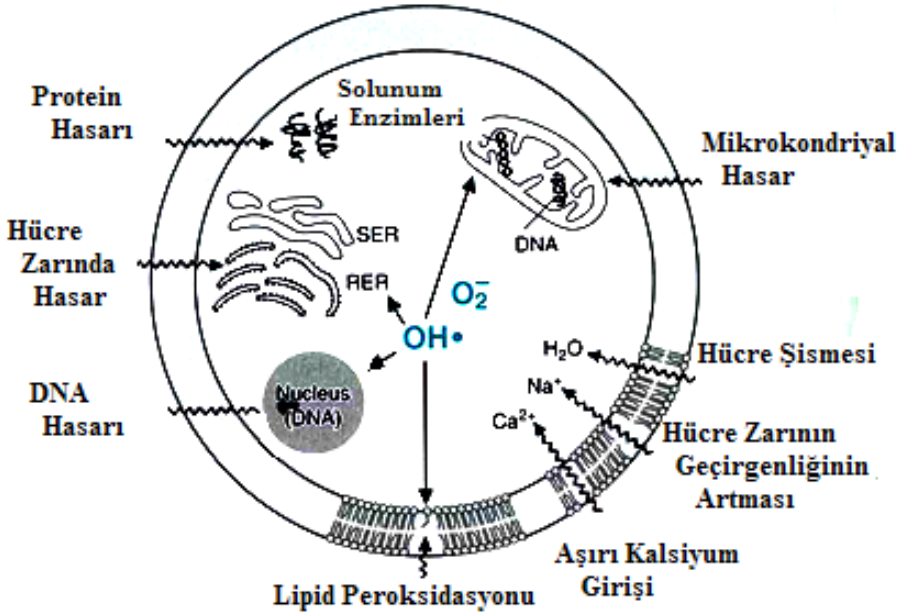
Serbest radikaller Şekil 2.3'te de görüldüğü üzere hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler.

Süperoksit radikali (O_2) ve hidroksil radikali (OH) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur.



Şekil 2.2 : ROS oluşumu.

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede ROS ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi sonrasında reperfüzyon da ROS artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır [5,6].



Şekil 2.3 : Serbest oksijen radikallerinin hücreye etkileri.

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın, komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.Bu hastalıklardan bazıları; aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma vb. dir [5,6].

2.2 Antioksidan Savunma Sistemi

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denilmektedir.

Antioksidanlar, endojen veya eksojen kaynaklı olabilir. Endojen kaynaklı antioksidanlar enzim olan ve enzim olmayan antioksidanlar diye ikiye ayrılırken, eksojen kaynaklı antioksidanlar; vitamin kaynaklı, ilaç olarak kullanılan ve

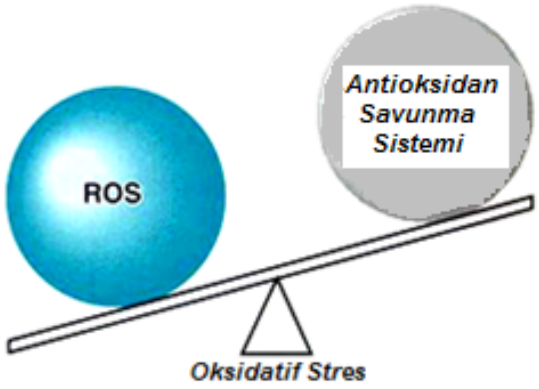
gıdalardaki eksojen antioksidanlar olmak üzere Çizelge 2.2'de de görüldüğü gibi üçe ayrılmaktadır.

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler;

1- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme toplayıcı etkidir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.
2- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme bastırıcı etkidir. Vitaminler ve flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
3- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
4- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ise onarıcı etki olarak isimlendirilir [5,6].

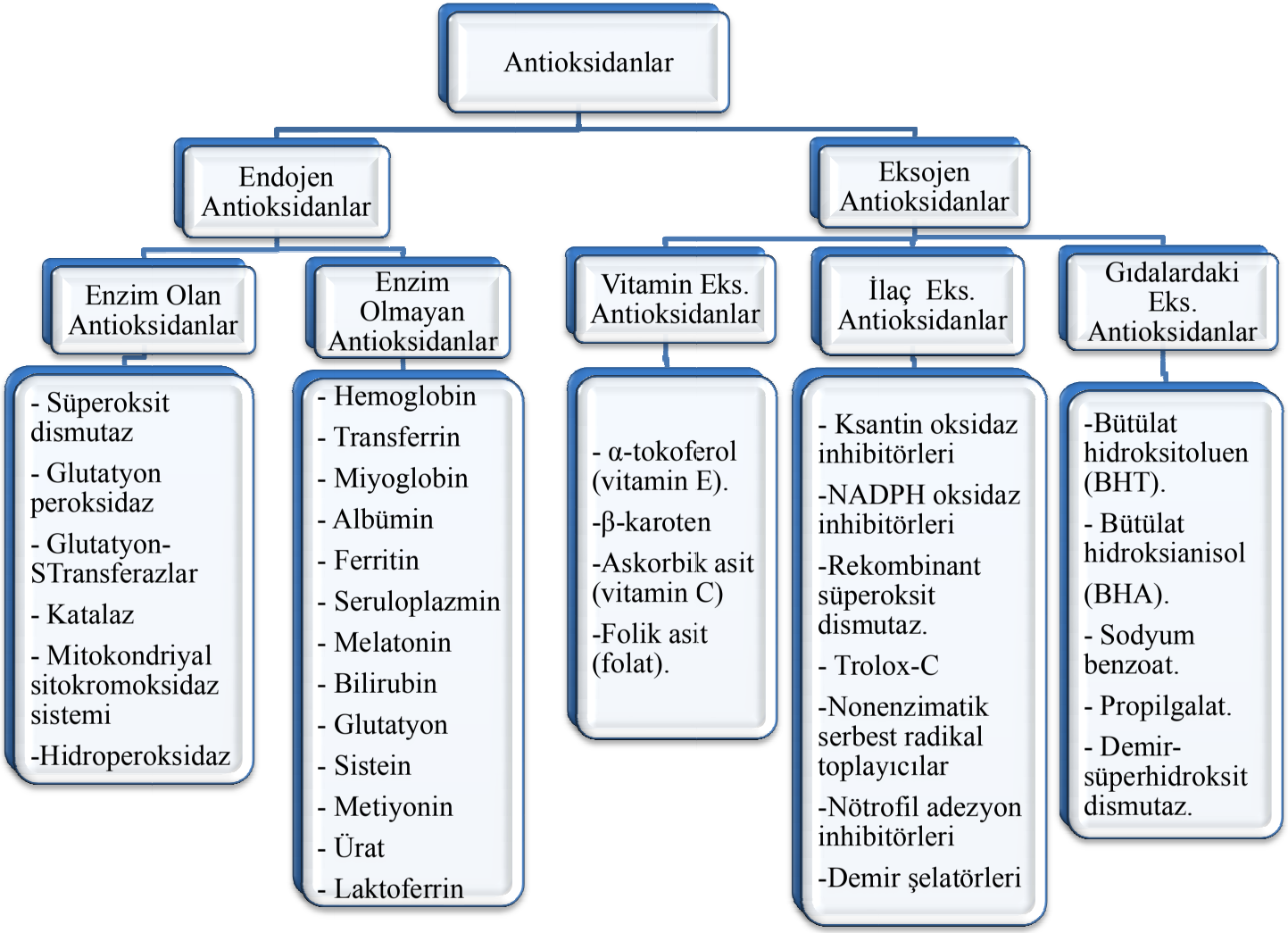
2.3 Reaktif Oksijen Radikalleri– Antioksidanlar Dengesi ve Oksidatif Stres

Hücrede oluşan ROS, normal şartlar altında antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılırlar. Ancak bazen hücresel savunma mekanizması (antioksidanlar) vasıtasıyla ortadan kaldırılandan daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Organizmada hücresel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırılandan daha fazla reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi "oksidatif stres" olarak tanımlanır (Bkz: Şekil 2.4).

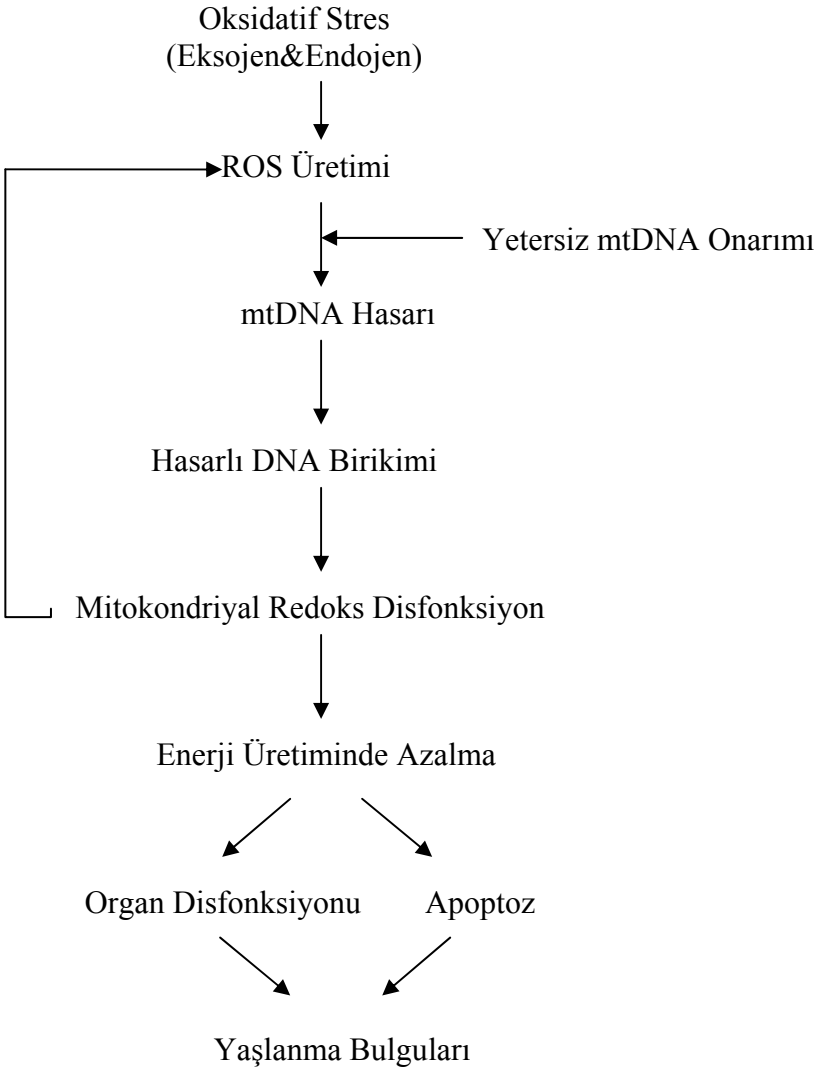


Şekil 2.4 : ROS-antioksidan dengesi ve oksidatif stres.

Çizelge 2.2 : Antioksidan türlerinin sınıflandırılması.



Oksijenli solunum sırasında oluşan serbest radikallerin hücrelere yaşlanma ve ölümle sonuçlanan oksidatif zararlar verdikleri tezi ilk defa 1956 yılında Harman [12] tarafından ortaya atılmıştır. Geçen 50 yılda Harman'ın ortaya attığı tez her geçen gün ortaya çıkarılan bulgular ışığında güçlenmiştir.



Şekil 2.5 : Mitokondriyel ROS, oksidatif mtDNA hasarı ve yaşlanma.

Solunumun gerçekleştiği mitokondriler üzerine yoğunlaşan Miquel ve ark.1980 yılında, Mitokondriyal DNA'da (mtDNA) oksidatif hasar ve bu hasara bağlı mutasyonların yaşlanma sürecinde önemli olduğu ve mitokondrilerin yaşlanmada anahtar rol oynadıklarını ortaya çıkarmıştır [13]. Günümüze dek yapılmış olan araştırmalar fizyolojik yaşlanma, prematür yaşlanma semptomları; Alzheimer hastalığı, diabet, kalp yetersizliği, sağırlık, optik sinir dejenerasyonu, birçok ilerleyici kas hastalığı ve kanser gibi yaşlanma ile sıklıkları artan hastalıkların mutasyona

uğramış DNA içeren disfonksiyonel mitokondrilerin varlığı ile ilgili olduğunu ortaya koymuştur [14-16]. Mitokondriyal elektron transport zincirinden (ETZ) elektron kaçağı sonucu oluşan serbest radikaller önce mitokondride ve sonra hücrede hasar oluşturmaktadır. Hasar ROS oluşumunu daha da arttırmaktadır. Bu kısır döngü belli bir yaştan sonra ölüm hızında görülen büyük artışı açıklamaktadır [14,17,18] (Bkz: Şekil 2.5).

Reaktif oksijen türlerinin yol açtığı oksidatif stresin etkilerini azaltabilmek ve organizmanın daha uzun yaşamasını sağlayabilmek için bakım ve onarım mekanizmalarının doğru ve etkin çalışmalarının sağlanması gerekmektedir.

Barja G. yaptığı çalışmada kalori kısıtlaması ile daha uzun ve daha sağlıklı yaşaması sağlanan hayvanlarda daha az mitokondrial ROS oluşumu ve mtDNA'da daha az mutasyon birikimi olduğunu saptamış ve bu sayede oksidatif stresin etkilerinin kalori kısıtlaması ile azaltılabileceğini göstermiştir [18].

2.4 Zeytin (Olea Europaea)



"Bolluğun, adaletin, sağlığın, barışın, zaferin, bilgeliğin ve yeniden doğuşun simgesidir zeytin ağacı." Lalehan UYSAL [19].

Şekil 2.6 : Zeytin (Olea Europaea).

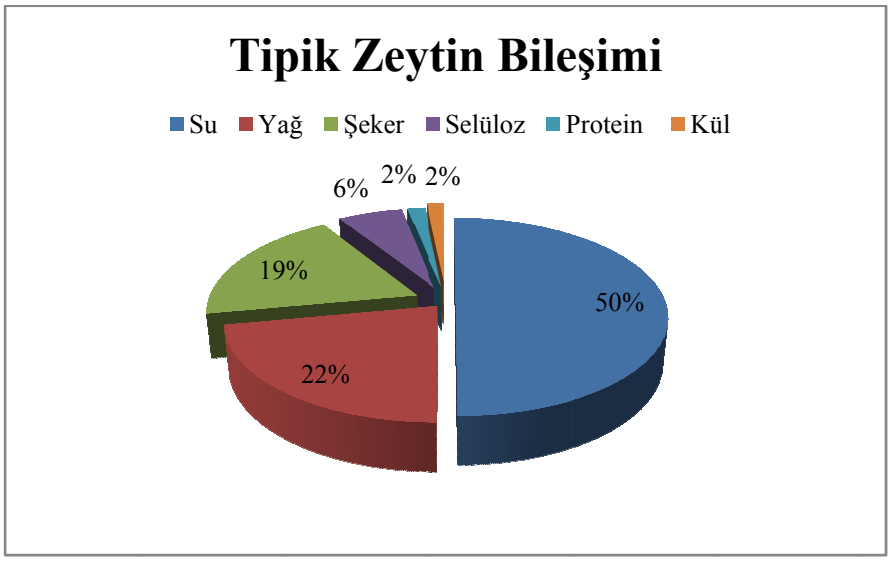
Zeytin, zeytingiller (Oleaceae) familyasından meyvesi yenen, boylu bir çalı veya 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her zaman yeşil yapraklı Akdeniz iklimine özgü bir ağaç türüdür.

"Fakir toprakların zengin ağacı" denilen zeytin bulunduğu yerin iklim koşullarına kolay uyum sağlar. Toprağın yapısına ve dokusuna göre köklerini salar. Zeytin ağacı yavaş büyür, serpilip büyümesi 15-20 yılı bulur. Geniş, kıvrımlı, yamru yumru bir

gövdesi vardır. 35 - 150 yaş arasında olgunluk ve verimlilik dönemini yaşar. Sonra yüzlerce yıl sürecek olan yaşlanma dönemi başlar. Ağaç yaşlandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Uzun ömürlü bir ağaçdır, yaklaşık 2.000 yıl kadar yaşayabilir. Ömrünü tamamladığında köklerinden yeni bir ağaç filizlendiği için zeytin ağacına ölmez ağaç ismi verilmiştir [19].

Zeytin ağacı bir yıllık yaşamını Akdeniz ikliminin özelliklerine göre, kasım ve şubat aylarını dinlenerek geçirir. Mart ve nisan aylarında dallarının uçları filizlenir. Nisan-haziran çiçek mevsimidir. Temmuz-ağustos aylarında meyveleri yani zeytin taneleri büyür, çekirdeği sertleşir. Eylül-ekim arası taneler olgunlaşır, olması gereken boyutlara gelir. Zeytinin çeşidine göre büyüklükleri ve biçimleri farklıdır. Zeytin taneleri yeşilden mora döndüğünde ya da koyu pembesi siyahlaştığında, yağlanma da başlar. Hasat eylül ile şubat ayları arasındadır. Zeytinin hasadı elle toplanarak ve sırıkla ya da makineyle ağacın silkelenmesiyle yapılır [19].

Yaprakları kozmetik ve ilaç sanayinde , meyvesi gıda ve yağ sanayinde kullanılan zeytinin, çekirdeğinin de kışlık yakacak olarak kullanılmasıyla her parçası çöpe gitmeden değerlendirilmektedir [20].



Şekil 2.7 : Zeytinin ortalama bileşimi.

En fazla yağ içeriğine sahip meyvelerden biri olan zeytinin ağırlığının yaklaşık olarak % 20-30 kadarı yağdır. Zeytin; su, protein, yağ, selüloz, fosfor, kükürt, kalsiyum, klor, demir, bakır, manganez A, C ve E vitaminlerini içermektedir (Bkz: Çizelge 2.3). Zeytinin ortalama bileşimi de Şekil 2.7'de görülebilir.

Çizelge 2.3 : Sofralık zeytinin besin değeri.

	Siyah Zeytin (100g)	Yeşil Zeytin (100g)
Enerji (kalori)	207	144
Yağ (g)	21	13,5
Karbonhidrat (g)	1,10	2,8
Protein (g)	1,8	1,5
Kalsiyum (mg)	77	90
Demir (mg)	1,6	2,0
Vitamin A (IU)	60	300
Vitamin B_1 (mg)	0,02	0,02
Vitamin B_2 (mg)	0,02	0,02
Niasin (mg)	0,2	0,1

2.4.1. Zeytinin tarihçesi

Akdeniz efsanelerinde adı Ölmez Ağaç ya da Hayat Ağacı olarak geçen zeytin ağacı, antik çağlardan beri insanoğlunun hayatının içinde olmuş, kimi zaman meyvasıyla kimi zaman yağıyla insanlığa sağlık, lezzet ve güzellik vaat etmiştir.

Efsaneye göre, Havva ile birlikte cennetten yeryüzüne kovulan Âdem 930 yaşındayken öleceğini hisseder ve Tanrı'dan kendisini ve dolayısıyla tüm insanlığı bağışlamasını dilemeye karar verir. Bu amaçla oğlu Şit'i Cennet Bahçesi'ne gönderir. Bahçenin bekçiliğini yapan melek, Şit'in duası üzerine İyi-Kötü Ağacı'ndan aldığı üç tohumu ona verir ve öldükten sonra babasının ağzına koyup öyle gömmesini söyler. Âdem ölür ve Tabor Dağı yakınında Hebron Vadisi'ne gömülür. Âdem'in ağzında yeşeren ve kök salan üç tohumdan Akdeniz ikliminin simgesi üç ağaç filiz verir ; zeytin, sedir ve servi [21].

Kökleri tarih öncesine dayanan zeytin ağacının kaç bin yaşında ve anayurdunun tam neresi olduğu konusunda arkeobotanikçiler, tarihçiler ve arkeologlar arasında bugün hâlâ ortak bir görüş yoktur.

Ama yine de önemli olan yabani zeytinin dünya yüzünde ilk varlığı değil, ilk ne zaman ehlileştirildiğiyse, bu mucizeyi Samilerin başardığı düşünülmektedir. Dünya Zeytin Ansiklopedisi yazarı José M. Blazquez zeytin yetiştiriciliği için nerede, ne zaman sorularını kitabında şu cümle ile açıklamıştır: *"Zeytin yetiştiriciliği yaklaşık altı bin yıl önce Anadolu'da başlamıştır"* [19].



Şekil 2.8 : Çiçek açmış zeytin dalı.

Yabani zeytin *oleaster*'in aşıyla kültür bitkisi olan *sativa*'ya dönüştürülmesi yeryüzünde ilk kez M.Ö. 4.000'lerde Anadolu, Doğu Akdeniz ve Güney Önasya'da; diğer bir ifade ile Mersin, Adana ve Gaziantep'ten başlayıp Suriye, Lübnan ve İsrail'e inen Akdeniz kıyı şeridinde gerçekleştirildiği sanılmaktadır. Anadolu'da, özellikle Kilikya Ovası'nda (Adana civarı), zeytin yetiştiriciliği yapıldığı konusundaki veriler Hitit metinlerinde bahsedilmektedir [22].

Zeytinin bir kültür bitkisine dönüşmesi, M.Ö. 4.000'lerde gerçekleşmiştir. Ancak, meyvesinin sıkılıp yağının çıkarılması, zeytinyağının yaygınlaştırılması ise 1.500-2.000 yıl sonra olmuştur. Tunç Çağı'nda Akdeniz'de zeytinciliğin yaygınlaştığı sadece zeytin çekirdeklerinden değil, bulunan yağ presleri, saklanan kaplar, vazo ve fresklere yansıyan artistik çalışmalarda ortaya çıkmaktadır. "Verimli hilal" olarak adlandırılan bölgede, özellikle Fırat ve Asi ırmakları arasındaki ticaret merkezi Palmira'nın zeytinyağı çok ünlenmiştir.

Suriye ve Lübnan kıyılarında yaşayan Fenikeliler aracılığıyla, önce zeytinyağı ticareti, ardından fidanlarla taşınan zeytin kültürü, M.Ö. 2.600-1.600 arası önce güneyde Mısır'a, batıda Kıbrıs, Girit ve M.Ö. 1.400-1.200'lerde Anadolu yoluyla Yunanistan'a, M.Ö. 700'lerde Kuzey Afrika'da Libya ve Tunus'a, Akdeniz'in iki yakasında genişlemiştir. Yunanlılar M.Ö. 8. yüzyılda zeytinyağı ve şarap gelirleri ile

kurdukları Syrakusa kolonisiyle Sicilyalılara, sonra Romalılara ve onlardan da Fransızlara, İspanyollara ve nihayet Portekizlilere ulaşmıştır.

İspanyolların zeytin yetiştiriciliği ile tanışmalarının Akdeniz ticaretini ellerine geçiren Fenikeliler sayesinde (M.Ö. 1.050) gerçekleştiği söylenmektedir. Ancak, zeytin ve zeytinyağcılığın, özellikle Romalıların bu ülkeye gelip yönetimleri altına aldığı M.Ö. 212-45 yılları arasında geliştiği açıktır. İberik Yarımadası'nı M.S. 8. yüzyılda egemenlikleri altına alan Araplar da beraberlerinde getirdikleri zeytin çeşitlerini dikerek zeytin kültürünün yayılmasında önemli bir rol oynamışlardır. Nitekim, İspanyolca zeytin (aceituna), zeytinyağı (aceite) ve zeytin ağacı (acebuche) sözcüklerinin kökeni de Arapça'dir. Yüzyıllar sonra zeytin ağacı okyanuslar aşmış, 16. yüzyıldaki büyük keşiflerin ardından Avrupa'dan gelen İspanyol misyonerler aracılığıyla, Kuzey ve Güney Amerika'da yetiştirilmiştir. 15. yüzyılda Sevilla'dan götürülen zeytin fidanları, önce İspanyollar tarafından fethedilen Batı Hint Adaları'nda dikilmiş, sonra Amerika kıtasına yayılmıştır. Rönesans'ın sonundan Avrupa güçlerindeki kolonileşmeye kadar zeytinler, kaşifler ve kolonistler tarafından yayılmıştır. 1560'larda zeytin kuruları İspanyol kaşifler tarafından Meksika'ya oradan da Peru'ya taşınmıştır [22].

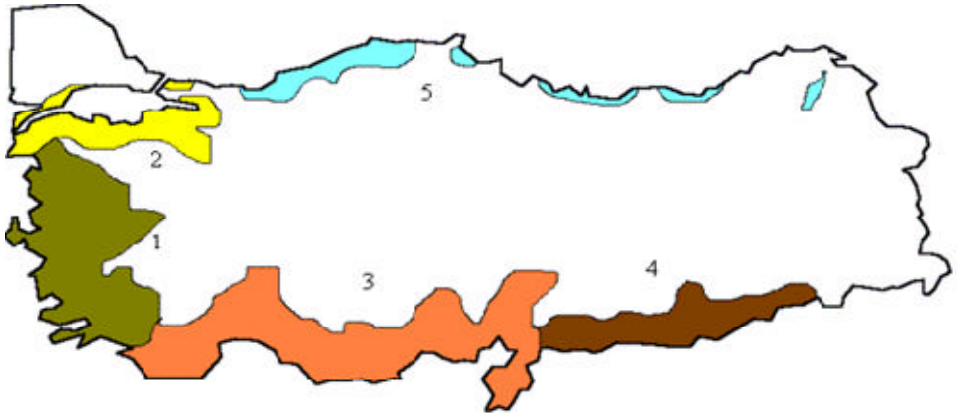
Tarih öncesi devirlerden bugüne zeytin, Akdeniz Medeniyetinin temelini oluşturan, kutsal kitaplarda ve birçok efsanede yer alan simgesel bir ağaç olmuş ve hala bu özelliğini sürdürmektedir.

2.4.2 Türkiye'de ve dünyada zeytincilik

Türkiye'de zeytinciliğin, zeytinin ana vatanında Anadolu olduğu düşünüldüğünde, tarih öncesi devirlerde başlayıp, günümüze kadar devam eden geleneksel bir tarım türü olduğu söylenebilir.

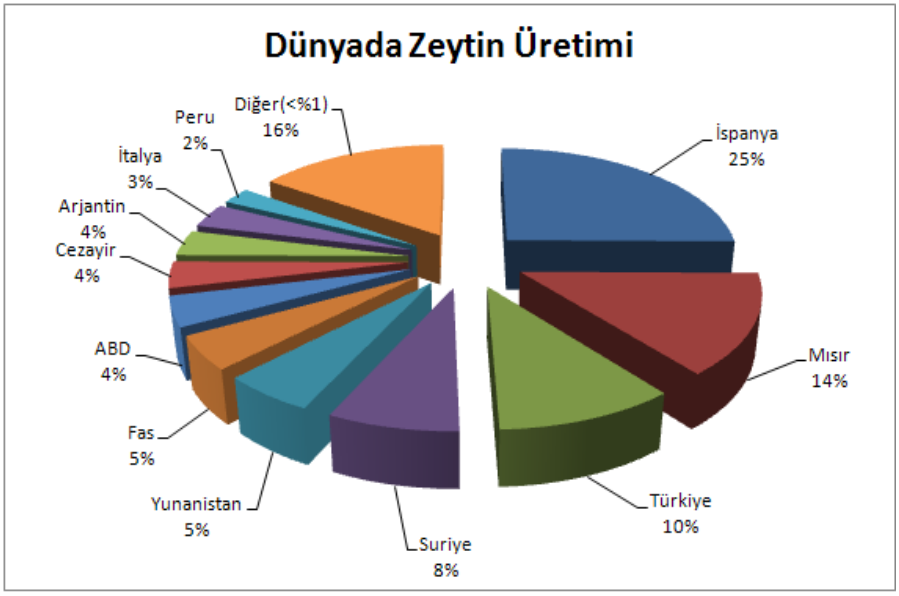
Türkiye'deki işlenen tarım alanlarının %2,2'sini zeytinlikler kapsamaktadır. Günümüzde Türkiye'de kaç tane zeytin ağacı olduğu net bir rakam olarak bilinmemektedir. Her kurumun kendine göre ayrı rakamı vardır. Türkiye'de 2002 yılına kadar tahmin edilen zeytin ağacı sayısı 80×10^6 adetti. Son 6 yılda dikilen zeytin fidanlarıyla bu rakamın iki katını da aşarak 200×10^6 adede dayanmış olduğu varsayılmaktadır. Önümüzdeki 5 yıl içinde de zeytin dikim alanlarınında 7×10^5 hektardan 1×10^6 hektara çıkarılması hedeflenmektedir [23].

Türkiye'de zeytin üretiminin %67,7 'si Ege Bölgesi'nde gerçekleştirilmektedir. Bunu sırasıyla %15,6, %11,3, %5, ve %0,4 ile Marmara, Akdeniz, Güney Doğu Anadolu ve Karadeniz Bölgeleri izlemektedir(Bkz :Şekil 2.9). Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Bursa, Manisa, Çanakkale, Tekirdağ, Hatay da önemli zeytin üreticisi iller olarak sıralanmaktadır [24,25].



Şekil 2.9 : Türkiye'de zeytincilik yapılan yerlerin gösterimi.

Türkiye İhracatçılar Meclisi (TİM) 2008 Aralık ayı ihracat rakamlarına göre zeytin ve zeytinyağı ihracatı 2008 yılında geçen yıla kıyasla yüzde 24,36 azalarak $186{,}6\times10^{6}$ ABD Doları olarak gerçekleşmiştir. Zeytin ve zeytinyağı ihracatının tarım sektörü ihracatı içindeki payı % 1,4, toplam ihracat içindeki payı ise % 0,15 tir. 1991-2009 yılları arasında Türkiye'de sofra zeytini üretim, tüketim, ithalat ve ihracat rakamları Çizelge 2.4'te gösterilmiştir [26].



Şekil 2.10 : Dünyada zeytin üretimi değerleri (2002/3-2008/9 dönemleri ort.) [24].

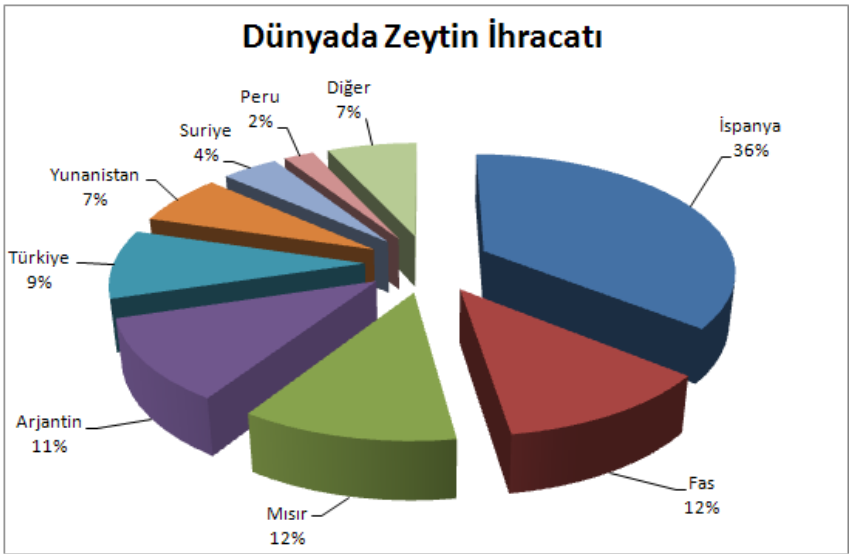
Çizelge 2.4 : Yıllara Göre Türkiye'de Sofra Zeytini Pazarı [24].

Dönem	Üretim (10^3 ton)	Tüketim (10^3 ton)	İhracat (10^3 ton)	İthalat (10^3 ton)
1990/1	150,0	110,0	8,0	0,0
1991/2	110,0	98,0	12,0	0,0
1992/3	100,0	90,0	13,0	0,0
1993/4	100,0	89,0	15,0	0,0
1994/5	180,0	135,0	29,0	0,0
1995/6	120,0	129,0	22,0	0,0
1996/7	185,0	135,0	30,0	0,0
1997/8	124,0	129,0	23,0	0,0
1998/9	178,0	132,0	30,0	0,0
1999/0	150,0	127,0	20,0	0,0
2000/1	224,0	149,0	32,0	0,0
2001/2	85,0	130,0	56,0	0,0
2002/3	165,0	125,0	35,0	0,0
2003/4	125,0	100,0	51,0	0,0
2004/5	240,0	114,0	58,0	0,0
2005/6	280,0	96,0	54,0	0,0
2006/7	240,0	175,0	55,0	0,0
2007/8	200,0	221,0	40,0	0,0
2008/9*	250,0	200,0	60,0	0,0

*2008/2009 dönemi için öngörülen değerlerdir.

Dünyada ise yaklaşık 10×10^6 hektar alanda 1×10^9 zeytin ağacı olduğu tahmin edilmektedir. Dünya zeytin ve zeytin ürünleri pazarının yıllık değeri $1{,}5\times10^9$ ABD Dolarının üzerindedir. Dünyada yıllık sofralık zeytin üretimi ortalama $1{,}8\times10^6$ tondur. Bu pazarın en büyük üreticileri sırasıyla İspanya, Mısır, Türkiye, Suriye, Yunanistan ve Fas'tır (Bkz: Şekil 2.10 ve Çizelge 2.5). En büyük ihracatı gerçekleştiren ülkeler ise sırasıyla İspanya, Fas, Mısır, Arjantin ve Türkiye'dir (Bkz: Şekil 2.11 ve Çizelge 2.6). Türkiye'nin üretimde 3. sırada yer almasına karşın,

ihracatta 5. sırada olmasının nedeni üretilen ürünlerin büyük bir bölümünün yurt içinde tüketilmesi ve bu alanda ithalatın bulunmamasıdır. Pazarın hakimi %51,1 lik payı ile AB (AvrupaBirliği)'dir [24].



Şekil 2.11 : Dünyada zeytin ihracatı değerleri (2002/3-2008/9 dönemleri ort.) [24].

Çizelge 2.5 : Dünyada zeytin üretimi (2002/3-2008/9 dönemleri ortalaması) [24].

Ülke	Üretim (10^3ton/yıl)
İspanya	506,9
Mısır	282,9
Türkiye	208,3
Suriye	151,7
Yunanistan	108,8
Fas	95,0
ABD	85,2
Cezayir	74,8
Arjantin	72,5
İtalya	69,2
Peru	47,6
Diğer	311,7
Toplam	**1872**

Çizelge 2.6 : Dünyada zeytin ihracatı değerleri (2002/3-2008/9 dönemleri ort.) [24].

Ülke	İhracat (10^3ton/yıl)
İspanya	186,30
Fas	61,20
Mısır	59,50
Arjantin	57,80
Türkiye	48,80
Yunanistan	36,00
Suriye	22,30
Peru	11,90
Diğer	35,50
Toplam	**519,30**

2.4.3 Zeytinin sağlık açısından faydaları

Zeytin ve zeytin yağı üzerine yapılan çalışmalarda; zeytinyağı kullanımının kandaki LDL (zararlı kolesterol) düzeyini düşürdüğü, aynı zamanda HDL (faydalı kolesterol) düzeyini ise yükselttiği [27-29] ve kalp hastalıklarını önlediğinden [30] bahsedilmektedir.

Zeytin yağının kanseri önleyici etkisi üzerine yapılan çalışmalarda; yüksek oranda tekli doymamış yağ tüketen kadınların göğüs kanserine yakalanma riskinin daha az olduğunu gözlenmiş [31], prostat kanseri hücrelerinin oluşumunu engellemede yardımcı olabildiği, safra asiti miktarını azaltarak ve DAO (diamin oksidaz adlı enzim) seviyesini yükselterek, anormal hücre artışına ve kansere karşı koruyucu etkilerinin olduğundan bahsedilmektedir [32].

Zeytin yağı ayrıca içerdiği E, A, D, ve K vitaminleri, çocukların ve erişkinlerin kemik gelişimine yardımcı olması, kalsiyumu sabitleyerek kemikleri güçlendirmesi nedeniyle de önemlidir. Zeytinyağının aynı zamanda içerdiği hücre yenileyici özelliklere sahip olan vitaminler sayesinde yaşlılık tedavisinde de kullanıldığı, cildi beslediği ve koruduğundan da bahsedilmektedir [32].

Zeytin ve zeytinyağı, tüm bu ve bu gibi özellikleri dolayısıyla son yıllarda tıpta ve kozmetikte önemli bir konu haline gelmiştir.

2.5. Zeytin Yaprağı, Sağlık Açısından Faydaları ve Kullanım Alanları

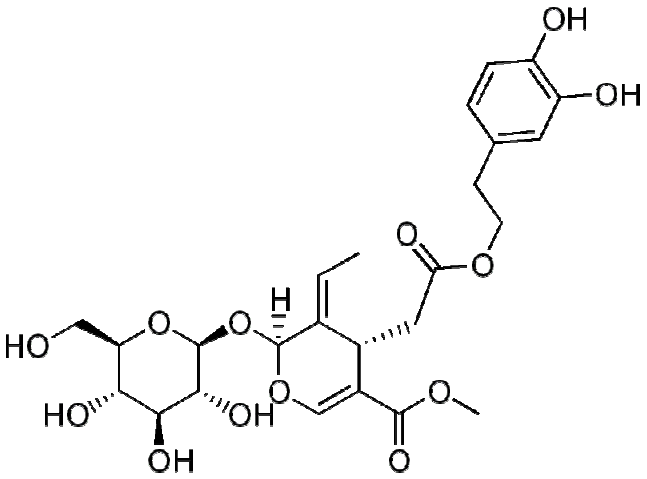
Zeytin ağacının, yalnızca meyvesi ve ondan elde edilen yağı değil; yaprağı da, insan sağlığı yönünden önemlidir. Asırlardır yetiştiği bütün coğrafyada zeytinin yaprağı ilaç olarak kullanılmaktadır. Halen diyabette, hipertansiyonda, kardiyovasküler rahatsızlıklarda, gripte, üriner sistem rahatsızlıklarında, kronik halsizlikte, kötü huylu kolesterolün düşürülmesinde, dejeneratif eklem rahatsızlıkları, sinüzit ve vücudun doğal bağışıklık sisteminin desteklenmesinde kullanılan pek çok marka zeytin yaprağı içerikli bitkisel ilaç piyasada hazır preparatlar olarak satılmaktadır. Kozmetikte zeytin yaprağı özü içeren ürünler antioksidan etkileriyle cilt bakımında kullanılmaktadır [34].

Bugüne kadar zeytin yaprağından, 100'e yakın madde elde edilmiştir. Yaprakta bulunan bu maddeler, zeytin çeşidine uygulanan kültürel tedbirlere, yetiştiği bölgeye ve hasat zamanına göre farklılıklar göstermektedir [33]. Yapılan çalışmalar zeytin yaprağının fenolik maddeler açısından oldukça zengin olduğunu göstermektedir. Zeytin yaprağında bulunan başlıca antioksidan maddeler; oleuropein, hidroksityrosol, rutin, verbaskosid, kateşin, luteolin-7-glukosid ve apigenin-7-glukosid'tir [35].

2.5.1 Oleuropein

Oleuropein, başlıca polifenolik antioksidanlardan biridir ve yaprağın en etken fenolik bileşiğidir. Zeytin ağacının tamamında bulunan ve zeytine acı bir tadını veren bileşiktir. Elenolik asitin bir tirosol esteri olan oleuropeinin kimyasal yapısı Şekil 2.12' te gösterilmiştir.

Oleuropeinin içeriğinde bulunan elenolik asit ve oleuropein türevi olan kalsiyum elenolat, çok çeşitli mikroorganizma gruplarını uzak tutma özelliğine sahiptir. Zeytine uzun ömrünü verdiği söylenen, oleuropein maddesi, Avrupa'da, gençleştirici kremlerden, haplara ve sütlerin özelliklerini artırmaya yönelik olmak üzere, çok geniş alanlarda kullanılmaktadır [34].



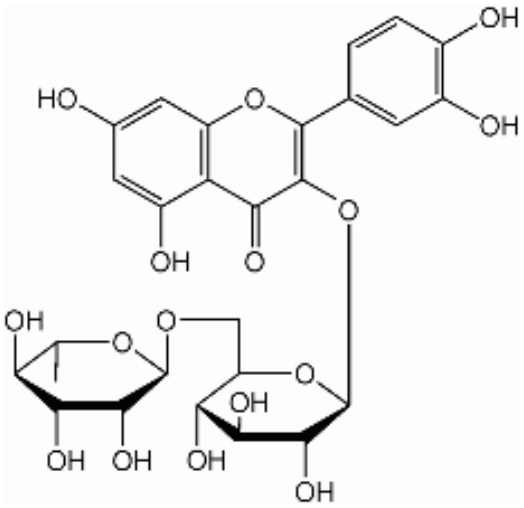
Şekil 2.12 : Oleuropein'in kimyasal yapısı.

Oleuropein yıllardır bilim çalışmalarına konu olmuş bir fenolik bileşiktir. Oleuropein, insan vücudunda bulunan esteraz ve beta-glukozidaz enzimleri tarafından elenoik aside dönüştürülür. Bu bileşik güçlü bir antibakteriyal etkiye sahiptir. Zeytin yapraklarında bulunan oleuropein maddesi bu şekilde antibiyotiklere direnç kazanmış mikroorganizmalar üzerinde etkili olarak bağışıklık sistemini güçlendirmeye yardımcı olur. Ayrıca kan şekeri ve kolestereol seviyesini dengelemeye de yardımcı olan çok değerli bir bileşendir [36].

2.5.2 Rutin

Rutin saf halde sarı yada sarı-yeşil renkte olan iğne kristali şeklinde flavonol quercitin ve disakkarit rutinaz arasında bir glikozittir. Zeytin yaprağının temel antioksidanlarından olan rutinin kimyasal yapısı Şekil 2.13'te gösterilmiştir.

Tüm biyoflavonoidler gibi rutin'in de, vucudun oksijen kullanımı sonucu oluşan doku ve hücrelere zarar veren serbest radikalleri yok etmede etkili olduğu bilinmektedir. C vitamininin etkinliğini arttırmak, katarakta ve serbest radikallerin retinaya zarar vermesine karşı önlemeye yardımcı olmak, kılcal damarları güçlendirerek hemofili hastalığının belirtilerini azaltmak, kolesterolü düşürmek, kan dolaşımını artırmak, uzun süreli kan kayıplarından doğan belirtilerin etkisini azaltmak Rutin'in sağlık açısından faydaları arasında sayılabilir [37].

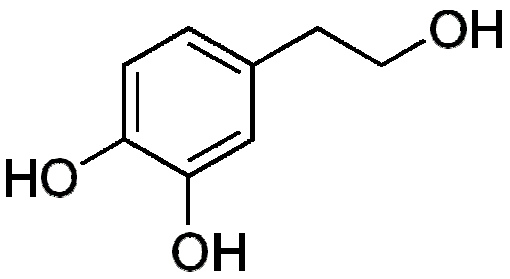


Şekil 2.13 : Rutin'in kimyasal yapısı.

Rutin'in sağlık üzerine etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, yüksek kolesterollü bir diyetle beslenen farelerde, rutin takviyesinin farelerde plazmada ölçülen kolesterol miktarını düşürdüğü tespit edilmiştir [38].

2.5.3 Hidroksitirosol

Zeytinin yaprağında ve diğer tüm bölümlerinde bulunan Hidroksitirosol serbest radikal yakalama aktivitesi en yüksek antioksidanlardan biridir. Zeytin yaprağında bulunan önemli antioksidanlardan biri olan hidroksitirosol'un kimyasal yapısı Şekil 2.14'te gösterilmiştir.

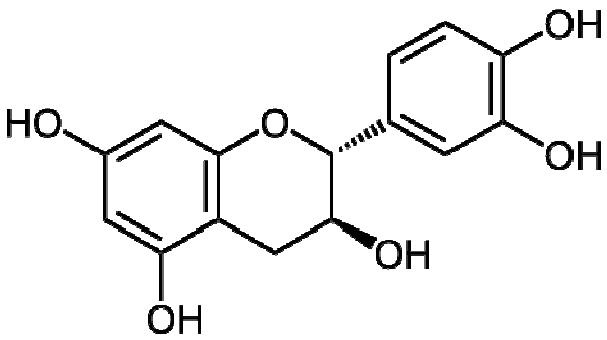


Şekil 2.14 : Hidroksitirosol'un kimyasal yapısı.

Yüksek serbest radikal yakalama aktivitesi dolayısıyla hidroksitirosol birçok bilimsel çalışmaya konu olmuştur. Bu çalışmalara göre çeşitli etki mekanizmaları ile oksidatif stresi azallttığı [39-42], kanser oluşumunu önlemeye yardımcı olduğu [43,44], enflamatuar genlerin kontrol edilmesinde bileşen olarak kullanılabileceğinden bahsedilmektedir [45].

2.5.4 Kateşin

Zeytin yaprağında bulunan flavonoidlerden olan kateşin, aynı zamanda kateşol olarakda adlandırılan bir polifenoldür. Kateşin'in kimyasal yapısı Şekil 2.15'te gösterilmiştir.



Şekil 2.15 : Kateşin'in kimyasal yapısı.

Kateşin'in sağlık açısından yararlarının incelenmesi üzerine bir çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar; Kateşin'in "büyük dörtlü" olarak tabir edilen; felç, kalp rahatsızlıkları, kanser ve diabet üzerinde kayda değer etkiler gösterdiği [46], yaşlanma sürecini yavaşlattığı, oksidatif stresi azalttığı [47], deriyi UV-radyasyonundan koruyarak tümör oluşumunu engellediği [48] gibi etkilerinin olduğunu göstermektedir.

2.6. Zeytin Yaprağı Üzerine Yapılan Çalışmalar

Zeytin yapraklarından fenolik içerikli ekstraktlar eldesinde, karıştırıcı ekstraktörde gerçekleştirilen geleneksel yöntemin dışında; sokslet ekstraksiyonu, süperkritik sıvı ekstraksiyonu [49], süperkritik su ekstraksiyonu [50], subkritik ekstraksiyon [51], süper-ısıtılmış sıvı ekstraksiyonu [52], dinamik ultra-ses yardımlı ekstraksiyon [53], mikrodalga yardımlı ekstraksiyon [54] gibi farklı yöntemlerden bahsedilmektedir. Yüksek fenolik madde miktarı içeren ekstraklar elde edilirken ekonomik açıdan da fayda sağlayacak optimum bir yöntem oluşturma amacıyla yapılan bu çalışmalarda son yıllarda artış gözlenmektedir.

Daha once de bahsedildiği gibi zeytin yapraklarındaki fenolik bileşikler; zeytinin çeşidine, uygulanan kültürel tedbirlere, yetiştiği bölgeye ve hasat zamanına göre farklılıklar göstermektedir. Zeytin yaprağının fenolik madde içeriği ile ilgili yapılan

çalışmalarda elde edilen sonuçlarda bu sebebten dolayı sayısal olarak farklılık gözlenmektedir. Dekanski ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada zeytin yaprağı ekstraktı (EFLA® 943) içindeki fenolik madde içeriğini 197,8±11,3 μg GAE/ g kuru ekstrakt olarak [55], Boudhrioua ve ark. (2008), Chetoui (Tunus)'den topladıkları zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriğini 23,20 ± 0,11 mg CAE/g kuru madde olarak [56], Ferreira ve ark. (2006), Trás-os-Montes (Portekiz)'ten topladıkları zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriğini 12,7 ± 0,040 mg GAE/g kuru ekstrakt olarak [1], Altıok ve ark. 2008, İzmir (Türkiye)'den topladıkları zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriğini 10 mg TA/g yaprak olarak [57] tespit etmişlerdir.

Zeytin endüstrisinin önemli bir yan ürünü olan zeytin yaprakları toplandıktan sonra toz ve böcek gibi dış etkenler için açık hedef haline gelip önemli bileşenlerini kaybetme tehlikesi ile karşı karşıya kalırlar. Yaprakların bozunmadan depolanması amacıyla kurutularak neminin alınması gerekir [56]. Ancak zeytin yapraklarının kurutulması çok kritik bir prosestir. Kurutma süresince yaprağın kalite özellikleri kayda değer ölçüde değişim gösterir. Buna ilave olarak kurutma işlemi enerji yoğun bir işlemdir ve bütün gelişmiş ülkelerde kurutma işlemleri için kullanılan enerji sanayide kullanılan enerji tüketiminin %10-15'ini kapsamaktadır. Dolayısıyla kurutma işlemlerinin optimizasyonu, fosil yakıtların kullanımı ve çevre kirliliği gibi ana problemler açısından da büyük önem taşımaktadır [58].

Hava ile kurutma, mikrodalga ile kurutma ve infrared ile kurutma yaprakların neminin giderilmesi amacıyla kullanılabilecek yeni yöntemlerdendir. Kurutma işlemi yaprakların sadece bozunmadan saklanması için değil, aynı zamanda besin değeri ve fonksiyonel özelliklerinin bozunmadan korunması açısından da önem taşımaktadır. Mikrodalga ve infrared ile kurutma işlemlerinin sebze, meyve ve ilaç sanayii ürünlerinin kalitelerinin bozunmadan korunmasında iyi sonuçlar verdiğinden bahsedilmektedir [56]. Boudhrioua ve ark. 2008, Chetoui (Tunus)'den topladıkları zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriğini infrared ile kurutma ile artığını ve yaprakların renginde normal kurutmaya oranla açılma yönünde herhangi bir değişim gözlemediklerini bildirmişlerdir [56].

Birçok araştırmacı yüksek sıcaklık hassiyeti olan sebzeleri ve yüksek şeker içerikli meyveleri mikrodalga ile kurutmuş ve yaptıkları bu bütün çalışmalarda kurutma süresinin kayda değer ölçüde azaldığını ve çoğu durumda da bu kurutulmuş yiyeceklerin kalitelerinin arttığı veya değişmeden kaldığını gözlemlemişlerdir [59].

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmada Kullanılan Hammaddeler

Deneysel çalışmada Ege Bölgesi Dikili yöresinden toplanan zeytin yaprakları kullanılmıştır. Ekstraksiyonda çözücü olarak aseton (Merck 1.00013), etanol (Merck 1.00983), metanol (Merck 1.06008) ve bu çözücülerin çeşitli oaranlardaki sulu çözeltileri kullanılmıştır. Toplam antioksidan tayini için Folin-Ciacalteu Fenol Reaktifi (Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), Gallik asit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) ve Sodyum karbonat (Horasan Kimya)'tır. Antioksidan aktivitesi tayini için ise *2,2*-Difenil-1-Pikril Hidrazil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) reaktifi kullanılmıştır.

3.2 Deneysel Çalışmada Kullanılan Yöntem

3.2.1 Ekstraksiyon

Katı veya sıvı halde bulunan bir bileşenin bir çözücü kullanılarak, karışmış olduğu diğer katı veya sıvı bileşenlerden kütle aktarımı temeline dayanarak ayırılması işlemine ekstraksiyon adı verilir. Burada kullanılan çözücü ayrılacak maddeye bağlı olarak organik veya inorganik olabilir. İki tür ekstraksiyon işlemi vardır:

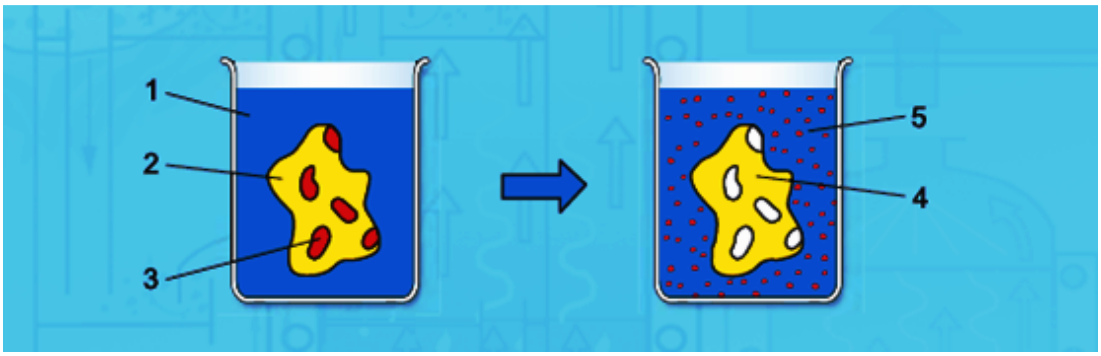
1- Katı-sıvı ekstraksiyonu

2- Sıvı-sıvı ekstraksiyonu

Deneysel çalışmada kullanılan ekstraksiyon yöntemi katı-sıvı ekstraksiyonudur.

3.2.1.1 Katı- sıvı ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu bir katıda bulunan bir veya daha fazla bileşenin, uygun bir çözücü ile temas ettirilerek çözeltiden uzaklaştırılması işlemidir. Katı-sıvı ekstraksiyonu ile katı içinde bulunan bir madde bu maddeyi büyük ölçüde çözebilen bir sıvı yardımıyla alınmaktadır. Fazlar ayrıldıktan sonra sıvının herhangi bir yöntemle uzaklaştırılması ile katı içindeki madde ele geçer [62].



1- Çözücü, 2- Ekstrakte edilecek taşıyıcı madde, 3- Çözünen(geçiş) madde,
4- Ektrakte olmuş taşıyıcı madde, 5- İçinde çözünen bulunan çözücü (çözelti).

Şekil 3.1 : Katı-Sıvı Ekstraksiyonunun şematik gösterimi.

Katı-sıvı ekstraksiyon işlemi başlıca; ekstrakte edilecek maddenin hazırlanması, ayırma işlemi(ekstraksiyon), çözücünün ekstraktan ayrılması ve çözücüden ekstrakte edilen maddenin ayrılması kademelerinden oluşur [62].

Ekstraksiyon işlemine etki eden faktörler şöyle sıralanabilir;

1- Parçacık boyutu : Parçacık boyutu ne kadar küçük olursa çözücünün parçacıklarla temas yüzeyi artar ve dolayısıyla ekstraksiyon hızı artar. Şayet çözücünün hareketi engellenirse parçacık boyutunun etkisi az olur. Bazen çok ince parçacıklar büyük parçacıkların gözeneklerine girer. Bu da çözücünün katıyla temasını da engelleyebilir.

2- Çözücü: Ekstraksiyon için çözücü seçimli olmalıdır. Çözücünün vizkozitesi rahatça devir daim yapacak şekilde düşük olmalıdır. Ekstraksiyon ilerledikçe çözünen konsantrasyonu artar. Ekstraksiyon hızı düşer, konsantrasyon gradyenti ve çözelti viskozitesi artar.

3- Sıcaklık: Ekstraksiyon hızı genellikle sıcaklık artışı ile artmaktadır. Buna bağlı olarak difüzyon konsantrasyonu artar. Bazı hallerde sıcaklığın üst sınırı 2. dereceden etkiye sahip olabilir.

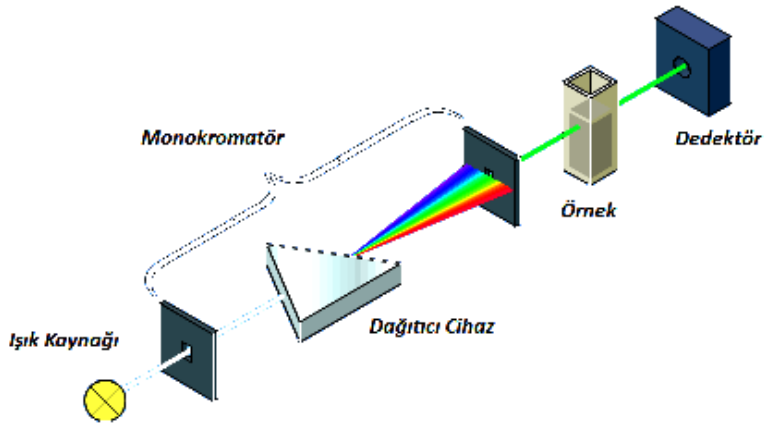
4- Karıştırmanın önemi: Çözücünün karıştırılması önemlidir. Karıştırma girdap difüzyonunu artırır. Katı yüzeyden çözelti içine maddenin transferi artar. Ayrıca ince parçacıkların karışması sedimentasyonu önler ve ara yüzeyde daha etkili ekstraksiyon oluşur [60,61].

3.3 Deneysel Çalışmada Kullanılan Tayin Yöntemleri

3.3.1 Spektrofotometrik yöntem

Bir çözelti içindeki madde miktarını çözeltiden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışık miktarından faydalanarak ölçmede kullanılan düzeneğe absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Temel çalışma prensibi; hazırlanan çözeltiden belirli spektrumlarda ışık geçirilmesi ve bu ışının ne kadarının çözelti tarafından absorblandığının bulunması esasına dayanır. Çözeltinin içerdiği madde miktarı ne kadar fazla ise daha fazla ışın, çözelti tarafından soğurulur. Spektrofotometre, çözeltinin içinden geçebilen çözelti tarafından absorblanmayan ışığın yoğunluğu tespit ederek çözelti içeriğindeki aranan maddenin miktarı hakkında kantitatif bilgi verir.

Bir spektrofotometre düzeneği Şekil 3.2'de görüldüğü gibi başlıca, ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi ve dedektörden oluşur. Dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici veya bir galvonometre ile ölçülür.



Şekil 3.2 : Bir spektrofotometrenin temel bileşenleri.

Spektrofotometreler gönderdiği ışığın dalga boyuna göre çeşitlidir. Gönderilen ışık, küvet'in içindeki örnekten geçtikten sonra fotometreye ulaşır. Spektrometre'den gönderilen ışık ile fotometreye ulaşan ışık arasındaki fark bize absorblanma miktarını verir. Absorblanma terimi absorbans'tır ve Beer-Lambert yasasından hesaplanır.

Lambert-Beer Yasası'na göre;

- Çözeltiye gelen gelen ışık ile çözeltiden çıkan ışık arasında matematiksel bir ilişki vardır.

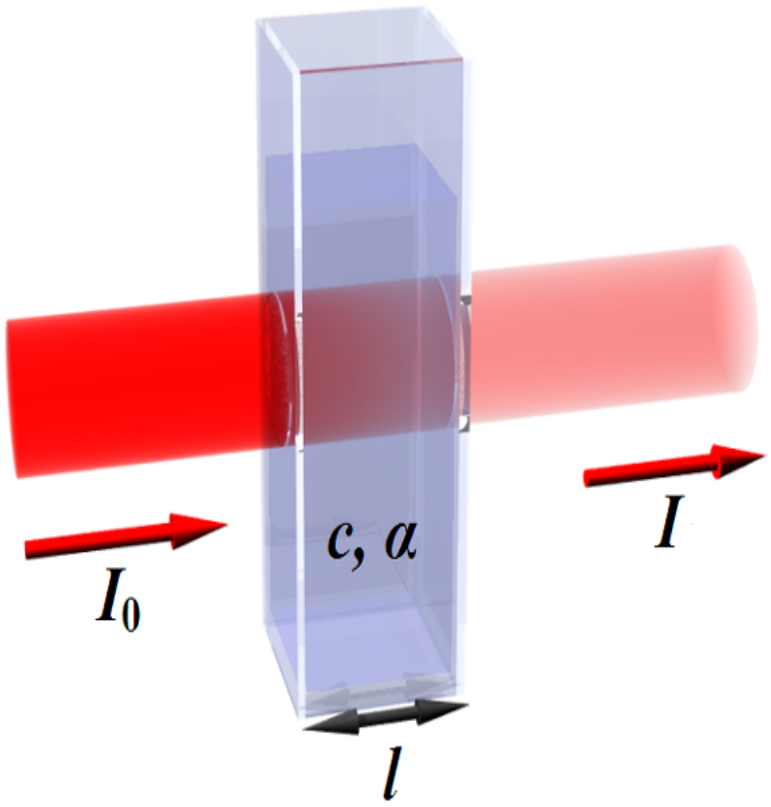
- Absorbans absorblayan maddenin konsantrasyonu ve çözeltiden geçen ışığın katettiği yolun uzunluğu ile doğru orantılıdır.

- Ölçülen maddenin konsantrasyonu ile absorbans değeri arasında doğrusal bir ilişki vardır.Konsantrasyon arttıkça absorbans artar, transmitans azalır.

Lambert-Beer yasasını matematiksel olarak ifade edilirse;

$A = \log(I_0/I) = \xi * c * l$

$A = 2 - \log_{10} \%T$



Şekil 3.3 Spektrofotometrenin temel çalışma prensibi.

Burada;

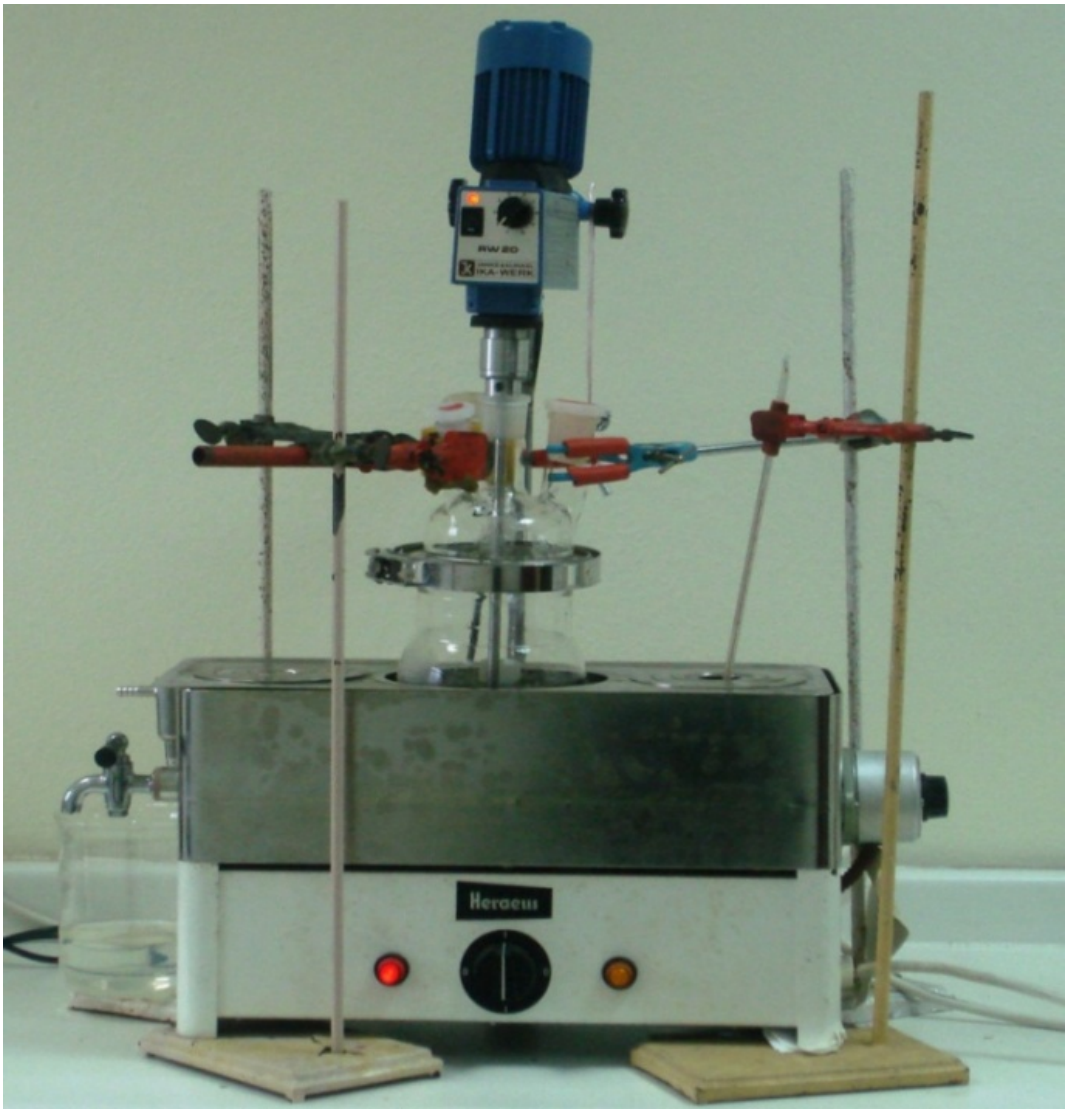
A: absorbsiyon, T: transmitans, I_0: gelen ışının şiddeti, I: geçen ışının şiddeti,
ξ (α): absorpsiyon katsayısı, c: konsantrasyon, l: ışık yoludur.

3.4 Deneysel Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Deneysel çalışmanın yürütülmesi sırasında kullanılan ana cihazlar; ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirildiği karıştırmalı ektraktör ve sokslet ekstraktörü; fotometrik ölçümlerin yapıldığı spektrofotometredir.

3.4.1 Karıştırmalı ekstraktör

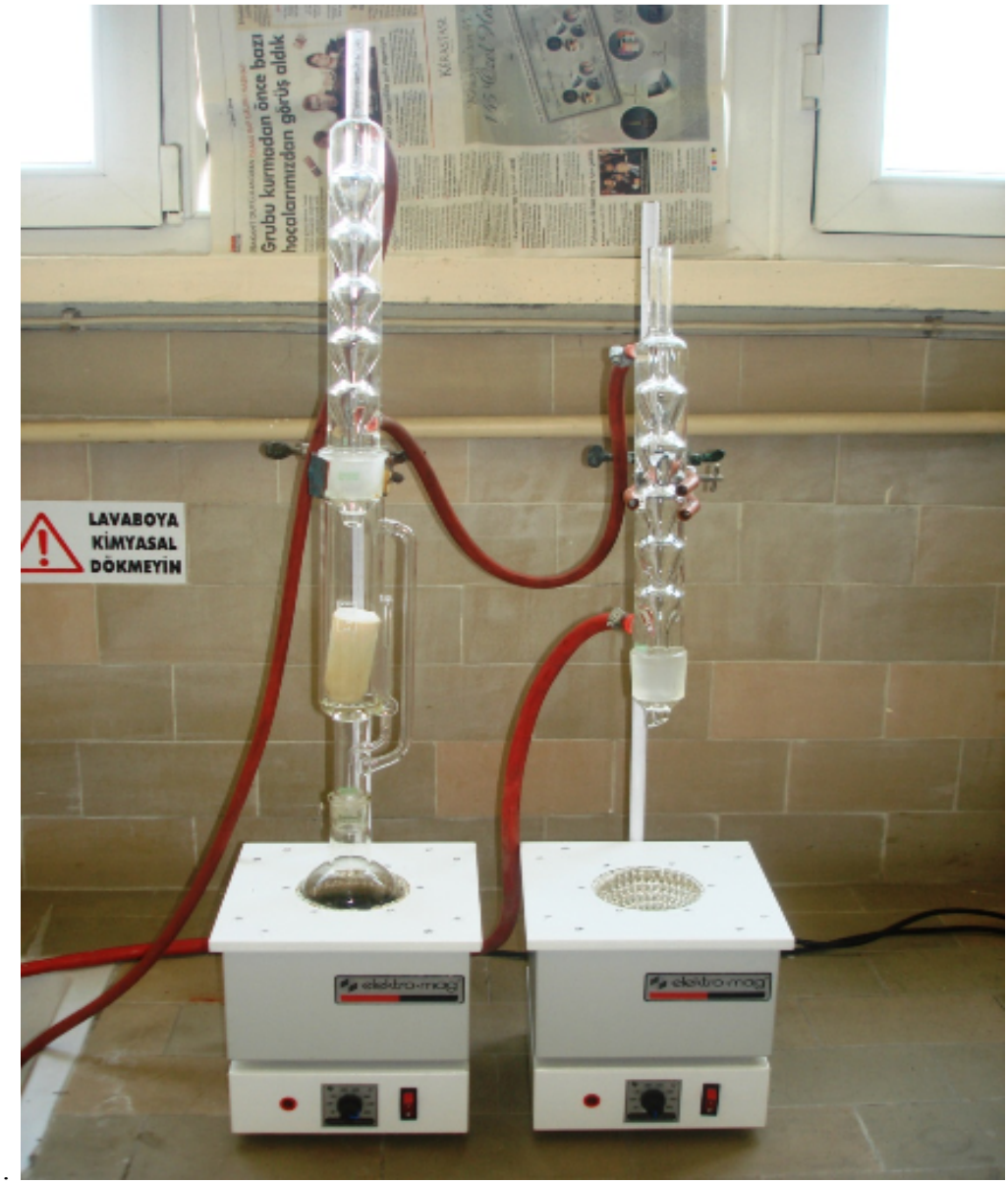
Katı-Sıvı ekstraksiyonu işlemleri Şekil 3.5'te görülen sıcaklık kontrollü karıştırmalı ekstraksiyon düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. Düzenekte Janke &Kunkel RW20 marka karıştıcı, Heraeus P 3K marka su banyosu ve sıcaklık tayini için civalı termometre kullanılmıştır.



Şekil 3.4 : Deneysel çalışmada kullanılan karıştırmalı ekstraksiyon düzeneği.

3.4.2 Sokslet ekstraktörü

Katı-Sıvı sokslet ekstraksiyonu işlemleri Şekil 3.5'te görülen sıcaklık kontrollü Sokslet ekstraksiyonu düzeneğinde gerçekleştirilmiştir. Düzenekte Elekro-Mag M 500 model ısıtıcı ceket kullanılmıştır.



Şekil 3.5 : Deneysel çalışmada kullanılan sokslet ekstraktörü düzeneği.

3.4.3 Spektrofotometre

Örneklerin toplam fenol miktarı ve antioksidan aktivitelerinin ölçümleri tayinleri Şekil 3.6'da görülen SHIMADZU firmasının ürettiği Mini-UV-1240 model UV-Vis spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.6 : Deneysel Çalışmada Kullanılan Spektrofotometre.

3.5 Deneysel Çalışmanın Aşamaları

Deneysel çalışma; çalışmada kullanılacak hammadde ve kimyasalların hazırlanması, toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesine çözücü, çözücü/katı madde miktarı oranı ve sıcaklık etkisinin incelenmesi amacıyla bu parametrelerin değiştirilerek karıştırmalı ekstraksiyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi ve son olarak elde edilen ekstrakların toplam fenolik madde miktarlarının ve aktioksidan aktivitelerinin tayin edilmesi kademelerinden oluşmaktadır.

3.5.1 Hammadde ve kimyasalların hazırlanması

3.5.1.1 Zeytin yapraklarının hazırlanması

Taze toplanmış zeytin yaprakları saplarından ayrılmış ve temizlenmesi amacıyla destile su ile yıkanmıştır. Daha sonra 55˚C'de 24 saat boyunca etüvde (Heraeus T6030) kurumaya bırakılmıştır. Mikrodalga örnekleri ise 30 pişirme gücü kademesinde (180 W) 5+5 dak. boyunca mikrodalgada (Arçelik ARMD550) kurutulmuştur. Kurutulmuş zeytin yaprakları 30+30 sn. boyunca homojen ufak parçalar oluşturulana dek sebze parçalayıcısında (Moulinex 127.2.03) parçalanmıştır. Parçalanan örneklere elek analizi yapılmıştır. Bu amaçla Çizelge 4.1'de boyutları

verilen elekler en büyük boyutlu olan en üste gelecek şekilde sırayla birbirine eklenmiş ve 150 g parçalanmış zeytin yaprağı en üst eleğe konularak elekler elek sistemine (J. Engelsmann, AKT.) konularak 15 dak. süre ile elenmiştir. Parçacıkların %81'inin 1,40 mm-0,63 mm arasında olduğu gözlenmiş ve deneysel çalışmada bu boyut aralığındaki parçacıklar kullanılmıştır.

3.5.1.2 Folin-Ciacalteu fenol reaktifi çözeltisi hazırlanması

10 mL Folin reaktifi 100 mL'lik volumetrik bir balon jojeye konularak üzeri destile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Folin çözeltisinin günlük taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

3.5.1.3 Gallik asit stok çözeltisi hazırlanması

0.500 g gallik asit katısı 100 mL'lik volumetrik bir balon jojeye konur ve üzerine standardı olarak kullanılmak istenilen çözeltiden(%60 etanol-su çözeltisinin stardart eğrisi çıkartılmak isteniyorsa %60'lık etanol-su çözeltisi kullanılır) 10 mL ilave edilerek gallik asit çözdürülür ve üzeri destile su ile 100 mL'ye tamamlanır. Hazırlanan bu gallik asit çözeltisi buzdolabında iki hafta süreyle saklanabilir.

3.5.1.4 Sodyum karbonat çözeltisi hazırlanması

7,5 g sodyum karbonat katısı 100 mL'lik volumetrik bir balon jojeye konarak destile su ile çözülür ve çözelti destile su ile 100 mL'ye tamamlanır.

3.5.1.5 *2,2*-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH) reaktifi çözeltisi hazırlanması

0,024 g *2,2*-difenil-1-pikril hidrazil reaktifi 100 mL'lik volumetrik bir balon jojeye konur ve metanol ile çözülüp yine metanolle 100 mL'ye tamamlanır. DPPH reaktifi çözeltisinin günlük taze olarak hazırlanması gerekmektedir.

3.5.2 Karıştırıcılı ekstraktör ile katı-sıvı ekstraksiyon işlemleri

3.5.2.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde saf aseton ve asetonun %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf etanol ve etanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf metanol ve metanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri ve destile su ayrı ayrı çözücü olarak kullanılarak 19 ayrı çözücü ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha önceden etüvde kurutulmuş ve parçalanmış zeytin yapraklarından 20 g tartılarak üzerlerine her bir çözelti için katı madde/katı çözücü oranı 1:10 olacak şekilde çalışılan çözeltilerden eklenmiştir (Örnek %60'lık etanol-su çözeltisi için 20 g kuru yaprak üzerine 229 mL çözelti eklenmiştir- Her bir çözelti için 1 g kuru yaprak/10 g çözücü oranını sağlayacak şekilde 20 g kuru yaprak üzerine; çözeltilerinde yoğunlukları dikkate alınarak, çözeltilerin 200 g katı çözelti miktarlarının mL cinsinden karşılıkları ilave edilmiştir.). Şekil 3.4'te görülen düzeneğe yerleştirilen bu çözeltilere 25˚C de sürekli 360 devir/dak. ile karıştırılarak 8 saat boyunca kesikli ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.5.2.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde %60'lık etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha önceden etüvde kurutulmuş ve parçalanmış zeytin yapraklarından 20 g tartılarak üzerlerine her bir deneme için katı madde/katı çözücü oranı 1:10, 1:25 ve 1:50 olacak şekilde %60'lık etanol su çözeltisinden sırasıyla 229 mL, 575 mL ve 1150 mL eklenmiştir. Şekil 3.4'te görülen düzeneğe yerleştirilen bu çözeltilerin 25˚C'de sürekli 360 devir/dak ile karıştırılarak ve 10., 20,, 30., 40., 60.dak'larda ve 2,4,6 ve 8. saatlerde örnek alınarak, 8 saat boyunca kesikli ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.5.2.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde %90'lık aseton-su, %60'lık etanol-su ve %70'lik metanol çözeltileri çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha önceden mikrodalga ile kurutulmuş ve parçalanmış zeytin yapraklarından 20 g tartılarak üzerlerine her bir çözelti için katı madde/katı çözücü oranı 1:10 olacak şekilde çalışılan çözeltilerden eklenmiştir. (Örnek: %60 etanol-su çözeltisi için 20g kuru yaprak üzerine 229 mL çözelti eklenmiştir.) Şekil 3.4'te görülen düzeneğe yerleştirilen bu çözeltilere 25˚C'de sürekli 360 devir/dak ile karıştırılarak 8 saat boyunca kesikli ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.5.2.4 Ekstraksiyon işlemine sıcaklık etkisi incelenmesi

Bu deneylerde %60'lık etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha önceden etüvde kurutulmuş ve parçalanmış zeytin yapraklarından 20 g tartılarak üzerlerine katı madde/katı çözücü oranı 1:10 olacak şekilde %60'lık etanol-su çözeltisinden eklenmiştir. Şekil 3.4'te görülen düzeneğe yerleştirilen bu çözeltilere 25˚C - 40˚C ve 70˚C'lerde sürekli 360 devir/dak. ile karıştırılarak ve 10., 20,, 30., 40., 60. dak.'larda ve 2,4,6 ve 8. saatlerde örnek alınarak, 8 saat boyunca kesikli ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.5.3 Sokslet ekstraktörü ile katı-sıvı ekstraksiyon işlemi

Bu deneylerde saf aseton, saf etanol, saf metanol ve saf su çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Daha önceden etüv ile kurutulmuş ve parçalanmış zeytin yapraklarından 20 g tartılarak sokslet düzeneğine yerleştirilmiş, balona ise her bir çözelti için katı madde/katı çözücü oranı 1:10 olacak şekilde çalışılan çözeltilerden konmuştur.(Örnek saf su çözeltisi için 20 g kuru yaprak üzerine 200 mL çözelti eklenmiştir.) Şekil 3.5'te görülen düzeneğe yerleştirilen bu çözeltilere sistem dengeye ulaştıktan sonra 8 saat boyunca kesikli ekstraksiyon uygulanmıştır.

3.5.4. Toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi tayini

3.5.4.1 Toplam fenolik madde miktarı tayini (Folin-Ciacalteu yöntemi)

Örneklerin toplam fenolik madde miktarlarını tayini için modifiye edilmiş Folin-Ciacalteu yöntemi kullanılmıştır [63]. Her örnek için 3 paralel deney ile çalışılmıştır.

Folin-Ciacalteu yöntemi bitki ve yiyeceklerdeki toplam fenolik madddelerin tayini için kullanılan en eski yöntemlerden biridir [66]. Fenolik bileşikler Folin-Ciacalteu Reaktifi (FCR) ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler, bu yüzden ortam sodyum karbonat (%5-10) ile bazikleştirilir. Fenolik bir bileşiğin bazik ortamda bir H^+ kaybetmesi ile fenolat anyonu oluşur. Bu anyonda FCR içindeki molibdat'ı mavi renkli molibden oksite indirger. Oluşan bu mavi rengin yoğunluğu örnek içindeki toplam fenolik madde miktarı ile orantılıdır [66,67].

Tayin edilecek ekstrakt 0,1 mL alınarak üzerine 9,9 mL kendi çözeltisinden eklenerek 1:100 oranında seyreltilir. (Örnek %60'lık etanol-su çözeltisi örneği için 0,1 mL numune üzerine 9,9 mL %60'lık etanol-su çözeltisi eklenmiştir.) Hazırlanan bu seyreltik örnek çözeltisinden bir deney tüpüne 0,3 mL alınarak üzerine 1,5 mL taze hazırlanmış Folin reaktifi çözeltisi ilave edilir, iyice karışması sağlanır. 8 dak. 30 saniye karanlıkta bekletilir. Karanlıktan çıkarılan bu karışımın üzerine 1,2'şer mL %7,5'luk sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek, yine iyice karıştırılır. Karıştırılan örnekler 1 saat 30 dak. süre ile karanlıkta bekletilir. 1,5 saat sonra karanlıktan çıkarılan örneklerin hiç bekletilmeden 765 nm'deki köre (destile su) karşı absorbans değerleri okunur.

-Kontrol numunesinin hazırlanması:

Örnek hazırlanması ve ölçümü aşamasında gerçekleştirilen tüm işlemler burada da aynen uygulanır buradaki tek fark örnek çözeltisi yerine çalışılan örneğin çözeltisi kullanılır.

-Gallik asit standart eğrisi hazırlanması:

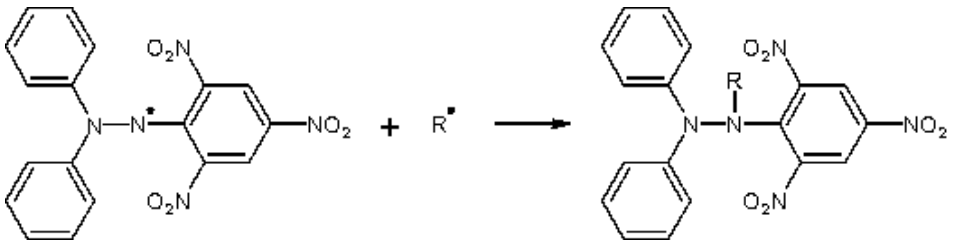
Daha önce hazırlanan gallik asit stok çözeltisinden 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 1,0 ve 2.,0 mL alınarak 100 mL'lik volumetrik balon jojelere konur ve üzerleri stardart eğrisi çıkarılmak istenen çözücü çözeltisi ile tamamlanır, böylece sırasıyla 0, 10, 20, 30, 50 ve 100 mg/L gallik asit içeren çözeltiler elde edilmiş olunur. Hazırlanan bu gallik asit çözeltilerinden deney tüplerine 0,3 mL alınarak üzerlerine 1,5 mL taze hazırlanmış Folin reaktifi çözeltisi ilave edilir, iyice karışması sağlanır. 8 dak. 30 saniye karanlıkta bekletilir. Karanlıkta çıkarılan bu karışımın üzerine 1,2'şer mL %7,5'luk sodyum karbonat çözeltisi ilave edilerek, yine iyice karıştırılır. Karıştırılan gallik asit çözeltileri 1 saat 30 dak. süre ile karanlıkta bekletilir. 1,5 saat sonra karanlıktan çıkarılıp hiç bekletilmeden 765'nm'deki absorbans değerleri köre(destile su) karşı okunur.

3.5.4.2 Antioksidan aktivitesi tayini (DPPH yöntemi)

Örneklerin antioksidan aktivitesi tayini için modifiye edilmiş *2,2*-Difenil-1-Pikril Hidrazil (DPPH) radikali yakalama aktivitesi yöntemi kullanılmıştır [64]. Her örnek için 3 paralel ile çalışılmıştır.

Yöntemde "kararlı" metanolik DPPH çözeltisi kullanılmaktadır. Taze hazırlanmış DPPH çözeltisi 515 nm'de maksimum absorbans veren koyu mor bir renk taşır.

Ortamda antioksidan bulunması durumunda bu koyu mor renkte sönme veya kaybolma görülür. Bu antioksidan molekülleri Şekil 3.7'den de görüldüğü üzere DPPH radikaline saldırarak onu doyurur ve renksiz/ağarmış mor renge dönüştürürler. Bu renk değişimi de absorbansta azalma meydana getirir. Bu azalma örnek içindeki antioksidanların aktivitesi hakkında kantitatif bir fikir verebilmektedir [1].



Şekil 3.7 : Antioksidanların DPPH molekülüne etkisi.

DPPH radikali yakalama aktivitesi tayin edilmek istenen örnek çözeltisinden bir deney tüpüne 0,1 mL alınarak üzerine 3,9 mL taze hazırlanmış DPPH reaktifi çözeltisi ilave edilir, iyice karışması sağlanır. Karıştırılan örnekler 30 dak. süre ile karanlıkta bekletilir. 30 dak. sonra karanlıktan çıkarılan örneklerin hiç bekletilmeden 515 nm'deki absorbansları köre (metanol) karşı okunur.

-Kontrol numunesi hazırlanması:

Örnek hazırlanması ve tayini aşamasında gerçekleştirilen tüm işlemler burada da uygulanır, burada tek fark örnek çözeltisi yerine çalışılan örneğin çözücü çözeltisi kullanılmasıdır.

3.6 Kullanılan Bilgisayar Programları

Deneysel çalışma sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizi ve bu verilere dayanan grafiklerin çizilmesinde Origin Pro 8 SR0 (v 8.0724 –B724) programı kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR

4.1 Zeytin Yapraklarının Kuru Madde Mikrarının Hesaplanması:

Kuru madde miktarını hesaplamak amacıyla 5 g taze yaprak 105˚C'de sabit kütleye gelinceye kadar etüvde kurutulmuştur. Analiz iki paralel deney ile çalışılarak yapılmış ve aşağıdaki formül **(4.1)** kullanılarak yaprakların ortalama kuru madde miktarı (w_{ky}) yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

$$w_{ky} = \frac{m_2}{m_1} \times 100 \qquad \textbf{(4.1)}$$

Burada m_1 kurutulmadan önceki yaprak ağırlığı(g), m_2 kurutulduktan sonraki yaprak ağırlığı(g).

$$w_{ky} = \frac{3,73}{5,00} \times 100 = \%\ 74,68 \pm 0,39$$

4.2 Zeytin Yapraklarının Ortalama Parçacık Boyutunun Hesaplanması

Zeytin yapraklarının ortalama tanecik boyutunun hesaplanması amacıyla elek analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 : Zeytin yapraklarının tanecik boyutu analizi sonuçları.

Elek Boyutu	Elek Üstünde Kalan	% Tanecik Dağılımı	Aralık
2,00 mm	4,18	2,9	>2,00mm
1,40 mm	33,52	22,9	>2,00 - ≤ 1,40
1,00 mm	37,91	25,9	>1,40 - ≤ 1,00
0,85 mm	22,34	15,3	>1,00 - ≤ 0,85
0,63 mm	24,55	16,8	>0,85 - ≤ 0,63
0,42 mm	10,4	7,1	>0,63 - ≤ 0,42
0,30 mm	9,17	6,3	>0,42 - ≤ 0,30
Kalan	4,16	2,8	>0,30
Toplam	146,23		

Taneciklerin %81'i 1,40 mm-0,63 mm arasındadır. Deneysel çalışmada bu parçacık boyutu aralığındaki zeytin yaprakları kullanılmıştır.

4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

Toplam fenolik madde miktarı tayini için Folin-Ciacalteu yöntemi kullanılmıştır.

Spektrofotometrik analiz için örneklerden 3'er, kontroller için ise 2'şer adet paralel deney ile çalışılmıştır.Ölçümler 765 nm dalga boyunda spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Ölçülen absorbanslar ilgili gallik asit eşdeğeri standart eğrisi yardımıyla mg GAE/mL cinsinden ifade edilmiştir. Son sonuçlar ise daha önce Waterman ve Mole [68] ve A. B. Kojic ve ark. [69] da kullandığı formülün modifiye edilmiş şekli ile, g kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g-ky) olarak hesaplanmış ve ifade edilmiştir **(4.2)**.

$$C = c \times (V_2 + V_3) \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1}{m_s} \times \frac{100}{w_{ky}} \qquad \textbf{(4.2)}$$

Burada;

C : Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/g-ky),

c : Toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/mL).

V_1 : Kullanılan çözücü miktarı (mL),

V_2 : Eksraksiyon çözeltisinden seyreltik çözelti hazırlamak için alınan ekstrakt miktarı (mL),

V_3 : Seyreltmek için kullanılan çözücü miktarı (mL),

m_s, ekstraksiyonda kullanılan yaprak miktarı (g),

w_{ky} : Yaprakların yüzde kuru madde miktarını ifade etmektedir.

Örnek hesap; Ek-2 Çizelge B.1'den %100 aseton çözücüsü için ölçülen absorbans değeri 0,201 olarak görülmektedir. Ek-1 Şekil A.1'te bulunan saf aseton için gallik asit standart eğrisi kullanılarak;

$$c = \frac{0{,}201 + 0{,}00498}{0{,}01237}$$

Buradan c = 0,01665 mg GAE/mL olarak bulunur. Bu değer formülde yerine konursa;

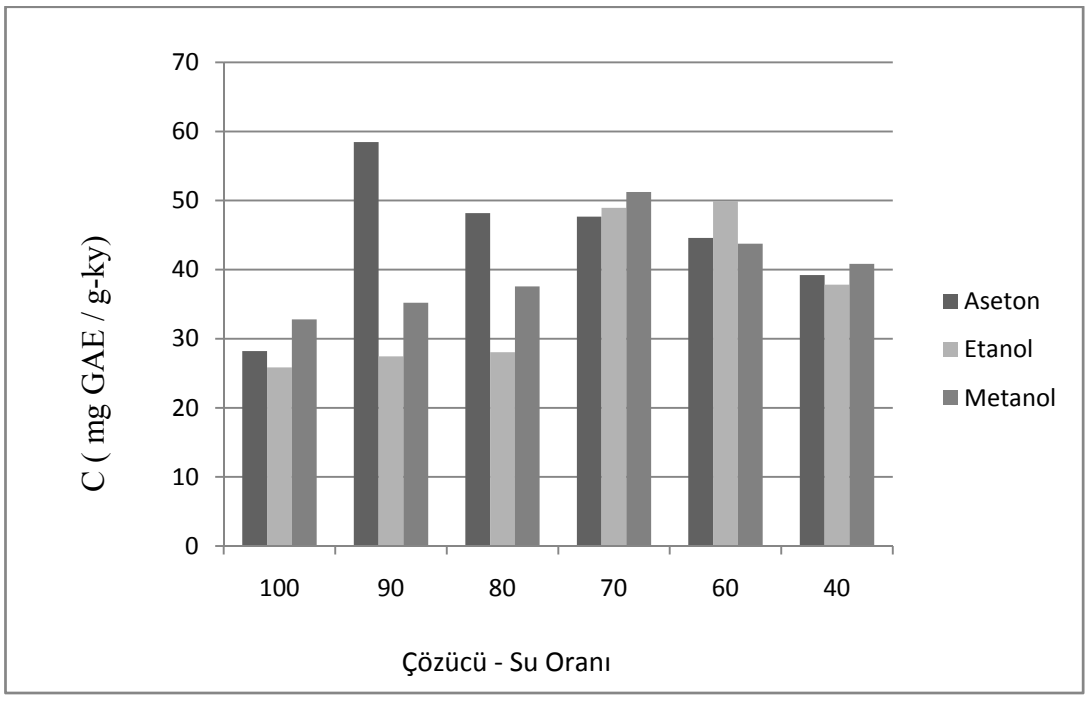
$$C = 0{,}01665 \times (0{,}1 + 9{,}9) \times \frac{253}{0{,}1} \times \frac{1}{20} \times \frac{100}{74{,}68}$$

Saf aseton ile ekstrakte edilmiş örneklerin toplam fenolik madde içerikleri;

28,20 ±1,56 mg GAE/g-ky olarak bulunur.

4.3.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisi incelenmesi deneyleri

Bu deneylerde saf aseton ve asetonun %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf etanol ve etanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf metanol ve metanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri ve destile su ayrı ayrı çözücü olarak kullanılarak 19 ayrı çözücü ile 25˚C de 1/10 katı madde/çözücü oranında çözücü kullanılarak etüv ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.1'de verilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1 : Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisinin grafiksel gösterimi.

Şekil 4.1'de de görüldüğü üzere en yüksek fenolik madde miktarı içeren ekstraklar sırasıyla; saf aseton ve asetonun sulu çözeltileri içinde %90 aseton-su, saf metanol ve metanolün sulu çözeltileri arasında %70 metanol-su ve saf etanol ve etanolün sulu çözeltileri arasında %60 etanol-su çözücüleri ile elde edilenlerdir.

Çizelge 4.2 : 19 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Çözücü		c^a ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	± SD^b	C^c (mg GAE/g-ky)	± SD^d
Aseton	**%100**	16,65	0,92	28,20	1,56
	%90	35,50	0,53	58,46	0,90
	%80	29,99	0,68	48,19	1,15
	%70	30,30	1,31	47,67	2,22
	%60	28,96	1,31	44,58	2,22
	%40	26,63	0,68	39,22	1,15
Etanol	**%100**	15,27	0,96	25,86	1,63
	%90	16,66	0,53	27,44	0,90
	%80	17,46	0,96	28,05	1,62
	%70	31,11	1,31	48,94	2,22
	%60	32,42	0,60	49,91	1,01
	%40	25,68	1,09	37,82	1,84
Metanol	**%100**	19,37	0,69	32,80	1,17
	%90	21,38	0,53	35,21	0,90
	%80	23,39	0,74	37,58	1,25
	%70	32,57	0,65	51,24	1,11
	%60	28,42	0,62	43,76	1,05
	%40	27,73	1,18	40,83	2,00
Su	**%100**	6,96	0,60	9,32	1,02

[g] *Örneklerin mg/ml cinsinden gallik asit eşdeğerleri (c).*

[h] *Örnek mg/ml cinsinden gallik asit eşdeğerlerinin standart sapmaları.*

[i] *Örneklerin g kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri (C).*

[j] *Örneklerin g kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerinin standart sapmaları.*

Saf çözücülerin zeytin yapraklarınından fenolikler eldesinde etkili sonuçlar vermediği ve sulu çözeltilerin saf çözeltilere göre daha iyi sonuçlar verdiği ancak çözücülere göre belirli su oranlarında maksimumlar verip, farklı dağılımlar gösterdiği gözlenmiştir. Sulu çözeltilerin saf çözeltilere oranla daha iyi sonuçlar vermesi suyun yaprak yapısında şişme meydana getirerek diffüzyonu arttırmaası ile açıklanabilir.

Altıok ve ark. zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriklerinin aseton ve asetonun sulu çözeltileri içinde % 90 aseton-su çözeltisi ile, etanol ve etanolün sulu çözeltileri içinde % 70'lik etanol-su çözeltisi en yüksek değerlere sahip olduklarını gözlemlemişlerdir [57]. R. Japon-Lujan ve ark. etanol ve etanolün sulu çözeltileri arasında en yüksek toplam fenolik madde miktarlarını super-ısıtılmış sıvı ekstraksiyon için %70'lik etanol-su çözeltisi ile, ultra-ses yardımlı ekstraksiyon için %60'lık etanol-su çözeltisi ile, mikrodalga yardımlı ekstraksiyon için %80'lik etanol-su çözeltisi ile elde etmişlerdir [70]. M. Alothman ve ark. çeşitli tropikal meyvelerden fenolik ektraklar elde etmek için yaptıkları denemelerde %70'lik etanol-su ve % 70'lik metanol-su çözeltilerinin kendi çözücü türleri içinde en iyi sonuçları verdiğini gözlemlemişlerdir [64].

Daha önce yapılan çalışmalarda meyve ve bitkilerden fenolik maddelerin ekstraktlarının eldesinde %50-%80 arasında alkol-su çözeltilerinin en uygun çözücüler olduklarından bahsedilmektedir. Meyve ve bitkilerden fenolik maddelerin ekstraktlarının eldesinde metanolik çözeltiler daha iyi sonuçlar vermelerine karşın, sanayi üretiminde insan sağlığı kısıtlamaları nedeniyle daha temiz bir solvent olan etanol kullanılmaktadır.

4.3.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde % 60'lık etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. 765 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.2, B.3, B.4'te gösterilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'te verilmiştir.

Çizelge 4.3 : 1 g/10 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

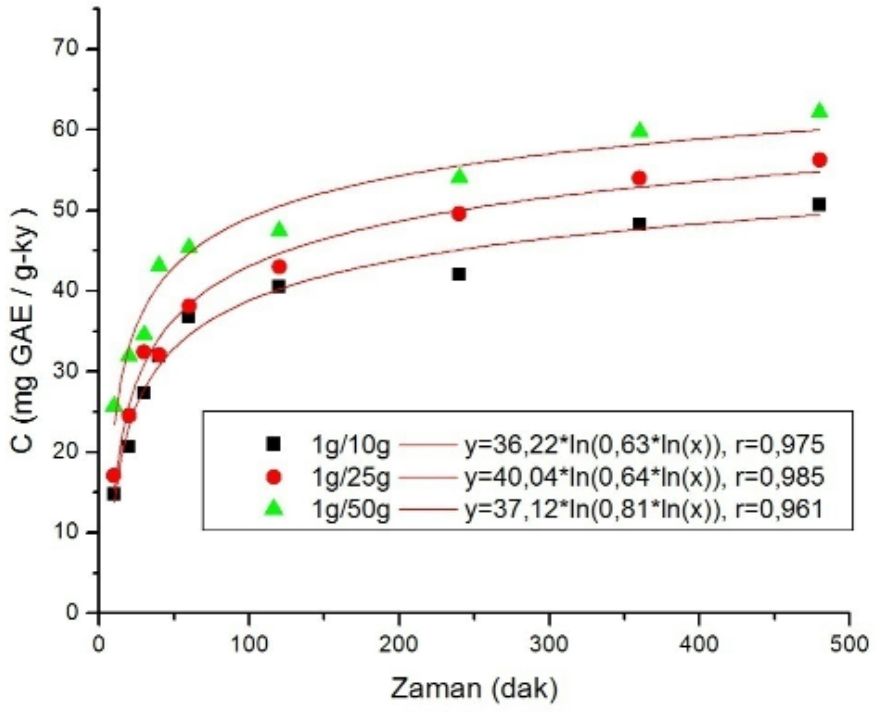
Zaman (dak)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/ mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	9,63	0,89	14,76	1,50
20	13,46	0,29	20,64	0,49
30	17,82	0,94	27,33	1,59
40	20,78	0,74	31,87	1,25
60	23,91	1,22	36,66	2,06
120	26,43	0,50	40,52	0,84
240	27,38	2,28	41,98	3,84
360	31,44	1,05	48,21	1,77
480	33,02	0,82	50,64	1,39

Çizelge 4.4 : 1 g/25 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/ mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	3,70	1,05	14,19	3,70
20	5,41	0,63	20,74	5,41
30	6,01	1,14	23,05	6,01
40	6,01	0,52	23,05	6,01
60	7,78	0,85	29,82	7,78
120	9,42	0,44	36,10	9,42
240	12,94	0,58	49,61	12,94
360	13,54	0,54	51,92	13,54
480	14,68	0,33	56,27	14,68

Çizelge 4.5 : 1 g/50 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	3,28	0,49	25,67	1,15
20	4,07	0,51	31,90	1,19
30	3,67	0,27	28,77	0,63
40	3,75	0,57	29,35	1,34
60	4,54	0,86	35,57	2,03
120	5,77	0,87	45,16	2,04
240	6,41	0,49	50,19	1,16
360	6,74	0,60	52,82	1,42
480	7,94	0,54	62,21	1,28

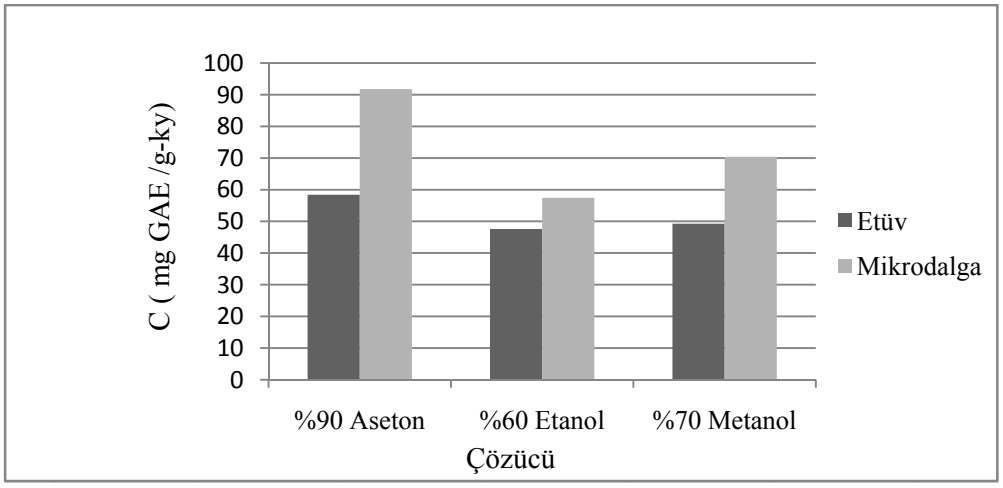


Şekil 4.2 : Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin grafiği.

Şekil 4.2'den de görüldüğü gibi çözücü miktarı artıkça ekstrakte olan fenolik madde miktarı da artmaktadır. Daha önce meyve ve bitkilerden fenolik içerikli ekstraktlar elde etmek için yapılan çalışmalarda da ekstraksiyon işleminin çözücü miktarının artışından pozitif etkilendiği görülmüştür [69,71-73]. Ekstraktların fenolik içeriklerinin çözücü miktarının arttırılması ile artış göstermesi kütle transferi ilkeleri ile açıklanabilir. Yaprak içindeki kütle transferini düşündüğümüzde itici güç konsantrasyondur. Daha düşük katı madde/çözücü oranları daha yüksek olan konsantrasyon diffüzyonu arttırır [72]. Ancak daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak diffüzyona artışına bağlı olarak toplam fenolik madde miktarlarındaki bu artış çözücü miktarının artışı ile orantılı değildir [71-73]. Uygun bir katı madde/çözücü oranı tespiti amacıyla yaptığımız çalışmada; çözücü oranı 2,5 kat arttırıldığında elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarları 1 g/10 g katı madde/çözücü oranı ile ekstrakte edilenlere oranla %10; çözücü oranı 5 kat arttırıldığında ise elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının ise %19 artış gösterdiği gözlenmiştir.

4.3.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisi incelenmesi

Bu deneylerde en yüksek toplam fenolik madde miktarlarının ölçüldüğü çözücüler olan %90'lık aseton-su, %60'lık etanol-su ve %70'lik metanol çözeltileri çözücü olarak kullanılarak etüv ve mikrodalga ile kurutulan zeytin yaprakları ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.6'da gösterilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.3 : Ekstraksiyon işlemine kurutma şeklinin etkisi grafiği.

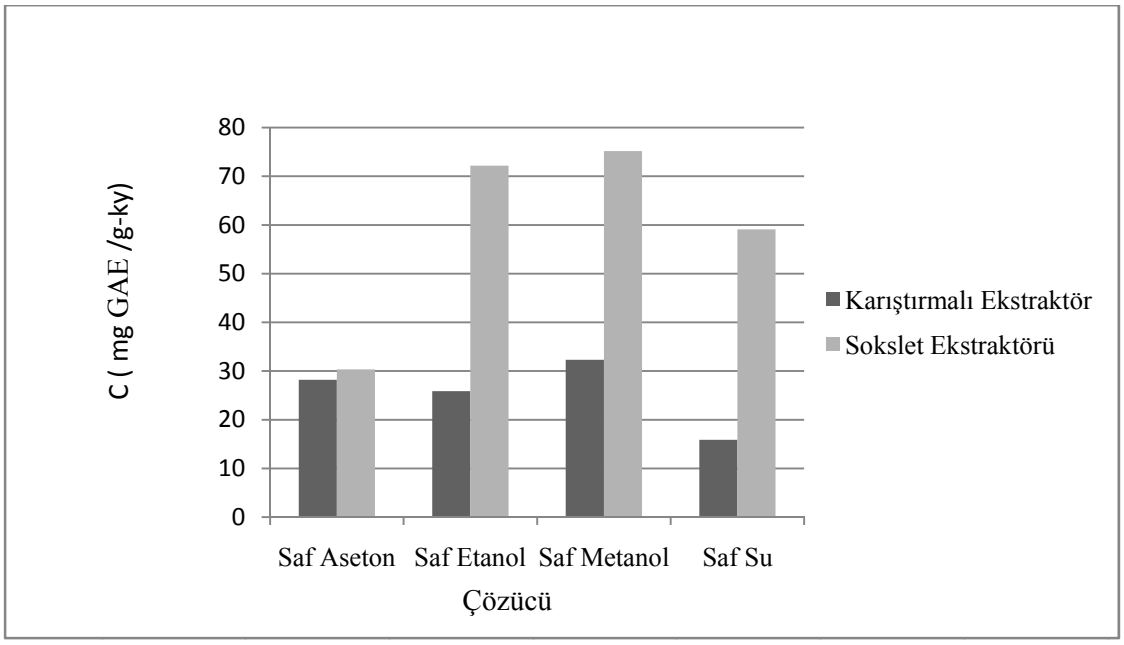
Çizelge 4.6 : Farklı kurutma şekilleri ile kurutulan zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Kurutma Şekli	Çözücü	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
Etüv	%90 Aseton	35,50	0,53	58,46	0,90
	%60 Etanol	32,42	0,60	49,91	1,01
	%70 Metanol	32,57	0,65	51,24	1,11
Mikrodalga	%90 Aseton	55,73	0,81	91,78	1,33
	%60 Etanol	37,30	0,85	57,43	1,30
	%70 Metanol	44,74	0,73	70,38	1,15

Şekil 4.3'den de görüldüğü gibi mikrodalga ile kurutulan örnekler daha fazla fenolik madde içermektedir. Çalışmaya paralel olarak Boudhrioua ve ark. zeytin yapraklarından fenolik içerikli ekstraklar elde etmek için yaptıkları çalışmada mikrodalga ile kurutttukları zeytin yapraklarından elde edilen fenolik içeriğin taze (kurutulma işlemi uygulanmamış) zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktlara oranla daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir [56]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, daha önce yapılan çalışmalardaki yargıların aksine meyvelerdeki antioksidan içeriğinin mikrodalga ile kurutmada azalma göstermediğinden, hatta mikrodalga ile kurutma işleminin ekstraktlardan daha yüksek miktarlarda fenolik bileşiklerle elde edilebilmesine olanak sağladığından bahsedilmektedir [59].

4.3.4 Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şekli etkisi incelenmesi

Bu deneylerde saf aseton, saf etanol, saf metanol ve saf su çözücü olarak, 1 g/10 g katı madde/çözücü oranı kullanılarak ekstraksiyon işlemleri ise Sokslet ekstraktörü ve karıştırıcılı ekstraktör kullanılarak gerçekleştirilmiş, spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.7'de gösterilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.4 Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şekli etkisinin grafiği.

Çizelge 4.7 : Sokslet ve karıştırmalı ekstraktörden elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

K.Ş.[a]	Çözücü	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
K.E.[b]	**Saf Aseton**	16,65	0,92	28,20	1,17
	Saf Etanol	15,27	1,08	25,86	1,37
	Saf Metanol	19,07	0,79	32,30	1,00
	Saf Su	14,75	0,60	24,99	0,66
S.E.[c]	**Saf Aseton**	17,90	1,05	30,32	1,21
	Saf Etanol	42,62	1,02	72,19	1,12
	Saf Metanol	44,38	0,59	75,16	0,65
	Saf Su	44,13	1,34	59,08	1,70

[a] Karıştırma şekli, [b]Karıştırmalı ekstraktör, [c] Sokslet ekstraktörü.

Şekil 4.4'den de görüldüğü üzere Sokslet ekstraktörü ile ekstrakte edilen örneklerin karıştırmalı ekstraktöre göre daha iyi sonuçlar vermektedir. Ancak sokslet ekstraktörü çözücünün buharlaşıp tekrar yoğunlaşarak ekstraksiyon işlemine katılması esasına dayandığı için karıştırmalı ekstraktöre oranla sıcaklık farkına

sahiptir. Yüksek fenolik içeriğin bu sıcaklık farkından kaynaklanadığı düşünülmektedir. Kaynama noktasında çalışan sokslet ekstraktörü ile çalışmanın ekstraktların fenolik içeriğini arttırdığı daha önce yapılan çalışmalarla da paralellik göstermektedir [74]. Aynı zamanda sokslet ekstraktöründe çözücü buharlaşıp yoğunlaşarak tekrar tekrar saf olarak yapraklarla temas etmeside sokslet ekstraktörünün karıştırmalı ekstraktöre oranla daha iyi sonuçlar vermesini açıklamak için kullanılabilir.

4.3.5 Ekstraksiyon işlemine sıcaklık etkisi incelenmesi

Bu deneylerde %60'lik etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak, 1 g/10 g katı madde/çözücü oranı ile 25, 40 ve 70˚C'lerde ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.8, B.9 ve B.10'da gösterilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.8, 4.9 ve 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.8 : 25˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

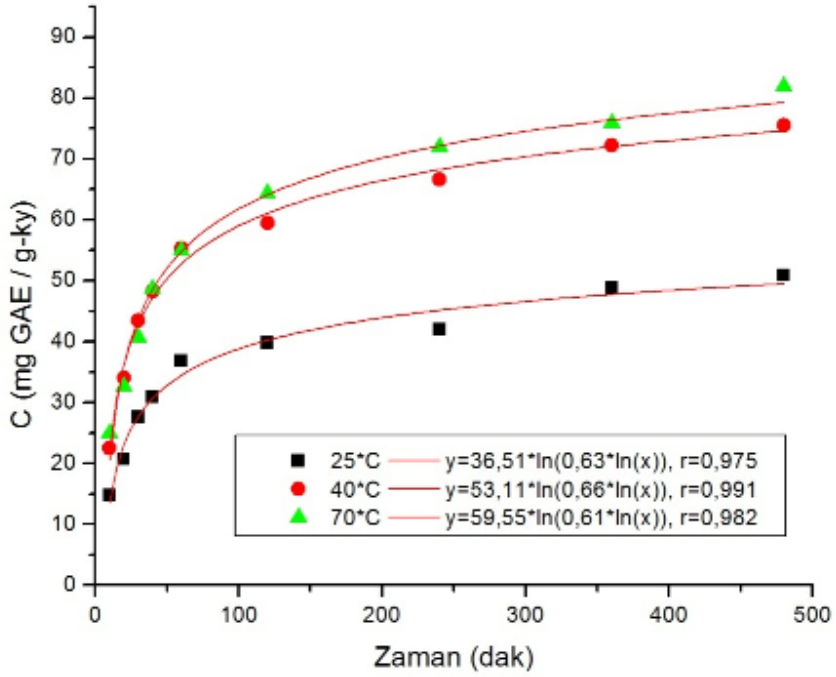
Zaman (dak.)	**c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)**	**±SD**	**C (mg GAE/ g-ky)**	**±SD**
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	9,63	0,89	16,24	1,50
20	13,46	0,29	22,71	0,49
30	17,99	0,87	30,34	1,47
40	20,16	0,72	34,00	1,22
60	24,04	0,93	40,55	1,57
120	25,93	0,50	43,74	0,84
240	27,38	2,28	46,18	3,84
360	31,84	0,85	53,70	1,44
480	33,19	0,85	55,98	1,44

Çizelge 4.9 : 40˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak.)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	14,63	0,87	23,02	1,36
20	22,09	0,52	34,75	0,82
30	28,26	0,66	44,46	1,04
40	31,34	0,61	49,30	0,96
60	35,90	1,16	56,48	1,82
120	38,67	0,25	60,83	0,40
240	43,29	0,48	68,10	0,76
360	46,91	0,60	73,80	0,95
480	49,03	0,52	77,14	0,81

Çizelge 4.10 : 70˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak.)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	16,21	1,04	25,50	1,63
20	21,19	0,97	33,34	1,53
30	26,43	0,50	41,57	0,78
40	31,63	1,58	49,77	2,48
60	35,66	1,04	56,09	1,63
120	41,80	0,62	65,76	0,97
240	46,76	1,90	73,56	2,99
360	49,28	0,55	77,52	0,86
480	53,20	0,54	83,70	0,84



Şekil 4.5 : Ekstraksiyon işlemine sıcaklığın etkisinin grafiği.

Şekil 4.5'ten de görüldüğü gibi örneklerin toplam fenolik madde miktarları sıcaklık arttıkça artış göstermektedir, ancak bu artış sıcaklık yükseldikçe önemli ölçüde azalmaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda meyve ve bitkilerden fenolik içerikli ekstraklar eldesinde ekstraksiyon sıcaklığı arttıkça daha fazla fenolik maddenin ekstrakte edildiği gözlenmiştir [74,75]. Toplam fenolik madde miktarının sıcaklık artışı ile artış göstermesi kütle transferi prensipleri ile açıklanabilir. Sıcaklık artışı ile çözücünün yüzey gerilimi ve vizkositesi düşer bu iki faktör diffüziviteyi dolayısıyla kütle aktarımını arttırır. Ayrıca sıcaklık artışı ile çözücünün polaritesi azalır dolayısıyla çözücü yaprağın polaritesi düşük fenoliklerini de çözebilir hale gelir [75].

Pathirana ve ark. buğdaydan fenolik maddelerin ekstraksiyonunu optimize etmek için yaptıkları çalışmada yaptıkları çalışmada ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının sıcaklık artışı ile 60˚C'ye kadar artış gösterdiğini bu sıcaklıktan sonra elde edilen fenolik içeriklerde azalma belirtmişler [76], Roudsari ve ark.kanola unundan fenolik ekstraklar eldesinde sıcaklık artışı ile daha yüksek fenolikler elde etmişler ve herhangi bir sıcaklık limiti belirlememişler [75], Bucic´-Kojic´ ve ark. üzüm çekirdeklerinden fenoliklerin elde edilmesinde sıcaklık artışı ile toplam fenolik madde miktarlerında artış gözlemişler 25˚C-80˚C sıcaklık aralığında en yüksek

fenolik içerikleri 80˚C ile gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu elde edilmiştir [69]. Bu sonuçlarda yaptığımız çalışma ile paralellik göstermektedir.

4.3.6 En uygun ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilen deney

Çalışmanın daha önceki bölümlerinde yapılan deneylerin sonuçları göz önüne alınarak; %60 etanol-su çözeltisi, 1 g/10 g katı madde/çözücü oranında, etüv ve mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40˚C'de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, spektrofotometrede 765 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri EK-2'de bulunan Çizelge B.11 ve B.12'de gösterilmiştir. Örneklerin gram kuru yaprak başına mg gallik asit eşdeğerleri de Çizelge 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

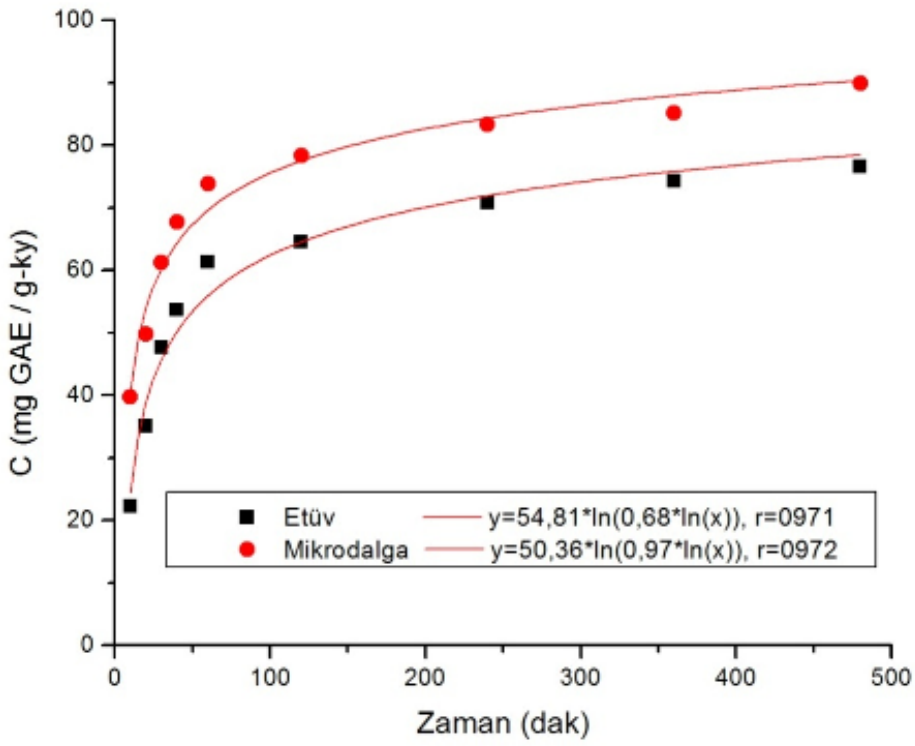
Çizelge 4.11 : Etüv ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak.)	**c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)**	**±SD**	**C (mg GAE/ g-ky)**	**±SD**
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	14,15	1,09	22,26	1,72
20	22,31	0,49	35,10	0,77
30	30,31	0,79	47,68	1,24
40	34,11	0,61	53,66	0,96
60	38,95	0,87	61,27	1,36
120	41,04	0,40	64,56	0,63
240	44,99	0,81	70,77	1,28
360	47,19	0,94	74,24	1,47
480	48,69	0,69	76,59	1,09

Şekil 4.6'dan da görüldüğü gibi mikrodalga ile kurutma toplam fenolik madde miktarını artış yönünde etkilemektedir. Çalışılan sistem için en uygun ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi ile gerçekleştirilen bu deneyde mikrodalgada kurutma ile etüvde kurutmanın farkı bir daha gözlenmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalarda benzer çözücü [70], katı madde/çözücü oranı [69,71-73], sıcaklık [74,75] ve kurutma şekli [56] sonuçlarına varılmıştır.

Çizelge 4.12 : Mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların mg cinsinden gallik asit eşdeğerleri.

Zaman (dak.)	c ($\times 10^{-3}$) (mg GAE/mL Ekstrakt)	±SD	C (mg GAE/ g-ky)	±SD
0	0,00	0,00	0,00	0,00
10	25,24	0,91	39,71	1,44
20	31,66	0,95	49,80	1,50
30	38,96	2,26	61,30	3,56
40	43,06	1,04	67,74	1,64
60	46,91	0,36	73,80	0,57
120	49,82	0,64	78,38	1,00
240	52,98	0,65	83,35	1,02
360	54,17	0,68	85,21	1,06
480	57,18	1,11	89,95	1,74



Şekil 4.6 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisinin grafiği.

4.3.7 Gallik asit standart eğrileri

Folin-Ciacalteu yönteminde toplam fenolik madde miktarı çoğunlukla gallik asit eşdeğeri olarak hesaplanmaktadır(Örnek: mg gallik asit/g kuru madde). Folin-Ciacalteu yönteminde tüm fenolik maddelerin ölçülmesine rağmen gallik asit eşdeğeri olarak verilmek istenmesinin nedeni gallik asidin diğer fenollere göre daha ucuz olarak saf madde halinde temin edilebilmesi ve kararlı oluşudur. Deneyde kullanılan 19 ayrı çözücü için gallik asit standart eğrileri EK-1 de bulunan Şekil A.1-2-3-4-5-6-7-8-10-11-12-13-14-15-16-17-18 ve A.19'da gösterilmiştir.

4.4 Aktioksidan Aktivitesi Tayini

Antioksidan tayini için *2,2*-Difenil-1-Pikril Hidrazil(DPPH) radikali yakalama aktivitesi yöntemi kullanılmıştır.

Spektrofotometrik analiz için örneklerden 3'er, kontrol çözeltilerinden ise 2'şer adet paralel çözeltiler kullanılmıştır. 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbanslardan aşağıdaki formül **(4.3)** yardımıyla örneklerin DPPH radikali yakalama aktiviteleri, dolayısıyla antioksidan aktiviteleri hesaplanmış ve ilgili çizelgelerde gösterilmiştir.

$$\%\ \text{DPPH Radikali Yakalama Aktivitesi} = \frac{\text{Kontrol}_{\text{Abs}}\text{-Örnek}_{\text{Abs}}}{\text{Kontrol}_{\text{Abs}}} \times 100 \qquad \textbf{(4.3)}$$

4.4.1 Ekstraksiyon işlemine çözücü etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde saf aseton ve asetonun %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf etanol ve etanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri, saf metanol ve metanolün %90-80-70-60 ve %40'lık sulu çözeltileri ve destile su ayrı ayrı çözücü olarak kullanılarak 19 ayrı çözücü ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.13'de gösterilmiştir.

Şekil 4.7'den de görüldüğü gibi örneklerin aktioksidan aktiviteleri toplam fenolik madde miktarları ile paralellik göstermekte ve kendi çözücü türleri içinde en yüksek antioksidan aktiviteye sahip çözücüler, toplam fenolik madde miktarlarında olduğu gibi %90 aseton-su, %70 metanol-su ve %60 etanol-su çözeltileridir.

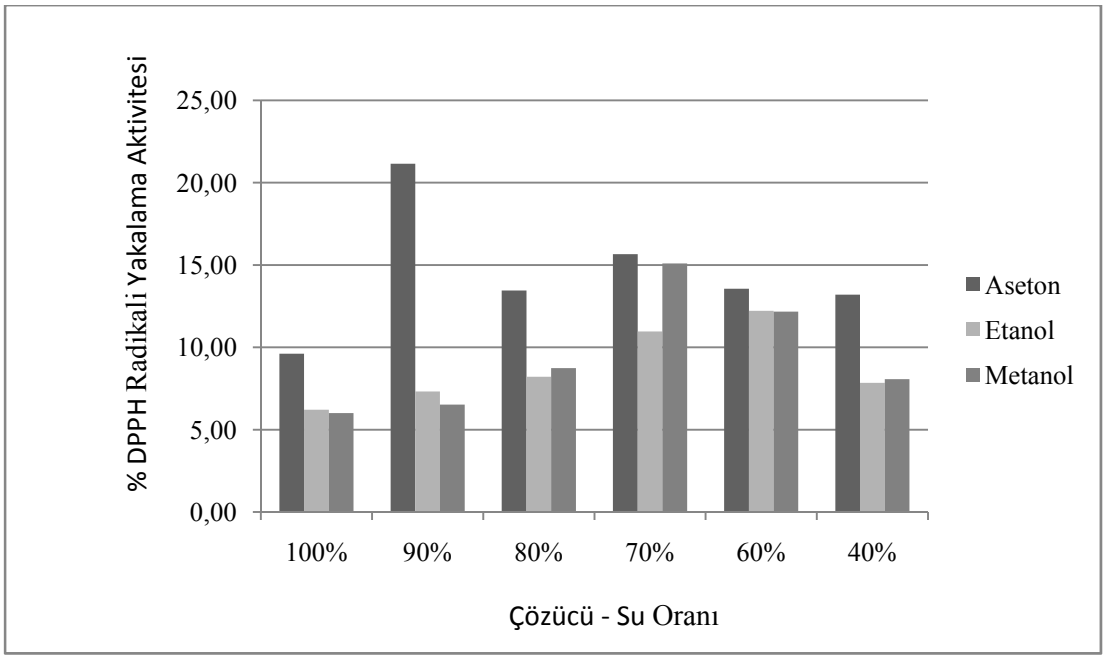
M. Alothman ve ark. çeşitli tropikal meyvelerden elde edilen ektrakların antioksidan aktivitelerini analiz etmek yaptıkları denemelerde; %90 aseton-su, %70'lik etanol-su

ve %70'lik metanol-su çözeltilerinin kendi çözücü türleri içinde en iyi sonuçları verdiğini gözlemlemişlerdir [64].

Çizelge 4.13 : 16 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.

Çözücü		Örnek[a] (Ort.)	±SD[b]	Kontrol (Ort.)[c]	±SD[d]	%DPPH Yakalama Aktivitesi[e]	±SD[f]
Aseton	**100%**	0,603	0,005	0,668	0,005	9,61	0,60
	0,90%	0,533	0,004	0,676	0,005	21,15	0,55
	0,80%	0,614	0,007	0,728	0,006	15,66	0,76
	0,70%	0,582	0,006	0,691	0,004	15,70	1,44
	0,60%	0,638	0,010	0,739	0,004	13,56	0,81
	0,40%	0,641	0,010	0,739	0,004	13,20	0,84
Etanol	**100%**	0,674	0,007	0,719	0,004	6,21	0,65
	0,90%	0,618	0,004	0,667	0,007	7,35	1,65
	0,80%	0,626	0,004	0,682	0,001	8,21	0,30
	0,70%	0,621	0,013	0,698	0,001	10,97	0,84
	0,60%	0,589	0,004	0,671	0,004	12,22	0,42
	0,40%	0,648	0,004	0,704	0,002	7,84	0,38
Metanol	**100%**	0,639	0,004	0,680	0,012	6,01	0,93
	0,90%	0,606	0,003	0,645	0,006	6,05	1,396
	0,80%	0,675	0,001	0,740	0,004	8,74	0,32
	0,70%	0,585	0,014	0,689	0,003	15,09	1,01
	0,60%	0,653	0,004	0,744	0,005	12,17	0,54
	0,40%	0,617	0,018	0,672	0,004	8,07	1,30
Su	**100%**	0,538	0,009	0,556	0,003	3,24	0,72

[a] Örnek absorbansları ortalamaları (n=3), [b] Örnek absorbansları ortalamalarının standart sapmaları(±SD), [c] Kontrol örnekleri absorbansları ortalamaları (n=2), [d] Kontrol örnekleri absorbansları ortalamalarının standart sapmaları (±SD), [e] %DPPH radikali yakalama aktiviteleri ortalamalar,. [f] %DPPH radikali yakalama aktiviteleri ortalamaları.standart sapmaları (±SD).



Şekil 4.7 : Antioksidan aktivitesine çözücü etkisinin grafiği.

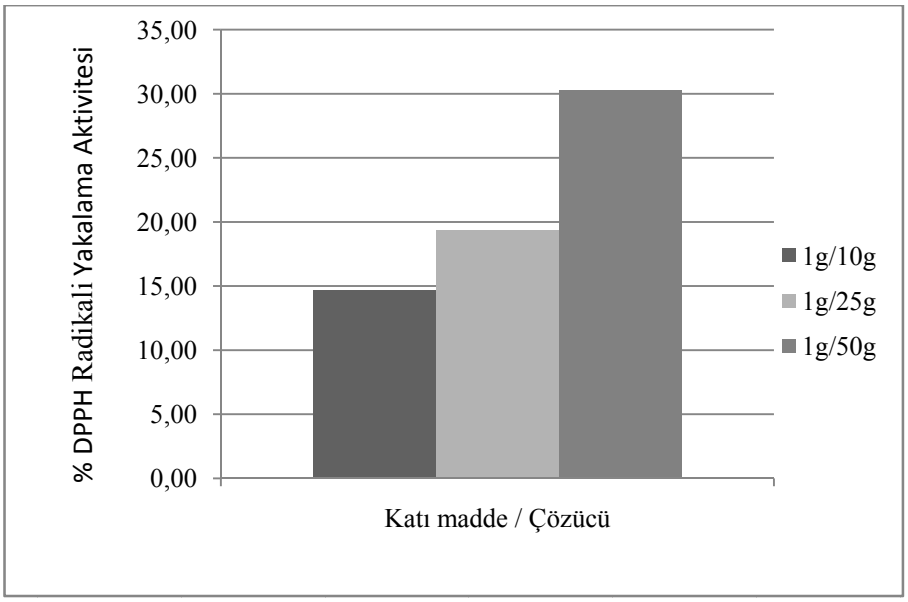
4.4.2 Ekstraksiyon işlemine katı madde/çözücü oranı etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde %60 etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.14'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.14 : Farklı çözücü miktarları ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.

g Katı Madde/ g Çözücü	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	%DPPH Yakalama Aktivitesi	±SD
1g/10g	0,479	0,004	0,562	0,004	14,71	0,78
1g/25g	0,462	0,002	0,573	0,004	19,36	0,51
1g/50g	0,401	0,005	0,576	0,006	30,32	1,02

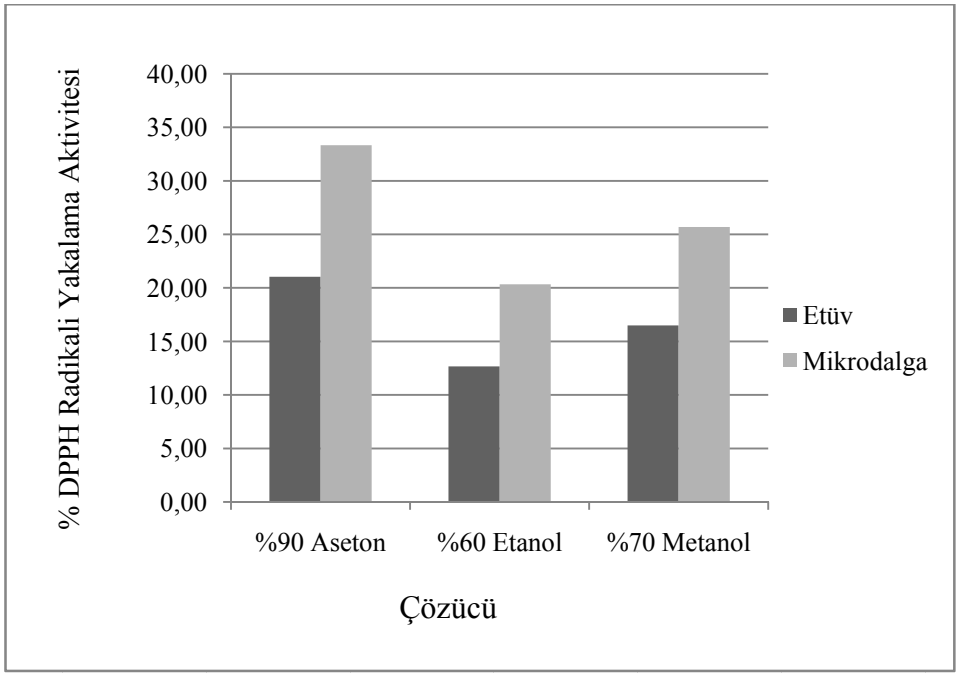
Şekil 4.8'den de görüldüğü gibi çözücü miktarının artışı ile antioksidan aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Toplam fenolik madde miktarı artışı ile paralellik gösteren bu durum çözücü miktarı artışının ekstraktların antioksidan aktivitelerine pozitif etki yaptığını göstermektedir.



Şekil 4.8 : Antioksidan aktivitesine katı made/çözücü oranı etkisinin grafiği.

4.4.3 Ekstraksiyon işlemine kurutma şekli etkisinin incelenmesi deneyleri

Bu deneylerde %90'lık aseton-su, %60'lık etanol-su ve %70'lik metanol çözeltileri çözücü olarak kullanılarak etüv ve mikrodalgada kurutulan zeytin yaprakları ile ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.15'de gösterilmiştir.



Şekil 4.9 : Antioksidan aktivitesine kurutma şekli etkisinin grafiği.

Çizelge 4.15 : Farklı kurutma şekilleriyle kurutulmuş yapraklar ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.

K.Ş.[a]	Çözücü	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	%DPPH Yakalama Aktivitesi	±SD
	%90 Aseton	0,533	0,005	0,676	0,006	21,05	0,65
E.[b]	**%60 Etanol**	0,589	0,004	0,674	0,004	12,66	0,47
	%70 Metanol	0,565	0,002	0,677	0,003	16,49	0,29
	%90 Aseton	0,457	0,002	0,686	0,006	33,33	0,46
M.[c]	**%60 Etanol**	0,548	0,006	0,688	0,002	20,34	0,46
	%70 Metanol	0,502	0,004	0,676	0,001	25,68	0,28

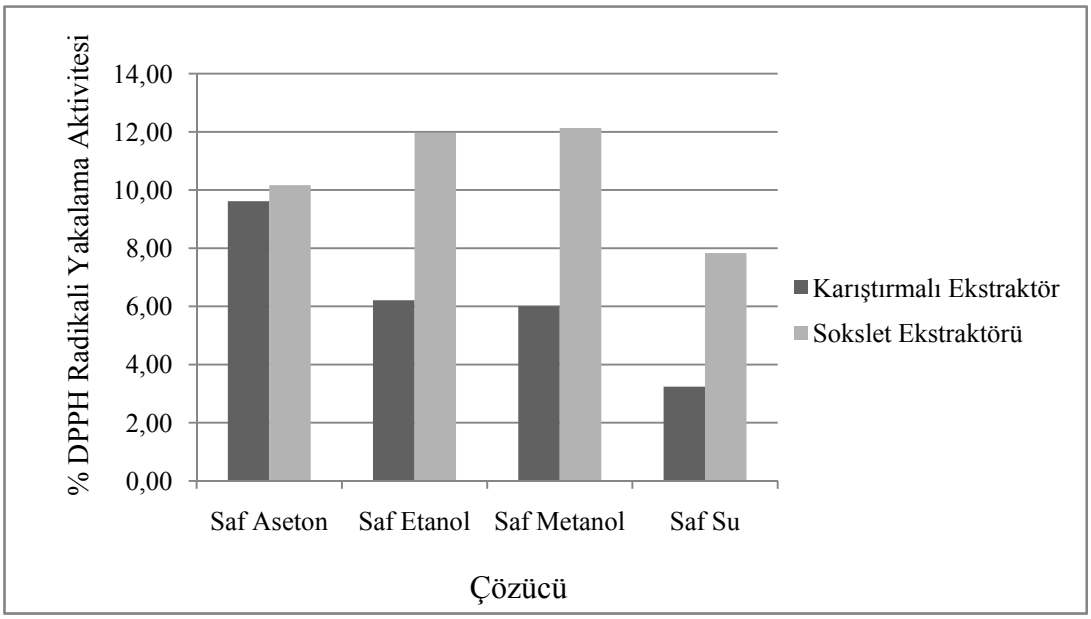
[a] *Kurutma şekli,* [b]*Etüv,* [c] *Mikrodalga.*

Şekil 4.9'dan da görüldüğü gibi mikrodalga ile kurutulan örneklerin antioksidan aktiviteleri etüv ile kurutulanlara oranla daha yüksektir. Bu sonuçda son zamanlarda yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [77,78]. Mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarından elde edilen ekstrakların fenolik içeriğinin etüvde kurutulanlara oranla daha yüksek olması mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarından ekstraksiyon sırasından fenolik maddelerin daha kolay difüze olması ile açıklamaktadırlar. Ayrıca mikrodalga ile kurutma sırasında hücre içinde bulunan ve antioksidanları yok eden bazı oksidatif enzimlerin yüksek sıcaklıklarda bozunarak inaktive olduğu ve bu sayede elde edilen antioksidanların miktarında ve dolayısıyla aktivitelerinde artış olduğu düşünülmektedir [56].

4.4.4 Ekstraksiyon işlemine ekstraksiyon şeklinin etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde saf aseton, saf etanol, saf metanol ve saf su çözücü olarak, ekstraksiyon işlemleri ise Soxhlet Ekstraktörü ve Karıştırıcılı Ekstraktör kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans

değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.16'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10 : Antioksidan aktivitesine ekstraksiyon şekli etkisinin grafiği.

Çizelge 4.16 : Sokslet ve karıştıcılı ekstraktör ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH* yakalama aktivitesi değerleri.

K.Ş.	Çözücü	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	%DPPH Yakalama Aktivitesi	±SD
K.E.	**Saf Aseton**	0,603	0,005	0,668	0,005	9,61	0,60
	Saf Etanol	0,674	0,007	0,719	0,004	6,21	0,65
	Saf Metanol	0,639	0,004	0,680	0,012	6,01	0,93
	Saf Su	0,538	0,009	0,556	0,003	3,24	0,72
S.E.	**Saf Aseton**	0,698	0,002	0,777	0,004	10,17	0,30
	Saf Etanol	0,692	0,005	0,786	0,006	11,96	0,61
	Saf Metanol	0,681	0,004	0,775	0,004	12,13	0,47
	Saf Su	0,528	0,002	0,573	0,004	7,83	0,30

[a] Karıştırma şekli, [b] Karıştırmalı ekstraktör, [c] Sokslet ekstraktörü.

Şekil 4.10'dan da görüldüğü gibi sokslet ekstraktörü ile ekstrakte edilen numunelerin antioksidan aktiviteleri karıştırmalı ekstraktör ile ekstrakte edilenlere oranla daha

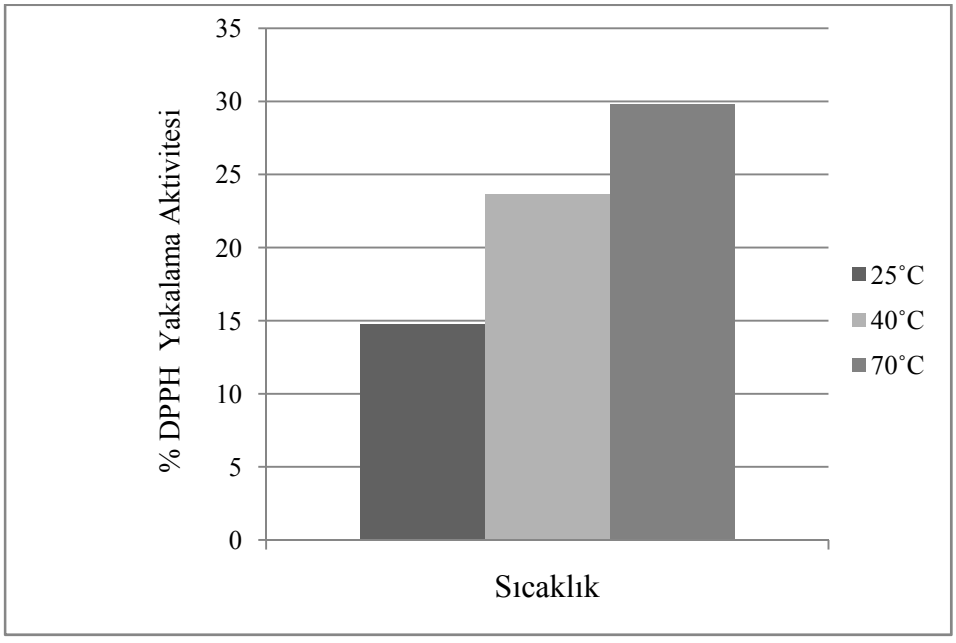
yüksektir. Elde edilen sonuçların aksine Sousa ve ark. sofra zeytini ile 25˚C de karıştırmalı ekstraktörde saf su ile elde ettikleri ektrakların antioksidan aktivitelerinin sokslet ekstraktörü ile elde edilenlerden yüksek değerlere sahip olduğunu, metanolle yaptıkları çalışmada ise sokslet ektraktörü ve karıştırmalı ektraktörlerden elde edilen ekstrakların antioksidan aktivitelerinin aynı kaldığını gözlemlemişlerdir [74].

4.4.5 Ekstraksiyon işlemine sıcaklığın etkisinin incelenmesi

Bu deneylerde %60'lık etanol-su çözeltisi çözücü olarak kullanılarak 25, 40 ve 70 ˚C lerde ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.17'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.17 : Farklı sıcaklıklarda ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH radikali yakalama aktivitesi değerleri.

Sıcaklık	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	%DPPH Yakalama Aktivitesi	±SD
25˚C	0,479	0,004	0,562	0,004	14,71	0,47
40˚C	0,438	0,003	0,574	0,003	23,64	0,35
70˚C	0,402	0,006	0,572	0,004	29,78	0,59



Şekil 4.11 : Antioksidan aktivitesine sıcaklığın etkisinin grafiği.

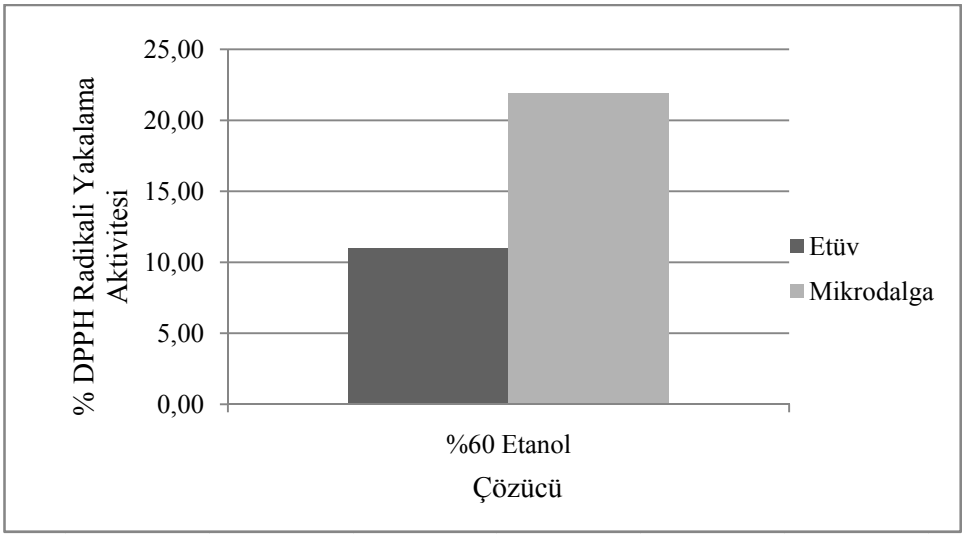
Şekil 4.11'den de görüldüğü gibi sıcaklığın ekstrakların antioksidan aktivitesine pozitif etkisi olduğu tespit edilmiştir. Conde ve ark. zeytin ile yaptıkları çalışmada ekstrakların antioksidan aktivitelerinin sıcaklık artışı ile artış gösterdiğini gözlemişlerdir [79].

4.4.6 En uygun ekstraksiyon şartlarında gerçekleştirilen deney

Çalışmanın daha önceki bölümlerinde yapılan deneylerin sonuçları göz önüne alınarak; %60 Etanol-su çözeltisi, 1 g/10 g katı madde/çözücü oranında, etüv ve mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40˚C'de ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiş, spektrofotometrede 515 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleri ve örneklerin % DPPH radikali yakalama aktiviteleri Çizelge 4.18'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.18 : Farklı kurutma şekilleriyle kurutulmuş yapraklar ile ekstrakte edilen ekstraktların 515 nm'de ölçülen absorbans ve %DPPH yakalama aktivitesi değerleri.

Kurutma Şekli	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	%DPPH Yakalama Aktivitesi	±SD
Etüv	0,583	0,011	0,655	0,006	10,98	1,02
Mikrodalga	0,554	0,006	0,709	0,007	21,91	0,75



Şekil 4.12 : Antioksidan aktivitesinin grafiksel gösterimi.

Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi mikrodalga ile kurutmanın DPPH radikali yakalama aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir Çalışılan sistem için en uygun ekstraksiyon şartlarının belirlenmesi ile gerçekleştirilen bu deneyde mikrodalgada kurutma ile etüvde kurutmanın farkı bir daha gözlenmiştir. Daha önceden yapılan çalışmalarda benzer çözücü [70], katı madde/çözücü oranı [69,71-73], sıcaklık [74,75] ve kurutma şekli [56] sonuçlarına varılmıştır.

5. GENEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışma kapsamında, zeytin yapraklarından antioksidan eldesinde, toplam fenolik madde miktarı ve % DPPH radikali yakalama aktivitesinin kurutma şekli, çözücü türü ve miktarı, ekstraksiyon şekli ve sıcaklıktan etkilendiği görülmüştür. Çalışılan tüm şartlarda toplam fenolik madde miktarının 15,87 ±1,02 mg GAE/g-ky ile 91,78 ±1,33 mg GAE/g-ky, yüzde DPPH radikali yakalama aktivitesinin ise %3,24 ±0,72 ile %33,33 ±0,46 arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir.

Ekstraksiyon işleminde çözücü seçimi çok önemli bir yer tutmaktadır. Uygun çözücü seçimi için yapılan deneylerde sırasıyla saf aseton ve asetonun sulu çözeltileri içinde %90 aseton-su, saf metanol ve metanolün sulu çözeltileri arasında %70 metanol-su ve saf etanol ve etanolün sulu çözeltileri arasında %60 etanol-su çözücüleri ile elde edilen ekstraktlar en yüksek fenolik madde miktarlarına sahip çözeltilerdir. Aseton ve metanollü çözeltiler etanole oranla daha iyi sonuçlar vermelerine karşın; toksik olmayışı, çevre dostu oluşu ve pahalı olmaması gibi özellikleri dolayısıyla etanol daha tercih edilebilir bir çözücü olarak önerilmiştir. Bu yargı da daha önce yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [57].

Ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilirken kullanılan çözücünün miktarı ekonomik açıdan büyük önem taşımaktadır. Uygun katı madde/çözücü oranı belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde 1 g/10 g katı madde/çözücü oranının ekonomik açıdan en uygun oran olduğu tespit edilmiştir. 1 g/25 g ve 1 g/50 g katı madde/çözücü oranı ile ekstrakte edilen örneklerin 1 g/10 g katı madde/çözücü oranına oranla toplam fenolik madde miktarlarının sırasıyla %10 ve %19 oranında artış gösterdiği belirlenmiştir. 2,5 kat ve 5 kat daha fazla çözücü kullanılması ve çözücü geri kazanımı göz önünde tutulduğunda elde edilen bu artış değerlerinin dikkate değer seviyede olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ekstraksiyon işleminde önemli parametrelerden biri de sıcaklıktır. Uygun sıcaklığın tespiti amacıyla yürütülen deneylerde ekstraktların toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerinin sıcaklık artışı ile artış gösterdiği gözlenmiştir. 40˚C ve

70˚C‘lerde ekstraktların toplam fenolik madde miktarları 25˚C’de elde edilen fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitelerine oranla sırasıyla %27 ve %33 artış göstermektedir. Kullanılan çözücülerin kaynama noktaları da göz önüne alındığında ekstraksiyon işleminin 40˚C gerçekleştirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Sokslet ekstraktörü ile çalışmanın toplam fenolik madde miktarlarında belirgin artışlar sağlamasına karşın antioksidan aktivitesine artış yönünde belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Folin-Ciocalteau reaktifi proteinler gibi bileşenlerle de pozitif reaksiyon verebilen bir reaktiftir. Spektrofometrik ölçümlerde yanılsamalara sebeb olabilen bu durum Sokslet ekstraktörü ile çalışılırken karıştırmalı ekstraktöre oranla daha farklı bileşenlerin de ekstrakte edilebildiğini düşündürmektedir.

Çalışmada incelenen önemli parametrelerden biri de mikrodalga ile kurutmanın toplam fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisidir, çünkü mikrodalga ile kurutma işlemi zaman ve enerji tasaruffu açısından büyük kolaylıklar sağlamakta, ekonomik açıdan büyük bir önem taşımaktadır. Yürütülen çalışmada mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarından elde edilen ekstrakların, etüv ile kurutulanlardan elde edilenlere oranla daha yüksek toplam fenolik madde miktarına ve antioksidan aktivitesine sahip oldukları gözlenmiştir. Bu da son zamanlarda yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir [56,59].

Ekstraksiyon işleminin zamanla değişim gösterdiği de incelenmiştir. Bu amaçla yapılan deneylerde ekstraksiyon işlemine 8 saat boyunca devam edilmesine karşın çalışılan şartlarda ekstraksiyon işleminin %93’ünün 4 saat sonunda tamamlandığı gözlenmiştir. Bu tespit göz önüne alındığında bu sistem için ekstraksiyon işleminin 4 saat boyunca sürdürülmesinin yeterli olacağını düşünülmüştür.

Elde edilen veriler ışığında ekstraksiyon işleminin; en uygun çözücü olan %60 etanol-su çözücüsü ile , en uygun katı madde/çözücü oranı olan 1 g katı madde/10 g çözücü oranında, mikrodalga ile kurutulmuş zeytin yaprakları ile 40˚C’de, 4 saat boyunca çalışılarak gerçekleştirilmesi benimsenmiştir.

Ekstraksiyon işleminin parçacık boyutundan ve karıştırma hızından da etkilendiği bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında 1,40 mm-0,63 mm parçacık boyutu aralığında parçalanmış zeytin yaprakları ile, karıştırma hızı için ise 360 devir/dak. ile çalışılmıştır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu parametreler değiştirilerek bu

parametrelerin ekstraktların toplam fenolik madde miktarları ve antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri incelenebilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, daha önce yapılan çalışmalardaki yargıların aksine meyvelerdeki antioksidan içeriğinin mikrodalga ile kurutmada azalma göstermediğinden bahsedilmektedir [56,59]. Kurutma işlemi zeytin yapraklarının hasattan sonra bozunmadan depolanması ve yıl içinde istenildiği zaman kullanılabilmesi açısından çok önemlidir. Geleneksel kurutma yöntemlerinin dışında yaprakların antioksidan içeriğine zarar vermeksizin uygulanabilecek, ekonomik açıdan fayda sağlayacak mikrodalga ile kurutma gibi yöntemler bundan sonra yapılacak çalışmaların ana hedeflerinden biri olmalıdır.

KAYNAKLAR

[1] Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Soares, M. E., Bastos, M. L., and Pereira, J. A. 2006. Antioxidant activity and phenolic contents of Olea europaea L.leaves sprayed with different copper formulations. *Food Chemistry* **103**,188–195.

[2] Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, Philip L., Chang, Y., and Huang, P.L., 2003. Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **307**, 1029–1037.

[3] Samuelsson, G. 1951. The blood pressure lowering factor in leaves of Olea Europaea. *Farmacevtisk Revy*, **15**, 229-239.

[4] Zarzuelo, A. 1991. Vasodilator effect of olive leaf. *Planta Medica*, **57**, 417-419.

[5] Burtis, C.A., and Ashwood, E.R., 1999. Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania.

[6] Dawn, B.M., Allan, D.M., and Colleen, M.S., 1996. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach.Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.

[7] Nalçacı, E., 1994. Evrim ve yaşlanma sürecinde antioksidan savunma. *Ankara Tıp Mecmuası,* **47**, 465-474

[8] Kavas, G., 1989. Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Tıp Bilimleri Dergisi*, **1**, 1-8**.**

[9] Delibaş, N. ve Özcankaya, R., 1995. Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **7,** 11-17.

[10] Akkuş İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya.

[11] Cross., C.E., 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med*., **107**, 526 - 545.

[12] Harman, D., 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation. *J. Gerontol.* **2**, 298–300,

[13] Miquel, J., Economos, C., Fleming., J., and Johnson, J.E., 1980. Mitochondrial role in cell ageing. *Exp Gerontol*, **15**, 575-591.

[14] Burçak, G., and Andican, G., 2004. Oxidative DNA damage and aging. *Cerrahpaşa J Med*, **35**, 159-169

[15] Wallace, D.C., 1997. Mitochondrial DNA in aging and disease. *Scientific American*, **8**, 40-47.

[16] Martin, G.M., and Oshima, J., 2000. Lessons from human progeroid syndromes. *Nature*, **408**, 263-266.

[17] Sastre, J., Pallardo, F.V., and Vina, J., 2003. The role of mitchondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med*, **35**, 1-8.

[18] Barja, G., 2002. Endogenous oxidative stress: Relationship to aging, longevity and caloric restriction. *Ageing Res Rev*, **1**, 397-411.

[19] Uysal, L., 2006. 'En değerli armağan: Zeytin' - Skylife Dergisi, THY Yayınları Ekim 2006; 5-7.

[20] Anonim, http://www.zaman.com.tr/haber.do?haberno=790999, 02.01.2009.

[21] Ünsal, A., 2003. Ölmez Ağacın Peşinde Türkiye'de Zeytin ve Zeytinyağı. Arka kapak yazısı.

[22] Anonim, http://www.dazb.org.tr/upload/zeytinin_tarihcesi.pdf, 18.02.2009.

[23] Türkel, F., 2008. Kaç tane zeytin ağacımız var? http://www.zaman.com.tr/yazar.do?yazino=764315, 21.03.2009.

[24] Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (International Olive Oil Council - IOOC). 2008. Kasım 2008 Raporu. http://www.internationaloliveoil.org/web/aaingles/corp/AreasActivitie/economics/economics-TableOliveFigures.html. 22.03.2009

[25] Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (International Olive Oil Council - IOOC). 2008. Ülke profilleri: Türkiye http://www.internationaloliveoil.org/downloads/economia/turquie-fr.pdf. 22.03.2009

[26] Türkiye İhracatçılar Meclisi (TİM), 2008. Türkiye İhracatçılar Meclisi (TİM), 2008 İhracat Raporu.

[27] Keys, A., Menotti, A., and Karvonen, M.J., 1986. The diet and 15-year death rate in the Seven Countries Study, *Am. J. Epidemiol*, 124, 903-915.

[28] Willett, W.C., 1990. Diet and coronary heart disease. *Monographs in Epidemiology and Biostatistics*, 15, 341-379.

[29] World Health Organization, 1990. Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases, Report of a WHO Study Group, WHO Technical Report Series, Geneva, 797.

[30] DeLorgeril, M., Salen, P., Martin, JL., Monjaud,I., Boucher, P., and Mamelle, N., 1998. Mediterranean Dietary Pattern in a Randomized Trial: Prolonged Survival and Possible Reduced Cancer Rate. *Archives of Internal Medicine*, **158**, 1181-1187.

[31] Wolk, A., Bergström, R., Hunter, D., Willett, W., Ljung, H., Holmberg, L., Bergkvist, L., Bruce, Å., and Adami, H-O., 1998. A prospective study of association of monounsaturated fat and other types of fat with risk of breast cancer. *Archives of Internal Medicine*, **158**, 41-45.

[32] Linos, A., Kaklamani, V.G., and Kaklamani, E., 1999. Dietary factors in relation to rheumatoid arthritis: a role for olive oil and cooked vegetables. *American Journal of Clinical Nutrition*, **70**, 1077-1082.

[33] Anonim, Zeytin Ağacının Yaprakları, Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi, http://www.uzzk.org/zeytinAgaci.asp, 09.03.2009.

[34] Pakkaner, M., Zeytin ve zeytin yağı. http://www.tarimsal.com/zeytin.htm. 09.03.2008.

[35] Garcia, O.B., Castillo, J., Lorente, J., Ortuna, A., and Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from Olea europaea L. leaves. *Food Chemistry*, **68**, 457-462.

[36] Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M. And Greco, G., 1995. Production of Glucose and Bioactive Aglycone by Chemical and Enzymatic Hydrolysis of Purified Oleuropein from Olea Europea, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **61**, 365-377.

[37] Anonim, http://www.phytochemicals.info/phytochemicals/rutin.php, 23.03.2009.

[38] Park, S.Y., Book, S.H., Jeon, S.M., Park, Y.B., Lee, S.J., Jeong, T.S., Choi, M.S., 2002. Effect of rutin and tannic acid supplements on cholesterol metabolism in rats, *Nutrition Research*, **22**, 283-295.

[39] Visioli, F., Galli, C., Plasmati, E., Viappiani, S., Hernandez, A., Colombo, C., and Sala A., 2000. Olive phenol hydroxytyrosol prevents passive smoking-induced oxidative stress. *Circulation*, **102**, 2169-71

[40] Manna, C., Migliardi, V., Sannino, F., De Martino, A., and Capasso, R., 2005. Protective effects of synthetic hydroxytyrosol acetyl derivatives against oxidative stress in human cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 9602-7

[41] Manna, C., Galletti, P., Cucciolla V., Montedoro, G., and Zappia, V., 1999. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *The Journal of Nutritional Biochemistry*; **10**, 159-65

[42] O'Dowd, Y., Driss, F., Dang MyChan [Dang, M. C. P.], Elbim, C., Gougerot-Pocidalo, M. A., Pasquier, C., and El-Benna, J., 2004. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. *Biochemical Pharmacology,* **68**, 2003-8.

[43] Fabiani, R., De Bartolomeo, A., Rosignoli, P., Servili, M., Montedoro, G.F., and Morozzi, G., 2002. Cancer chemoprevention by hydroxytyrosol isolated from virgin olive oil through G1 cell cycle arrest and apoptosis. *European Journal of Cancer Prevention*, **11**, 351-8.

[44] Ragione, F.D., Cucciolla, V., Borriello, A., Pietra, V.D., Pontoni, G., Racioppi, L., Manna, C., Galletti, P., and Zappia, V. 2000. Hydroxytyrosol, a natural molecule occurring in olive oil, induces cytochrome c-dependent apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun,* **278**, 733-9.

[45] Maiuri, M.C., De Stefano, D., Di Meglio, P., Irace, C., Savarese, M., Sacchi, R., Cinelli, M.P., and Carnuccio, R., 2005. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, **371**, 457-65

[46] Roberts**, M.,** 2007. Cocoa nutrient for 'lethal ills' http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/6430777.stm. 24.03.2009.

[47] Murase, T., Haramizu, S., Ota, N., and Hase, T., 2008. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppresses the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerated mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **295**, 281-9.

[48] Katiyar, S., Elmets, C.A., and Katiyar, S.K., 2007. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. *The Journal of nutritional biochemistry*, **18**(5), 287-96.

[49] Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A., and Valcárcel, M., 1998. Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, **46(**5), 1123-1130.

[50] Ghoreishi, S.M., and Shahrestani, R.G., 2009. Subcritical water extraction of mannitol from olive leaves. *Journal of Food Engineering,* **93**(4), 474-481.

[51] Adil, İ.H., Çetin, H.İ., Yener, M.E ., and **Bayındırlı, A., 2007.** Subcritical (carbon dioxide + ethanol) extraction of polyphenols from apple and peach pomaces, and determination of the antioxidant activities of the extracts. *The Journal of Supercritical Fluids,* **43**(1), 55-63.

[52] Japón-Luján, R., and Luque de Castro, M.D., 2006. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A,* **1136**(2), 185-191.

[53] Japón-Luján, R. , Luque-Rodríguez, J.M., and Luque de Castro, M.D., 2006. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **1108**, 76-82.

[54] Sánchez-Ávila, N., Priego-Capote, F., Ruiz-Jiménez, J., and Luque de Castro, M.D., 2009. Fast and selective determination of triterpenic compounds in olive leaves by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring after microwave - assisted extraction. *Talanta*, **78**(1), 40-48.

[55] Dekanski, D., Janiceijevic, S., Tadic, V., Markovic, G., Arsic, I., and Mitrovic, M.D, 2009. Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract. *J. Serb. Chem. Soc*., **74** (4), 367–377.

[56] Boudhrioua, N., Bahloul N., Slimen, I.B, and Kechao, N., 2009. Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial Crops and Products*, **29**(2-3), 412-419.

[57] Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, D., Bayraktar, and O., Ülkü, S., 2008. Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin. Separation and Purification Technology*,* **62**(2), 342-348.

[58] Erbay, Z., and Icier, F., 2009. Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, **91**(4), 533-541.

[59] Zhang, M., and Xu, Y. Y., 2003. Research developments of combination drying technology for fruits and vegetables at home and abroad. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, **22**(6), 103-106.

[60] Banchero, J.T., and Badger, W.L., 1986. Kimya Mühendisliğine Giriş. (Çeviri Çataltaş İ.) İnkilap Yayınevi, İstanbul.

[61] McCabe, W., Smith, J. and Harriott P., 2004. Unit Operations of Chemical Engineering, McGraw Hill, Singapur.

[62] Gamse, T., 2002. "Liquid - Liquid Extraction And Solid - Liquid Extraction" Ders Notları, Graz University of Technology, Avusturya.

[63] Singleton, **V.L.** and **Rossi**, **J.A.** 1956. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Vitic. **16**, 144–158.

[64] Alothman, M., Bhat, R., and Karim, A.A., 2008. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents*.* *Food Chemistry,* **115**, 785-788.

[65] Anonim, Yüksek basınçlı sıvı kromataografisi-http://www.kimyaevi.org/ dokgoster.asp?dosya=560000115kimyaevi.org hplc bilgileri. 10.04. 2009.

[66] Roginsky, V., and Lissi, E.A., 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, **92**, 235–254.

[67] Huang, D., Ou, B., and Prior, R.L. , 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841–1856.

[68] Waterman, P. G., and Mole, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites.

Oxford: Blackwell scientific publications, s. 78.

[69] Bucic-Kojic, A., Planinic, M., Tomas, S., Bilic, M., and Velic, D., 2007. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, **81**, 236–242.

[70] Jap´on-Luj´an, R., and Luque de Castro, M.D., 2006. Superheated liquid extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, **1136**, 185–191.

[71] Silva, E.M., Rogez, H., and Larondelle, Y., 2007. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, **55**, 381–387.

[72] Cacace, J.E., and Mazza, G., 2002. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering,* **59**, 379–389.

[73] Pinelo, M., Sineiro, J., and Nunez, M.J., 2005. Mass transfer during continuous solid–liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, **77**, 57–63.

[74] Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Bento, A., and Pereira, J.A., 2007. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives ‘‘alcaparras’’. *Food Science and Technology,* **41**(4), 739-745.

[75] Hassas-Roudsari, M., Chang, P.R., Pegg, P.R., and Tyler, R.T., 2009.Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola mealby subcritical water, ethanolic and hot water extraction. *Food Chemistry*, **114**, 717–726.

[76] Liyana-Pathirana, C., and Shahidi, F., 2005. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry*, **93**, 47–56.

[77] Spigno, G., and De Faveri, D.M., 2009. Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, **93**, 210–217

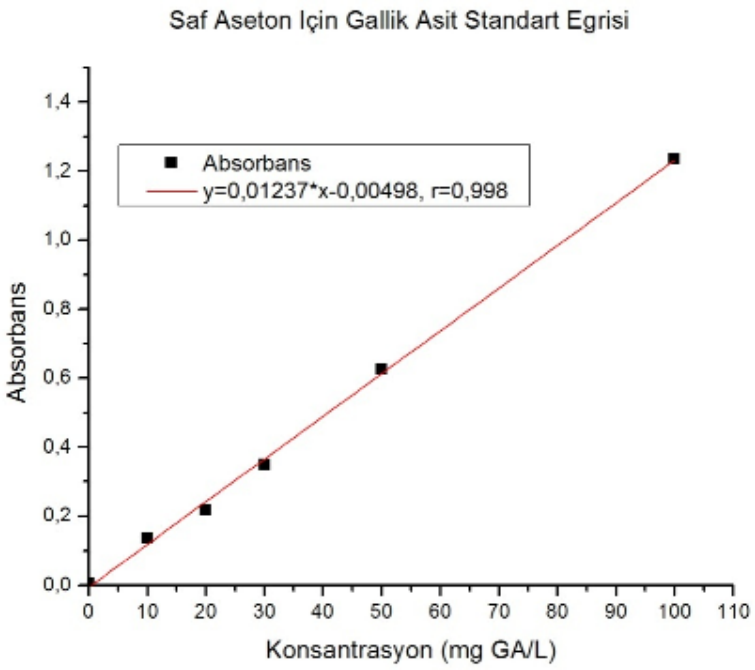
[78] Park., Y., Jung, S., Kang, S., Delgado-Licon, E., Ayala, A.L.M., Tapia, M.S., Martín-Belloso, O., Trakhtenberg, S., and Gorinstein., S., 2006.Drying of persimmons (*Diospyros kaki L*.) and the following changes in the studied bioactive compounds and the total radical scavenging activities. *Food Science and Technology,* **39**, 7 : 748-755.

[79] Conde, E., Cara,C., Moure,A., Ruiz, E., Castro, E., and Dominguez, H., 2009. Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning. *Food Chemistry*, **114**, 806–812.

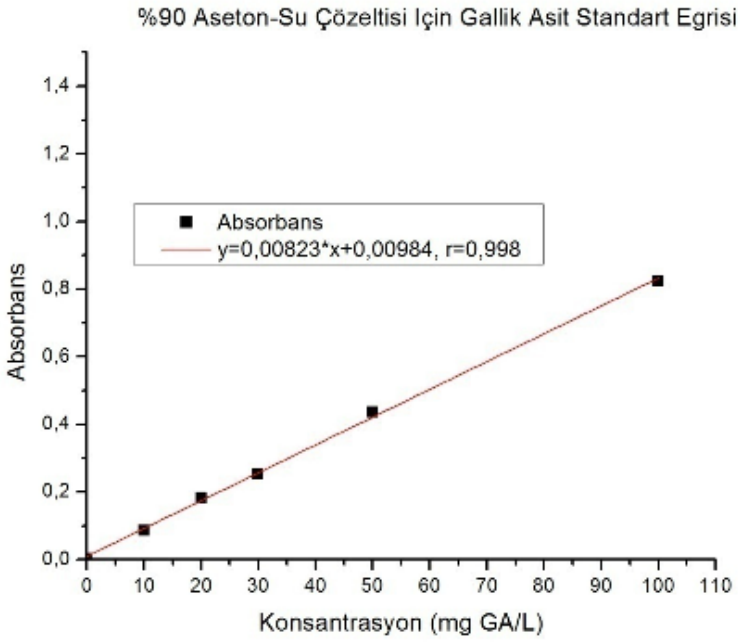
EKLER

EK -A : Çözücüler için gallik asit standart eğrileri
EK -B : Örneklerin absorbans değerleri çizelgeleri

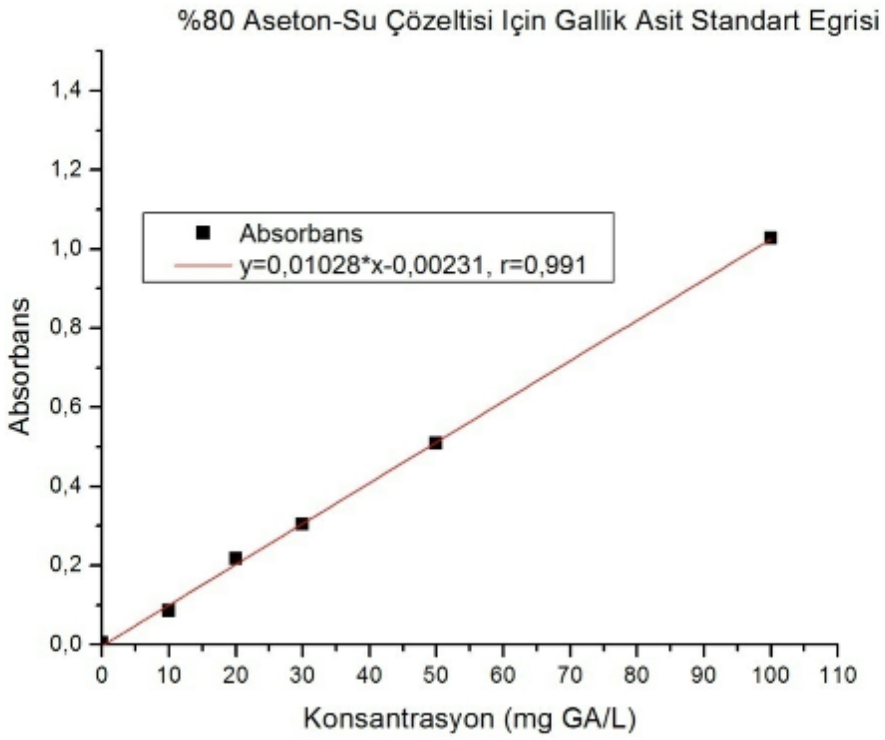
EK -A



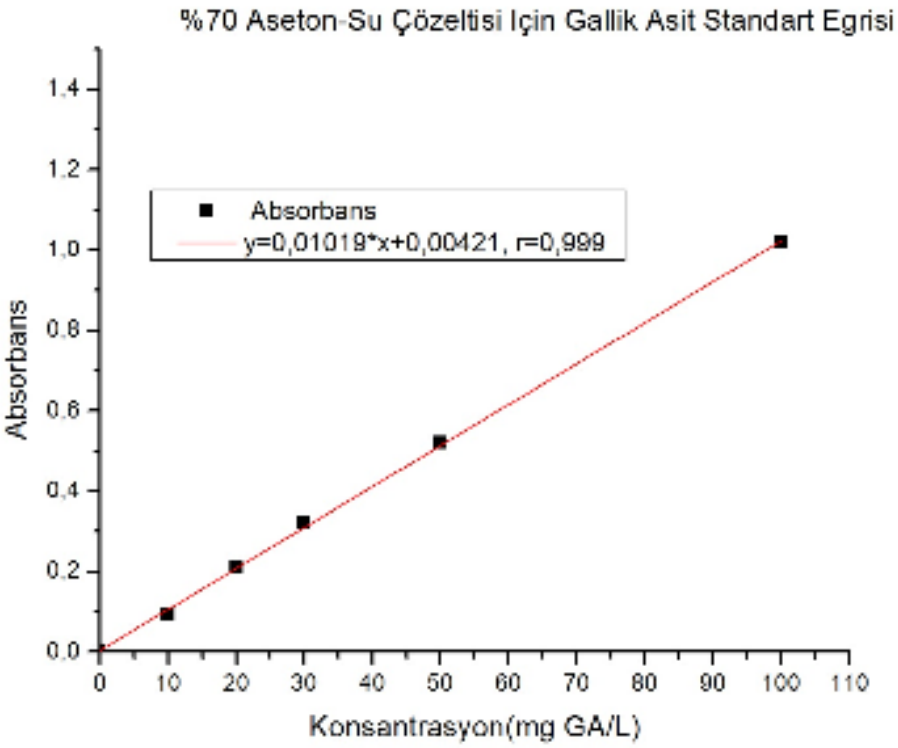
Şekil A.1 : Saf aseton için gallik asit standart eğrisi.



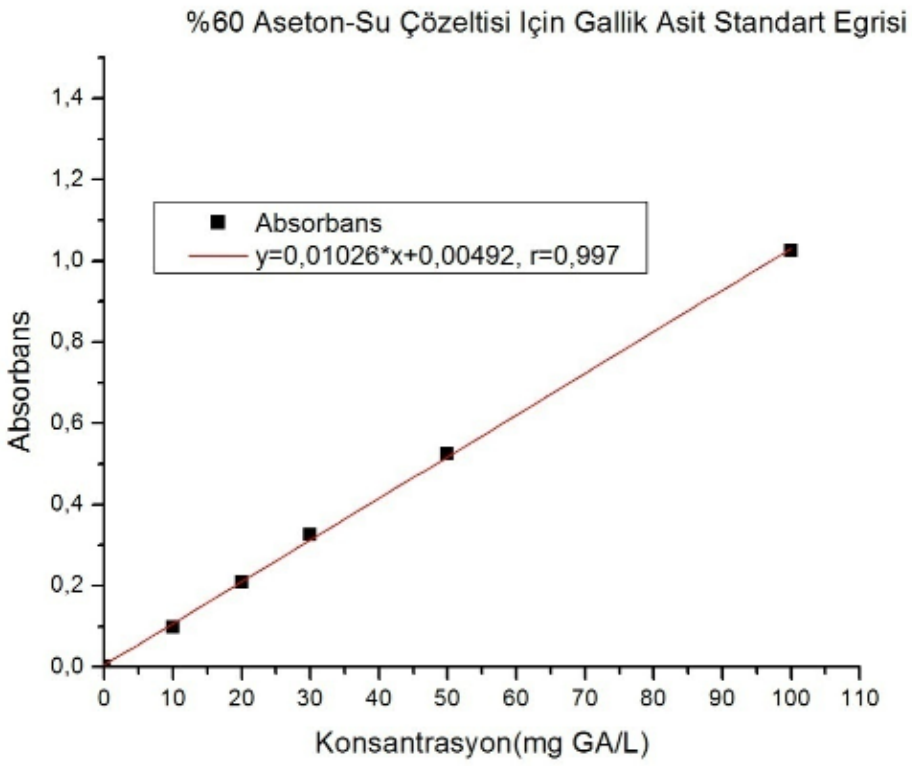
Şekil A.2 : %90 aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



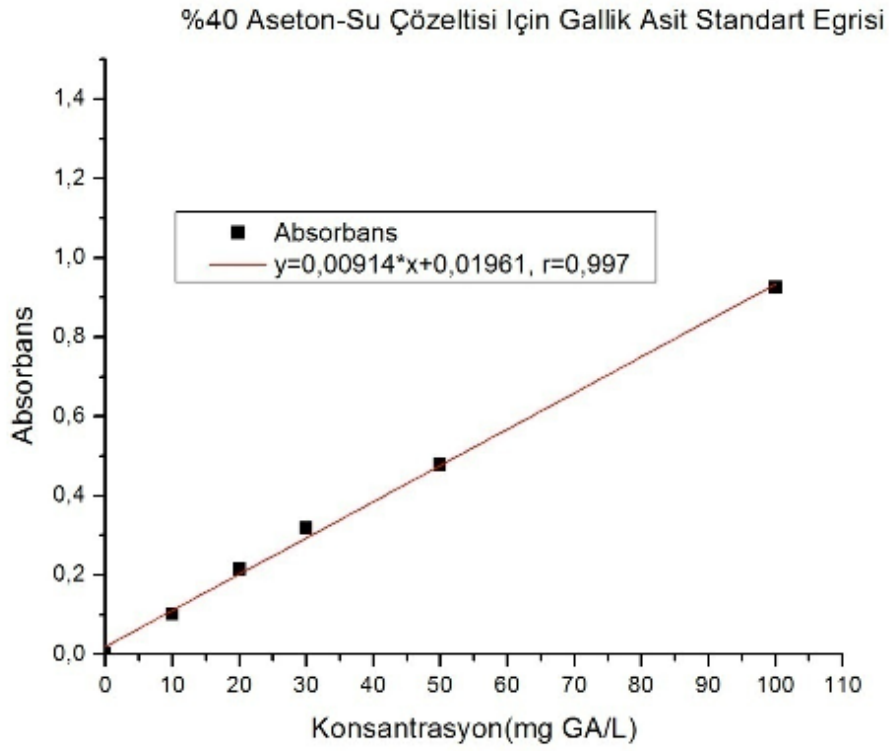
Şekil A.3 : %80 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



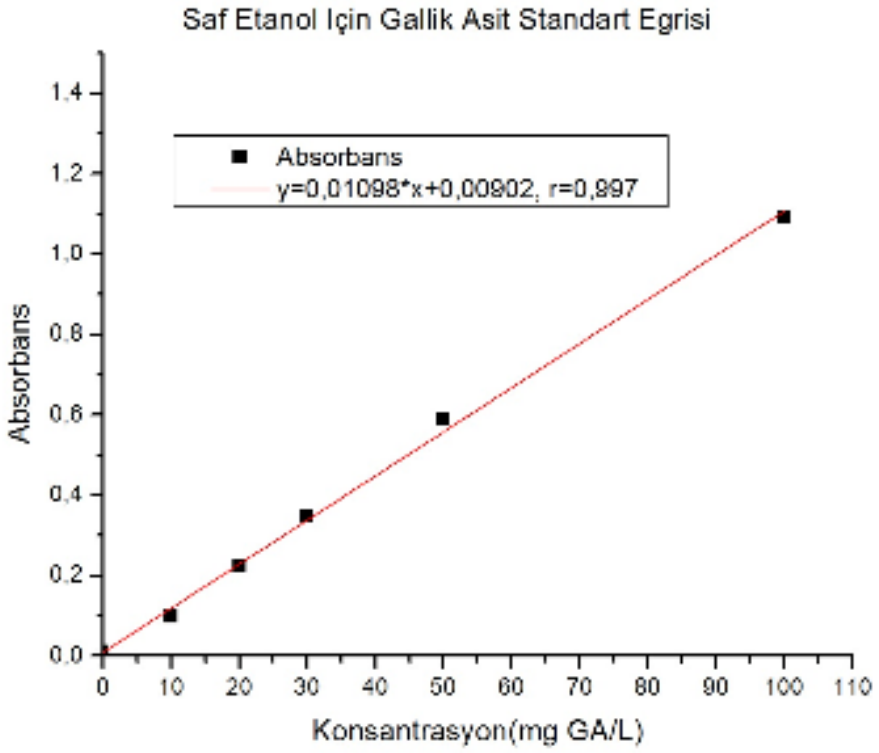
Şekil A.4 : %70 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



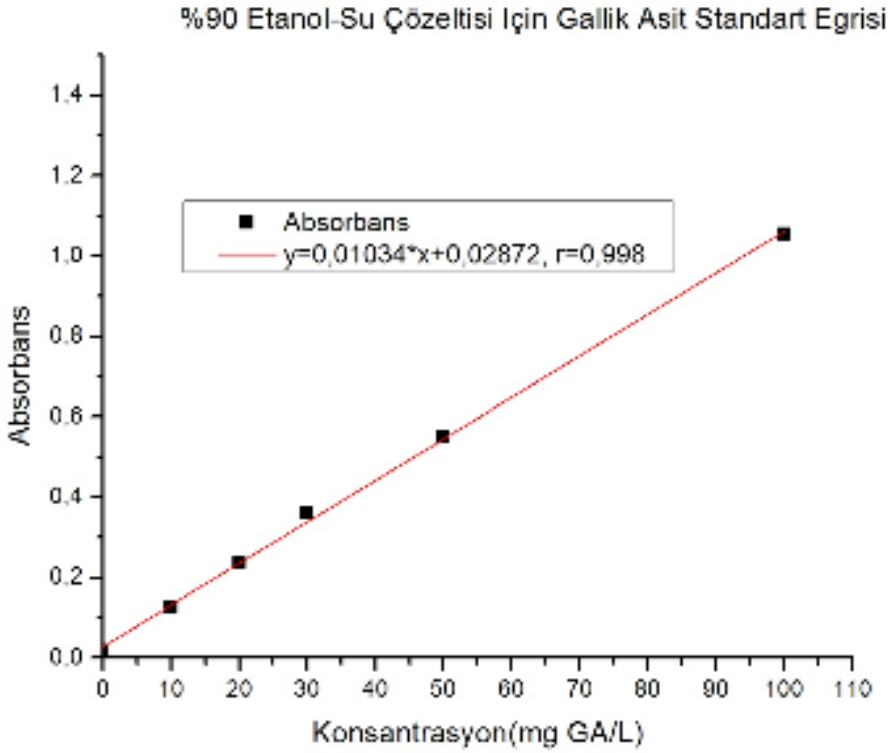
Şekil A.5 : %60 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



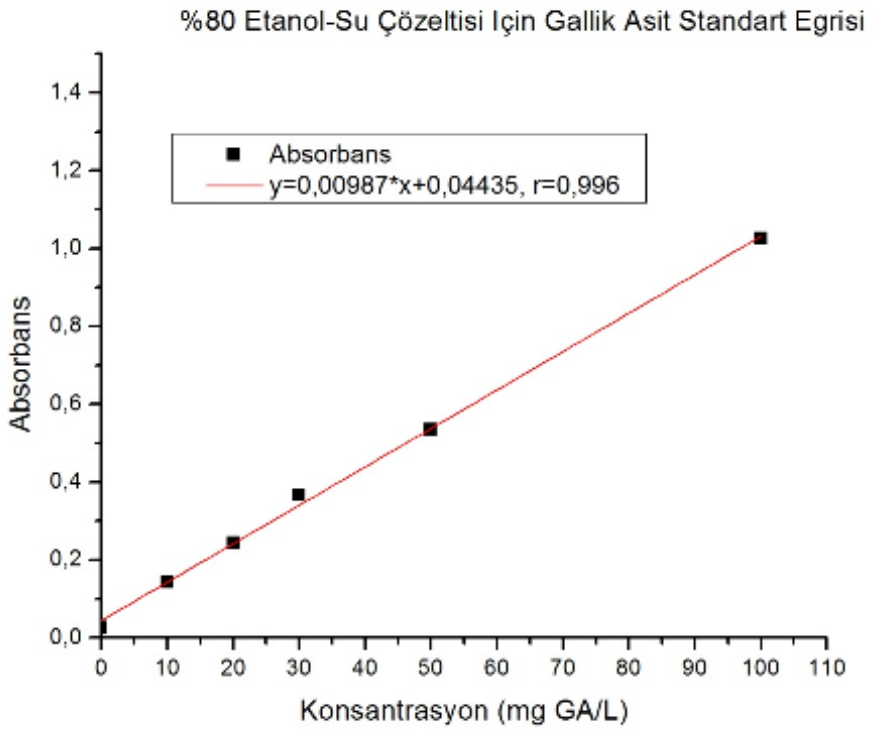
Şekil A.6 : %40 Aseton-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



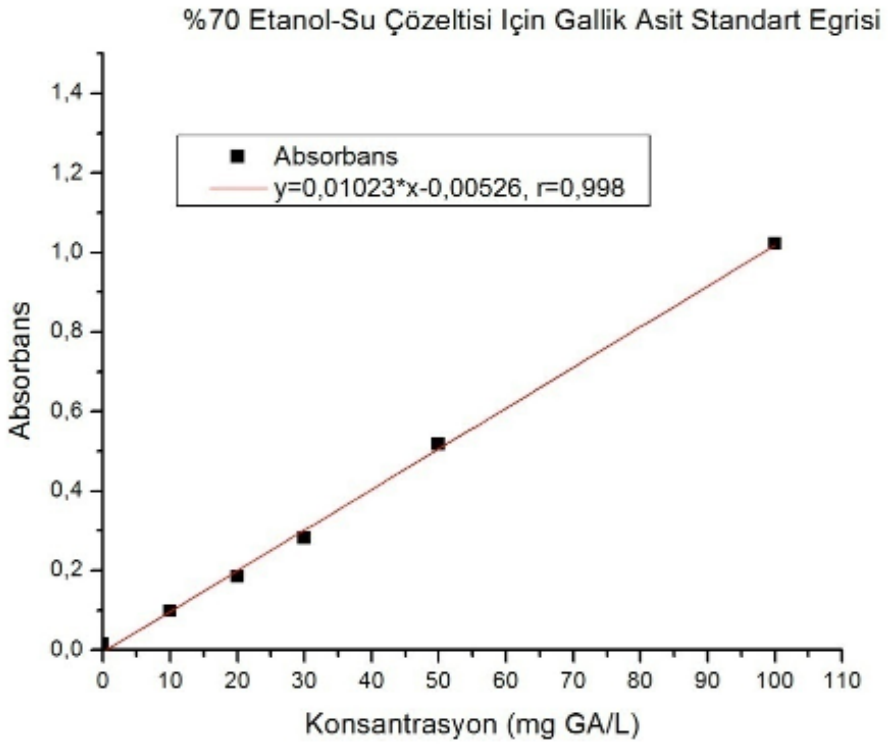
Şekil A.7 : Saf etanol için gallik asit standart eğrisi.



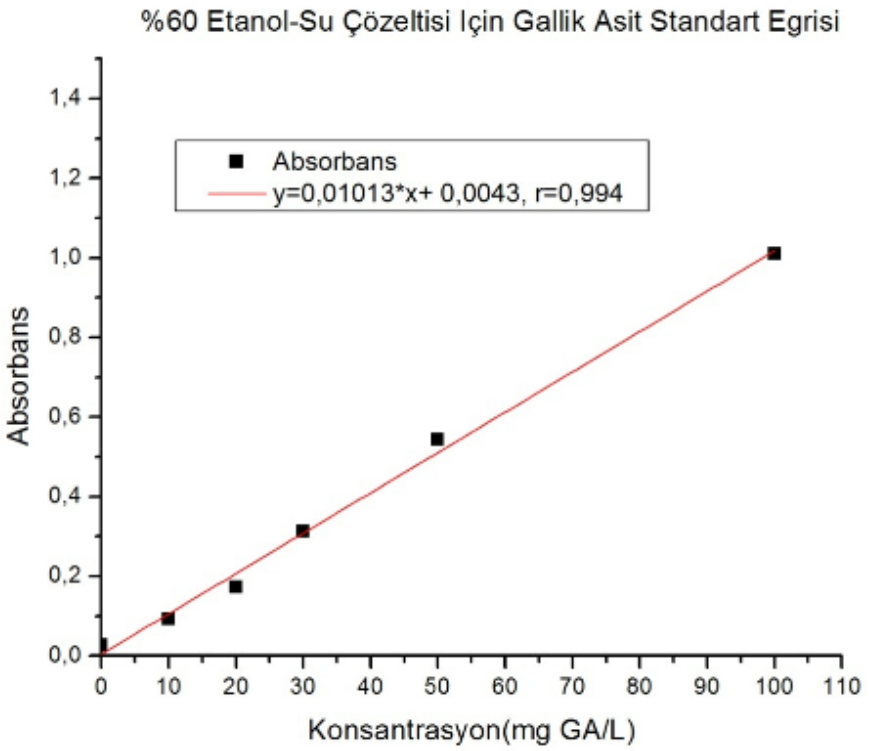
Şekil A.8 : %90 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



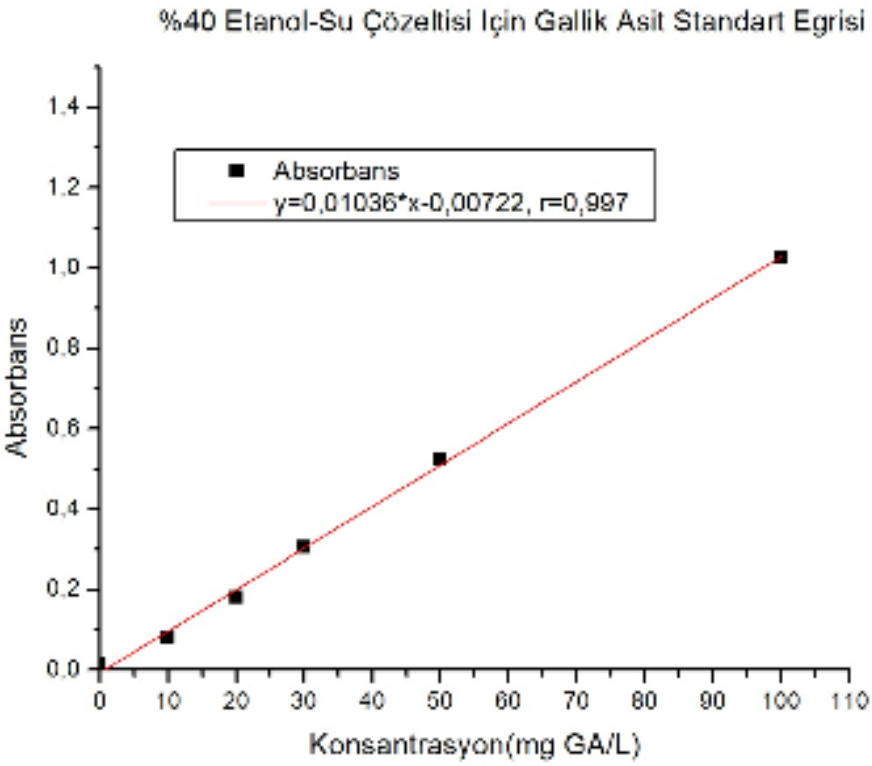
Şekil A.9 : %80 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



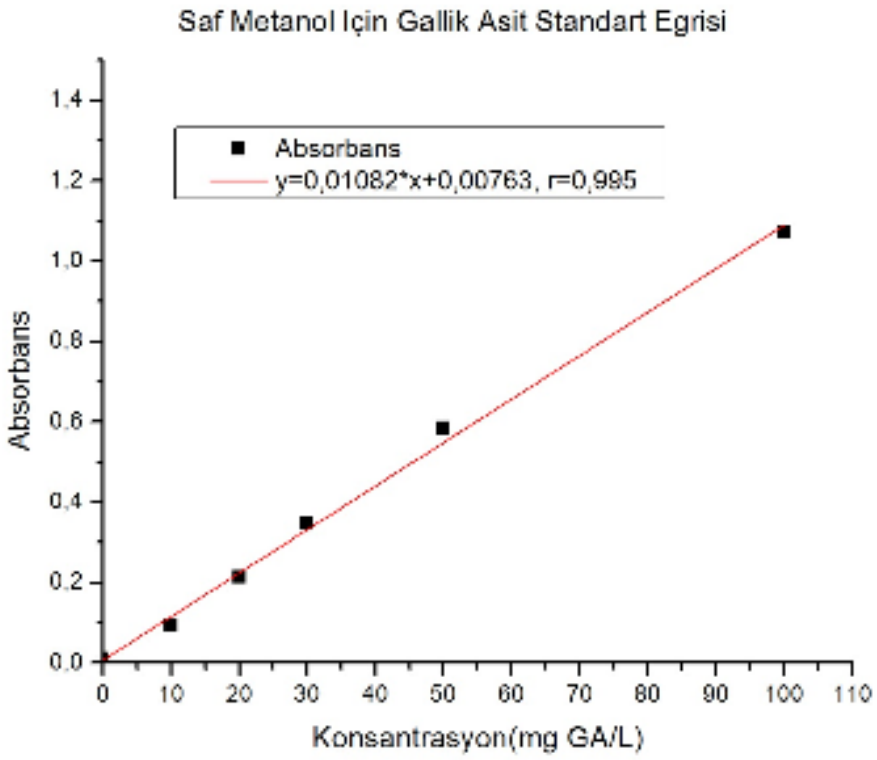
Şekil A.10 : %70 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



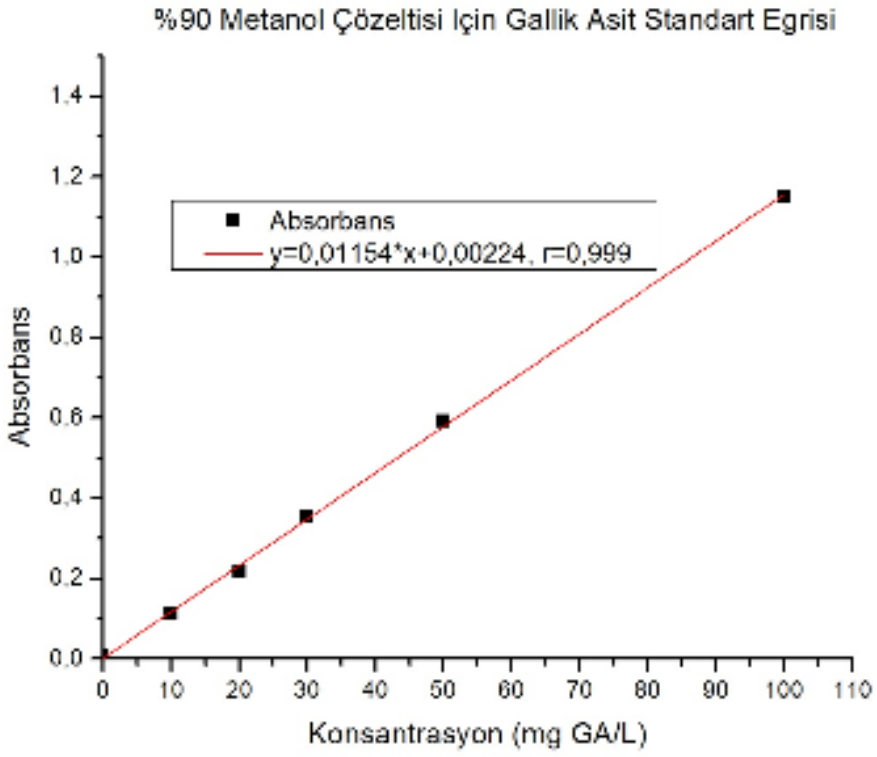
Şekil A.11 : %60 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



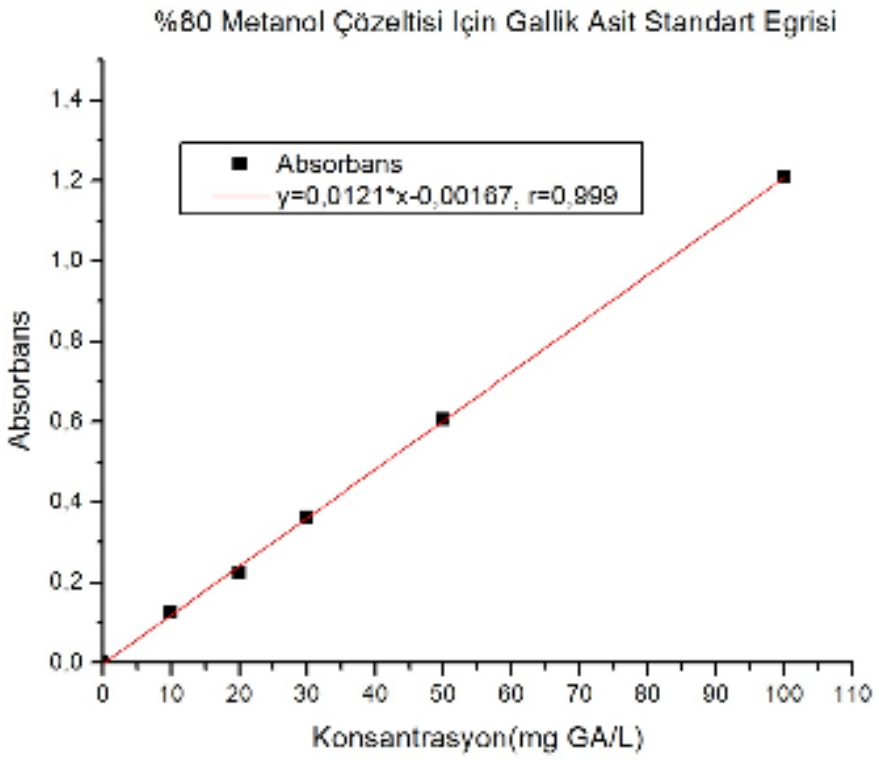
Şekil A.12 : %40 Etanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



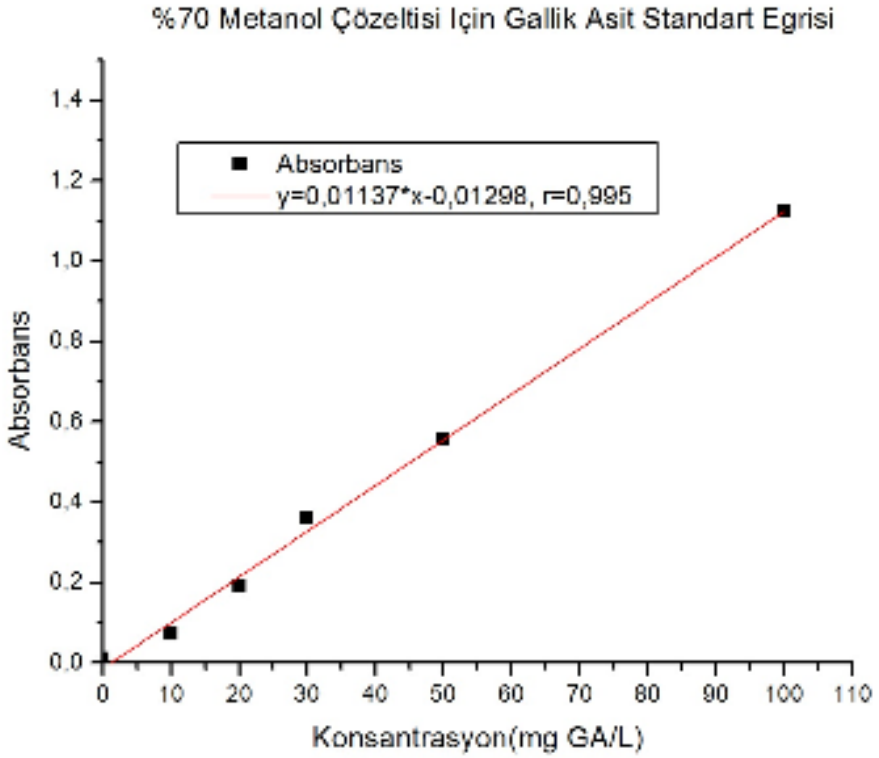
Şekil A.13 : Saf metanol çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



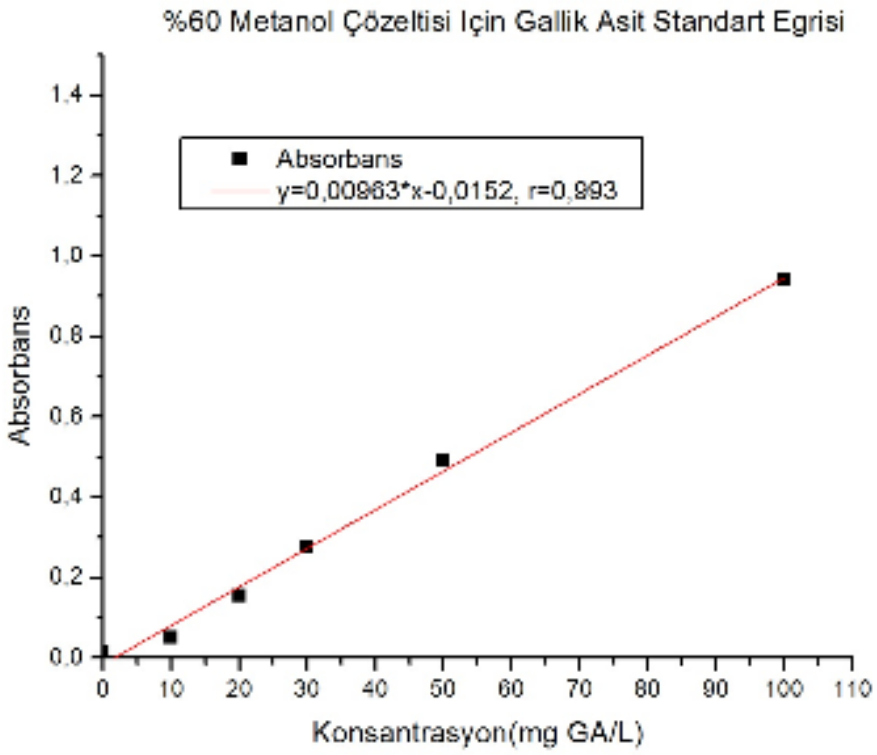
Şekil A.14 : %90 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



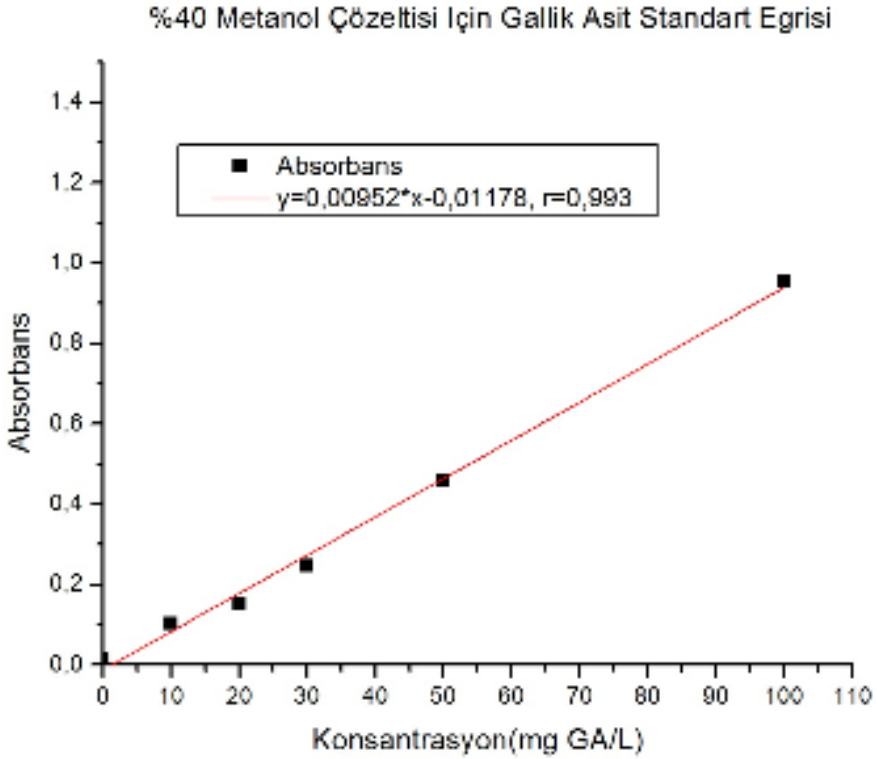
Şekil A.15 : %80 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



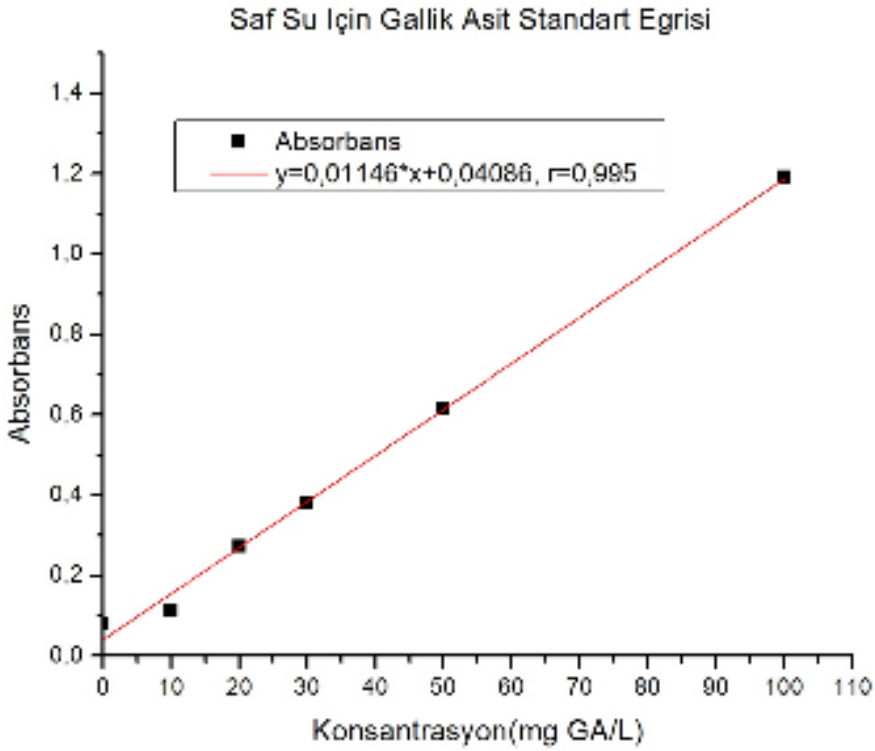
Şekil A.16 : %70 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



Şekil A.17 : %60 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



Şekil A.18 : %40 Metanol-su çözeltisi için gallik asit standart eğrisi.



Şekil A.19 : Saf su için gallik asit standart eğrisi.

EK -B

Çizelge B.1 : 16 farklı çözücü ile ekstrakte edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Çözücü		Örnek[a] (Ort.)	±SD[b]	Kontrol[c] (Ort.)	±SD[d]	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)[e]	±SD[f]
Aseton	%100	0,285	0,011	0,084	0,008	0,201	0,011
	%90	0,378	0,010	0,076	0,001	0,302	0,007
	%80	0,369	0,008	0,053	0,006	0,306	0,008
	%70	0,366	0,019	0,053	0,008	0,313	0,016
	%60	0,361	0,018	0,040	0,009	0,302	0,016
	%40	0,290	0,012	0,027	0,002	0,263	0,008
Etanol	%100	0,254	0,014	0,077	0,006	0,177	0,012
	%90	0,280	0,010	0,079	0,001	0,201	0,007
	%80	0,269	0,016	0,052	0,004	0,217	0,012
	%70	0,366	0,019	0,053	0,008	0,313	0,016
	%60	0,384	0,009	0,051	0,004	0,333	0,007
	%40	0,285	0,016	0,027	0,006	0,259	0,013
Metanol	%100	0,255	0,009	0,038	0,005	0,217	0,009
	%90	0,295	0,010	0,046	0,001	0,249	0,007
	%80	0,309	0,010	0,028	0,006	0,281	0,009
	%70	0,386	0,006	0,029	0,008	0,357	0,008
	%60	0,287	0,009	0,029	0,004	0,259	0,008
	%40	0,277	0,019	0,025	0,005	0,252	0,015
Su	%100	0,156	0,008	0,035	0,004	0,121	0,007

[a] *Örnek absorbansları ortalamaları (n=3).*

[b] *Örnek absorbansları ortalamalarının standart*

[c] *Kontrol örnekleri absorbansları ortalamaları (n=2).*

[d] *Kontrol örnekleri absorbansları ortalamalarının standart sapmaları (±SD).*

[e] *Örnek absorbans ortalamaları – Kontrol absorbans ortalamaları.*

[f] *Örnek absorbans ortalamaları – Kontrol absorbans ortalamaları standart sapmaları (±SD).*

Çizelge B.2 : 1 g/10 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,151	0,004	0,050	0,005	0,102	0,009
20	0,191	0,002	0,050	0,001	0,141	0,003
30	0,235	0,006	0,051	0,004	0,185	0,010
40	0,270	0,007	0,056	0,001	0,215	0,008
60	0,293	0,006	0,047	0,006	0,247	0,012
120	0,312	0,004	0,040	0,001	0,272	0,005
240	0,320	0,020	0,038	0,003	0,282	0,023
360	0,371	0,009	0,049	0,002	0,323	0,011
480	0,390	0,008	0,052	0,001	0,339	0,008

Çizelge B.3 : 1 g/25 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,091	0,006	0,050	0,005	0,042	0,011
20	0,109	0,005	0,050	0,001	0,059	0,006
30	0,116	0,008	0,051	0,004	0,065	0,012
40	0,121	0,005	0,056	0,001	0,065	0,005
60	0,130	0,002	0,047	0,006	0,083	0,009
120	0,140	0,003	0,040	0,001	0,100	0,004
240	0,173	0,003	0,038	0,003	0,135	0,006
360	0,190	0,003	0,049	0,002	0,142	0,006
480	0,195	0,003	0,042	0,001	0,153	0,003

Çizelge B.4 : 1 g/50 g katı madde/çözücü oranıyla elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,079	0,002	0,041	0,003	0,038	0,005
20	0,085	0,002	0,039	0,004	0,046	0,005
30	0,090	0,001	0,048	0,002	0,042	0,003
40	0,093	0,002	0,051	0,004	0,042	0,006
60	0,102	0,005	0,052	0,004	0,050	0,009
120	0,108	0,002	0,045	0,007	0,063	0,009
240	0,111	0,003	0,042	0,002	0,069	0,005
360	0,122	0,002	0,049	0,005	0,073	0,006
480	0,126	0,002	0,041	0,003	0,085	0,006

Çizelge B.5 : Farklı kurutma şekilleri ile kurutulma sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

K.Ş.[a]	Çözücü	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
E.[b]	%90 Aseton	0,378	0,010	0,076	0,001	0,302	0,007
	%60 Etanol	0,384	0,009	0,051	0,004	0,333	0,007
	%70 Metanol	0,386	0,006	0,029	0,008	0,357	0,008
M.[c]	%90 Aseton	0,570	0,004	0,102	0,006	0,469	0,010
	%60 Etanol	0,448	0,006	0,066	0,005	0,382	0,010
	%70 Metanol	0,543	0,008	0,047	0,001	0,496	0,009

[a] Kurutma şekli, [b]Etüv, [c] Mikrodalga.

Çizelge B.6 : Sokslet ve karıştırmalı ekstraktörden elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

K.Ş.[a]	Çözücü	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
K.E.[b]	Saf Aseton	0,285	0,011	0,084	0,008	0,201	0,011
	Saf Etanol	0,254	0,014	0,077	0,006	0,177	0,012
	Saf Metanol	0,255	0,009	0,038	0,005	0,217	0,009
	Saf Su	0,187	0,008	0,035	0,004	0,152	0,007
S.E.[c]	Saf Aseton	0,248	0,005	0,032	0,008	0,217	0,013
	Saf Etanol	0,551	0,006	0,074	0,006	0,477	0,011
	Saf Metanol	0,570	0,004	0,079	0,003	0,491	0,006
	Saf Su	0,156	0,008	0,035	0,004	0,121	0,007

[a] Karıştırma şekli, [b]Karıştırmalı ekstraktör, [c] Sokslet ekstraktörü.

Çizelge B.7 : 25˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,151	0,004	0,0495	0,0049	0,102	0,009
20	0,191	0,002	0,05	0,0014	0,141	0,003
30	0,237	0,005	0,0505	0,0035	0,187	0,009
40	0,264	0,006	0,0555	0,001	0,209	0,007
60	0,294	0,003	0,0465	0,0064	0,248	0,009
120	0,307	0,004	0,04	0,0014	0,267	0,005
240	0,320	0,020	0,038	0,0028	0,282	0,023
360	0,375	0,007	0,0485	0,0021	0,327	0,009
480	0,392	0,008	0,0515	0,001	0,341	0,009

Çizelge B.8 : 40˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,182	0,006	0,029	0,003	0,153	0,009
20	0,255	0,003	0,027	0,002	0,228	0,005
30	0,325	0,004	0,034	0,003	0,291	0,007
40	0,349	0,003	0,028	0,004	0,322	0,006
60	0,393	0,007	0,025	0,005	0,368	0,012
120	0,426	0,000	0,030	0,002	0,396	0,003
240	0,467	0,004	0,025	0,001	0,443	0,005
360	0,510	0,004	0,031	0,002	0,480	0,006
480	0,529	0,002	0,028	0,003	0,501	0,005

Çizelge B.9 : 70˚C'de yapılan ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,215	0,004	0,0465	0,0064	0,169	0,010
20	0,259	0,008	0,04	0,0014	0,219	0,010
30	0,308	0,002	0,0355	0,0035	0,272	0,005
40	0,368	0,013	0,043	0,0028	0,325	0,016
60	0,412	0,004	0,0465	0,0064	0,366	0,010
120	0,468	0,005	0,04	0,0014	0,428	0,006
240	0,516	0,016	0,038	0,0028	0,478	0,019
360	0,552	0,003	0,0485	0,0021	0,504	0,006
480	0,594	0,002	0,0505	0,0035	0,543	0,005

Çizelge B.10 : Etüv ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,180	0,007	0,032	0,004	0,148	0,011
20	0,261	0,004	0,031	0,001	0,230	0,005
30	0,350	0,005	0,039	0,003	0,311	0,008
40	0,383	0,004	0,0335	0,002	0,350	0,006
60	0,428	0,007	0,0295	0,002	0,399	0,009
120	0,463	0,003	0,043	0,001	0,420	0,004
240	0,494	0,004	0,034	0,004	0,460	0,008
360	0,519	0,007	0,037	0,003	0,482	0,009
480	0,527	0,003	0,0295	0,004	0,498	0,007

Çizelge B.11 : Mikrodalga ile kurutulan zeytin yapraklarınnın ekstraksiyonu sonucu elde edilen ekstraktların 765 nm'de ölçülen absorbans değerleri.

Zaman (dak)	Örnek (Ort.)	±SD	Kontrol (Ort.)	±SD	Örnek(Ort.) - Kontrol(Ort.)	±SD
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
10	0,295	0,004	0,035	0,006	0,260	0,009
20	0,356	0,004	0,031	0,006	0,325	0,010
30	0,434	0,017	0,035	0,006	0,399	0,023
40	0,469	0,010	0,029	0,001	0,441	0,011
60	0,514	0,002	0,035	0,002	0,480	0,004
120	0,542	0,005	0,033	0,001	0,509	0,006
240	0,573	0,005	0,032	0,001	0,541	0,007
360	0,588	0,005	0,035	0,002	0,553	0,007
480	0,618	0,006	0,035	0,005	0,584	0,011

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad : Şafak KARAKULAK

Doğum Yeri ve Tarihi : Kırklareli – 15.03. 1985

Adres : Türkali Mah. Mısırlıbahçe Sok. No:22 Daire:4
Beşiktaş/İstanbul

Lise	: Lüleburgaz Anadolu Lisesi	(1996-2003)
Lisans Üniversite	: İstanbul Üniversitesi- Kimya Müh.	(2003-2007)
Yüksek Lisans	: İstanbul Teknik Üniversitesi	(2007- …)

Bildiği Diller : Türkçe - Anadil
İngilizce - Çok İyi Düzeyde
Fransızca - Orta Düzeyde
Almanca - Başlangıç Düzeyinde