



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**



**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ FENOLİK PROFİLİNİN  
STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ**

**Elaf ABDELILLAH ALI ELHUSSEIN**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ**

**Cilt 1 ve 2**

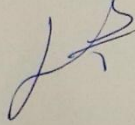
**Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Temel İşlemler ve Termodinamik Programı**

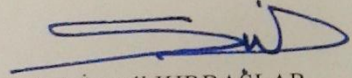
**İSTANBUL-2018**

Bu çalışma 03.01.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Kimya Mühendisliğı Anabilim Dalı, Temel İşlemler ve Termodinamik Programı Yüksek  
Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

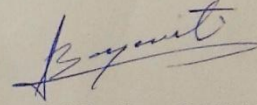
TEZ JÜRİSİ



Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Şah İsmail KIRBAŞLAR  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Şahika Sena BAYAZIT  
Beykent Üniversitesi  
Mühendislik-Mimarlık Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa’nın aboneliği olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 23367 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım süresince tecrübelerini ve değerli bilgilerini benimle her aşamada paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgıyla faydalı olabilmek için elinden geleninin fazlasını sunan, güler yüzü ile samimiyetini benden esirgemeyen, yeni fikirlerime güvenen, yayınlarımın yazılmasına, kongre ve proje gibi bilimsel çalışmalara ve faaliyetlere katılmama teşvik eden ve yol gösteren, gelecek eğitim hayatımın adımları için faydalı düşüncelerini benimle paylaşan ve çok daha başarılı olacağıma ve yükseleceğime inanan, güzel anılar ve unutulmaz hatıralar yaşatan, Türkiye’de ikinci ailem gibi olan ve danışman hoca statüsünü hakkıyla yerine getiren değerli hocam sayın Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ’ye saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, desteklerinden ötürü Kimya Mühendisliği Bölüm Başkanı sayın hocam Prof. Dr. Mehmet BİLGİN’e ve Temel İşlemler ve Termodinamik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail İNCİ’ye saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansta ilk Türkçe olarak yaptığım sunumun sonunda, yabancı dil kullanmak ve yurtdışında yaşayıp eğitim alma tecrübesinin eğlencelerini ve zorluklarını bana anlatan sayın hocam Doç.Dr. Tuncer YALÇINYUVA’ya, güler yüzleri ile severek bilimsel çalışmalarına benim de katılmama sağlayan sayın hocalarım Doç. Dr. Şahika Sena BAYAZİT ve Doç.Dr. Serkan EMİK’e ayrıca teşekkür ederim.

Türkiye’de ilk ve en önemli adım olarak Türkçe öğrenim konusunda beni ileri sevelere getiren sayın hocam Serra Yavuz’a ve İstanbul Üniversitenin dil merkezine de teşekkür ederim.

İçimde olan sanat parçam ile sanat dünyasına bir gezi yapmama fırsat veren sayın Abdullah SEVGİLİ’ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni bu günlere getiren, sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mutlu günlerimi benimle paylaşan ve her sorun yaşadığımda yanlarına çekinmeden gidebildiğim Abdalla ABDALRAZİG, Abubakr BUSHRA, Ahad ELFATİH, Ahmed ADİL, Amjad MAHJOUR, Amani ALDİRDEERY, Awadala SALİH, Dilafruz SAFARALİEVA, Doaa MUSA, Ethar OMER, Fatima BABİKİR, Genevieve HOARE, Halima ELTONİ, Khadija AJİ, Latifa ABDULJALİL, Mawada ISMAİL, Mohammed ABDELATİF, Mohamed ELBADRİ, Mohamed ELFATİH, Mohamed ALHADİ, Nesrin AHMED, Omer ELSHEİKH, Ranyia SOBHİ, Twasul ALTYAR, Tida MUNKONG, Sahar HOLY, Sulafa HOLY, Suzan ABDELKAREEM ve Wala TARİG’e tek tek teşekkür ederim.

Aralık 2018

**Elaf ABDELILLAH ALI ELHUSSIN**

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
TABLO LİSTESİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xviii
ÖZET .....	xxv
SUMMARY .....	xxvi
ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
TABLO LİSTESİ.....	xv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xviii
ÖZET .....	xxv
SUMMARY .....	xxvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	4
2.1. OKSİDASYON VE OKSİDATİF STRES .....	4
2.1.1. Oksidasyon .....	4
2.1.2. Oksidatif stres.....	5
2.1.2.1. Oksidatif stresin hasarları .....	6
2.1.2.2. Acaba, ROS her zaman kötü mü? .....	8
2.2. FONKSİYONEL GIDALAR.....	11
2.2.1. Tanımlar ve sınırlamalar.....	17

2.2.2. Fonksiyonel gıdaya karşı farmasötikler.....	17
2.2.3. Kaynakları ve sınıflandırması.....	17
2.2.3.1. Bitkisel fonksiyonel gıdalar .....	17
2.2.3.2. Hayvansal fonksiyonel gıdalar .....	18
2.2.3.3. Mikrobiyal fonksiyonel gıdalar.....	18
2.2.3.4. Çeşitli fonksiyonel gıdalar .....	19
2.3. FİTOKİMYASALLAR.....	22
2.3.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması ve aktiviteleri.....	25
a. Sınıfları .....	25
b. Aktiviteleri.....	36
2.3.2. Fonksiyonel gıdaların fitokimyasal içeriklerine göre sınıflandırılması.....	39
2.3.2.1. Nişastalı olmayan karbonhidratlar (diyet lifi ve fucoidan) .....	39
2.3.2.2. Antioksidanlar, anti-kanserli ve bağışıklık sistemini düzenleyici ilaçlar .....	42
2.3.2.3. Probiyotikler ve prebiyotikler .....	46
2.4. ANTİOKSİDANLAR .....	48
2.4.1. Mekanizması.....	48
2.4.2. Türleri .....	52
2.4.2.1. Sentetik antioksidanlar .....	52
2.4.2.1. Doğal antioksidanlar .....	53
2.5. ZEYTİN .....	55
2.5.1. Zeytin Ağacı .....	55
2.5.1.1. Dünya çapında zeytin ağacının tarihsel arka planı.....	55
2.5.1.2. Dünya çapında zeytin ağacı tarımı.....	58
2.5.1.3. Türkiye'nin zeytin ağacının tarihi arka planı .....	61
2.5.1.4. Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı .....	62
2.5.1.5. Ağacının taksonomik hiyerarşi ve karakterizasyonu .....	62
2.5.1.6. Ağacının büyümesini ve kompozisyonunu etkileyen faktörler .....	76
2.5.2. Meyvesi .....	78
2.5.2.1. Bileşenleri .....	79
2.5.2.2. Türk tipi zeytin meyvesi .....	82
2.5.3. Zeytinyağı.....	95
2.5.3.1. Bileşenleri.....	95
2.5.3.2. Türk zeytinyağı.....	96

2.5.3.3. Yağın ekstraksiyonu ve yan ürünleri.....	101
2.5.4. Zeytin ürünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin varlığını etkileyen faktörler .....	153
2.6. EKSTRAKSİYON .....	154
2.6.1. Ekstraksiyon işlemi ve teknolojisi.....	157
2.6.1.1. Hidrodistilasyon .....	157
2.6.1.2. Sokslet ekstraksiyonu .....	159
2.6.1.3. Subkritik Su Ekstraksiyonu .....	161
2.6.1.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE).....	164
2.6.1.5. Maserasyon ve süzme ile sulu ve organik çözücü ekstraksiyonu.....	170
2.6.1.6. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu) .....	173
2.6.1.7. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) .....	176
2.6.1.8. Ultrasonik destekli ekstraksiyonu (UAE).....	181
2.6.1.9. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HAE) .....	186
2.6.2. Ekstaksiyon için katkıları .....	203
2.6.2.1. Yüzey aktif madde (surfaktanlar) ve deterjan kullanımı.....	203
2.6.2.2. İyonik sıvı kullanımı.....	204
2.6.3. Ekstraksiyondan önce adımlar.....	205
2.6.3.1. Bitki materyalleri .....	205
2.6.3.2. Ekstraksiyon parametreleri .....	209
2.7. ANALİZLER .....	215
2.7.1. Spektrofotometrik Yöntemler.....	215
2.7.1.1. İlkeleri.....	215
2.7.1.2. Antioksidan aktivite / kapasite analizlerinin sınıflandırılması .....	222
2.7.1.3. Antioksidan Kapasite Ölçümü .....	228
2.7.1.4. Folin-Ciocateu Reaktif (FCR analizi) ile toplam fenol analizi .....	250
2.7.1.5. Alüminyum klorür kolorimetrik ( $AlCl_3$ analizi) ile toplam flavonoid analizi.....	250
2.7.2. Kromatografik Yöntemler .....	251
2.7.2.1. Türleri.....	251
2.7.2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) .....	256
2.7.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	266
2.7.3.1. Prensipleri .....	266
2.7.3.2. SEM Cihazı .....	266
2.8. STABİLİTE.....	270

2.8.1. Raf Ömrü .....	271
2.8.2. Stabilite türleri .....	271
2.8.2.1. Fiziksel Stabilite.....	271
2.8.2.2. Kimyasal stabilite .....	271
2.8.2.3. Mikrobiyolojik stabilite.....	272
2.8.3. Gıda ve İlaç İdaresi stabilite kuralları .....	272
2.8.4. Malezma formlara göre stabiliteyi etkilen faktörler .....	273
2.8.4.1. Sıvı formu.....	273
2.8.4.2. Katı formu.....	274
2.8.5. Malzeme Bozunmasının Mekanizması.....	275
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>308</b>
3.1. MALZEME .....	308
3.1.1. Bitkisel Malzeme.....	308
3.1.2. Kimyasal Malzeme .....	308
3.2. YÖNTEM.....	309
3.2.1. Ekstraksiyon .....	309
3.2.1.1. Metodları .....	309
3.2.1.2. Ön Denemeleri.....	310
3.2.2. Analizler .....	311
3.2.2.1. Spektrofotometrik analizler .....	311
3.2.2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) .....	313
3.2.2.3. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) .....	314
3.2.3. Yönetimlerin modellemesi .....	314
3.2.4. Yönetimlerin istatistiksel analizleri.....	316
3.2.4.1. İstatistiksel analizlere genel bakış ve deney tasarımının önemi.....	318
3.2.4.2. Yanıt Yüzey Metodolojisi ve Merkezi Kompozit Tasarım .....	319
3.2.4.3. Varyans analizi (ANOVA).....	321
3.2.4.4. Varyasyon katsayısı (CV) .....	321
3.2.4.5. Ortalama (M).....	321
3.2.4.6. Standart sapma (SD).....	322
3.2.4.7. Ortalama Karekök Hatası (RMSE).....	322
3.2.4.8. Pearson katsayısı (r).....	322
3.2.4.9. Tukey testi .....	323



3.2.5. Stabilite çalışması .....	324
3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması.....	324
3.2.5.2. Numunelerin Depolaması .....	324
3.2.5.3. Numunelerin stabilitelerinin belirlenmesi .....	324
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>326</b>
4.1. KALİBRASYON ÇALIŞMALARI.....	326
4.2. ÖN DENEMELER.....	328
4.2.1. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HAE) .....	328
4.2.2. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UAE) .....	329
4.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE).....	330
4.3. DENEYSEL TASARIM VE MODELLEME.....	333
4.4. SEM ANALİZİ .....	363
4.5. STABİLİZASYON ÇALIŞMALARI .....	364
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>409</b>
<b>Kaynaklar.....</b>	<b>419</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>526</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

<b>Şekil 2.1:</b> Serbest radikal üretimi/türleri ve oksidatif stres hasarlarının tipleri içeren oksidatif stres mekanizmasının şematik gösterimi	10
<b>Şekil 2.2:</b> Farklı örgütleri tarafından geliştirilmiş fonksiyonel gıda tanımları	20
<b>Şekil 2.3:</b> Fonksiyonel gıdalar ve farmasötikler arasındaki farkın şematik diyagramı	21
<b>Şekil 2.4:</b> Bitkilerde mevcut önemli fenolik bileşiklerin moleküler yapıları ve ana sınıflandırılması	28
<b>Şekil 2.5:</b> Bitkilerde bulunan bazı alkaloidler ve molekül yapıları	32
<b>Şekil 2.6:</b> Bitkilerde bulunan bazı terpenoidler ve molekül yapıları	34
<b>Şekil 2.7:</b> Bitkilerde bulunan bazı saponinler ve molekül yapıları	35
<b>Şekil 2.8:</b> Antioksidanlar ve serbest radikaller arasında meydana gelen reaksiyon mekanizması	51
<b>Şekil 2.9:</b> Dünya çapında zeytin ağacı tarımı (milyon hektar)	59
<b>Şekil 2.10:</b> Dünya çapında zeytin ağacı tarımı (milyon hektar)	60
<b>Şekil 2.11:</b> 1996, 2003, 2004 ve 2005 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	63
<b>Şekil 2.12:</b> 1995 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	64
<b>Şekil 2.13:</b> 1997 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	65
<b>Şekil 2.14:</b> 1998 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	66
<b>Şekil 2.15:</b> 1999 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	67
<b>Şekil 2.16:</b> 2000, 2001 ve 2002 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	68
<b>Şekil 2.17:</b> 2006 ve 2007 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	69
<b>Şekil 2.18:</b> 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 ve 2014 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	70
<b>Şekil 2.19:</b> 2013, 2015 ve 2016 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı	71
<b>Şekil 2.20:</b> 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'de bulunan meyve veren ve vermeyen zeytin ağaçlarının sayısı	72
<b>Şekil 2.21:</b> Zeytin ağacının genel karakterizasyonu	73
<b>Şekil 2.22:</b> Zeytin ağacının alt kısımlarının karakterizasyonu	74
<b>Şekil 2.23:</b> Zeytin ağacının üs kısımlarının karakterizasyonu	75
<b>Şekil 2.24:</b> Bölgelere göre zeytin üretimi	83

<b>Şekil 2.25:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi üretim miktarı ( $10^6$ ton)	84
<b>Şekil 2.26:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi üretim miktarı	85
<b>Şekil 2.27:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi verimi ( $10^6$ hg/ha)	86
<b>Şekil 2.28:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi verimi	87
<b>Şekil 2.29:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi ihracatı ( $10^3$ ton)	88
<b>Şekil 2.30:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi ithalatı ( $10^3$ ton)	89
<b>Şekil 2.31:</b> Dünya çapında zeytin meyvesi tüketimi ( $10^3$ ton)	90
<b>Şekil 2.32:</b> 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'deki zeytin meyvesi üretimi	93
<b>Şekil 2.33:</b> Türk tipi zeytin meyvesi yerel özellikleri	94
<b>Şekil 2.34:</b> Dünya çapında zeytinyağı ihracatı ( $10^3$ ton)	97
<b>Şekil 2.35:</b> Dünya çapında zeytinyağı ithalatı ( $10^3$ ton)	98
<b>Şekil 2.36:</b> Dünya çapında zeytinyağı tüketimi ( $10^3$ ton)	99
<b>Şekil 2.37:</b> Türk zeytinyağının genel özellikleri	100
<b>Şekil 2.38:</b> Zeytinyağının ekstraksiyon işlemi ve yan ürünleri akış şemaları	102
<b>Şekil 2.39:</b> Zeytin yaprağının kimyasal içeriği	142
<b>Şekil 2.40:</b> Türk orijinli zeytin yaprağının kimyasal ve fiziksel özellikleri	149
<b>Şekil 2.41:</b> Oleuropeinin 3 boyutlu olarak moleküler yapısı	151
<b>Şekil 2.42:</b> Oleuropeinin hidroksitirosole degradasyonu	152
<b>Şekil 2.43:</b> Hidrodistilasyon düzeneği (Clevenger aparatı)	158
<b>Şekil 2.44:</b> Soklet sistemi	160
<b>Şekil 2.45:</b> Subkritik su ekstraksiyon sistemi	163
<b>Şekil 2.46:</b> Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sistemi	169
<b>Şekil 2.47:</b> Maserasyon ekstraktör sistemi	171
<b>Şekil 2.48:</b> Süzme ekstraktör sistemi	172
<b>Şekil 2.49:</b> Basınçlı sıvı ekstraktör (hızlandırılmış solvent ekstraktör) sistemi	175
<b>Şekil 2.50:</b> Mikrodalga destekli ekstraksiyon için (a) odaklanmış açık-kapılı MAE sistemi, (b) kapalı damarlı MAE sistemi	180
<b>Şekil 2.51:</b> Ultrason destekli ekstraktör sistemi	185

<b>Şekil 2.52:</b> Homojenizatör destekli ekstraktör sistemi	190
<b>Şekil 2.53:</b> Spektrofotometre sistemi	217
<b>Şekil 2.54:</b> ABTS <sup>++</sup> radikalinin oluşumu için reaksiyon	231
<b>Şekil 2.55:</b> DPPH oluşturmak için DPPH serbest radikal ve antioksidan arasındaki reaksiyon	237
<b>Şekil 2.56:</b> ORAC analizi sırasında AAPH radikalinin ve antioksidanın reaksiyonları	243
<b>Şekil 2.57:</b> HPLC sisteminin şematik diyagramı	259
<b>Şekil 2.58:</b> Taramalı elektron mikroskopunun temel bileşenleri	269
<b>Şekil 3.1:</b> Yönetimlerin istatistiksel analizleri şematik grafiği	317
<b>Şekil 4.1:</b> HAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve karıştırma hızının ekstraksiyon verimine etkisi	328
<b>Şekil 4.2:</b> UAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve ultrasonik titreşimlerin genliğinin ekstraksiyon verimine etkisi	329
<b>Şekil 4.3:</b> MAE yöntemi ile mikrodalga gücüne göre ve işlem sıcaklığının 50°C'den fazlasına geçmeden işlem süresinin değişimi	330
<b>Şekil 4.4:</b> MAE yönteminde çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon verimine etkisi	331
<b>Şekil 4.5:</b> MAE yönteminde mikrodalga gücünün göre ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon verimine etkisi	331
<b>Şekil 4.6:</b> MAE yönteminde zeytin yaprağı miktarının ekstraksiyon verimine etkisi	332
<b>Şekil 4.7:</b> (a.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (a.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %50, v/v ve çözücü hacmi = 25 mL), (b.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (b.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin karıştırma hızı ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 60 saniye ve çözücü hacmi = 25 mL) ve (c.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (c.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin karıştırma hızı ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 60 saniye ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) 3D yüzey grafikleri	337
<b>Şekil 4.8:</b> (ç.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (ç.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı = 7000 rpm ve çözücü hacmi = 25 mL), (d.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (d.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı = 7000 rpm ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) ve (e.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin çözücünün konsantrasyonu ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı = 7000 rpm ve ekstraksiyon süresi = 60 saniye) 3D yüzey grafikleri	338
<b>Şekil 4.9:</b> (a.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (a.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %50, v/v ve çözücü hacmi = 25 mL), (b.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (b.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 50 dakika ve çözücü hacmi = 25 mL) ve (c.1) TPM-Y <sub>1</sub> ve (c.2) TFM-Y <sub>2</sub> 'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 50 dakika ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) 3D yüzey grafikleri	343

- Şekil 4.10:** (ç.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (ç.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve çözücü hacmi = 25 mL), (d.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (d.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) ve (e.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin çözücü konsantrasyonu ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve ekstraksiyon süresi = 50 dakika) 3D yüzey grafikleri 344
- Şekil 4.11:** (a.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (a.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %25, v/v ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g), (b.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (b.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin mikrodalga gücü ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 1 dakika ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g) ve (c.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (c.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin mikrodalga gücü ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 1 dakika ve çözücü konsantrasyonu = %25, v/v) 3D yüzey grafikler 349
- Şekil 4.12:** (ç.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (ç.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (mikrodalga gücü = 200 W ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g), (d.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (d.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak (mikrodalga gücü = 200 W ve çözücü konsantrasyonu = %25, v/v) ve (e.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin çözücü konsantrasyonu ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak (mikrodalga gücü = 200 W ve ekstraksiyon süresi = 1 dakika) 3D yüzey grafikleri 350
- Şekil 4.13:** Zeytin yapraklarının SEM görüntüleri (a): İşlem görmemiş; (b) HAE ile ekstrakte edilmiş; (c) UAE ile ekstrakte edilmiş; (d) MAE ile ekstrakte edilmiş 363
- Şekil 4.14:** HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu 370
- Şekil 4.15:** UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu 377
- Şekil 4.16:** MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu 384
- Şekil 4.17:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 385
- Şekil 4.18:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 386
- Şekil 4.19:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 387
- Şekil 4.20:** HAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 388
- Şekil 4.21:** HAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 389
- Şekil 4.22:** HAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi 390

<b>Şekil 4.23:</b> HAE ile elde edilmiş ve -20°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	391
<b>Şekil 4.24:</b> HAE ile elde edilmiş ve 4°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	392
<b>Şekil 4.25:</b> UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	393
<b>Şekil 4.26:</b> UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	394
<b>Şekil 4.27:</b> UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	395
<b>Şekil 4.28:</b> UAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	396
<b>Şekil 4.29:</b> UAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	397
<b>Şekil 4.30:</b> UAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	398
<b>Şekil 4.31:</b> UAE ile elde edilmiş ve -20°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	399
<b>Şekil 4.32:</b> UAE ile elde edilmiş ve 4°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	400
<b>Şekil 4.33:</b> MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	401
<b>Şekil 4.34:</b> MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	402
<b>Şekil 4.35:</b> MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	403
<b>Şekil 4.36:</b> MAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	404
<b>Şekil 4.37:</b> MAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	405
<b>Şekil 4.38:</b> MAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	406
<b>Şekil 4.39:</b> MAE ile elde edilmiş ve -20°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	407
<b>Şekil 4.40:</b> MAE ile elde edilmiş ve 4°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi	408

## TABLO LİSTESİ

Sayfa No

<b>Tablo 2.1:</b> Bazı hastalık riski azaltma için faydalı fonksiyonlara sahip olan besleyici olmayan bileşenler	12
<b>Tablo 2.2:</b> Bitkilerde bulunan biyoaktif ve hastalık önleyici fitokimyasallar ve fonksiyonları	24
<b>Tablo 2.3:</b> Bitkilerde mevcut olan fenolik bileşiklerin karbon atomu sayılarına göre ana sınıfları	27
<b>Tablo 2.4:</b> Zeytin yaprağının kurutulması, biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonu ve analizleri ile ilgili yapılmış olan çalışmaların özeti	191
<b>Tablo 2.5:</b> Ekstraksiyon için kullanılan bazı yaygın çözücülerin fiziksel özellikleri	212
<b>Tablo 2.6:</b> AOA/TAC analizlerin sınıflandırması	227
<b>Tablo 2.7:</b> Biyoaktif bileşiklerinin stabilitesinin incelenmesinde literatürde gösterilmiş çalışmaların özeti	277
<b>Tablo 3.1:</b> HPLC sisteminin gradient elusyon programıdır	313
<b>Tablo 3.2:</b> HAE, UAE ve MAE'nin optimizasyonu için CYY'de kullanılan bağımsız değişkenlerin değerleri, seviyelerin kodu ve sembolleri	315
<b>Tablo 3.3:</b> Depolama koşulları ve numunelerin ayrıntıları	325
<b>Tablo 4.1:</b> Farklı konsantrasyondaki etanol içerisindeki gallik asit, kateşin ve troluks çözeltilerinin farklı analiz metodları için oluşturulan kalibrasyon denklemlerinin parametreleri	326
<b>Tablo 4.2:</b> Farklı konsantrasyondaki etanol içerisindeki gallik asit, kateşin ve troluks çözeltilerinin farklı analiz metodları için oluşturulan kalibrasyon denklemlerinin parametreleri	327
<b>Tablo 4.3:</b> HAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_1$ , $X_2$ , $X_3$ ve $X_4$ ) ve deneysel sonuçlar	333
<b>Tablo 4.4:</b> HAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_1$ , $X_2$ , $X_3$ ve $X_4$ ) ve deneysel sonuçlar	335
<b>Tablo 4.5:</b> UAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_5$ , $X_6$ , $X_7$ ve $X_8$ ) ve deneysel sonuçlar	339
<b>Tablo 4.6:</b> UAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_5$ , $X_6$ , $X_7$ ve $X_8$ ) ve deneysel sonuçlar	341
<b>Tablo 4.7:</b> MAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_9$ , $X_{10}$ , $X_{11}$ ve $X_{12}$ ) ve deneysel sonuçlar	345
<b>Tablo 4.8:</b> MAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_9$ , $X_{10}$ , $X_{11}$ ve $X_{12}$ ) ve deneysel sonuçlar	347
<b>Tablo 4.9:</b> HAE, UAE, MAE yöntemleri ile elde edilen TPM ve TFM için üretilmiş olan varyans testi göstergeleri	352
<b>Tablo 4.10:</b> HAE, UAE ve MAE yöntemleri için türetilen model eşitliklerinin güvenilirlik ölçütleri	359
<b>Tablo 4.11:</b> HAE, UAE ve MAE yöntemlerinden ekstrakte edilen TPM ve TFM için hesaplanan optimum koşullar ve sonuçların validasyonu	360

<b>Tablo 4.12:</b> HAE, UAE ve MAE yöntemleri ile elde edildiği zeytin yaprağının ekstraktlarının TPM, TFM ve AA içerikleri arasındaki korelasyon değerler	361
<b>Tablo 4.13:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri	364
<b>Tablo 4.14:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri	365
<b>Tablo 4.15:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri	366
<b>Tablo 4.16:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri	367
<b>Tablo 4.17:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri	368
<b>Tablo 4.18:</b> HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri	369
<b>Tablo 4.19:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri	371
<b>Tablo 4.20:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri	372
<b>Tablo 4.21:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri	373
<b>Tablo 4.22:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri	374
<b>Tablo 4.23:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri	375
<b>Tablo 4.24:</b> UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriklerinin kararlılık süreleri	376
<b>Tablo 4.25:</b> MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri	378
<b>Tablo 4.26:</b> MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri	379
<b>Tablo 4.27:</b> MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri	380
<b>Tablo 4.28:</b> MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri	381
<b>Tablo 4.29:</b> MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri	382



**Tablo 4.30:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriklerinin kararlılık süreleri 383



## SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
$^{\circ}\text{C}$	: Derece santigrat
<b>pH</b>	: Çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi (Power of hydrogen)
$\phi$	: Hacim fraksiyonu
$R_f$	: Alıkonma faktörü
$D_1$	: Çözünenin hareket ettiği mesafe
$D_2$	: Çözücü önünün kat ettiği mesafe
$r$	: Pearson korelasyon katsayısı
$R^2$	: Belirleme katsayısı
$N$	: Toplam deney sayısı
$k$	: Deneyde incelenen faktörlerin sayısı
$n$	: Deneyenin tekrarların sayısı, Verilerin sayısı ve Gözlemlerin sayısı
$Y$	: Cevapları
$k$	: Toplam sayı bağımsız faktörü
$\beta$	: Bir kesişme için katsayı değeri
$\beta_i$	: Doğrusal için katsayı değeri
$\beta_{ii}$	: Kuadratik (ikinci dereceli) için katsayı değeri
$\beta_{ij}$	: Etkileşim efektleri için katsayı değeri
$x_i$ ve $x_j$	: Bağımsız değişkenler için kodlanmış seviyeleri
$x$	: Veri değeri
$\mu$	: Gözlem setinden hesaplanan doğru değer tahmini
$x_i$	: Gözlemlerinin kümelerinden biri
$a_w$	: Su aktivitesi
$a$	: Eğim
$b$	: Kesişme
$r^2$	: Determinasyon katsayısı (Doğrusal Denklem)
$R^2$	: Determinasyon katsayısı (Çoklu Regresyon Analizi)
$R^2_a$	: Düzeltmiş determinasyon katsayısı (Çoklu Regresyon Analizi)

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>RCS</b>	: Reaktif klorin türleri
<b>RBS</b>	: Reaktif bromin türleri
<b>RSS</b>	: Reaktif sülfür türleri
<b>UV/X</b>	: Morötesi ışık / X radyasyonu
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>FOSHU</b>	: Foods for Specified Health Uses
<b>-OH</b>	: Hidroksil grubunu
<b>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH</b>	: Fenol
<b>CH<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)-CH=CH<sub>2</sub> ve C<sub>5</sub>H<sub>8</sub></b>	: İzopren
<b>HDL</b>	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>mRNA</b>	: mRibonükleik asit (Messenger RNA)
<b>AnOH</b>	: Fenolik antioksidanı
<b>ROOH</b>	: Hidroperoksitler
<b>AnO</b>	: Antioksidan radikali
<b>ROO</b>	: Peroksil radikali
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HO</b>	: Hidroksil radikali
<b>ONOO</b>	: Peroksinitrit
<b>R·, RO·, ROO·</b>	: Serbest radikaller
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit anyonu
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Tekli oksijen
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>M</b>	: Metal katyonu
<b>BHA</b>	: Bütillenmiş hidroksi anisol
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş hidroksi toluen tersiyer bütül hidrokinon
<b>PG</b>	: Propil gallat
<b>TBMP</b>	: 2-terciyer butül-4-metilfenol
<b>TBQ</b>	: 2-terciyer butül 1,4-benzokinon metaboliti
<b>GRAS</b>	: Generally recognized as safe
<b>M.Ö.</b>	: Milattan Önce
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>AB</b>	: Avrupa Birliği

<b>FAOSTAT</b>	: Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics
<b>K</b>	: Potasyum
<b>N</b>	: Nitrojen
<b>g/L</b>	: Gram/Litre
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>Na</b>	: Sodyum
<b>Mg</b>	: Magnezyum
<b>Ca</b>	: Kalsiyum
<b>hg/ha</b>	: Hectogramme/Hektar
<b>IOC</b>	: International Olive Council
<b>TÜİK</b>	: Türkiye istatistik kurumu
<b>kg</b>	: Kilogram
<b>PUFA</b>	: Çoklu doymamış yağ aside
<b>SFA</b>	: Tekli doymuş yağ aside
<b>PUFA/SFA</b>	: Çoklu doymamış yağ asitleri/ Tekli doymuş asitlerinin yağ oranı
<b>VOO</b>	: Natürel birinci zeytinyağı
<b>Al</b>	: Alüminyum
<b>As</b>	: Arsenik
<b>B</b>	: Bor
<b>Cr</b>	: Krom
<b>Cu</b>	: Bakır
<b>Fe</b>	: Demir
<b>Li</b>	: Lityum
<b>P</b>	: Fosfor
<b>Pb</b>	: Lead
<b>V</b>	: Vanadyum
<b>Zn</b>	: Çinko
<b>Mn</b>	: Manganez
<b>Ni</b>	: Nikel
<b>mg KOH/g</b>	: Potasyum hidroksidin miligramı/yağın gramı
<b>meq/kg</b>	: Miliequivalent/yağın kilogramı
<b>mg-GAE/kg</b>	: Gallik asidin miligramı/yağın kilogramı
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon dioksit
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit

<b>MBC ve MIC</b>	: Minimum bakterisidal konsantrasyonu
<b>TC</b>	: Total kolesterol (TC)
<b>TG</b>	: Trigliseritler (TG)
<b>LDL-C</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol
<b>LDL</b>	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<b>SFE</b>	: Süperkritik akışkan ekstraksiyonu
<b>MAE</b>	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
<b>UAE</b>	: Ultrasonik destekli ekstraksiyonu
<b>HAE</b>	: Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon
<b>MPa</b>	: MegaPaskal
<b>W</b>	: Vat
<b>(%, v/v)</b>	: % Konsantrasyon oranı, hacim/hacim
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>L</b>	: Litre
<b>TPM</b>	: Toplam Fenolik miktarı
<b>FCR</b>	: Folin - Ciocalteu reaktifi
<b>AA</b>	: Antioksidant aktifite
<b>DPPH</b>	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<b>HPLC-DAD</b>	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Diyot Dizi Dedektörü
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>rpm</b>	: Dakikadaki devir sayısı
<b>TFM</b>	: Toplam flavonoid miktarı
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	: Alüminyum klorür
<b>HPLC/LC-ESI-MS/MS</b>	: Sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-tandem kütle spektrometresi
<b>ABTS</b>	: 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
<b>CUPRAC</b>	: Bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite
<b>SFMAE</b>	: Solventsiz mikrodalga destekli ekstraksiyonu
<b>m/s</b>	: Meter/saniye
<b>Hz</b>	: Hertz
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>HPLC-ESI-TOF/IT-MS/ IT-MS<sup>2</sup></b>	: Elektrosprey uçuş zamanı kütle spektrometresi (ESI-TOF-MS) ve elektrosprey iyon tuzağı tandem kütle spektrometrisine (ESI-IT-MS (2)) yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bağlı formu
<b>HPLC-ESI-QTOF-MS</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi - Elektrosprey iyonizasyonuna ve dört kutuplu uçuş zamanı kütle spektrometresi

<b>HPLC-ESI-TOF/IT-MS</b>	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi - Elektrosprey iyonizasyonunun uçuş zamanı kütle spektrometresi
<b><i>P</i></b>	: Polarites
<b><i>P<sub>a</sub></i></b>	: <i>a</i> çözünün polaritesi
<b><i>P<sub>b</sub></i></b>	: <i>b</i> çözünün polaritesi
<b>g/mL</b>	: Gram/mililitre
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>VIS</b>	: Görünür ışık veya görünür spektrum
<b>UV-VIS</b>	: Ultraviyole-görünür spektroskopisi
<b><math>\mu</math>L</b>	: Mikrolitre
<b>Cs</b>	: Sezyum
<b>Ag</b>	: Gümüş
<b>Cs-Sb</b>	: Sezyum- Antimon alaşımı (Mavi fotosel)
<b>HAT</b>	: Hidrojen atomu transfer
<b>SET</b>	: Tek elektron transferine
<b>AOA / TAC</b>	: Antioksidan oksidative aktivitesi / toplam antioksidan kapasitesi
<b>FR<sup>•</sup></b>	: Serbest radikaller
<b>AH</b>	: Antioksidanlar, lipidler / proteinler / DNA molekülleri
<b>A<sup>•</sup></b>	: Antioksidan radikalleri
<b>H<sup>•</sup></b>	: Hidrojen aktif atomunu
<b>e<sup>-</sup></b>	: Elektron
<b>Cu<sup>+</sup></b>	: Bakır iyonu
<b>Fe<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	: Demir İyonu
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>ArOH</b>	: Fenolün
<b>ArO<sup>•</sup></b>	: Ariloksi radikali
<b>AH</b>	: Biyomolekülleri
<b>A<sup>•</sup></b>	: Biyomolekülleri serbest radikal formu
<b>ET</b>	: Elektron transferi
<b>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></b>	: Hidronyum
<b>FRAP</b>	: Ferrik Azaltıcı Antioksidan Kapasite
<b>ORAC</b>	: Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi
<b>TEAC</b>	: Trolox eşdeğer kapasite
<b><i>t</i></b>	: Süre
<b>Abs<sub>t=0</sub></b>	: 0 dakikada absorbansı
<b>Abs<sub>t=t</sub></b>	: <i>t</i> dakikadan sonra absorbansı

<b>HPS</b>	: Hidrojen peroksit süpürücü
<b>ARP</b>	: Antiradikal güç
<b>Fe(III)-TPTZ</b>	: Ferrik tripitridiltriazin kompleksi
<b>TPTZ</b>	: 2,4,6-tripiridil-S-triazin ligandını
<b><math>A_{control}</math></b>	: Fe <sup>2+</sup> /ferrozine kompleksinin absorbansı
<b><math>A_{numune}</math></b>	: Test bileşiğinin absorbansı
<b>Br<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Diatomik Brom iyonu
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	: Hidrojen peroksidin iyonu
<b>AAPH</b>	: 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorürün
<b>M</b>	: Molar konsantrasyon (molarite)
<b>AUC<sub>numune</sub></b>	: Numunenin Trolox'un değeri için eğri altındaki alanı
<b>AUC<sub>blank</sub></b>	: Blank çözeltinin Trolox'un değeri için eğri altındaki alanı
<b>AUC<sub>Trolox</sub></b>	: Trolox'un değeri için eğri altındaki alanı
<b>TRAP</b>	: Telomeraz Tekrarlanan Amplifikasyon Protokolü
<b>mM</b>	: milimol/litre
<b>μM</b>	: micromol/litre
<b>MeOH</b>	: Metanol
<b>HCl</b>	: Hidrojen klorür
<b>PC</b>	: Kağıt kromatografisi
<b>TLC</b>	: İnce tabaka kromatografisi
<b>GC</b>	: Gaz kromatografisi
<b>LC</b>	: Sıvı kromatografisi
<b>RP-HPLC veya RPC</b>	: Ters fazlı HPLC
<b>FID</b>	: Alev iyonizasyon detektörü
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskobu
<b>FDA</b>	: Gıda ve İlaç İdaresi
<b>I3C</b>	: İndol-3-karbinol
<b>EGC</b>	: Epigallokateşin
<b>ECG</b>	: Epikateşin gallat
<b>EGCG</b>	: Pigallokateşin gallat
<b>PC-B2</b>	: Prosiyanidin B2
<b>EC</b>	: (-) Epikateşin
<b>CgA</b>	: Klorojenik asit
<b>HP</b>	: Hiperosid
<b>IQ</b>	: Isoquercitrin

<b>RH</b>	: Bağıl nem
<b>GHz</b>	: GegaHertz
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Sodyum karbonat
<b>mg-GAE / g-KY</b>	: miligram galik asit/gram kurutulmuş zeytin yaprağı
<b>mg-CE / g-KY</b>	: miligram kateşin/gram kurutulmuş zeytin yaprağı
<b>(% , w/v)</b>	: % Konsantrasyon oranı, ağırlık / hacim
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	: Sodyum nitrat
<b>mg-TEAC / g-KY</b>	: miligram troloks eşdeğeri /gram kurutulmuş zeytin yaprağı
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	: Amonyum asetat
<b>CYY</b>	: Cevap Yüzey Yöntemi
<b>MKT</b>	: Merkezi kompozit tasarım
<b>ANOVA</b>	: Varyans analizi
<b>RMSE</b>	: Ortalama karekök hatası
<b>SD</b>	: Standart sapma
<b>M</b>	: Ortalama
<b>CV<sub>xy</sub></b>	: x ve y verilerin kovaryansı
<b>SD<sub>x</sub></b>	: x verinin standart sapması
<b>SD<sub>y</sub></b>	: y verinin standart sapması
<b>N</b>	: Normallik
<b>atm</b>	: Atmosferik basınç



## ÖZET

### ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ FENOLİK PROFİLİNİN STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

#### YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elaf ABDELİLLAH ALİ ELHUSSEİN

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Anabilim Dalı Adı

Danışman : Doç. Dr. Selin ŞAHİN SEVGİLİ

Bu çalışmada üç farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılıp optimize edilerek elde edilen zeytin yaprağı ekstraktları farklı koşullarda depolanarak belirli aralıklarda analiz edilmiş ve fenolik profilinin değişimi, toplam flavonoid miktarlarının değişimi ve antioksidan özelliklerinin değişimi izlenmiştir. Aynı zamanda her ekstraksiyonla işlenmiş zeytin yaprakları, işlenmeden öncesi ve sonrası mikro gözeneklerinde oluşmuş değişimler izlenmek için SEM analizi uygulanmıştır.

Aralık 2018, 555 sayfa.

**Anahtar kelimeler:** Zeytin yaprakları, polifenoller, antioksidan aktivite, HAE, UAE, MAE, Optimizasyon,RSM

## **SUMMARY**

### **INVESTIGATION OF STABILITY OF OLIVE LEAF EXTRACT'S PHENOLIC PROFILE**

#### **M.Sc. THESIS**

**Elaf ABDELILLAH ALI ELHUSSEIN**

**Istanbul University-Cerrahpasa**

**Institute of Graduate Studies**

**Department of Chemical Engineering**

**Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Selin SAHIN SEVGILI**

In this study, the optimum parameters of three different extraction methods were not only determined but also used to obtain olive leaves extracts for investigating the different storage conditions by examined the extracts through selected analysis at certain intervals. At the same time, SEM analysis was applied to monitor the changes in the micropores of the olive leaves before and after their processing by each extraction method.

December 2018, 555 pages.

**Keywords:** Olive leaves, polyphenols, antioxidant activity, HAE, UAE, MAE, Optimization, RSM

## 1. GİRİŞ

Vücutta üretilmiş serbest radikaller oksidatif stres oluşturduğunda biyolojik sistemlerde olan DNA, protein ve lipid yapısına zarar vermektedir. Bu hasar, ateroskleroz, romatizmal artrit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi insan hastalığı ile ilişkilidir. Antioksidanlar, serbest radikal yutumu ile oksidatif stresin oluşmasını önlemektedir [1, 2]. Oksidasyon nedeniyle doymamış yağ asitleri içeren gıda sistemleri, gıda endüstrisinde önemli bir sorundur. Oksidasyon ile doymamış yağ asidinin degradasyonu, doğrudan gıdaların ekonomik değeri, besin kalitesi, kokusu, güvenliği ve depolanması sorunları ile ilgilidir. Lipid içeren gıda maddelerinde iki temel oksidasyon reaksiyonları oluşabilmektedir. Oto-oksidasyon ve foto-oksidasyon olarak tanımlanmaktadır. Bunlardan oto-oksidasyon en yaygın olanıdır. Oto-oksidasyon, oksijen varlığında meydana gelir ama foto-oksidasyon normal üçlü oksijen UV radyasyona maruz bırakılarak tekli oksijenin dönüşmesinden meydana gelmektedir. Antioksidanın eklenmesiyle lipidler oksidasyondan korunmakta ve etkili bir şekilde kokusunu ve rengini muhafaza etmektedir [3].

Meyve ve sebze tüketiminin pek çok majör hastalık riskini azalttığı kabul edilmektedir. Bu etkiler, ağırlıklı olarak meyvelerde ve sebzelerde doğal olarak bulunlan biyolojik etkili bileşenler (bunlardan en önemlileri olan fenolik bileşikler, karotenoidler, vitaminler ve mineral maddeler) ile ilişkilidir. Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler, anti-alerjik antiaterojenik, anti-enflamatuar, anti-mikrobiyal, antioksidan, anti-trombotik, antikanser, kalp ve damar genişletici olarak geniş fizyolojik özelliklerin kaynağı olarak kabul edilmektedirler. İnsanlarda normal fizyolojik fonksiyonları üzerinde, anlamlı derecede reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi reaktif türlerinin olumsuz etkilerini azaltan gıdalardaki bir madde "antioksidan" terimi olarak tanımlanmaktadır [4-7]. Üstelik doğal antioksidanlar fenolik bileşikler gibi, gıda kalitesi ve kararlılığını artırma kapasitesine sahip olurlar ve nutrasötiklerin dikkatine çekerek biyolojik sistemlerde serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmak için nutrasötikler olarak davranabilirler. Böylece tüketiciye ekstra sağlık yararları sağlayabilirler. Bu antioksidanlar esas olarak flavonoid, fenolik asitler, stilben, tokoferoller, tokotrienoller, askorbik asit ve karotenoidler fenolik bileşik formunda bitkilerden elde edilmektedirler [8-11]. Yüksek fiyatlarda olmasına rağmen bazı doğal

ürünlerle, doğal katkı maddelerinin pazarlanması hızla büyüyebilir. Dahası, bazı sentetik bileşiklerin toksik olmasıyla kozmetik, ilaç ve gıda katkı endüstrileri için doğal ürünlerin araştırmasına artan bir ilgi söz konusudur.

Zeytin ağacı *Olea europaea* L. olarak botanik sınıflandırılmış ve Akdeniz ülkelerinde en önemli meyve ağaçlarından birisidir. Dünya zeytin üretici ülkeleri arasında; ağaç varlığı açısından Türkiye 4., alan açısından da 6. sırada yer almaktadır [12]. Zeytin yaprağı, zeytin ağacı yetiştiriciliğinden ve zeytinyağı değirmenlerden atık yan ürün olarak her mevsim kolayca bulunabilmektedir. Zeytin yaprakları, zeytin yetiştiriciliğinden ve zeytinyağı sektöründen yan ürün olarak alınmakta ve antioksidanca zengin bir kaynak olarak kabul edilmektedir. Zeytin yapraklarında çok sayıda fenolik bileşik bulunmaktadır. Zeytin yaprakları zeytin ağacının farklı bölümleri arasında bu bileşiklerin yüksek içeriğe sahip olduğu bölümdür. Basit fenoller ve asitler, lignanlar, secoiridoid ve flavonoidler gibi ana moleküler gibi türlü gurupları söz konusudur. Buna ek olarak, zeytin yaprağı ekstraktının antimikrobiyal, anti-HIV, antioksidan ve hipoglisemik aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin birçok sağlık yararı olduğundan araştırmacılar, ev tüketicileri ve ticari kuruluşlar için büyük bir ilgi kaynağıdır [13-21].

Zeytin yapraklarından başlıca fenolik bileşiklerin kazanımını ve kararlılığını değerlendirmek için farklı ekstraksiyon yöntemleri ve koşulları incelenmiştir. Yetiştirme bölgesi, hasat zamanı, kurutma koşulları ve ekstraksiyon işlemi gibi çeşitli faktörler zeytin yapraklarının kalitatif ve kantitatif fenolik bileşimini etkileyebilmektedir. Kullanılan çözücü tipi, pH, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, çözücü / katı oranı ve katı matris partikül boyutu gibi faktörler ekstraksiyon işleminin verimini önemli oranda etkilemektedir. Depolama süresi, sıcaklık, nem ve ışık gibi birçok faktör depolanmış zeytin yaprağı ekstraktlarındaki fenolik bileşiklerin konsantrasyonunu etkilemektedir.

Dolayısıyla, bu tezin amaçlarını;

- çevre dostu ve ekonomik çözümler kullanarak zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerce zengin ekstrakt elde etmek,
- bunun için çeşitli ileri ayırma yöntemlerini kullanmak,
- önerilen yöntemlerin iyi bir antioksidan kazanımı için en uygun ekstraksiyon koşullarını belirlemek,
- optimum koşullarda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarındaki mevcut başlıca fenolik bileşikleri tayin edip belirlemek ve
- mevcut ekstraktların kararlılığına depolama koşullarının etkilerini araştırmak şeklinde sıralayabiliriz.

Bu bölümde gösterilen bilgiler yedi kısım olarak düzenlenmiştir. Oksidasyon ve oksidatif stres, fonksiyonel gıdalar ve antioksidan dahil olmak üzere bütün tanımlar, türler ve ilişkiler anlatılmıştır. Dünyada ve Türkiye'de bulunan zeytin (ağaç, meyve, yağ ve diğer yan ürünleri) üretimi, tüketimi, pazarlaması, insan sağlığına potansiyel yararları ve zeytin endüstrisi detaylı olarak açıklanmıştır. Tezin ana konusu olan zeytin yaprağının ekstraksiyonu ve içeriğindeki yüksek katma değerli ürünlerin teknik olarak incelenmesi ve stabilitesinin takip edilmesi de detaylı olarak verilmiştir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. OKSİDASYON VE OKSİDATİF STRES

#### 2.1.1. Oksidasyon

Oto-oksidasyon, bir serbest radikal zincir reaksiyonunu içeren lipid degradasyonunun birincil adımlarından biridir. Oto-oksidasyon klasik olarak başlangıç adımını (lipid serbest radikallerin üretimi), yayılma evresi ve reaksiyon sonlandırılmasını (radikal olmayan ürünlerin üretimi) içermektedir [22]. İstenmeyen aroma verici uçucu bileşiklerin ve toksik bileşiklerin potansiyel oluşumuna yol açan gıda lipidlerinin oksidasyonu, hasat ve depolama süresinde ve aynı zamanda gıda işlemenin çeşitli aşamalarında meydana gelebilmektedir. Ek olarak yağ asitleri, yağda çözünen vitaminler ve diğer biyoaktif maddeler oksidasyon sırasında kaybolabilmektedir. Canlı organizmalarda, membran fosfolipidlerinin doymamış yağ asitleri, aerobik metabolizma sırasında veya oksitleyici ajanların varlığında oksidasyona geçirmektedir. Bu süreç oksidatif hasara neden olabildiğinden dolayı enzimler, DNA, kolesterol, lipoproteinler ve proteinler gibi ekstraselüler ve hücrel bileşenlerin doku hasarını ve özellikle geri dönüşümsüz hücrenin bozulmasını sağlamakta ve sonuç olarak ateroskleroz, iltihap, karsinogenez ve yaşlanma gibi birçok hastalık ve sağlık durumu ile ilişkilidir [23]. Lipid içeren gıdaların oksidatif stabilitesi esas olarak katalizörler, inhibitörler ve sıcaklık gibi diğer faktörlerden ve lipidlerin kimyasal yapısından etkilenmektedir. Mesela, otomasyonla serbest radikal oluşumunun başlatılmasında aktivasyon enerjisi azaltıldığından daha yüksek sayıda çift bağa sahip lipidler, doymuş yağ asitlerine göre oksidasyona daha duyarlıdır [24]. Proteinler lipidlerden daha yüksek bir oksidasyon oranına maruz kalmalarına rağmen herhangi bir aroma oluşturmaması için onlarca yıl boyunca gözardı edilmiştir. Diğer taraftan, Alzheimer gibi ilgili dejeneratif hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynadığı için canlı dokularda bulunan protein oksidasyonuna çok dikkat edilmiştir [25]. Protein oksidasyonu süreci, oksijen ve reaktif radikallerin varlığında aminoasitlerin ana ve yan zincirlerinin değiştirilmesini kapsamaktadır. Proteinlerin oksidatif değişimleri arasında peptit bağlarının bölünmesi, kovalent moleküller arası çapraz-bağlı protein türevleri oluşturması (sistein ve tirozin kalıntılarının kaybıyla disülfürün, sülfenik, sülfonik asitler ve droskürin oluşumu) ve amino asit yan zincirinin modifikasyonu (protein karbonil gruplarının

ve protein hidroperoksitlerin oluşumu) yer almaktadır [26-28]. Bir araştırmada [29] işlenmiş et ürünlerinde proteinlerin oksidasyonunun, yumuşaklık ve sululuk gibi doku oluşturma becerilerini ve su tutma kapasitesini azaltabileceği gösterilmiştir. Bu değişiklikler, protein substratlarının proteolitik enzimlere duyarlılığını değiştirdiğinde düşük sindirime ve besin değerinin azalmasına sebep olan protein konformasyonunun, hidrofobikliğin ve çözünürlüğünün değişmesine bağlanmıştır [30, 31].

### **2.1.2. Oksidatif stres**

Hücre ve dokularda bulunan prooksidant ve antioksidan arasında bulunan dengenin bozulması oksidatif stresin ilk tanımıdır. Genel olarak oksidatif stres, artan reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyeleri ile düşük antioksidan mekanizmanın aktivitesi arasındaki dengesizlik olarak tanımlanabilmektedir. Oksidatif stres, antioksidan enzimlerinin ya da seviyelerinin azalmasından ya da antioksidan mekanizmanın kusurlarından kaynaklanabilmektedir. Oksidatif stresin artması hem hücresel yapıya zarar vermekte hem de potansiyel olarak dokuları tahrip edebilmektedir [32-38].

Oksidatif stres, serbest radikallerden kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller, oldukça istikrarsız, aktif olarak diğer moleküller ile reaksiyona girebilen ve eşlenmemiş elektronlara sahip olan moleküller, atomlar veya iyonlardır. Oksidatif hasarları iki element şeklinde (oksijen ve nitrojen) serbest radikallere tetiklendiğinde reaktif türler terimi reaktif klor, brom, sülfür ve demir türlerini kapsayacak şekilde genişletilmiştir. Ayrıca, oksidatif stres, ROS / RNS'nin artan miktarının, hücrenin dengeleyemeyeceği bir sonucudur. Böylece ROS, reaktif nitrojen türleri (RNS), reaktif klorin türleri (RCS), reaktif bromin türleri (RBS), reaktif sülfür türleri (RSS) ve geçiş metali iyonları oluşturulmaktadır. ROS gibi serbest radikaller, endojen (geçiş metallerinin etkileri, glukoz oksidaz, ksantin oksidaz, lipoksijenazlar, mitokondriyal solunum zinciri, miyeloperoksidaz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz, nitrik oksit sentaz, siklooksijenaz ve solunum patlaması) veya ekzojen (alkol içimi, enflamatuar bozukluklar, fitokimyasal duman, iyonlaştırıcı radyasyon, iskemi reperfüzyon, kirleticiler, ksenobiyotik, kronik enfeksiyon, steroid olmayan anti inflammatuar ilaçların yutulması, ozon, pestisitler, sigara içimi ve UV/X ışını radyasyonu) kaynaklardan ortaya çıkabilmektedir. Süperoksit, hidrojen peroksit, tekli oksijen ve azot serbest radikali gibi ROS ve RNS, insan vücudunda hem iç hem de

dış kaynaklı çeşitli faktörlerden üretilmektedir. ROS'un, RNS'nin ve diğer radikallerin aşırı üretimi, gıda ürünlerinin oksidatif bozulmasına sebebi olmakta ve yaşlanma, ateroskleroz, kanser, kalp-damar hastalıkları, diyabet, iskemik reperfüzyon yaralanmaları, nörodejeneratif hastalıklar ve romatizmal artrit gibi çeşitli patolojik durumlarda doku hasarının indükleyicisi olduğu gösterilmektedir. ROS normal fizyolojik olayların sırasında üretildiğinde membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatabildiğinden lipid peroksit birikimi oluşurulmaktadır [39-41].

### **2.1.2.1. Oksidatif stresin hasarları**

#### **a. Proteinlerin oksidatif hasarı**

Proteinlerin oksidasyonu, spesifik amino asidin direkt oksidasyonu, peptid yarılmada serbest radikal aracılı oluşturulması ve protein moleküllerine lipid peroksidasyonu ile protein çapraz bağının üretilmesiyle meydana gelmektedir [42]. Sistein ve metionin gibi sadece birkaç kolay oksitlenebilen amino asidin, metionin sülfoksit redüktaz ve tioredoksin / tioredoksin redüktaz sistemi gibi birkaç enzim kolaylaştırılmasıyla hasar gördükten sonra ilk forma geri yüklenebilmektedir [41, 43]. Genellikle protein oksidasyonu/nitrasyonu fonksiyonel bozulmaya neden olmaktadır. Protein oksidasyonu, diğer biyomoleküllere ve oksitlenmiş lipidlere zarar veren diğer radikal türleri üretebilir ve karbonhidratlar oksitlenmiş proteinlerle reaksiyona girdiğinde protein agregasyonunu hazırlayabilir ve proteazom bozulmasını engelleyebilmektedir [41].

#### **b. DNA'ya oksidatif hasarı**

Genelde nükleik asitler, ROS'un veya diğer serbest radikallerin oksidatif hasarının hedefleridir. DNA'nın oksidatif modifikasyonları arasında taban içermeyen sahaların üretimi, silme, tüm bazların modifikasyonu, çerçeve kaymaları, zincir kopmaları, DNA-protein çapraz bağları ve kromozomal yeniden düzenlemeler yer almaktadır. Bunlar Fenton reaksiyonundan üretildiği hidroksil radikale kaynaklanabilmektedir. Hidroksil radikali pürinde, pirimidin bazlarında ve deoksiriboz omurgasında bulunan özellikle DNA molekülünü hedeflemektedir [44, 45]. Ayrıca, peroksil radikali DNA oksidasyonuna müdahale etmektedir [41]. Mitokondriyal DNA, koruyucu



histon eksikliği, onarım mekanizmalarının olmaması ve iç mitokondriyal membran oluşturulmuş ROS'a çok yakınlığı nedeniyle nükleer DNA ile karşılaştırıldığında stres daha duyarlıdır.

#### c. Lipidlere oksidatif hasarı

Reaktif oksijen türleri lipid yapılarının yan zincirinde bulunan metilen karbondan bir hidrojen atomu ayıklayarak çıkarabilmektedir [41]. Lipid molekülünün yağ asidinde olan konjüge çift bağ sistemi, serbest radikallerin hidrojen atomunu uzaklaştırmasını ve radikal oluşturmasını kolaylaştırılmaktadır. Bundan dolayı, çoklu doymamış yağ asidi, mono doymamış yağ asidine veya doymuş yağ asidine göre serbest radikal oksidasyona daha duyarlıdır. Lipid radikali peroksil radikali oluşturmak için oksijen ile reaksiyona girebilmektedir. Bu yeni oluşturulmuş reaktif radikaller, etraflarını çevreleyen moleküllerden hidrojen atomlarını çekip lipid peroksidasyonunun bir zincir reaksiyonunu tetikleyebilmektedir. Radikal zincir reaksiyonuna ek olarak, tekli oksijeni lipid hasara uğratarak çoklu doymamış yağ asidiyle reaksiyona girebilmektedir. Singlet oksijeni zincir reaksiyonunu başlatmak için hidrojen atomunu çekmeden yağ asidiyle direkt reaksiyona girebilmekte ve bu reaksiyon minör bir lipid oksidasyonu yoludur [46]. Lipidlerin peroksidasyonu membran akışkanlığını ve biyolojik özelliklerini değiştiren hücre altı membranlarına ve plazma bürgüsüyle hasar yaratmaktadır. Bir de bu tür oluşturulmuş hasar, membrana bağlı reseptörleri veya enzimleri etkisizleştirebilmekte, normal hücre fonksiyonunu bozalabilmekte ve hücre geçirgenliğini artırabilmektedir. Lipid peroksidasyonunun ara ürünleri ve final ürünleri ikincil hücrel hasara yol açarak belirli proteinleri ve DNA'yı eşdeğerli bir şekilde modifiye edebilmektedir [47, 48].

#### ç. Karbonhidratlara oksidatif hasarı

Erken glikasyon sırasında oluşturulan serbest oksijen radikalleri, glikosilasyon hasara neden olabilmektedir. Başlangıçta enzimatik olmayan glikosilasyon, şeker fragmentasyonundan glikolilaldehit ve diğer kısa zincirli türler (siklizasyon için çok kısa zincirli ama oto-oksidasyona uğrayabilmektedir) sağlamaktadır. Proteinlerin tüm amino asitleri ROS ve RNS tarafından saldırıya uğrayabilmekte ve bunların arasında aromatik ve kükürt içeren amino asitleri en duyarlıdır [49, 50]. 3-nitrotirozin, dityrosine, karbonil türevler ve nitrasyon ürünü (ONOO<sup>-</sup>) amino asitlerin oksidasyonunun en önemli ürünleridir. Buna ek olarak, hücre içi olan protein

molekülleri karbohidratlar, lipidler ve nükleik asitler gibi diğer hücrel bileşenlerin oksidasyon ürünlerinin bir sonucu olarak modifiye edilebilmektedir [43].

### **2.1.2.2. Acaba, ROS her zaman kötü mü?**

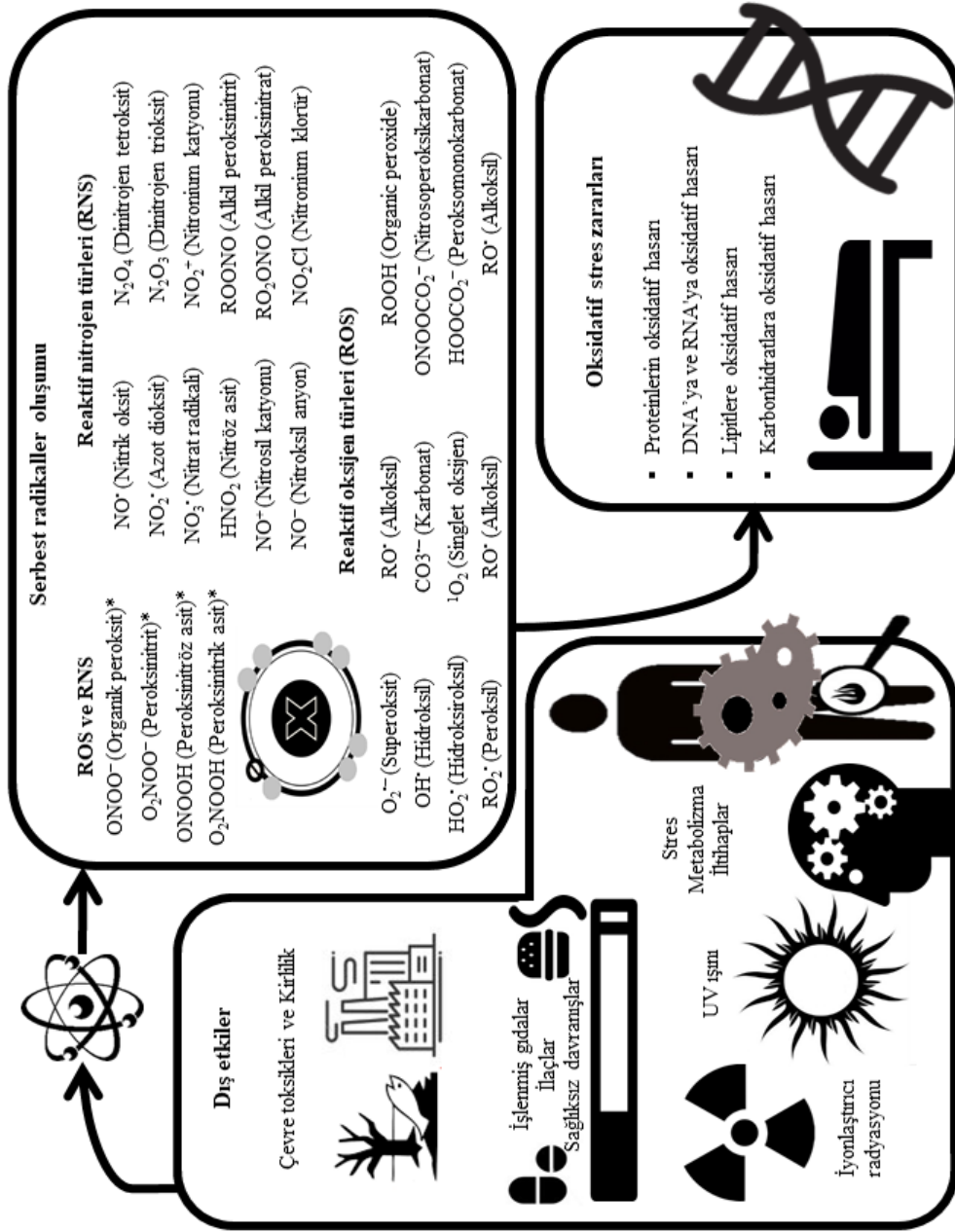
Araştırma kapsamında edinilen bilgilere göre ROS'un artmış seviyeleri, alzheimer hastalığı, ateroskleroz, karsinogenez, metabolik sendrom ve şeker hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimine katkıda bulunmaktadır. Giderek artan sayıda yapılmış olan araştırmalar, ROS'un normal hücrel sinyallerin bir parçası ve hücre farklılaşmasını ve apoptozu başlattığını açıkça göstermektedir. Yani, aşağıda önerilen mekanizmaya dayanarak ROS seviyelerinin artması kanser gelişimine yol açabilmektedir:

- a. Mitokondriyal DNA replikasyonunu düzenleyen nükleer genlerin inaktivasyonu, mitokondriyal biyogenez ile çakışmaktadır.
- b. Azaltılmış mitokondriyal kapasitesi, oksidatif fosforilasyonun seviyesi ve ROS üretiminin azalmasına yol açmaktadır.
- c. Mangan süperoksit dismutaz aktivitesinin seviyesi ve lipid peroksidasyonunun azalmasına yol açmaktadır.
- ç. İyi bilindiği gibi kanser hücrelerinin özellikleri: Pentoz fosfat yolağında kilit özgen glikoz-6-fosfat dehidrojenazını engellemesi, kontrolsüz DNA sentezi ve hücre çoğalması için riboz ve Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat sağlamaktadır.

Kanserinde ROS'un gerçek rolünün açıklığına kavuşturulması, mitokondrinin bozukluğunun normal hücrelerin malign dönüşümüne nasıl yol açtığına anlaşılmasına ışık tutabilmekte ve kanserin önlenmesi ve tedavisi için yeni stratejiler sunabilmektir [51-54]. ROS'un, normal hücre büyümesi ve konak savunmasının inflamatuvar yanıtları için önemli olan hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynadığı giderek daha belirgin hale getirilmiştir. ROS ve redoks durumunun bakteri ve bitkilerde bir role sahip olduğunu gösteren çok sayıda kanıt olmasına rağmen çok yakın zamana kadar memeli hücrenin korunmasında daha az kanıt vardır. Örnek olarak, bakterilerde bulunan transkripsiyon faktörü redoks duyarlıdır [55]. Hayvanlarda, Protein Tirosin Fosfataz'ın, tioredoksin'in, Sarco / endoplazmik retikulum  $Ca_2^+$ -ATPaz'in ve RAS proteinlerinin ROS-temel sinyalleri iyi oluşturulmuştur [56-58]. Normal fizyolojik

fonksiyonunda önemli rol oynayan diğer bir radikal ise nitrik oksittir: immünite durumunun, sinir fonksiyonunun ve vasküler tonusunun düzenlenmesine katılmaktadır. Serbest radikal üretimi/türleri, oksidatif stres hasarlarının tipleri ve oksidatif stres mekanizması şekil 2.1’de gösterilmiştir.





**Şekil 2.1:** Serbest radikal üretimi/türleri ve oksidatif stres hasarlarının tipleri içeren oksidatif stres mekanizmasının şematik gösterimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Resimler Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [41, 59, 68-73, 60-67].

## 2.2. FONKSİYONEL GIDALAR

En yaygın fonksiyonel gıdalar, çinko, demir, folik asit, kalsiyum, retinol (A vitamini) ve tokoferol (E vitamini) gibi vitaminlerle ve/veya minerallerle güçlendirilmiş gıdalardır [74]. Yakın zamanda, araştırmacıların dikkatleri allisin, glukosinolatlar, limonen ve kapsaikinoidler gibi antikarsinogenik ajanlar, fenolik bileşikler (flavonoidler, fenolik asitler, kateşinler, kurkumin, stilbenler ve diğerler), fitoöstrojenler (izoflavonlar, lignanlar) veya karotenoidler gibi antioksidan özelliklere sahip olan fitokimyasal maddeler, fitosteroller ve omega-3 yağ asitleri gibi çeşitli besin maddeleriyle güçlendirilmiş gıdalara taşınmıştır [75]. Bütün bu maddeler sağlığa faydalıdır. Ama bazı durumlarda (fazla ise), bunun tersi bir etkiyle sonuçlanabilir: C ve E vitaminleri, antioksidan özellikleri sayesinde hücreleri serbest radikallerin zararlarına karşı korumakta, fakat E vitamini fazlalığı özellikle antikoagülan alan yetişkinler için kanama riskini artırabilmektedir. Ara sıra, çok yüksek doz kullanan yetişkinler mide bulantısı, kas yorgunluğu ve yorgunluk söz konusudur [76].

Fonksiyonel bileşenler, vücutta bir veya daha fazla metabolik işlemi ya da bir yolağı modüle etme kapasitesine sahip olduğu gıdalarda ortaya çıkan geleneksel olmayan biyomoleküller ve sağlık faydaları ve genel sağlıklılık hali artırmasıyla sonuçlanmaktadır. Araştırma, gıdada, genel sağlıklılık durumu halinde ve sağlıkta bulunan/kullanılan fonksiyonel bileşenler arasında bir ilişki olduğu kanıtlamıştır. Dolayısıyla fonksiyonel komponentler, başlangıçtan gelişime kadar, birden çok ilerlemeli adımlarla ilişkili hastalık kontrolünün çeşitli aşamalarında sağlık arttırıcı rollere sahiptir. Böylece, hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde etkili bir şekilde uygulanabilmektedir. Bu nedenle, bir dönemde bulaşıcı olmayan hastalıkların önlenmesinde sağlıklılık bir diyetin rolünün iyi kabul edildiğinde gıda ve ilaç arasında sınır çok zayıf hale gelmektedir [77]. Tablo 1.1'de bazı hastalık risklerine karşı faydalı fonksiyonlara sahip olan besleyici olmayan bileşenler özetlenmiştir [77, 78].

**Tablo 2.1:** Bazı hastalık riski azaltma için faydalı fonksiyonlara sahip olan besleyici olmayan bileşenler

Bileşen	Örnek ve Kaynak	Hastalık ve Potansiyel faydalar
Karoten	$\alpha$ -Karoten ve $\beta$ -Karoten (havuç, meyveler ve sebzeler)	Oksidatif stress: a. Hücrelere zarar verebilecek serbest radikalleri nötralize etmektedir
	Likopen (domates)	b. Prostat kanseri riskini azaltmaktadır
Ksantofil	Lutein (yeşil sebzeler)	Oksidatif stress: Kas dejenerasyon riskini azaltmaktadır
Flavonol	Kuersetin (sebze)	Oksidatif stress: a. Serbest radikalleri nötralize etmektedir
		b. Kanser riskini azaltmaktadır
Flavon	Nobiletin (narenciye)	Oksidatif stress: a. Serbest radikalleri nötralize etmektedir
		b. Kanser riskini azaltmaktadır
Izoflavon	Daidzein (soya fasulyesi)	Osteoporoz
		Sıcak basması gibi menopoz semptomları
		Kalp hastalığı ve bazı kanser türlerine

		karşı korumaktadır
		Düşük yoğunluklu lipoprotein ve total kolesterolü düşürmektedir
		Diyabet
		Oksidatif stress:
Flavanon	Naringin (greyfurt)	a. Serbest radikalleri nötralize etmektedir
		b. Kanseri riskini azaltmaktadır
		Alerji
	Epigallokatekin galat 3-metil ester (çay)	Oksidatif stress:
Kateşin	Epigallokatekin galat 4-metil ester (çay)	a. Serbest radikalleri nötralize etmektedir
		b. Kanseri riskini azaltmaktadır
		Oksidatif stress:
Antosiyanin	Siyanidin (Fasulye)	a. Serbest radikalleri nötralize etmektedir
		b. Kanseri riskini azaltmaktadır
Basit polifenol	Klorojenik asit (kahve)	Kanser
Fenilpropanoid	Kürkümin (zerdeçal)	Kanser
İzoprenoid	Ubikinon (ubikuitöz)	Oksidatif stres
Triterpenoid	Soyasaponin (soya)	Oksidatif stres
Nişasta	Fucoidan 'fukoz' (mantarlar ve	Bağışıklık modülasyonu

içermeyen polisakkarit	kahverengi yosunlar)	Kanser hücrelerinin apoptozisi
	Çözünmeyen diyet lifi (buğday kepeği)	Beyin gelişimini uyarmaktadır Anti-pıhtılaşma etkisi
	Çözünebilen diyet lifi ' $\beta$ -Glucans' (yulaf ve arpa)	Düşük kan kolesterol düzenlemektedir
	Çözünür lif (karnıyarık otu)	Yüksek tansiyonu azaltmaktadır Kan şekerini dengelemektedir
		Meme veya kolon kanseri riskini azaltmaktadır Kardiyovasküler hastalık riskini azaltmaktadır Kalp hastalığına ve bazı kansere karşı korumaktadır Düşük yoğunluklu lipoprotein ve total kolesterol düşürülmektedir
Kromanol türevi	Tokotrienol (soya fasulyesi)	Oksidatif stres
İzotiyosiyanat	Sülforafan (brokoli)	Detoksifikasyon
Sülfoksit	Alliin (sarımsak)	Koagülasyon
Vanilloid	Kapsiat (acı)	Obezite
Alkaloit	Kafein (kahve)	Obezite
Lignan	Sesamin (susam, keten, çavdar, sebzeler)	Kaşıntı



		Kanser önleme
		Böbrek yetmezliği
Organik asit	Asetik asit (sirke)	Hipertansiyon
Amino asit	$\gamma$ -Aminobütirik asit (pirinç)	Hipertansiyon
	Uzun zincirli omega-3 Yağlı	Kardiyovasküler hastalık riskini azaltmaktadır
Yağ asitleri	Asitler DHA / EPA (somon ve diğer balık yağları)	Zihinsel ve görsel işlevleri geliştirmektedir
	Konjuge linoleik asit (peynir, et ürünleri)	Vücut kompozisyonu geliştirmektedir Kanserlerin riskini azaltmaktadır
Protein	$\beta$ -konglisinin (soya)	Obezite
Oligopeptid	Val-Pro-Pro (ekşi süt)	Hipertansiyon
Lipid	3-Diacylglycerol (yemeklik yağ)	Obezite
Polisakkarit	Alginik asit (yosunlar)	Hiperkolesterolemi
		İdrar yolu sağlığını iyileştirmektedir
Tanenler	Proantosiyanidinler (kızılcık, kıızılcık ürünleri, kakao ve çikolata)	Kardiyovasküler hastalık riskini azaltmaktadır
	Stanol ester (mısır, soya, buğday, odun yağları)	Hiperkolesterolemi
Steroller	$\beta$ -Sitosterol (soya fasulyesi)	Kolesterol emilimini inhibe ederek düşük kan kolesterolünü düzenlemektedir

	Fruktooligosakkaridleri (kudüs enginar, arpacık ve soğan tozu)	Obezite
Prebiyotikler ve Probiyotikler	Manno-oligosakkarit (kahve)	Kabızlık
	Bifidobakteriyum lactis (yoğurt)	Bağırsak mikroflora kalitesini ve gastrointestinal sağlığını artırmaktadır
Tatlandırıcı	Neokulin (Curculigo latifelia)	Diyabet

"İlaç ve gıda eş açılıdır" antik Çinde menşeli olan, uzun zaman önce Japonya'ya taşınan ve Hipokrat doktrini konsepttir [79]. Diğer taraftan, "Gıdalar ilaç olsun ve ilaçlar gıda olsun" düşüncesi yeniden dirilmiştir [80]. Güncel bilim ve gelişmiş teknoloji, gıdaların bize beslenmeden daha fazlasını sağlayabileceğini fark etmemizi sağlamaktadır. Gıdalar, alerjilerin, enfeksiyon hastalıklarının, kanserin ve diyabet, dislipidemi, hipertansiyon, obezite gibi kronik yaşam tarzı ile ilgili hastalıkların azaltılmasına yardımcı olabilmektedir. Bu anormal modalitelere karşı ilk savunma hattı olarak gıdaları yeniden gözden geçirme ve uygun alımları, gıdaların besinsel faydalarından ziyade fizyolojik anlayışımızın artmasından kaynaklanmıştır [81].

"Fonksiyonel gıda" kavramı Japonya'da yaklaşık yirmi yıl önce ortaya atılmıştır [79]. 1984 yılında, Tokyo Üniversitesi'nde Profesör S. Arai başkanlığında kurulan özel araştırma ekibi ve diğer önde gelen gıda bilimcileri tarafından yürütülen büyük çaplı bir ulusal proje Japonya Eğitim Bakanlığı, Bilim ve Kültür Bakanlığı tarafından başlatılmıştır. Tokyo Üniversitesi'nde 1910 yılından beri [81], "sağlık için gıda" projesinde biyokimya uzmanı Dr. Umetaro Suzuki pirinç kepeğini araştırmış ve B vitamini eksikliğinden kaynaklanan bir hastalığın engellenmesinin ilkesini bulmuştur. Araştırma ekibi, önce üç kategoride gıda işlevselliği önermiş ve daha sonra, çalışmayı, besleyici olmayan bileşenler tarafından uyarılmak üzere "üçüncül" işlev üzerinde belirlemiştir. 1991 yılında, Japonya Sağlık ve Refah Bakanlığı, "belirtilen sağlık faydası için kullanılan gıda" (FOSHU) adı verilen seçilmiş fonksiyonel gıdaların ticarileşmesine yasal olarak izin veren dünyadaki ilk poliçeyi başlatmıştır. FOSHU ürünlerinin her birinin sağlığa yararı belirli bir derecede talep edilmektedir. Bu bilimsel ve politik aktiviteler, Nature'de

“Japonya gıda ve ilaç arasında bir sınırı araştırmaktadır” başlığıyla bildirilmiş ve dolayısıyla dünyaya eski bir kavram olan "İlaç ve gıda eş açılıdır" fikrini hatırlatmıştır [81].

### **2.2.1. Tanımlar ve sınırlamalar**

Fonksiyonel gıdaların dünya çapında genel bir tanımı halen olmadığından dolayı çeşitli örgütleri tarafından geliştirilmiş çoklu tanımlamalar vulunmaktadır. Bu tanımlamalar şekil 2.2’de özetlenmiştir.

### **2.2.2. Fonksiyonel gıdaya karşı farmasötikler**

İnsan hastalıklarını önlemek veya tedavi etmek için ürünlerin geliştirilmesinde farmasötik ve gıda endüstrileri yeni ürünleri araştırmaktadır. İlaç endüstrisi, kronik ya da akut hastalıklarla mücadele etmek için ilaç preparatları geliştirirken, gıda endüstrisi, insan sağlığını ve beslenmesini teşvik etmeyi amaçlayan yiyecek ve içecek ürünleri geliştirmektedir. Fonksiyonel gıdalar ve farmasötikler arasındaki fark, şekil 2.3’te şematik olarak gösterilmiştir.

### **2.2.3. Kaynakları ve sınıflandırması**

Fonksiyonel gıdalar, bitki, hayvan, bakteri ve virüs (algler, mantar ve diğerleri de dahil olmak üzere) gibi kaynaklara göre sınıflandırılmaktadır. Menşe kaynağına bakılmaksızın, fonksiyonel gıdaların hedefi, bağışıklık güçlendirme, gastrointestinal, kadın sağlığı, kanser, kardiyovasküler hastalık, stres yönetimi, şeker hastalığı ve yaşlanma içermektedir [81].

#### **2.2.3.1. Bitkisel fonksiyonel gıdalar**

Bitkisel fonksiyonel gıdalar birincil ve ikincil metabolitler olarak ayrılmaktadır. Birincil metabolitler, büyüme için gerekli bitki bileşikleridir. İkincil metabolitler büyüme için gerekli değildirler, ama bitkilerin hayatta kalma mekanizmaları için gereklidirler.

Birincil metabolitler bitki proteinlerini,  $\beta$ -glukanları ve omega-3 yağ asitlerini içermektedir. Bitki proteinleri arasında tekstüre bitkisel protein, amino asitler ve soya proteini izolatu bulunmaktadır. Bu proteinler, yağ ve kolesterol tüketiminin azaltılmasıyla et tüketim miktarını azaltmaya yardımcı olarak fonksiyonel gıdalar olarak görevini yapmaktadır. Yulaflarda bulunan  $\beta$ -glukanlar kolesterol absopsiyonunu azaltarak fonksiyonel gıdalar olarak görevini yapmaktadır. Keten

tohumu içinde bulunan omega-3 yağ asitleri trombosit agregasyonunu azaltarak fonksiyonel gıda olarak bulunmaktadır.

### **2.2.3.2. Hayvansal fonksiyonel gıdalar**

Hayvansal fonksiyonel gıdalar olan biyokimyasallar, altı yağ asitleri, glukozamin, kazein, kondroitin sülfat, konjuge linolenik asit, küçük peptitler, omega-3 ve peynir altı suyu içermektedir. Omega-3 yağ asitleri  $\alpha$ -linolenik, dokosaheksaenoik ve eikosapentaenoik yağ asitleri içermektedir.  $\alpha$ -linolenik asit kaynakları ceviz, keten tohumu, soya ve kanola yağlarını içermektedir. Dokosaheksaenoik'nin ve eikosapentaenoik yağ asitlerinin ana kaynağı, somon gibi yağlı balıklardır. Omega-6 yağ asitleri, arakidonik yağ asitleri, gama-linolenik ve linolenik içermektedir. Bu yağlı asitlerin kaynakları, bazı bitkisel yağlar, kabuklu yemişler ve tam tahıllar içermektedir. Altı yağ asitleri ve omega-3, bağışıklık sistemini güçlendirerek, iltihaplanmayı düzenleyerek ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayarak fonksiyonel gıdalar olarak görevini yapmaktadır [81].

Konjuge linoleik asit, sütte bulunduğunu ve kanser risklerini ve adiposit farklılaşmayı azaltarak fonksiyonel gıdalar olarak görevini yaptığını bildiren bir yağ asididir [80]. Kazein ve peynir altı suyu, kolayca sindirilip absorbe edilerek fonksiyonel gıdalar olarak görevini yapan, kas kütesinin oluşmasına yardımcı olan ve küçük peptitler şeklinde çalışan süt proteinleridir. Kolajen oluşumu için glukozamin ve kondroitin sülfat gerekli olmakta ve osteoartrit ile ilişkili ağrıyı hafifleterek fonksiyonel gıdalar olarak görev yapmaktadırlar [81].

### **2.2.3.3. Mikrobiyal fonksiyonel gıdalar**

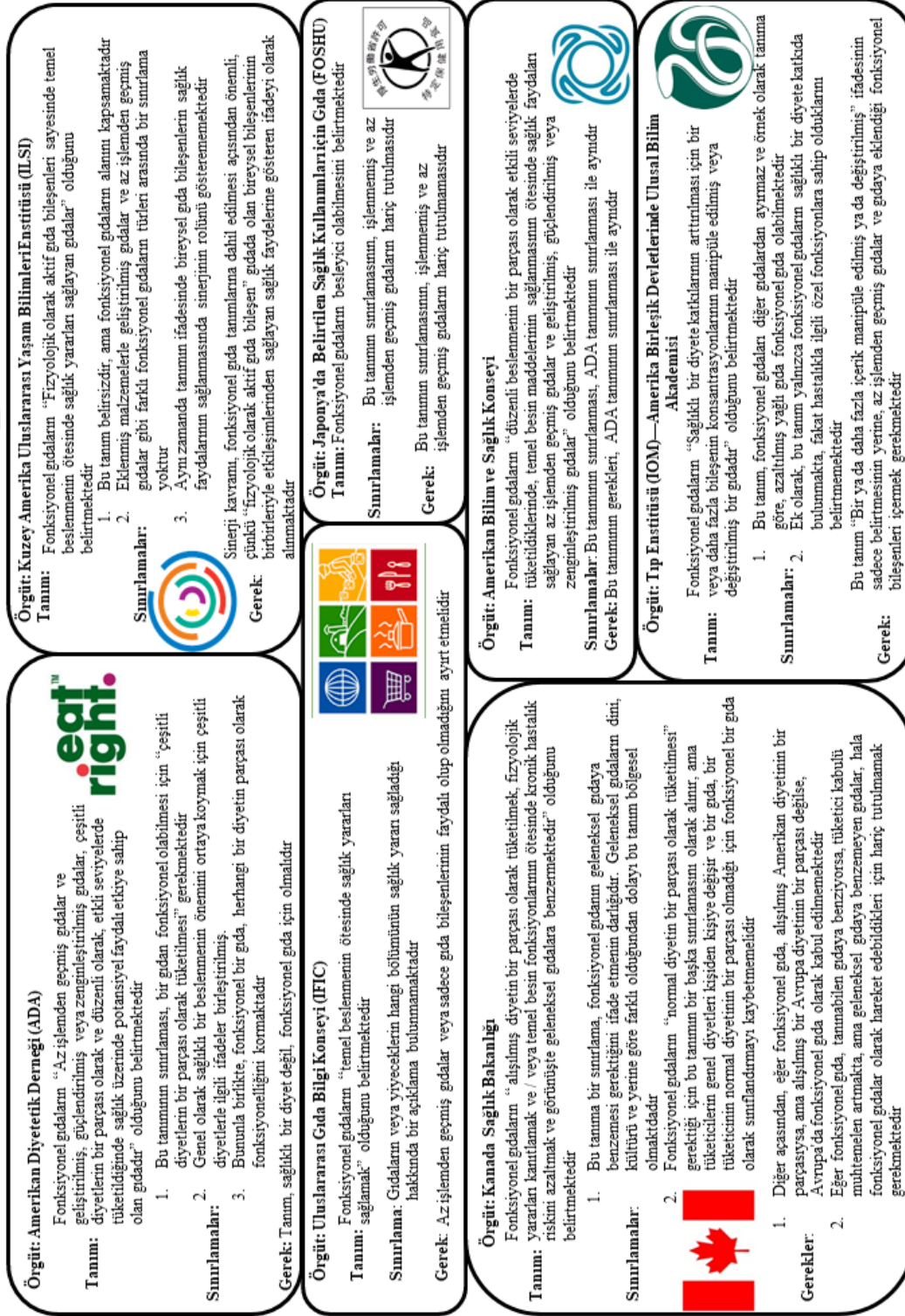
Mikrobiyal fonksiyonel gıdalar arasında prebiyotikler, probiyotikler, simbiyotikler ve sinbiyotikler bulunmaktadır. Probiyotikler, Bifidobacterium ve Lactobacillus casei gibi bağırsakta ortaya çıkan ve sağlığı destekleyen doğal mikrofloralardır. Prebiyotikler, probiyotik bakterilerin büyümesini destekleyen diyet bileşenleridir [80].

Simbiyotikler, rasgele birleştirilmiş probiyotikler ve prebiyotikler içermektedir. Sinbiyotikler, birbirlerinden faydalanmak için birlikte karıştırılmış spesifik probiyotikler ve prebiyotikler içermektedir. Mikrobiyal fonksiyonel gıdaların patojenik bakterilerin büyümesinin sınırlı olacağı şekilde probiyotik bakterilerin büyümesini destekleyerek görevini yapmaktadır [81].

#### ***2.2.3.4. Çeşitli fonksiyonel gıdalar***

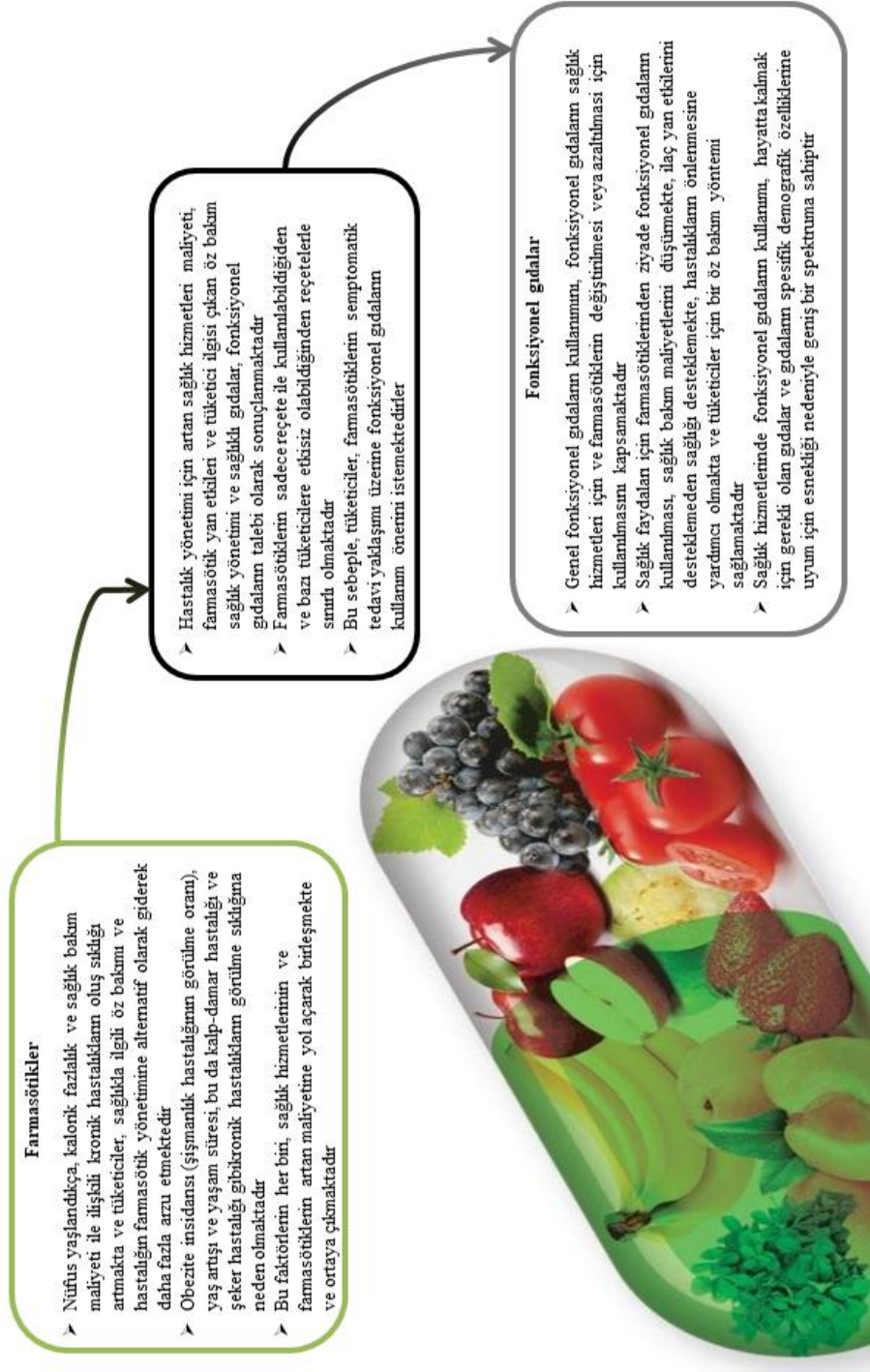
Bazı fonksiyonel gıdalar, algler ve mantar gibi çeşitli bileşiklerden elde edilmektedir. Algler, bağışıklık sistemini güçlendiren, iltihaplanmayı düzenleyen ve nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma sağlayan canlılardır. Mantarlardan elde edilen fonksiyonel gıdalar antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antiviral özelliklere sahip olmaktadır [81].





Şekil 2.2: Farklı örgütleri tarafından geliştirilmiş fonksiyonel gıda tanımları<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resimler Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [81-88].



Şekil 2.3: Fonksiyonel gıdalar ve farmasötikler arasındaki farkın şematik diyagramı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [81, 89].

### 2.3. FİTOKİMYASALLAR

Doğa, pek çok ilgi çekici biyolojik aktiviteye ve tıbbi özelliğe sahip, yüksek fitokimyasal çeşitliliği olan benzersiz bir kaynaktır. Fito bitki anlamına gelen Yunanca bir kelimedir. Fitokimyasallar, biyolojik olarak aktif ve doğal olarak bitkilerde bulunan, insanlara makro besinlerine ve mikro besinlerine atfedilenlerden daha fazla sağlık faydaları sağlayan kimyasal bileşiklerdir. Bu bileşikler, bitkileri hastalıktan ve hasarlardan korumakta, bitkinin aromasına, lezzetine ve rengine katkıda bulunmaktadır [90]. Genel olarak bitki hücrelerini kirlilik, kuraklık, stres, UV'ye maruz kalma ve patojen saldırı gibi çevresel tehlikelerinden koruyan bitki kimyasalları fitokimyasallar olarak adlandırılmaktadır [91]. Son yıllarda, beslenme alışkanlıklarının insan sağlığının korunmasında önemli bir role sahip olduğu açıkça bilinmektedir. Dört binden daha fazla fitokimyasal kataloglama yapılmış ve fiziksel özellikleri, kimyasal özellikleri ve koruyucu fonksiyonları ile sınıflandırılmış, 2014'e kadar yaklaşık yüz elli fitokimyasal ayrıntılı olarak çalışılmıştır [92]. Baharatlar, baklagiller, kabuklu yemişler, kepekli tahıllar, mantarlar, meyve, otlar, sebze ve tohumlarda geniş kapsamlı bir diyet fitokimyasalları bulunmaktadır. Fitokimyasal kaynakları olarak ahududu, baklagiller, brokoli, çilek, domates, fasulye, havuç, kepekli ekmek, kiraz, lahana, sarımsak, soğan, soya fasulyesi ve üzüm sıralanabilir [90]. Fitokimyasallar, çiçekleri, kökleri, meyveleri, sapları, tohumları veya yaprakları gibi bitkilerin farklı kısımlarında toplanmaktadır [93]. Birçok fitokimyasal, özellikle pigment molekülleri, çeşitli bitki dokularının dış katmanlarında yoğunlaşmaktadır. Fitokimyasal konsantrasyonunun düzeyleri, tür, işleme ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak bitkiden bitkiye değişmektedir [94]. Fitokimyasallar ek formlarda da mevcuttur, fakat besinsel fitokimyasallar ile aynı sağlık faydalarını sağladığından kanıt yoktur. Fitokimyasallar ikincil bitki metabolitleri olarak bilinmekte ve antimikrobiyal etki, antioksidan aktivite, antikanser özelliklerinin modülasyonu, bağışıklık sisteminin uyarılması, detoksifikasyon enzimlerinin modülasyonu, hormon metabolizmasının modülasyonu ve trombosit agregasyonunun azalması gibi biyolojik özelliklere sahip olmaktadır. Binden fazla bilinen ve çok bilinmeyen fitokimyasallar vardır. Bitkilerin kendilerini korumak için bu kimyasalları ürettiklerinin bilinmesiyle yapılan son araştırmalar, birçok fitokimyasalın insanları hastalıklara karşı da koruyabildiğini göstermiştir [90, 95]. Bitkilerde bulunan fitokimyasallar, hastalığın önlenmesinden sorumlu olması, sağlığın desteklenmesi, etkinliklerinin belirlenmesi ve etkilerinin altında yatan mekanizmanın anlaşılması



için kapsamlı bir şekilde çalışılmıştır. Bu tür çalışmalarda kimyasal bileşenlerin tanımlanması ve izolasyonu bulunmaktadır. Fitokimyasalların biyolojik etkileri deneysel hayvanlarda hem in vitro hem de in vivo çalışmalar ve insanlarda epidemiyolojik ve klinik durum kontrolü çalışmaları ile kanıtlanmıştır. Fitokimyasallar kansere neden olan maddeleri detoksifiye etmekte, karsinojenleri aktive eden enzimleri inhibe etmekte, karsinojenleri detoksifiye eden enzimleri aktive etmekte ve serbest radikalleri nötralize etmektedirler. Mesela jenistein, tümör büyümesi ve metastaz için gerekli olan yeni kılcal damarların oluşumunu engellenmesinde gösterilmiştir [90, 92]. Nispeten az sayıda fitokimyasalın fizyolojik özellikleri iyi anlaşılmış, bu sebeple sonra yapılan araştırmalar kalp ve kanser hastalıklarının önlenmesi veya tedavi edilmesinde etkili olmuştur. Ayrıca, maküler dejenerasyonunun, şeker hastalığının ve yüksek tansiyon önlenmesi ve tedavisi için fitokimyasallar önerilmiştir [90]. Bitkilerde bulunan biyoaktif ve hastalık önleyici fitokimyasallar Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.2:** Bitkilerde bulunan biyoaktif ve hastalık önleyici fitokimyasallar ve fonksiyonları [90]

<b>Sınıflandırma</b>	<b>Bileşiklerin ana grupları</b>	<b>Biyolojik fonksiyonu</b>
Antibakteriyel ve antifungal	Alkaloidler, fenolikler ve terpenoidler	Mikroorganizma inhibitörleri Mantar enfeksiyonu riskini azaltmaktadır
Antikanser	Karotenoidler, kurkumin, flavonoidler ve polifenoller	Tümör inhibitörleri Akciğer kanseri gelişiminin inhibitörleri Anti-metastatik aktivitesi
Antioksidanlar	Askorbik asit, flavonoidler, karotenoidler, polifenoller ve tokoferoller	Oksijen serbest radikal söndürme Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu
Detoks ajanları	Aromatik izotiyosiyanatlar, flavonlar, fenoller, fitosteroller, indirgeyici asitler, indoller, karotenoidler, kumarinler, retinoidler, siyanatlar ve tokoferoller	Prokarsinogen aktivasyon inhibitörleri Karsinogenlerin ilaç bağlanma indükleyicileri Tümöröjeniz inhibitörleri
Nişasta içermeyen polisakkaritler	Hemiselüloz, ligninler, müsilajlar, pektinler, selüloz ve zamklar	Su tutma kapasitesi, Besin emiliminde gecikme, Bağlayıcı toksinler ve safra asitleri
Diğer	Alkaloidler, biyojenik aminler, terpenoidler ve uçucu aroma bileşenleri	Nörofarmakolojik ajanlar Antioksidanlar Kanser kemo-müdahalesi

### 2.3.1. Fitokimyasalların sınıflandırılması ve aktiviteleri

Fitokimyasalların kesin sınıflandırması, geniş çeşitliliği nedeniyle bugüne kadar gerçekleştirilememiştir. Son yıllarda, bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak, primer veya ikincil bileşenler olarak sınıflandırılmıştır. Primer bileşenler arasında, amino asitler, klorofil, proteinler, nükleik asitlerin pirimidinleri ve pürinler ve ortak şekerler sayılabilir. İkincil bileşenler alkaloidler, bitki steroidleri, flavonoidler, fenolikler, glukozitler, lignanlar, perkular, saponinler ve terpenler gibi geriye kalan bitki kimyasallarını kapsamaktadırlar [96].

#### *a. Sınıfları*

##### a.1. Fenolikler

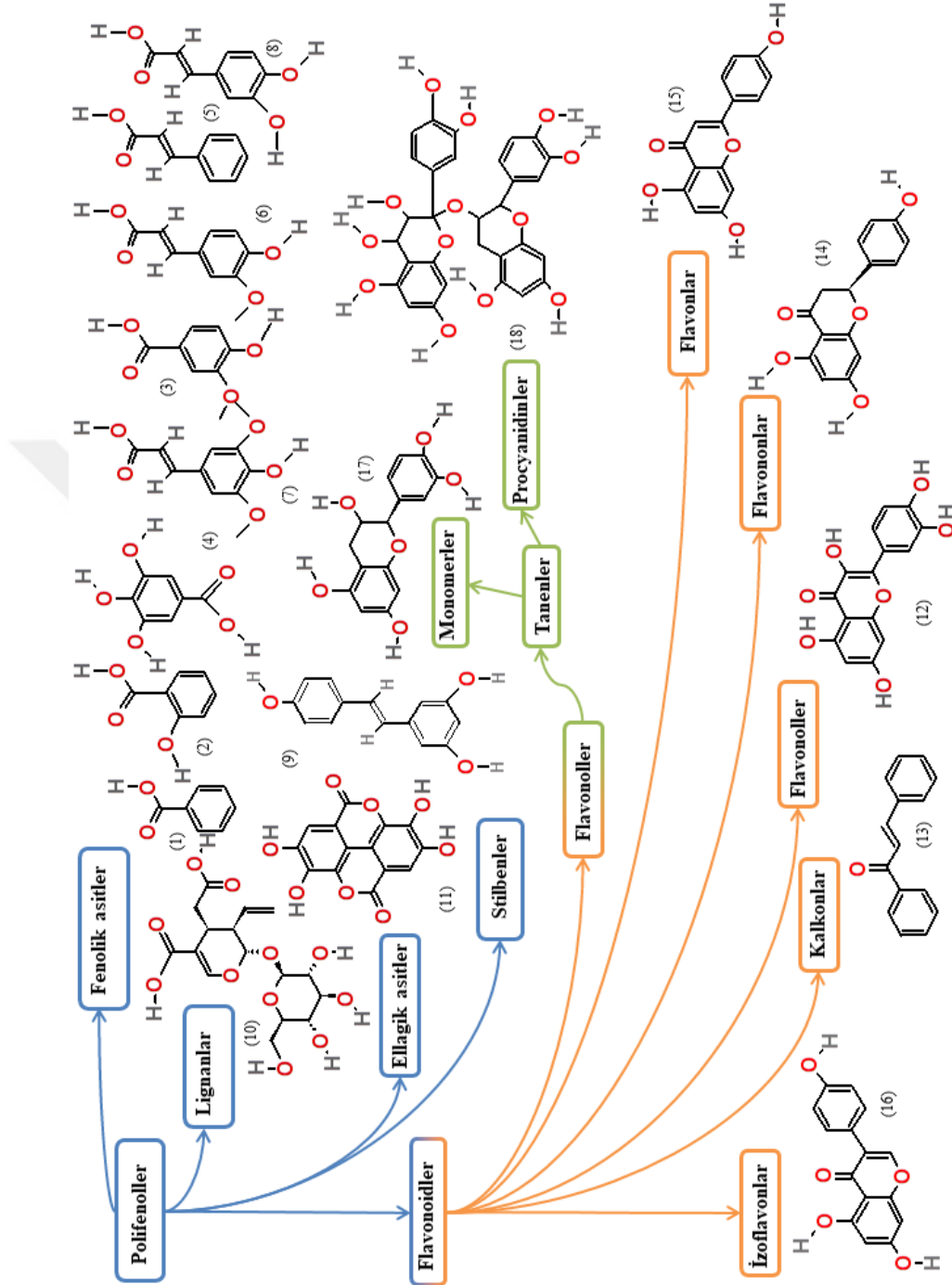
Fenolikler, fitokimyasalların en büyük kategorisini oluşturmaktadır. Besinsel fenoliklerinin en önemli üç grubu flavonoidler, fenolik asitler ve polifenollerdir. Fenolik kimyasal bileşik sınıfını içeren maddeler, hidroksil grubunu (-OH) doğrudan bir aromatik hidrokarbon grubuna bağlanmaktadır. Fenol ( $C_6H_5OH$ ) bu doğal bileşik grubunun en basit sınıfı olarak kabul edilmektedir. Fenolik bileşikler, bitkilerde bulunan geniş ve karmaşık bir kimyasal bileşen grubudur [97]. Bunlar, ikincil metabolitler ve savunma bileşikleri olarak önemli bir role sahiptirler. Fenolikler, insanlara faydalı birçok özelliklerin destekleyicisi ve antioksidan özellikleri açısından önemlidirler. Flavonoidler ise en geniş fenolik gruptur ve çok fazla sayıda çalışmada incelenmiştir. Fenolik asitler ise genişçe dağıtılmış, hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitleri içeren bir grubu oluşturmaktadırlar. Genel olarak, tanenler olarak bilinen fenolik polimerleri ve hidrolize edilebilmiş ve yoğunlaştırılmış tanenler olarak iki sınıfa ayrılan yüksek molekül ağırlıklı bileşikler içermektedirler [90, 98]. Tablo 2.2’te bitkilerde mevcut fenolik bileşiklerin karbon atom sayılarına göre ana sınıfları verilmiştir. Şekil 2.4’te ise bitkilerde bulunan önemli fenolik bileşiklerin moleküler yapıları ve ana sınıfları gösterilmiştir.

### a.1.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler terimi genel olarak bir karboksilik asit fonksiyonel grubuna sahip olan fenollerini belirtmektedir. Fenolik asitler, hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik yapılar olarak iki farklı karbon çerçevesini içermektedir. Hidroksisinnamik asit bileşikleri glikoz veya hidroksi karboksilik asitler ile basit esterler olarak üretilmektedir. Bu fenolik bileşikler moleküler yapıda farklılıklar içermektedir ve hidroksile aromatik halkalarla karakterize edilmektedirler. Bu bileşikler esas olarak kardiyovasküler hastalıklar, iltihap ve kanser gibi çeşitli dejeneratif hastalıklara yol açan oksidatif hasara karşı özellikleri bakımından çalışılmıştır. Birçok bilimsel makale ve derleme [90, 99-101], fenolik asitlerin biyoyararlılığı ile ilgili çalışmalarını tanımlamakta, hem gıda tüketimi ile doğrudan alımı hem de gastrik, bağırsak ve hepatik metabolizma ile elde edilen dolaylı biyoyararlılığı vurgulamaktadır. Bundan başka, fenolik asit bileşikleri ve fonksiyonları çok sayıda biyolojik, kimyasal, tarımsal ve tıbbi çalışmaların konusu olmuştur. Son yıllarda, fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin önemi ve doğal antioksidan bileşikler olarak işlenmiş gıdalarda potansiyel kullanımları yeni bir seviyeye ulaşmış ve bazı kanıtlar bu bileşiklerin biyolojik etkilerinin antioksidan aktiviteleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir [90, 102].

**Tablo 2.3:** Bitkilerde mevcut olan fenolik bileşiklerin karbon atomu sayılarına göre ana sınıfları [90]

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



**Şekil 2.4:** Bitkilerde mevcut önemli fenolik bileşiklerin moleküler yapıları ve ana sınıflandırılması. (1) Benzoik asit, (2) Salisilik asit, (3) Vailinilik asit, (4) Gallik asit, (5) Sinamik asit, (6) Ferulik asit, (7) Sinapik asit, (8) Kafeik asit, (9) Ötesiresveratrolü, (10) Secologanoside, (11) Ellagik asit, (12) Kuersetin, (13) Kalkon, (14) Naringenin, (15) Apigenin ve (16) Genisten

### a.1.2. Flavonoidler

Flavonoidler, doğada her yerde bulunan polifenolik bileşiklerdir. Çay, kahve ve meyve suları gibi içeceklerde, meyvelerde ve sebzelerde bulunan dört binden fazla flavonoidler tanımlanmıştır. Flavonoidlerin eski zamanlarda tıbbi tedavilerde önemli bir görev üstlendiği ve kullanımlarının şimdiye kadar devam ettiği görülmektedir. Flavonoidler vasküler bitkiler arasında yaygın bir şekilde aglikonlar, glukozitler ve metillenmiş türevler olarak bulunmaktadır. Şu ana kadar bilinen bitkisel metaryellerde 4000'den fazla flavonoid tanımlanmış ve bunun yaklaşık 650'si flavon ve 1030'u flavanoldur. Az miktarda aglikon sıklıkla ve bazen de bitkide olan toplam flavonoid bileşiklerinin önemli bir bölümünü temsil etmektedir. Benzen halkası ile yoğunlaştırılmış altı üyeli halka, -pyron (flavonlar ve flavonoller) ya da dihidro türevlerindir (flavanonlar ve flavan-3-ol). Benzenoidun pozisyonu flavonoidleri, flavon (2. pozisyon) ve izoflavon (3. pozisyon) olarak iki sınıfa bölmektedir. Çoğu flavonoid, doğal olarak konjuge formda şekere bağlı olarak meydana gelmekte ve monoglikozid ve diglikozidik gibi herhangi bir sınıf içinde karakterize edilebilmektedir. Glikosidik bağlantısı normal olarak 3. veya 7. pozisyonunda bulunmakta ve karbonhidrat birimi arabinoz, *D*-glukoz, galaktoz, glukamagnoz veya *L*-ramnoz olabilmektedir [90].

### a.1.3. Tanenler

Kimyasal açıdan bakıldığında, tanenleri tanımlamak zordur, çünkü terim çok çeşitli oligomerleri ve polimerleri kapsamaktadır. Tanenlerin mineraller, nükleik asitler, polisakkaritler, alkaloidler ve proteinler ile tersinmekte ve geri dönüşü olmayan kompleksler oluşturma kapasitesine sahip heterojen ve yüksek molekül ağırlıklı polifenolik bileşikler grubu olduğu söylenmektedir. Yapısal özelliklerine dayanarak, ellagitanninler, gallotanninler, kompleks tanenler ve yoğunlaştırılmış tanenler olarak dört ana gruba ayrılırlar [103-105]:

1. Gallotanninler, galloyl birimlerinin veya onların meta-depsidik türevlerinin farklı katekin-, poli-ol- veya triterpenoid- birimlere bağlı olduğu tüm tanenlerdir.
2. Ellagitanninler, en az iki galloil ünitenin birbirine bağlı C-C olduğu ve glikozidik bağlı bir kateşin birimi içermeyen tanenlerdir.
3. Kompleks tanenler, bir kateşin biriminin bir gallotanine glikosidik olarak bağlandığı veya bir ellagitannin birimi tanenlerdir.
4. Yoğuşmuş tanenlerin hepsi bir sonraki monomerik kateşinin C-8 veya C-6'sı ile bir kateşinin C-4 bağlanmasıyla oluşturulan oligomerik ve polimerik proantosiyanidinlerdir.

Tanenler, çay, çikolata, baklagiller, baklagil yemleri, persimmon, üzüm ve yaban mersini gibi meyvelerde ve baklagil ağaçlarında yaygın olarak bulunmaktadır. Tanenlerin sağlığa faydaları çeşitli epidemiyolojik çalışmalarla kanıtlanmıştır [90, 106].

#### a.2. Alkaloidler

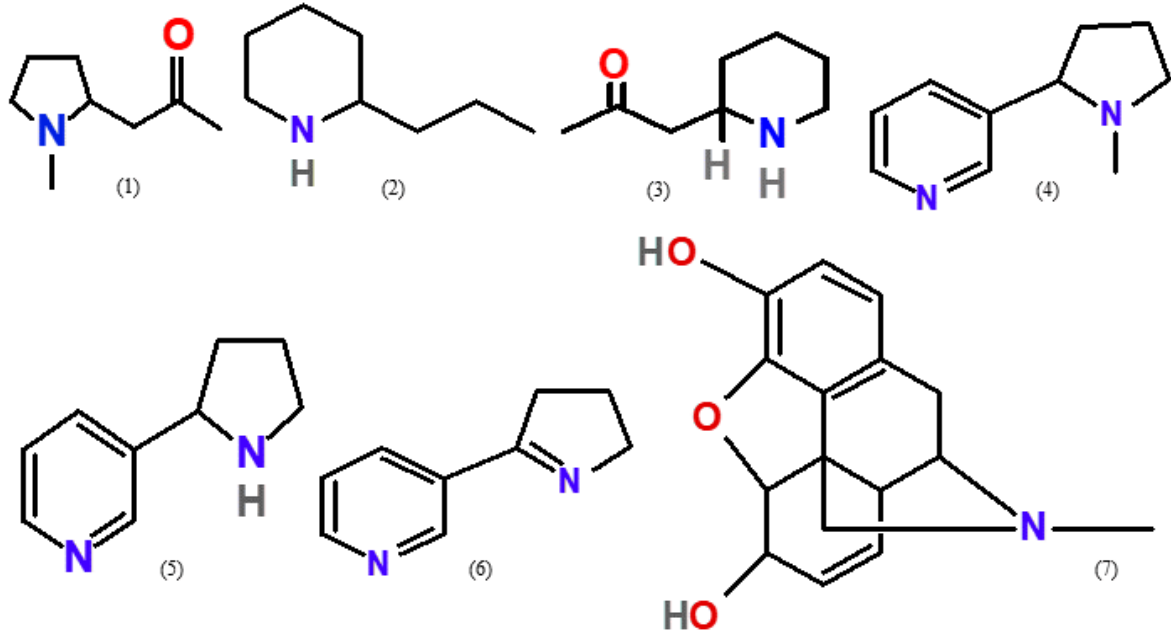
Alkaloidler heterosiklik nitrojen atomları içeren bazlı bir karaktere sahip doğal ürünlerdir. Alkaloidlerin ismi "alkali" den türemiş ve nitrojen içeren herhangi bir bazın tanımlanması için kullanılmıştır. Alkaloidler, bitkiler, bakteriler, hayvanlar ve mantarlar dahil olmak üzere çok sayıda organizma tarafından doğal olarak sentezlenirler.

Tıbbi bitkilerden izole edilen doğal ürünlerden bazıları, 19. yüzyılın ilk yıllarında bitki materyallerinden elde edilen alkaloidlerken, bunların nitrojen içeren bazlar olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bitkisel alkaliler olarak da bilinmektedirler. Alkaloidler kokain gibi uyarıcı olarak ve lokal anestezi olarak kullanılmaktadır. Neredeyse bütün alkaloidler acı bir tada sahiptir. Alkaloidler çok sayıda bulunmakta ve çok çeşitli moleküler yapıları nedeniyle sınıflandırılmaları zordur [90]. Şekil 2.5'te bitkilerde bulunan bazı alkaloidler ve molekül yapıları gösterilmiştir.



Yapısal karmaşıklıkları nedeniyle tarihsel nedenlerden dolayı, alkaloidlerin isimlendirilmesi sistemleştirilmemiştir. Bireysel üyelerin isimleri, genellikle içinde bulunduğunu bitkinin isminden veya karakteristik fizyolojik aktivitelerinden türetilmektedir. İçerdiğini heterosiklik halka sistemine göre çeşitli alkaloid sınıfları aşağıda listelenmiştir.

1. Pirolidin alkaloidleri: Pirolidin (tetrahidropirrol) halka sistemi içermekte ve örnek olarak higrin *Erythroxylum coca* yapraklarında bulunmaktadır.
2. Piridin alkaloidler: Piperidin (heksahidropiridin) halka sistemine sahip olmakta ve koni, izopelletierin ve piperin gibi örnekleri gösterilmektedir.
3. Pirolidin-piridin alkaloidler: Bu alkaloidlerde bulunan heterosiklik halka sistemi pyrrolidinepyridine'dir. Örnek olarak myosmine ve tütün (*Nicotiana tabacum*) bitkisinde bulunan bir nikotin alkaloididir.
4. Piridin-piperidin alkaloidleri: Bu alkaloid ailesi, bir piperidin halka sistemine bağlanan bir piridin halka sistemini içermektedir. En basit üye, zehirli Asiatik bitki anabasis aphyllanından izole edilen Anabasine alkaloididir.
5. Kinolin Alkaloidler: Bunlar temel heterosiklik halka sistemine sahip olmakta ve quinine cinchona ağacının kabuğu içinde oluşmaktadır. Sıtma tedavisinde yüzyıllardan beri kullanılmaktadır. Primaquine gibi sentetik ilaçlar büyük ölçüde bir antimalaryal olarak kinin yerini almıştır.
6. İzokinolin alkaloidler: Heterosiklik halka sistemi izokinolin içermektedir. Eroin, kodein, morfin, narkotik ve papaverin gibi afyon alkaloidleri örnek olarak verilebilir.



**Şekil 2.5:** Bitkilerde bulunan bazı alkaloidler ve molekül yapıları. (1) Hygrine, (2) Koniin, (3) İzopelletierin, (4) Nikotin, (5) Mysomin, (6) Anabazin ve (7) Morfin

### a.3. Terpenoidler

Terpenoidler beş karbonlu izopren birimlerinden türetilmiş bir doğal ürünler sınıfıdır. Terpenoidlerin çoğu, fonksiyonel grupları ve temel karbon iskeletleri ile birbirinden farklı olan çok halkalı yapılara sahiptir. Bu tip doğal lipidler her canlı sınıfında bulabildiğinden dolayı en büyük doğal ürün grubu olarak kabul edilmektedir. Terpenoidlerin birçoğu, gıda ve kozmetik örneklerinde mentol ve sclareol olarak tat ve koku olarak kullanımlarından dolayı ya da meyvelerin aroması ve linalool gibi çiçeklerin kokusu gibi tarım ürünlerinin kalitesi için önemli olduklarından ticari olarak ilgi çekmektedirler. Terpenler, esas olarak bitkilerde uçucu yağların bileşenleri olarak doğada yaygındır. Terpenlerin temel yapı taşı hidrokarbon izoprenidir ( $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$ ). Bu nedenle, terpen hidrokarbonları,  $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$ 'in molekül formülüne sahip olmakta ve izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılmaktadır [107]. Şekil 2.6'da bitkilerde bulunan bazı terpenoidler ve molekül yapıları gösterilmiştir.

### *a.3.1. Hemiterpenoidler*

Hemiterpenoidler tek bir izopren ünitesinden oluşmaktadır. Tek hemiterpen, izoprenin kendisi olmakta ama izovalerik asit ve prenol gibi oksijen içeren izopren türevleri hemiterpenoid olarak sınıflandırılmaktadır.

### *a.3.2. Monoterpenoidler*

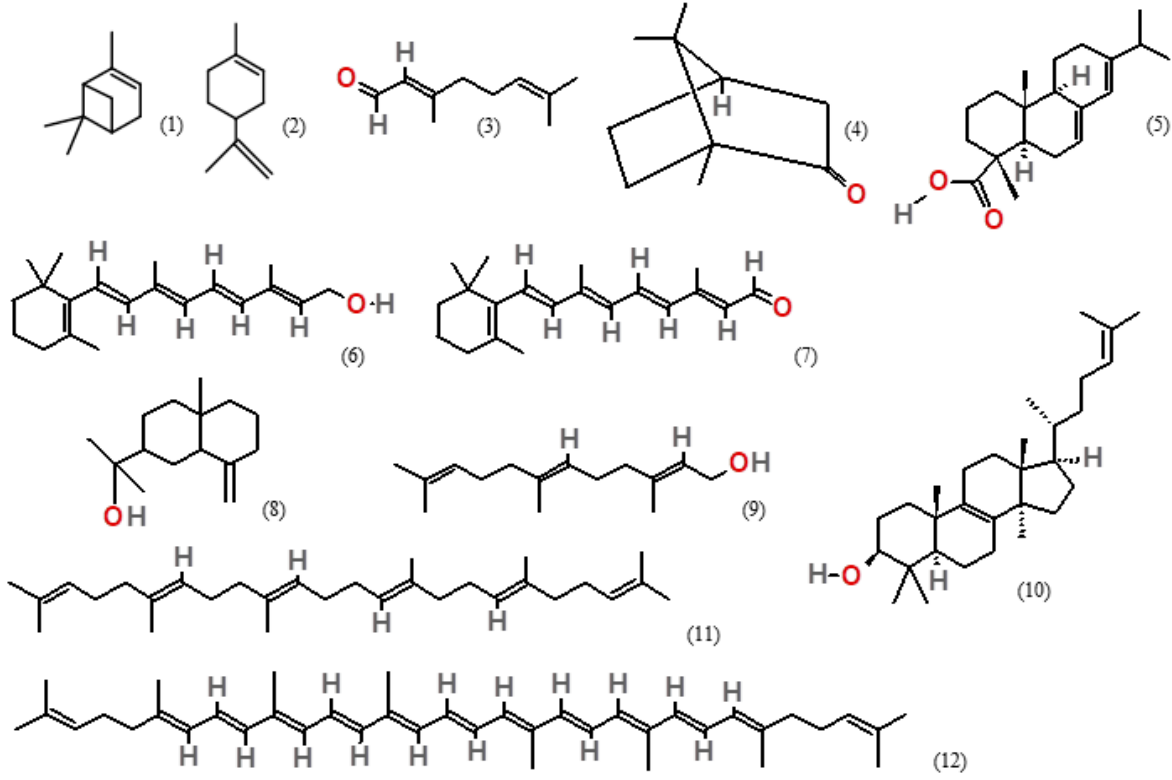
Monoterpenoidler oksidasyon veya yeniden düzenleme gibi biyokimyasal modifikasyonları ilgili monoterpenoidler üretmektedir. Monoterpenoidlerin iki izopren birimi vardır. Doğrusal olarak veya halkalar içeren monoterpenler iki türdür. Geranil pirofosfat, kafur, limonen, okaliptol, pinen ve sitral gibi bileşenler örnek olarak verilebilir.

### *a.3.3. Seskiterpenler*

Seskiterpenin üç izopren birimi vardır. Seskiterpenlerin örnekleri olarak artemisinin, bizabolol, farnezol, çiçek yağı veya okaliptüs yağında bulunan eudesmol gibi halkalı bileşikler gösterilebilir.

### *a.3.4. Diterpenler*

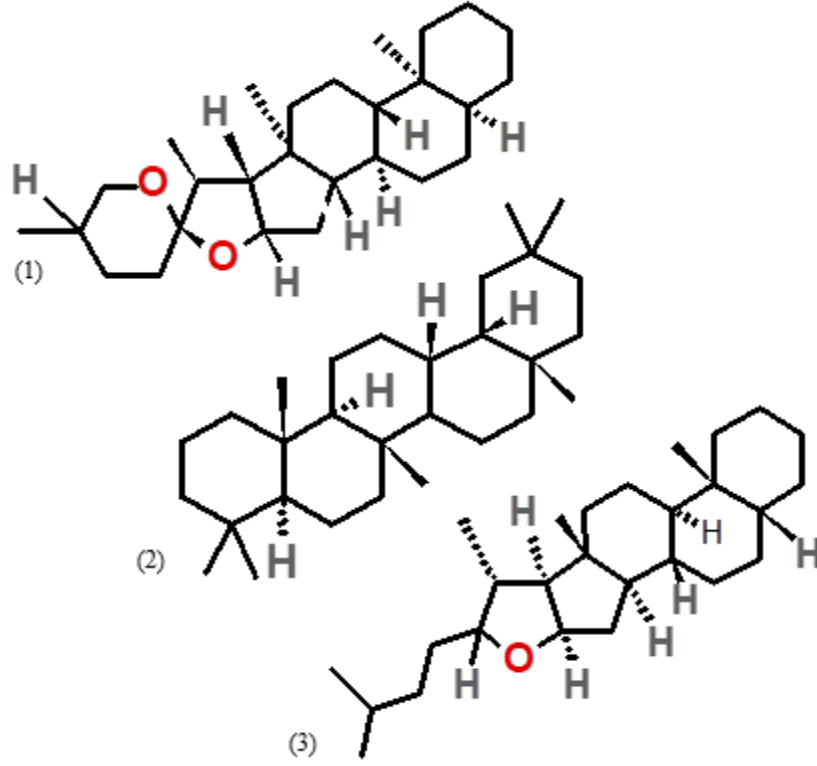
Diterpenler dört izopren biriminden oluşmaktadır. Geranilgeranil pirofosfattan türemektedirler. Fiton, fitol, kapsianozit A, viridol A, B ve zoapatanol diterpen örnekleri olarak gösterilebilir. Triterpenler altı izopren birimlerinden oluşmaktadır. Triterpenlerin örnekleri olarak buğday tohumunda ve zeytinlerde bulunan lanosterol ve skualen alınmaktadır. Tetraterpenoidler, halkasız (asiklik) likopen, tek halkalı (n-monosiklik) gama-karoten ve iki halkalı (bisiklik) alfa- and beta-karotenler şeklinde sekiz izopren birimi içermektedir [90].



**Şekil 2.6:** Bitkilerde bulunan bazı terpenoidler ve molekül yapıları. (1)  $\alpha$ -Pinen, (2) Limonine, (3) Sitral, (4) Kafur, (5) Abietik asit, (6) A Vitamini, (7) Retinene, (8) Eudesmol, (9) Farnesol, (10) lanosterol, (11) Skualen ve (12)  $\beta$ -karoten.

#### a.4. Saponin

Saponinler, bitki krallığında yaygın olarak bulunan sekonder metabolitlerdir. Sabun gibi sulu solüsyonlarda kararlı bir köpük oluşturduğundan “saponin” adı verilmektedir. Kimyasal olarak glikozile steroidler, triterpenoidler ve steroid alkaloidleri olan bileşikler içerirler. Furostan türevleri ve spirostan, steroid aglikonların iki ana tipi olarak bilinmektedir. Triterpen aglikonu oleananenin bir türevidir. Karbonhidrat kısmı, bir arabinoz, galaktoz, glükoz, ksiloz, ramnoz veya glikosidik olarak sapogenin ile bağlanmış glukuronik asit (aglikon) içeren bir veya daha fazla şeker parçasından oluşmaktadır. C-3 pozisyonuna bağlı bir şeker molekülüne sahip olan saponinler, monodesmosid saponinler olarak adlandırılmaktadır. Ama biri C-3'e ve biri de C-22'ye bağlanmış en az iki şeker molekülüne sahip olanlara bidesmosid saponinler denmektedir [90, 108, 109]. Şekil 2.7'de bitkilerde bulunan bazı saponinlerin molekül yapıları gösterilmiştir.



**Şekil 2.7:** Bitkilerde bulunan bazı saponinler ve molekül yapıları. (1)  $5\beta$ -Spirostan, (2) Oleanane ve (3)  $5\beta$ -Furostan

## ***b. Aktiviteleri***

### **b.1. Fenolik asitlerin aktivitesi**

Fenolik bileşikler, geniş farmakolojik aktiviteleri olan sekonder metabolitlerin bir grubudur. Bitkilerde mevcut fenolik bileşikler, ligninler ve proantosiyandinler gibi daha büyük moleküller halinde polimerize edilmektedir. Dahası, fenolik asitler alkoller, glikozitler, hidroksi yağ asitleri ve steroller gibi diğer doğal bileşiklerle esterler halinde gıda bitkilerinde ortaya çıkabilmektedirler. Fenolik asitlerin çeşitli biyolojik aktiviteleri pek çok bilimsel çalışmada rapor edilmiştir. Kan kolesterolünü ve lipid seviyelerini düşürmesi, safra sekresyonunu arttırması ve stafilocok aureus gibi bazı bakteri suşlarına karşı antimikrobiyal aktiviteyi arttırması, fenolik asitlerin biyolojik aktivitelerinden bazılarıdır. Fenolik asitler, antidepresan aktiviteleri, anti-enflamatuar, antioksidan, antispazmodik, antitümör, anti-ülser ve sitotoksik aktivite gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir [90, 102, 110].

### **b.2. Flavonoidlerin Aktivitesi**

Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasitesi moleküler yapılarına bağlıdır. Hidroksil gruplarının ve flavonoidlerin kimyasal yapısında olan diğer özelliklerin konumu, antioksidan ve serbest radikal süpürücü aktiviteleri için önemlidir. Öte yandan kateşinler ve luteolin gibi flavonoidler, C vitamini, E vitamini ve  $\beta$ -karoten gibi besleyici antioksidanlardan daha iyi antioksidanlardır. Flavonoidlerin anti-alerjik aktivite, anti-enflamatuar aktivite, antimikrobiyal aktivite, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu, östrojenik aktivite, sitotoksik antitümör aktivitesi ve vasküler aktivite içeren birçok yararlı özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Flavonoidler, biyolojik sistemlerin, DNA, karbonhidratlar, lipidler ve proteinler gibi makromoleküller üzerindeki oksidatif süreçlerin zararlı etkilerine karşı korunmasında önemli görev yapan çok çeşitli maddeleri oluşturmaktadırlar [90, 111, 112].

### b.3. Tanenlerin aktivitesi

Tanen ekstraktları, özellikle Asya'da (Çin ve Japonya) doğal yollarla tedavide anti-enflamatuar, antioksidan, antiseptik ve hemostatik olarak, diyareye karşı büzücü olarak, duodenal tümörler ve mideye karşı diüretik olarak kullanılmaktadır. Tanenler, boya endüstrisinde katyonik boyalar (tanen boyaları) için kostik olarak ve mürekkep (demir gallat mürekkebi) üretiminde kullanılmaktadır. Gıda endüstrisinde bira, meyve suları ve şarap içerisinde kullanılmaktadır. Tanenlerin diğer endüstriyel kullanımları arasında kauçuk üretiminde pıhtılaştırıcı olarak ve tekstil boyalarında bulunmaktadır. Son zamanlarda tanenler, özellikle çeşitli kanser ve immün yetmezlik sendromu gibi ölümcül hastalıkların artması nedeniyle araştırmacıların dikkatini çekmektedir [90, 113-117].

### b.4. Alkaloidlerin aktivitesi

Alkaloidler, allelopatik aktif kimyasalları sayesinde bitkinin hem böceklere, mikroorganizmalara (antibakteriyel ve antifungal aktiviteler) ve otçullara hem de diğer bitkilere karşı hayatta kalmalarını sağladığından bitkinin korunması ve yaşaması için önemlidir. Bitkisel ham madde içeren baharatlar, boyalar, ilaçlar veya zehirler gibi alkaloidlerin kullanımı neredeyse medeniyet başlangıcına kadar uzanmaktadır. Alkaloidler antiaritmik etki, antihipertansif etkiler, antikanser eylemleri ve antimalarial aktivite içeren birçok farmakolojik aktiviteye sahiptir. Bazı alkaloidler, kafein ve nikotin olarak uyarıcı özelliklere de sahiptir. Kinin antimalarial ilaç olarak ve morfin analjezik olarak kullanılmaktadır [90].

### b.5. Terpenlerin aktivitesi

Bitki sekonder metabolitleri arasında terpenoidler yapısal olarak çok çeşitli bir gruptur. Bitkinin direkt savunmasında fitoaleksinler olarak veya otçullar gibi doğal düşmanlarına karşı dolaylı savunma tepkilerinde sinyal görevi yapmaktadırlar. Pek çok bitki, polenleşme için belirli böcekleri çekmek için veya bu bitkileri gıda gibi kullanarak bazı hayvanları uzaklaştırmak için uçucu terpenler üretmektedir. Daha az uçucu fakat güçlü acı tatlandırıcı veya zehirli olan terpenler, bazı bitkilerin hayvanlar tarafından yenilmelerini önlemektedirler. Yani basit bir açıklama olarak beslenme engelleyicidir. Terpenoidler antikanserojen (perilla alkolü),

antimalaryal (artemisinin), antimikrobiyal, anti-ülser ve diüretik aktivite (gliserizin) gibi tıbbi özelliklere sahip olabilmektedir [90, 116, 118, 119].

#### b.6. Saponinlerin aktivitesi

Saponinlerin bitkilerde fizyolojik rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bitkilerde tanımlarını ve hayvan hücrelerinde, bakterilerde ve mantarlarda çoklu etkilerini anlatan çok sayıda bilimsel yayın olmasına rağmen, sadece birkaç tanesi bitki hücrelerindeki işlevlerini ele almıştır. Spirostan ve furostan türevlerini inhibe etmek için birçok saponinin antimikrobiyal olduğu bilinmektedir. Saponinler, bitkilerin savunma sistemlerinin bir parçası olarak düşünülendiğinden fitoantinantlar veya fitoprotektanlar olarak adlandırılan bitkilerde bulunan büyük bir koruyucu moleküler gruba dahil edilmektedirler. Bitkilerde ve bitkisel ürünlerde bulunan saponin karışımları hayvan vücudunda bulunduğunda çeşitli biyolojik etkilere sahip olmaktadır. Saponinlerin antikarsinojenik, hipokolesterolemik, immunostimülan ve membran geçirgenliği özellikleri üzerine kapsamlı araştırmalar yapılmış ve ayrıca hayvanların büyümesini, beslenmesini ve üremesini önemli ölçüde etkilediği bulunmuştur. Bu yapısal olarak çeşitli bileşiklerin, proteinlerin sindirimini ve bağırsakta olan vitamin ve minerallerin alımını bozmak, hipoglisemiye neden olmak ve antifungal ve antiviral olarak hareket etmek üzere, protozoanları ve yumuşakçaları öldürmek gibi görevleri üstlendiği gözlenmiştir [90, 120-122].



### 2.3.2. Fonksiyonel gıdaların fitokimyasal içeriklerine göre sınıflandırılması

Fonksiyonel bileşenler, bazı bulaşıcı olmayan hastalıkların başlamasını önlemek için bitkilerden türetilmiş, besleyici olmayan ve biyolojik olarak aktif kimyasallar olan fitokimyasalları içermektedirler. Gıdalarda 900'ün üzerinde fitokimyasal bulunmaktadır. Yaklaşık 120 g meyve/sebzenin bir porsiyonunda 100 kadar farklı fitokimyasal bulunmaktadır. Önceleri, fonksiyonel bileşenlerin, ağırlıklı olarak sadece meyve, sebze ve tahıllar gibi bitkisel gıdalarda fitokimyasallar olarak oluştuğu düşünülmüştür. Bununla birlikte, fermente süt ürünleri, soğuk su balıkları ve süt gibi hayvansal ürünlerde bulunan biyoaktif peptitler, doymamış yağ asitleri (-6 ve -9), konjuge linolenik asit, probiyotikler ve uzun zincirli omega-3 eşit olarak bulunmaktadır [77].

Fonksiyonel bileşikler genellikle gıdada esterleştirilmiş, glikozile, hidroksillenmiş veya tiollenmiş materyaller gibi çeşitli formlarda ortaya çıkmaktadır. Ayrıca vücutta olan çeşitli hastalıklar ve hedef dokular üzerinde faydalı etkiler sağlayan çoklu metabolik aktiviteleri vardır [77].

#### 2.3.2.1. Nişastalı olmayan karbonhidratlar (diyet lifi ve fucoidan)

Esasında, bunlar arabinoz, früktoz, galaktoz, ksiloz ve diğerler dahil olan glikoz moleküllerinin ve diğer şekerlerin polimerleri gibi deposal ve yapısal karbonhidratlardır. Bu sayede, insan sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemezler, ama kolonda olan probiyotik mikroplar tarafından fermantasyon geçirmektedirler. Diyet lifi ve fucoidan gibi çeşitli nişastalı olmayan karbonhidratlar vardır.

##### a. Türleri

##### a.1. Diyet lifleri

Çözünebilen veya çözünmeyen diyet lifleri, nişastalı olmayan polisakaritler ve tahılın ve mikroorganizmalarının hücre duvarlarının yapısal bileşenleridir. İnsan sindirim enzimleri tarafından hidrolize edilemeyen bağlarla tutturulan uzun, düz ve dallanmış karbonhidrat molekülleri zincirlerinden oluşan bitki besinlerinin sindirilmeyen kısmıdır. Kimyasal açıdan, diyet lifleri,  $\beta$  (1,3: 1,4) veya  $\beta$  (1,3: 1,6) bağlarının hetero-yapısal konfigürasyonunda glikoz polimerleridir. Suda çözünebilen lifler esas olarak arabinoksilanlar,  $\beta$ -glukanlar, müsilaj, pektin

ve zamklar, iken suda çözünmeyen lifler hemiselüloz, lignin ve selülozdan oluşmaktadırlar [77, 123-125].

#### a.2. Fucoidan

Fucoidan nişastalı olmayan ve sülfatlanmış polisakkariddir. Fucoidan ayrıca ksiloz'un, galaktoz'un ve glukuronik asitin izlerine sahiptir. Fukozu memelilerde bulunan diğer altı-karbonlu şekerlerinden ayıran iki yapısal özge, altı-pozisyonunda (C-6) karbonun ve L-konfigürasyonunun üzerinde bir hidroksil grubunun bulunmamasıdır [77, 126].

#### b. Fonksiyonları

Diyet liflerinin uzun lifli yapıları, karsinojenlerinin ve zararlı toksinlerinin sindirim kanalına girip zarar vermesine izin vermektedir. Çözünen diyet lifi olan tahıl  $\beta$ -glukan, serum kolesterolünün düşürülmesi gibi birçok sağlığa yararı sebebiyle özel bir ilgi elde etmiştir. Buna ek olarak, iyi su tutma kapasitesine, jelleşme kabiliyetine ve yağ yerine geçen maddelerin kullanımlarını etkilemiş hidrokoloidalın oluşturmasının özelliklerine sahiptir. Fungi  $\beta$ -glukanlar, maya ve küflerin hücre duvarında bulunan çeşitlendirilmiş yapıların bir ailesi, vücut savunma mekanizmasının geliştirilmesinden sorumlu olan lökosit aktivitesini arttırarak bağışıklık sistemini modüle etmektedir.

Araştırmalara göre [127-131], süt ürünlerinde başarılı bir şekilde yağın yerini almışlardır. Çözünür diyet lifi suda çözülebilmekte veya suyu absorbe edebilmekte ve bağırsak yolunda olan bağlanma toksinlerine ve kolesterolüne etkilidirler. Öte yandan, çözünmeyen diyet lifi, suda çözülememekte ve bağırsak yolundan gıda geçiş oranının artırılmasına etkilidir. Çözünür olmayan diyet lifi aynı zamanda potansiyel karsinojenleri azaltmakta ve toksinlerin ve karsinojenlerin bağırsak yoluyla temasını da azaltıp vücuttan geçişini hızlandırmaktadır. Benzer bir şekilde, fucoidan, tümör hücrelerinin hücre dışı matrise yapışmasını önleyerek ve yetişkin T-hücreli lösemine neden olan insanın T-hücreli lösemi virüsü (tip I 'HTLV-1') içinde programlanmış hücre ölümü sağlayarak kanser hücrelerinin yayılmasını önlemektedir. Polisakkarit, antiapoptotik proteinleri düzenleyen doğal olarak oluşan bir madde olan NF-kB'yi etkisizleştirilerek programlanmış hücre ölümünün yolunu açmaktadır [77, 128, 130-132].

Fucoidanın, enfeksiyona karşı korumayı artırmasına sebep olanlar makrofajların fagositik etkisini ve birçok immün hücre tipinin sentezini stimüle ettiğini göstermiştir. Fucoidanın besinsel yapısı, bilinen en mükemmel bağışıklık destekleyici gıda olan anne sütüne benzetilmektedir. Polisakkarit, bağışıklık sistemine, beyaz kan hücreleri patojenlere saldırıp imha ettiği süreç olan fagositozu artırarak büyük bir destek sağlamaktadır. Ayrıca, fucoidan vücutta dolaşan matür beyaz kan hücrelerinin sayısını arttırarak enfeksiyonlara ve hastalıklara karşı ilk savunma hattını güçlendirmektedir [77, 129, 133].

### c. Kaynakları

Çözünen diyet lifi bakımından zengin gıdalar, brokoli, ceviz, çoğu baklagil, elma, kızılıçık, kuşkonmaz, havuç, portakal, psilyum, mango yer fıstığı ve yulaf içerirken çözünmeyen diyet lifi bakımından zengin olanlar badem, brokoli, çilek, çoğu baklagiller, elma, ıspanak, kahverengi pirinç, muz, susam tohumu, tahıllar, tam buğday ekmekleri ve yeşil biberdir. Tahıllar ve bakteriler  $\beta$ -(1,3:1,4)-glukanca zengin bir kaynaktır (kolesterol düşürülmesi ve düşük glisemik indeksli fonksiyonlar için gıdalarda iyi bir fonksiyonel içerik olarak kabul edilen güçlü koloidal özelliklere sahip bir diyet lifidir). En yüksek  $\beta$ -(1,3:1,4)-glukan miktarı yulaf (%2.2-7.8), arpa kepeği (%2.5-11.3), alöron ve sub-alöron fazlarında bulunmaktadır [77, 125].

Bazı tıbbi mantarlar ve fukusgiller, fucoidanca zenginlerdirler. Yukarıda belirtilene ek olarak, mantar ve mayanın polisakkaritleri gibi  $\beta$ -(1,3:1,6)-anittümör aktivitelere odaklanılmıştır ve bu glikanların kimyasal çeşitliliği homopolimerlerden yüksek-kompleks heteropolimerlere kadar değişmektedir. Arabinoz, galaktoz, glikoz, glukuronik asit, ksiloz, mannoz, sukroz riboz ve diğerler gibi şeker çeşitleri, bu tür polisakkaritlerin oluşmasında rol oynamaktadırlar. Bazı glikanlar, daha kuvvetli antitümör aktivitesi olan proteinler ve peptitler ile konjugat oluşturmaktadırlar [77, 129, 133, 134].

### 2.3.2.2. Antioksidanlar, anti-kanserli ve başışıklık sistemini düzenleyici ilaçlar

Antioksidanlar, hücrede bulunan serbest radikallerini ve reaktif oksijen türlerini nötralize eden bileşik gruplarıdır. Serbest radikal, çiftleşmemiş elektronu içeren ve yüksek oranda yüklü ve dengesiz bir karbon veya oksijen atomudur. Serbest radikaller lipidler, proteinler ve karbonhidratlardan oluşmaktadır.

#### a. Türleri

##### a.1. Karotenoidler

Karotenoidler, en az 40 karbon içeren ve geniş bir konjuge çift baē sistemine sahip olan oksijenli veya oksijensiz hidrokarbonlar olan lipofilik bitki pigmentleridir.  $\alpha$ -karoten,  $\beta$ -karoten ve likopen, baskın polar olmayan fonksiyonel karotenoidler ve lutein birincil polar fonksiyonel karotenoiddir. Karotenoidler yaē asitlerine esterleştirilmiş veya bitki dokularında esterleştirilmemiş olarak bulunabilmektedir. Likopen, potansiyel kemo terapi aktivitelerine sahip olan en aktif oksijen ntralleştiricidir. Meyvelerin ve sebzelerin toplam karotenoid ieriēi yaşlarına ve depolamasına göre deēiřmektedir [77].

##### a.2. Polifenoller

Polifenoller, çok sayıda ve yaygın olarak daēıtılmıř fonksiyonel molekül grubudur. Polifenoller, bir veya daha fazla benzen halkaları ve deēiřen sayıda hidroksil (OH), karbonil (CO) ve karboksil (COOH) grupları içeren gruplardır. Genellikle bir veya daha fazla baēlı şeker kalıntısı ile konjuge formlarda bulunmaktadır. Polifenollerin en yaygın sınıfı flavonoidlerdir. Diēer polifenol türleri arasında izoflavonlar, kateşinler, flavinler ve 8000'den fazla diēer bileşikler bulunmaktadır. Polifenol ieriēi, gıda kaynakları ile aynı tip olan gıdalar arasında olaēanst düzeyde deēiřebilmektedir. Arpa ve darı (590 -1500 mg / 100 g - KM), mısır ve yulaf (8.7-30.9 mg/100g-KM), pırasa ve taze soēan (20 - 20.25 mg/100g-KM), taze brüksel lahanası (6-15 mg/100g-KM), ahududu, ilek, kızılıcık ve yaban mersini (37 - 429 mg / 100 g - KM) gibi bazı gıda maddelerinde ve meyvelerde toplam polifenol içerikleri gsterildiēi aralıklar olarak rapor edilmiştir [77, 135, 136].

### a.3. Fitosteroller

Fitosteroller hayvanlarda kolesterolün bitki eşdeğeri'dir. Onların yapıları benzerdir. Bununla birlikte, bitki sterollerinde olan yan zincir ek çift bağlar ve metil ve/veya etil grupları içermektedir. En yaygın biyoaktif bileşikler beta-sitosterol, kampesterol ve stigmasteroldür. Her gün vejeteryen olmayan diyet yaklaşık 250 mg doymamış fitosterol içermekte ve vejeteryen diyet 500 mg'dan fazla içermektedir. Bitkisel sterollerin doymuş türevleri, sitostanol gibi bitki stanolleridir [77].

### a.4. Tokoferoller ve tokotrienoller

Tokoferoller ve tokotrienoller, doymuş (tokoferoller) veya doymamış (tokotrienoller) olan bir izoprenoid yan zincirine bağlı bir fenolik kromanol halkası içeren lipid-çözünür fonksiyonel bileşenlerdir. Ayrıca orada, fenolik-kromanol halkasında olan metil gruplarının sayısı ve pozisyonunda farklılık gösteren dört primer tokoferol ve tokotrienol, alfa, beta, gamma ve delta formları vardır. Ek olarak, tokoferollerin izoprenoid yan zincirinin iki, dört ve sekiz pozisyonlarında üç asimetrik karbon bulunmaktadır. Sonuç olarak, RRR-a tokoferolünün en büyük biyoaktiviteye sahip olduğu ve aynı zamanda insan kanında ve dokularında en fazla olduğu tokoferollerin sekiz izomerik formu vardır [77, 135].

### a.4. Organosülfür komponentleri

Çoğunlukla organosülfür bileşikleri brokoli, brüksel lahanası ve karnabahar gibi turpgillerde veya pırasa gibi allium sebzelerde (soğan ve sarımsak ile aynı sınıfta bulunan sebzeler) bulunmaktadır. Organosülfür bileşikleri, bir çevrimsel veya çevrimsel olmayan konfigürasyonda bir siyanat grubuna veya bir karbon atomuna bağlı olan sülfür atomlarını içermektedir. Organosülfür bileşikleri içeren gıdaların fonksiyonel bileşenleri, sadece çiğnendikten, kesildikten veya parçalandıktan sonra hücrelerin bozulmasına neden olduğu bunları açığa çıkarmasıyla elde edilmektedir. Turpgillerde, benzil izotiyosiyanat, fenetil izotiyosiyanat ve sülforafan gibi çeşitli izotiyosiyanatlar, mirosinazin etkisiyle glikosinolyatlardan oluşturulmaktadır. Allium sebzelerde allisin alinden oluşmakta ve sonra allinazın etkisi ile dialil sülfita, dialil disülfüra veya dialil trisülfüra hızla dönüşmektedir. Hem turpgillerde hem de allium sebzelerde, bu hidrolitik yıkım ürünleri sağlık arttırıcı fonksiyonel bileşenlerdir [77].

## b. Fonksiyonları

Antioksidanların birincil fonksiyonu, bir hücre içinde olan redoks potansiyelinin düzenlenmesini ve hücre ölümünün ve karsinogenezin potansiyel başlatıcılarının azaltılmasını içermektedir. Dolayısıyla antioksidanlar anti-kanserojen maddelerdir. Redoks potansiyeli, hücre içinde meydana gelen oksitleme ve indirgeme reaksiyonların dengesini ifade etmektedir. Bir hücrede olan redoks değişiklikleri, apoptosisin indüksiyonu (hücre ölümü) ve sinyal iletiminin aktivasyonu gibi çeşitli moleküler tepkileri (hücreler arasında ve bir hücre içinde mesajların aktarımı) tetikleyebilmektedir. Bu nedenle, fizyolojik ve patolojik süreçlerin redoks düzenlemesi, sağlığın ve hastalıkların önlenmesinin optimize edilmesinde önemlidir. Diğer fonksiyonel antioksidan bileşikler, N-nitrozo bileşiklerinin çay içinde polifenoller ile bağlanması gibi, bağırsak yolunda olan karsinojenlere veya toksinlere bağlanabilmekte ve sonuç olarak transformasyonunu ve hatta absorpsiyonunu engellemektedir. Fitosterol/stanollerin lipid düşürücü mekanizması, bağırsak yolunda kolesterolü tecrit ederek ve absorpsiyonunu azaltarak gerçekleşmektedir [50, 77, 137].

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, diyet fitosterollerinin, kolon, meme ve prostat kanseri gibi batı toplumlarında yaygın bulunduğu kanserlerin çoğundan korunma sağlayabileceğini düşündürmektedir. Fitosterollerin bu koruma sağladığı olası mekanizma, konak hücre dokularında, membran yapısında ve tümörde etkilerini, tümör büyümesini ve apoptozu düzenleyen sinyal transdüksiyon yollarını, konakçının immün fonksiyonlarını ve konakçı tarafından kolesterol metabolizmasını içermektedir. Birkaç izoflavonometabolit ile östrojen ve östradiollerin arasındaki yapısal benzerlik, izoflavonlarda östrojen benzeri biyolojik aktiviteler olasılığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, fitoöstrojenler veya izoflavonlar, menopoz öncesi kadınlarda östrojene daha az maruz kalma ve meme kanseri riskini azaltma ile sonuçlanan antagonist östrojen aktivitesi göstermektedir. Postmenopozal kadınlarda, fitoestrogen zengin diyetleri, plazma kolesterol seviyelerinde ve kemik erimesinde hormon duyarlı artışları azaltmaktadır [77, 129, 131, 133, 138-141].

Bağışıklık modülasyonu için ana mekanizma, alil sülfidler, karotenoidler, izotiyosiyanatlar, polifenoller ve tokoferollerin çoklu antioksidan kapasitesidir. Likopen, potansiyel kimyasalların zararlı etkilerini önleyicinin aktivitelerine sahip en aktif oksijen nötrleştiricisi olmaktadır. Bu

bileşikler, bağışıklık hücrelerinin erken ölümüne neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin zararlı etkilerini azaltmaktadır. Sarımsak, toplam kolesterol seviyelerinin düşürülmesinde üstün bir fitokimyasal olarak bulunmaktadır. Aynı zamanda, sarımsağın iyi kolesterolü artırarak (Yüksek yoğunluklu lipoprotein 'HDL') ve kötü kolesterolü düşürerek (Düşük yoğunluklu lipoprotein 'LDL') arteriyel sertliği kontrol ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca, proteini ve mRNA'yı azaltarak indüklenebilen nitrik oksit sentezini inhibe etmekte ve böylece kan damarlarının vazodilatasyonunu desteklemektedir. Sarımsak, güçlü bağışıklık potansiyeline sahiptir ve hipersensitivite reaksiyonu geciktirerek doğal öldürücü aktivitesini ve T-Lenfositlerin proliferasyonunu arttırmaktadır. Özellikle akciğer karsinomunun ve sarkom-180'in kontrolünde ve trombosit agregasyonunun inhibisyonunda, yaşlı sarımsak ekstresinin iç vücut düzenleyici işlevi ile ümit verici bir bağışıklık değiştirici olduğu rapor edilmiştir. Sarımsak ekstraktının içeriğindeki hem yağda hem de suda çözünen bileşiklerin sağlığa yararları gösterilmiştir. Sarımsak ekstraktının oksidan tepkilerini tersine çevirmesinden dolayı dokuları oksidatif hasarlardan koruduğu düşünülmektedir [77, 142, 143].

### c. Kaynakları

Polifenoller ve flavonoidler gıdasal kaynaklar olan meyvelerle, sebzelerle ve tahıllarla yapılan diğer içecekler, baklagiller, çaylar, fındıklar, meyveler, sebzeler, tahıllar ve şaraplarda yer almaktadırlar. Havuç, kabak, ıspanak ve tatlı patates  $\beta$  ve  $\alpha$ -karotene zengindirler ve hardal yeşili, ıspanak, lahana ve yeşil fasulye gibi koyu yeşil yapraklı sebzeler lutein içeren kaynaklardır. Likopen ağırlıklı olarak domateslerde bulunmaktadır [144]. Domatesde bulunan diğer biyoaktif bileşenler, antimutagenik aktivitelere sahip olan kaempferol veya klorojenik asittir. Domates süspansiyonu, karsinogenez sırasında farklı biyolojik yolların modülasyonunun aracılığıyla meydana gelen kolon kanserinde koruyucu bir etkiye sahiptir. Tokoferol ve tokotrienoller açısından zengin olan tipikal diyetin kaynaklarının arasında bitkisel yağlar, kabuklu yemişler ve tahılların tohum kısmı bulunmaktadır. Faydalı immünomodülatör etkilere sahip olduğu gösterilen yiyecekler arasında badem, bitkisel yağlar, brokoli, ceviz, sarımsak ve soğan bulunmaktadır [77].

Benzer şekilde, lahana, meyan kökü, sarımsak, soya fasulyesi ve zencefil ekstreleri ve şemsiye biçimindeki çiçekli sebzeler, en yüksek antikanser aktivitesine sahip olan yiyecekler ve bitkiler olarak tanımlanmıştır. Turunçgiller, yeterli tedarikte C vitamini, çözünebilen lif, folik asit ve

potasyum sağlamasıyla bir konakçı aktif fitokimyasal içermektedir [77]. Yeşil çay, bazı kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltırken, humoral ve hücre aracılı bağışıklığı artırmaktadır. Epidemiyolojik çalışmalarda, programlanmış hücre ölümüne neden olabilen kanser insidansını azaltmak için sarımsak, soya fasulyesi, yeşil çay ve zencefil önerilmektedir. Soya fasulyesi ekstraktının polikistik böbreklerin gelişmesini engellediği gösterilmiştir. Zerdeçal, deri tümörlerine karşı çok etkilidir [77, 145, 146].

### **2.3.2.3. Probiyotikler ve prebiyotikler**

Probiyotikler, yeterli miktarlarda uygulandığında, konakçı üzerinde sağlığa fayda sağlayan yararlı canlı mikroorganizmalardır. Prebiyotikler, sindirim sisteminde olan probiyotiklerin büyümesini ve aktivitesini sağlığa faydalı olduğu iddia edildiği şekilde sindirilemeyen gıda maddeleridir. Böylelikle, prebiyotikler sindirim sistemimiz aracılığıyla yol alan ve yararlı veya iyi bakterilerin büyümesine ve gelişmesine yardımcı olan sindirilmeyen sağlıklı gıda bileşenleridir.

#### **a. Fonksiyonları**

Probiyotiklerin bizi iki majör rolle koruduğuna inanılmaktadır. Birincisi sindirim sistemimizde oynadıkları roldür. Sindirim sistemlerimizin iyi ve kötü mikroorganizmalar arasında sağlıklı bir dengeye ihtiyacı vardır. Ama antibiyotik kullanımı, çevresel etkileri, diğer ilaçlar kullanımı, duygusal stresi, kötü beslenme seçenekleri ve uyku eksikliği gibi yaşam tarzlarımız dengeyi kötü mikroorganizmaların lehine değiştirebilmektedir. Sindirim sistemi sağlıklı olduğunda bu ve diğer atık ürünleri filtrelemek ve ortadan kaldırmaktadır. Vücudumuzun ihtiyaç duyduğu ve emdiği şeyleri (gıdadan ve sudan besinler) almakta ve ihtiyaç duyulan hücrelere ulaştırmaya yardımcı olmaktadır. Fikir tüm mikropları öldürmek değildir. Vücudumuzun kötü olanlara ve iyi olanlara ihtiyacı vardır. Sorun, dengenin, iyiden daha kötü olmasına kaydırıldığı zamandır. Bir dengesizlik diyareyle, idrar yolu enfeksiyonlarıyla, kas ağrısıyla ve yorgunlukla ilişkilendirilmiştir [77].

Probiyotiklerin ikinci büyük faydası, bağışıklık sistemimize etkisidir. Bağışıklık sistemi, bizim patojenlere karşı korunma sistemimizdir. Düzgün çalışmadığında, alerjik reaksiyonlardan, enfeksiyonlardan ve oto-immün bozukluklardan muzdarip olabiliriz. Doğumdan itibaren doğru dengeyi koruyarak bu rahatsızlıklar önlenmektedir. Doğum kanalıyla doğum sırasında yeni



doğmuş bir çocuk, annesinden yararlı bakterileri almaktadır. Bu iyi bakteriler, sezaryen yapıldığında ve sezaryen ile doğan bazı bebeklerin alerjileri, sub-optimal bağışıklık sistemleri ve bağırsak mikroflorasının daha düşük seviyelerine sahip olmasının nedenleri olarak gösterildiklerinde ortaya çıkmazlar. Probiyotiklerin istenmeyen mikroorganizmaları içermediği özel mekanizmalardan bazıları, adhezyon bölgelerinin bloke edilmesini, besinlerin rekabeti, inhibitör maddelerin üretimini, immünitinin ve toksin reseptörlerinin degradasyonunun uyarılmasını içermektedir [147].

Prebiyotikler bağırsakta olan yararlı ve sağlıklı mikroorganizmaların (probiyotikler) büyümesini istila eden patojenlere karşı artan bir dirençle uyarmaktadır. Prebiyotiklerin, değiştirilmemiş bir formda, insan bağırsağında olan bu olumlu etkisi, prebiyotik etki olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, probiyotiklerin sayısında ve aktivitesinde artış olduğunda böyle bir prebiyotik etki ortaya çıkmaktadır. Bu etki prebiyotikler içeren fonksiyonel gıdalar tüketilerek oluşturmaktadır. Prebiyotik tanım, belirli bir mikrobiyal grubu vurgulamamaktadır [77].

#### b. Kaynakları

Probiyotik temin ettiği iddia edilen yiyecekler çerezler, çubukları, dondurulmuş yoğurt, granola, tahıl suyu ve şekerdir. Prebiyotiklerin en yaygın türleri, fruktooligosakkarit ve galaktooligosakkarit gibi diğer oligosakkaritler ve çözünebilen diyet lifi gibi nişastalı olmayan karbonhidratlardır. Enginar, kuşkonmaz, pırasa, sarımsak ve soğan gibi sıkça yenen bitkileri (sebzeler) mükemmel inülin kaynaklarıdır.  $\beta$ -glukan ve inülin, diyet lifi ve fruktan içeren birçok bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Prebiyotiklerin geleneksel diyet kaynakları arasında çiğ yulaf, rafine edilmemiş arpa, rafine edilmemiş buğday ve soya fasulyesi bulunmaktadır [77].

## 2.4. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar lipid oksidasyonu için en önemli savunma mekanizmasını sağlamaktadırlar. Antioksidanlar doğal olarak bir gıda bileşeni olarak mevcut olmakta veya gıda işleme süresinde oluşturulmaktadır [148]. Halbuki, genellikle gıda işleme doğal olarak bulunan antioksidanların kaybına neden olmakta ve bu sebeple dış antioksidan kaynaklarının belirlenmesi ve denemesi gerekmektedir. Gıda ürünlerinde kullanılan antioksidanlar çözünür, düşük konsantrasyonlarında etkili, kokusuz, tatsız, işlem süresinde dayanıklı ve ucuz olmalıdır. Bu bağlamda, sistem tarafından ideal antioksidanlar hızlıca absorbe edilmeli ve fizyolojik olarak ilgili seviyelerde bulunan proksidant metal iyonlarının şelatlanmasıyla ve serbest radikallerinin söndürülmesiyle oksidasyonu önlemektedir [149, 150].

### 2.4.1. Mekanizması

Antioksidanlar, otoksidasyon reaksiyonlarını indükleyerek ve azaltarak katı yağın, yağların, yağlı maddeler içeren gıdaların oksidasyonunu yavaşlatan veya önleyen bileşiklerdir [151, 152]. Antioksidanların aktivitesi oksidasyonun başlangıç döneminde en iyi performansı göstermektedir. Sonradan, antioksidan konsantrasyonu azaldığından ve daha serbest radikaller bulunduğu için oksidasyon hızlı bir şekilde hareket etmektedir. Hidroperoksit içeriği gittikçe artıp antioksidan fazlası çok hızlı bir şekilde yok edilmektedir. Daha uzun bir başlatma süreci daha güçlü antioksidanların etkinliğini göstermekte ve oksidasyon süresinde oluşturulan serbest radikalleri bağlayarak, yağlı maddelerinin oksidasyonunu yavaşlatabileceği veya önleyebileceği fenolik bileşikler içermektedir [150].



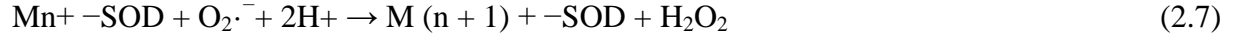
Burada *AnOH* fenolik antioksidanı, *ROOH* hidroperoksitler, *AnO* antioksidan radikali ve *ROO* peroksil radikali temsil edilmektedir. Denklem (2.1)'de gösterilen reaksiyonda, antioksidanlar bir hidrojen atomu oluşturmakta ve sonuç olarak üretilen hidroperoksitlere ayrıştırılmaktadır. Antioksidanların hidroperoksit dekompozisyonunu inhibe etmek için etkisi, aldehit'in ve diğer karbonil bileşiğinin oluşumlarına bağlı ransiditeyi azaltarak yağın kalitesinin korunmasında kritik olabilmektedir [151]. Antioksidan radikal aşağıda gösterildiği gibi sonraki reaksiyonlarda yer alabilmektedir:



Yüksek antioksidan aktiviteyi sahip olan fenoller (hidroksitirozol, kafeik asit ve oleuropein gibi) denklemler (2.2) ve (2.4)'te gösterilen reaksiyonlarda denklemler (2.3) ve (2.5)'te gösterilen reaksiyonlardan daha iyi tepki vermektedir. Sonuç itibarıyla, serbest radikaller etkisizleşip zincir reaksiyonları durdurulmuştur [150]. Şekil 2.8'de antioksidanlar ve serbest radikaller arasında olan reaksiyon mekanizması gösterilmiştir.

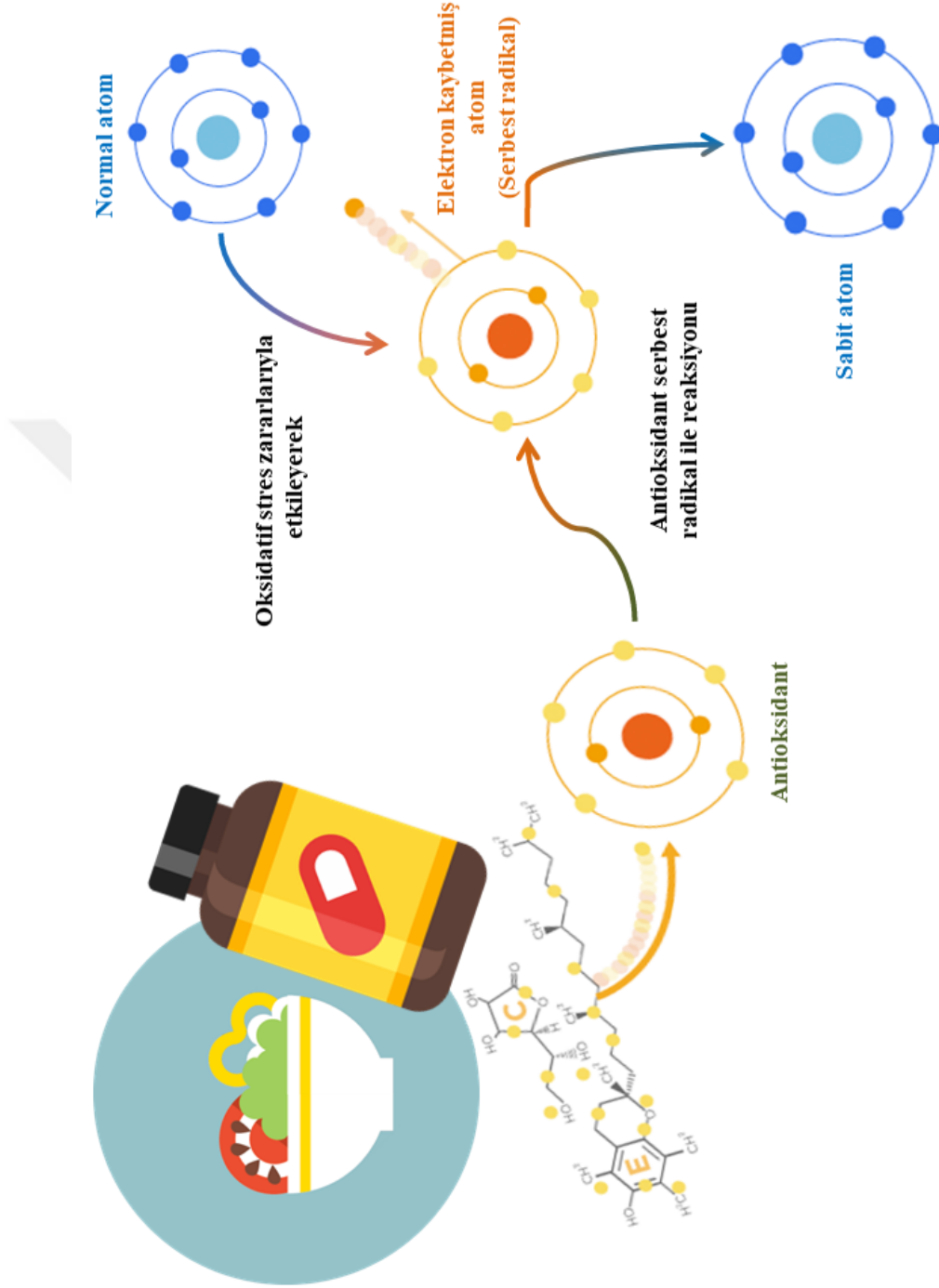
Oksidasyonun temel süreçlerini, antioksidan etkisini ve lipid oksidasyonunun bozunma ürünlerinin etkilerini anlamaya yardımcı olmak için çok fazla araştırma yapılmıştır. Çalışmalarda, arayüzey fenomenlerinin heterojen gıdalar ve biyolojik sistemlerde antioksidan etkisinin daha iyi anlaşılması için anahtar olduğu gösterilmektedir. Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroksil radikali (HO), peroksinitrit (ONOO), serbest radikaller ( $\text{R}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ), süperoksit anyonu ( $\text{O}_2^-$ ) ve tekli oksijen ( $^1\text{O}_2$ ) gibi reaktif oksijen türleri (ROS), birçok hücrel oksidatif yollarından ve lipidlerin otoksidasyonu ve termal oksidasyonundan üretilebilmektedir [156-158]. ROS'in üretimin ve ortadan kaldırımı arasında meydana gelen dengesizlik oksidatif streştir. Bu durumda hücrenin ölümü ve ciddi kronik hastalıklara yol açan aşırı ROS, hücrelerdeki bütün biyomoleküllere saldırıp neredeyse hasar vermektedir. Fazla ROS'un neden olduğu fizyolojik hasarı en aza indirmek için, ROS oluşumunun yerini doldurmak için geniş bir yelpazede enzimatik ve enzimatik olmayan endojen antioksidan savunma sistemi geliştirilmektedir. Süperoksit dismutaz (SOD) ( $\text{O}_2^-$ )'nin oksijen ve hidrojen peroksite dismutasyonu katalize edilmektedir. Böylece, oksijene maruz kalan tüm hücrelerde önemli bir antioksidan savunma bulunmaktadır [150, 156, 159-161]. SOD ile süperoksitin dismutasyonu aşağıda gösterilen yarı reaksiyonlarla yazılabilmektedir:





Burada M,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  veya  $\text{Ni}^{++}$ 'dir.

Bu reaksiyonlarda metal kationun oksidasyon durumu n ve n+1 arasında değişmektedir [150]. Genelde doğal veya sentetik antioksidanlar, metal iyonları şelat olmasıyla, serbest radikalın durdurulmasıyla veya oksijenli molekülerin etkisizleştirmesiyle oksidasyon önlenmektedir [150, 162].



**Şekil 2.8:** Antioksidanlar ve serbest redikaller arasında meydana gelen reaksiyon mekanizması<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [150, 153-155].

## 2.4.2. Türleri

### 2.4.2.1. Sentetik antioksidanlar

Bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanlar serbest radikalleri durdurmak ve oksidasyonu kontrol etmek için yaygın olarak kullanılmaktadırlar [163, 164]. BHA, tahıl üretiminde ve şekerlemede kullanılan hindistan cevizi ve palmye çekirdeği yağlarında yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir. Domuz iç yağında ve soya yağında kullanılan BHA ve BHT kombinasyonunun yüksek bir antioksidan aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [165]. TBHQ, ağartılmış yağda, deodorize edilmiş deniz ürünlerinin yağlarında ve rafine edilmiş yağlarda BHA'den, BHT'dan veya  $\alpha$ -tokoferolden daha fazla antioksidan aktivite sergilemiştir [166]. PG, insanin promyelositik lösemi hücre dizisinde olan hücre içi ROS'un baskılanmasını ve ksantin oksidazı inhibe ettiği rapor edilmiştir [167]. Bununla birlikte, bazı araştırmalarda, BHA ve BHT gibi sentetik antioksidanların bazı hayvanlarda yüksek seviyelerde zayıf karsinojenik etkilere sahip olabildiği gösterilmiştir [168]. Bazı araştırmalar [169], BHA, TBHQ, 2-terciyer butil-4-metilfenol (TBMP) ve PG'nin, nükleik asitlerle moleküler kompleksler oluşturma ve DNA'nın çift sarmal yapısına zarar verme potansiyeli olduğunu rapor etmiştir. Bu sentetik antioksidanlar gıda endüstrisi tarafından 60 yıldan uzun bir süre kullanılmış ve yağların ve lipid içeren gıdaların işlenmesi ve depolanması süresince oksidasyonunun başlaması, geciktirilmesi veya önlenmesi amacı ile ürünlere kasıtlı olarak eklenmektedir [150, 170]. %1.5-2 oranında olan BHA, DNA'daki kalıtsal değişiklikler indükleyerek kemirgen işkembesinde tümörün oluşmasına sebebiyet vermiştir [171]. Yüksek dozlarda kullanılan BHT, K-vitaminine bağlı olan kan pıhtılaşma faktörlerini azaltma yeteneğine sahip olmakta ve yeterli bir iç ve dış çok şiddetli kanamaya sebep olarak bazı farelerin ve kobayların gerginliğinin ortadan kalkmasına neden olmuştur [172]. Dahası, TBHQ ve 2-terciyer butil 1,4-benzokinon metaboliti (TBQ), insan monositik lösemi U937 hücrelerinde sitotoksik etkide bulunmuştur [173]. Bu arada PG, mitokondrilere zarar verme etkisine sahip olduğundan izole sıçan hepatositlerinde hücre zehirlenmesine yol açmıştır [150].

Gıda maddelerinde sentetik antioksidan kullanımı, potansiyel toksisiteleri olduğundan devlet yönetimleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Sentetik antioksidanlar antioksidanın etkiye sahip olmalarına rağmen potansiyel toksisiteleri sebebiyle gıdalardaki uygulamaları sınırlıdır [174]. Geçmişte, yağların oksidasyonu esas olarak güçlü sentetik antioksidanların eklenmesiyle kontrol edilmiştir [175]. Ancak, kanserojen, patojenik ve potansiyel toksik etkileri hakkında endişeler gitgide artmaktadır [176, 177]. BHA, BHT ve TBHQ gibi sentetik antioksidanların kullanımı kobaylarda çeşitli kanser türlerinde artışı tetiklemiştir [166]. Böylece, son yıllarda sentetik antioksidanların kullanımı büyük derecede değişmiştir. Birkaç yıl öncesine kadar birçok ülkede güçlü sentetik antioksidan olan TBHQ'nun kullanılmasına izin verilmemiş ve genellikle güvenli olarak kabul edilen (GRAS) bileşiklerin listesinden BHA çıkarılmıştır [178, 179]. Son zamanlarda yapılan birçok araştırma [150, 180-185], sentetik kaynaklara benzer özelliklere sahip olan doğal kaynaklardan alternatif yeni antioksidanların tanımlanması üzerinde yoğunlaşmıştır.

#### ***2.4.2.1. Doğal antioksidanlar***

Askorbik asit, karotenoidler, polifenoller ve tokoferoller/tokotrienoller meyvelerde, sebzelerde ve tahıllarda yüksek oranda konsantre olan geleneksel doğal antioksidanlardır. Antioksidan etki mekanizmaları arasında serbest radikallerin süpürülmesi, geçiş metali iyonu katalizörlerinin şelatlanması, hidroperoksitlerin kararlı hidroksil türevlerine indirgenmesi ve diğer indirgeyici bileşiklerle sinerjik olarak karşılıklı etkileşimi bulunmaktadır. Doğal antioksidanlar üzerinde çok sayıda çalışma ve değerlendirme yayınlanmıştır. Fakat düzenleyici kanunlar sebebiyle az sayıda doğal kaynaklı doğal antioksidan pazara ulaşmıştır [150, 162, 186-188].

Fenolik fitokimyasallar ve vitaminler gibi doğal gıdalar ve gıdadan türetilmiş antioksidanlar, oksidatif hasarlara karşı hareket eden, sağlığı geliştirici maddeler olarak işlev gördüğünden dolayı çok ilgi çekmiştir [183, 189-192]. Bitkilerde, otlarda (özellikle bitkisel infüzyonlar, sıklıkla ev ilaçları olarak kullanımı) ve baharatlarda fenolik bileşiklerin varlığı (flavonoidler, fenolik asitler ve polifenoller), antioksidatif, farmakolojik ve tatlandırıcı özellikler gibi çeşitli işlevlerinden dolayı artarak ilgi görmektedir [193]. Sadece doğal antioksidanların, günlük alım (RDI) miktarlarına sahip olan gıdalarda olduğu gibi yasal olarak kullanılabilen ve bunlarından yalnızca A, C ve E vitaminlerini ve selenyum içerdiği de not edilmelidir. Buna bağlı

olarak, antioksidanların diğer doğal kaynakları, biberiye ve adaçayı gibi tatlandırıcıların, yeşil çay gibi doğal bir bileşen ve özellikle soya fasulyesi yağı işlemeden üretilen deodorizer-distilattan karışık tokoferoller altında kullanılmaktadır. Kullanılan diğer antioksidan kaynaklarına unlar ve diğer tohum bileşenleri gibi bağlayıcılar dahil edilmektedir [150].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda [192, 195-204], doğal antioksidan kaynağının bolluğu ve zenginleştirme yöntemleri bildirilmiştir. Bir de yapılan araştırma, toz halinde olan baharat ve sebzeler, baharat ekstraktları ve ıspanak, kişniş ve lahana gibi yapraklı sebzeler içermektedir. Araştırmaçılar, antioksidan stabilite ve acılık indeksi üzerindeki etkilerini incelemek için saf fenolik bileşikleri bir lipid matrisi olarak rafine zeytinyağına eklemişlerdir. Ama yine de, zeytinyağını fenolik ekstraktlarla zenginleştirirken ortak bir sorun vardır. Kararsız emülsiyonlar meydana gelmektedir [205]. Bu problemi çözmek için, emülgatörlerin kullanılması önerilmiştir. Zenginleştirilmiş zeytinyağları hazırlamak için en iyi emülgatör olarak lesitin tanımlanmıştır. Yağda hidro-etanolik parçacıkların kararlı hale gelmesine ve fenolik zenginleşmenin bir sonucu olarak ortaya çıkan acılığın artışını sınırlandırdığı gözlenmiştir [150, 206].



## 2.5. ZEYTİN

### 2.5.1. Zeytin Ağacı

Zeytin ağacı adını Yunanca Olea kelimesinden almakta ve dünyada bilinen en eski ekili ağaçlardan biri olarak bilinmektedir. Zeytin (*Olea europaea*), yenilebilir meyveleri için yetiştirilen ve yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Zeytin beslenme ve tıbbi etkileri olan dini ve sosyo-kültürel öneme de sahip bir üründür. Zeytin meyvesinden ekstrakte edilmiş zeytin yağı ve sofralık zeytin veya salamuralık zeytin olarak pazarlanmaktadır [207].

#### 2.5.1.1. Dünya çapında zeytin ağacının tarihsel arka planı

Zeytin ağacı Akdeniz havzasında yaklaşık 6000 yıl yetiştirilmiştir. Arkeolojik çalışmalar, zeytin yetiştiriciliğinin orijinal merkezlerinin Girit, İsrail, Kıbrıs, Lübnan ve Suriye'de olduğunu göstermektedir. M.Ö. 600 civarında, zeytin ağacı Kuzey Afrika'dan veya Yunanistan'dan İtalya'ya ve diğer Akdeniz ülkelerine getirilmiştir. Zeytin ağacı muhtemelen Araplar, Romalılar ve Yunanlılar tarafından İspanya'ya tanıtılmıştır. Roma, işgal altında olan tüm Roma İmparatorluğuna zeytin yetiştiriciliğini genişletmiştir. Zeytin ağacı, güney Avrupa'da yaygın olarak yetiştirdiğinden dolayı *Olea europaea* adını buradan almıştır.

Efsaneye göre, zeytin ağacı tanrılardan eski Yunanlılara bir armağandır. Tarihçi Herodotus, Atina'yı M.Ö. 5. yüzyılda geniş bir zeytin kültürü merkezi olarak tanımlamıştır. Filozof Aristoteles, zeytin ekimini bir bilime yükseltmiştir. Zeytin ağacı Yunanlılar için manevi bir hazinedir. Cenaze törenlerinde arıtılmış suya daldırıldığı zeytin dalları kullanılmıştır. Yün ile sarılarak özel yapılmış zeytin dalı çelengi, hasat festivallerinde şarkı söyleyen çocuklar tarafından taşınmıştır. Yunan şehri Olympia'da Olimpiyat oyunlarında kazananlar yabani zeytin dallarından yapılmış çelenklerle taçlandırılmıştır. Kazananlara bir de zeytinyağı fincanı verilmiştir. Zeytin ağacı, Yunanlılar ve diğer milletler için olduğu gibi Romalıların da sembolüdür. Romalılar ve Yunanlılar, zeytin yetiştiriciliğinin, üretiminin ve işlenmesinin tüm yönlerini geliştirmiştir. Romalılar tarafından zeytin meyvesinin işlenmesi için vida presi (hidrolik pres) icat edilmiş ama yaklaşık 2000 yıl boyunca bu yöntem kullanılıp ona hiç değişim ya da gelişim yapılmamıştır. Roma, Afrika'da olan zeytin ağacının önemini fark edip ekimini

hızlandırmıştır. Romalılar diyetlerde zeytinyağı yerine hayvansal yağ tüketicilerini barbar olarak görmüştür.

Zeytin, incir ve üzüm gibi en yararlı ve nefis meyvelerden biri olarak kabul edilmiştir. Şüphesiz, antik dönemlerde zeytin ve zeytinyağı en değerli ürünlerdir. Zeytinyağı, yağlı bir besleyici olmasının dışında her zaman başka çeşitli kullanımlara da sahiptir. Zeytinyağı, Ortodoks Kilisesi törenlerinde özel bir yere sahiptir. Ortodoks rahipleri ve Yunanistan krallarının kutlanması için kullanılmıştır. Ayrıca zeytin ağacı, çömleklerin ve duvarlarının dekorasyonunda önemli bir rol oynamıştır. Zeytin ağacı kültürünün antik yapısı ve Batı medeniyetinin gelişmesinde etkisi nedeniyle büyük tarihsel bir öneme sahiptir. Yüzyıllar boyunca zeytin çeşitleri geliştirilmiştir. Zeytin kültürleri meyvelerinin büyüklüğüne, kalitesine, rengine ve yağ içeriğine göre farklılık göstermektedir.

Diğer meyve üreten ağaçların aksine, zeytin ağaçları yüzyıllar ve bazen de binlerce yıl yaşamaktadır. Kıbrıs, İtalya, İspanya, Portekiz, Yunanistan ve diğer ülkelerde anıt ağaçlar vardır. Örnek olarak, Yunanistan'da, tanrıça Athena'nın, Plato'nun ve Hipokrat'ın zeytin ağaçları vardır. Ayrıca, 8 metre çevre uzunluğuna ve 800 yıldan daha fazla yaşa sahip olan Kalamata zeytin ağacı Peloponez'de 1821-1824 yılları arasında büyük yangından kurtulan tek ağaçtır [207].

Zeytin ağacı yetiştiriciliği Girit'ten Yunanistan'ın geri kalanına yayılmıştır. Birçok arkeolog, MÖ 3500-1000 arasında yaşadığı Girit Minoan Krallığı'nın zenginliğinin zeytinyağının başarılı ticaretinden kaynaklandığına inanmaktadır. 20. yüzyılın başlarında Girit'te olan Knossos'un Minoan sarayında bulunan resimler, zeytin tüketen ve yemek pişirmek için yağ olarak ve lambalara yakıt olarak zeytinyağı kullanan insanları göstermektedir. Bugüne kadar Knossos ve Phestos'ta bulunabilen büyük kil kaplar (amforalar) antik çağda zeytinyağının depolanması için kullanılmıştır. Girit adasında, 1000 yıldan daha fazla yaşayan 20 eski zeytin ağacı arasında, en ünlü olan ve hala zeytin üretebilen ağacın adı "Vouves zeytin ağacı" ve bu ağacın yaşının 2000-3000 yıl olduğu tahmin edildiğinden dünyanın en eski zeytin ağaçlarından biridir [207].

Anadolu, Doğu Akdeniz Havzası, Orta Mezopotamya ve Suriye gibi zeytin ağacının kökeni hakkında birçok araştırmacı tarafından çeşitli görüşler sunulmuştur. Diğer teorilere göre, zeytin ağacının doğum yeri olarak kabul edilen başka yerler de vardır. Bunlar, Güney Kafkasya, Hazar Denizi, Küçük Asya'nın doğusunda, Sudan, Etiyopya ve diğerlerinin batı kıyılarına kadar uzanmaktadır [208]. En yaygın teorilerden biri, ekilmiş zeytin ağacının yaklaşık 6000-7000 yıl önce, Doğu Akdeniz Havzasında MÖ 4800 ila 4300 arasında evrimleştiğini göstermektedir [209]. Bununla birlikte, Fenikeliler, Mısırlılar, Helenler, Romalılar, Yahudiler, Suriye'de ve Anadolu'da olan Hititler ve diğerleri gibi zeytin ağacının yetiştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. MÖ 2000'nin ikinci yarısından itibaren Suriye'nin zeytinyağıyla ilgili fazla sayıda veri mevcuttur. Geç Tunç Çağı'nda, Suriye'nin bugün Ras Shamra olarak adlandırılan Ugarit bölgesinde, zeytinyağı üretimi yaklaşık 5000 tondur. Bu bölgeden zeytinyağı ihracatı Kıbrıs'a, Küçük Asya'ya ve Mısır'a yapılmıştır [207].

Mısır kayıtlarında açık bir rapor bulunmamasına rağmen Mısır, Suriye-Filistin kıyısında üretilen zeytinyağının ana ticari noktası olmuştur. M.Ö. 3700-3500 arasında Kalkolitik dönemden beri Yakın Doğu'da zeytin ağacı yetiştiriciliğinin yayıldığı kanıtlanmıştır. Güney Mezopotamya'da bulunan zeytin ağacının ilk yetiştirme tarihi bilinmemektedir [210]. Daha sonra, MÖ 1197-1165'de II. Ramses döneminde Mısır'da zeytin ağacı ekimi yapılmış ve Heliopolis'te tanrı Ra'nın tapınağında bulunan bir kitaba göre, kentin çevresinde bulunan zeytin ağaçları, sarayın aydınlatmasında kullanılan en kaliteli zeytinyağını üretmiştir. Nil Vadisi'nde yetiştirilen bu zeytin ağaçlarının, Mısırlıların ticaretini yaptığı Suriye'den türemiş veya kaynaklanmış olduğuna inanılmaktadır [207]. Firavunlar Tuthmosis III ve Akhenaten döneminde ve hatta daha sonra Ramses II döneminde bile Mısır ve Miken arasında önemli bir belgelenmiş bir diplomasi ve ticaret söz konusu olmuş. Bu dönemde, Filistinliler ve Mısırlılar arasında en az üç diplomatik delegasyon varmış ve burada Argolis'ten zeytin ve zeytinyağı firavunlara teklif edilmiştir [210]. Reformer Akhenaten tarafından kurulan yeni sermaye, Amarna, tanrı Aten tapınağında keşfedilen bir heykel taş üzerinde, firavun zeytin ile bir zeytin ağacı dalı tutarken sunulmuştur [207]. Ek olarak, Amarna'da bir zeytin ağacı ve bir zeytin yaprağı çelengi tanımlayan bir duvar resmi bulunmuştur. Meyvelerin yağ içeriğine göre zeytin ağaçlarının seçimi yapılmıştır. Daha sonra bile, insanlar acı zeytin meyvesinin işlenmesinin ve zeytin ağaçlarından zeytinyağı üretmenin yollarını aramayı düşünmüşlerdir [210].

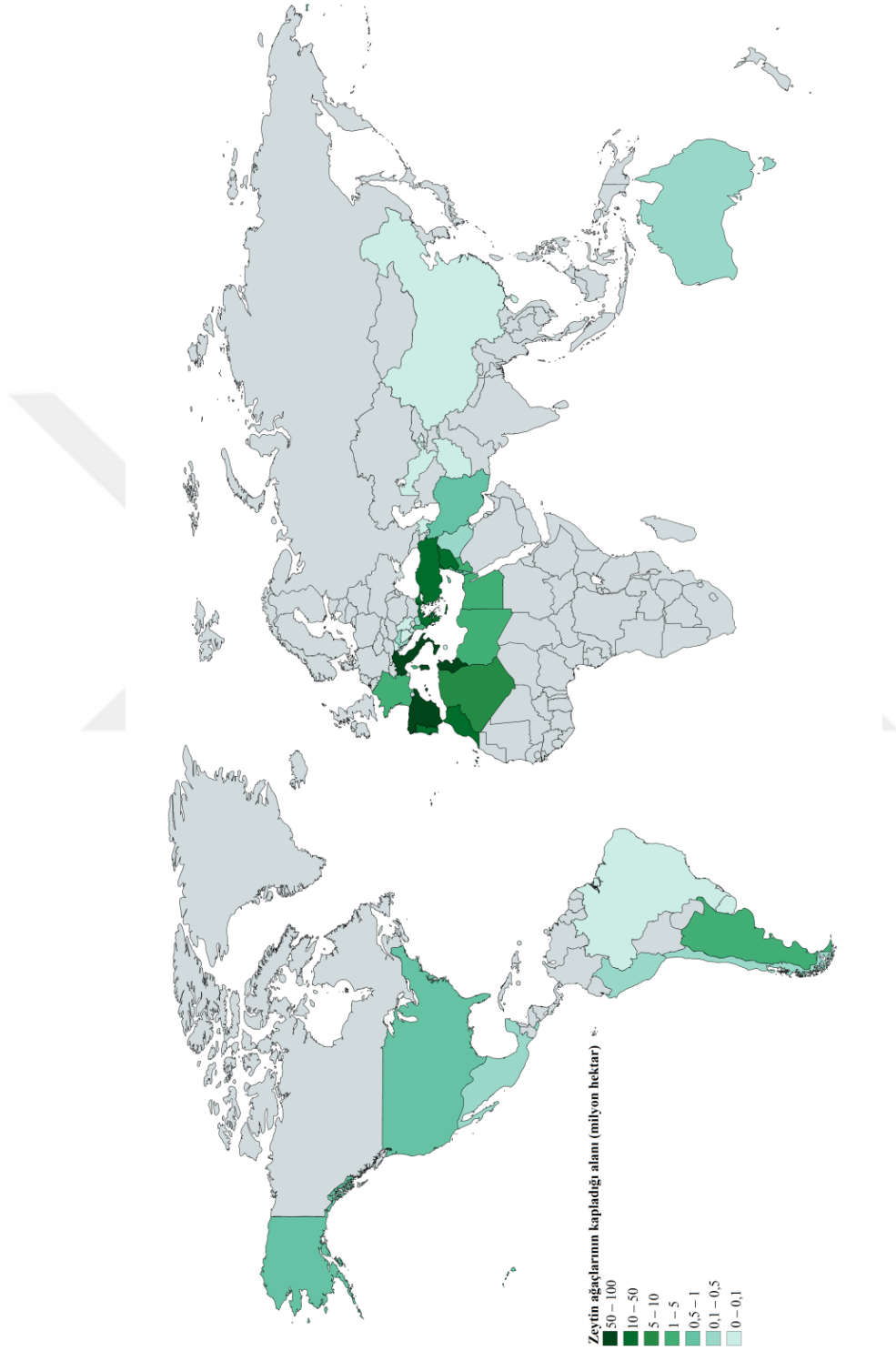
Kuzey Amerika kıtasının keşfinden sonra, zeytin ağacı İspanyol yerleşimciler tarafından oraya getirilmiştir. Zeytin ağaçları ilk olarak 1800 yıllarında Kaliforniya'ya ekilirken, kesimler veya tohumlar Fransisken rahibi tarafından San Diego'ya getirilmiştir. Önceki zamanlarda, San Diego'nun türleri Kaliforniya'da bulunanlardan öncedir. Amerikalıların da zeytinyağlı mutfağı geliştirmelerine rağmen yerel iklim hala yetersizdir. 1930 ve 1940'larda, birçok Kaliforniya zeytini, zeytinyağı yerine, sofralık zeytin üretmek için aşılmıştır. Böylece, bugün Kaliforniya, ABD'de tüketilen zeytinyağının sadece küçük bir yüzdesini tedarik etmektedir. Arizona, zeytin ağaçları ile dikilmiş ticari alan yüzölçümüne sahip başka bir eyalettir. Zeytinyağı üretimi için Amerika Birleşik Devletleri'nde "Misyon", İspanya'da "Arbequina", İtalya'da "Frantoio" ve Yunanistan'da "Koroneiki" dört türü sıklıkla kullanılmaktadır [207].

### **2.5.1.2. Dünya çapında zeytin ağacı tarımı**

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.), Akdeniz florasının en belirgin ağacı olduğundan bütün Akdeniz ülkelerinde bulunabilmektedir. Yerli zeytin ağaçları Portekiz, İran, Irak, Ürdün ve doğuda olan Türkmenistan gibi ülkelerin de ötesinde bulunmaktadır. Zeytin ağacının evrimsel seyri sırasında, insan tarafından 1500'den fazla zeytin çeşidi yetiştirilmiş, bu da sadece Akdeniz havzası ve Orta Doğu boyunca değil, daha da ileri Amerika'ya, Asya/Güneydoğu Asya'ya, Okyanusya'ya, Orta/Güney Afrika'ya ve Doğu'ya genişlemesini mümkün kılmaktadır.

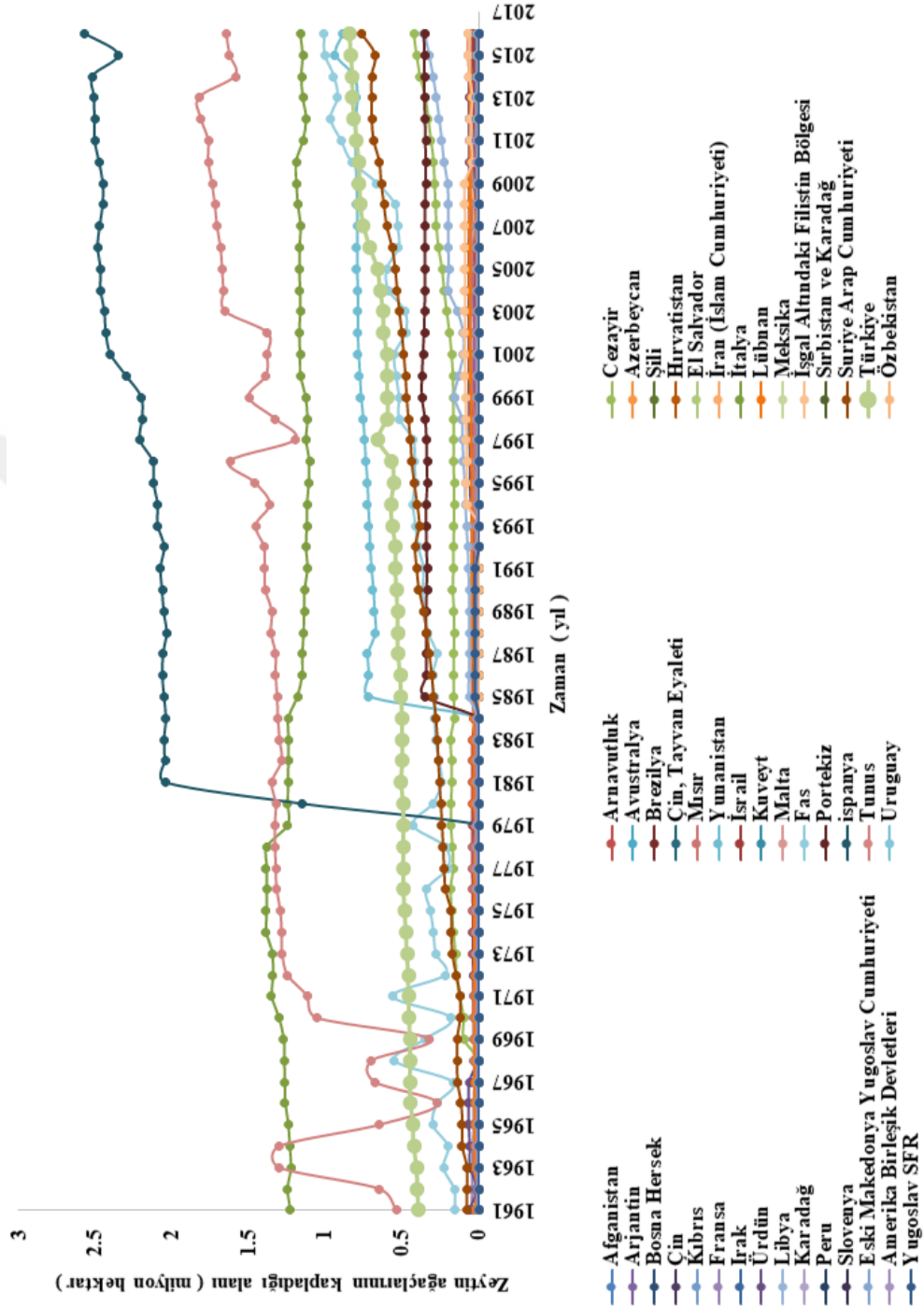
Modern zamanlarda, zeytin ağacı tüm dünyaya yayıldığına göre daha önce zeytin ağaçlarının olduğunu bilinmeyen birçok bölgede başarıyla yetiştirilmiştir. Zeytin ağaçları şu anda 30° ve 45° enlemleri arasında yer alan yaklaşık 30 ülkede ticari olarak yetiştirilmektedir. Ancak, antik ev olan Akdeniz havzası, en fazla sayıda zeytin ağacına sahip olup henüz dünyanın ana zeytinyağı kaynağıdır.

Günümüzde, zeytin yetiştiriciliğinde sürekli olarak artan bir ilgi vardır. Tüketicilerin bilinçlendirilmesine atfetiğinden dolayı yüksek besin değeri ve sağlık faydaları sağlayan ürünler zeytinler ve zeytinyağı gibi zeytin ürünlerine yönelik talep artırmaktadır. Akdeniz Havzasında zeytin, çevresel ve sosyo-ekonomik açıdan çok önemli bir tür olarak kalmaktadır. Son on yılda, üç ana Avrupa Birliği (AB) zeytin üreticisi ülkede, İtalya, İspanya ve Yunanistan'da zeytin yetiştiriciliğinde büyük ilerleme kaydedilmiştir [207, 211, 212]. Şekilleri 2.9 ve 2.10'de dünya çapında zeytin ağacı tarımı gösterilmiştir [213].



**Şekil 2.9:** Dünya çapında zeytin ağacı tarımı (milyon hektar)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritnin tasarlama verileri FAOSTAT'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [213, 214].



Şekil 2.10: Dünya çapında zeytin ağacı tarımı (milyon hektar)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri FAOSTAT'ten alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [213].

### ***2.5.1.3. Türkiye'nin zeytin ağacının tarihi arka planı***

Dünyadaki gibi Türkiye'de zeytin uzun ömürlü yaprak dökmeyen bir ağaç olarak tanımlanmaktadır. Türk zeytin ağaçları, 10 metre yüksekliğe ulaşabilen ve yoğun biçimde dallanmış ve geniş bir kanopiye sahip olan ağaçlardır. Yaşla birlikte, düzgün gri gövdesi yavaş yavaş çatlamaya başlayıp budaklı halde olup ağaç yüksekliği arttıkça kanopi genişlik artmaktadır. Çok yıllık bir ağaç olduğu için yaklaşık 2000 yıldır yaşayabilmektedir. Kanopi, verimli toprakta yetiştiğinde açık ve simetrik ama verimsiz arazide ekilirken daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri ve neredeyse üçgen şekliindedir.

Medeniyetlerin yol kavşağı olan Anadolu, 6000 yıl boyunca zeytin ağacına ev sahipliği yapmaktadır. Zeytin, bölgeye barış, güzellik ve sağlık getirmektedir. Zeytin ve ürünleri, akdeniz halklarının uzun ömürlülüğünün büyüleyici sırrı olup farklı medeniyetlerin paylaştığı lezzetli geleneksel ürünleri taşımaktadır. Urla'da ege bölgesinde Klazomenai antik kentide bulunan arkeolojik kalıntılar, M.Ö. 6. yüzyıla kadar zeytinyağı ekstraksiyonuna tanıklık etmekte ve son keşifler bu şehirde erken zeytin ticareti ve ihracatı hakkında daha fazla kanıt sağlamaktadır. Türkiye'de zeytin'in uzun tarihinin bir başka kanıtı, Mut'ta 1300 yaşında bulunan ağaç ya da İzmir'de bulunan zeytinyağı depolarıdır. İzmir, MÖ 1199'da zeytin ağaçlarının gölgesinde Homeros'un destanlarını arkadaşlarına okuduğu ve akşam yemeğini yedikleri yerdir. Hata'yda zeytinlerin ana vatanı ve Türkiye'de en eski ikinci zeytin ağacına (gövde apı 110 cm) ev sahipliği yapmaktadır. Ağrı'da eski çağlardan beri Nuh'un Gemisine zeytin dallarını gagasında taşıyan güvercinler barışın simgesi olmuştur [215, 216].

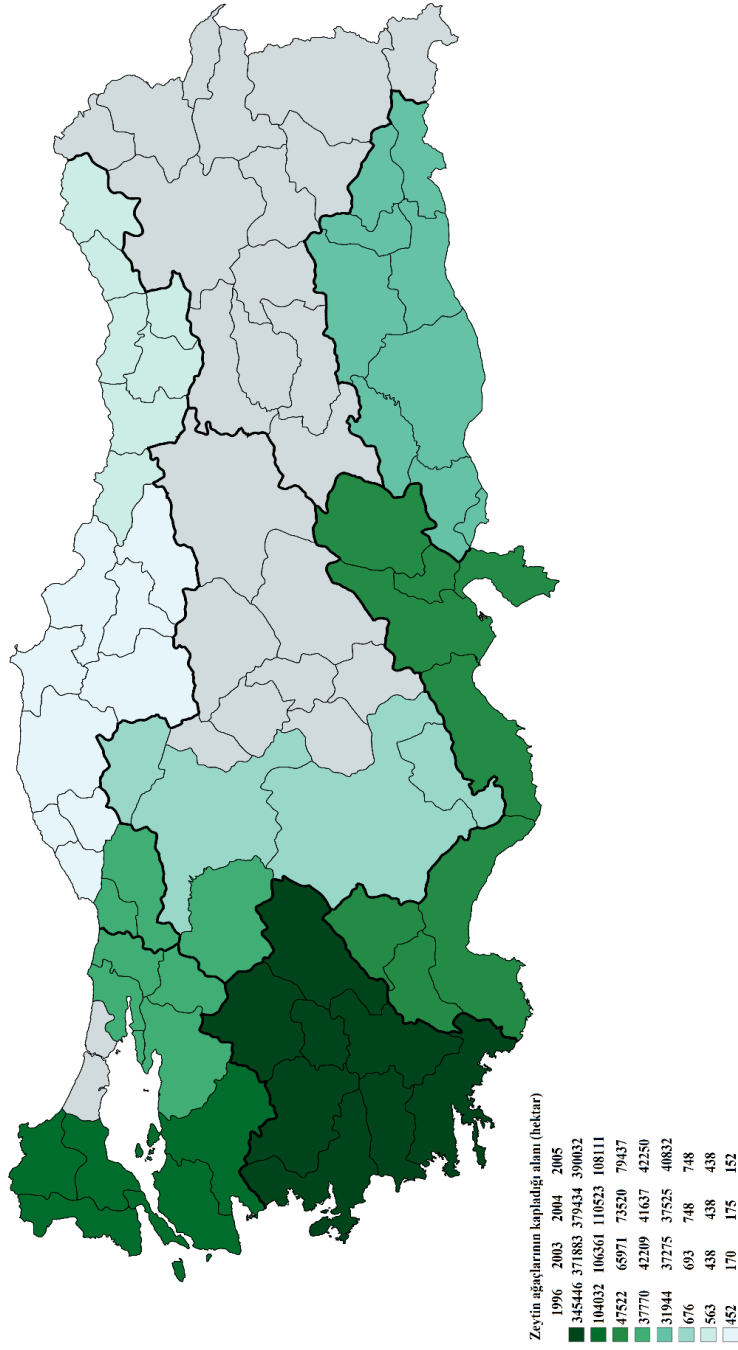
#### **2.5.1.4. Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı**

2000'lerin başında, Türkiye'nin 100 milyon zeytin ağacı bulunmaktaydı. 2014/15 sezonunda, yeni dikimleri için bu sayıyı 169 milyona artırmıştır. Zeytin yetiştiriciliği Aydın, Balıkesir, Bursa, Çanakkale, Ege, İzmir, Manisa, Muğla, Gaziantep ve Mersin illeri, Marmara ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yoğunlaşmaktadır [215, 216]. Şekil 2.11-2.19'da 1995'ten 2016'ya kadar olan Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı özetlenmektedir [217]. Şekil 2.20'da 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'de bulunan meyve veren ve vermeyen zeytin ağaçlarının sayısı gösterilmektedir [218].

#### **2.5.1.5. Ağacının taksonomik hiyerarşi ve karakterizasyonu**

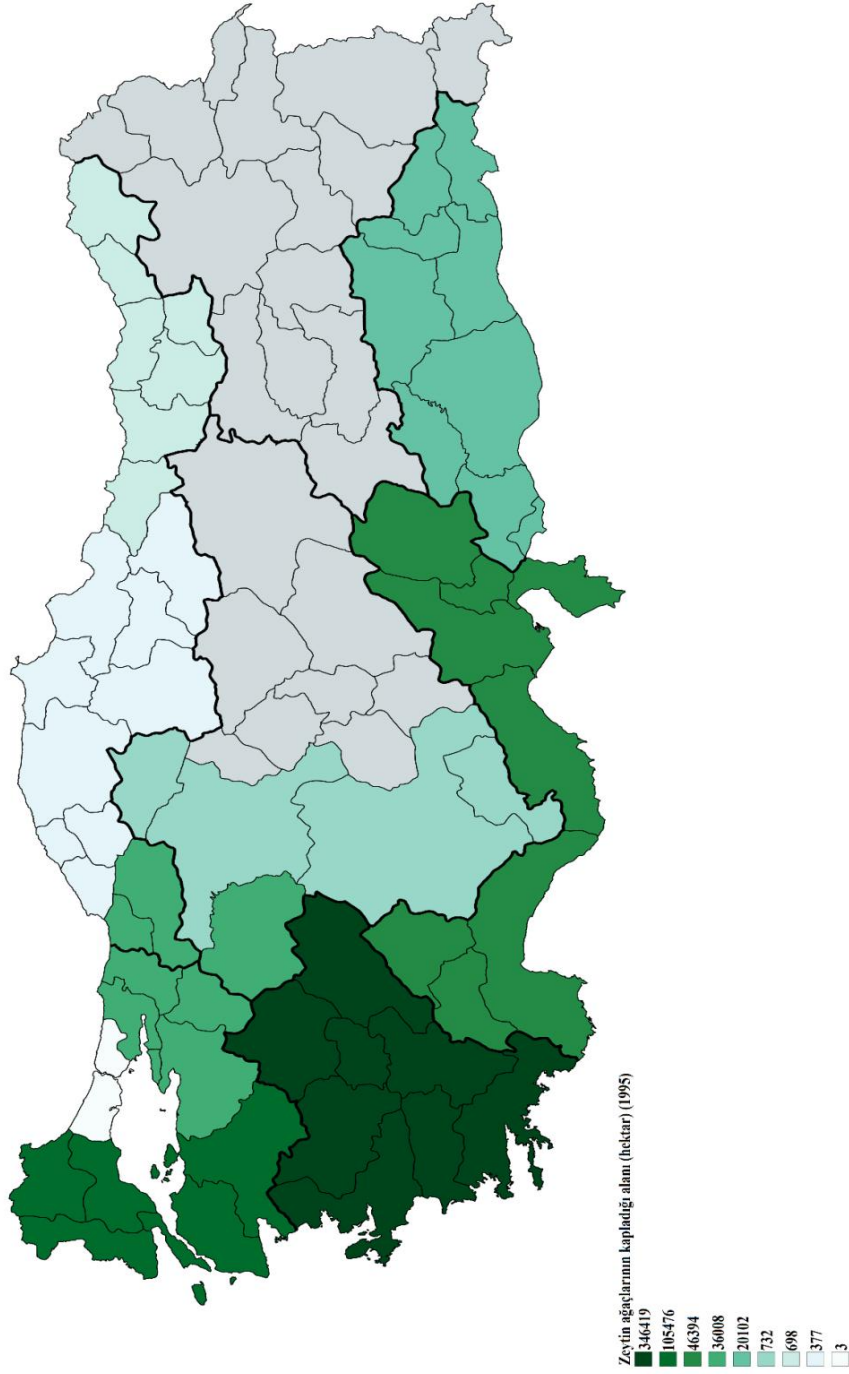
Zeytin ağacı 30 cins ve 180 türe sahip olan Oleaceae ailesine aittir. *Olea europaea* türü, sürekli olarak yetiştirildiği ve dünya çapında zeytin bahçeleri içinde hakim olanıdır. Pek çok bilim adamına göre, *Olea europaea*'nın gerçek bir tür olmadığını, ancak  $2x = 46$  kromozom genotipine sahip bir grup türün, melezizmden ve tropikal ve subtropikal Afro-Asya türlerinden, *Olea chrysoylla* ve *Olea excelsa* gibi genotiplerin mutasyonundan türediği bir grup tür olduğunu düşünmektedir. Zeytin ağacının tarihsel ömrü boyunca, yukarıda belirtildiği genotipler günümüzde en çok yetiştirilen tür olan *Olea europea*'yı oluşturmak için çeşitli iklim koşullarından geçmiştir. Akdeniz Havzası'nın bu sembolik ürünü, birçok grupta tahmin edilen çok geniş bir germplazma ve 2600'den fazla çeşidi korumuştur [207]. Son çalışmalar, aynı *Olea* türünün bitkileri içinde olan genotipik varyasyon ve çeşitliliği kanıtlamıştır [219, 220]. Akdeniz bölgesinde, ana zeytin alt türü arasında doğal *Olea europaea* Oleaster (yabani zeytin) ve ekili *Olea europaea* Sativa bulunmaktadır. Son yıllarda, zeytin bitkilerinin ekonomik ve besinsel önemi nedeniyle, DNA işaretleyicilerinin araştırılmasına uygulanmasına özellikle dikkat edilmiş ve genom analizinde önemli sonuçlar bildirilmiştir [207]. Zeytin ağacının karakterizasyonu şekil 2.21, 2.22 ve 2.23 ile gösterilmiştir.





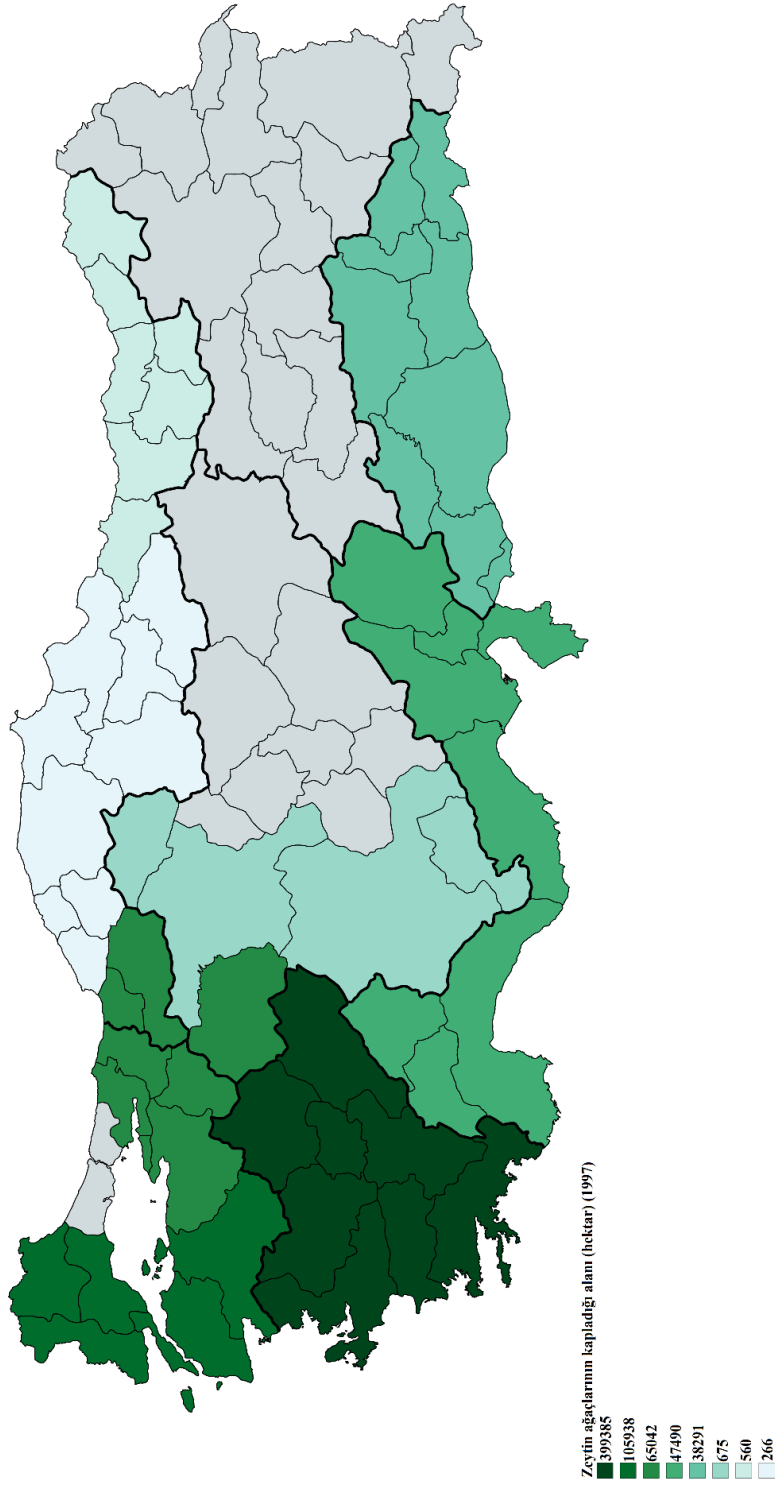
Şekil 2.11: 1996, 2003, 2004 ve 2005 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



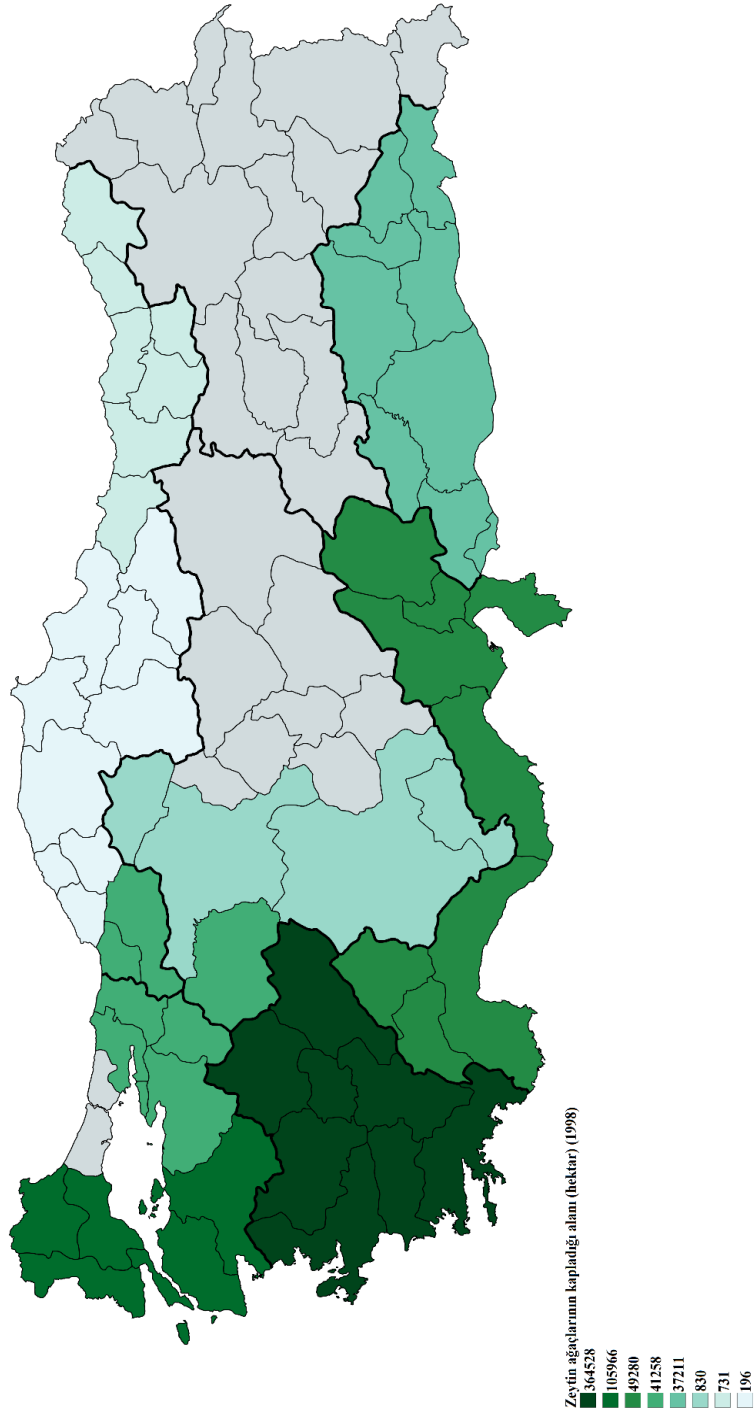
Şekil 2.12: 1995 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritnin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



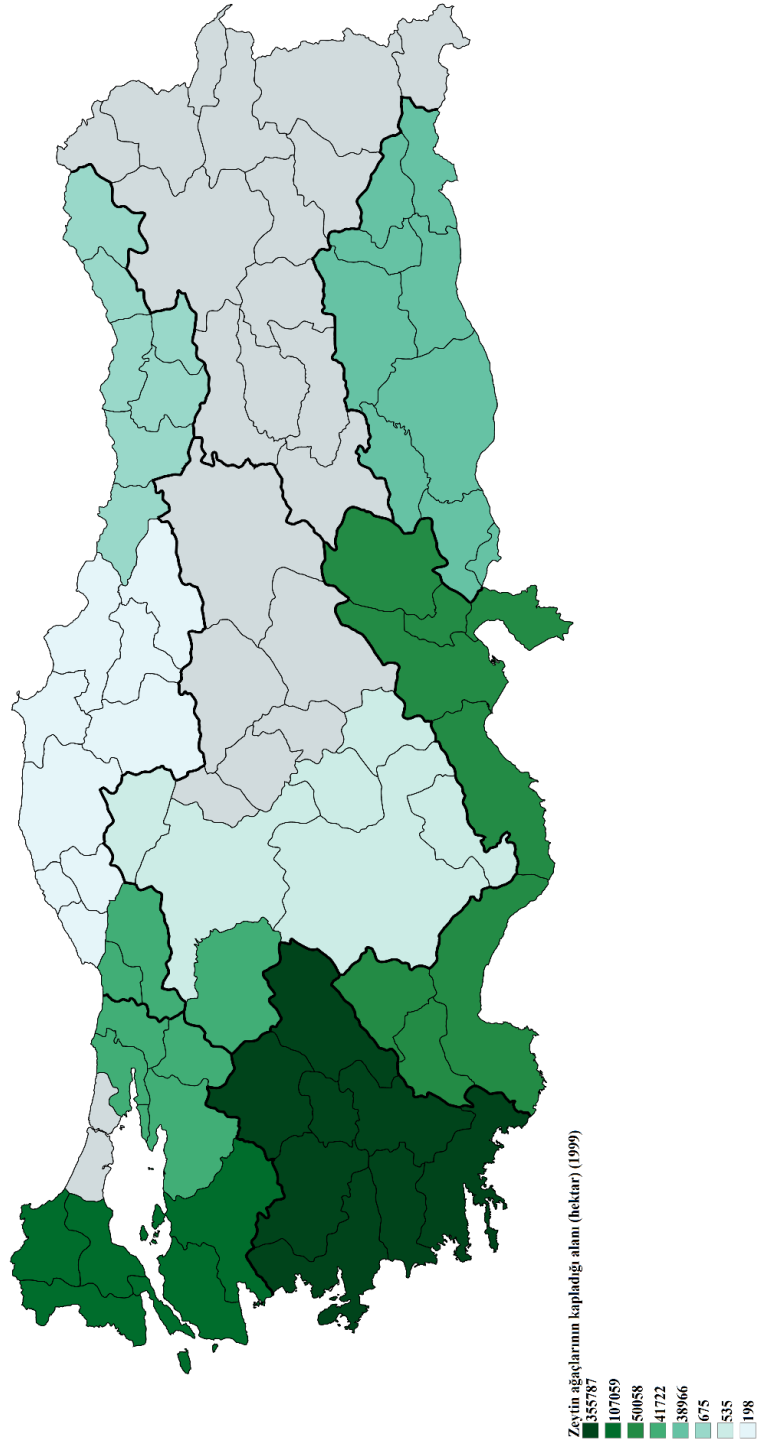
Şekil 2.13: 1997 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



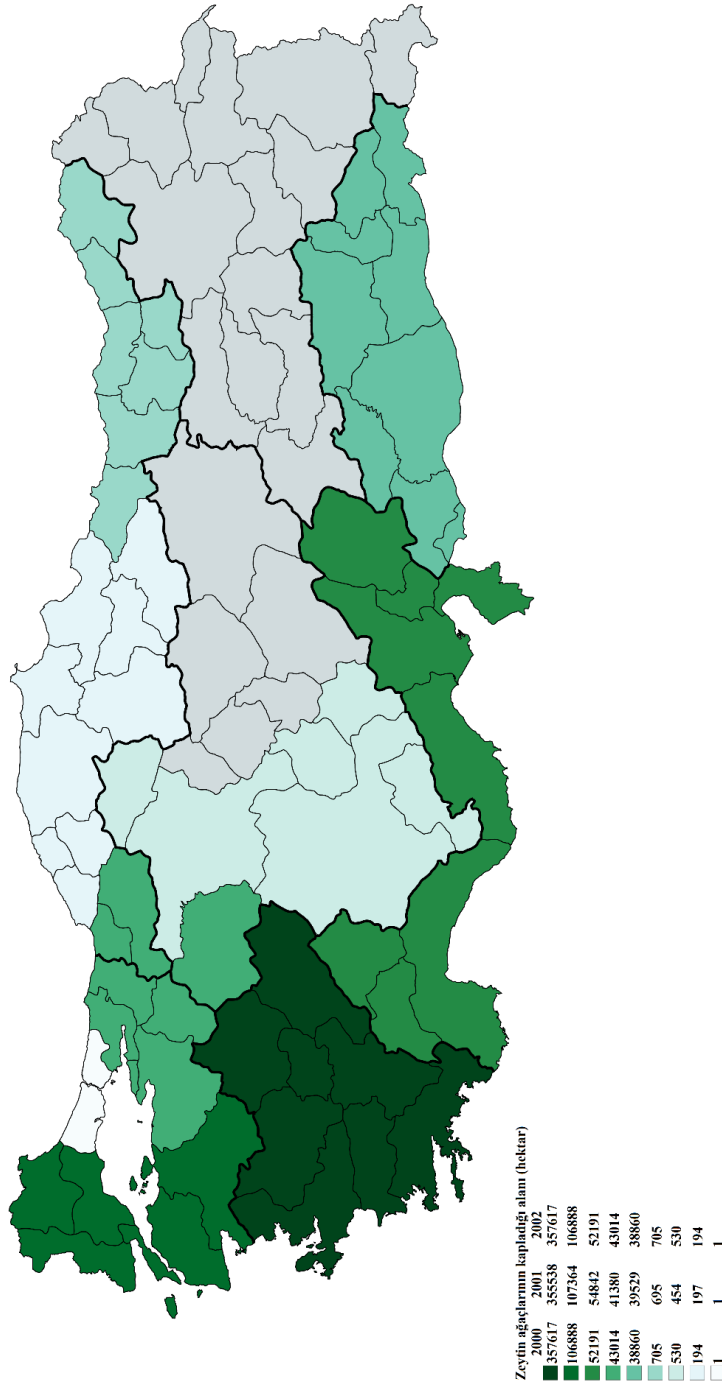
Şekil 2.14: 1998 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Haritnin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



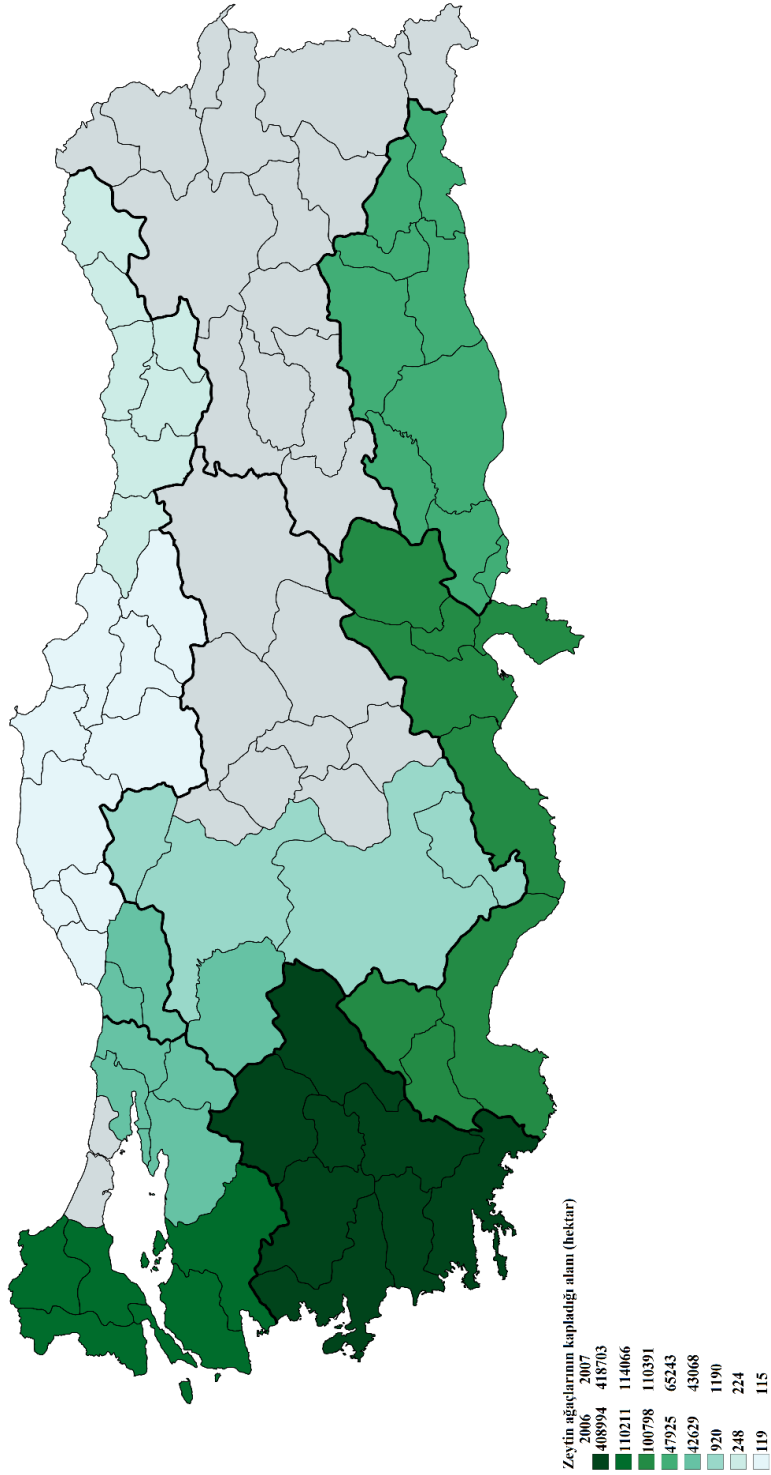
Şekil 2.15: 1999 yılında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



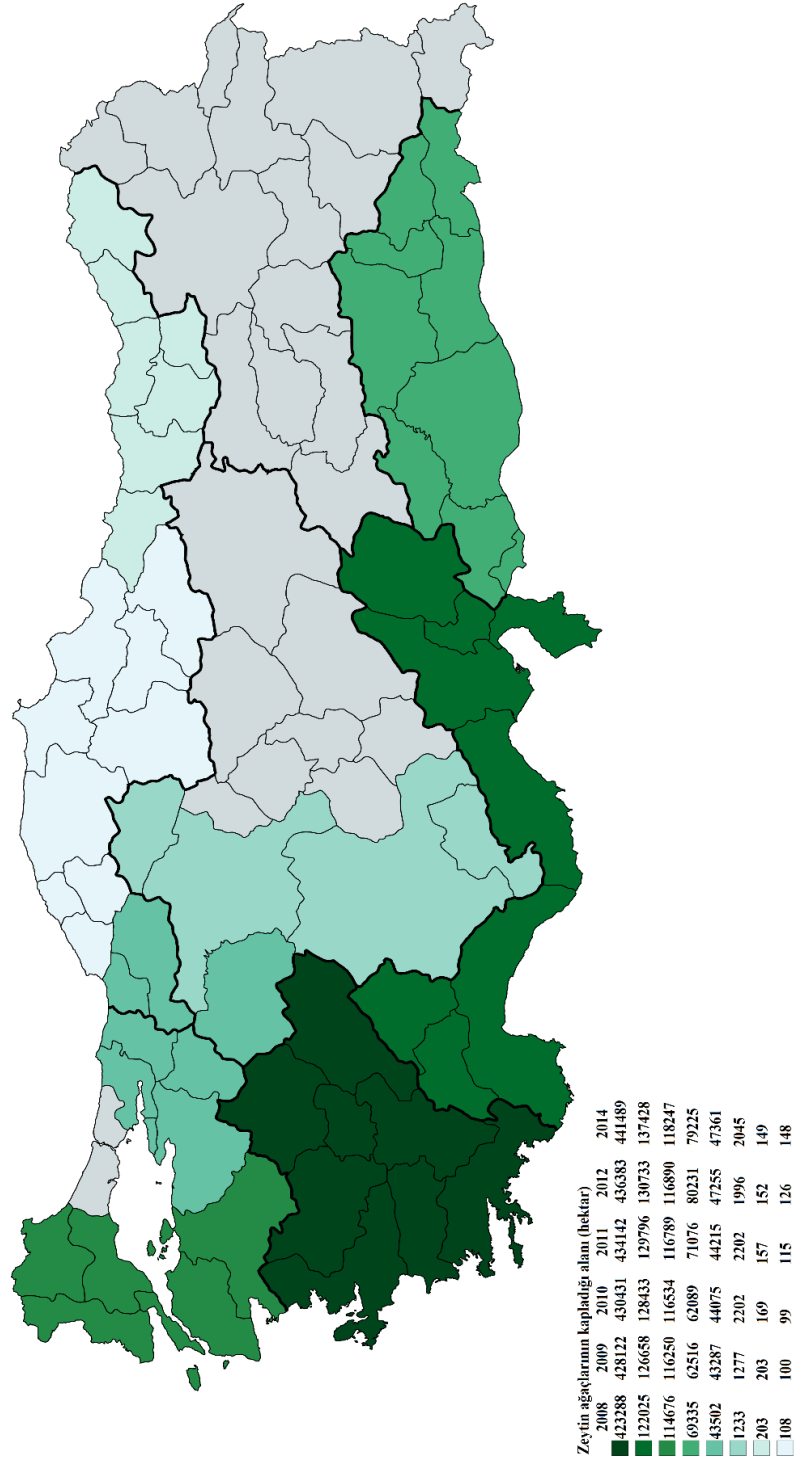
Şekil 2.16: 2000, 2001 ve 2002 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritnin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



Şekil 2.17: 2006 ve 2007 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

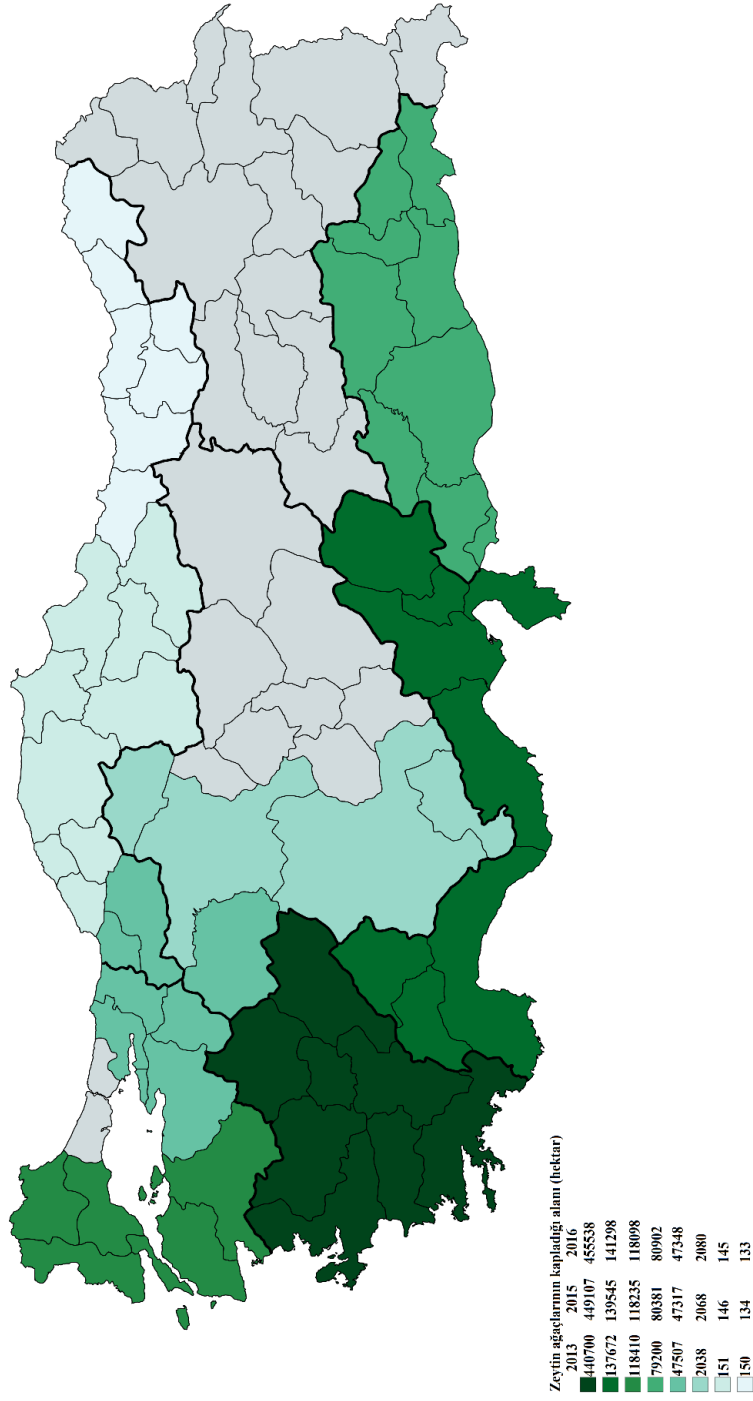
<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



**Şekil 2.18:** 2008, 2009, 2010, 2011, 2012 ve 2014 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

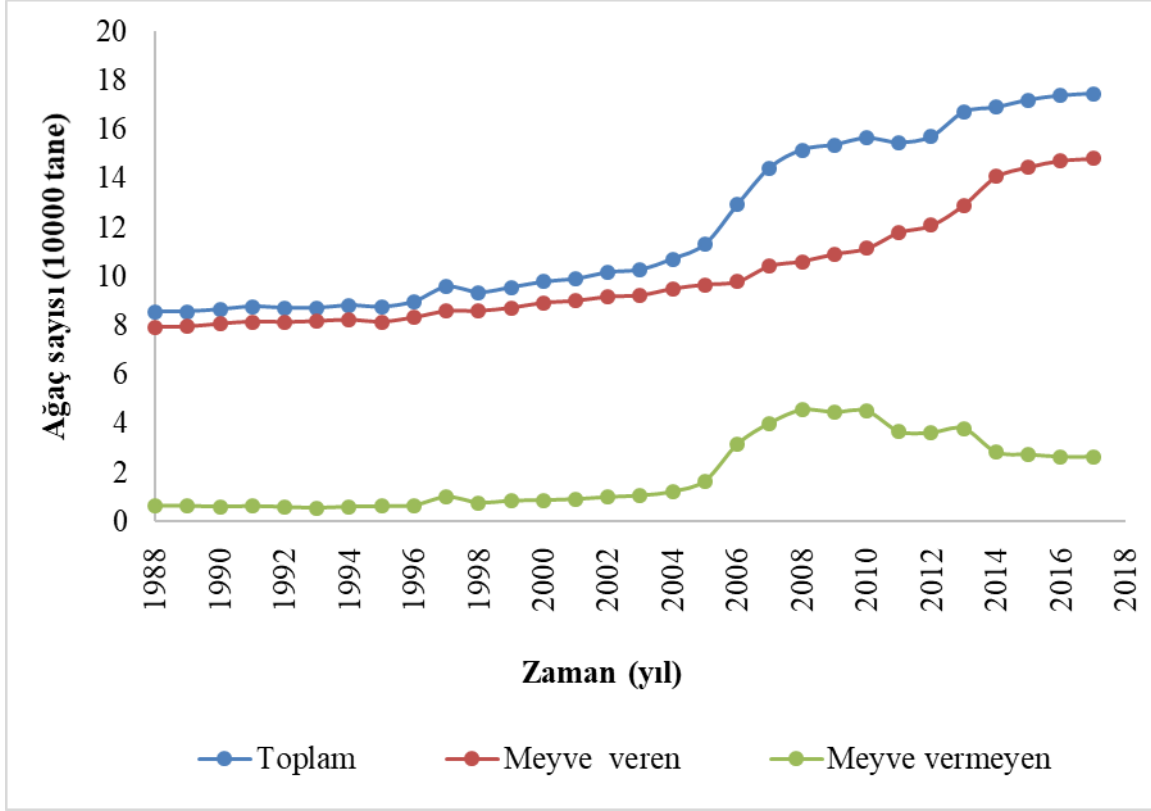
<sup>1</sup>Haritnin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].





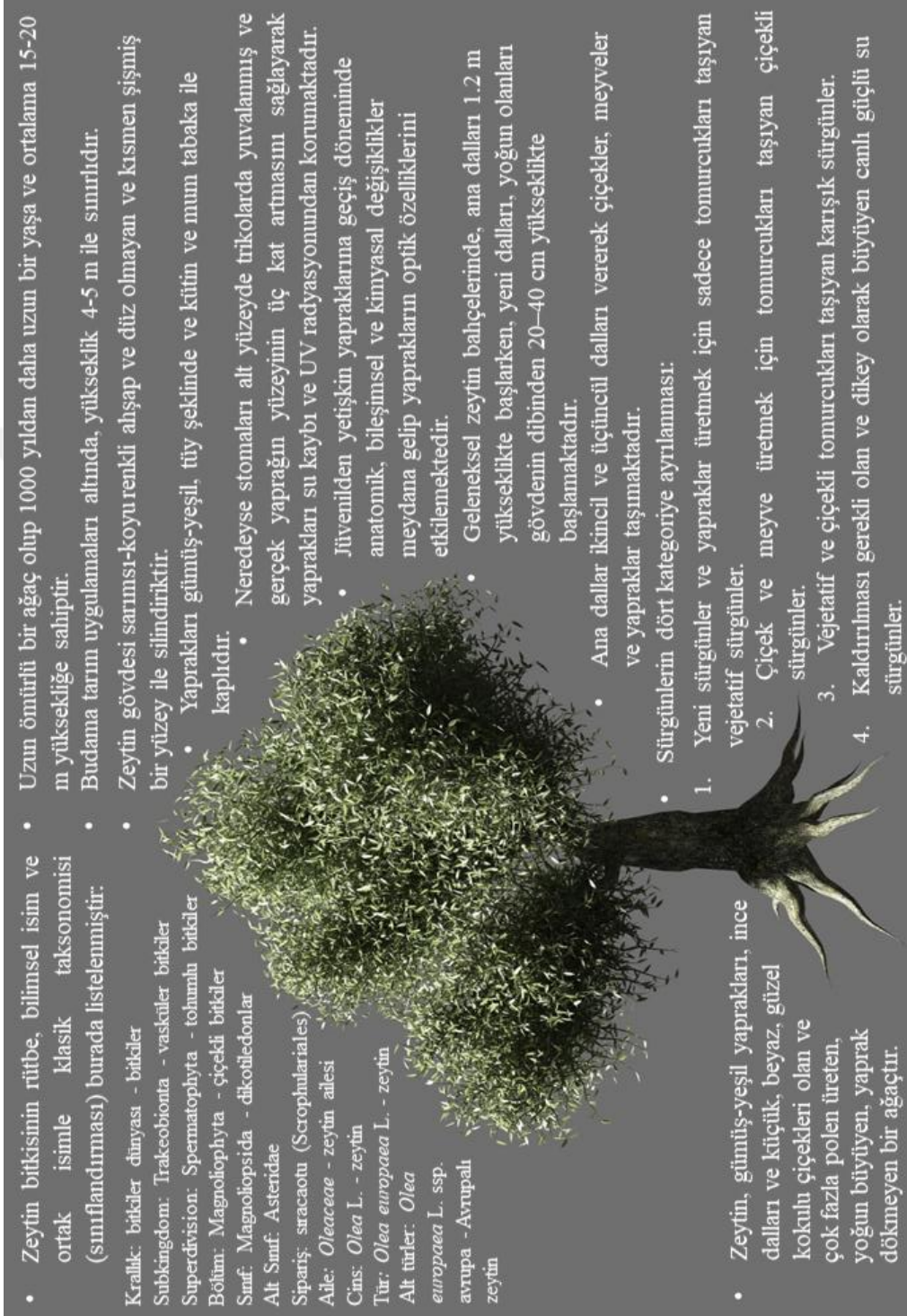
Şekil 2.19: 2013, 2015 ve 2016 yıllarında Türkiye'nin zeytin ağacı tarımı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [214, 217].



**Şekil 2.20:** 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'de bulunan meyve veren ve vermeyen zeytin ağaçlarının sayısı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri TÜİK'ten alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [218].



**Şekil 2.21:** Zeytin ağacının genel karakterizasyonu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [207, 221].



**Şekil 2.22:** Zeytin ağacının alt kısımlarının karakterizasyonu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [207, 222].

- Tomurcuklar bitkisel veya çiçekli olarak sınıflandırılıp sırasıyla sürgünler ve yapraklar veya çiçekler ve meyve üretmektedir.
- Vejetatif tomurcuklar küçük ve konik ama çiçekli olanlar daha büyük ve küreseldir.
- Latent tomurcuklar ağır budama ve donma hasarları durumlarda büyümektedir.
- Zeytin çiçeklenme, her yaprağın koltuğundan içinde çiçekli tomurcuklarından kaynaklanan ve 15-30 çiçek içeren bir salkundur.
- Çiçeklenme başına çiçek sayısını çeşidi, kış soğutması, gelişimi sırasında toprak nemi ve zeytin ağacının yapraklarının N içeriği ile değiştirmektedir.
- Küçük, kremalı beyaz zeytin çiçekleri kalın yapraklarla korunmaktadır.
- Zeytin çiçekleri, hermafrodit (Tam çiçek ) hem erkek hem dişiğe ve stamenleri olan (Bir eşeyli çiçek) sadece stamenlere ve ilkel pistile sahip olarak iki tip ile ayırt edilmektedir. Bir eşeyli çiçekler meyveyi ayarlamamaktadır.
- Zeytin meyvesi, üç ayrı anatomik parçaya ayrılabilirdiği küçük, orta veya büyük boyutlu küresel veya eliptik bir çekirdektir:
  1. Meyvenin dış kabuğu, çekirdeğin ağırlığının %1-3'ünü oluşturmaktadır.
  2. Mezokarp (posa veya et) tüm meyvenin %70-80'ini oluşturan ve yenilebilen kısımdır. Mesokarpın su içeriği %70-75 ve zeytinyağı içeriği yeşil sofralık zeytinlerde %14 ile %15 arasında ama siyah olgun zeytinlerde %30'den fazla olmaktadır.
  3. Endokarp (taş veya çukur) zeytinin ağırlığının %10-27'sini temsil edip tohumu içermektedir.
    - Her bir tohum, bir oğulcuk, iki çenekiler, bir kökçük ile bir plümüle içermekte ve tohum kabuğundan ve besidokundan oluşmaktadır.
    - Zeytin meyvesinin büyüklüğü ve şekli çeşidine, meyve yüküne, tarım uygulamalarına, toprak sularına ve toprak verimliliğine göre değişmektedir.
- Zeytinyağı işleme için küçük meyve boyutuna sahip olan zeytinler ve sofralık zeytin işleme için büyük meyve boyutuna sahip olan zeytinler kullanılmaktadır.
- Olgun meyveler esas olarak eflatun siyah ve bazı çeşitlerde yeşilimsi veya bakırlı kalıverengidir.



**Şekil 2.23:** Zeytin ağacının üs kısımlarının karakterizasyonu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [207, 223].

### **2.5.1.6. Ağacının büyümesini ve kompozisyonunu etkileyen faktörler**

Düzenli iklim koşullarında, zeytin meyvesinin büyüme ve olgunlaşma süreci yaklaşık 5 ay sürmektedir. Zeytin ağaçları, geleneksel "Akdeniz diyeti" nin ana bileşenleri olan sofralık zeytin ve zeytinyağı olmak üzere iki ana ürün üretmektedir. Dünya çapında tüketilen zeytin ve zeytinyağı tüketimi, en iyi beslenme ve sağlık üzerinde faydalı etkilere sahip fonksiyonel gıdaların bilinçlendirilmesi sayesinde önemli ölçüde artmıştır [224, 225]. Zeytin ve zeytinyağı bileşimi ve özellikleri bahçıvanlık, çevresel ve genetik faktörleri nedeniyle değişebilmektedir. En çok tanınan faktörler, beslenme (fertilizasyon), çeşitler, meyve olgunlaşma evresi (olgunluk indeksi), sulama ve zeytinyağı işleme teknikleridir. Budama ve yabancı ot, haşere ve hastalık yönetimi gibi diğer çiftçilik uygulamalarının zeytin ağaçlarının büyüme ve verimliliğini doğrudan etkilediğinden dolayı olarak fenolik bileşiklerin içeriği (zeytinyağı kalitesi) de etkilenmektedir [226, 227].

#### **a. İklim koşulları**

Zeytin, çeşitli iklim ve toprak koşullarında çoğunlukla 30 ila 45° kuzey ve güney enlemleri arasında olan ılıman ve subtropikal bölgelerde yetiştirilen çok yıllık bir subtropikal ağaçtır. Zeytin ağaçlarının ılıman kışlara (en düşük 4°C), ılık, kuru yazlara (en fazla 40°C) ve yıllık ortalama 15-20°C sıcaklığa ihtiyacı vardır. Zeytinlerin geç çiçeklenmesinden dolayı ilkbahar donları zeytin kültüründe belirleyici faktörler değildir. Ancak, hasattan önce olan don, zeytin meyvesinin büzülmesine ve hatta bu ağacın nekrozuna neden olabilmektedir. Don tehlikesi, geç budama, soğuğa dayanıklı çeşitlerin kullanımı ve sulama ve gübrelemede azalması gibi belirli tarım uygulamaları ile azaltılabilmektedir. Zeytin ağaçlarına püskürtülmüş bakır içeren kimyasallar ve kalsiyum soğuğa dayanmalarını arttırmaktadır. Zeytin ağaçlarının soğuğa alışmaları kriyoprotektan protein geçişim ile ilgilidir [228, 229]. Dona karşı en dayanıklı çeşitlerin bazıları "Arbequina", "Picual", "Carolea", "Chemlali", "Corticabra", "Leccino", "Mission", "Moraiolo" ve "Picholine"dır [230]. Zeytin ağaçları rüzgara dayanmasına rağmen zeytin yetiştiriciliği için güçlü rüzgarlardan etkilenen alanlardan kaçınmak gerekmektedir. İlkbaharda soğuk, nemli ve sıcak rüzgarlar çiçek açmasına ve büyümenin azalmasına neden olurken, yaz aylarında yüksek sıcaklıklar ve sıcak rüzgarlar meyve düşmesine neden olabilmektedir [231]. Akdeniz ülkelerinde, don riski ve daha kısa vejetatif dönemler nedeniyle,

800 m'den daha yüksek olan alanlar zeytin yetiştiriciliğine uygun değildir. Tropik bölgelerde, çiçeklenme ve tomurcuğun farklılaşması için gerekli olan düşük sıcaklıkların eksikliğinin (0-7°C) olmaması nedeniyle zeytin yetiştirilmemektedir. Bazı zeytin çeşitleri, tozlaşma altında düşük sıcaklıklar için ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli yükseklikte ekili yetiştirildikleri takdirde, tropikal koşullarda bile meyve üretebilmektedir. Dolu ve yüksek bağıl nem, zeytinyağının fonksiyonel bileşiklerinin azaltılması gibi zeytinyağı kalitesinde olan kusurlardan, hastalık problemlerinden ve meyve hasarından sorumludurlar [207, 232, 233].

#### b. Toprak koşulları

Fakir, kuru, kalkerli ve taşlı topraklarda bile zeytin ağaçları yetişebilmektedir. Özellikle kök sistemi yoğun olduğundan dolayı su stresine çok toleranslıdır. K'yi hareketsiz kılan yüksek nem içeriğine sahip killi topraklar zeytin için uygun değildir. Zeytin ağaçlarının yıllık rulmanı için en uygun topraklar, K, N ve su ile yeterince desteklenmiş, derin ve kumlu topraklardır. Zeytin ağaçları, 1 g/L'den daha az sodyum klorür (NaCl) içeren ve orta asidik ve alkali topraklarda daha iyi yetişmektedirler. PH'ı 8.5'ten yüksek olan alkali topraklar zeytin büyümesi için uygun değildir. Yüksek bor içeriği olan topraklar, zeytin ağaçlarının toksisite problemlerini azaltmaktadır [207].

#### c. Genetik faktörler

Zeytinin türü, olgunlaşma aşaması ve hasat zamanı sızma zeytinyağının acılık derecesinin yoğunluğu ve toplam fenolikiçeriği üzerinde önemli etkilere sahiptir. Birçok çalışma zeytin ağacı ve zeytin meyvesinin bazı özelliklerinin genetik olarak kontrol edildiğini göstermiştir. 2007 yılında Vossen tarafından yapılan bir çalışmada yağ içeriği, soğuk, sertlik, meyve boyutu, polifenol içeriği ve tozlanma uyumluluğu gibi birincil zeytin çeşitlerinin özelliklerine ait değişiklikler gösterilmiştir [207].

#### ç. Beslenme (gübreleme)

Makro besinlerin zeytin ağacının büyümesi, zeytin meyvesi ve zeytinyağı üzerinde olan etkisini gösteren çeşitli çalışmalar yapılmış ve yayınlanmıştır. Zeytin ağacında biriken makro besinlere (K, N ve diğer mineraller) ağaç beslenme durumu, çevresel koşullar, gübre bileşimi, su mevcudiyeti, toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri, uygulama yöntemleri ve zamanlama gibi çeşitli

faktörlerin etkisi vardır. Bu nedenle, ağacın beslenme durumunun değerlendirilmesi, besinlerin uygulama doz oranlarından daha önemlidir [234]. Son çalışmalar zeytin ağacı, meyve ve yapraklarda K ve N düzeylerini etkileyen faktörlere dayanarak bitki beslenmesi ve yağ kalitesi arasında olan etkileşimle ilgilenmektedir. Zeytinyağı kalitesi, duyuşal değerlendirme, besin değeri, sağlık faydaları ve yağ dengesini etkileyen parametrelerin karmaşık bir kombinasyonudur. Araştırmacılar [235], uzun süreli N denemesinde, yüksek N gübrelemenin zeytinyağında olan polifenol içeriğini azalttığından dolayı yağ stabilitesini azalttığını bildirmiştir. Geçenlerde, diğer araştırma grubu [236] zeytin ağaçlarının ana besinler (K ve N) ile zeytinyağı kalite parametreleri arasında olan etkileşimi incelemiştir. Yeni çalışmalarda, zeytin ağaçlarının N seviyesinin, çoklu doymamış yağ asitleri, oleik, polifenol içeriğı ve serbest yağ asitleri esas olarak zeytinyağı kalitesinin bileşenleri üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yaprakların artan N seviyesi, zeytinyağı fenolik içeriğinin doğrusal olarak azalmasıyla yapraklardaki protein-fenol rekabetini göstermiştir. 2013 yılında Erel ve arkadaşları [236] tarafından meyvede artan N seviyesi, zeytinyağı çoklu doymamış yağ asitlerini, linolenik ( $\omega 3$ ) ve linoleik ( $\omega 6$ ) asitleri artırmakta ama oleik asidi azaltmaktadır. Zeytin ağacının N seviyesinin, zeytinyağı bileşenleri üzerindeki etkisi gösterilmiştir [207, 236].

Yüksek yükü olan meyve, meyvenin ve yaprağın nitrojen konsantrasyonunu azaltmaktadır. Meyvenin nitrojen içeriğı, irrigasyon solüsyonunda, K mevcudiyetinde ve meyve yükünde nitrojen konsantrasyonundan etkilenmektedir. Artan bir K seviyesi, nitrojen birikimini artırdığından dolayı olarak zeytinyağı kalitesini etkilenmektedir. Zeytin ağaçlarının dengeli olan nitrojen gübrelemesi, zeytinyağının iyi kalitede olmasını sağlamaktadır [207, 236].

### 2.5.2. Meyvesi

Zeytin ağacının büyük ya da küçük fenotipik ve genetik farklılıklar sergileyen birçok çeşidi vardır. Günümüzde, zeytin yetiştirici ülkelerde zeytinin boyutu, rengi, yağ içeriğı, yağ asidi bileşimi ve diğer özelliklerde bulunan farklılıkların çoğu kaydedilmiştir [237]. 1996 yılında en önemli çeşitleri Fontanazza tarafından tartışılmıştır. Aynı zeytin çeşitleri sofralık zeytinler ve yağ üretimi için kullanılabilir. Ancak genellikle zeytin üretimi için zeytinin posasının çekirğine oranına (7:1-10:1) sahip olmalıdır. Ama zeytin üretimi için zeytinler aynı oranda olabilmekte ya da daha düşük bir orana (4:1-7:1) da sahip olmaktadır. Araştırmacılar [237]



tarafından vurgulandığı gibi, zeytin çeşitlerini tanımlama ve sınıflandırma görevi çok karmaşıktır.

Zeytin meyvesi ya da zeytin, etli ve tek çekirdekli bir meyve, eksokarp (dış kabuk), mezokarp (orta kabuk) ve endokarp (iç kabuk) olmak üzere ana bölümlerden oluşmaktadır. Bazı çeşitler 20 g ağırlığında olmasına rağmen diğerler 2-12 g ağırlığındadır. Epikarpand (meyvenin kabuğu) ve mezokarp (meyvenin posası), toplam ağırlığın yaklaşık %65-83'ünü oluşturan perikarpın iki kısmıdır. *Olea europea*'nın meyvesi oval şekilli, etli ve tek çekirdekli bir meyvedir. Perikarpdan ve endokarpdan (çekirdek) oluşmaktadır. Perikarp toplam yağ içeriğinin %96-98'ini içermekte ve yağın kalan oranı %2-4'ü endokarpte bulunmaktadır [207]. Çukur veya çekirdek olarak da adlandırılan endokarp, meyve ağırlığının %3'ünü temsil edip tohum içermektedir. Endokarp (çekirdek) %13 ila %30 arasında değişebilmektedir. Epikarp balmumu ile kaplı ve meyve olgunlaştıkça açık yeşilden siyaha dönüşmektedir [207, 237].

### **2.5.2.1. Bileşenleri**

Zeytin meyvesi su (%50), protein (%1.6), yağ (%22), karbonhidrat (%19.1), selüloz (%5.8), inorganik maddeler (%1.5) ve fenolik bileşikler (%1-3) içermektedir. Ayrıca, zeytin meyvesinde organik asitler, pektin ve pigmentler gibi bazı diğer önemli bileşikler de bulunmaktadır.

#### **a. Su**

Su "sebze suyu", zeytin meyvesinin ağırlığının yaklaşık %70'ini oluşturmasından ana bileşenlerinden biridir. Su, meyvenin diğer suda çözünebilen bileşenleri, oleuropein, organik asitler ve tanenler için bir çözücü olarak hizmet etmektedir. Meyvelerin içinde bulunan su miktarı, çeşidine, olgunluk aşamasına, iklim, toprak nemi ve sulama gibi diğer faktörlere bağlıdır [207, 237].

#### **b. Şeker**

Fruktoz ve glikoz meyve posası ana şekerleridir. Belirli çeşitlerde de galaktoz, izomaltoz, maltoz, mannoz ve sükroz bulunmuştur [238]. Glikoz ve küçük miktarlarda fruktoz meyvenin çekirdeğinde bulunmaktadır. Zeytin meyvesinin şeker içeriğinin azalması, olgunlaşarak yağ içeriğinin artmasıyla ilişkilidir [207, 237].

### c. Protein

Orta kabuğu olan zeytin meyvesi, çeşidi ve olgunlaşma aşamasına bağlı olarak %1.5 ile 3 oranında protein içermektedir. Diğer bitki proteinlerinde bulunabilen bütün amino asitleri, tek başına zeytin meyvesinde bulunmaktadır [239]. Protein içeriği nispeten düşük olmasına rağmen besin değeri yüksektir. Serbest nitrojen içeriği önemli ölçüde değişmekte ve toplam nitrojenin %1'inden azını oluşturmaktadır. Zeytin taşı ucuz bir protein kaynağı olarak önerilmiştir. Aslında, zeytin tohumu proteinleri, antioksidan ve antihipertansif özellikler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyoaktiviteleri gösterebilen biyoaktif peptitler gibi değerli maddelerin üretimine ilgi duyabilmektedir [240]. Zeytin çekirdeği protein izolatının enzimatik hidrolizatları beş farklı proteazla işlem edilerek hazırlanmış ve bütün hidrolizatlar antioksidan özellikler ve antihipertansif kapasite göstermiştir. Buna ek olarak, bu fraksiyonlar, laboratuvarında canlı gastrointestinalde sindirime maruz kaldıktan sonra biyoaktivitelerini korumuştur. Bu, zeytin tohumu proteinlerinin ucuz ve değerli bir antioksidan ve antihipertansif peptitler kaynağı oluşturduğunu göstermektedir. Genellikle aspartik ve glutamik asitler çeşitli zeytin çeşitlerinin meyvesinde bulunan ana amino asitler olup bunu lösin ve valin takip etmektedir [241]. Arginin ve fenilalanin, yüksek oranlarda bazı çeşitlerde de bulunabilmektedir [238]. Üç Yunan zeytin çeşidinin amino asit bileşimi gösterilmektedir [207, 239].

### d. Fenolik bileşikler

Zeytin meyvesinin önemli bileşenleri fenollerin glikozitleri, organik asitler, pektinler ve pigmentlerdir. Bileşenlerin bazıları veya hidroliz ürünleri, işlem sırasında yağ ile sıkılan ve santrifüjlüme ile ayrılan atık suyunda bulunmaktadır.

### e. Yağ

Meyve ağırlığı, Ekim ayına veya Kasım ayı ortasına kadar çeşitli aşamalarda artmaktadır. Daha sonra, temel olarak nem kaybıyla azalmaya başlamaktadır. Sonuç olarak, genellikle Ekim-Aralık ayları arasında yağ içeriğinde bir artış gözlemlenmiştir. Yağ birikimi, Temmuz ayı sonundan Ağustos'un başına kadar olan dönemde başlamaktadır. Sonbahar ve kış boyunca meyve siyahlaşıp yağ içeriği maksimum seviyesine ulaşmaktadır. Yağ esas olarak %96-98'e kadar perikarpta yoğunlaşmaktadır. Birçok lipid sınıfının zengin bir hazinesi olan çekirdekte yağın

oluşumu ve konsantrasyonu, muhtemelen yağın eşsiz bir lezzet ve kokuya sahip olmasının sebebidir [207].

#### f. Yağ asitleri

Bilindiği gibi, zeytinyağı ve sofralık zeytinler, Akdeniz diyetinin önemli bileşenleri ve zeytinyağı üretmeyen birçok ülkede daha popüler hale gelmektedir. Akdeniz diyetinin ortak bileşenlerinden biri yağ asitleridir. Özellikle, sağlık faydaları sahip olan ve insan beslenmesi için önemli olan tekli doymamış yağ asitlerinin yüksek seviyeleri, Akdeniz diyetinin ana bileşenleri arasında ve sofralık zeytinlerin besin değerinde önemli bir rol oynamaktadır [242-244]. Sofralık zeytinlerden olan ana yağ asitleri linoleik, oleik, palmitik, palmitoleik ve stearik asitlerdir [245, 246]. Sofralık zeytinler çoğunlukla tekli doymamış yağ asitlerinden oluştuğu için, sofralık zeytinlerin tüketimi kardiyovasküler hastalıklar riskini önleyebilip azaltabilmekte, kolesterol seviyelerini düzenleyebilmekte, düşük-dansiteli lipoprotein-kolesterol reseptör mRNA'nın transkripsiyonunu uyarmakta ve meme kanseri risklerini azaltabilmektedir [245, 247-249].

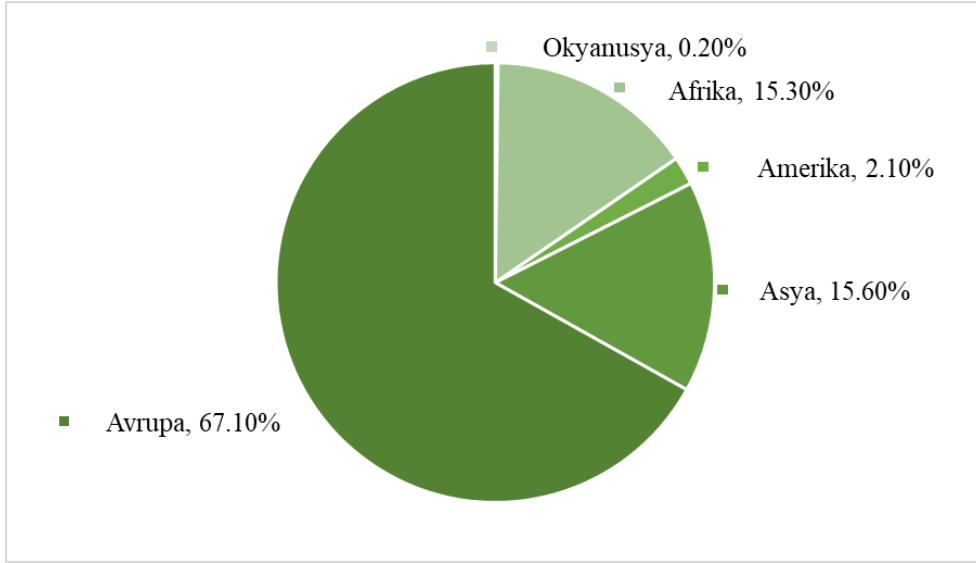
#### g. Mineral maddeler

Sofralık zeytinlerin diğer önemli bileşenleri mineral maddelerdir. Mineraller vücutta önemli işlevlere sahip ve sağlıklı desteklenme ve yaşam için önemlilerdir. Sofralık zeytinlerde bulunan mineral maddeler besinsel ve toksikolojik açıdan önemlidir. Sofralık zeytinlerin mineral içeriği, ambalaj malzemesi, fitokimyasal ürün kontaminasyonu, çeşidinin farklılaşması, çevre kirliliği, hava koşulları, işleme yöntemi, kullanılan kimyasallar, olgunlaşma ve yer gibi çeşitli parametrelere bağlıdır [250-254]. Potasyum, zeytin meyvesinde en fazla bulunan element, bunu kalsiyum, magnezyum ve sodyum izlemektedir [255, 256]. Osmotik basınç ve vücut sıvılarının asit / baz dengesi için K, Na ve Mg gereklidir. Vücutta birçok enzim Mg varlığına bağlıdır. Ca özellikle sağlıklı kemiklerin ve dişlerin büyümesinde ve korunmasında etkilidir. Ek olarak Ca hücre membranı yoluyla kalp atışı kontrolü, kan pıhtılaşması ve sinir iletimi için gereklidir. Demir, oksitlenme / indirgeme süreçlerini düzenleyen birçok enzim sisteminin bir bileşenidir [254]. Diyet alımı, vücut için minerallerin ana tedarikçisi olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle tüketilen gıda ürünlerinde bu elementlerin seviyeleri araştırılmalıdır. Bu nedenle, esas yağ

asitlerinin ve mineral maddelerin vücuda olan katkısının beslenme gerekli olduklarından dolayı sofralık zeytin tüketimi önemlidir [249, 254, 256].

### ***2.5.2.2. Türk tipi zeytin meyvesi***

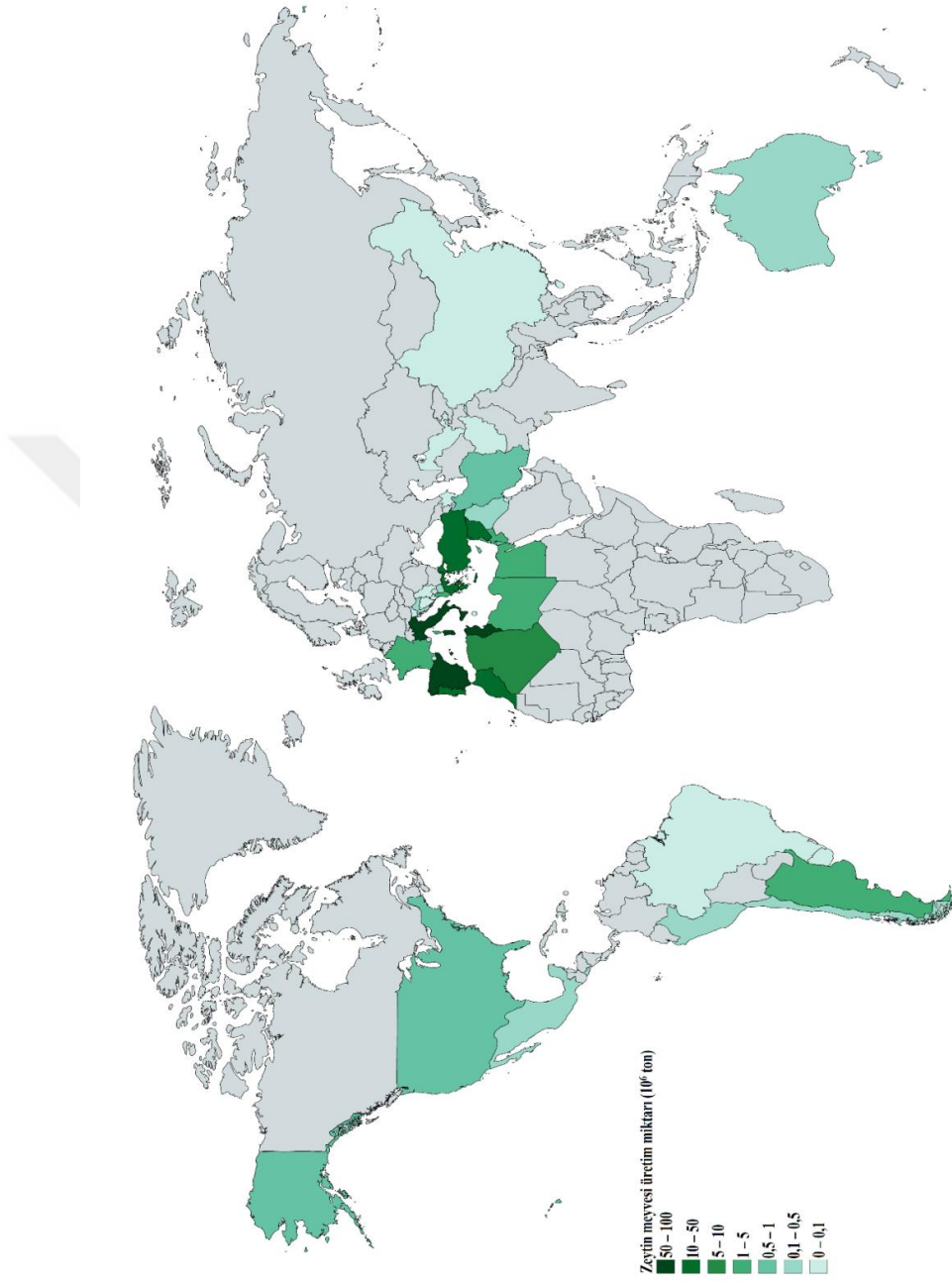
Türkiye’de bronz çağına ait olan Uluburun batığında zeytinin kalıntıları bulunmuştur. Türkiye, bir Akdeniz ülkesi olarak büyük bir zeytin üreticisidir. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi verilerine göre, dünya sofralık zeytin üretimi 2011-2012 sezonunda yaklaşık 2,526,000 tondur. Dünya’nın sofralık zeytinlerin üretimi yaklaşık %28.5’i Fransa, Portekiz, İspanya, İtalya, Slovenya ve Yunanistan gibi AB ülkelerine aittir. Ayrıca, Mısır ve Türkiye dünyanın sofralık zeytin üretiminin sırasıyla %19.8 ve %15.8’ine sahiptirler. Milet Thales meteoroloji çalışmalarına göre gelecek yılın zeytin verimini tahmin etmiştir [249]. Bölgelere göre zeytin üretimi şekil 2.24’te gösterilmiştir [213]. Şekil 2.25 ve 2.26’de dünya çapında zeytin meyvesi üretimi miktarı ( $10^6$  ton) gösterilmiştir. Şekil 2.27 ve 2.28’de dünya çapında zeytin meyvesi verimi ( $10^6$  hg/ha) gösterilmiştir. Sırayla şekil 2.29, 2.30 ve 2.31’de dünya çapında zeytin meyvesi ihracatı, ithalatı ve tüketimi ( $10^3$  ton) gösterilmiştir.



Şekil 2.24: Bölgelere göre zeytin üretimi<sup>1</sup>

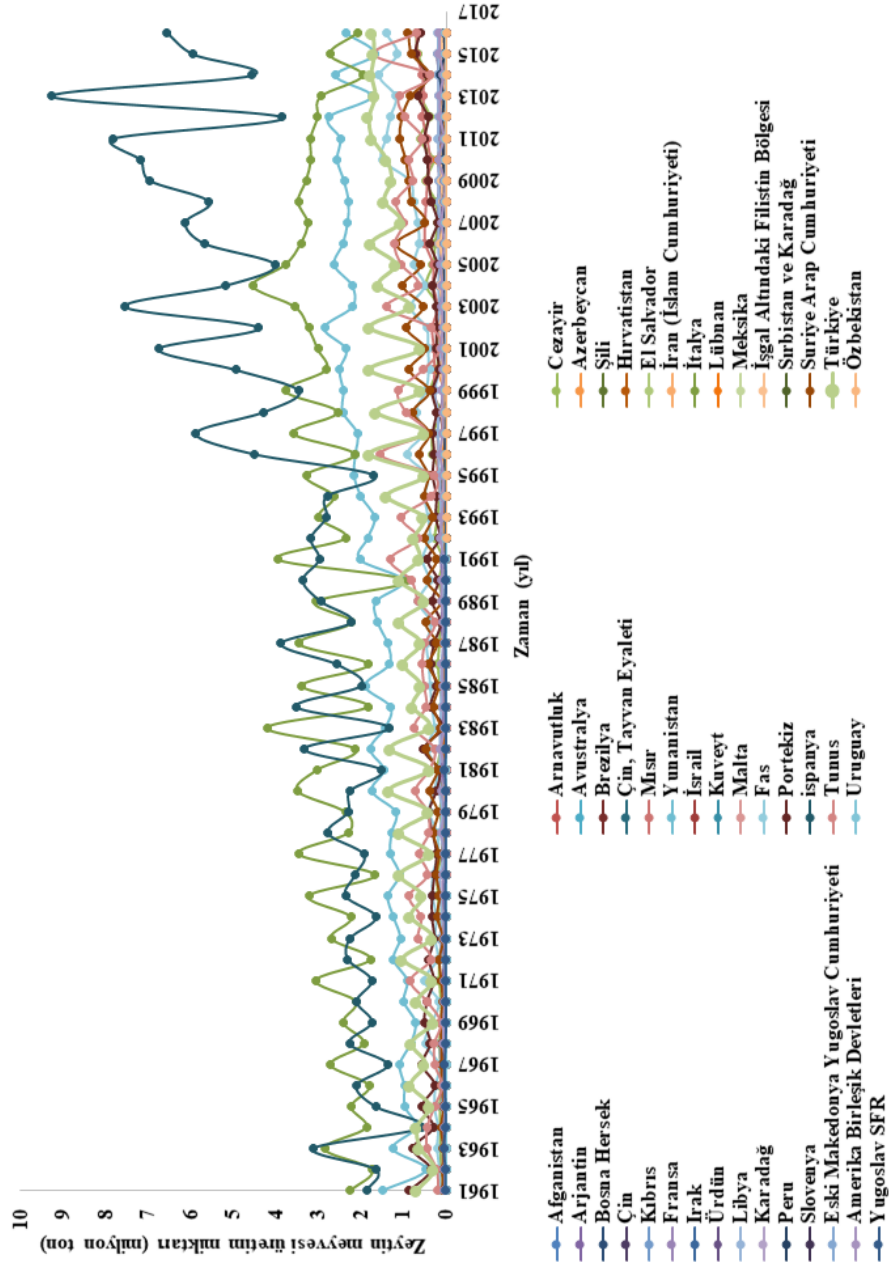
---

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri FAOTSAT'ten alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [213].



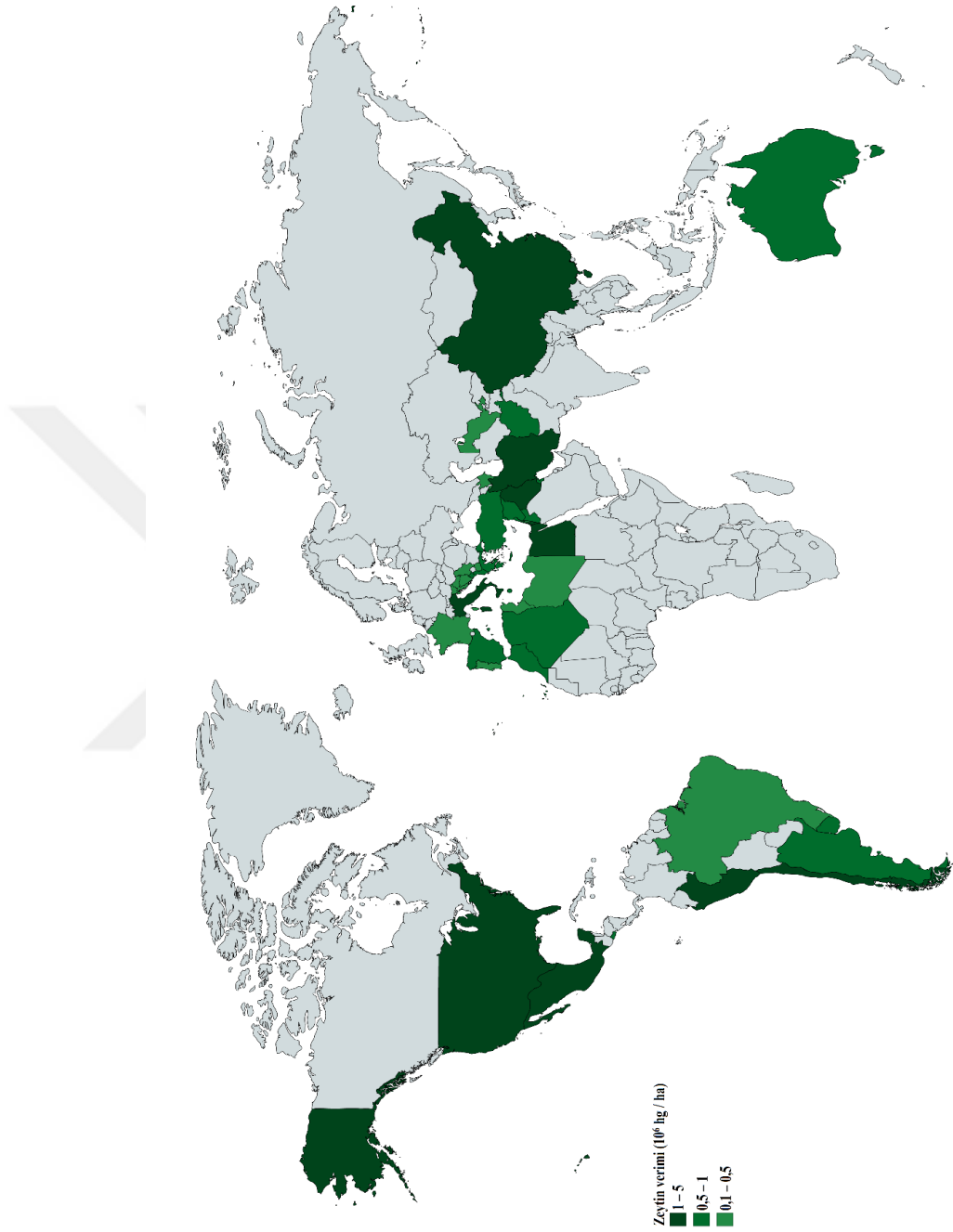
Şekil 2.25: Dünya çapında zeytin meyvesi üretim miktarı (10<sup>6</sup> ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Haritin tasarlama verileri FAOTSAT'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [213, 214].



Şekil 2.26: Dünya çapında zeytin meyvesi üretim miktarı<sup>1</sup>

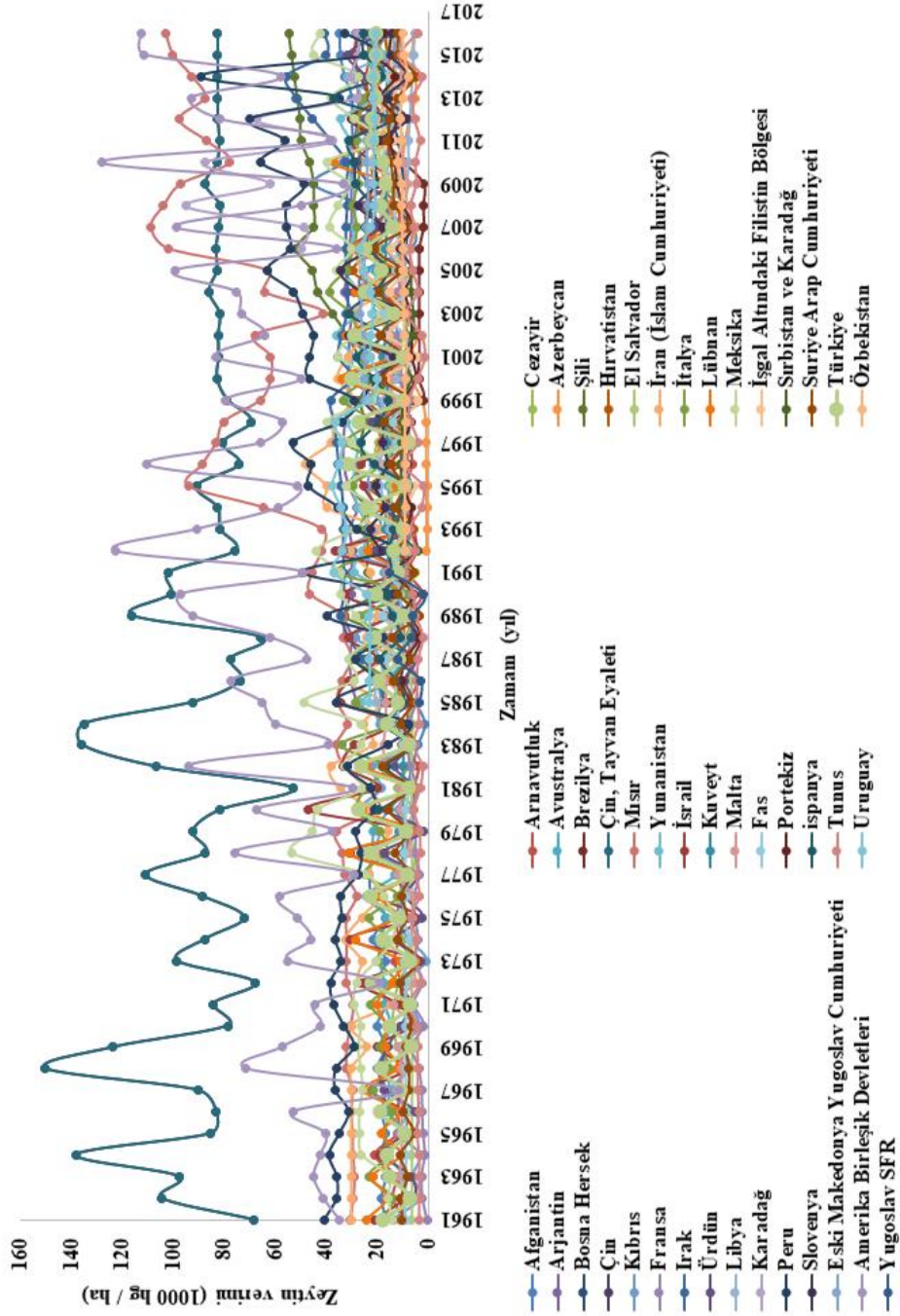
<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri FAOSTAT'ten alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [213].



Şekil 2.27: Dünya çapında zeytin meyvesi verimi (10<sup>6</sup> hg/ha)<sup>1</sup>

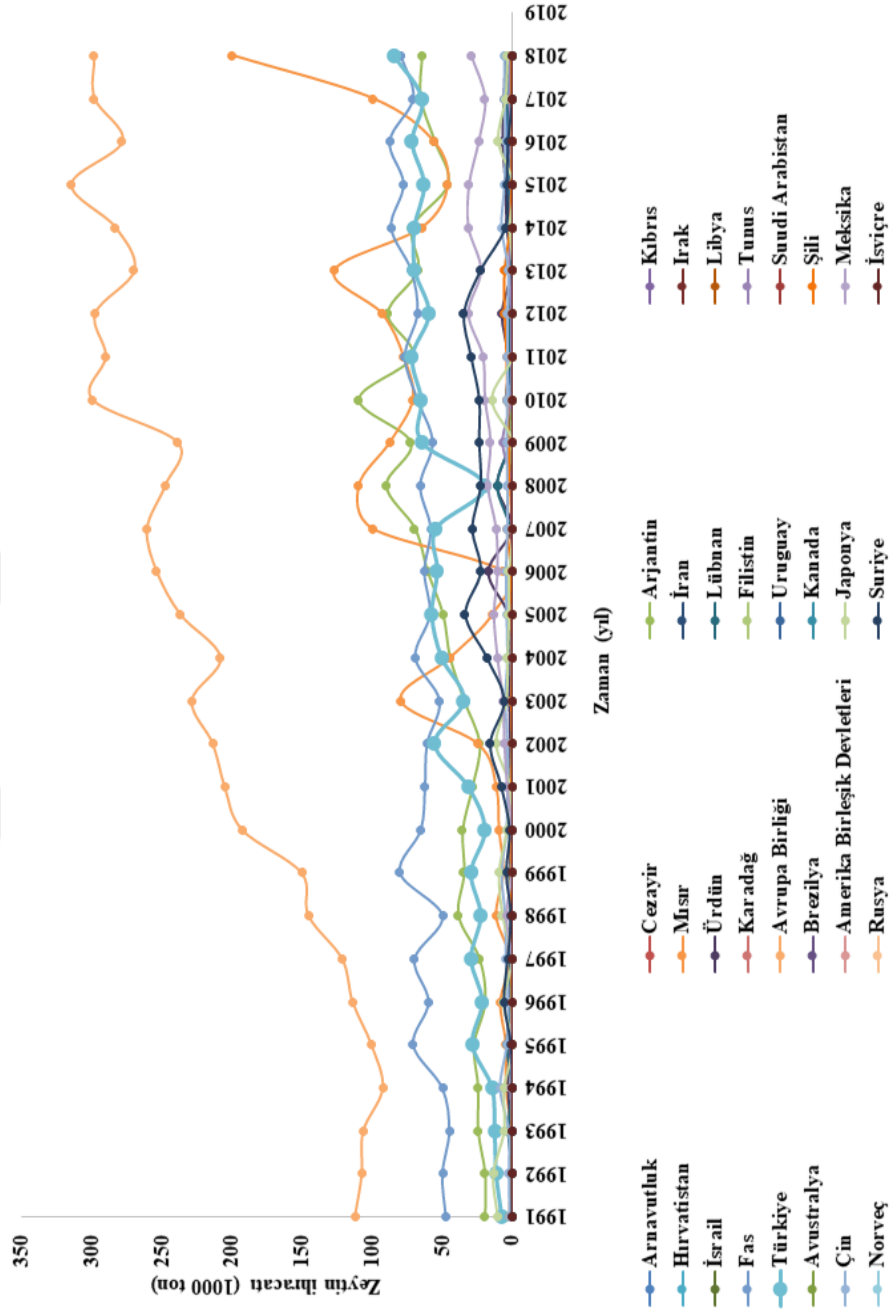
<sup>1</sup>Haritnin tasarlama verileri FAOSTAT'ten alınmış ve mapchart.net sitesi kullanılarak hariti kurulmuştur [213, 214].





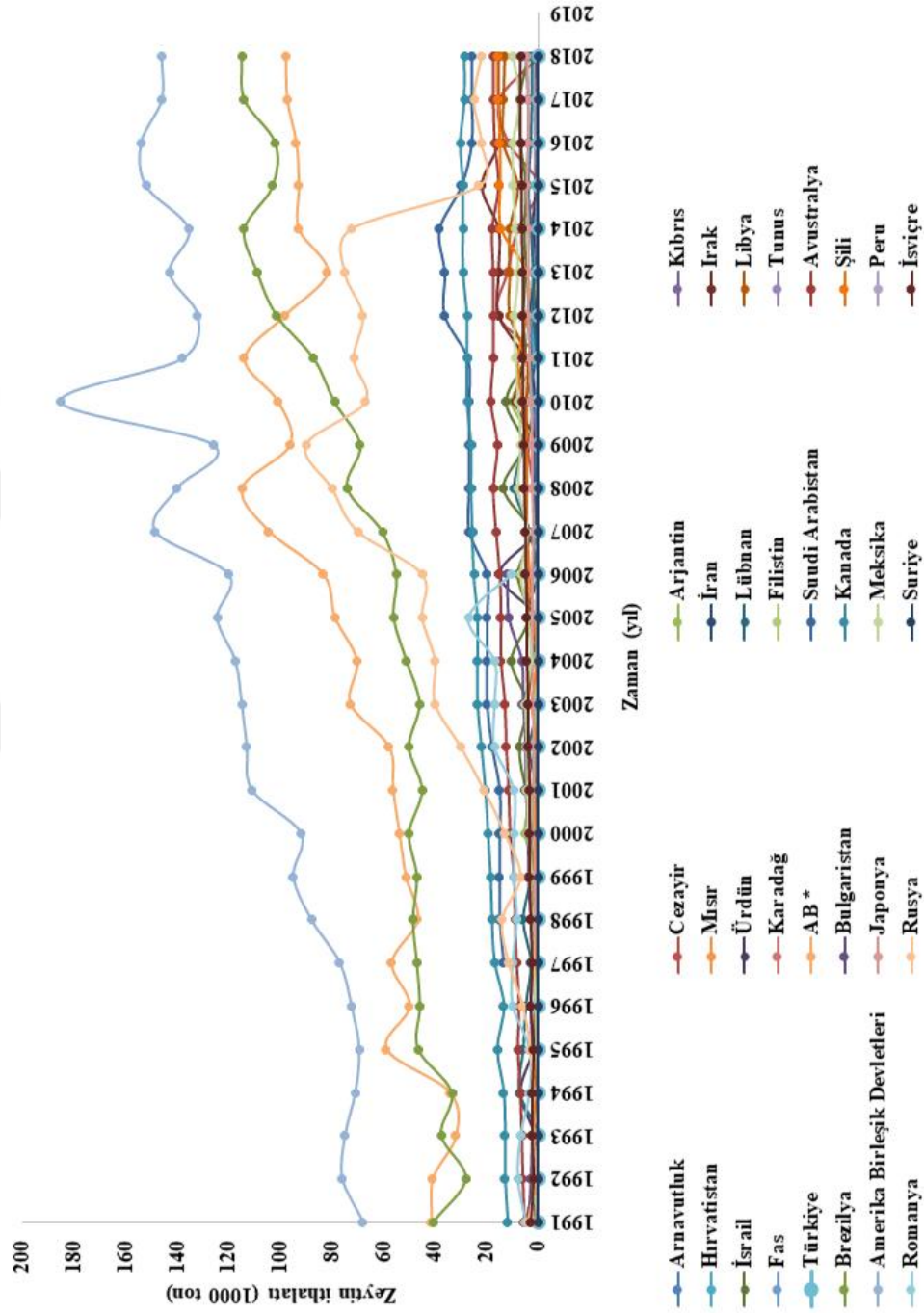
Şekil 2.28: Dünya çapında zeytin meyvesi verimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri FAOSTAT'ten alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [213].



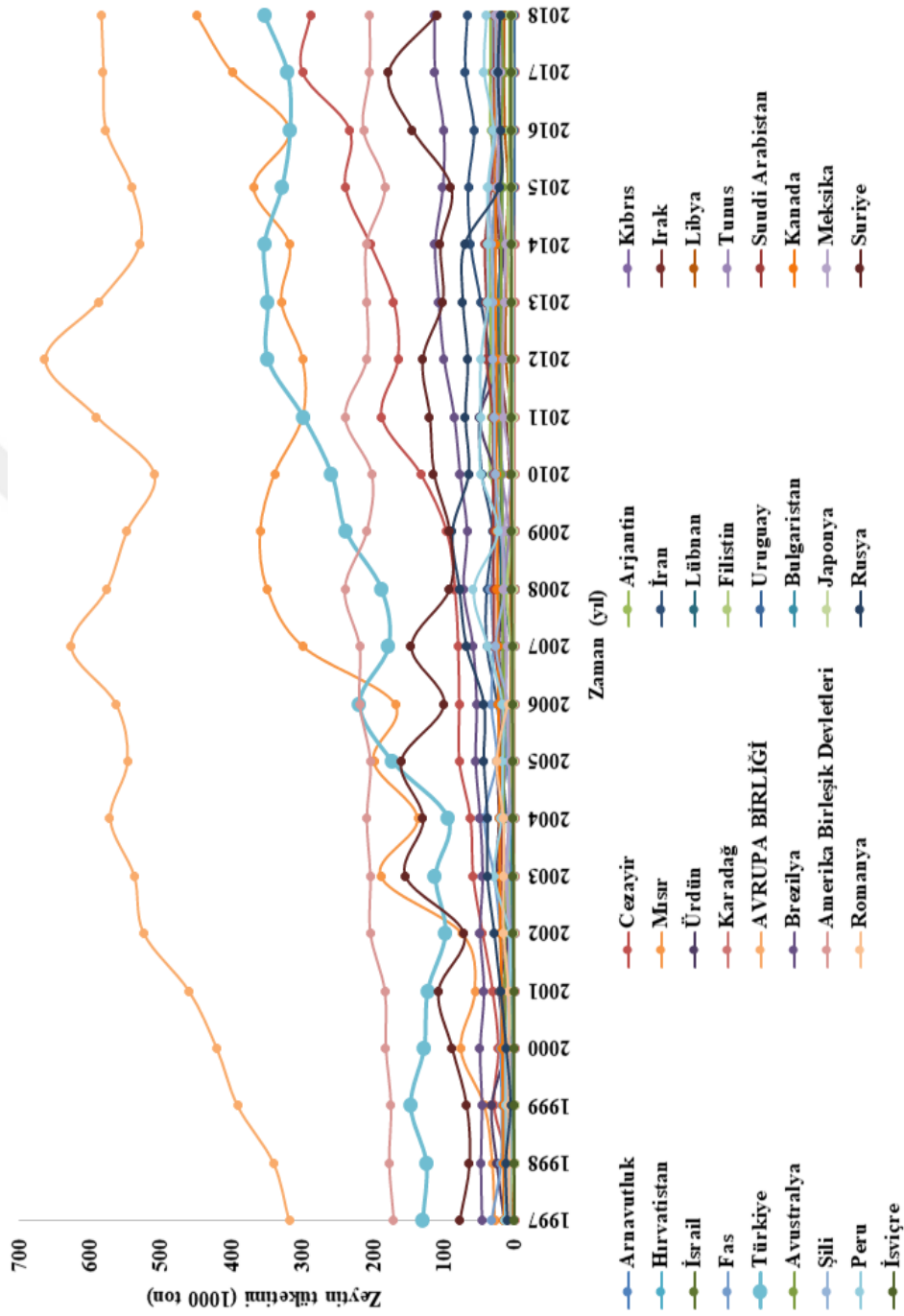
Şekil 2.29: Dünya çapında zeytin meyvesi ihracatı (10<sup>3</sup> ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].



Şekil 2.30: Dünya çapında zeytin meyvesi ithalatı ( $10^3$  ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].



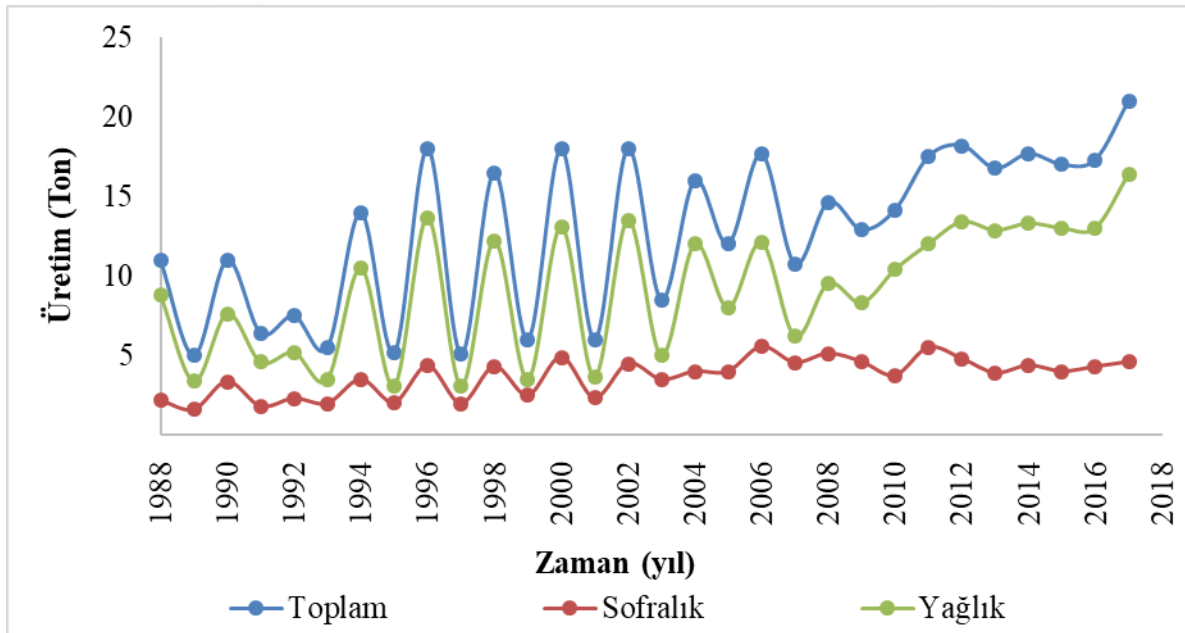
Şekil 2.31: Dünya çapında zeytin meyvesi tüketimi (10<sup>3</sup> ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].

Türkiye’de ilkbaharda zeytin ağacı çiçeklenmektedir. Meyve olgunlaşması yaz aylarında başlamaktadır. Meyveler kasım ayında renk değiştirmeye başlamaktadır. İlk önce yeşilden menekşe rengine dönmekte ve olgunlaştıkça siyaha dönüşmektedir. Olgun zeytinler Kasım'dan Şubat'a kadar hasat edilmektedir. Üretilen zeytin yağının kalitesi, zeytinlerin nasıl toplandığına büyük ölçüde bağlıdır. Zeytinler dallardan tek tek alındığında en iyi zeytinyağı elde edilmektedir. Diğer yöntemler, zeytinin yere düştükten sonra elle veya emme makineleri kullanılmasıyla toplanmaktadır. Zeytinler hasattan sonra mümkün olan en kısa sürede işlenmelidir. Zeytinyağı ekstraksiyonu için kullanılacak meyvelerin, ilk olarak yaprakları çıkarılır, ardından otomatik makinelerde yıkanır. Daha sonra zeytin, yağını çıkarmak için preslerde sıkılmaktadır. 1 kg erken hasat sızma zeytinyağı elde edebilmek için yaklaşık 10 kg zeytin kullanılmaktadır. Diğer yöntemlerle, 3 kg ila 8 kg arası zeytinden 1 kg yağ çıkmaktadır. Sofralık zeytinler, Türk halkının beslenme alışkanlıklarında önemli bir bileşendir. Türkiye hem üretici hem de sofralık zeytin tüketicisidir. Ayrıca, uluslararası düzeyde ticari hale getirilmiş zeytinlerin çoğu Türkiye orijinelidir. Kalamata zeytinleri, insan diyeti için yağın besin değerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan en yüksek PUFA / SFA oranına sahip olup en yüksek PUFA içeriğini sunmaktadır [258, 259].

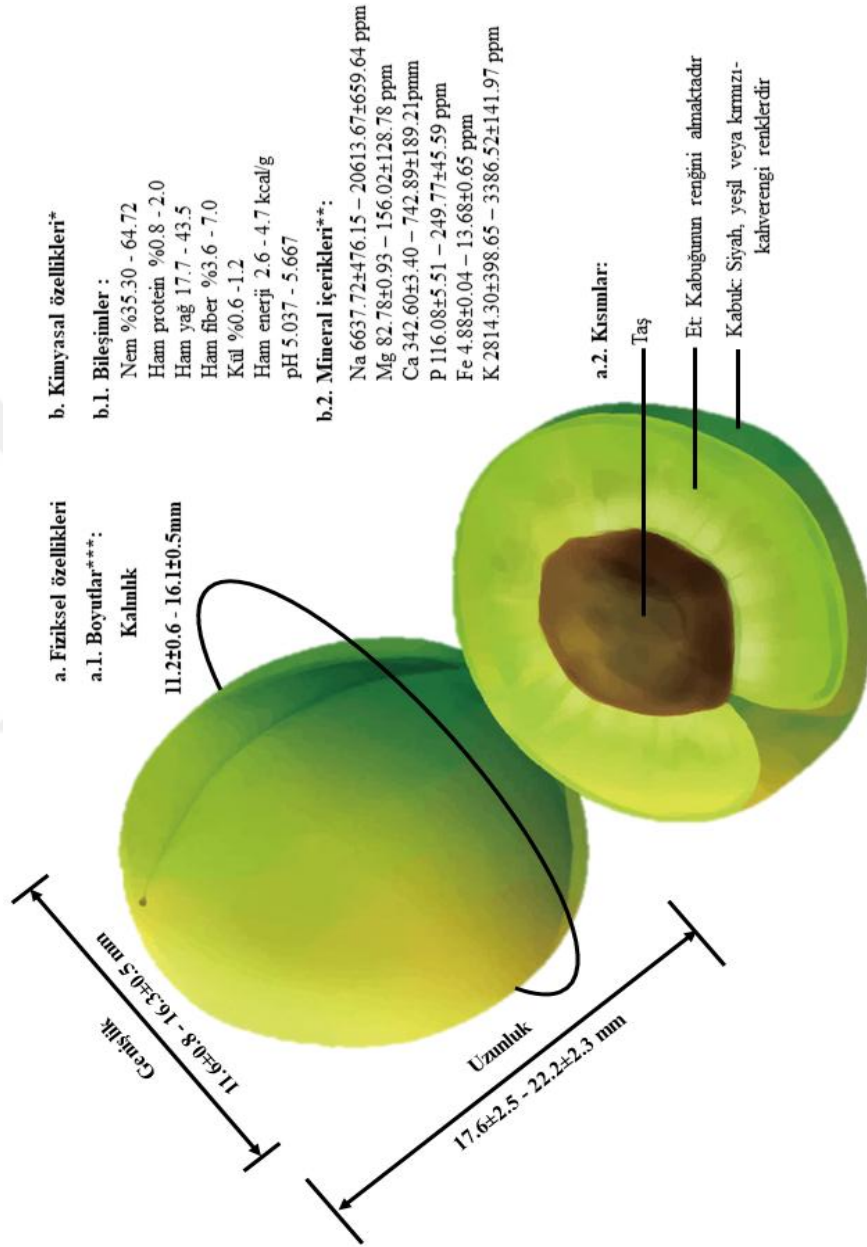
Türkiye’de yağ ve dekapaj üretimi için kullanılan en iyi bilinen bazı zeytin çeşitlerinden bazıları, Ayvalık, Chilli, Domat, Gemlik, Memecik, Tavsan ve Yüreğidir. Türkiye’de gemlik çeşidi büyük ölçüde siyah sofralık zeytin olarak üretilmekte ve tüketilmektedir. Diğer Türk çeşitleri arasında Büyük Topak, Ulak, Çakır, Çekişte, Çelebi, Çilli, Domat, Edincik Su, Eğriburun, Erkence, Halhalı, İzmir Sofralık, Kalembezi, Kan Çelebi, Karamürsel Su, Kilis Yağlık, Kiraz, Manzanilla, Memeli, Nizip Yağlık, Samanlı, Sarı Haşebi, Sarı Ulak, Saurani, Taşan Yüreği, Uslu ve Yağ Çelebi içermektedir. Optimum olgunlaşma süresi yıllar arasında ve yetiştirme alanları arasında değişebilmektedir [260]. Türkiye’de Hatay ilinde toplam 37,381 zeytin yetiştirme alanı, 5.2 milyon meyve veren zeytin ağacı ve 1.7 milyon meyve vermeyen zeytin ağacı bulunup 98,946 ton zeytin ve 21,988 ton zeytinyağı üretilmektedir [261]. Hatay, sofralık zeytinlerin %7'sini ve Türkiye'nin zeytinyağı ihtiyacının %10'unu karşılamaktadır [261]. Hatay’da yetiştirilen en önemli zeytin çeşidi Gemlik, Halhalı, Haşebi, Karamani, Sarıulak ve Saurani'dir. Bu çeşitler, alternatif ve yüksek üretkenlik göstermekte ve düşük don direnci, orta düzeyde canlı ve küçük boyutlu meyveler (Halhalı hariç) ile karakterize edilmektedir. Büyük miktarda meyve üreten ağaçları meyveleri nispeten yüksek bir yağ verimine sahip olup, yağ içeriği kuru maddede

%45'ten fazlasına ulaşmaktadır. Son birkaç yılda Hatay'da, özellikle ülkenin Ege ve Marmara bölgelerinde yaygın olan, tüketiciler tarafından çok değerli olan yüksek verime, erken olgunlaşmaya, düşük periodisiteye ve organoleptik kaliteye sahip olan, iyi meyve ve zeytinyağının, sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminin büyük bir bölümünü kaplayan “Gemlik” çeşidi tanıtılmıştır. Devlet ve özel şirketler tarafından üretilen fidelerin %80'i bu çeşide ait olduğundan dolayı yerel zeytin yetiştiricileri için en uygun çeşittir. Bu asıl yerinde bulunan çeşitlerin sayısında bir azalmaya yol açmıştır. Bununla birlikte, yeni çeşitlerin tanıtılmasından önce, farklı ortamlarda olan davranışları değerlendirmesi gerekmektedir [258, 261, 262]. Şekil 2.32'de 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'deki zeytin meyvesi üretimi gösterilmiştir. Şekil 2.33'de Türk zeytin meyvesi yerel özellikleri gösterilmiştir.



Şekil 2.32: 1988'den 2017'ye kadar Türkiye'deki zeytin meyvesi üretimi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri TÜİK'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [218].



**Şekil 2.33:** Türk tipi zeytin meyesi yerel özellikleri. \*Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye, Ayvalık, [261] \*\*Domat, Kalamata, Edremit (siyah), Edremit (yeşil), Gemlik [249] ve \*\*\*Kargaburun, Erkence, Halhalı, Saurani [263] olarak Türk zeytin meyvelerin türleri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [249, 261, 263-265].



### 2.5.3. Zeytinyağı

Zeytinyağı, Akdeniz'i çevreleyen ülkeler için bir diyet kaynağı, ancak kullanımı, eşsiz tadı, fenolik bileşikler ve tekli doymamış yağ asidi gibi biyolojik olarak önemli küçük bileşenlerin varlığı ve yüksek oranda sağlıklı olması nedeniyle dünya üzerindeki diğer bölgelere de genişlemiştir [266]. Natürel birinci zeytinyağı (VOO), organoleptik ve besinsel özellikleriyle değerlendirilmekte ve fenoller gibi doğal antioksidanların, yüksek tekli doymamış yağ asidi içeriğinin ve düşük çoklu doymamış yağ asidi içeriğinin varlığına bağlı olarak oksidasyona karşı dirençlidir [267]. Özel gıda alanında, zeytinyağı popülaritesi artmaya devam eden baskın bir türdür. 2012 yılında üretilen zeytinyağı miktarı verilerine göre İspanya (992.000 ton), İtalya (570.000 ton), Yunanistan (351.800 ton), Türkiye (206.300 ton), Suriye (200.000 ton) ve Tunus (192.600 ton) önde gelen üreticilerdir [213, 258, 268]. Sırayla şekil 2.34, 2.35 ve 2.36'da dünya çapında zeytinyağının ihracatı, ithalatı ve tüketimi ( $10^3$  ton) gösterilmiştir.

#### 2.5.3.1. Bileşenleri

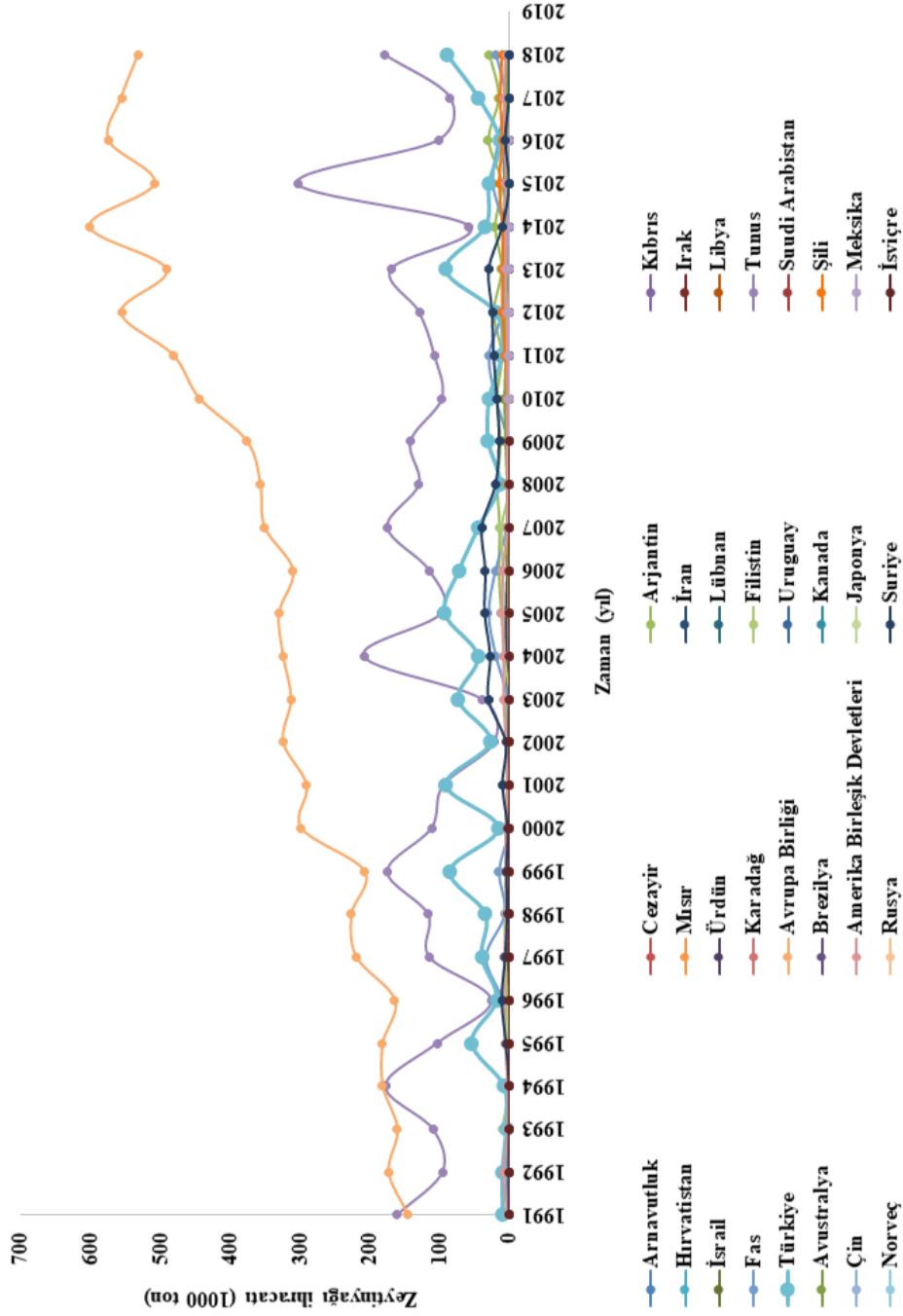
Yağ içeriği, miktar olarak değil, kalite bakımından meyve içeriğine benzemektedir. Natürel birinci sınıf zeytinyağının kompozisyonunu zeytinin çeşidi, büyüme bölgesi, ekstraksiyon teknikleri, iklim koşulları ve meyve olgunluğu derecesi gibi birçok faktör etkilemektedir [267]. Olgunlaşma sırasında, yağın serbest yağ asidinin önemli oranı, botanik çeşitliliğine, iklim koşullarına, meyve olgunluğuna, triaçilgliserollerin hidroliz derecesine ve zeytinlerin coğrafi kökenine bağlıdır [266]. Yaygın olarak polifenoller olarak bilinen fenolik bileşikler, zeytinyağının küçük bileşenleridir. Bu bileşikler, antioksidatif özelliklerinden dolayı natürel birinci sınıf zeytinyağlarının raf ömrü için temel öneme bir sahiptir. Antioksidan aktiviteleri, koroner kalp hastalığı ve belli kanserler gibi bazı kronik ve dejeneratif hastalıklara karşı koruma ile ilgilidir [269, 270]. Ek olarak, polifenoller acılık, keskinlik ve büzülme kazandırarak natürel birinci sınıf zeytinyağlarının duyuşal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların ve bazı kanserlerin önlenmesi iyi dengelenmiş ekstra natürel birinci sınıf zeytinyağlarının tüketimi, yağ asitleri bileşimi ile ilgilidir [271, 272]. Zeytinyağında olan ana yağ asitleri hem linoleik (%7.5-20), linolenik (%0.0-1.5), palmitik (%7.5-20), palmitoleik (%0.3-3.5), oleik (%55-85) ve stearik (%0.5-5) asitler hem de miristik asitlerin izleri bulunmuştur

[258]. Genellikle çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin diğer bitkisel yağlara kıyasla, zeytinyağı, ev kızartması veya yüksek sıcaklıklar gerektiren diğer kullanımlar sırasında daha düşük bir değişim oranına sahiptir. Zeytinyağının stabilitesi ve yüksek sıcaklıklarda hızlı bozulmaya karşı direnci, yağ asitleri profiline ve doğal antioksidanların varlığına bağlıdır [258].

### **2.5.3.2. Türk zeytinyağı**

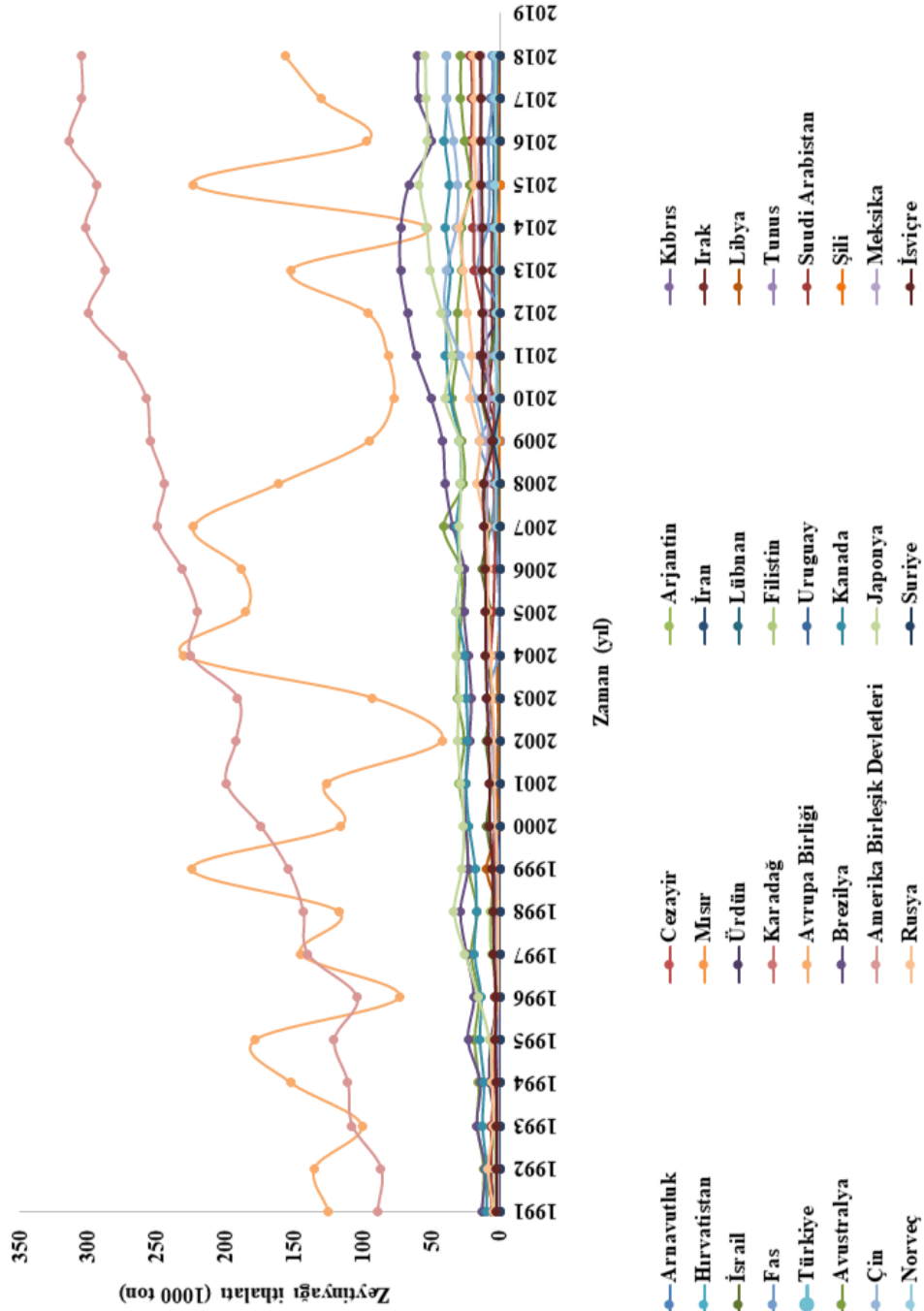
Türkiye'de zeytinyağının tarihsel simgeleri, Çeşme yakınında bulunan ve antik bir kent olan Erythrai'nın (Ildır) M.Ö. 6. yüzyılda önde gelen zeytinyağı ihracat merkezlerinden biri olduğu ve Urla'da MÖ 6. yüzyıldan kalma bir zeytinyağı basını bu sitede ve MÖ 3. ve 2. yüzyıllar arasında zeytin mağazalarının keşfedildiği şeklinde özetlenmiştir [216]. Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye ve Ayvalık orijinli Türk zeytinyağı genel özellikleri şekil 2.37'de gösterilmiştir.





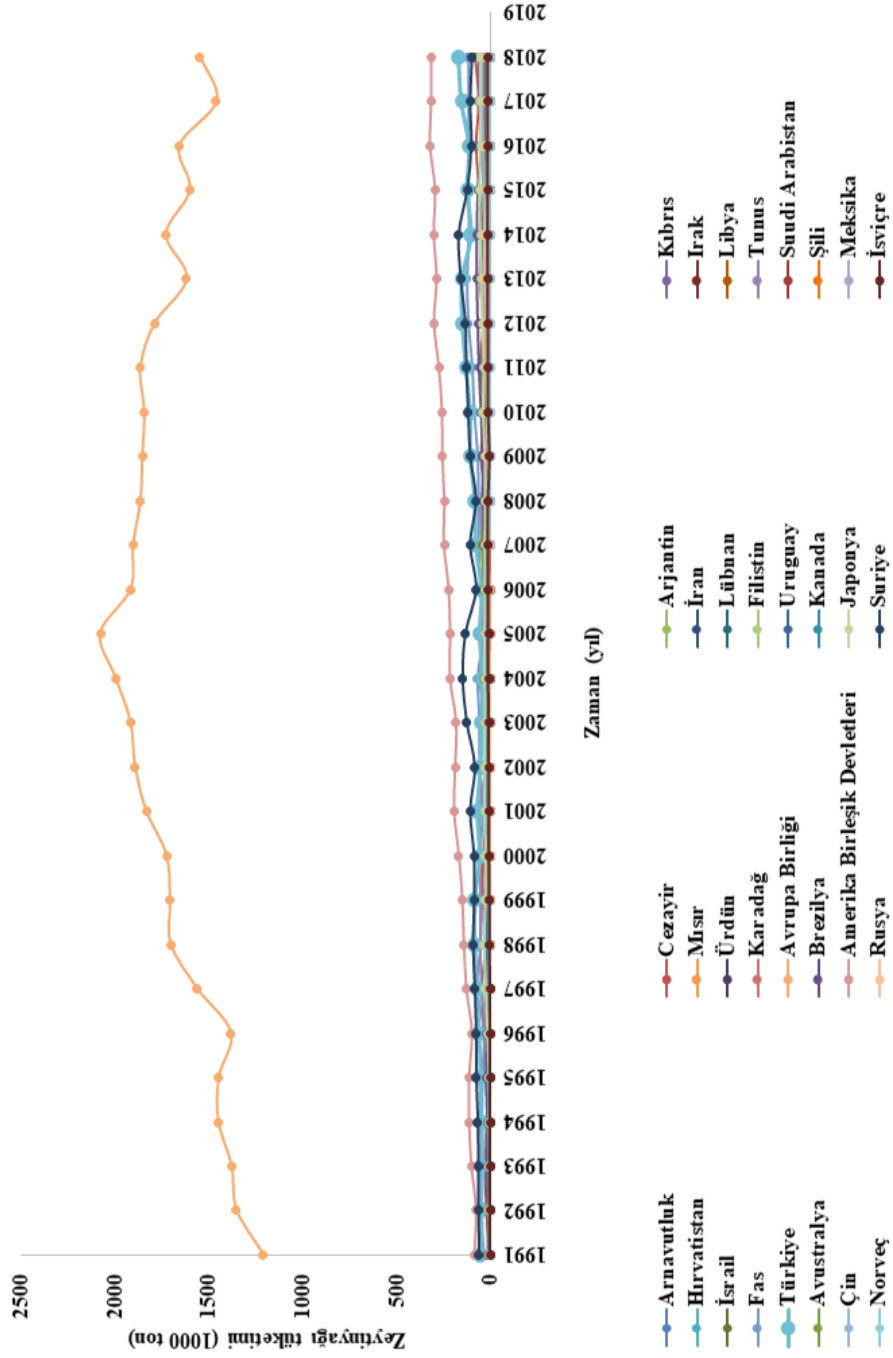
Şekil 2.34: Dünya çapında zeytinyağı ihracatı (10<sup>3</sup> ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].



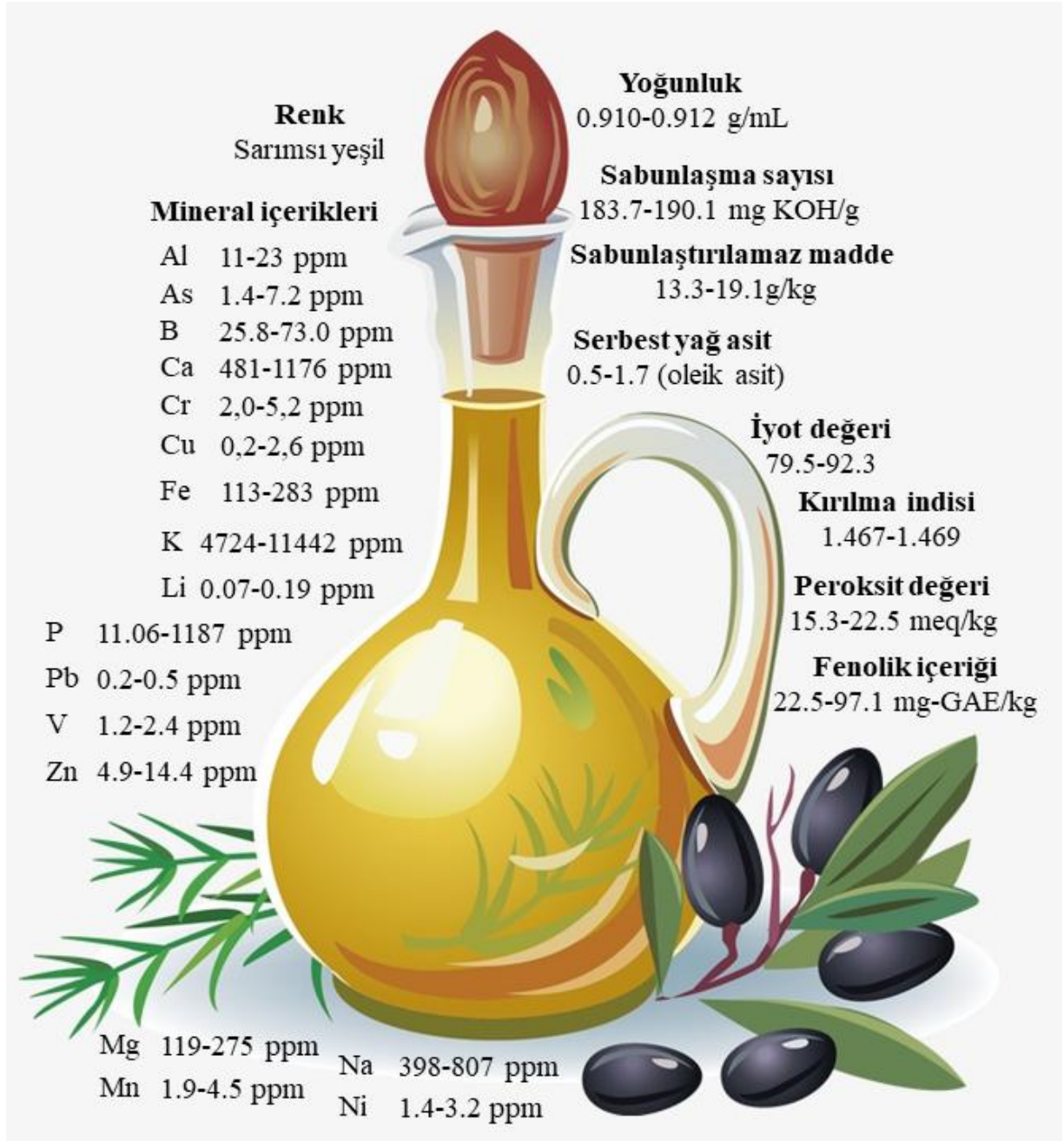
Şekil 2.35: Dünya çapında zeytinyağı ithalatı ( $10^3$  ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarım verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].



Şekil 2.36: Dünya çapında zeytinyağı tüketimi ( $10^3$  ton)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Figürün tasarlama verileri IOC'dan alınmış ve excel programı kullanılarak figür kurulmuştur [257].



Şekil 2.37: Türk zeytinyağının genel özellikleri<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [263, 273].

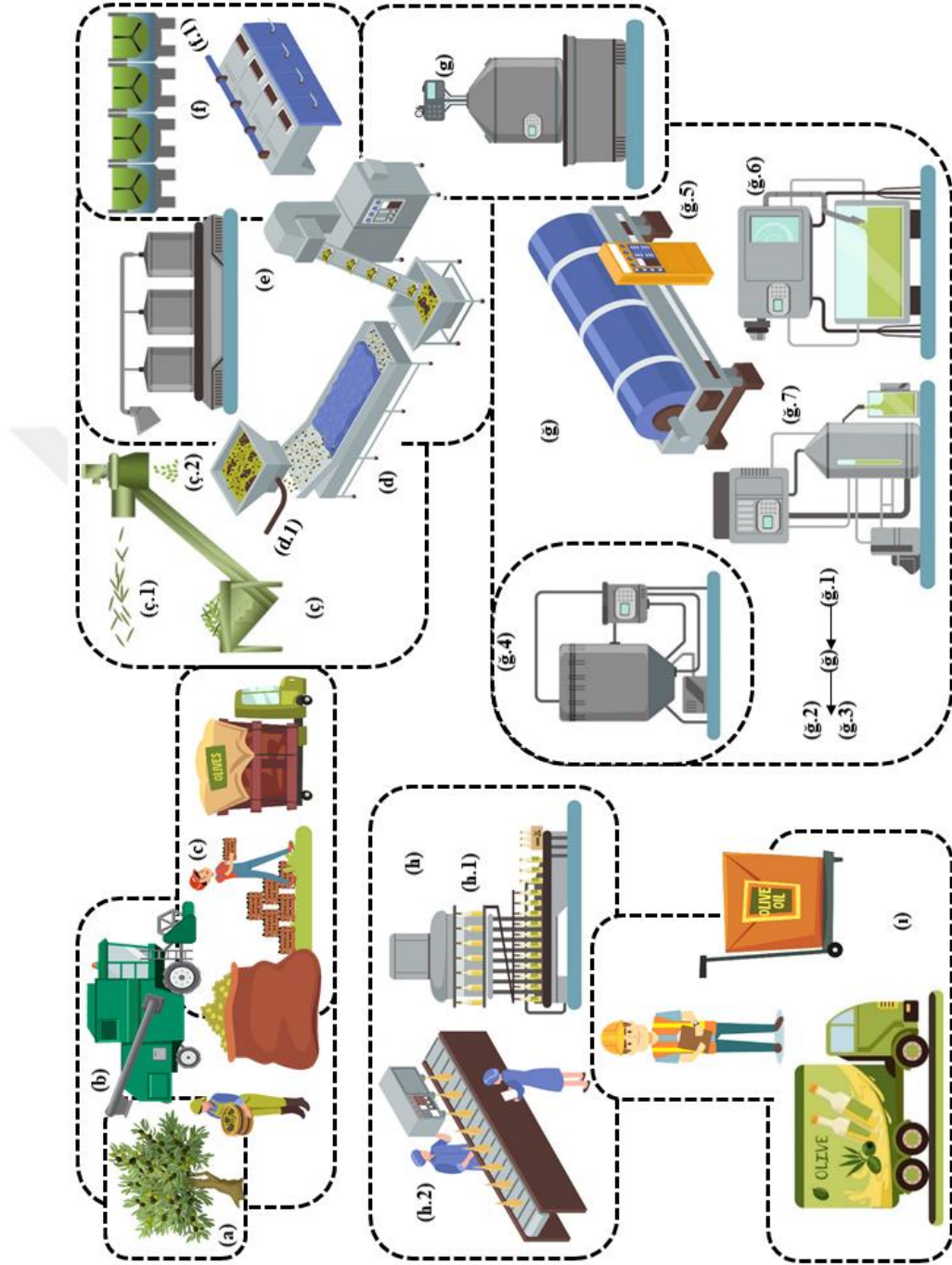
### 2.5.3.3. Yağın ekstraksiyonu ve yan ürünleri

Zeytin meyvelerinin hasatı ve bunların işlenmesi, meyvelerde ve elde edilen yağda fonksiyonel bileşiklerin içeriği üzerinde bir etkiye sahiptir. Bu etkiler, onların karakteristik ve dolayısıyla ilgili sağlık etkileri üzerinde olan etkisini gösterecektir. Sekil 2.38'de zeytinyağının ekstraksiyon işlemi ve yan ürünleri akış şemaları ile gösterilmiştir. Şemada, (a) Çiftlikte zeytin ağacı yetiştiriciliği, çiçeklenme ve meyve büyümesi, (b) Manuel ve mekanik hasat, (c) Meyvelerin yağ üretimine taşınması, (ç) Meyve temizleme, (ç.1) Zeytin yaprağı, (ç.2) Zeytin meyveleri, (d) Meyve yıkama makinesi, (e) Parçalama, (f) Su, (f.1) Karıştırma (malaksasyon/yoğurma), (g) Presleme, (ğ) Santrifüj işlemi, (ğ.1) Preslenmiş zeytinyağının macunu, (ğ.2) Zeytinyağının keki ve zeytinyağı değirmeni atıksuyu, (ğ.3) Saf zeytinyağı, (ğ.4) Filtrasyon, (ğ.5) Yatay santrifüj, (ğ.6) 3 fazlı santrifüj, (ğ.7) 2 fazlı santrifüj, (h) Zeytinyağının ambalajlanması, (h.1) Yarı manuel paketleme, (h.2) Otomatik paketleme ve (ı) Nihai ürün kontrolü, nakliye ve pazarlama.

a. Zeytin olgunlaşması, hasadı, depolanması ve taşınması

a.1. Zeytin olgunlaşması ve hasat zamanı

Hasat için zeytinlerin olgunlaşma aşaması çok önemli bir faktördür. Olgunlaşmayı test etmek için en spesifik indeks zeytindeki yağ birikimidir. Taze zeytin meyvesinde yağ yüzdesi, zeytin olgunlaştıkça sürekli artarken, kuru madde içinde yağ yüzdesinin maksimum değere ulaşması ve sabit kalması dikkat çekicidir. Bu, trigliserit biyosentezinin durmadan önce belirli bir olgunlaşma aşamasına ilerlemesi nedeniyle oluşmaktadır [274-282]. 2004 yılında araştırmacılar grubu tarafından yapılan en son araştırmalar, en önemli üç İspanyol ve İtalyan türünün (Frantoio, Hojiblanca ve Picual) yağ içeriğinin olgunlaşma sırasında meyvede yağ içeriğinin kuru ağırlık esasında arttığını, ancak ette yağ biyosentezinin olduğunu ve Kasım ayında durduğunu göstermiştir. Yağ içeriği, taze ağırlık bazında ifade edildiğinde iklim koşullarına bağlı değişimler olmasına rağmen, tüm çeşitlerde artmıştır [237, 283].



Şekil 2.38: Zeytinyağının ekstraksiyon işlemi ve yan ürünleri akış şemaları<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bütün resimler Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [207, 237, 284].



Tozlaşma sonrası, hücre bölünme süreci nispeten hızlıdır. Hızlı büyüme koşullarının ilk aşamasında, neredeyse tüm hücre bölünme süreci tamamlanmıştır. Yavaş büyüme koşullarının ikinci aşamasında, çukur sertleştirme işlemi gerçekleşip sonraki aylarda çukur ve oğulcuk değişmeyerek nihai büyüklüklerine ulaşmaktadırlar [237]. Hızlı büyüme koşullarının son aşaması, eteğinde olan hücrelerin genişlemesi ve yağ ve nem birikmesi süreçleri nedeniyle meyvenin gerçek boyutunu belirtmektedir. Yeşil aşamada, zeytin meyvesi son şekline ve büyüklüğüne ulaşarak rengi sarı yeşil olur. Kabuğun renk maddesi (klorofil) antosiyanin ile değiştirildiği zaman, meyve, mor siyah renkle siyah dereceye girmektedir [237, 283].

Yağ üretimi için ayrılmış zeytin meyvesi, maksimum yağ birikimine yakın ve kalitesi bozulmadan önce hasat edilmektedir. Zeytin meyveleri en düşük yağışlı yılda daha az yağ ve daha yüksek kuru madde içeriği gösterir. Bu nedenle, en yüksek yağ verimini elde etmek ve doğal meyve düşüşünü önlemek amacıyla Kasım ayı ortasından itibaren meyve hasadı yapılması gerekmektedir. Geleneksel olarak, yeşil-sarı veya siyah-mor aşamalarda zeytin hasat edilmektedir. Acılık giderme ve kullanılmış fermantasyon işlemine bağlı olarak, yeşil, vişne veya siyah aşamada sofralık zeytin hasat edilebilmektedir [244, 285, 286]. Zeytin için meyve büyüme ve gelişme süresi 6 ila 7 ay olup diğer çekirdekli meyvelerle karşılaştırıldığında oldukça uzundur. Ağaç başına meyve verimi seviyesi, çeşitler, yetiştirme koşulları ve diğerleri arasında önemli farklılıklar vardır, ancak ortalama döngüyü tamamlanmak için yaklaşık 200 gün gerekmektedir [207].

En uygun hasat zamanı zeytin meyvesinde yağ seviyelerinin yüksek olduğu zamandır. Hasata doğal meyve düşmeden önce başlamak gerekmektedir. Normal olgunlaşan çeşitlerde, hasat etmeye başlama zamanı, meyve kabuğunun rengi ile değerlendirilebilmektedir. Ağaçta yeşil zeytin kalmadıysa, belki de renk değişiminde sadece bazı meyveler, yağ biyosentezi kesilip hasat başlayabilmektedir [207]. Yağ üretimi için ayrılmış zeytinin hasat edilmesi için en uygun aşama optimum olgunluktur. Bu aşamada, yağ içeriği ve yağ kalitesi en yüksek seviyelerdedir. Çok erken veya çok geç hasatların hem kalite hem de miktar üzerinde olumsuz etkileri vardır [207, 287]. Aşırı olgunlaşma sırasında triaçilgliserollerin hidrolize uğramasıyla asitlik de artmaktadır. 1992 yılında, zeytin meyvesinin ağaçta kaldığı süre boyunca zeytinyağı triaçilgliserollerinin kademeli hidrolize başladığı ve peroksit değerlerinin ve UV absorbansının arttığı

gözlemlenmiştir. Haşarat basmış meyveler zeytinyağı asitliğinin artışına yol açmaktadır. Geciken hasat yağ asiditesini arttırmış, ancak meyve boyutu küçük olduğunda bu geçerli olmamıştır [207]. Olgunluk indeksi (MI), zeytin yetiştiricilerinin kendi özel yetiştirme koşulları altında, çeşitlerinin olgunluk seviyelerini birkaç yıl boyunca sınıflandırmasına yardımcı olmak için geliştirilmiştir [207]. Bu, optimum ürün kalitesine sahip olan zeytin çeşidinin uygun bir hasat süresinin tahmin edilmesi için basit ama mükemmel olmayan bir araçtır [288]. Hasatta, olgunluk indeksi genellikle 1 ile 4.5 arasında değişmektedir [289]. Erken hasat için hızlı yağ birikimi veya meyve dökümü, sıcak iklimde yetiştirme gibi kültür alışkanlıklarını göz önünde bulundurmamaktadır. Araştırmacı grubu [207], meyve pigmentasyonunun her zaman yağda olan uçucu bileşenlerin, özellikle hekzanol, heptanol ve bazı uçucu alkollerin ve doymamış konjuge bileşiklerin fraksiyonu ile ilişkili olmadığını göstermiştir.

Fenolik bileşikler, olgunluk döneminde niteliksel ve niceliksel olarak değişerek, sarı-yeşil ve mor renk arasındaki aşamada en yüksek içeriğe ulaşmaktadır. Geç olgunluk aşamasında, fenolik bileşiklerin toplam miktarı, özellikle de oleuropein, esteraz enzimi tarafından parçalanıp önemli ölçüde azalmaktadır [274]. Geç olgunlaşma aşamasında, daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan bileşenler, tirosol ve hidrokstirosol oluşturmak üzere hidrolize edilmektedir [207]. 29 farklı Portekiz çeşidinde, olgunluk aşamalarına göre fenolik profilde olan farklılıklar ve bileşiklerin seviyeleri gözlenmiştir [290-292]. Bir araştırma grubu [293], fenollerin ve genellikle antioksidan içeriğinin yeşil zeytinlerde olgun zeytinlerden daha yüksek olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, zeytinlerde olan bileşimsel değişiklikler, hasat süresinin belirlenmesine etki edebilecek diğer faktörlerden çok etkilenmektedir [207].

Meyve bahçelerinden yüksek kalitede ürünler elde etmek için optimum hasat aşamasına ilişkin çalışmalar halen devam etmektedir [294, 295]. Ekstraksiyon sırasında ortaya çıkan uçucu bileşikler, kimyasal oksidasyondan uçucu bileşiklerin ortaya çıkmasıyla birlikte yağ depolama sırasında daha az baskın hale gelmektedir. Dolayısıyla, belirli uçucu bileşiklerin varlığı veya yokluğu zeytinyağının kalitesinin farklılıklarını kısmen açıklamaktadır. Uçucu bileşikler, meyve büyümesi sırasında belirgin miktarlarda üretilmez, ancak olgunlaşmanın klimakterik aşamasında ortaya çıkmaktadır [296]. Klimakterik dönem boyunca, meyveler etilen üreterek biyokimyasal, fiziksel ve kimyasal değişimlere neden olup bazı protein ve enzim aktivitelerinde artış

sağlamaktadır. Özellikle lipoksijenaz yolağından zeytinyağlarının enzimsel oksidasyonu, yağın aromasından sorumludur [207, 297].

Bütün meyveler aynı ağaçta bile aynı anda olgunlaşmamış olduğundan, meyvenin çoğunluğu optimum olgunlukta iken hasat yapılması gerekmektedir. Ama, hava koşulları, tarım işçiliğinin mevcudiyeti ve zeytinyağı değirmenlerinin mevcudiyeti gibi diğer faktörler hasat süresini de etkileyebileceğinden dolayı her zamanda muhtemel değildir. Meyve büyümesi sırasında olan özel iklim koşulları meyvenin olgunlaşmasını ve kalitesini etkilemektedir. Bu öngörülemeyen faktör hasat zamanının önceden belirlenemediğini göstermektedir [207, 297].

## a.2. Hasat ve hasat teknikleri

Zeytin hasadı yöntemleri yüzyıllar boyunca değişmeden kalmıştır. Zeytinlerin toplanmasını kolaylaştırmak için kullanılan yeni teknikler sadece son zamanlarda tanıtılmıştır. Zeytin hasadında kullanılan yöntemler, ağaç büyüklüğüne ve şekline, kültür tekniklerine ve meyve bahçesinin arazisine bağlıdır. Çoğu zeytin elle ve / veya çalkalayıcılarla hasat edilmektedir. Yeni ekilen meyve bahçelerinin mekanik olarak hasat edilmesi olasılığı daha yüksektir. Bazı çeşitlerin yüksek ağaçları, meyvenin doğal düşüşünden sonra ağların yardımıyla toplanmaktadır. Mekanik hasar ile meyve kırılmasını ve toprak malzemesi ile meyve kirlenmesini önlemek için önlemler alınmalıdır [207].

### a.2.1. Doğal düşüşten sonra hasat

Geçmişte, zeytin yere düştükten sonra el ile hasat edilirdi. Bu yöntem büyük ölçüde Yunanistan ve diğer ülkelerde ağaçların altına yayılmış plastik ağlar ile yer değiştirip meyvelerin doğal olarak üzerlerine düşmesine izin verilmiştir. Yağın bozunmasını minimuma indirmek için, ağlar 15 gün boyunca ağlarda bırakılmamalıdır [298]. Zeytinler ağlara daha uzun süre bırakıldığında düşük kalitede bir yağ ile sonuçlanmaktadır. Meyve düşmesi ve hasat arasında olan süre, zeytinyağının asitliğini arttırmanın çok önemli bir faktördür [207, 299].

### *a.2.2. Eli ile ağaçtan hasat*

Sofralık zeytin olarak işlenecek zeytinler neredeyse her zaman el ile toplanmaktadır. El ile ağacından toplanan meyve, kuşkusuz hem sofralık zeytin hem de zeytinyağı üretimi için en iyi kalitede olmaktadır. Elle çizilmiş meyve dalları, toprak ve yaprak gibi yabancı maddelerden nispeten muaftır. Aynı zamanda, el toplaması ağacın minimum hasar görmesine neden olduğundan dolayı çok pahalıdır [207].

### *a.2.3. Dalları yenerek ağaçtan hasat*

Zeytinler, zeytin kabukları karanlığa gömüldükten ve yağ içeriği önemli ölçüde arttıktan sonra, ağaçların dalları uzun direkler, tahta veya plastik ile el döverek toplanmaktadır. Arasına plastik taraklar da zeytinleri ayırmak için kullanılmaktadır. Bu yöntem bazen meyve dallarını incitir ve Bacterium savastanoi'nin neden olduğu hastalığı yaymaktadır. Yunan yapımı kırbaç makineleri gibi ucuz ve verimli zeytin hasat yöntemlerini icat etmek için büyük çaba sarf edilmiştir. Bu hasat makineleri, her bir işçinin hasat oranını iki veya üç kat artırmaktadır. Kırbaç makineleri zeytin yetiştirme alanlarında çok hızlı yayılmıştır [207, 300].

### *a.2.4. Çalkalayıcılarla hasat*

Zeytin hasadı için yaprak döken ağaç meyveleriyle kullanılmak üzere tasarlanmış ağaç çalkalayıcıları kullanılmıştır. Zeytin meyvesinin ağaçlara tutturulması, sökme kuvvetinin meyve ağırlığına oranı ile ölçüldüğü için çok güçlü olduğundan dolayı meyvenin ağaçtan serbest kalmasına yardımcı olan absisyon kimyasallar tanıtılmıştır. Ama, son araştırmalara göre, meyve kaldırma kuvvetini azaltabilen başarılı bir absisyon bileşimi tanımlanmamıştır. Zeytin hasadında en önemli araştırma hatlarından biri, çıkarılan meyve yüzdesini maksimize etmektir. Birçok durumda hasat verimliliği, kullanılan makinelerin operasyonel parametreleri ve mekanik hasat için ağaç adaptasyonu ile belirlenmektedir. Toprak alanı büyük olduğunda, daha düşük bir kanopi yoğunluğuna yol açan her iki orta ve ağır budamanın, gövde çalkalayıcı ile hasadı geliştirdiği belirlenmiştir [207, 301].

### a.3. Zeytin depolanması ve zeytinyağı değirmenine taşımacılığı

Zeytin taşımacılığı ve depolanması hem mekanik hasarı hem de sıcaklığı kontrol etmek için kritik aşamalar olarak düşünülebilir. Bu aşamalar sırasında yanlış kullanım, maya ve küflerin büyümesine ve istenmeyen enzimatik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Zeytinleri taşımamanın en iyi yolu, havanın meyve yıkım aktivitesinin neden olduğu zararlı ısınmayı ve dolaşımını sağlayan üstü açık plastik kasalardır. İdeal olarak, zeytin yağının işlenmesi gecikmeden hasatın takip edilmesi gerekmektedir. Zeytinlerin, hasat sırasında sahip oldukları kalite özelliklerini muhafaza etmelerini sağlamak için, işleme için ekstraksiyon tesisine hemen teslim edilmesi gerekmektedir. Bu genellikle pratik davranmadığı için, işlemeden önce belirli bir süre saklanmaktadır. İşlemeden önce depolandığında, zeytinlerin sığ tabakalara yayılması ve iyi havalandırılan, serin ve kuru alanlarda tutulması gerekmektedir. Zeytinlerin jüte torbasında saklanmasının önlenmesi gerekmektedir. Depolama sırasında, yağın bozulmasına yol açan çeşitli kimyasal ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelebilmektedir. En ciddi hasar, zeytinlerin fermantasyonundan kaynaklanmaktadır. Fermantasyon hem zeytin dokusunda endojen olan hem de bakteriler, küfler ve mayalar tarafından üretilen enzimlerin neden olduğu reaksiyonları içermektedir. Zeytin dokusu solumasıyla üretilen ısı etkili şekilde dağıtmadığında enzim hareketlerini hızlandırmaktadır. Lipoliz, lipid oksidasyonu ve diğer istenmeyen reaksiyonlar meydana gelip asitliğin artmasına ve yağın fonksiyonel bileşenlerinin ortadan kaldırılmasına neden olmaktadır. Zeytin bozulmasını önlemek için, yüksekliği 25 cm'i geçmeyen tabakalarda ve serin binalarda depolanması tavsiye edilmektedir. Suya NaCl (%3), metabisülfid (%2) veya sitrik asit (%0.03) gibi hafif koruyucuların eklenerek zeytinlerin su altında depolarda depolanmasının önerilmesiyle daha iyi bir depolama söz konusu olmaktadır [207]. Depolamadan önce zeytinlerin kızılötesi ışınımı ile kısmi kurutulması denenerek bu tür bir tedavi çok maliyetli görünmektedir. Amonyak veya nitrojen gibi etkisiz ya da antiseptik gazlar içeren kapalı tanklarda zeytin meyvesi muhafazası tatmin edici sonuçlar vermiştir [207]. Zeytin ezmesi de astarlı tanklarda korunmuştur [207]. Zeytin meyvesinin kontrollü atmosferler altında depolanmasını içeren araştırmalar çeşitli araştırma kurumlarında gerçekleştirilmektedir. Bir araştırma sonucuna göre, zeytin meyvesinin kontrollü atmosferlerde %3 CO<sub>2</sub> ve/veya %5 O<sub>2</sub> ile 5°C'de depolanması, yağın kalite özellikleri üzerinde herhangi bir açık olumlu etki göstermemiştir [302]. Zeytin meyvesini depolamanın etkili ve nispeten ucuz bir yolu, meyveyi

zeytinyağı değirmeninin yakınında serin odalarda tutmaktadır. Meyvenin soğutulması, 60 gün boyunca bile yağın fiziksel, kimyasal ve duyuşal özelliklerini kormaktadır [302]. Bir araştırma grubu [303], kapalı plastik torbalarda üç çeşit (Arbequina, Arbosana ve Leccino) zeytin meyvesinin depolandığı 12 gün boyunca uçucu fenol üretimini değerlendirmiştir. Her türün mikrobiyolojik saldırıya karşı farklı bir direnci gözlenmiş ve serbest asitlik değerleri ile ilişkili olarak guaiacol, 4-etilfenol ve 4-ethylguaiacol'ün evrimi ile yansıtılmıştır [304]. Taze, yeşil Manzanillo türü sofralık zeytinler için 5 ila 7.5°C ve %95 bağıl nemde ideal ön işlemler depolaması önerilmiştir. Bu koşullar altında, zeytinler 6 ila 8 hafta havada veya 9 ila 12 hafta %2 oksijen atmosferinin ortamında, zeytinlerin kalitesinde kayda değer bir kayıp olmadan depolanabilmektedir. Diğer araştırmacı gruplarından [305, 306] depolama koşullarının zeytin kalitesine ve zeytinyağı kalitesine etkisi hakkında daha fazla bilgi verilmiştir. Zeytin meyvelerinde oksijen difüzyonunun azaltılması amacıyla hasattan sonra nitrogen depolama metodunun öncesinde ve sonrasında, zeytinler çeşitli kimyasal solüsyonlara (%0.5 askorbik asit, %0.3 NaOH, %0.05 SO<sub>2</sub> ve %1 gliserol) daldırılmıştır [307]. Nitrojen atmosferini uygulamadan önce sadece bir kaplama tabakası formunda gliserol kullanımı iyi sonuçlar vermiştir. Ayrıca, bu polifenolün herhangi bir hidroliz reaksiyonu gerekmez, oleuropeinin oksidasyonu nedeniyle, çürümüş zeytinlerde esmerleşme reaksiyonlarının geliştirildiği gösterilmiştir. Oleuropein'in azalmasının ve çürümüş alanların koyulaşmasını artmasının, nitrojende korunan ve tekrar havaya maruz kalan zeytinlerin enzimatik reaksiyonlardan kaynaklandığı görülmüştür. Zeytin meyvesinin taşınması için yaygın ama yanlış bir uygulama onları plastik veya başka bir materyalden yapılmış çuvallara yerleştirmektir. Plastik çuvalların içlerinde yaratılan koşullar mikrobiyal büyümeyi ve meyvenin bozulmasını desteklediğinden dolayı onların kullanımının cesaretlendirilmemesi gerekmektedir. Meyveler yağ değirmenine ulaştığında, zeytin meyvesinin tür, hasat yöntemi ve koşul (böceklerin saldırıları gibi) açısından sınıflandırılması gerekmektedir. Her meyve sınıfının ayrı ayrı işlenmesi gerekmektedir. Daha önce de belirtildiği gibi, iyi kalitede yağ, zeytinler hasattan hemen sonra herhangi bir gecikmeden işlendiğinde elde edilmektedir [207].

#### a.4. Yağ ve meyve kalitesine etkileri

Tüm hasatın nihai amacı, elle ya da mekanik olarak hasat edilmiş zeytin meyvelerinden yüksek kaliteli pazarlanabilen zeytinyağı üretmektir. Sonuç olarak, hasat öncesi, hasat aşaması ve hasat sonrası uygulamalar zeytinyağı kalitesini etkileme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Zeytinyağı kalitesini etkileyen ana hasat öncesi üretim faktörü sulama işlemidir. Traktör lastikleri için toprak koşullarını kolaylaştırmak ve gövde havlamasını azaltmak için hasattan önce sulamanın azaltılması uygulaması incelenmemiştir. Bununla birlikte hem sofralık zeytin hem de zeytinyağı kalitesinde hasattan önce azalan sulamanın etkileri iyi belgelenmiştir. Hasattan önce sulamanın azaltılması sofralık zeytinlerin büyüklüğünü etkilemekte ve muhtemelen burkulmasına neden olmaktadır. Zeytin sulama literatürü genel olarak ürünlerin kalitesinin, sulama için kullanılan suyun çeşidine, kalitesine ve miktarına bağlı olduğunu göstermiştir [308]. Hasattan önce aşırı sulanan zeytin meyvelerinin yağ içeriğinin ve kalitesinin yüzdesini azaltacağı, ama hasattan önce açık/eksik sulanan zeytin meyvelerinin yağ içeriği yüzde cinsinden azalırken kalitesini artırabileceği de gözlenmiştir. Yousefi ve ark. (2012) [309], mekanik hasatın hızlı yumuşama ve bozulmaya neden olan iç meyve hasarına neden olduğunu bildirmişlerdir. Üretilen yağ benzer yağlı asit kompozisyonuna sahip olmasına rağmen tokoferol içeriği, fenolik içeriği ve oksidatif stabilite açısından elle toplanan zeytinlerden elde edilen yağdan daha düşüktür. Meyve depolama sırasında meyve hızla bozunmuştur. Soğuk hava deposu (3°C) bozulmayı geciktirmiş ve 10 gün boyunca mekanik olarak hasat edilmiş zeytinlerden yağda ticari bir kalite seviyesi üretilmiştir. Mekanik hasat ile toplanmış meyvelerin 24 saat içinde işlenemediğini ve değirmenlerden daha yüksek hacimde olduğu, kaliteli zeytinyağı üretiminin temin edilmesi için bir yol olarak soğuk olarak depolanması önerilmiştir [309].

#### b. İşlem adımları

Zeytin meyvesinde mezokarp hücrelerinin kofullerinde minik damlalar şeklinde zeytinyağı bulunmaktadır. Ayrıca hücrenin sitoplazmasının kolloidal sisteminde ve daha küçük bir dereceye kadar meyvenin dış kabuğunda ve endospermde dağılmaktadır. Kofullerde bütün yağın işlem sırasında açığa çıkmasının mümkün olmasına rağmen sitoplazmanın yağ içinde dağılmış şekilde elde edilmesi zordur. Bu yağ genellikle zeytin meyvesinin bir yan ürünü olarak prinada kalmaktadır. Zeytinyağı elde etmek için zeytinyağı değirmeninde ana işlem basamakları

besleme, yıkama, ezme, malaksasyon (karıştırma), zeytinyağının zeytin ezmesinden ayrılması ve dikey santrifüjde yağın son santrifüjlenmesini içermektedir. Zeytinyağında olan hidrofilik fenollerin varlığı, zeytin meyvesinin farklı endojen enzimlerine ve zeytin meyvesi işleme sırasında malaksasyon koşullarına bağlıdır [207].

#### b.1. Beslenme

Meyve hareket eden kemere bağlanmış büyük bir besleme hunisi içine yerleştirilmektedir. Yapraklar önemli fonksiyonel bileşenleri içerdiklerinden yaprakların bir kısmının kaldırılmaması gerekmektedir. Klorofilin yapraktan yağa aktarılması, foto-oksidasyona bağlı ışığın varlığında zeytinyağı bozunmasını hızlandırmakta ama bu pigment, karanlıkta yağın depolanması sırasında bir antioksidan olarak çalışmaktadır [207].

#### b.2. Meyve temizleme (Yıkama)

Meyvelerin yıkaması ve yapraklarının çıkması meyve temizliğinde iki gereken işlemdir. Yaprak ayırıcı, bir egzoz fanı tarafından üretilen güçlü bir hava akımı boyunca yaprakları, çırpı ve kiri emmektedir. Bundan sonra, zeytinler bir su akımı içinde yıkanmaktadır. Meyvelerin yıkanması yabancı maddelerin varlığını ortadan kaldırmaktır. Zeytin yıkama makinası, zeytinyağı değirmeninin temel bir aksesuarıdır. Bu su, dekantasyon işlemi sonrasında geri dönüştürülüp temiz su ile önceden belirlenmiş oranlarda sürekli karıştırılmaktadır. Yıkayıcı verimliliğini arttırmak için, yıkama kabı, kütleler içinde türbülans oluşturmak için, ekranlar boyunca herhangi bir kirliliği ve bir hava enjeksiyon sistemi ile sallanan bir çalkalayıcı ile donatılmıştır [207].

#### b.3. Parçalama (öğütme)

Yıkandıktan sonra, zeytin meyvesi parçalama ünitesine aktarılmaktadır. Parçalama veya öğütme, zeytin yağının işlenmesinde ilk ana adımdır. Bu işlem, meyve hücrelerini iç boşluktan (koful) yağ damlacıklarını serbest bırakmak için yırtılarak tasarlanmıştır. Bu nedenle, parçalama sırasında, mikroskobik damlalar, gelecek diğer adımlarda ayrılabilen daha büyük yağ damlaları oluşturmak üzere birleşmektedir [310]. Bütün hücrelerin yumuşatılması neredeyse imkansız olduğundan dolayı tüm yağlar serbest kaldırılamazsı mümkün değildir. Üstelik, damlacıklar



yağın emülsiyon durumunda kalmasını sağlayan, damlacıkların büyüklüğüne bağlı olan amfoterik psödo-membran ile çevrelenmektedir: ne kadar küçükse, o kadar kararlıdır. Geçmişte ve hatta günümüzde bazı zeytinyağı üreten ülkelerde, parçalama konik veya silindirik yağ taşlarıyla yapılmıştır. Ayrıca, macun içinde olan pektinlerin oluşturduğu koloidal sistemde az miktarda yağ kalmaktadır. Zeytin parçalamak için kullanılan ana yağ taşları parçalayıcılar, 1975 yılında Mendoza tarafından tarif edilmiştir [207]. Taş değirmenlerin en son versiyonu, 12-15 rpm'de 2'den 4'e kadar dönüş yapan dik granit değirmen taşlarından ve macun üzerine tahliye edilmesini sağlamak için uygun bir genişlikte bir yan kapaklı metal bir yalaktan oluşmaktadır. Değirmen taşları (öğütülmüş), silindirik şekilli, 120-140 cm çapı ve 30-40 cm hareketli kolların genişliği gibi özelliklerine sahiptir [207].

Meyve parçalayıp ve kısmen macunu karıştırarak değirmen taşlarının kombine bastırma ve itme hareketi iki işlevi yerine getirdiği için taş değirmenleri en uygun işi yapmaktadır. Yağ taşları parçalayıcıları macunu düzgün bir şekilde karıştırıp sebze suyuna dağılmış yağ damlacıklarını birleştirdiğinden dolayı metal parçalayıcılara göre bazı avantajları vardır. Yağ taşları parçalayıcıları yavaşça döndürüp hem parçalama hem de kısmi malaksasyon elde etmektedir. Taş değirmenlerinin dezavantajları pahalı olmaları, sürekli ve yavaş çalışmaları ve uzman personel tarafından dikkatle çalıştırılması gerektiğidir. Büyük boyut, düşük verimlilik ve yüksek işçilik maliyeti gibi kusurlara sahip olan eski yağ taşları parçalayıcıları kullanılan fabrikalarının yenileriyle değiştirilmesi nedenleridir. Bununla birlikte, son yıllarda, yeni işleme sistemleri (santrifüj) için metal zeytin parçalama ekipmanları tanıtılmıştır. Metal parçalayıcılar, çekiç, dişli, disk veya silindirik (silindir) olabilmektedir. Onlar yüksek hızlarda döndürmektedir. Sürekli ekstraksiyon tesisleri kullanıldığında, zeytinleri öğütmek için metal parçalayıcılar, çekiç veya dişli disk kullanılmıştır. Yüksek hızda dönerek, sabit veya yavaş dönüşlü metal bir ekrana karşı zeytinleri veren metal bir parçadan oluşmaktadır. Ekran boyutu 5 mm, 6 mm veya 7 mm'dir ve en uygun taş tanecik büyüklüğünü elde etmek için ekstraksiyon sistemine ve zeytinlerin olgunlaşma aşamasına bağlı olarak seçilmesi gerekmektedir. Çekiçli veya dişli diskli parçalayıcılar yüksek bir işlem kapasitesine sahip olarak sürekli çalıştırabilmesi için ve malaxing makineleri ile birleştirilmesi için yaygın kullanıma girmiştir. Ancak, uygun işi yapıp yapmadıklarına dair hala kuşkular var. Bu, işlemcilerin geleneksel taşlı parçalayıcılar

fabrikalarının sürekli ekstraksiyon tesislerine dahil edilmesini talep etmelerinin nedenidir. Çekiçli değirmenler en çok kullanılan parçalayıcı tipi ama bazı dezavantajları vardır:

- Maşalanmayı uzatmak için gerekli olan çekiçlerin yüksek devir dönüşlerinden dolayı emülsiyonların oluşturulmasını kolaylaştırmaktadır.
- Zeytin macununun sıcaklığını artırılmasıyla belirgin bir acılıkla yağlar üretmektedir.

Parçalama hızlı bir şekilde gerçekleştirildiğinde dolayı parçalama her zaman düzgün bir şekilde hazırlanmamaktadır. Yağın duyuşal özellikleri etkilenebilmekte ve yüksek hızlarda dönen parçalayıcıların metal kısımları aşınma ve yıpranmadan dolayı zarar görmektir. 1988 yılında Ranalli, zeytin çekirdeğinin (çukur) öğütülmesiyle yağ veriminin arttığını bulmuştur. Zeytin macunu daha ince dövüldüğünde, daha yüksek verim elde edilmektedir [207].

#### b.4. Karıştırma (Malaksasyon/Yoğurma)

Zeytinde yağ oranı yaklaşık %20-25 arasında olup vakuollerde bulunan mezokarp hücrelerde bulunmakta ve küçük lipid inklüzyonları şeklinde sitoplazma yoluyla daha az bir alana dağılmaktadır. Mekanik olarak elde edilen yağ, damlacıkların "cepler" olarak bilinenleri oluşturacak şekilde daha büyük damlalar halinde birleşebileceği şekilde, dokulardan serbest bırakılması gerekmektedir. Dayak veya yoğurma olarak da belirtilen mayalama, ekstraksiyon verimini arttırmak için temeldir. Parçalama etkisinin artırılması ve macun üniform hale getirilmesi için tasarlanmıştır. Böylece, bu operasyonun amacı serbest yağın yüzdesini arttırmaktır. Esas amaç, yağ / su emülsiyonunu ayrılması, böylece yağ damlacıkları daha büyük damlalar oluşturmak için birleştirilmektedir [311]. 1989 ve 1996 yıllarında Di-Giovacchino tarafından parçalama ve ezme sonrası elde edilen zeytin macununda bulunan farklı boyutlarda yağ damlalarının yüzdeleri tartışılmıştır [207]. Parçalamadan sonra, damlaların sadece %45'i 30 mikrondan daha büyük bir çapa sahip olarak yağın sürekli işlem ayrılması için minimum boyut olmakta, ama bu oran, ezmeden sonra daha büyük çaplı damla sayısında eşlik eden büyük bir artış ile %80'e yükselmektedir. Zeytinde bütün yağlar serbest bırakılmamasında bazıları saçılmamış hücrelerin içinde kalmakta, bazıları zeytin macununun kolloidal sisteminden (mikro

jeller) yayılmakta ve bazıları bitkisel su ile bir emülsiyon içinde bağlanmaktadır. Bu yağın geri kazanılmasında ana zorluk, dağılmış ya da emülsifiye edilmiş yağ damlacıklarının, yağın emülsifikasyonunu ya da fosfolipidler ve proteinler gibi yayılımını stabilize eden bir lipoprotein membranı tarafından çevrelenmesidir. Damlacıkların boyutu ne kadar küçükse, stabilizasyon derecesi o kadar büyüktür. Bu da daha büyük damlalar oluşturmak için kaynaşmasını önlediği anlamına gelmektedir. Zeytin meyvesi parçaladıktan sonra, elde edilen macun karıştırma aşamasına uğramaktadır. Karıştırma (malaksasyon), zeytin macununu yaklaşık 30 dakika boyunca yavaşça ve sürekli olarak karıştırmayı gerektirmektedir. Olgunluğa ulaşan zeytin meyvesi için 20-25 dakikalık bir malaksasyon yeterlidir. Zeytinleri parçalamak için değirmen taşları kullanıldığında, yağ emülsiyonu, oda sıcaklığında 10-15 dakika karıştırıldıktan sonra optimal olarak parçalanmaktadır. Normalde metal kırıcılarla donatılmış sürekli santrifüj işleminin yapıldığı değirmenlerde, 2 veya 3 aşamada olan malaksasyon 60 ila 90 dakika sürmektedir. Malaksörlar, zeytinyağı bitkileri arasında boyut, şekil ve düzenlemede farklılık göstermektedir. Bunlar çoğunlukla döner bıçaklı ve çift cidarlı silindirik teknelerdir. Birkaç kanatlı dönen bir sarmal macunu karıştırmaktadır. Genellikle dönüş macun türüne bağlı olduğundan dolayı yavaştır (19-20 rpm). Daha fazla verim için, malaksörlar ılık su sirkülasyonu için çift duvarlardan oluşmaktadır. Sıcaklık artışı ile yağın viskozitesini düşürüp daha büyük bir zeytinyağı verimi sonuçlanmaktadır [207]. Sıcaklığın yükseltilmesi zeytin macunu daha az yapışkan hale getirmekte ve sıvı fazların santrifüjleme ile ayrılması daha kolaylaşmaktadır. Zeytin macunlarının doğrudan santrifüjlenmesi ile takip edilen malaksasyonun süresinin ve sıcaklığının artmasının, özellikle sırt zeytinlerde daha yüksek ekstraksiyon verimine yol açtığı iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, yağın fonksiyonel değerinin azalmasına neden olan uçucu bileşenlerin bozumasını önlemek için suyun sıcaklığı (27°C'den fazla) yüksek olmamak gerekmektedir. Yukarıda göstermiş etkiyi önlemek için, malaksörlar otomatik bir termostat ile donatılmış olmak gerekmektedir. Öğütme ve malaksasyon sırasında, su ile temas ederek orijinal damlaların yüzeyinde lipoprotein membranlar oluşturulabilmektedir. Eğer malaksasyon süreci yavaşsa, daha büyük yağ damlalarının oluşumu sağlanıp emülsiyon oluşumu geciktirilip yağ fazının ayrılması daha kolaylaşmaktadır. Uzun süreli malaksasyon yağ ayrılmasını geciktiren emülsiyonların oluşumunu desteklemektedir [207]. Zeytinyağı ekstraksiyon işleminde, yağın %10-20'si açılmamış hücrelerin içinde veya zeytin ezmesinin (mikrojellerin) kolloidal sisteminde kalmakta ve bazıları bitkisel su ile bir emülsiyona bağlanmaktadır. İspanya, zeytinyağı

ekstraksiyonu için ilk ürün olan doğal talk (hidratlı doğal magnezyum silikat) kullanılarak karşılıklı yardımlaşan maddeler ilk ülke düzenlemiştir. Bir araştırmacı grubu, karşılıklı yardımlaşan maddelerin kullanımının, yağ ekstraksiyon verimini geliştirdiğini bulmuştur [312]. Ekstre edilen ilk yağın yüzdesi ve yüzde ekstraksiyon etkinliği, %2 oranında artmıştır. Aynı parçacık boyutu için, kalsiyum karbonatın talktan daha büyük bir miktarda yağ ekstrakt ettiği bulunmuştur. %0.3 kalsiyum karbonat kullanıldığında en iyi sonuçlar elde edilmiştir. Son yıllarda malaksasyon, natürel birinci zeytinyağı için mekanik ekstraksiyon işleminde en kritik noktalardan biri olarak kabul edilip malaksasyonun ekipmanının tasarımı büyük değişikliklere uğramıştır. 80'den fazla makalenin sonuçlarını özetleyen Clodoveo'ya (2012) [311] göre, atmosferin zeytin macunu ile temas halinde olan kompozisyonu, sıcaklık ve zaman gibi malaksasyon koşulları, sağlıklılardan sorumlu olan enzimlerin aktivitesini ve ürünün organoleptik özelliklerini etkileyebilmektedir. Zeytin meyvesinden en iyi kaliteyi elde edebilmek için, özütleme prosesi sırasında oksijen konsantrasyonunu stratejik olarak kontrol etmek ve aynı zamanda etkisiz gazlar kullanmak için malaksasyon makinesi hava geçirmez veya sızdırmaz bir biçimde olarak kapatılması gerekmektedir. Malaksasyon sırasında etkisiz gazın kullanılması, üretilen yağa zarar vermeden malaksasyon süresini uzatıp fenolik bileşiklerin oksidatif bozunmasını azaltmaktadır. Ayrıca, artan malaksasyon süresi, ağır macunların işlenmesinde yağ ekstraksiyon veriminde bir artışa izin vermektedir. Verimden ödün vermeden iyi bir zeytinyağı kalitesi elde etmek için düşük bir malaksasyon sıcaklığı (<27°C) ve 30 ila 45 dakika arasında bir malaksasyon süresi tavsiye edilmektedir. Zeytin macunları tarafından malaksasyon sırasında doğal olarak üretilen CO<sub>2</sub>'nin kullanılması, malaksasyon ekipmanında tepe boşluğunun doğal bir etkisizleştirilmesi için bir yöntem olarak kullanılabilir ve etkisiz gazların kullanılarak maliyetlerde büyük bir azalmaya olanak tanımaktadır. Malaksasyon sırasında macuna ılık su ilave edilmesi, yağ ekstrakte edilebilirliğini artırabilmekte, fakat aynı zamanda hidrofilik bir doğada olan fenoller, eklenen su miktarının bir fonksiyonu olarak azalmaktadır. 2014 yılında araştırmacı grubu [313] tarafından zeytin macununun hazırlama koşullarının, standart kalite parametreleri üzerinde etkilerini ve İspanya'nın kuzeybatısının alanında bir üretilen zeytin 'Morisca' ve 'Manzanilla de Sevilla' çeşitlerinden elde edilen ekstra zeytinyağlarının uçucu profillerini test etmiştir. Farklı malaksasyon parametreleri uygulandığında yağların uçucu profili, kokulu maddenin serileri açısından önemli bir değişiklik geçirmiştir. Bir çalışmanın sonuçlarına göre, malaksasyon sıcaklığı, hidroperoksit liyazlarının kanıtlanmış inaktivasyonunun bir sonucu

olarak, genellikle lipoksijenaz yolaklarından gelen uçucu bileşiklerin seviyelerinde bir azalmaya neden olmaktadır [314]. Malaksasyon süresi ve özellikle sıcaklığı, secoiridoid bileşiklerin içeriğine olumsuz olarak etkileyerek lipoksijenaz yolaklarından kaynaklanan metabolitlerin bileşimini değiştirip amino asit dönüşümüyle 2-metil butanal ve 3-metil butanal üretimini de arttırmaktadır. Malaksasyon koşulları, hem polifenollerin hem de uçucu bileşiklerin konsantrasyonunda değişiklikleri içeren, ortaya çıkan yağın tadını etkilemektedir [297, 310, 315, 316]. Araştırmalara [297] göre secoiridoid fraksiyonunun toplam miktarı, malaksasyon süresinden olumsuz olarak etkilenmiştir. Araltırmaclar, fenolik konsantrasyonun endojen oksidoredüktaz enzimlerinin aktivasyonuna indirgenmesine bağlanmışlardır. Sıcaklık 25°C'den 35°C'ye yükseltildiğinde daha büyük kayıplar ortaya çıkmaktadır [315]. Malaksasyon sıcaklığı, özellikle hidroksitirosol içeren türevlerin konsantrasyonunda belirgin bir düşüşe neden olmaktadır. 20-30°C aralığında artan malaksasyon sıcaklıkları, yağlarda lipokrom ve diğer fonksiyonel sabunlaşmayan bileşenlerin (uçucu maddeler hariç) konsantrasyonlarının artmasına neden olmuştur. Genel olarak, malaksasyon adımı sıcaklık esas olarak amino asit dönüşüm yolağın aktivasyonu yoluyla 2-metil butanal ve 3-metil butanal içeriğinin çok yüksek miktarda üretiminden, daha az çekici algılayıcılığa sahip olan düşünülen hekzan-1-ol ve trans-2-hekzen-1-ol'un artışından, secoiridoid bileşiklerin önemli kayıplarından ve yağların duyuşsal özelliklerinden sorumludur [297]. Zeytin macunlarının reolojisine göre, 30 ila 45 dakika arasında değişen macun malaksasyon süresi, elde edilen yağın kalitesi ve miktarı konusunda tatmin edici sonuçlar vermektedir. Malaksasyon, natürel birinci zeytinyağı için mekanik ekstraksiyon işleminde en kritik noktalardan biri olarak kabul edilmiştir. Aslına bakılırsa, malaksasyon aşaması, sürekli bir ekstraksiyon işleminde tek süreksiz fazdır. Yakın gelecekte, natürel birinci zeytinyağının endüstriyel tesisi üretim sektörünün temel zorluğu, sürekli olan bir aşamada süreksiz malaksasyon adımını dönüştürmek ve endüstriyel tesislerin çalışma kapasitesini geliştirmek için gelişmiş makineler tasarlamak ve inşa etmektir. Malaksasyon süresini azaltmak ve yağ kalitesini arttırmak için, geleneksel yöntemle karşılaştırıldığında iki ultrason işlemi denenmiştir [317]. Selenleme işlemi, bir su banyosuna (parçalamadan önce) ve zeytin macununa (parçaladıktan sonra) batırılmış zeytinlere uygulanmıştır. Daha iyi ekstrakte edilebilirlik ve daha yüksek minör bileşikler, zeytin banyosundan bir su banyosuna batırılmış zeytinlerin sonikasyonunda elde edilmiştir. Malaksör fiçileri, içinde paslanmaz çelikten imal edilip yarı silindirik veya yarı küresel şekilde olmaktadır. Dik veya yatay rotorlar ve bir dış hazneden geçen sıcak su (45-

50°C) kullanan bir ısıtma sistemi vardır. Döner kollar, 15-20 rpm'de yavaşça dönerek macunu karıştıran, farklı şekil ve boyutlarda özel olarak tasarlanmış paslanmaz çelik bıçaklarla donatılmıştır. Zeytin macununun oksidasyonuna karşı, ketenleme işlemi sırasında korunmak için makineler, gerektiğinde hafif basınç altında inert bir gazla (nitrogen) çalışacak şekilde tasarlanmıştır. Bazen, malaksör macunu daha fazla emülsiyonlaştırabilip yağ verimi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olabilmektedir. Bu, bıçakların hareketi çok hızlı olduğunda ve sıcaklık ve süreler işlenmekte olan macunun reolojik özelliklerine uygun şekilde ayarlanmadığında gerçekleşmektedir. Sızma zeytinyağı endüstrisi ekstraksiyon işleminde ultrason sistemlerinden yararlanabilmektedir. Nitekim olarak, ultrasonlar ürünün kalitesini artırarak, malaksasyon süresini azaltabilmektedir. Üstelik, ultrason teknolojisi, zeytin yoğurmasının (malaksasyonunun) daha hızlı ısıtılmasını, ekstrakte edilebilirlik işlemi gelişmelerini ve sonuçta meydana gelen yağlarda yüksek oranda küçük bileşik içeriğini sağlamaktadır. Peroksidaz ve polifenoloksidaz gibi oksidoredüktazlar üzerinde sıcaklığın etkisi araştırıldığında zeytin peroksidazın 37°C'de en yüksek aktiviteyi gösterdiği, polifenoloksidazın ise yaklaşık 50°C'de optimum aktivite sergilediği gözlenmiştir. Test edilmiş zeytin çeşidinde ve malaksasyon işlemi sırasında uygulanan sıcaklıklara göre büyük bir varyasyon oluşmuştur. Daha yüksek malaksasyon sıcaklıklarını takiben elde edilen sızma zeytinyağında bulunan fenol konsantrasyonunda bir artış olabilmektedir. Ama, 27°C'den yüksek bir malaksasyon sıcaklığının sızma zeytinyağı kalitesini düşürdüğü görüşünü dikkate alınabilmektedir [207]. Genel olarak, zeytinlerin işlenmesi sırasında ortaya çıkan veya oluşan sızma zeytinyağının fenolik bileşikleri, su (zeytin meyvesinde mevcut olan antioksidan oranının yaklaşık %53'ü) ve yağ fazları (%1-2) arasında dağıtılmaktadır. Fenoliklerin başka bir kısmı (yaklaşık %45) katı fazda (prina) tutulmaktadır [318]. Su ve yağ arasında fenolik bileşiklerin serbest bırakılan miktarın dağılımı, bu iki fazın her birinde çözünürlüklerine bağlıdır. Sonuç olarak, fenoliklerin sadece bir kısmı yağ fazına girmektedir [207].

### b.5. Zeytin macunundan zeytin yağının ayrılması (İşleme sistemleri)

Küçük çekirdek parçaları (çukur), parçalamış zeytinlerin hücre kalıntıları, su ve zeytin yağı olarak zeytin macununun ana bileşenleridir. Yağın diğer bileşenlerden ayrılması için basınç, santrifüjleme veya seçici bir filtrasyon işlemi uygulanabilmektedir. Genel olarak, bugün kullanılan işleme sistemleri, % 25-30 arasınıda düşük nem içeriğine sahip olan prina ve %45'ten fazla yüksek nem içeriğine sahip olan prina olarak sonuçlananlara bölünebilmektedir. İşleme sistemleri, basınçlı (geleneksel) zeytinyağlı değirmenleri birinci tibi olarak, iki fazlı ve üç fazlı santrifüj zeytinyağı değirmenleri olan santrifüj ikinci tibi olarak ve seçici filtrasyon (Sinolea) ve santrifüjleme dayalı olan kombinasyon zeytinyağı değirmenleri üçünü tip olarak sınıflanmaktadır [207]. İşleme sisteminden bağımsız olarak, yüksek kaliteli bir ürünün elde edilmesi ve düşük maliyetlerle optimum proses veriminin elde edilmesi için işlem otomasyonu gerekli olmaktadır [319]. Önemli kimyasal özelliklerin sürekli olarak ölçülmesi için sensörlerin ve dedektörlerin kullanılması önemli teknik faydalara sahip olabilmektedir. Çevreye duyarlı kalite kontrolüne ve sızma zeytinyağlarının karakterizasyonuna yakın kızılötesi (NIR) geçirgenlik spektroskopisi uygulanabilmektedir. Sızma zeytinyağı aroması ile ilgili olarak, zeytin macunlarının analiz edilmesi için elektronik koku alıcılar kullanılabilmektedir [311]. Sızma zeytinyağı işlenmesi sırasında uçucu bileşiklerin evriminin çevrim-içi olarak izlenmesi, kültivar, olgunlaşma aşaması, sağlık yönleri ve diğerleri gibi ürün tipine göre sızma zeytinyağı duyuşal kalitesinin iyileştirilmesi için atmosfer, sıcaklık ve süre olarak malaksasyon koşullarının tanımlanması için çok yararlı olabilmektedir. Elektronik dilleri, zeytinyağının ekstraksiyonunun kontrolünde de umut verici bir tekniktir [207, 320].

#### *b.5.1. Presleme*

Presleme, kombine bir katı / sıvı kütlesi olduğunda, prensibe dayanmakta, içinde zeytin ezmesi gibi, baskıya maruz kaldığında sıvı hacminden dolayı kütle hacmi azalmasıya yağlılar, paspasların ve taş parçalarının drenaj etkisinin yardımıyla zorlanmakta ve katı fazdan ayrılmaktadır. Filtrasyon ile karşılaştırılabilecek bir işlem ve aslında aynı kinetik özellikleri paylaşmasına rağmen ama daha karmaşıktır. Normal bir filtreleme işleminde, filtre yatağının hacmi sabitlenirken, drenaj kanallarının hacmi, katı maddeleri kanalların tamamen tıkanmasına

kadar orada biriktiğinden yavaş yavaş azalarak sıvının akması önlenmektedir. Macuna basıldığında, filtre yatağın değişken olduğunda ve drenaj kanallarının hacmi deşarj edilen sıvı miktarı ile tam orantılı olarak azalarak tüm sıvı zorlandığında sıfırlanmaktadır. Otomatik macun dağıtıcıları, paslanmayı, taş değirmenlerinden macunu kabul eden bir yoğurma makinesiyle işbirliği yaparak paspasların üzerine uygulamak için kullanılmaktadır [207].

Bu işlemde, yağın zeytin parçalamasından ayrılması için basınç uygulanmaktadır. Zeytin yağının elde edilmesi için zeytin meyvesinin işlenmesinde en eski ve en yaygın yöntemdir. Zeytin ağacı yetiştiriciliğinin başlangıcından beri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, basınç süreci yıllar içinde büyük ölçüde değişmiştir. Çok eski yağ değirmenleri, yağ ayırımı, insan ya da hayvan gücü tarafından baskı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Hidrolik presin (sıkma) icadı, eski zeytinyağı değirmenlerinin işletilmesi için bir devrimmiş. Hidrolik presler gelişmiş geleneksel zeytinyağı tesislerinde hala kullanılmaktadır. Presleme sisteminde, parçalamadan ve malaksasyondan sonra elde edilen zeytin macunu yağ diyaframlarına yerleştirilmektedir. 2-3cm kalınlığında zeytin macunu, her diyafram üzerine eşit olarak yerleştirilmektedir. Inox disk diyaframları, her beş paspas arasına yerleştirilerek şarj basmak için eşit dağılımlıdır. Basınç, merkezi çivili bir arabaya yerleştirilen zeytin macunu ile yayılmış büyük bir paspas yığına uygulanmaktadır. Merkezi baştaki delikler, sıvı fazların istifin ortasından dışarı akmasına sağladıklarından dolayı su ile zeytin yağı karışımı olarak yağlı fazların porsiyondan ayrılmasının iyileştirilmesi için belirleyici bir faktör olmuştur. Paspasların ve disklerin büyük yığını açık bir monoblok iskele ve 35-40 cm çapına sahip olup alttan kazık iter bir piston tarafından oluşturulan presin altına yerleştirilmektedir [207].

Yağ diyaframları, diyaframların düz bir şekilde yerleştirilmesini sağlamak ve sistem hidrolik basınca maruz kaldığında herhangi bir hareketi önlemek için bunları desteklemek üzere delinmiş bir silindir kılavuzuna sahip olan hareketli bir üniteye yerleştirilmektedir. Tek bir uygulama ve daha kararlı bir yük elde etmek için her 3 veya 4 diyaframdan sonra bir metal tepsi ve zeytin macunu içermeyen bir diyafram yerleştirilmektedir. Hareketli ünite, yükü ile bir hidrolik basınç ünitesinin altına yerleştirilmektedir. Basınç uygularken, su ve yağ olarak sıvı fazları zeytin macunundan ayrılmaktadır. Böylece, diyaframlar filtreleme aracı olarak çalışmaktadır. Bir filtreleme işlemi olarak basıncın kinetiği, Carman'ın denklemine dayanmaktadır. 1994 yılında



Di Giovacchino [321] tarafından aynı denklem uygulanmıştır. Uygulanan basınç, macunun türüne bağlıdır. 100-150 kg /cm<sup>2</sup> arasında olan düşük basınç uygulanarak daha iyi bir yağ elde edilmektedir. 1975 yılında iki ayrı çalışmada çeşitli faktörlerin baskı sürecini etkilediklerini bildirilmişlerdir. Dahası 1994 yılından sonra iki ayrı araştırmacılar [310, 321] tarafından, basınç sürecinin avantajlarını ve dezavantajlarını özetlenmiştir.

Günümüzde, basınç ekstraksiyonu normal olarak pistonun alanında ifade ederek 400 atmosfere kadar olan bir servis basınçla hidrolik süper-preslerde gerçekleştirilmektedir. Süper presler, tek bir pres modunda, 45-60 dakika içinde maksimum değere kadar basınç artışıyla, 10-20 dakika daha yüksek basınçta kalarak çalışmaktadır. Preslemeden sonra, sıkışmış malzemeyi paspaslardan durulamak ve yağlı maddeyi berraklaştırmak için az miktarda su kullanılmaktadır. Uygulamada, prina nem oranı yaklaşık %28 bulunduğunda %86-90'lık bir işleme verimi elde edilmiştir. Dolayısıyla bu yöntem, zeytinlerin kalitesi ve paspasların durumu da iyi olmak kaydıyla, tüm işlem boyunca kısa işlem süresi ve düşük sıcaklıklar nedeniyle en iyi kalitede bir yağ garanti etmektedir. Bitkisel lif paspaslarının eski dezavantajı, artık daha kolay temizlenen inert polipropilen fiber paspaslar kullanılarak tamamen ortadan kaldırılmıştır [207].

### *b.5.2. Santrifüj işlemi*

Basınç işlemine kıyasla santrifüjleme, zeytin macunundan yağın ayrılması için kullanılan nispeten yeni bir işlemdir. Santrifüjleme işlemi, çözünmeyen katılar, su ve zeytinyağı gibi zeytin macunu bileşenlerinin yoğunluğunda farklılıklara dayanmaktadır. Birbirine karışmayan sıvıların ayrıştırıldığı hız, merkezkaç kuvvetine maruz kaldıklarında, Stoke yasası tarafından yönetilmektedir [321]. Yağın ayrılması yatay bir santrifüj (dekantör) ile gerçekleştirilmektedir. Bir santrifüj ayırıcı (dekanter) verimi, açısal hızı ( $\omega$ ), döner kollarından uzaklık ( $r$ ), santrifüj ivmesi ( $\omega^2 r$ ) ve yerçekimi ivmesi ( $g$ ) arasındaki ilişki açısından belirlenmektedir. Santrifüj hareketi  $G = \omega^2 r / g$  ile 2500-3000 G gibi yüksek değerlere ulaşabilmektedir. Parçalamadan ve malaksasyondan sonra, zeytin macunu içinde bulunan zeytinyağı ya tamamen ya da mikrojellerin içinde küçük damlacıklar şeklinde ya da sulu fazda emülsifiye edilmektedir. Yağın çoğu serbest olduğunda yağın santrifüjleme ile ayrılması çok daha kolaylaştırmaktadır [207]. Yatay santrifüjler (dekanterler) silindirik-konik bir kaseden oluşmaktadır. İçlerinde içi boş ve sarmal

kanatlı benzer şekilli bileşendir. Kasenin döndüğü hız ile iç vida dişlilerinin dönme hızı arasında küçük bir fark, atık suyun, bazı su ile yağ karışımının ve prinanın hareketi ile sonuçlanmaktadır. Zeytin macununun inceltilmesi için gereken optimum su miktarı esas olarak zeytin macunu ve santrifüjün özellikleri ile belirlenmektedir. Eklenen suyun sıcaklığı, zeytin macununun aşırı ısınmasını önlenmesi için düşük olması gerekmektedir. Mevsimsel sıcaklık değişimlerine, meyve ekimine, olgunluk düzeyine ve su içeriğine bağlı olarak değişen zeytin macununun reolojik özellikleri, santrifüj ekstraksiyonunun etkinliğini büyük ölçüde etkilemektedir. Zeytin yağı ekstraksiyonu sırasında bir dekanter santrifüjüne beslenen zeytin macunu kütle akış hızınının kontrol edilmesi için otomatik bir sistemin kurulması amacıyla uygun bir akış kütle sensörünü test edilmiştir [207, 322].

#### b.5.2.1. Santrifüj süreç bölümleri

Sürekli işletme tesislerinin ortaya çıkması, maliyetlerin azaltılmasına ve işleme kapasitesinin artmasına katkıda bulunmuştur. Bu ayırma işlemi, macunun sıvısını emerek çalışan santrifüj kuvvetine dayanmaktadır. Bu ayırma yöntemi, farklı yoğunluklara sahip olan karışmaz sıvıların herhangi bir kombinasyonunun, kendi bileşenlerine kendiliğinden ayrılma eğiliminde olması prensibine dayanmaktadır. Bunun nedeni, doğal yerçekimi kuvveti, yoğunluğa bağlı olarak sıvıları farklı şekilde etkilemektedir. Eğer sadece yerçekimi kuvveti uygulanırsa, ayırma hızı çok yavaş olabilmekte, fakat eğer karışım bir yapay çekim kuvvetine tabi tutulursa, ayırma hızı arttırılabilmektedir. Bu, hızı ve ayırma verimliliği, açılmal hız ve dönme yarıçapı ile doğru orantılı olan ve ayrılması gereken sıvıların yoğunluğunda olan fark ile devir hareketli makineler ile yapılmaktadır. Kullanılan makineler, doğal yerçekimi ivmelenmesinden 3000 kat daha fazla ivme üreten açılmal bir hızda çalışan yatay santrifüjlerdir. Bu kuvvetlere maruz bırakıldığında, yoğun katı parçacıklar döner kase duvarına doğru dışarı doğru bastırılırken, daha az yoğun sıvı faz eş merkezli bir iç tabaka oluşturmaktadır. Farklı baraj plakaları, gerektiği gibi havuzun derinliğini değiştirmek için kullanılmaktadır. Katı parçacıkların oluşturduğu tortu, kaseden farklı bir hızda dönen vidalı konveyör tarafından sürekli olarak uzaklaştırılmaktadır. Sonuç olarak, katı maddeler yavaş yavaş havuzdan ve konik kısmından sürülmektedir [207]. Herhangi bir dekanter santrifüjün çok önemli bölümleri:

### *1. Giriş bölgesi*

Giriş bölgesi, besleme bulamacını kaseinin hızına kadar hızlandırmaktadır. Uygun şekilde tasarlanmış bir giriş bölgesi, besleme katı maddelerinin herhangi bir bozulmasını minimumda tutarak haznede çökeltinin bozulması önlenmektedir.

### *2. Salyangoz taşıyıcı*

İyi dekanter performansının anahtarı, tortulaşmış katıların verimli ve etkili bir şekilde kaydırılmasında yatmaktadır. Bu nedenle salyangoz taşıyıcının tasarımı çok önemlidir.

### *3. Katı boşaltma bölümü*

Uygulamaya bağlı olarak, ayrılan katıların kıvamı kuru tozdan bir macuna kadar değişebilmektedir. Bu nedenle, boşaltma bölgesinin konfigürasyonu, böylesi keklerin mümkün olduğu kadar etkili bir şekilde çıkmasını sağlamak için seçilmektedir.

### *4. Sıvı boşaltma bölümü*

İki fazlı bir dekantörde, sıvı seviyesi baraj plakaları tarafından düzenlenmektedir. Üç fazlı bir durumda çalışırken, her faz bir dizi bord levhası üzerinden gövdeye ayrı bölmeli bölmelere boşalmaktadır. Bazı uygulamalarda, yağı boşaltmak için ayarlanabilen bir eşleme borusu veya bir merkezci pompa kullanılmaktadır. Açıkça, ayırma hızının artırılmasıyla, karışım makinede daha kısa bir süre kaldığında birim zaman başına ayrılan karışım miktarının artmasıyla işleme kapasitesi de artmaktadır. Döndürmenin suyla seyreltilmiş zeytin ezmesi üzerinde meydana getirdiği çalkalama etkisi, iki yağ / su fazının ara yüzeyinde bir emülsiyonun oluşumuna yol açıp küçük bir yağ oranı bitkisel suda kaybolma eğilimi göstererek sonuçlanmaktadır. Geliştirilmiş santrifüjlerin ortaya çıkmasıyla, bu dezavantaj önemli ölçüde azalmıştır. Bununla birlikte, preslere çok yakın olmasına rağmen, santrifüj ekstraksiyon verimleri hala biraz daha düşüktür. Bu tür yönetimlerin artan işleme kapasitesi, işlenmeyi bekleyen değirmen çatılarında bulunan zeytinlerin zamanının uzunluğunu önemli ölçüde azalttığından sonuçta ortaya çıkan yağların ortalama asitliğini düşürüp kaliteyi bu açıdan geliştirilmektedir. Diğer hususlara gelince, daha

yüksek sıcaklıkların ve daha uzun atılma sürelerinin, zeytin ezmesini seyreltmek için sıcak su kullanımı ile birleştiğinde, kısmen yağın stabilitesini ve tadını veren küçük bileşikler çıkardığı kabul edilmiştir [207].

#### b.5.2.2. Santrifüj tipi zeytinyağı değirmenleri

Sürekli santrifüjleme, yaprakların ayrılması ve yıkanması, zeytinlerin parçalaması, zeytin macununun malaksasyonu ve "üç fazlı" veya "iki fazlı" moda göre su ilavesiyle veya su ilavesi olmadan santrifüjleme olarak aşamaları içermektedir.

##### *1. Üç fazlı Santrifüjleme*

Yıllar boyunca, santrifüj ekstraksiyonu uygulanan zeytin pastaları, fraksiyonların farklı spesifik ağırlıklarla ayrılmasını kolaylaştırmak için oldukça akışkan gerektiği için zeytin meyvelerinin ağırlığının yaklaşık %40-60'ına eşdeğer ılık su ekleyerek yapılmıştır. Su ile inceltilmiş macun, dekantörde santrifüjlenmektedir. Yağlı bir su, eklenmiş su (zeytinyağı değirmeni atık suyu) ve prina (taş ve pulpa artığı) ile karıştırılmış atık su olarak üç faz olarak ürünler elde edilmektedir. Bu işlemin dezavantajları, basın ekstraksiyonundan 1.25 ila 1.75 kat daha fazla su kullanılarak su kullanımının artması, su fazında doğal antioksidanlar gibi değerli bileşenlerin kaybı ve zeytinyağı değirmeni atık suyunun atılması problemlerini içermektedir. Bu problemi azaltmak için, su fazı, dekantörden çıktığı anda, macunun dekantörde bırakıldığı pompaya enjekte edilerek zeytin macununun inceltmesi için geri dönüştürülebilmektedir. Bu teknik, atık suyun hacminin yaklaşık %35 oranında azaltılmasını ve yağın toplam polifenol içeriğinin yaklaşık %30 oranında iyileştirilmesini mümkün kılmıştır. Yeni de uygulama üretilen yağın kalitesini olumsuz yönde etkilemekte ve artık pek kullanılmamaktadır. Zeytinyağının zeytin macunundan ayrılmasını kolaylaştırılması için suyun dekantöre ilave edildiğinde üç fazlı santrifüj tipi zeytinyağı öğütücülerinin atık suları tarafından yaratılan sorun, daha iyi yağ kalitesi için talebinde ve tarımda kullanım için geri dönüştürülmesinde bulunan zorluklardan oluşmaktadır. Bunlar üç fazlı dekantörün modifikasyonunun sebebi olmuştur [207].

## 2. İki fazlı santrifujleme

Uygun bir sonu boru atık su arıtma teknolojisini geliştirmek için yetmezliğinden iki aşamalı bir işlem geliştirmek için teknoloji üreticileri için fırsat vermiştir. Burada hiçbir su işlemi kullanmamasıyla, sıvı faz olarak yağ vermekte ve daha etkili bir santrifujleme teknolojisi kullanarak katı faz olarak çok ıslak bir zeytin posası vermektedir. Bu teknoloji, su tedariki kısıtlı ve / veya sulu atık sularının azaltılması gerektiğinde özel ilgi çekmiştir. Taze zeytin kullanıldığında, macun su ilave olmadan üretilirken, kurutulmuş zeytinler kullanıldığında, az miktarda su eklenmektedir. Yağ ve prina olarak katı ile su karışımı olarak zeytin macunu iki fazın elde edildiği dekantörde santrifuj edilmektedir. İki fazlı sürece dayanan dekantörler birkaç şirket tarafından geliştirilmiştir. İki fazlı dekantörlerin performansı, geleneksel üç fazlı ekstraksiyon süreci ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve üç fazlı işlemine benzer verimlerde zeytinyağı üretildiği, fakat polifenoller ve difenol içerik bakımından üstün bir kaliteye sahip olduğu bulunmuştur. Ek olarak, iki fazlı işlem, yağ ekstraksiyonu sırasında atık su üretmemiştir. İki fazlı boşaltma, su gereksinimlerini azaltmaktadır [207].

Birinci iki fazlı santrifuj pompasından elde edilen macunun malaksasyon ve uygun seyreltilmesinden sonra ikinci bir üç fazlı santrifujün uygulanması, son prinanın neminin azaltmasına rağmen sadece küçük bir yağ yüzdesi geri kazanılmaktadır [323]. Bu yağın rengi yeşil ve daha yüksek alifatik alkollere, balmumlarına ve triterpen alkol içeriğine sahip olmaktadır. Yağlı macunun su eklenmeden iki faza (yağ ve yağlı prina) ayrılmasını sağlayan yeni santrifujler (dekantörler) geliştirilmiştir. İki fazlı dekantörde zeytinyağı için çıkış ve katı maddeler için diğer çıkış olarak iki çıkış var ama üç fazlı dekantörde atık su çıkışı dahil olmak üzere üç çıkıştan oluşturulmaktadır. İki fazlı dekantörler ticari amaçlar için ekolojik olarak adlandırılmaktadır. Bunlar, en önemli zararlı atık fraksiyonun ortadan kaldırılması ve zeytin yağı, yüksek fenol içeriği olmak üzere birçok avantajlara sahip olduğunu görünmektedir [310, 321]. Böyle bir yağın çok fonksiyonel ve nutrasötik değeri vardır. Bununla birlikte, iki fazlı dekantör tarafından üretilen prina, üç fazlı dekantörler olarak geleneksel santrifujlerden elde edilen nem içeriğinden daha fazladır. Bir araştırmacıların grobu tarafından iki karşı üç fazlı santrifuj ile üretilen yağda bulunan önemli ölçüde daha yüksek fenolik içeriğine, daha yüksek hidroksitirosole içeriğine, daha yüksek tirosol içeriğine, homovanillik alkol seviyelerine ve

vanilin içeriğine atfedildiğini bildirilmiştir. Santrifüj sisteminin yağların fonksiyonel özellikleri üzerinde etkisinin değerlendirilmesi, iki fazlı dekantör yağının belirgin üstünlüğünü göstermiştir [324]. Üç fazlı dekantörden elde edilen yağa kıyasla, daha yüksek ferrik indirgeme kapasitesi, serum lipid gecikme süresinin uzaması ve uyarılmış insan mononükleer hücrelerinin sitokin tepkisinde azalma göstermiştir. Genel olarak, zeytinyağı değirmeni ve uygulanan koşullar, yağın kalitesini ve fonksiyonel özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir [207].

#### b.5.2.3. Seçmeli filtrasyon (Sinolea) süreci

Basınç ve santrifüjlemenin yanı sıra, zeytin yağının zeytin macunundan ayrılması için santrifüj ile kombine edilmiş seçici filtrasyon (Sinolea) kullanılmaktadır. Seçici filtrasyon, bir çelik levha ile temas halinde bulunan yağ ve suyun farklı ara yüzey gerilimlerine dayanmaktadır. 1911 yılında ilk perkolasyon ekstraktör versiyonu “Acapulco” olarak, 1930 yılında ikinci versiyonu “Acapulco-Quintanilla” olarak ve 1951 yılında İspanya’da üretilen üçüncü versiyonu “Alfin” olarak adlandırılmıştır. Perkolasyon ekipmanında sürekli iyileştirmeler gerçekleştirilmiştir. 1972 yılında her iki kaplamaya (Sinolea Sistemi) ve santrifüjlemeye dayanan bir işlem sistemi tanıtılmıştır. Yağın ara yüzey gerilimi sudan daha az olduğundan çelik levha zeytinyağı içine daldırıldığında yağ ile kaplanmaktadır. En yaygın bulunan seçici filtrasyon sistemi Sinolea ünitesidir. Her biri altta paslanmaz çelik bir ızgara birimi bulunan, yaklaşık 350-370 kg zeytin macunu işleyen bir veya daha fazla üniteden oluşmaktadır. Izgara ünitesinde yarıklardan beş ila yedi bin hareketli tabaka yarılarak yavaşça pistonlu hareketle macunun içine işlemektedir. Macun kıvrılan mekanik kol için en iyi dönme hızı 7.5 rpm'dir. Çelik levha macun içine hareket ettirildiğinde, tercihen damlayan yağ ile kaplanacak ve neredeyse sadece yağdan oluşan yağlı bir akış oluşturacaktır. Bu işlem birkaç kez tekrarlandığında, yağın çoğu macuntan geri kazanılmaktadır. Sinolea, paslanmaz çelik yarı silindirik bir ızgara ve yer çekiminde yarıklar boyunca hareket eden birçok küçük bıçaktan oluşmaktadır. Bıçakların hareketi yavaş olduğundan dolayı sürekli olarak yenilenirken zeytin macununa daldıklarında, yağ ile kaplanmaktadır. Bıçaklar geri çekildiğinde yağ bıçaklardan damlamaktadır. Gerçekte, Sinolea ekstraktör ile 30 dakikadan maksimum 60 dakikaya kadar uygun bir süre boyunca, yağın %50-70'i macuntan ekstrakte edilmektedir. Verim, zeytinlerin çeşitliliğine, ekstraksiyon süresine ve macunun reolojik özelliklerine bağlıdır. Geri kalan yağın elde edilmesi için, zeytin macunu daha da

nemlendirilmek, yeni birleştirme işleminden geçirilmek ve santrifüje tabi tutulmaktadır. Daha detaylı olarak geri kalan yağlı macun, 20-40 dakika boyunca ek bir malaksasyondan sonra, su ile inceltildikten sonra kalan yağın ana kısmını geri kazanmak için 3 fazlı bir dekanter ile santrifüj edilmektedir. Seçici filtrasyon işlemiyle elde edilen yağa “Sinolea yağı” denip “birincil” yağ olarak kabul edilebilmektedir. Bu yağ, Zeytin meyvesinin doğal bileşimini ve duyuşal özelliklerini korumakta ve yüksek bir fonksiyonel değere sahip olmaktadır. Bu işlemle elde edilen yağa “dekanter yağı” denmektedir. Santrifüji ve seçici filtrasyon olarak iki işlemin kombinasyonu, yüksek verim ile sonuçlanmaktadır. Kombine seçici filtrasyon ve santrifüjleme iyi bir işleme sistemini olmasına ve iyi kalitede bir yağ üretmesine rağmen maalesef yaygın olarak kabul edilmemiştir. Sinolea yağı, perkolasyon, ortam sıcaklığında, su eklenmeden ve paspas kullanılmadan gerçekleşerek herhangi bir kirlenme olasılığı önleendiğinden dolayı yüksek polifenol içeriğine ve mükemmel organoleptik özelliklerine sahip olarak yüksek kaliteli bir sızma yağıdır. Kombine işlem, presleme ile elde edilenlere benzer verimlerde kaliteli bir yağ üretmekte, fakat sürekli olması, maliyeti düşürmesi ve kapasiteyi arttırması avantajına sahip olmaktadır [207].

#### b.5.2.4. Zeytinyağının son santrifüjü

Uygulanan işlemde, yani basınç, santrifüj veya seçici filtrasyondan (Sinolea) bağımsız olarak yağın son bir santrifüjüne ihtiyaç vardır. Böylece, bir miktar su içeren yağ, yağın son ayrılması ve arıtılması için 6000 ila 7000 rpm'de dönen dikey bir santrifüjden geçilmektedir. Santrifüj, çok hızlı bir şekilde dönen stabil ve hareketli bir parçadan oluşmaktadır. Santrifüj ünitesine çok sayıda koni şeklinde olan diskler takılmıştır. Sıvı faz, ince tabakalar halinde toplam yüzey üzerine dağıtıldıktan sonra dikey santrifüjde santrifüjlemesiyle yağın sudan ve diğer maddelerden nihai olarak ayrılmasına neden olmaktadır [207].

#### b.7. Zeytinyağının ambalajlanması ve ambalaj malzemelerinin zeytinyağının kalitesine etkisi

Zeytinyağının uygun şekilde ambalajlanması, dağıtım ve pazarlama için yeterli ürün ömrünü garanti eden koşulları sağlayacaktır. Ambalaj malzemesinin fiziko-kimyasal özellikleri, etkileşimlerin boyutuna bağlı olarak, yağın kalitesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Migrasyon ve çimlenme, yağın kalite ve güvenlik yönlerini daha da etkileyen zeytinyağı ve ambalaj malzemesi arasında oluşabilecek etkileşimlerdir. Zeytinyağı şişeleme ve paketleme için kullanılan malzemeler arasında alüminyum, cam, fiberglas, plastik, paslanmaz çelik, plastik kaplı karton ve teneke bulunmaktadır. En yaygın konteynerler cam, plastik ve teneke şişelerdir [207, 237].

#### b.6. İşleme sistemlerinin zeytinyağı kalitesi ve fonksiyonel özelliklerine etkisi

Çeşitli ekstraksiyon sistemlerinde elde edilen yağın katı maddelerden ve atık suyundan ayrılması için son bir işlemde geçilmesini gerekmektedir. Bir arıtıcı veya çökeltme tankı ile, parçacıklar ve sıvı fazlar dibe incek, ama kontrol eksikliği ve gerekli zamanın uzunluğu, modern endüstriyel süreçler için uygun olmayan doğal çökeltme yapılmasını sağlamaktadır. Bugün, disk istifi kendinden temizlenen bir kase ile santrifüjler yapar ve bu işi arıtıcı olarak bilinmektedir. Esas olarak üç fazlı ayırma arıtıcı, katıların aynı anda ayrılması dahil olmak üzere iki karışmaz sıvının ayrılması için kullanılmaktadır. Bu birimin hızla döndürülmesi, yer çekiminin etkisinin, kontrol edilebilen bir merkezkaç kuvveti ile değiştirildiği anlamına gelmektedir. Bunun etkisi, sıvılar içinde süspansiyon haline getirilmiş katı maddeler üzerinde yerçekiminden 10,000 kat daha fazla olabilmektedir. Bu kuvvetlere maruz kaldığında, yoğun katı parçacıklar döner kase duvarına doğru dışarı doğru bastırılırken, daha az yoğun sıvı fazlar eş merkezli iç tabakalar oluşturmaktadır. Birçok ekstraksiyon sisteminden elde edilen yağlı macunlar, macunun karışımının %25 - % 35'i dengeli olan küçük bir miktar su ilavesiyle, saf yağ ve ayrılmış suyun elde edildiği disk istifine santrifüje beslenmektedir. Katılar sürekli olarak disk santrifüjünden boşaltılmaktadır.

İşleme sistemlerinin zeytinyağı kalitesi üzerinde etkisini inceleyerek asitlikte, esas olarak küf özneliği gibi duyuşal özelliklerinde ve peroksit değerinnde etkilediğini bulunmuştur [325].



İşleme sistemi  $\Delta$ -5-avenasterol, heksacosanol, tetracosanol ve diğerleri gibi bazı zeytinyağı kimyasal bileşiklerinin değerlerini etkilemektedir [326-328]. Basınçla elde edilen yağın santrifüjleme ile elde edilenlerden daha fazla miktarda polifenol içerdiğinden dolayı daha yüksek bir fonksiyonel değere sahip olduğunu bildirilmiştir [328]. Uygulanan işleme sistemi ve koşullar, yağın hem karotenoidlerini ve klorofillerini bozabilmekte hem de fonksiyonel aktivitesini azaltabilmektedir. Santrifüj tipi makineler kullanılarak ekstrakte edilen ve karanlıkta cam kaplarda tutulan yağ örneklerinin klasik yöntemle elde edilenlerden daha yüksek peroksit değerlerine sahip olduğunu gözlemlenmiştir [329]. Ancak, kaliteli zeytin meyvesinden elde edilen zeytinyağlarının, kullanılan işleme sisteminden bağımsız olarak karakteristiklerinde farklılık göstermediğini not alınmıştır. Bu parametrelerin değerleri temel olarak zeytinlerin kalitesine ve işlenmeden önce zeytin üzerinde olan enzim etkisine bağlıdır [321]. Yağın polifenol içeriği ile endüksiyon zamanı arasında kuvvetli doğrusal bir korelasyon gözlemlenmiştir. Yağın indüksiyon zamanı toplam polifenol içeriği ile bir ilişkilene sahip olduğuna göre santrifüjleme ile elde edilen zeytin yağlarında indüksiyon zamanı önemli ölçüde düşüktür. Santrifüjlü zeytinyağı değirmeninde kullanılan su, polifenol hidroksitirosolü büyük ölçüde gidermektedir. İki fazlı dekantör işlemleriyle elde edilen zeytinyağı, üç fazlı işlemde daha fazla fenolik bileşen içermektedir. İki fazlı dekantrandan elde edilen zeytinyağı üç fazlı dekantrandan elde edilen yağa kıyasla daha yüksek miktarlarda çimenli aromalı en önemli aroma bileşeni olarak trans-2-heksenal, hidroksitirosol, orto-difenoller, polifenoller, tokoferoller ve toplam aroma uçucu bileşikler içermektedir. Bu, yağın daha yüksek fonksiyonel ve besin değerini göstermektedir [323].

Presleme, daha az enerji tüketimi daha az nem ve daha az yapı maliyeti olarak avantajları ve daha fazla iş gücü gerekli, zeytin diyaframında temiz tutulma zorluğu, zeytin ezmesi ve yağın atmosferik oksijene daha fazla maruz kalması olarak dezavantajları özetlenmiştir. 3-fazlı dekantör, nispeten kuru prina üretmesi ve daha kolay ekstraksiyon işlemini sağlaması olarak avantajları ve daha fazla su tüketimi, ekstra suyu ısıtmak için yüksek enerji maliyeti harçalaması, fazla miktarda atık su üretmesi, polifenollerin kaybı olarak dezavantajları özetlenmiştir. 2-fazlı dekantör, zeytin ezmesine daha az su eklendiğinden su ve ısı tasarrufu sağlaması ve yağ daha yüksek polifenol içeriğiyle üretmesi ve sürekli akmaya sahip olması gibi avantajları ve yüksek neme sahip prina üretmesi ve daha zor ekstraksiyon işlemesi gibi dezavantajları

özetlenmiştir. Seçmeli filtrasyon (Sinolea), dekantör veya pres sistemi ile bağlantılı olarak daha fazla yağ çıkarılması, eşsiz sinolea kalitesinde yağ üretilmesi gibi avantajları ve sinolea ünitesini temizlemek zor olması, daha fazla genel maliyetine sahip olması ve daha fazla bakım lazım olması gibi dezavantajları özetlenmiştir [207, 237, 310].

#### 6.8. Yan ürünleri ve önemi

Atıksu, prina ve zeytin yaprağı, farklı işlemlerin uygulanmasıyla ayrılabilen çok önemli bileşenleri içeren yağ meyvesinin ana yan ürünleridir [330-340]. Genel olarak, zeytinyağı yan ürünleri, iyi bir fenolik bileşik kaynağı olarak kabul edilmektedir. Zeytin yaprağı, önemli fonksiyonel değere sahip bir yan ürün olarak kabul edilmektedir [207, 315].

Zeytinyağı ekstraksiyonu, tüm Akdeniz bölgesi boyunca eski bir tarım endüstrisidir. Bugüne kadar birçok ülke için ekonomik açıdan çok önemlidir. Yüzyıllar boyunca sadece küçük değişikliklerle kullanılan geleneksel presleme olarak ve son yıllarda zeytinyağı endüstrisinin devrıldığı santrifüjleme olarak iki yağı çıkarmanın yolları vardır. Üç fazlı ve iki fazlı sistemler olarak adlandırılan iki santrifüjleme sistemi vardır. Geleneksel sıkma nispeten eski bir teknoloji olmasına rağmen, bazı zeytinyağı üreticileri tarafından hala kullanılmaktadır. Sıkma işleminden sonra “zeytin kek” adı verilen bir katı ürün, geri kalan zeytinyağı atık suyundan ayrılarak zeytinyağı içeren bir emülsiyon ile birlikte yan ürünler olarak elde edilmektedir. Modern zeytin değirmenlerinde baskın bir süreç olan sürekli üç fazlı ekstraksiyon prosesi, “orujo” veya “zeytinli kek” denilen ıslak bir katı kek (material% 30 hammadde ağırlığı) olarak ve bir sulu “alpechin” veya zeytinyağı değirmeni atık suyu denilen sıvı (% 50 hammadde ağırlığı) olarak iki atık akışı üretmektedir [341]. Bu sistemin presleme (sıkıma) ile karşılaştırıldığında daha az alan gerekli, daha iyi yağ kalitesi ve tam otomasyon gibi belirgin avantajlarına rağmen daha fazla su ve enerji tüketimi, daha yüksek atıksu üretimi ve daha pahalı tesisatlar gibi bazı olumsuz yönler de sunmaktadır [332]. Doksanlıların başında zeytinyağı kampanyasının zeytinyağı değirmeni atıklarını %75'e kadar azaltan yeni bir santrifüj sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem, su tüketiminde olan azalma nedeniyle “ekolojik” olarak pazara sunulmuş ve katı olan “alperujo” olarak adlandırılan (“zeytin ıslak kabuğu”, “ıslak prina” veya “iki fazlı zeytinyağı değirmeni atığı”) ve sıvı olan (zeytin yağı) olarak iki fraksiyon üretilmesi için “iki fazlı” bir sistem olarak

adlandırılmıştır. Kullanılan ekstraksiyon sistemine bağlı olarak zeytinyağı ekstraksiyonundan kaynaklanan farklı yan ürünler. Zeytinyağı, atık yağ fabrikalarında, atıkta kalan az miktarda yağın çıkarılması için işlenmektedir. Hem ham hem de işlenmiş zeytin keki katı yakıt olarak kullanılabilmekte ama ek olarak hayvan yemine eklenmekte veya malç olarak zeytinliğe geri gönderilmektedir. Artık tohum yağı üretiminin karlılığına ilişkin ekonomik kaygıları sorgulanırken, zeytinli keklerin kullanılma veya ortadan kaldırılması sorunu bu üç alternatiften biri ile yeterince ele alınmaktadır [207, 237, 341].

#### *b.8.1. Zeytin keki*

Prina, yağın çoğunu zeytin macunundan çıkardıktan sonra kalan hamur materyalidir. Prinanın ticari değeri esas olarak hem yağ ve su içeriğine hem de uygulanan yöntem ve işletme koşullarına bağlıdır. Prina kabuk parçaları, posa, çekirdek parçaları ve biraz yağ içermektedir. Proteinler, selüloz ve su ana bileşenleridir [323]. Prina da ürün için önemli bir fonksiyonel değer veren bazı polifenoller içermektedir. Prinada ferulik asit, gallik asit, kafeik asit,  $\rho$ -hidroksibenzoik asit, protokansik asit ve vanilik asit gibi belirgin miktarda fenolik asitler tutulmaktadır. Fenolik bileşenler, aseton veya etanol kullanılarak prinadan ekstrakte edilebilmektedir [342, 343]. Prinada bulunan fenolik bileşenler, diğer yağlar veya katı yağlar için antioksidanlar olarak kullanılabilir fonksiyonel ve besleyici değerlerini arttırmaktadır. Prinanın alternatif kullanımlarına yenilikçi bir yaklaşım önerilmekte ve bu noktada, prinada bulunan bakterilerin hidrokarbon biyobozunması, nitrogen fiksasyonu ve civa direnci için nasıl kullanılabilirliği açıklanmaktadır [344]. Prinada bulunan yağ, nem içeriği, enzim lipaz varlığı ve triaçilgliserol hidrolizini destekleyen mikroorganizmaların gelişmesini nedeniyle hızlı bozulmaya uğramaktadır. Prina yağının asitliği kısa sürede %5'ten %60'a çıkabilmektedir [207, 237, 341]. Asitliğin artışıyla fazla prinanın depolanması sırasında oksidasyon ürünleri (aldehitler ve ketonlar) da oluşturmaktadır. Bu ürünler prina yağının kalitesini önemli ölçüde etkileyip fonksiyonel değeri ortadan kaldırmaktadır. Prina yağının bozulmasını en aza indirmek için, prina mümkün olan en kısa sürede işlenmesi gerekmektedir. Prina, prina yağı ve diğer önemli bileşenleri elde etmek için işlenmektedir [345]. Zeytinyağının zenginleştirilmesi için ekstraksiyonun etkinliğini artırarak ekstraksiyon süresinin ve solvent tüketiminin azaltılmasına olanak tanıyan yeni ekstraksiyon prosedürleri kullanılarak zeytin kekinden ana fenolik

bileşenlerini ekstrakte etmek mümkündür [346]. Bir araştırmacı ve arkadaşları [341] sprey kurutma kullanarak prinadan fenolik bileşiklerin ayırmasını önermişlerdir. Prinadan elde edilen polifenoller, yüksek basınçlı, yüksek sıcaklıkta çalkalanmış bir reaktörle ekstrakte edilmiş ve ilk defa, farklı konsantrasyonlarda kaplama maddesi olarak maltodekstrin kullanılarak püskürtmeli kurutma ile kapsüllenmiştir. Fizikokimyasal, antioksidan özellikleri ve mikropartiküllerin stabilitesi değerlendirilmiştir. Yüksek giriş sıcaklığı, antioksidan özelliklerini etkilemeden daha düşük nem ve yığın yoğunluğu anlamına gelmektedir. Artan maltodekstrin konsantrasyonu daha düşük kütle yoğunluğuna ve daha yüksek mikropartikül boyutlarına neden olurken, daha yüksek besleme akışı artan nem içeriğine yol açmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve termogravimetrik analiz, fenolik bileşikler için maltodekstrin'in termal koruma etkisini ortaya koymuştur. Mikrokapsüller, 5 gün boyunca karanlık koşullarda 5°C'de istikrarlı ama 25°C'ye kadar depolama sıcaklığı arttığında sadece %21 oranında bozulmuştur. UV ışığına maruz kalmış öreğin 48 sonra polifenollerinde %66'lık bir kayıp ile sonuçlanmıştır. Plastik ve diğer malzemelerin üretimi için küçük çekirdek parçacıkları kullanılabilir. Çekirdek ahşabı, taşların kaldırıldıktan sonra çiftlik hayvanlarına besleme olarak kullanılabilir. Taşımacılık ve kullanımı kolaylaştırmak için küçük taneciklere dönüştürülmektedir. Çekirdek ahşabının külü, Ca, K ve P içeriğinden dolayı iyi bir gübredir. Prina yağı sadece arıtmadan sonra tüketilebilir. Bu koku giderme, nötrleştirme ve renk giderimi içermektedir. Prina yağının arıtılmasından elde edilen ürünler arıtılmış prina yağı, bitkin prinası, serbest yağ asitleri ve zeytin sabunu macunu içermektedir. Arıtılmış prina yağı yemeklik sıvı yağ olarak kabul edilebilir. Yağ asidi bileşimi arıtılmış prina yağından farklı yoktur. Yüksek asitli prina yağı, deterjanların piyasaya çıkmasından önce, çoğunlukla ev sabunlarının üretiminde kullanılmıştır [207, 237, 341].

#### b.8.1.1. Kimyasal özellikleri

Ham zeytin keki (orujo) ezilmiş taşlar, kabuk, kağıt hamuru, su (~%25) ve bazı artık yağlar (%4.5-9) içermektedir. Ham zeytin keki yağları ve nötr deterjan lifleri en değişken bileşenlerdir. Lignin içeriği özellikle yüksektir. Ham zeytin keki protein içeriği genellikle düşüktür ve önemli bir kısmı hücre duvarı bileşenlerine bağlanmaktadır. Amino asit bileşimi, glutamik asit, lizin ve prolin eksikliği olan arpa tahıl ile benzerdir. Suda çözünebilir fraksiyonda, ana bileşikler

karbonhidratlardır [347]. Özellikle ılımlı şiddetli koşullar altında glikoz toplam monosakkarit içeriğinin önemli bir bölümünü ve bunu takiben arabinoz, ama şekerlerin çözündürülmesi baskın olarak oligomerik fraksiyonda meydana gelmektedir. Mannitol, %1.5'e kadar önemli miktarlarda bulunmaktadır [207, 347]. İki fazlı zeytinyağı değirmeni atığı olarak elde edilen zeytin posasının özellikleri zeytinli keklerden çok farklıdır. İki fazlı zeytinyağı değirmeni atığı, zeytin meyvesi ve bitki sularından gelen taş parçaları ve hamurları içeren kalın bir çamurdur. Zeytin posasında nem içeriği oranı, ilki fazlı sistemlerinde %65-75 arasında, geleneksel olarak preslenmiş sistemlerinde %22-25 arasında ve üç fazlı sistemlerinde %40-45 arasında değişmektedir [348]. Bu yüksek nem içeriği, üç fazlı sisteminde vejetasyon suyunda bulunan şekerler ve ince katılarla birlikte, iki fazlı çamurun bir hamur kıvamına sahip olmasını ve taşınmasını, depolanmasını ve işlenmesini zorlaştırmaktadır [349]. Zeytin posası yaklaşık %55 tüm bitki örtüsü sularından ve bazen zeytinyağı işleme sırasında zeytinyağı değirmeni içinde eklenen sudan, %22 posadan, %20 zeytinyağı çukuru ve %3 yağdan oluşmaktadır [350]. Bir çalışmada [348] zeytinyağı değirmeni atık suyuna kıyasla, kuru madde içeriğinin zeytin kekinde daha yüksek olduğunu ve kül içeriğinin zeytin kekinde ve iki fazlı zeytinyağı değirmeni atıklarında daha belirgin önemli olduğunu bildirilmiştir. Özellikle ilgi çeken yağsız zeytin posasının temiz yakıt olarak kullanılabilen kükürt az içeriği, gübrelemede yanma külünün kullanılabilen potasyum ve fosfor az içerikleri ve kurutucular içinde sorunlara yol açan şekerler yüksek içeriğidir. İki fazlı zeytinyağı değirmeni atığı çukur ve kabuk parçaları içerdiğinden ligninde yüksektir [348]. Lignin'in kendisi ve diğer organik bileşenlere bağlanma yeteneği, mikroorganizmaların ve enzimlerinin iki fazlı zeytinyağı değirmeni atıklarını bozma kabiliyetini engellemektedir [351]. Bu, iki fazlı zeytinyağı değirmeni atığının ön işlenmeden kompost bir alt tabaka olarak atılmasını zorlaştırmaktadır. Farklı araştırmalar, prinadan izole edilmiş alkolde çözünmeyen kalıntı, çözünen ve çözünmeyen parçaların şeker içeriğini incelemiştir [352]. Taş ve tohum kabuğu şeker bileşimi de nötr bir deterjan lif yöntemi kullanılarak çeşitli zeytin meyvesi çeşitleri için belirlenmiştir [207, 237, 341, 353].

### b.8.1.2. Fiziksel özellikleri

Zeytin posasında en fazla 0.6 mm olan 0.25-1 mm aralığında ince ve orta partiküllerin bir fraksiyonunu bulunmaktadır. Diğer bir maksimum, yaklaşık 1.4 mm'lik ortalama parçacık boyutunda görünmekte ve son olarak, 2 ile 5 mm arasında geniş bir parçacık dağılımı görülmektedir. Yazarlar, bu tip dağıtımlara, Kabuk, kağıt hamuru ve çukurlar gibi kuru zeytin posasının farklı doğada bulunan parçacıklardan oluştuğu gerçeğine atfedmektedirler. Kurutulmuş iki fazlı katı zeytinyağı yan ürününde bulunan zeytin kabuğu, posası ve kavuzu birbirinden ayırt edilmektedir [354]. Ortalama partikül çapı 2 mm olan kabuk parçacıkları, örnekte baskın ve en ağır fraksiyonu (ağırlıkça yaklaşık %85) göstermektedir. Kabuk parçaları hemiselüloz, lignin ve selülozden oluşup makroskobik gözenekli yapısı olmayan kompakt bir görünüme sahip olduğundan suyun çoğunun dış yüzeylerinde adsorbe olması beklenmektedir. Aksine, posa parçacıkları hafif, küçüğe ve sadece ağırlıkça yaklaşık %15'i temsil etmektedirler. Küçük kabuk parçaları iğne şeklinde ve bunların oranı örnekte önemsizdir. İki fazlı zeytin posası, yüksek nem içeriği, yapışkanlığı ve viskozitesi nedeniyle çok karmaşık bir yapıya sahiptir. Reolojik özellikleri kritik olarak nem içeriğine bağlı ve ağırlıkça yaklaşık %50 su içeriğinin altında granüler bir katı olarak kabul edilebilmektedir. Zeytin posası psödopartikülleri, birleştirme matrisi olarak hareket eden ve malzeme dokusuna yüksek plastisite sağlayan sert kabuklu zeytin kabuğu ve küspe yığınlarıdır. Zeytin posası, viskoelastik veya Bingham-plastik malzemelerin özelliklerine sahip, su içeriğine ve belirli bir aparat içinde gerilim koşullarına bağlı olarak, Newtonian olmayan bir sıvıdır [350]. Bu malzemenin higroskopik özelliklerini tam olarak bilmek için farklı sıcaklıklarda (15-50°C) iki fazlı katı zeytinyağı değirmeni yan ürününün nem emme izotermelerini ölçülmüştür. Düşük sıcaklıklarda izotermilerin şekli,  $T < 25^{\circ}\text{C}$ , Brunauer sınıflandırmasına göre tip II katıların karakteristiğidir [207, 237, 341].

### *b.8.2. Atık su (Kara su)*

Zeytinyağı değirmeni atık suyunun yönetimi, Akdeniz ülkelerinde çok önemli bir konu olarak yılda 2.4 milyon tondan fazla zeytin üretilmekte (toplam dünya üretiminin %95'i), ve bunun %90'ı zeytinyağı üretimi içermektedir. Üç fazlı zeytin değirmenleri için üretilen atık suyun öğütülmüş zeytinlerin ağırlığının 1.1-1.5 katı olduğu tahmin edilmektedir [355]. Zeytin üreticileri mevsimsel olarak çalıştiklerinden dolayı ve üretim birimleri küçük olduğundan dolayı genel kural olarak sıvı atıkları üretim sürecinden işlenmemektedir. Günümüzde izlenen en yaygın uygulama, akarsu, nehir, göl ve hatta deniz gibi yakınlarda bulunan alıcılarda zeytinyağı değirmeni atık suyunun ortadan kaldırılmasıdır. Daha spesifik olarak, zeytinyağılı üreticilerin %58'i atık sularını daha büyük su rezervuarları ile sonuçlanan akıntılara atıp %12 doğrudan denize döküp %19'u toprağa boşaltmaktadır. Sonuç olarak, ciddi çevresel sorunlara neden olmaktadır. Zeytinyağı değirmeni atık sularının ortadan kaldırılmasından etkilenen bir toprağın karakterizasyonu ve evrimine odaklanan çalışmalar, iki yıllık tortu giderme işleminin ardından bile, toprağın üst kısmındaki 40 cm'lik kalıntı kirlilik seviyelerinin hala önemli olduğunu göstermiştir [356]. Zeytin değirmenlerinin çoğunlukla zeytin bahçelerinin çoğunun bulunduğu denize yakın konumlandırılması, deniz tatil yerleri gibi yüksek turistik alanlarına olumsuz sosyoekonomik etkilerin büyüklüğünü göstermektedir [207, 237, 341].

Ancak, iki fazlı zeytinyağı değirmeni atığının benzer şekilde işlediğinde, yüksek nem ve karbonhidrat konsantrasyonu nedeniyle büyük zorluklar ortaya çıkmıştır. Üstelik, yüksek nemi nedeniyle, kurutma işlemi maliyetleri önemli ölçüde artıran çok fazla enerji gerektirmektedir [332]. Zeytinyağı değirmeni atık su işlenmesi, ortadan kaldırılması ve kullanılması söz konusu olduğunda durum daha karmaşıklaşmaktadır. Sorunun azaltılması girişimleri 50 yıldan daha uzun bir süre önce başlamış ve henüz kabul edilen ve sürekli kullanılabilen bir çevre dostu ve ekonomik olarak uygulanabilen bir çözüm bulma konusunda henüz çok az bir başarı elde edilmiştir. Zeytinyağı değirmeni atık suyu bulanık bir sıvı, emülsiyonlaştırılmış yağ içeren sulu, koyu renkli ve kötü kokulu ve kolayca fermente edilebilmesinin kabiliyetine ve yüksek organik içeriğe sahiptir. Aşağıdakiler gibi çeşitli olumsuz etkilerden dolayı son derece rahatsız edici bir gıda atık akışıdır:

- Fenolik bileşikler, düşük pH ve toksik yağ asitleri nedeniyle toprak kalitesi ve bitki büyümesi üzerinde güçlü olumsuz etkiye sahip yüksek fitotoksisitedir
- Yüzeysel su ve yeraltı suyu kirliliği ile sonuçlanan doğal suların güçlü renk değişimi ve kirlenmesidir
- Sucul hayatı tehdit edilmesidir
- Sucul hayatı tehdit edilmesidir

Zeytinyağı değirmeni atıklarının işlenmesi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bu yöntemler üç kategorilerde gruplanabilmektedir:

- Fiziksel ve fizikokimyasal süreçler: gazlaştırma, ısı konsantrasyonu ve yanma gibi ısı işlemler, adsorpsiyon, ayırma işlemleri, flokülasyon ve ozonlama.
- Biyolojik işlemler: aerobik ve anaerobik süreçler
- Birleştirilmiş fizikokimyasal ve biyolojik işlemler

Yukarıda gösterilen işleme yöntemleri, bir kirlilik önleme olan tek boyutlu bir atık işleme yaklaşımına aittir. Aynı zamanda, özellikle de çoğu zeytin değirmeninin küçük boyutu göz önünde bulundurulduğunda, yüksek mali yük kirliliğinin engelini paylaşmaktadırlar. Bu engeli aşmanın pratik bir yolu, depolasyonu değerli yan ürün veya içeriklerin geri kazanımıyla birleştiren atık işleme planlarını geliştirilmiştir. Bu tür süreçlerde, yan ürünlerden elde edilen gelir atık işleme maliyetini (depolüsyon) ödeyebilmektedir [207, 237, 341].



İncelenmiş olan bir başka çalışmada [357], zeytinyağı atık suyunun dekantörden geri dönüştürülmesiyle fenolik bileşikler önemli bir konsantrasyonu gösterilmektedir. Bu fenolik bileşikler serbest radikal ataklarına karşı farklı mekanizmalara girmektedirler. Araştırmalarda, daha düşük peroksit değerleri ve daha yüksek stabilite, zeytinyağı değirmeni atık su ekstraktı yağlara eklendiğinde ölçülmüştür. Atık su, dekantörden toplandıktan hemen sonra, sıradan su yerine dekantöre giren zeytin hamurunu inceltmek için hemen kullanılmaktadır [357]. Bir çalışmaya [358] göre, yağın toplam fenolik içeriğinde artış yaklaşık %30'dur ve atık su hacminde yaklaşık %35-40'lık bir azalma vardır. Zenginleştirilmiş zeytinyağının üretiminde katkı sağlamanın yanı sıra, zeytin atık suyunun geri dönüşümü de, yüksek antimikrobiyal aktiviteye ve hidrofiliğine sahip olan fenoller açısından çok zengin olduğu için kirlilik sorunlarını çözmektedir. Zeytinyağı atık suyundan yararlanarak, endüstriyel ölçekte zeytinyağı ekstraksiyonu işlemi sırasında ham fenolik konsantrasyonunun eklenmesi ve nihai üründe bulunan biyoaktif fenol içeriğinin geliştirilmesine çalışılmıştır [315]. Ham fenolik konsantrasyonu, üç fazlı bir membran sistemi ile enzimatik olarak işlenmiş zeytin atık suyu üretilmiştir. Zeytinyağı değirmeni atık suyunun önsel enzimatik işlemi, enzimlerin pektinaz ve hemiselülozik aktiviteler ile depolimerleştirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Fenolik bileşiklerin geri kazanımı için mikrofiltrasyon, ultrafiltrasyon ve ters ozmoz kullanılmıştır. Üretilen ham fenolik konsantrasyonu, malaksasyon basamağında ilave edilip prosedür normal bir şekilde gerçekleştirilmiştir [207, 237, 315, 341].

### b.8.2.1. Kimyasal özellikleri

Zeytinyağı endüstrisinden gelen zeytinyağı zeytinyağı değirmeni atık suları aşağıda gösterilen genel özelliklere sahiptir [359].

- Yüksek organik içerik
- pH değerleri 3.0 ve 5.9 arasında olan asidik karakter
- 80 g/L'ye kadar olan n yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşikleri
- 20 g / L'ye kadar toplam katı madde yüksek içeriği.

Genel olarak, zeytinyağı değirmeni atık suyunun ana özelliği, zeytinyağı değirmeni atık suyunu fitotoksik malzemeye dönüştüren alkoller, lipidler, organik asitler ve polifenoller gibi organik bileşiklerin varlığı ve düzgün bir şekilde işlemediğinde büyük bir çevresel tehlikeyi temsil etmektedir. Kimyasal oksijen ihtiyacı değerleri normal olarak 1.9 ila 220 kg/m<sup>3</sup> arasında değişmekte ve biyokimyasal oksijen ihtiyacı genellikle belirlenmemesine rağmen 16.0'dan 93.5 kg/m<sup>3</sup>'e kadar değiştiği bulunmaktadır [207]. Aynı bağlamda, toplam katılar 5.9 ila 103.2 kg/m<sup>3</sup> arasında değişirken, uçucu katı maddeler 2.4 ila 89.9 kg/m<sup>3</sup> arasında değişmektedir [207, 360]. Zeytinyağı değirmeni atık suları aynı zamanda, yüksek organik madde konsantrasyonu ve birkaç besin maddesi, özellikle de potansiyel bir gübre olarak geri dönüştürülebilen potasyum gibi değerli maddeler içermektedir. Zeytinyağı değirmeni atık suyu zeytin çeşidine, büyüme süresinde iklim koşullarına ve kullanılan ekstraksiyon yöntemlerine bağlı olarak çeşitli miktarlarda şeker içermektedir. Genellikle şeker seviyeleri %1.6-4.0 (w/v), ama nadir durumlarda daha yüksek olabilmektedir. Şekerler kuru maddenin %60'ını ve azalan sırada fruktoz, mannoz, glukoz, sakaroz ve sükrozün ve pentozün izlerinden oluşmaktadır [207, 237, 341].

Fenolik bileşikler, kesinlikle zeytinyağı üretiminde kullanılan işleme sistemine bağlı olduğundan zeytinyağı değirmeni atık suyunda 0.5 ila 24.0 g/L'ye kadar geniş bir konsantrasyonun oranında bulunmaktadır [361]. Şimdiye kadar, zeytinyağı değirmeni atık sularında 30'dan fazla fenolik bileşik tespit edilmiştir [362]. Flavonoidler zeytinyağlı değirmen atıksu fenolik içeriğinin yaklaşık 45-65'ine karşılık gelmektedir. Zeytinyağı değirmeni atık suyunda ana flavonoid alt grupları flavanoller ve proantosiyanidinlerdir. Hidroksitirosol, zeytinyağı değirmeni atık suyunda en bol fenolik bileşik bulunduğu zeytinyağı değirmeni atık suyunun toplam fenolik konsantrasyonunun yaklaşık %55-70'ini temsil ettiğinde gallik asit zeytinyağı değirmeni atık suyunda 0.3-0.6 g tiroz eşdeğeri/L'yi oluşturmaktadır [362, 363]. İnorganik bileşikler söz konusu olduğunda, literatürde üç fazlı zeytinyağı değirmeni atık suyunda bulunan metal katyonların ve inorganik anyonların içeriği, bileşimi ve fizikokimyasal durumu rapor edilmiştir.

Tespit edilmiş ana bileşenleri, taştaki selüloz ve tohumda hemiselülozdur. Bir delignifikasyon işlemi daha sonra polisakkaritlerin zeytin tohumunun hücre duvarından çıkarılmasını mümkün kılmaktadır. Glukuronoksilans, tanımlanan başlıca selülozik olmayan polisakkaritten biridir. Taşlar ve tohumlar, önemli miktarda fenolik bileşik içermektedir. Zeytin taşlarında salidroside (tiroz-glikoz), nuezit (glukoz-elenolik asit-glikoz-tirozol) ve nüezitenoleosid dahil olmak üzere üç glukozid tanımlanmıştır. Nuezhenide sadece baskın bir fenol olarak tohumlarda bulunurken, verbascoside sadece tohumlarda ve posalarda önemli miktarlarda görülmektedir [207, 237, 341, 362-364]. Zeytin taşlarında tirozol ve hidroksitirosol saptanırken, hamur, tohum ve taşlarda dekarboksimetil oleuropein bulunmuştur [365]. İki fazlı zeytinyağı öğütücüsünde bulunan en bol fenolik bileşikler, *p*-kumarik asit ve daha az ölçüde olan vanillik asitle birlikte tiroz ve hidroksitirosoldur [366, 367]. Diğer minör bileşikler arasında 11-metiloleoside, caffeoylquinic asit, hidroksitirosol-10-*b*-glukozit, luteolin-4-glukozit, luteolin-7-rutinosid, oleosid, rutin ve verbaskozit bulunmaktadır [207, 237, 341, 348].

#### b.8.2.2. Fiziksel özellikleri

Zeytinyağı değirmeni atık suyunun partikül büyüklüğü dağılımı, yaklaşık 0.9 mm ortalama partikül çapına sahip olan posa partikülleri olarak ve sadece küçük bir kısmı temsil eden ortalama parçacık boyutu yaklaşık 0,5 mm olan ince parçacıkların bir kısmı olarak zeytinyağı değirmeni atık suyunun iki ana bileşeni nedeniyle bimodal bir dağılım göstermektedir. 2013 yılında Goula and Adamopoulos tarafından zeytinyağı değirmeni atık suyunun 25, 35, 50 ve 60°C'de akış eğrilerini gösterilmektedir. Göstirdikleri gibi, atık su, pektinler gibi yüksek moleküler ağırlıklı malzemelerin varlığına atfedilebilecek, Newton dışı bir davranışı göstermektedir. Zeytinyağı değirmeni atık su numuneleri, akış başlamadan önce belirli miktarda akma gerilmesi gerektirmektedir. Bu, atık suyun, akış meydana gelmeden önce belirli bir miktarda kuvvetin kopmasını gerektiren uyumlu bir ağ yapısına sahip olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda sonuçlarda zeytinyağı değirmeni atık suyunun 25°C'de geri yönde akış eğrisini de sağlamaktadır. Zeytinyağı değirmeni atık suyunun 20, 30, 40, 50 ve 60°C'de nem emme verileri aynı çalışmada gösterilmiştir [368]. İzotermler, sabit sıcaklıkta artan su aktivitesi ile denge nem içeriğinde bir artış olduğunu ve hidrofilik bileşenlerle zengin amorf malzemelerin karakteristiği şeklinde sigmoid olduğunu göstermektedir [369]. Düşük ve orta su aktivitelerinde, çok katmanlı sorpsiyon bölgesi olarak adlandırılan nem içeriği, su aktivitesi ile doğrusal olarak artmıştır ve yüksek su aktivitesi seviyelerinde, kapiler yoğunlaşma bölgesi olarak adlandırılan su içeriği, su aktivitesi ile hızla artmıştır [350]. Düşük su aktivitelerinde, denge nemi muhtevası, Langmuir'in tek tabakalı teorisi ile tarif edildiği gibi büyümekte ve burada eğri büyümesi, katı yüzeyde sınırlı sayıda su pozisyonundan dolayı doyuma etkisi ile sınırlanmaktadır. Bununla birlikte, çoğu durumda katı denge nemi hava bağıl nemi ile birlikte yükselmektedir. İzoterimde, BET ve GAB teorileri tarafından açıklanan çok katmanlı sorpsiyonun karakteristiği olan yüksek su aktivitelerinde üstel bir büyümeye yol açan bir bükülme noktası vardır. Elde edilen izotermlerin şekline göre, iki fazlı prina, küçük bir spesifik yüzeye ve düşük higroskopikliğe sahip makro gözenekli bir katıdır. Su yoğunlaşması üzerinde bazı kılcallık etkilerinden dolayı, 0.90'ın sadece yüksek su aktivitelerinde denge nemi önemli ölçüde artmaktadır [207, 237, 341].

### b.8.3. Yaprığı

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) genellikle sofralık zeytin ve zeytinyağı üretmek için yetiştirilen ve yaprakları geleneksel olarak tedavide kullanılan bir ağaçtır. Zeytin yaprağı, ağaç budamasının ve meyve hasatının önemli bir ürünüdür. Son zamanlarda yapılan araştırmalar [370-379, 380-389, 390-399, 400-403], meyve, yapraklar, prina ve hatta zeytin ağacı özleri gibi zeytin bitkisinin tüm kısımlarından elde edilen fenolik ekstraktların kayda değer antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Zeytin yaprağı, zeytin posası ve zeytinyağı atıksu ile birlikte zeytinyağı ekstraksiyon sürecinin en önemli yan ürünlerindedir. Bunlar zeytin değirmenlerinin yan ürünlerinden biri olduğundan, miktarı zeytin meyvelerine eşlik eden zeytin yaprağı miktarına göre değişebilmektedir [404]. Zeytin yapraklarında basit veya karmaşık yapıda türlü fenolik bileşik bulunmaktadır. Eski zamanlarda, zeytin yaprağı, sıtma gibi hastalıklarla mücadele için halk ilaçları olarak kullanılmaktaydı [161]. Zeytin yapraklarının bu özellikleri, fenolik bileşiklerinin ve türevlerinin biyoyararlılığına atfedilmektedir [405-407]. Genel olarak zeytin yaprağı, başlıca luteolin-7-glukozit, rutin ve verbaskozit eşliğinde hidroksitirosol ve oleuropein olmak üzere birçok fenolik bileşik içermektedir [183, 408]. Böylelikle, son yıllarda zeytin yaprağı çeşitli fenolik bileşiklerin zengin bir kaynağı olarak insan sağlığına antioksidan katkılarından dolayı çok dikkat çekmiştir [161, 408, 409]. Son dönemlerde, birkaç çalışma zeytin yaprağının antihipertansif, antikanserojenik, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve hipokolesterolemik etkilerini göstermiştir [13, 410, 411].

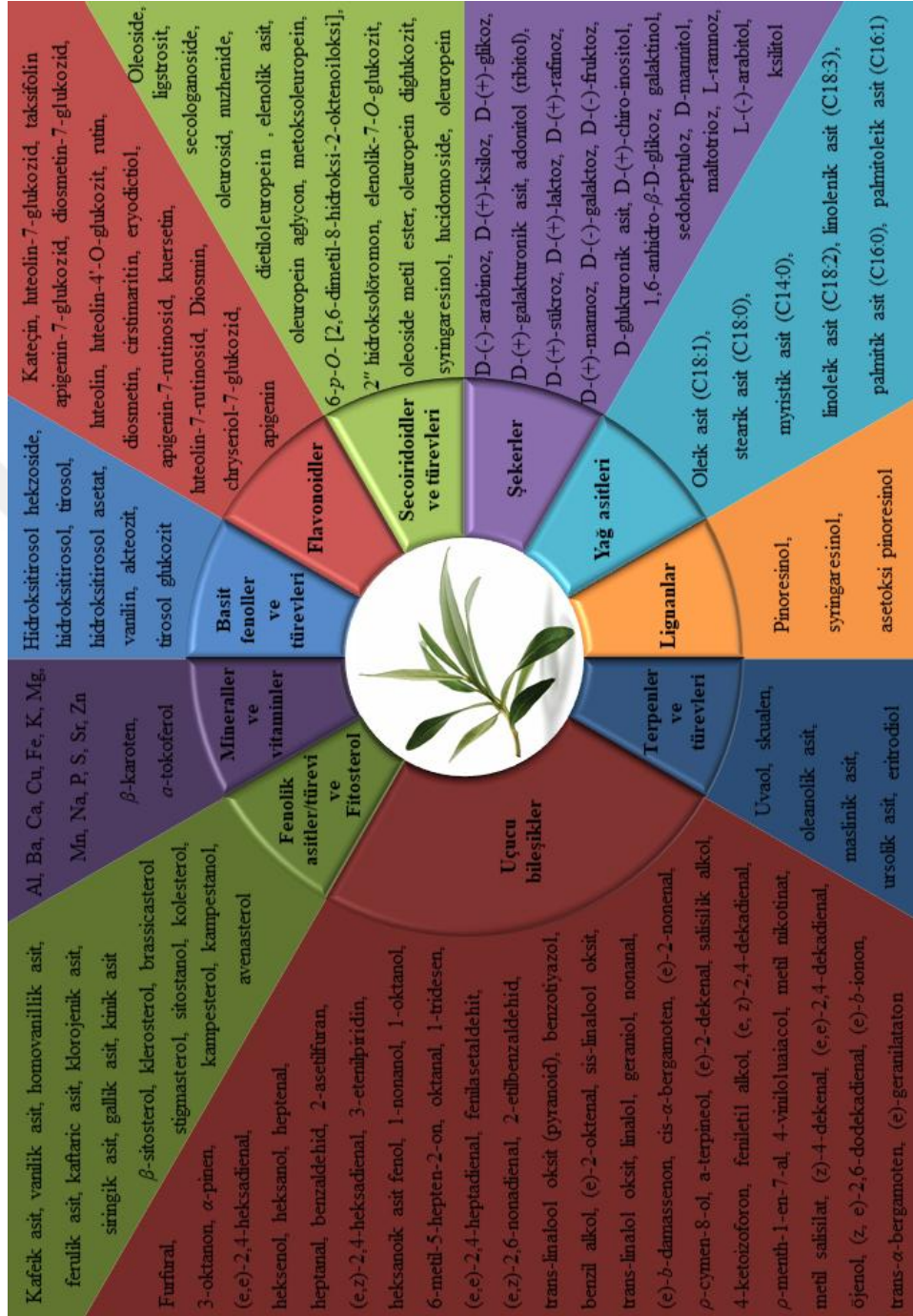
Budamadan elde edilen zeytin yaprağının zeytin ağacı başına 25 kg olduğu tahmin edilirken, yağ değirmeninde toplanan hasat edilmiş zeytinlerin ağırlığının %5'ine ek olarak, zeytinyağı endüstrilerine gelen zeytinlerin toplam ağırlığının yaklaşık %10'u zeytin yaprağıdır. Pek çok araştırmacı ve ticari kuruluşta, bu yan ürün üzerinde özellikle tıbbi özelliklerinden dolayı ilgi artışı görülmektedir [412-414]. Bazı araştırmacılar, farklı analitik teknikler kullanarak zeytin yaprağı içinde bulunan biyoaktif bileşikleri karakterize etmeye odaklanmaktadır. Polar ve semipolar bileşikleri karakterize etmek için en uygun teknikler, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve her ikisi de kütle spektrometresine bağlanan kapiler elektroforez, ama gaz kromatografisi esas olarak polar olmayan bileşiklerin karakterize edilmesi için kullanılmaktadır. Nükleer manyetik rezonans da bu matristen bazı bileşiklerin yapısını açıklamak için kullanılmaktadır. Zeytin yaprağının bileşimi karmaşık ve basit fenoller, fenolik asitleri ve

türevlerini, flavonoidleri ve bunların glikozile türevlerini, fitoterollerini, mineralleri, sekoiridoidleri ve türevlerini, terpenleri, uçucu bileşikleri, vitaminleri ve yağ asitlerini içermektedir (Şekil 2.39). Bununla birlikte, bu bileşiklerin heterojenliği, farklı analitik tekniklerin kullanılması ve farklı analitik yöntemlerin geliştirilmesi, zeytin yaprağının bileşimi hakkında genel bir bakış elde etmeyi zorlaştırmaktadır [207, 237, 341].

Pek çok çalışmada [412, 413], zeytin yapraklarının zengin bir doğal antioksidan kaynağı sağladığı gözlemlendiğinden gıda katkı maddelerinin yararlı bir kaynağı olarak kullanılabilir ucuz bir ham madde olarak önerilmektedir. Uygun konsantrasyonlarda çeşitli flavonoidler de mevcuttur [415]. Zeytin yapraklarının antioksidan kapasitesi, serbest radikal toplayıcılar olarak hareket eden fenollerin varlığına bağlanmaktadır [334, 407]. Oksidatif İstikrar İndeksi tarafından ifade edildiği gibi, üç farklı kültürden elde edilen zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirildiğinde ticari bir zeytinyağının antioksidan kapasitesinin geliştirilmesi mümkündür. Zeytin yaprağı ekstraktı, aritmi rahatlatmak ve bağırsak kas spazmlarını önlemek için hayvanlarda kan basıncını düşürmekte ve koroner arterlerdeki kan akışını arttırmaktadır [416].

Zeytin yaprağı ekstraktlarının pazar talebi, gıda katkı maddeleri ve takviyeleri olarak kullanımından ötürü artmaktadır. Zeytin yaprağı ekstraktları da oksidatif koşullar altında bitkisel yağlarda etkili stabilizörler gibi görünmektedir [179, 417, 418]. Bu nedenle, zeytin yapraklarının, yağın oksidatif stabilitesini zenginleştirmek için (raf ömrünü arttırmak için) kullanılmıştır [16, 419, 420]. Buna ek olarak, koyu kahverengi, acı tadı veren bir sıvı olan zeytin yaprağı ekstraktı, genellikle “zeytin biyofenolleri” olarak adlandırılan birçok farklı bileşik içermektedir [421-423]. Bahsedildiği gibi, bunlar arasında en bol biyofenol olan oleuropein, ardından apigenin-7-glukozit, luteolin-7-glukozit ve verimcoside gibi biyolojik etkilere sahip olup kullanılan doğal antioksidanlar içermektedir [207, 334, 372, 412]. Diğer birçok doğal üründe olduğu gibi, yaprak ekstraktının bileşimi de coğrafi konuma, bitki beslenmesine ve çeşidine bağlıdır. Zeytin yaprağı, alanin, arginin, glisin, lösin, prolin ve valin gibi amino asitler bakımından zengin ama lisin, metionin ve sistein bakımından düşüktür. Zeytin yaprağı değerli besinlerin zengin bir kaynağı olarak düşünüldüğünden hayvan yemi olarak kullanımı geçerli bir durumdur [370-403].

Son dönemlerde zeytin yaprağı çok iyi sonuçlarla zeytinyağı ile birlikte ekstrakte edilmiştir [424]. Alternatif olarak, zeytinyağı ekstraksiyon prosedüründen önce fazla olgunlaşmış zeytinlere çeşitli miktarlarda zeytin yaprağı eklendiğinde geliştirilmiş organoleptik özelliklere sahip olan bir ürün ile sonuçlanmıştır [425]. Zeytin yapraklarından ekstrakte edilmiş fenolik bileşikleri zeytinyağı zenginleştirilmesi için eklediğini, natürel birinci sınıf zeytinyağında (sızma zeytinyağı) bulunan gibi rafine edilmiş zeytinyağına benzer bir stabilite kazandırmak için bildirilmiştir [426]. Bununla birlikte, muhtemel renk değişiklikleri gibi zeytin yaprakları veya zeytin yaprağı ekstraktları zeytinyağına eklendiğinde dikkate alınması gereken birkaç husus vardır [427]. Ayrıca, fenol bakımından zengin bir zeytinyağının organoleptik özelliklerinde beklenen bir değişikliği, klorofil içeriği yüksek olduğundan foto-oksidasyona neden olabilmektedir. Klorofiller, doymamış yağ asitleri ile reaksiyona giren ve hidroperoksitler oluşturan tekli oksijen vererek, ışıktan enerjiyi üçlü oksijene aktarma kabiliyetleriyle ışığa duyarlı olarak hareket edebilmektedir. Klorofiller karanlıkta antioksidanlar olarak hareket etmekte ve yağı oksidasyondan korumaktadır [207, 310, 372].



**Şekil 2.39:** Zeytin yaprağının kimyasal içeriği<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [207, 249, 372, 428, 429].



### b.8.3.1. Kimyasal özellikleri

#### 1. Antioksidan özellikleri

Zeytin yaprağı, yıl boyunca mevcut olan güçlü bir radikal süpürücü kaynağıdır. Genel olarak, taze zeytin yapraklarının uçucu fraksiyonunun antioksidan aktivitesi, kurutulmuş yapraklardan elde edilenlere göre daha üstündür [184, 430, 431]. Bitkilerde polifenollerin belirlenmesi, bu bileşiklerin doğal antioksidan aktivitesi nedeniyle büyük ilgi görmüştür [432]. Oleaceae bitkilerinin karakteristiği olan polar fenolik bileşiklerin farklı sınıflarının ailesi arasında fenolik asitler, fenil etil alkoller, hidroksi-izobromanlar, flavonoidler, lignanlar ve sekoiridoidler bulunmaktadır [433]. Gıda maddeleri, gıda katkı maddeleri ve gıda takviyeleri olarak kullanılmak üzere zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı özleri gibi doğal polifenoller kullanma ihtiyacını arttırmıştır [434, 435]. Zeytin yapraklarındaki en önemli fenolik bileşik, oleuropein ve ardından diğerleri de dahil olmak üzere hidroksitirosoldür [244]. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan oleuropein ve hidroksitirosol, BHT veya vitamin E, C ve saf oleuropeinden çok daha etkili antioksidanlar olarak gözlenmişlerdir. Hidroksitirosol inhibisyon katsayısı 5 ve oleuropein için 7'dir. Aynı zamanda, 2 stokiometrik faktöre sahip olan BHT'dan daha yüksektirler. Bu sonuçlar, ekstresinin antioksidan kapasitesinde tekabül eden bir artış ve zeytin yaprağı ekstresinin fenollerin sinerjistik etkisi ile hidroksitirosol için oleuropein hidrolizi de dahil olmak üzere, iki ilgili fenomen ile açıklanmıştır [244, 370-372, 376, 377, 380, 381, 384, 388, 391, 395, 397-402, 417, 430, 432, 435-455]. Ayrıca zeytin yaprağında mevcut olan B halka kateşol, 3-hidroksil grubu ve 4-okso fonksiyonu ile konjüğe edilmiş 2,3-çift bağ olarak flavonoidlerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS<sup>•+</sup>) radikal katyonu süpürebilmektedir. Zeytin yaprağında bulunan diğer fenolik bileşikler için, ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonunu süpürmeye yönelik göreceli kabiliyetleri esas olarak yapılarında serbest hidroksil gruplarının sayısı ve pozisyonundan etkilenmektedir [416]. Zeytin yaprağı özütleri yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Antioksidan aktivite ve fenolik içerik arasında doğrusal bir ilişki vardır. Dolayısıyla, yenilebilen yağlar gibi gıda ürünlerinin oksidatif stabilitesinin artırılması için yararlı olmakta ve farklı gıda lipidleri üzerinde antioksidan etkiler göstermektedirler [18, 184, 207, 372, 430, 444, 456].

## 2. Antimikrobiyal özellikler

Bitkisel materyallerin ve bileşenlerinin antimikrobiyal aktivitelerini test etmek için çeşitli yöntemler vardır. Bu yöntemler, gözlenen inhibisyon seviyesini kuvvetli bir şekilde etkilemektedir. Bitki içerisindeki bireysel komponent ile ekstrakt arasında mikroorganizmalara karşı aktivitelerinde bir fark yoktur. Antimikrobiyal aktivite, iki baz, MIC olarak minimum inhibitör konsantrasyon ve MBC olarak minimum bakterisidal konsantrasyon üzerinde ölçülmektedir. MIC farklı şekillerde tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları arasında inokulumun canlılığının sürdürülmesiyle veya azaltılmasıyla sonuçlanan en düşük konsantrasyon, 48 saatlik inkübasyon kadar test organizmasının tam inhibisyonu için gerekli olan en düşük konsantrasyon, test organizmasının görünür büyümesini engelleyen en düşük konsantrasyon veya inokulların yaşayabilirliğinde %90'den daha fazlası gibi önemli bir düşüşe neden olan en düşük konsantrasyon bulunmaktadır. MBC, başlangıçtaki inokülümün %99.9 veya daha fazlasının öldüğü konsantrasyon veya taze et suyunun içine alt kültürlendikten sonra hiçbir büyümenin gözlemlenmediği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır [457]. *Olea europaea* çeşitlerinin yapraklarının uçucu maddelerinin antimikrobiyal aktivitesi, iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu bildirilen terpen içerikleri ile ilgilidir. Bu bileşiklerin etki mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da hücre zarı bozulmasının dahil olduğu düşünülmektedir [184, 207, 372, 430].

Zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyal etkileri, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata*'ya karşı test edilmiştir. Test edilen mayalar, aseton ve etil asetat ekstrelerine karşı hassastır. *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, mayalar arasında en dirençli olarak bulunmuştur [458]. Hidroksitirozol olarak 100 mg/kg zeytin yaprağı ekstraktının dozları ne sitotoksik ne de *S. Thermophiles* ve *Lactobacillus delbruechii* ssp. *Bulgaricus* coculumlarında laktik asit bakterilerinin (LAB) büyümesini inhibe etmemiştir [18]. Zeytin yaprağı ekstraktlarından elde edilen oleuropein ve hidroksitirozolun, viral füzyon ve entegrasyona karşı etkili olan eşsiz bir HIV-1 inhibitör sınıfı olduğu kanıtlanmıştır [459]. Tanınmış nutrasötik faaliyetleri göz önüne alındığında, zeytin yaprağı fenol özü bir gıda maddesi bileşeni olarak kullanılabilir [207, 372].

### 3. Terapötik özellikler

1900'lü yılların başında sıtmanın tedavisinde kininden çok daha üstün olduğu tespit edilen zeytin yaprağı çayı kullanılmıştır. Bir gıda maddesi olarak zeytin yaprağı özütü, Mısır imparatorluğuna kadar uzanan tıbbi faydaları ve gıda koruma özellikleriyle tanınmıştır [372]. Zeytin yaprağı ekstraktlarının temel avantajları arasında, zeytin yapraklarından kolayca elde edilebilmesi ve farklı hastalıkların önlenmesinde uygulanabilmesi için ekstrakt fraksiyonlarına herhangi bir saflaştırılma işleminin gerekmemesi sayılabilir [460]. Farmakolojik çalışmaların çoğu, özellikle dört bileşik (oleuropein, hidroksitirozol, tirosol ve verbaskozit) üzerine yoğunlaşmıştır. Antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri çok iyi bilinen zeytin yaprağı ekstraktı, anti-inflamatuar, immünomodülatör, gastrointestinal, respiratuar, otonomik, merkezi sinir sistemi, antikanser, kemoterapik ve kardiyovasküler aktivitelere sahiptir [461-464]. Zeytin yaprağı polifenolleri de sağlıklı ve sigara içmeyen erkeklerde in vitro trombosit aktivasyonunu inhibe etmektedir [465]. Oleuropein, oleuropein aglikon ve hidroksitirozol bakımından zengin ekstraktların hipokolesterolemik etkilerinin, serum total kolesterol (TC), trigliseritler (TG) ve düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol (LDL-C) seviyelerini düşürme etkileri olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda, lipid peroksidasyon sürecini yavaşlatmakta ve antioksidan enzim aktivitesini arttırmaktadır [466]. Hidroksitirozol, okside fosfolipid oluşumuna karşı en yüksek korumayı göstermiştir [467]. Ayrıca, insanlarda zeytin yaprağı ekstresinin antihipertansif ve kolesterol düşürücü etkisi de doğrulanmıştır [372]. Zeytin yaprağı ekstresi yüksek glukoz kaynaklı nöral hasara karşı PC12 hücrelerini kurtarmakta ve diyabetik sıçanlarda termal hiperaljeziyi zayıflatmakta, bu da diyabetik nöropatik ağrının zayıflatılmasında zeytin yaprağı ekstresinin terapötik potansiyelini göstermektedir [372]. Zeytin yaprağı kan basıncını ve kan şekerini düşürmekte ve atardamarları gevşeterek kan akışını arttırmaktadır. Zeytin yaprağının esansiyel yağı, tedavi edilmesi zor olan Epstein-Barr hastalığı, zona ve herpes gibi soğuk algınlığı, grip gibi viral enfeksiyonlarla savaşmak için kullanılmıştır. Bunlara ilave olarak, düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) veya kötü kolesterolü düşürdüğü gibi kalp için de iyidir [207, 372, 468].

#### 4. Anti-kanserojen özellikleri

Oleuropeinin in vitro anti-kanser aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ovariectomize çıplak mikrofonda MCF-7 hücrelerinin ksenograft büyümesinden oluşan hayvan modeli, pulmoner ve parenkim akciğer metastazları olarak engellemiştir. Oleuropein ve perasetilatlı oleuropein, insan papiller tiroid kanserinde saptanan genotipik değişikliklere ev sahipliği yapan iki tiroid tümör hücre hattının proliferasyonunu inhibe etmiştir [469]. İki insan MCF-7 ve T-47D gibi meme kanseri hücre dizisine karşı hücre döngüsü ilerlemesinin tutulmasının, oleuropein, perasile edilmiş oleuropein, perasile edilmiş aglikon ve perasile edilmiş hidroksitirozol kullanılarak yapılan bir çalışmada, perasile edilmiş bileşikler tarafından daha yüksek olduğu gösterilmiştir [470]. Oleuropein, glia tümör hücreleri gibi tümörlerin tedavisi ve daha kötü prognozu ile karakterize edilen kanserlerin tedavisi için mükemmel bir aday olabilmektedir. Oleuropein açısından zengin ekstrenin dil skuamöz hücreli karsinomunda da kemopreventif bir rolü vardır [471]. Ağırlıklı olarak oleuropein içeren zeytin yapraklarının ham ekstresinin insan meme adenokarsinomu, insan idrar torbası karsinoması ve bovin beyin kapiller endotelyal hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bulunmuştur [19]. Öte yandan, hidroksitirozol açısından zengin zeytin yaprağı ekstraktının MCF-7 göğüs kanseri hücrelerine karşı potansiyel anti-tümör etkileri vardır [461]. Hidroksitirozol, anti-proliferatif ve pro-apoptotik özelliklere sahip olarak hidrojen peroksit, O<sub>2</sub> ile oto-864 oksidasyonu üzerine salınan, yarı-benon, süperoksit iyonları (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşumuna neden olmaktadır [472]. Zeytin yaprağı ekstraktları, hem antioksidan aktivite ile apoptozu ve iyileştirilmiş gentamisin nefrotoksisitesini, lösemi hücrelerinde anti-proliferatif etki göstermiş hemde glutatyon peroksidaz dışında renal antioksidan enzim aktivitesi ve renal glutatyon içeriği artmıştır [473, 474]. Sulu zeytin yaprağı ekstresinin karaciğer kanserinde ümit verici bir terapötik değere sahip olduğu ve çoğunlukla lizozomal membran bütünlüğünün yükseldiği bildirilmiştir. Etanolik özüt, sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda Jurkat'ın çoğalmasını engelleyebilmektedir [473, 475]. Zeytin yaprağı ekstresinin ve oleuropeinin 14 gün boyunca günde iki kez ağızdan verilmesi, ultraviyole B radyasyonunun neden olduğu deri kalınlığındaki artışı inhibe ettiği kanıtlanmıştır [476]. Zeytin yapraklarının süperkritik sıvı ekstraksiyonu, diosmetin veya luteolin gibi flavonlarda daha zengin olması, meme kanseri hücrelerine karşı en yüksek anti-kanser aktiviteye sahiptir. Ancak bu biyolojik aktivite, tek bir bileşiğin etkisine dayanmamaktadır [477, 478]. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçları, zeytin fenollerinin, diğer fenolik veya nonfenolik bileşiklerin etkisi ile katkı veya sinerjik etkilerinin bir

sonucu olabilmektedir [479]. Çalışmalarda [207, 372], zeytin yapraklarının anti-kansorejen özelliklere sahip değerli fitokimyasallar içerdiğini ve fonksiyonel gıdaların tasarımı için kullanılabileceğini kuvvetli bir şekilde göstermektedir.

##### *5. Fonksiyonel özellikler*

Fonksiyonel gıdalar modern zamanlarda, farklı türdeki kanserlerin, diyabetlerin, kardiyovasküler hastalıkların ve diğer pek çok rahatsızlığın önlenmesinde ve/veya tedavisinde çok önemli bir yer tutmaktadır [480]. Son birkaç yılda, tamamen tüketilmemiş olmasına rağmen fonksiyonel gıdaların rolüne büyük ilgi gösterilmiştir [481, 482]. Zeytin yapraklarından elde edilen doğal antioksidanlar, gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilecek ve gıda endüstrisindeki duyusal ve beslenme özelliklerinin kaybını önleyecek ekonomik ve etkili koruyuculardır [426, 437]. Ancak, zeytin yaprağı fonksiyonel bir gıda maddesi olarak kullanılacaksa, kolon kromatografisi gibi saflaştırma yöntemleri kullanmak yerine, zeytin yaprağı ekstresinin hazırlanması için daha ekonomik ve daha güvenli bir ekstraksiyon yöntemi tasarlanması gerekmektedir [434]. Farklı çeşitlerin metanol/su zeytin yaprağı ekstraktlarının soya fasulyesi lipoksijenazını önemli ölçüde inhibe edebileceği doğrulanmıştır [334]. Vakumda paketlenmiş sığır filetosu için %2-3'lük zeytin yaprağı ekstraktlarının eklenmesi, 4°C'de 9 günlük depolama süresince sığır eti küplerinin mikrobik yükünü kontrol etmek için kullanılmıştır. Zeytin yapraklarından ekstrakte edilen polifenoller kullanılarak sofralık zeytinlerin besin değerini arttırmak için yapılan bir testte, en yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstre ve sofralık sofralık zeytinlerin tedavisinde kullanılan polifenol içeriği, oleuropein içeriği için %457'lik ve hidrokstitirosol içeriği için %109'luk bir artış göstermiştir. Bununla birlikte, muamele edilmiş sofralık zeytinlerin duyusal değerlendirmesi acılıkta bir artış göstermiştir [483]. Süngerimsi kekin formülasyonunda zeytin yaprağı metanol ekstrelerinin kullanılmasıyla ilgili bir çalışmada, sonuçlar daha az acılık açısından kabul edilen formülasyon olan 0.003 g oleuropein olarak 0.1 g ekstre içeren numunelerin elde edildiğini göstermiştir [372]. Zeytin yaprağı ekstraktlarının acı tadını maskelemek, standart bir sıralama yöntemi ve bir ölçek testi ile sodyum siklamat, sodyum klorür ve sakkorozun eklenmesiyle araştırılmıştır. 5.78 mg/100g olarak saptanan ve 8.05 mg/100 g olarak tanınan eşikleri zeytin yaprağı ekstresi polifenolleri, diğer maddeler acıyı maskelemediğinde düşük formülasyon limitlerini doğrulamıştır. 20 mg/100g olarak yüksek polifenol seviyelerinde, acı tadı algısını

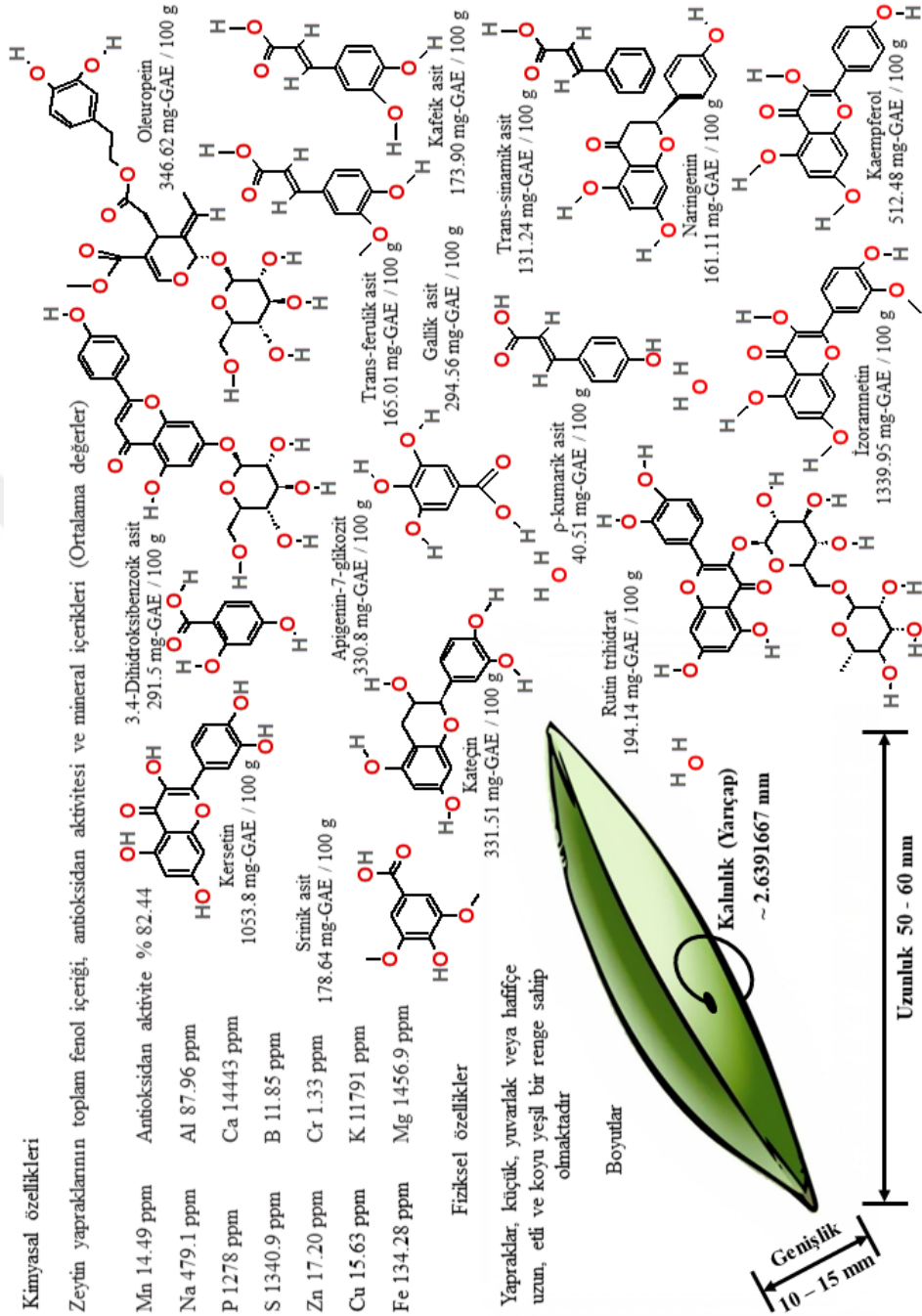
sırasıyla sodyum siklamat ve sükröz %39.9 ve %24.9 azaltabilmiştir. Oysa, sodyum klorürün acılığı etkili bir şekilde maskeleyebilmesi mümkün değildir [207, 372, 484].

#### b.8.3.2. Fiziksel özellikleri

Zeytin yaprağı, birbirinin karşısında düzenlenmiştir. Bunlar, yaklaşık 8 cm uzunluğunda, mızrak şeklindedir (tepe noktasında ve tabandaki bir noktaya doğru sivrilen). Kenarları tamamdır ve yapraklar küçük bir sap ile tutturulmaktadır. Yaprığın rengi, kışın soğuktan ve yaz aylarında ısıdan korunmayı amaçlayan alt kısımda beyazdır. Üst tarafta zeytin yaprağı parlak yeşil renge sahiptir [485].

#### b.8.3.3. Türk orijinli zeytin yaprağının özellikleri

2018 yılında Mehmet Musa Özcan ve arkadaşları [487] tarafından yapılan bir çalışmada kullanılan zeytin yaprakları Akdeniz yerli, Sarı ulak, Topak aş, Gemlik ve Yağlık zeytin çeşitlerine ait olup, aşağıda bulan şekil 2.40'da gösterilmiş özelliklere sahiptir.



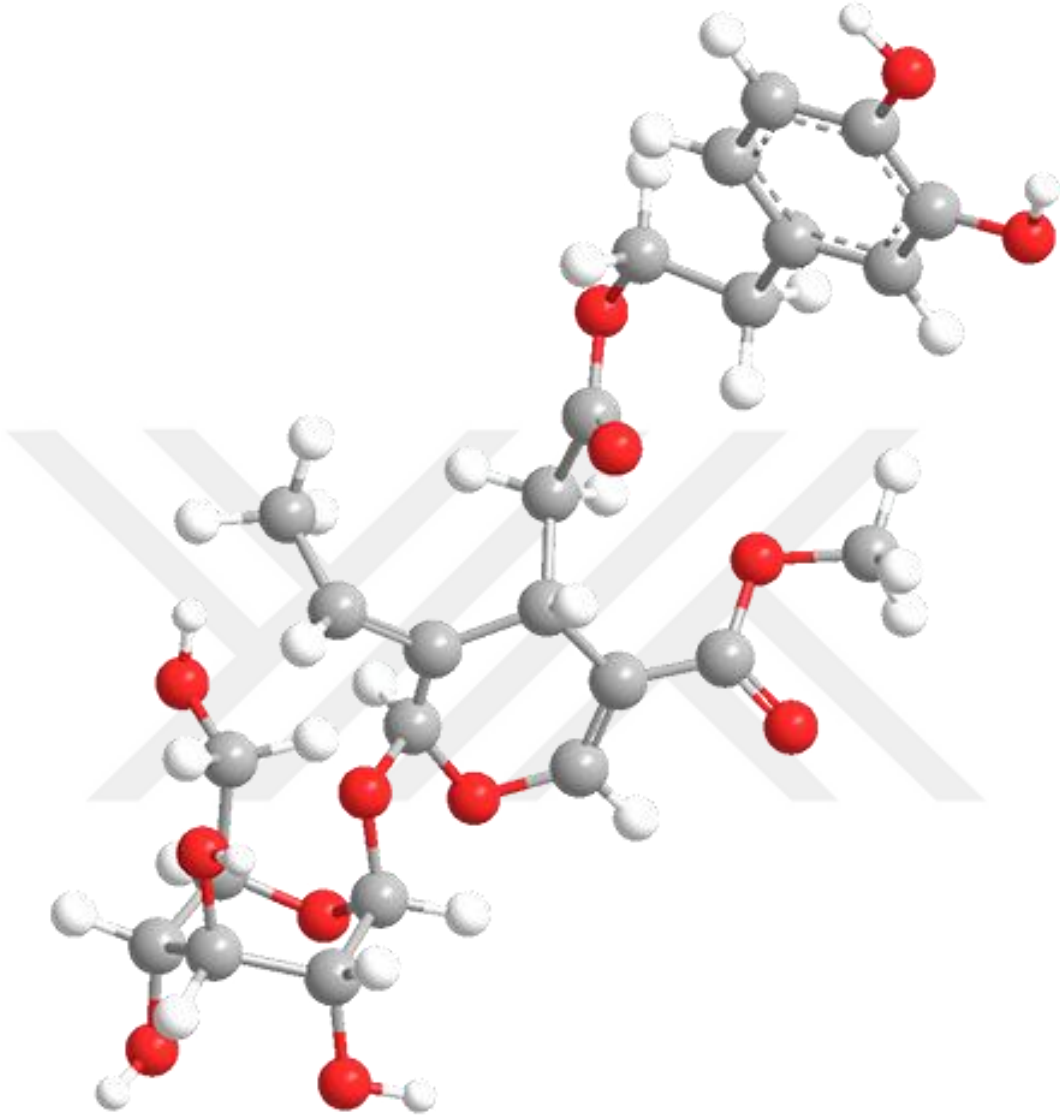
**Şekil 2.40:** Türk orijinli zeytin yaprağının kimyasal ve fiziksel özellikleri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [265, 375, 486, 487].

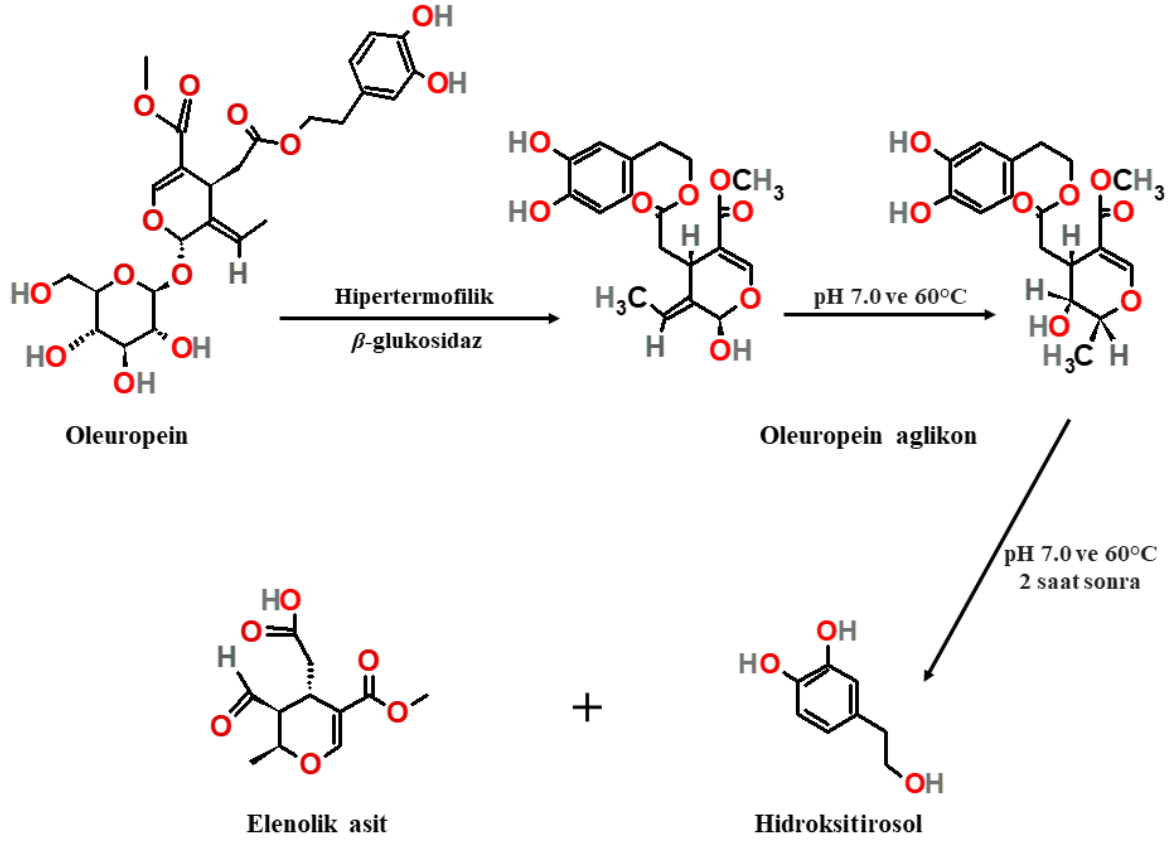
#### b.8.3.4. Oleuropein

Oleuropein, zeytin ağacı yapraklarının, meyvelerinin ve zeytin ağacının diğer kısımlarında bulunan ana fenolik bileşiktir (Şekil 2.41). Tedavi edici potansiyeli ile insan sağlığı üzerinde sayısız faydaları bulunmaktadır [488, 489]. Çalışmaların çoğu in vitro gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, insan popülasyonları üzerine yapılan bazı istatistiksel çalışmalar oleuropeinin en iyi bilinen sağlık destekleyicilerinden biri olduğunu göstermektedir. Zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriği ile antioksidan etkisi arasında doğrusal bir ilişki vardır [490, 491]. Oleuropein fenolik sekoiridoid bir bileşiktir ve oleuropein ligstrosid, oleurosid ve verbaskozit gibi dimetil oleuropeinin formlarına benzer bir formüle sahip olmaktadır. Bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstresinden yüksek oranda oleuropein elde edilmiş ve kuru kütle bazında %6-15'e ulaşılmıştır [404]. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri oleuropeinin yaprak ekstraktına %14'e kadar katkıda bulunduğunu ve hidroksitirosolün oleuropein bozunmasının ana ürünü olduğunu göstermiştir. Zeytin meyvesinden ve zeytin yapraklarından izole edilen birçok molekül, aglikon ile oleuropeinden kaynaklanıp elenolik asit halkasının açılarak sekoiridoid birinci bileşiğinin yeniden düzenlemesiyle elenolik asitin birçok biçimi ve hidroksitirosol gibi basit fenolik bileşikler oluşturmaktadır [412]. Oleuropein hidrolizinden (pH 7.0 ve 60 °C) hipertermofilik  $\beta$ -glukosidaz ile elde edilen ana reaksiyon ürünleri şekil 2.42'de gösterilmiştir. Bu bileşikler arasında hidroksitirosol önemli biyolojik özelliklere sahip olmaktadır [492-495]. Dolayısıyla, hidroksitirosol ve oleuropein, zeytinyağı değirmeni atık sularından, sızma zeytinyağından ve zeytin yapraklarından çeşitli yöntemler geliştirilerek ayrılıp saflaştırılmıştır [412, 492, 496, 497].





**Şekil 2.41:** Oleuropeinin 3 boyutlu olarak moleküler yapısı [498]



Şekil 2.42: Oleuropeinin hidroksitirosole degradasyonu [207]

#### 2.5.4. Zeytin ürünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin varlığını etkileyen faktörler

Zeytin ağacı ürünlerinin fenolik bileşenlerini etkileyen faktörler arasında ağacın yaşı, coğrafi konumu, türü, ışık şiddeti, muhafaza koşulları, tarımsal uygulamalar ve olgunluk derecesi sayılabilir [300, 310, 408, 421, 499-502]. Zeytinyağlarının toplam polifenol içeriği, yukarıda gösterilen faktörlere bağlı olarak 50 ile 1000 mg/kg arasında değişmektedir [503]. Olgunlaşma aşaması durumunda olgunlaşma ilerledikçe, fenoller, karotenoidler, klorofiller, tokoferoller, triaçilgliseroller ve yağ asitleri gibi bazı bileşiklerin profillerinde değişiklikler içeren belirli metabolik süreçler oluşabilmektedir [499, 500]. Sırayla, olgunlaşma aşaması, toplam fenol (mg kafeik/kg yağ) ve stabilite (saat), (yeşil, 336.20 ve 72.80), (benekli, 281.50 ve 66.10) ve (olgun, 270.30 ve 61.20) olarak farklı olgunluk aşamalarında zeytin meyvelerinden elde edilen zeytinyağlarının fenol içeriğini ve oksidatif kararlılığını özetlemektedir. Oksidatif stabilite ve toplam polifenollerin farklı değerleri arasında pozitif bir korelasyon vardır [500, 504]. Çeşidinin, yaprak yaşının ve toplanma zamanının zeytin yapraklarının fenolik içeriği üzerinde etkilerini inceleyerek bireysel bileşenlerin seviyelerinde farklılaşmanın hasat zamanına zeytin çeşidinden daha fazla bağlı olduğu bildirilmiştir [431]. Oleuropein içeriği, zeytin meyvesinin olgunlaşma süreci sırasında sürekli olarak azalır dimetiloleuropein, aynı miktarlarda oleuropeinin yerini almaktadır. Ekim ve Şubat aylarında iki farklı dönemde zeytin yapraklarının toplam fenol içeriğinde mevsimsel değişimleri tespit edilip iki aşamada toplanan yapraklar arasında toplam fenoller, odifenoller ve flavonoidler için mevsimsel bir örüntü gözlemlenmiştir [184, 430]. Hava, fotoperiyod, sıcaklık, toplam radyasyon ve toprak sıcaklığı gibi çevresel faktörlerin zeytin yaprağı ekstraktının fenol içeriğine önemli bir katkısı olduğu görülmektedir. Bakır işleminin zeytin yaprağı üzerinde etkisinin incelenmesi için yapılmış araştırmalar, bakır işlemine maruz kalmayan metanolik ekstraktların, farklı bakır formülasyonları ile işlenen yapraklardan daha iyi antioksidan özelliklere ve kontrol örneğinde saptanan fenollerin daha yüksek muhtevası ile uyum içinde olduğunu göstermiştir. Herhangi bir bakır işlemine maruz kalmayan yapraklardan elde edilen ekstraktlar, 2,2-Difenil-1-picrylhydrazyl radikallerini diğer yapraklardan elde edilen ekstraktlardan daha etkili bir şekilde süpürmüştür. Bakır (II) Oksiklorür kullanımı, radikal süpürme aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır [184, 207, 341, 430].

## 2.6. EKSTRAKSİYON

Bitki krallığı, biyolojik olarak aktif moleküllerin muazzam bir rezervuarını temsil etmekte ve etnofarmakolojik bilgi içeren bitkiler, erken ilaç keşfinin ana kaynağı olmaktadır. Modern tıpta kullanılan ilaçların büyük bir kısmı ya doğrudan doğruya bitkilerden keşfedilmiş ya da öncü bir bileşikten sentetik olarak modifiye edilmiştir. Ek olarak, doğal ürünler veya fonksiyonel gıdalar şeklinde bitkiler ve bunların özleri, birçok hastalığın tedavisi ve önlenmesinde spesifik olarak hedeflenmiş ilaçlara alternatif sunmaktadırlar. Biyoaktif bileşikler arasındaki büyük farklılıkları ve çok sayıda bitki türü olduğunu dikkate alarak, insan sağlığına yararlar taşıyan bu bileşiklerin eklenmesi için standart ve entegre bir yaklaşımın oluşturulması gerekmektedir. 1985 yılında Farnsworth ve diğerleri [505] tarafından sıkça kullanılan bitkilerin isim koleksiyonundan başlayıp sanayileşme ile sonlanan tıbbi bitki çalışmasının dizisini gösteren entegre bir yaklaşım rapor edilmiştir. Biyoaktif bileşiklerin, benzersiz yapısal çeşitliliği, nispeten küçük boyutları ve ilaçlar gibi sahip oldukları özellikler; emilip metabolize olma kabiliyetlerinden dolayı, gelecek yıllarda yeni ilaçların ana kaynaklarından biri olarak önemli bir rol oynaması beklenmektedir [506]. Biyoaktif bileşiklerin eldesi uygun bir ekstraksiyon işlemi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bitki ekstraktları ve fitokimyasalların çeşitli biyolojik aktiviteleri bildirildiği için, bilinen etnobotanik bilgiyle daha yüksek bitkilerin araştırılması araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Hastalığa dayalı ürünlerden sağlıklı yaşamı teşvik eden ürünlere geçiş nedeniyle, fitokimyasallar yerel ve küresel pazarlarda yüksek ticari değere sahiptir. Bunun yanı sıra, konvansiyonel ilaçlarla tedavi edilemeyen kronik hastalıkların prevalansı, fitokimya endüstrisini yaklaşmakta olan bir sanayi sektörüne dönüştürmektedir. Bununla birlikte, bu sektörle ilişkili yaygın bir tuzak, bu fitokimyasalların üretiminin çoğunlukla çeşitli geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilmesi ve yüksek kayıplara ve düşük verime yol açmasıdır. Fitokimyasal endüstrilerini uygun ve karlı hale getirmek için, dikim ve hasat, hammadde hazırlığı ve katma değerli üretim gibi uygun süreçler ile çeşitli dönüşümler gereklidir. Ayrıca, fitokimyasal işlemlerinin başarılı bir şekilde modernizasyonu için proses teknolojisinin, ekstraksiyon ve ürün formülasyonu amacıyla optimize edilmesi gerekmektedir. Fitokimyasal işlemede yer alan birkaç adım, aktif fitokimyasalların işlenmeden önce muhafaza edilmesini sağlamak için iyi bir depolama için öğütme işlemine kadar boyut küçültmeyi içermektedir. Ekstraksiyon, kurşun keşif aşamasından ilaç keşfinin iteratif sürecinde önemli bir adımdır [507]. Bununla birlikte, pratikte, aktif bileşenlerin farmakodinamik etkilerini etkileyebilecek ve istenmeyen safsızlıkları gidermek için

fiziksel ve kimyasal ön işlemler gereklidir. Ekstraksiyonu, daha iyi farmakolojik profillere sahip yeni analogların rasyonel tasarımı ve sentezi ile iyileştirme ile birleştirilen kurşun bileşiklerinin izolasyonu takip etmektedir. Ayrıca, fitokimyasal analiz için bu çok önemli bir adımdır. Elde edilen ekstrakt kimyasal ve aktif belirteçler açısından standardize edilmiştir. Bitkinin başlıca bileşenleri kimyasal işaretleyiciler, ama aktif işaretleyiciler ise biyoaktif özelliklerden sorumlu kimyasal bileşenlerdir. Kemosistemik çalışmalarında bitki sınıfları ile spesifik grupların oluşumu arasındaki ilişkiyi kurmak için her iki tip belirteç de kullanılmaktadır. Ham bitki ekstraktı, ilk olarak mevcut etnofarmakolojik bilgi temelinde belirli biyoaktiviteler için denenmekte ve bunu, ekstrelerin hazırlanması ve istenmiş bileşiklerin biyoaktivite güdümlü izolasyonu takip etmektedir [507-513].

Ekstraksiyon, genel olarak çeşitli gıda endüstrilerinde kullanılan bir ayırma tekniğidir. Esasen, bir veya daha fazla ilgi konusu bileşiği bir fazdan veya orijinal konumlarından başka bir faza veya daha ileri işlem ve analizlerin gerçekleştiği fiziksel olarak ayrılmış bir yere taşıma işlemidir [514]. Ekstraksiyon katıdan sıvıya veya sıvıdan sıvıya olabilmektedir. Uygun bir ekstraksiyon tipinin kullanılması sadece sonuçların doğruluğunu etkilemekle kalmamakta, aynı zamanda toplam analiz süresini de belirlemekte ve bu şekilde örnek ve analizi etkilemektedir. Ekstraksiyon süreci, geleneksel ve ileri teknikler olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Bitki materyallerinden biyoaktif bileşenlerin izolasyonu, zaman ve sıcaklık gibi çeşitli koşullar altında farklı çözücülerin denendiği bir deneme yanılma uygulamasıdır. Benzersiz / üzerinde çalışılmamış biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu ve saflaştırılmasının temel hedefleri, kimyasal parmak izi veya metabolomik çalışmalar için ikincil metabolitlerin potansiyelini ve biyoaktiflerin biyo-tahlilden türetilen tanımlamalarını araştırmaktır. Biyoaktif bileşiklerin izolasyonu, bitki matrisinden çözünen maddelerin çözünmesini, bileşiklerin özütleyici içine difüzyonunu ve kromatografik teknikler kullanılarak çözünen maddelerin ayrılmasını kapsamaktadır. Çeşitli doğal kaynaklardan ekstraksiyon seçiciliğini anlamak için farklı koşullarda farklı ekstraksiyon teknikleri kullanılmalıdır. Biyoaktif bileşikleri ekstrakt edilmesi için, çoğu yüzlerce yıl boyunca neredeyse aynı kalan farklı teknikler de kullanılabilir. Bütün bu tekniklerin, karmaşık bitki örneğinden hedeflenen biyoaktif bileşiklerinin ekstrakte edilmesi, analitik yöntemlerin seçiciliğini arttırmak, hedeflenen bileşiklerin konsantrasyonunu artırarak biyo-tahlilin duyarlılığını arttırmak, biyoaktif bileşikleri saptama ve ayırma için daha uygun bir formata dönüştürmek ve örnek matrisindeki varyasyonlardan bağımsız olarak güçlü ve tekrarlanabilir bir

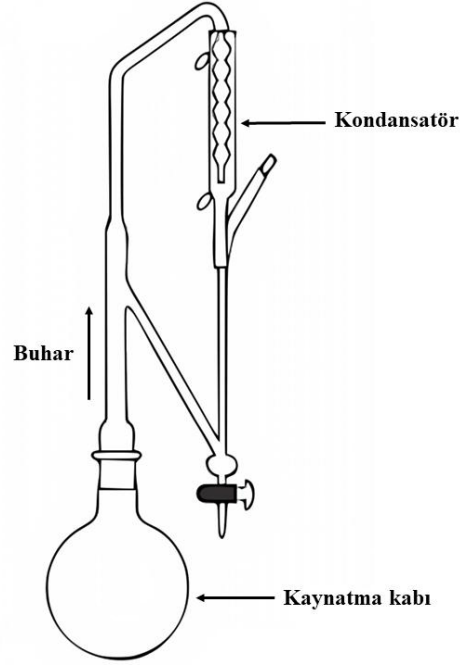
yöntem sağlamak olarak bazı ortak amaçları vardır. Son teknolojileri kullanılarak, yüksek bitkilerden, deniz organizmalarından ve mikroorganizmalardan doğal ürünlerin izolasyonu kritik öneme sahiptir. Bitki evreni, yaklaşık olarak 80-100,000 bitkisel biyoaktif bileşen içermektedir. Dolayısıyla, ayırma ve izolasyon süreçleri oldukça elverişsiz ve zahmetli olmaktadır. Doğal ürünlerin izolasyonu genellikle ayrıştırılacak bileşiklerin çözünürlüğü, uçuculuğu ve stabilitesine bağlı olarak çeşitli ayırma tekniklerini birleştirir. Ayırma işleminin farklı optimizasyon parametrelerinin seçimi kritik ve önemlidir. Ekstraksiyon teknolojisi, çalışma parametreleri ve istenen bileşenlerin verimi açısından optimize edilmiştir. İşleme yönteminin standardizasyonu, ekstraktların değerini arttırmak için önemli ve özellikle ekstraktların düşük verimi nedeniyle kritiktir. Aynı zamanda aktif bileşiklerin içeriğinde tutarlılık yoluyla ürün gücünü sağlamaktadır. Artan işleme ile, ürünün değeri de artmaktadır. Bununla birlikte, bazı durumlarda, ekstraktın fitokimyasalların sinerjik etkisinden dolayı saf fitokimyasallardan daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, ekstraktın standardizasyonu bitkinin fitokimyasal profilinin korunmasının sağlanmasını gerektirmektedir. Fitokimyasal işlemede birincil vurgu, ekstraksiyon işleminin optimizasyonu, verim artışı, ekstraksiyon için kullanılan çözücü hacminde azalma ve işlem süresinde azalma içererek işleme tekniklerini geliştirmek ve ürünleri geliştirmek üzerinedir. Biyolojik rafineri, ham bitki materyalinin tamamen parçalandığı ve değerli ürün spektrumuna dönüştürüldüğü yeni bir konsepttir. Çevresel açıdan güvenli ve ekonomik açıdan uygun bir üretim teknolojisi, fonksiyonel gıda katkı maddeleri veya farmasötik bitkisel ekstraktlar için faydalı olmaktadır [507-513].

## 2.6.1. Ekstraksiyon işlemi ve teknolojisi

En çok kullanılan ekstraksiyon teknikleri mevcut literatür bilgilerine göre aşağıdaki bölümlerde tartışılacaktır.

### 2.6.1.1. Hidrodistilasyon

Bitkilerden biyoaktif bileşikleri ve uçucu yağları, hidrodistilasyon geleneksel bir yöntem olarak buhar damıtma ve organik çözücü ekstraksiyonu ile izole edilebilmektedir. Su damıtması, su ve buhar damıtması ve doğrudan buhar damıtması olarak üç çeşit hidrodistilasyon vardır [515]. Hidrodistilasyon, hidrodifüzyon, hidroliz ve ısıl ayrışma olarak üç ana fizikokimyasal işlemi içermektedir. Glandüler trikomalardan salgılanan uçucu yağ esas olarak yapraklarda yoğunlaşmış ve alkoller, esterler, fenoller, hidrokarbonlar, karbonil ve terpenler bileşikleri ana bileşenleridir. Aldehidler, alkoller, esterler, ketonlar ve lakton gibi oksijenli bileşikler, koku kaynağı ve hava ve ışık varlığında oksitleyici eğilimi nedeniyle monoterpenler ve seskiterpenler gibi doymamış bileşenlerden daha stabildir. Monoterpenlerin kimyasal değişimlere, hatta buhar damıtma işlemine bile açık olduğu iyi bilinmektedir [516]. Kaynama noktası, termal stabilite ve buhar basıncı-sıcaklık ilişkisi gibi fiziksel özellikler verimi optimize etmek için önemli bilgiler sağlamaktadır. Esansiyel yağların hidrodistilasyon ile izolasyonu için, aromatik bitki materyali bir damıtma tertibatına aktarılıp yeterli miktarda su eklendikten sonra kaynatılmaktadır (Şekil 2.43). Alternatif olarak, bitki numunesine doğrudan buhar enjekte edilerek buhar doğrudan damıtma tertibatına geçebilmektedir. Sıcak su veya buhar, uçucu yağları yağ bezlerinden arındırmaktadır. Sıcak su ve buhar, bitki dokusunun serbest biyoaktif bileşiklerine etki eden ana faktörler olarak davranmaktadır. Buhar formunda su ve yağ karışımı, kondenserdeki suyun sirkülasyonu ile yoğunlaşmaktadır. Damıtık akışlar, ayırıcıdan kondenserden akmakta ve burada yağ ve biyoaktif bileşikler damıtılmış sudan otomatik olarak ayrılmaktadır [517]. Basitliğine ve çözücünün dahil edilmemesine rağmen, buhar damıtma işlemi zaman alıcı ve enerji tüketen bir tekniktir. Ayrıca, işlem sırasında yüksek sıcaklık ve yüksek nem genel kalitenin değişmesine ve bozulmasına neden olabilmektedir. Bu dezavantaj, ısıya duyarlı bileşenlerin ekstraksiyonunu sınırlamaktadır [507, 508, 518].



**Şekil 2.43:** Hidrodistilasyon düzeneği (Clevenger aparatı)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 508, 519].

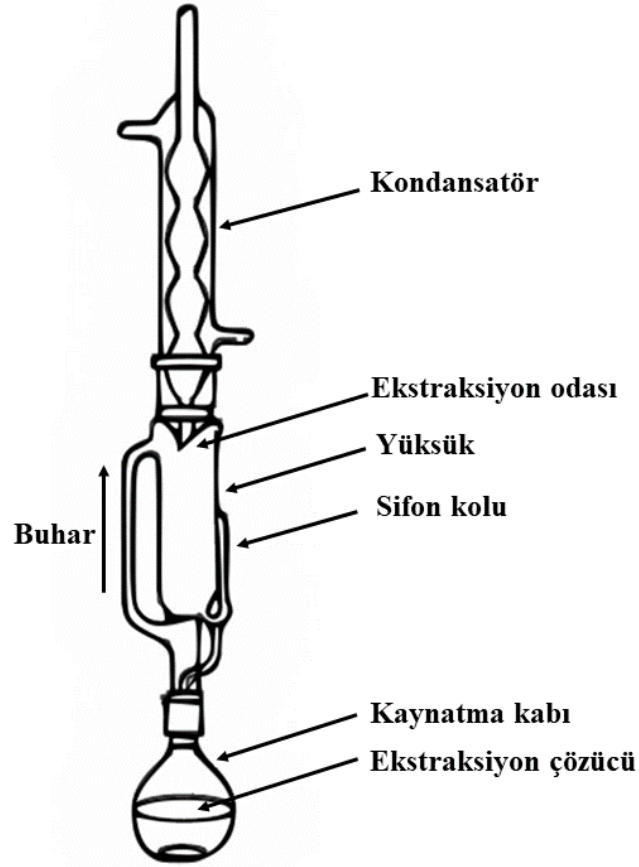


### **2.6.1.2. Sokslet ekstraksiyonu**

Bu ekstraksiyon aparatı, 1879'da ilk olarak Alman kimyacı Franz von Sokslet tarafından önerilmiştir. Esas olarak lipid ekstraksiyonu için tasarlanmıştır. Fakat şuan bununla sınırlı değildir. Sokslet ekstraksiyonu, katı matriks kullanılarak çeşitli doğal kaynaklardan fitokimyasallar olarak değerli biyoaktif bileşiklerin ekstrakt edilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sokslet ekstraksiyonu, yağ içeriğinin belirlenmesi için en sık kullanılan standart bir yöntemdir. Yeni ekstraksiyon alternatiflerinin karşılaştırılması için model olarak kullanılmaktadır.

Geleneksel sokslet sisteminde bitkisel malzeme bir yüksük tutucuya yerleştirilmekte ve bir damıtma şişesinden yoğunlaştırılmış taze çözücü ile doldurulmaktadır. Genel olarak, az miktarda kuru numune yüksük içine yerleştirilmektedir. Yüksük, daha sonra, ilgi konusu çözücü içeren damıtma balonuna yerleştirilmektedir. Sıvı taşma seviyesine ulaştığında, bir sifon yüksük tutucu solüsyonunu aspire etmekte ve damıtık çözelti içine geri ekstrakt etmekte ve damıtılmış sıvıyı dökme sıvıya taşmaktadır. Çözücü şişede, çözücü damıtma işlemi kullanılarak çözücünden ayrılmaktadır. Çözücü şişe içinde bırakılmakta ve taze çözücü bitki katı yatağına geri dönmektedir. İşlem, ekstraksiyon tamamlanana kadar tekrarlanmaktadır.

Ekstraksiyonun verimi, çözücünün polaritesi, sıcaklık, ekstraksiyon süresi ve numune-çözücü oranı gibi faktörlerden etkilenmektedir. Ekstraksiyon sıcaklığı kullanılan solventin kaynama noktasına bağlıdır. Bu sistem bir Sokslet aparatı, bir solvent haznesi, bir ekstraktör gövdesi, bir elektrikli ısı kaynağı ve bir su soğutmalı reflü kondansatöründen oluşmaktadır. İnce toz haline getirilmiş bitki materyali bir Whatman kağıt yüksüğüne yerleştirilmektedir. Yüksük, bir Sokslet aparatına yerleştirilip çözücü ile ekstrakt edilmektedir (Şekil 2.44). Sokslet sisteminin bazı dezavantajları arasında farklı nutrasötik bileşenlerin ekstrakte edilmesi için farklı çözücülerin kullanılmasını, büyük miktarda çözücü kullanılmasını ve tam ekstraksiyon için daha uzun süre gerektirmesi gibi durumlar sayılabilir. Bu işlem, bölümlenme için kullanılmadığı için sıvı-sıvı ekstraksiyonuna kıyasla daha az karmaşıktır. Ayrıca, ekstraksiyonun herhangi bir aşamasında hiçbir emülsiyon oluşumu gerçekleşmemektedir [520]. Daha uzun ekstraksiyon süresi, büyük miktarlarda solvent tüketimi ve sürekli ısıtma nedeniyle kararsız bileşiklerin olası bozunması, sokslet ekstraksiyon tekniğinin en önemli dezavantajlarıdır [507-513].



Şekil 2.44: Soklet sistemi<sup>1</sup>

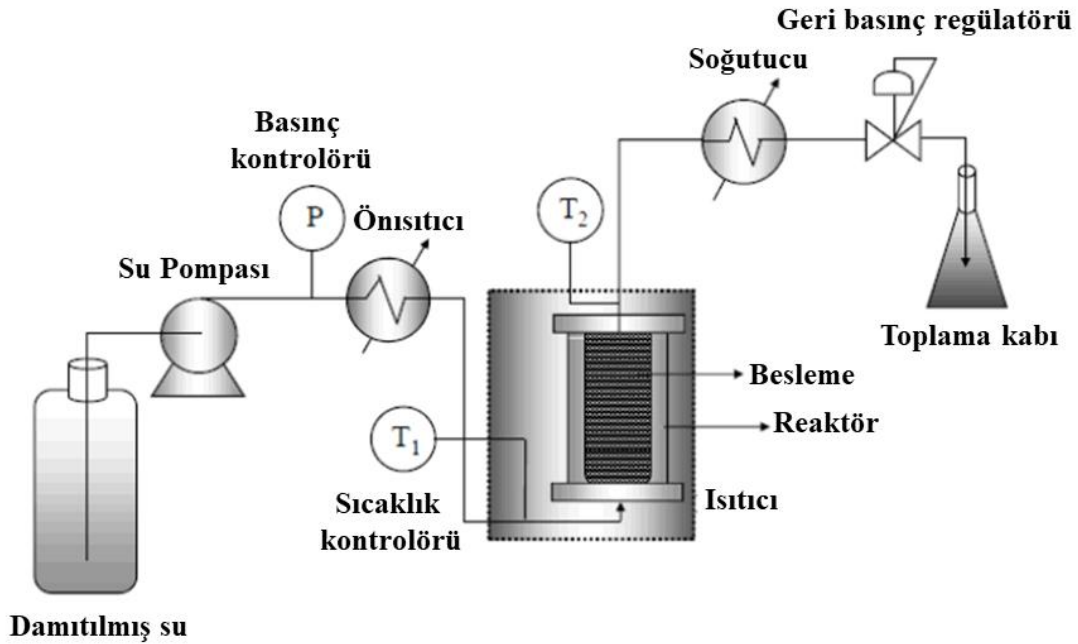
<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir. [508, 513, 521].

### **2.6.1.3. Subkritik Su Ekstraksiyonu**

Suyun yüksek sıcaklıkta ve süperkritik koşulların altında bir basınç değerinde, ekstraksiyon işlemlerinde kullanılması genellikle subkritik su ekstraksiyonu olarak adlandırılmaktadır. Bu teknik, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinin yerini almak üzere kullanışlı bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Subkritik su ekstraksiyonu geleneksel ekstraksiyon teknikleri üzerine daha hızlı olarak, yüksek verim üreterek ve çözücü tüketimini büyük ölçüde azaltarak bir dizi önemli avantajlar sunmaktadır [522]. Bu nedenle, bu yeni ekstraksiyon tekniği, diğer geleneksel ekstraksiyon yaklaşımlarına kıyasla sağladığı avantajlar ve geleneksel organik çözücü ekstraksiyon teknikleriyle karşılaştırıldığında çevre dostu olmasından dolayı artan bir ilgi görmektedir. Subkritik su ekstraksiyonu, sıvı halde suyu korumak için genellikle 10 ile 60 bar arasında olan yüksek basınç altında bulunan ikincisi suyun kritik sıcaklığında 100 ile 374°C arasında olan sıcak su kullanılarak yürütülmektedir. Dielektrik sabiti ve çözünürlüğü gibi çözücü parametreleri, sıvı haldeyken sıcaklık ile etkilenmektedir [523]. Bu nedenle, oda sıcaklığında su dielektrik sabitinin değeri yaklaşık olarak 80 olmasına rağmen, bu değer 250°C'ta yaklaşık 30'a düşürülebilmektedir. Altkritik suyun polaritesi, ortam koşullarındaki sudan çok daha azdır. Altkritik suyun dielektrik sabiti, basınca ve sıcaklığa bağlı olarak 20 - 40 aralığındadır. Bu değer 25°C'da etanol ( $\epsilon = 25$ ) ve metanol ( $\epsilon = 33$ ) dielektrik sabitine çok benzemektedir [524]. Bu koşullarda, etanol veya metanol gibi bazı organik çözücüler tarafından sunulan değere benzer bir değer elde edilmektedir. Bu nedenle, ortam koşullarında suda iyi çözünmeyen hedef polar veya hafif polar bileşenler, altkritik suda çok daha fazla çözünebilmektedir [525]. Bu nedenle, bu teknik, organik çözücülerin yerini alıp, polar olmayan doğal biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılabilir. Bununla birlikte, farklı tipteki bileşikler için dielektrik sabitlerinin değişkenliğini dikkate almak önemlidir. Organik sıvı çözücü ekstraksiyonu üzerinde altkritik su ekstraksiyonunun diğer önemli avantajları daha kısa ekstraksiyon süresi, daha yüksek ekstrakt kalitesi ve daha düşük solvent ekstraksiyon maliyetleridir [523]. Bu tekniğin uçucu yağ izolasyonu alanında kullanılması çok ümit vericidir [526]. Bu nedenle, 125°C ve 175°C arasındaki basınç altındaki altkritik suyun, biberiye kaynaklı oksijenli koku ve aroma bileşenlerini ayıkladığı, diğer yandan monoterenlerin yavaşça ekstrakte edildiği ve seskiterpenlerin, balmumlarının ve lipidlerin sadece çok küçük miktarlarının çıkarıldığı gösterilmiştir. Subkritik su ekstraksiyonu, çeşitli bitkisel ve diğer matrislerden farklı doğal biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda başarıyla

uygulanmıştır (Tablo 2.3). Prosesin ekstraksiyon oranı, bileşiklerin bitki materyali dışına difüzyonla değil, bitki materyali ve su arasındaki bileşiklerin ayrılmasıyla belirlenmektedir. Ayrıca, yağın bileşiminin ve kalitesinin, bitki materyalinin kütlesine göre su miktarını kontrol ederek ayarlanabileceği de anlaşılabilir [527]. Ekstraksiyon prosesini etkileyen değişkenlerin derinlemesine incelenmesiyle marjoram esansiyel yağının su ile ayrıştırılması için benzer eğilimler gözlemlenmiştir. Sıcaklık önemli değişken olarak bulunmuştur. Sıcaklığın etkisini inceleyerek 100 ile 175°C arasında çalışılmış olan ve 150°C'lik optimum bir değer olarak elde edilen oksijenli bileşiklerin miktarı açısından en kaliteli esansiyel yağ sağlanmıştır. Altkritik su kullanılarak, biyoaktif bileşenler gıdalar ve otlardan ekstrakt edilmiştir [528, 529]. Subkritik su ve etanolik ve sıcak su ekstraksiyonu kullanılarak kanola tohumundan elde edilen antioksidan bileşiklerin ekstraksiyonu incelenmiştir. 160°C'deki subkritik su ekstraksiyonunun, gram başına en yüksek toplam fenolik içeriğe ve antioksidan kapasiteye sahip olduğu bulunmuştur [530]. Benzer şekilde, farklı sıcaklık aralıklarında şarapla ilgili ürünlerden kateşin ve proantosiyanidinlerin geri kazanılmasında çalışılmıştır [531]. En yüksek geri kazanım, malzemenin 50, 100 ve 150°C'de 3 sıralı ekstraksiyona tabi tutulduğunda bulunmuştur. Fakat farklı polimerizasyon derecelerine sahip bileşiklerin seçici ekstraksiyonları, farklı sıcaklıklarda tek adımlı bir ekstraksiyon kullanılarak elde edilebilmektedir. Biyoaktif bileşiklerin subkritik su ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmesi için kullanılan diğer bitkisel matrisler arasında bazı mikroalgler, biberiye, kekik ve narenciye pomakları bulunmaktadır [523, 532-534]. Ayrıca, ekstraksiyon prosedürü sırasında, çeşitli bileşenler kendi matrislerinde modifiye edilebilir ve işlevlerini etkileyebilir [522]. Subkritik su ekstraksiyon koşulları altında, doğal biyoaktif bileşikler içeren matrislerin hücre yapısı kırılarak bu bileşikler hücre dışına çıkarak sıcak suda çözünmektedir. Bu bileşikler, özütleme sırasında etkileşime girerek orijinal hedeflere kıyasla, farklı yapı ve özellikler sergileyebilen farklı bileşikler oluşturulabilmektedir. Bu tür etkileşimlerin örnekleri, subkritik su ekstraksiyon koşulları altında tercih edilebilen Maillard reaksiyonu veya karamelizasyonudur [522]. Alg ve bitkiler ve mikroalg dahil olmak üzere farklı doğal bileşiklerin subkritik su ekstraksiyonu sırasında antioksidanların neoformasyonu üzerinde çalışılmıştır [522]. Maillard, karamelizasyon ve termoksidasyon reaksiyonlarından türetilen ekstraksiyon prosesi sırasında neoformlu bileşiklerin, numunenin doğasına bağlı olarak ekstraktların genel antioksidan kapasitesini etkilediğini öne sürmüşlerdir. Bu nedenle, bu ekstraktların potansiyel uygulaması hakkında daha iyi bir bilgi elde etmek için, subkritik su

ekstraksiyonu ile elde edilen bireysel bileşiklerin biyoaktif özelliklerinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Genel olarak kullanılan geleneksel ekstraksiyon tekniklerine göre subkritik su ekstraksiyonunun kullanımı, ekstraksiyon süreleri, ekstraktların daha yüksek kalitesi, ekstraksiyon maddesinin daha düşük maliyetleri ve çevreye uygun bir teknik olması gibi bir dizi avantaj sağlamaktadır. Ek olarak, subkritik su ekstraksiyonu ile ekstrakte edilen bileşikler arasındaki modifikasyonların ve / veya etkileşimlerin ortaya çıkması nedeni ile, yeni oluşan antioksidanların yapısını ve bunların, ekstraktların genel antioksidan kapasitesine bireysel katkılarını tanımlamak için gelecekteki araştırmalarda ele alınması gerekmektedir [507-513]. Bu yaklaşım, sağlık yararları sağlayan fonksiyonel gıda bileşenleri veya nutrasötikler olarak kullanılabilir. Subkritik su ekstraktör sistemi şekil 2.45'te gösterilmiştir.



Şekil 2.45: Subkritik su ekstraksiyon sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507-513, 535].

#### **2.6.1.4. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE)**

Çözücü olarak kullanılan süperkritik akışkanların, mükemmel kütle transferi, sıcaklık ve basınç ile çözünürlük kontrolü gibi avantajları vardır. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, çevresel olarak güvenli bir teknoloji olarak tanımlanmıştır [523]. Uygulamaları arasında bitkiler, gıda yan ürünleri, algler ve mikroalgler olabilmektedir. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu kullanan endüstriyel ölçekli tesisler, kahve ve çayın kafeinsizleştirilmesinde ve aynı zamanda da şerbetçi otundan acı maddelerin çıkarılmasında kullanılmıştır [536, 537]. Ayrıca, bu tekniğin amacı, yüksek seçicilik, kısa ekstraksiyon süresi, artan kirliliğin önlemesi ve toksik olmayan organik çözücülerin kullanımınıdır [538]. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, yoğunluk, difüzyon hızı, dielektrik sabiti ve viskozite gibi akışkanların bazı özelliklerine dayanmakta ve genellikle süper kritik bir akışkana ulaşmak için basınç ve sıcaklık gibi bazı koşulları modifiye etmektedir [523, 539]. Bu koşullar altında, süperkritik akışkanın yoğunluğu sıvıya benzerken viskozitesi gazına benzer olduğundan akışkan gaz ve sıvı arasındadır [539, 540]. Dolayısıyla, bir akışkanın süperkritik durumu, sıvı ve gazın birbirine özdeş olduğu durumdur [538]. Ek olarak, sıvı çözücülerin aksine, basınç ve sıcaklığı değiştirilerek yoğunluğu ayarlanabilen süper kritik akışkanlar, sıvılardan daha iyi taşıma özelliklerine sahiptir [523, 539]. Süperkritik akışkan ekstraksiyon işlemi sırasında, ham madde, sıcaklık ve basınç kontrol cihazlarına sahip bir ekstraktör kabına yerleştirilmektedir. Daha sonra ekstraktör kabı, bir pompa ile akışkan ile basınçlandırılmaktadır. Akışkan ve çözülmüş bileşikler ayırıcılara nakledildikten sonra, ürünler ayırıcıların alt kısmında bulunan bir musluktan toplanmaktadır. Son olarak, akışkan rejenere edilir veya çevreye bırakılmaktadır [539]. Süperkritik akışkan seçimi bir süper kritik akışkan ekstraksiyon sürecinin geliştirilmesi için çok önemlidir [541]. Süperkritik karbondioksit, patlayıcı ve toksik olmayan, ucuz, lipofilik maddeleri çözme yeteneğine sahip ve son ürünlerden kolaylıkla çıkarılabilir olması ile organik solventlere çekici bir alternatif sunmaktadır [538, 540, 542]. Diğer bir avantajı ise, karbondioksitin oda sıcaklığı ve basıncında gaz olmasıdır. Bu da geri kazanımını çok basitleştirir ve solvent içermeyen özler sağlamaktadır. Buna ek olarak, bu molekül çevre dostu olarak ve Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi ve Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu tarafından genel olarak güvenli kabul edilerek nitelenmiştir. Fakat düşük polaritesi nedeniyle, polar bileşiklerin ekstraksiyonunda daha az etkilidir [523]. Polar moleküller süperkritik karbondioksitte az çözünürler ve dolayısıyla ekstrakte edilmesi mümkün değildir [543]. Bu nedenle, işlemin çözünürlüğünü ve seçiciliğini arttırmak için başka çözücülerin

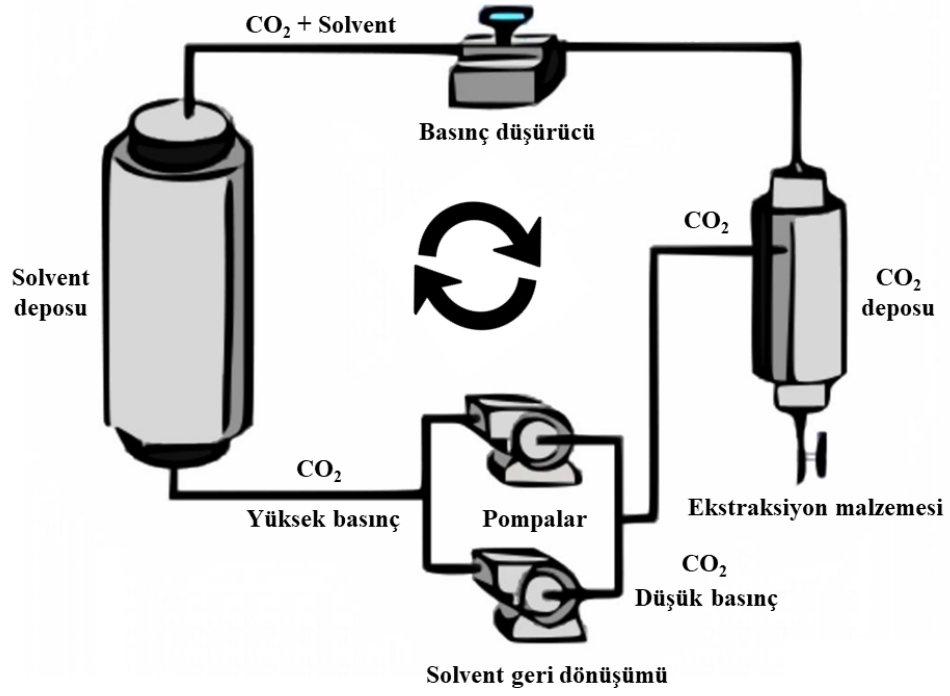
kullanılması gerekmektedir [539]. Bu olay, çözümlülük arttırıcılar olarak işlev gören çeşitli bileşenlere atfedilir ve buna “ortak çözücü etkisi” denmektedir. Heksan, metanol, etanol, izopropanol, asetonitril ve diklorometan bu yardımcı çözücüler veya modifiye ediciler arasındadır [538, 544]. Süperkritik akışkan olarak azot, etilen, florokarbonlar, ksenon veya metanlar gibi solventler olmasına rağmen, çoğu ayırma sistemi, güvenlik ve düşük maliyeti nedeniyle karbondioksidi kullanmaktadır [543]. Çoğu organik çözücünün aksine, karbondioksit çevreye zararlı değildir, viskozitesi düşük ve difüzyon katsayısı yüksektir. Karbondioksit ile karşılaştırıldığında, süperkritik su çok daha yüksek kritik sıcaklık ve basınca (347.2°C ve 220.6 bar) sahiptir. Ama bir çözücü olarak etkisi daha büyüktür. Çeşitli reaksiyonlar için kullanılabilir. Süperkritik karbondioksit neredeyse hiç yüzey gerilimine sahip değildir. Bu nedenle, sıvı çözücülere kıyasla bitki matrisine daha iyi penetrasyon mümkündür. Ancak, polar ve yüksek molekül ağırlıklı bileşiği çözme kapasitesi sınırlıdır. Bir modifiye edici olarak polar çözücünün eklenmesi polaritesini artırabilmektedir [545-547]. Süperkritik ekstraksiyonunun etkinliği bir dizi faktöre bağlıdır. Numene hazırlama, ekstraksiyon parametreleri ve toplama modu, süperkritik ekstraksiyonu için deneysel değişkenler olarak tarif edilmiştir [548, 549]. Su gözenekleri açabildiğinden ve matrisi şişirebildiğinden, süperkritik karbondioksitte sadece yaklaşık %0.3 oranında çözünmesine rağmen, analit değiştiricinin etkileşimini artırabilmektedir. Böylece sıvının analite daha iyi erişmesini ve analitin matrisden dışarı çıkmasını sağlamaktadır. Numunedeki nem mevcudiyeti, çözünenin ve matris özelliklerinin doğasına bağlı olarak süper kiritik ekstraksiyonu etkileyebilmektedir. Daha yüksek basınçta, su süperkritik akışkanda daha fazla çözünür hale geldiğinden dolayı polar bileşiklerin sulu faza tercihli olarak ayrılması söz konusudur. Bu, *Digitalis lanata* yapraklarından digoksin ekstraksiyonu durumunda rapor edildiği gibi tekrarlanabilirliği ve verimi etkilemiştir [550]. Numunedeki nem seviyesi, numunenin ısıtılmasıyla veya bir kurutma maddesi eklenerek kontrol edilebilmektedir [551]. Sabit bir sıcaklıkta artan basınç, yoğunluğu ve solvasyon gücünü arttırarak hem arzu edilen hem de istenmeyen bileşenlerin daha iyi ekstraksiyonu gerçekleşmiştir [507]. Tokoferoller, fitosteroller, polikosanoller ve serbest yağ asitleri gibi lipid bileşiklerinin sorgumdan özütlenmesi için süperkritik akışkan ekstraksiyon yönteminin fizibilitesi araştırılmıştır [544]. Diğer taraftan, bilimsel çalışmalar biberiye, adaçayı, kekik ve kekik otu gibi pek çok baharatın yanı sıra antioksidan etkilerini göstermiştir. Bu nedenle, farklı basınç ve sıcaklıklarda ve etanolü yardımcı çözücü olarak dikkate alarak kekik otu yapraklarının geniş ekstraksiyon koşulları altında bir

antioksidan kaynağı olarak kullanma olasılığını değerlendirilmişlerdir [541]. Elde edilen sonuçlar, süperkritik karbondioksit prosesi ile elde edilen ekstraktların, özellikle bir yardımcı çözücü kullanıldığında, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikaline karşı yüksek antioksidan kapasiteye sahip olduklarını göstermektedir. Bu bağlamda, süperkritik karbondioksit, termal olarak kararsız veya kolayca oksitlenen bileşiklerin ekstraksiyonları ve gıda endüstrisi için oldukça önemlidir [552]. Günümüzde, süperkritik akışkan ekstraksiyonu, kahvenin kafeinsizleştirilmesi, yağ asidi rafine etme ve nutrasötikler ve fonksiyonel gıdalarda potansiyel kullanımı olan doğal kaynaklardan elde edilen uçucu yağ ve aromaların ekstraksiyonu gibi birçok endüstriyel uygulamada kullanılmaktadır [538, 553]. Bu yöntem, organik çözücüler kullanılarak biyolojik olarak aktif bileşiklerin ekstrakte edilmesinde, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine önemli bir alternatiftir [538]. Ayrıca, başarılı bir süperkritik akışkan ekstraksiyonu geliştirmek için, ekstraksiyonu en üst düzeye çıkarmak amacıyla süperkritik akışkanlar, ham maddeler, yardımcı çözücüler ve ekstraksiyon koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin dikkate alınması gerekmektedir. Dahası, süperkritik akışkan ekstraksiyonunun, kararlı ve aktif olarak muhafaza edilebilen mikro parçacıklarda aktif maddelerin kuru toz halinde elde edilmesi için kullanılabileceğini başarı ile kanıtlanmıştır. Bu yaklaşım, bu bileşiklerin gıda ve farmasötik endüstrilerinde kullanılması için yeni bir fırsat sunmaktadır. Cape ve diğerleri tarafından yakın zamanda aktif tozlar ve partiküllerin hazırlanması ile süperkritik tekniklerin uygulaması gözden geçirilmiştir [554]. Basınçlı karbondioksite maruz kaldıktan sonra numune matrisinin şişmesi, analit matris kompleksinin bozunmasını engelleyebilmekte ve ekstraksiyon verimliliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir [555]. Yüksek basınçlı karbondioksitin neden olduğu bitki matriksindeki değişime bağlı olarak fesleğen, havuç ve stevianın ekstraksiyonunda düşük verim bildirilmiştir [556-560]. Sıcaklığın süperkritik akışkanların çözücü gücü üzerindeki etkileri analit uçuculuğuna ve sıvının yoğunluğuna bağlıdır [507]. Sıcaklığı düşük basınçta arttırmak, Artinko'nun *Ginko biloba*'dan ekstraksiyonunda süper kritik akışkanın çözücü gücünü azaltmaktadır. Bununla birlikte, bunun tersi yüksek basınçta gözlemlenmiştir [548, 561, 562]. Burada, arttırılmış basınçta arttırılmış sıcaklık, solvasyon gücünü arttırmasını sağlamıştır [548, 561, 562]. Bu gözlemler, yoğunluğun etkisinin düşük basınçta daha baskın olduğunu, oysa uçuculuk etkisinin yüksek basınçta daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Daha yüksek sıcaklık desorpsiyonunda, analitin difüzyonu ve çözünmesi tercih edilmesine rağmen, aynı zamanda yüksek ekstraksiyon sıcaklığı, muhtemelen degradasyona bağlı olarak daha iyi bir



verim üretmeyebilmektedir [562-564]. Basınç ve sıcaklığın dikkatli bir şekilde modülasyonu, sıralı ayırma kapları aracılığıyla fraksiyonel ayrışmaya izin vermektedir [565]. Değiştiricilerin eklenmesi, istenen bileşenin verimini üç kata kadar arttırmıştır [566, 567]. Mükemmel hidrojen-bağlama ve proton-kabul edici özelliklere sahip olan metanol, polar analitleri ekstrakte etmek için en yaygın kullanılan modifiye edicidir. Metanolden nispeten daha az polar olan ancak daha az toksik olan etanol, çeşitli ekstraksiyonlar için de kullanılmıştır. Bazı durumlarda, tek başına su kahve çekirdekleri ve çay yapraklarından kafein ekstraksiyonunda modifiye edici olarak kullanılmıştır. Modifiye edicinin kombinasyonu, analitlerin ekstraksiyon verimliliğini daha da arttırılabilmektedir. Metanol ve sudan oluşan bir kombinasyon, *Scutellariae radix*'den polar flavonoidin ve koka yapraklarından kokainin ekstraksiyonlarında metanolden daha etkili olmuştur. Modifiye süperkritik karbondioksit içindeki katıların çözünürlüğünü tahmin etmek için bir yöntem geliştirilmiş ve süperkritik karbondioksit için bir çözünürlük artırıcı olarak naproksen için uygun bir modifiye edici seçiminde orta derecede başarı ile kullanılmıştır [568]. Çok miktarda değiştiricinin eklenmesi, karışımın kritik parametrelerini değiştirmektedir [569]. Etanol ilavesi, birlikte-çözücünün daha yüksek yoğunluğuna ve yardımcı-çözücü madde etrafındaki süperkritik karbondioksit moleküllerinin kümelenmesine bağlı olarak süperkritik karbondioksitin yığın yoğunluğunu arttırmıştır [570]. Hem saf süperkritik karbondioksit hem de etanol ile modifiye edilmiş süperkritik karbondioksitte,  $\beta$ -karoten çözünürlüğü 40 ile 60°C'de ölçülmüştür [571]. Bir modifiye edici olarak etanolün çözünürlüğünü bir derece mertebesinde arttırdığı ve çözünürlükteki artışın modifiye edici konsantrasyonunun karekökü ile orantılı olduğu bulunmuştur. Süperkritik akışkan ekstraksiyonu, statik, dinamik ve statik dinamik ile bir kombinasyon olmak üzere üç modda gerçekleştirilebilmektedir. Süperkritik karbondioksit ekstraktör sistemi, Şekil 2.46'da gösterilmiştir. Statik ekstraksiyonda, belirli bir süre için sabit bir miktar süperkritik akışkan numune matrisi ile etkileşmektedir. Bu mod genellikle, ekstraksiyon prosesi desorpsiyon veya kinetik kontrollü olduğunda ve düşük bir analit konsantrasyonunun analite güçlü bir şekilde bağlı olduğu durumda kullanılmaktadır [572]. Ekstraksiyon çözelti / elüsyon kontrol edildiğinde dinamik mod kullanılmaktadır. Burada taze ekstraktant numune boyunca sürekli olarak geçmektedir. Akışın artırılması ekstraksiyon verimini arttırmaktadır [573]. Bazı durumlarda, sıralı statik ve dinamik ekstraksiyonlar daha iyi verim sağlamaktadır [574]. Statik faz, analitin matristen yer değiştirmesini ve ardından hücrenin dinamik bir taramasını kolaylaştırmaktadır [507, 548]. Süperkritik ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların,

katı bir matris kullanılarak toplama, az miktarda çözücü kullanarak sıvı toplama ve karbondioksitin doğrudan bir kap içine süblimasyonu olarak üç şekli bildirilmiştir. Katı toplamada, karbondioksit ve ekstrakt toplanmadan önce basınçlandırılarak toplama adsorbenti veya ambalaj malzemesi üzerindeki analitlerin adsorpsiyonu sağlanmaktadır. Sıvı toplamada, karbondioksit ve analit basınç altında olmakta ve çıkış sınırlayıcıdan doğrudan az miktarda toplama çözücüsüne kabarcıklanmaktadır. Bu yöntem, oksidasyonu korumak için çözücüye antioksidan eklenebileceğinden, analitler oksidatif bozunmaya duyarlı olduğunda faydalıdır [575]. Karbondioksit de analitin biriktirildiğinde boş bir şişeye doğrudan basınçsızlaştırılabilir [545]. Toplama yönteminin verimliliği de toplama sıcaklığı tarafından kontrol edilmektedir. Bazen, toplama kabının sıfırın altında sıcaklığa soğutulması, uçucu bileşiklerin kaybını önlemek için gereklidir [556, 557]. Yüksek modifiye edici konsantrasyonunda, toplama tankına kondansasyonu önlemek için sıcaklık, değiştiricinin kaynama noktasının üzerinde yükseltilmektedir. Son olarak, temel toplama seçimi numune matrisine, analit tipine ve ekstraksiyon parametrelerine bağlıdır. Süperkritik karbondioksit, son otuz yılda doğal ürünlerden yüksek değerli fitokimyasalların ekstraksiyonu ve izolasyonu için kullanılmıştır [576]. Bu tekniğin, geleneksel hidrodistilleme ve kafeinsizleştirme işleminden elde edilenlerden daha tatmin edici bileşimlerle arzu edilen seçici ayırma için uygun olduğu bulunmuştur [577, 578]. Süperkritik akışkanlar aynı zamanda reaksiyon karışımının homojenize olma kapasiteleri, yüksek difüzyon ve kontrollü faz ayrımı ve ürünlerin dağılımı nedeniyle bir reaksiyon ortamı olarak da görev yapmaktadır [579]. Süperkritik karbondioksitin fitokimyasalların izolasyonundaki uygulamaları tablo 2.3'te özetlenmiştir.

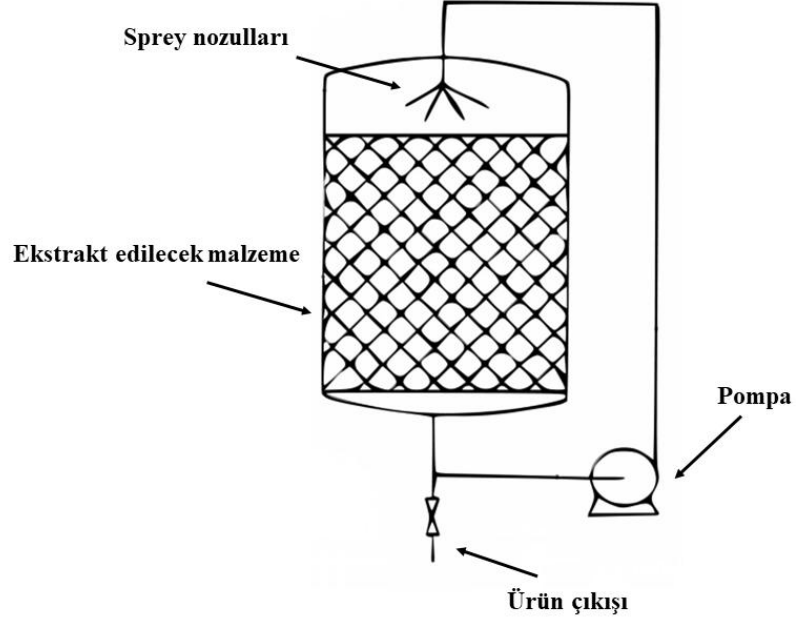


**Şekil 2.46:** Süperkritik karbondioksit ekstraksiyonu sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507-513, 580].

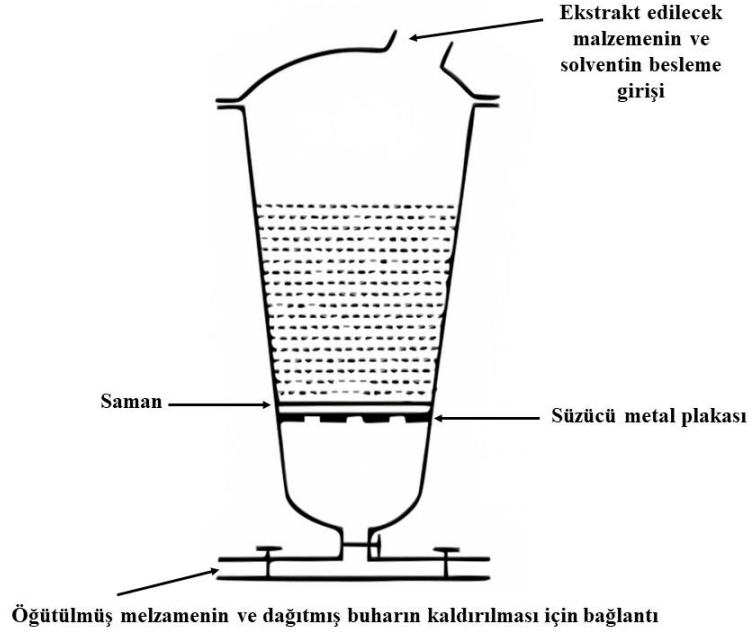
### ***2.6.1.5. Maserasyon ve süzme ile sulu ve organik çözücü ekstraksiyonu***

Uzun yıllardan beri ev yapımı tonik hazırlamasında maserasyon yöntemi kullanılmıştır. Uçucu yağlar ve biyoaktif bileşikleri almak için ucuz ve popüler bir yöntem haline gelmiştir. Küçük ölçekli ekstraksiyon için, maserasyon genellikle birkaç adımdan oluşmaktadır. İlk olarak, bitki materyallerinin küçük parçacık haline öğütülmesi, yüzey alanını çözücü ile karıştırmaya uygun olarak arttırmak için kullanılmaktadır. İkinci olarak, maserasyon işleminde, menstruum olarak adlandırılan uygun bir çözücü kapalı bir kaptaki eklenmektedir. Üçüncü olarak, sıvı süzülür, ancak bu ekstraksiyon işleminin katı artığı olan marka, büyük miktarda tıkanmış çözeltileri geri kazanmak için preslenmektedir. Elde edilen süzölmüş sıvı ve presleme sıvısı karıştırılıp süzülerek safsızlıklardan ayrılmaktadır. Maserasyonda arada sırada sallama, ekstraksiyonda difüzyonu arttırmak ve daha yüksek ekstraksiyon verimi amacıyla menstruum'a yeni çözücü getirmek için konsantre çözeltiyi numune yüzeyinden çıkarmak olarak iki şekilde kolaylaştırmaktadır. Ekstrate edilecek bileşiğin fizyokimyasal özellikleri, çözücünün seçimini belirlemektedir. Bileşik, belirli bir organik çözücü içinde yüksek ölçüde çözünür olduğunda, organik çözücü ekstraksiyonu gerçekleştirilmektedir. Hafif fiziksel koşullar kullanılarak infüzyon, sıcak veya soğuk su ile bitki dokularından hazırlanmaktadır. Bununla birlikte, kaynatılarak hazırlanan ekstrakt, kaynama suyu ve daha uzun ekstraksiyon süreleri ile nispeten kuvvetli fiziksel ekstraksiyon koşulları uygulanarak elde edilmektedir. Organik çözücülerle ekstraksiyon da oda sıcaklığında gerçekleştirilmektedir. İnce toz haline getirilmiş bitki materyali, oda sıcaklığında organik bir çözücü ile ıslatılmakta ve bu, aynı çözücü ile, en az üç ila dört kez, kapsamlı ekstrakte etmek için tekrarlanmaktadır [507]. Şekil 2.47 ve 2.48'de maserasyon ve süzme ekstraktör sistemleri gösterilmiştir.



Şekil 2.47: Maserasyon ekstraktör sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google göserller sitenden seçilip alınmış ve teori kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 581].



**Şekil 2.48:** Süzme ekstraktör sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 582].

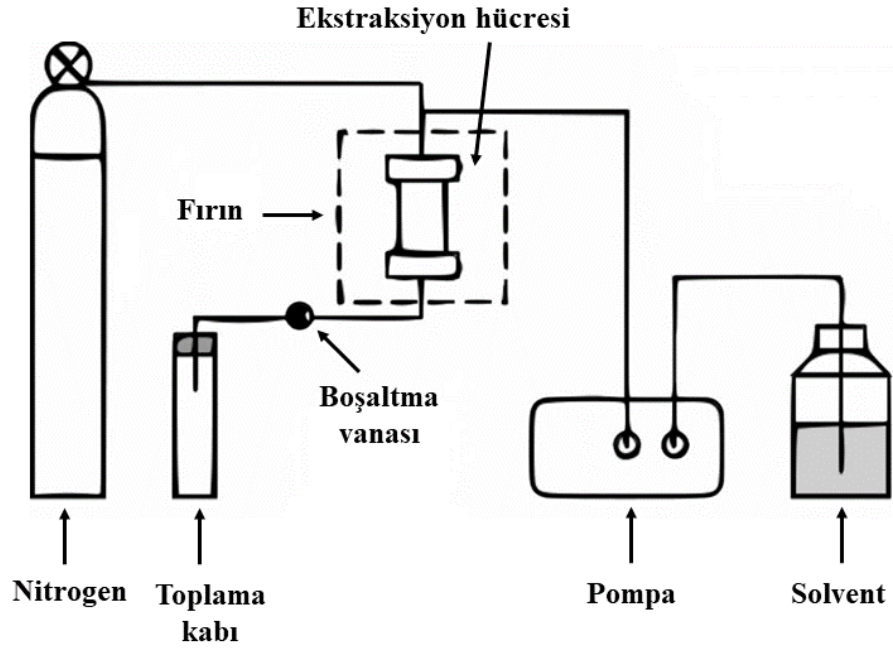
### **2.6.1.6. Basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Hızlandırılmış Solvent Ekstraksiyonu)**

Basınçlı sıvı ekstraksiyonu, bileşiklerin hızlı ekstraksiyon oranını sağlamak için 50 ila 200°C gibi yüksek sıcaklıkta ve 1450 ila 2175 psi gibi basınçta organik sıvı çözücüler kullanılarak gerçekleştirilmektedir [583]. Aynı zamanda prensip olarak sokslet ekstraksiyonuna benzer yeni bir ekstraksiyon tekniğidir [513].

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu, son yıllarda bitkilerden biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunun kısa bir süre içinde ve az miktarda çözücü ile inert nitrojen atmosferi altında tamamlanmasını sağlayan bir yöntemdir [584-588]. Bazı bitki materyallerindeki biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonundan önce özel ön işlem gerekmektedir. Kaempferol, luteolin, mirisetin ve qurosetin biberlerde glikozit olarak bulunmaktadır [589]. Bu bileşikler, sulu metanol veya etanol içinde kolayca çözünmektedir. Bununla birlikte, sonradan ortaya çıkan asit hidrolizinin serbest aglikononu flavonoid glukozidden serbest bırakmak için gerekli olmaktadır [590]. Enzimatik, asidik ve alkali hidroliz kombinasyonları, ekstraksiyondan önce veya sonra gerekli olmaktadır [591, 592]. Artan sıcaklık, difüzyonu artırıp ekstraksiyon kinetiklerini hızlandırmakta ve solventin viskozitesini azaltmaktadır. Böylece matrisin daha iyi penetrasyonuna ve çözülmüş matris etkileşiminin zayıflamasına izin vermektedir. Yüksek basınç, çözücünün kaynama noktasını kontrol etmekte ve çözücüyu matriks gözeneklerine zorlamakta ve daha iyi ekstraksiyon sağlamaktadır [593, 594]. Burada kullanılan solventler, normal olarak sokslet gibi standart sıvı ekstraksiyon teknikleri için kullanılanlardır. Sıcaklık, basınç, zaman ve çözücü hacminin optimizasyonu önemlidir. Yüksek basınç, ekstraksiyon hücrelerinin daha hızlı dolmasına ve sıvının katı matrikse sığmasına yardımcı olmaktadır [588]. Bu yeni teknikler, geleneksel çözücü ekstraksiyonları ile karşılaştırıldığında daha yüksek verimler elde edilmektedir. Ek olarak, basınçlı sıvı ekstraksiyonunun kullanımı, sadece su veya etanol gibi genellikle güvenli olarak kabul edilen çözücüler kullanıldığında elde edilen gıda sınıfı ekstraktların elde edilmesine yardımcı olmaktadır [595-597]. Çözücü özellikleri, sıcaklık değiştirilerek ayarlanabildiği için basınçlı sıcak çözücülerle çalışmanın birtakım avantajları vardır. Sıcaklık arttıkça, çözücünün dielektrik sabiti azalarak çözücünün polaritesini düşürmektedir [598]. Böylece sıcaklık, bir çözücünün polaritesinin, geri kazanılacak olan bileşiklerinki ile eşleştirilmesi için kullanılabilir [583, 587]. Bu da dielektrik sabitini, difüzyon oranını, viskoziteyi ve çözücünün yüzey gerilimini etkilemektedir. Bu hızlı ve verimli bir ekstraksiyon ile sonuçlanmaktadır. Kaynama noktasının üstünde olan yüksek sıcaklıkta

suyun, metanol ve asetonitril gibi bir organik çözücüye benzer bir dielektrik sabitine sahip olduğu bilinmekte ve muhtemelen suyun özelliğinin organik bir çözücününkiyle karşılaştırılabilmektedir. Basınçlı sıcak suyun, bitki materyallerinden polar bileşiklere orta derecede polar ekstrakte etmek için kullanılabileceği bildirilmiştir. Basınç altında ve 100°C'nin üstünde fakat olarak kritik sıcaklığının (374°C) altında olan kızgın su, bitkisel örneklerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır [527, 599, 600]. Kızgın su daha yüksek ekstraksiyon kabiliyeti gibi avantajları olmasına rağmen, termal olarak kararsız bileşikler için uygun değildir. Ayrıca, oksijenin dikkatli bir şekilde temizlenmesi gerekmekte, aksi halde yüksek sıcaklıktaki su, korozif etki nedeniyle ekstraksiyon kabına zarar verebilmektedir. Bu yöntemin ilk cihazı, 1994'te Dionex Corporation (Sunnyvale, California) tarafından ticarileştirilmiştir [601, 602]. Otomatik bir çözücü dağıtıcısının yakın zamanda gelişmesiyle, ekstraksiyon tanklarında birden fazla çözücü dağıtılabilmektedir. Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonunda, ekstraksiyon süresi ve çözücü tüketimi, sokslet ekstraksiyonundakinden çok daha azdır. Kekikten kekik esansının, Osage portakal ağacının kabuğundan fenolik bileşenlerin, koka yapraklarından ksantan alkaloidlerinin ve *Taxus cuspidata* kabuklarından taxnesnin ekstraksiyonları için kullanılmıştır [603-606]. Suda zayıf bir çözünürlüğe sahip olan paklitaksel, bu ekstraksiyonda soğuk suya göre 50 kat daha fazla ve sıcak suya göre yaklaşık beş kat daha fazla iyileşme göstermiştir [605]. Çeşitli matrislerde basınçlı sıvı ekstraksiyonu kullanılarak elde edilen fitokimyasalların özeti Tablo 2.3'te sunulmuştur. Konvansiyonel yöntemlere göre avantajları olmasına rağmen, bu yöntemin, yüksek sıcaklıklarda yapıları ve fonksiyonel aktivitesi üzerinde zararlı etkileri olabileceğinden, ısıya duyarlı bileşikler için uygun olmadığı bulunmuştur [607, 608]. Şekil 2.49'de hızlandırılmış solvent ekstraktör sistemi gösterilmiştir.





Şekil 2.49: Basınçlı sıvı ekstraktör (hızlandırılmış solvent ekstraktör) sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 509, 513, 609] .

### **2.6.1.7. Mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE)**

Mikrodalgalar ekstraksiyonu desteklemek için olağanüstü bir enerji kaynağı olarak kabul edilmiştir. 1980'lerin sonlarında geliştirilen mikrodalga destekli solvent ekstraksiyonu, doğal ürünler için geleneksel ekstraksiyon tekniklerine bir alternatiftir. Bu yöntemde ekstraksiyon, uygun bir solvent ve mikrodalga radyasyonu ile gerçekleştirilmektedir. Mikrodalgalar dalga olarak iletilebilen 0.001 m ile 1 m dalga boyunda elektromanyetik radyasyonlardır [610]. Geleneksel yöntemlere kıyasla daha kısa işlem süresine sahiptir. İlk olarak 1986 yılında Ganzler ve arkadaşları tarafından doğal ürünlerin ekstraksiyonu için mikrodalga radyasyonunun kullanılması rapor edilmiştir [611]. Mikrodalga destekli ekstraksiyonu sırasında solvent, çözücü veya numune materyalinde bulunan dipoller tarafından mikrodalga radyasyonlarının emilmesi sonucu ısıtılmaktadır. Daha acık olarak, mikrodalgalar ortamdan geçtiğinde, enerjisi emilip termal enerjiye dönüştürülebilmektedir. Bu prensip, hücre içindeki nemin ısınıp buharlaşarak, hücre duvarında yüksek bir basınç oluşturarak çalışan mikrodalga destekli ekstraksiyonun geliştirilmesinin temelini oluşturmuştur. Basınç, biyolojik matrisin gözenekliliğini arttıran biyolojik dokuların fiziksel özelliklerini değiştiren biyomateryal içinde oluşmaktadır. Bu, matris yoluyla ekstraksiyon çözücüsünün daha iyi nüfuz etmesine ve istenen bileşiklerin daha iyi verimine olanak sağlamaktadır [612]. Bu nedenle, matrisi iç ve dış olarak, bir termal gradyan olmaksızın ısıtıp, daha az enerji ve çözücü hacmi kullanılarak doğal biyoaktif bileşiklerin verimli ve koruyucu bir şekilde özütlenabilir olması ile, mikrodalga destekli ekstraksiyon, geleneksel çözücü ekstraksiyon yöntemine göre daha fazla gelişmiştir. Mikrodalga işlemi, numunedeki suyun buharlaştırılmasına, hücresel sistemi yok etmeye ve böylece kapsamlı bir ekstraksiyona olanak sağlamaktadır. Geleneksel ısıtmanın aksine, mikrodalga destekli ekstraksiyonu durumunda hiçbir sıcaklık gradyanı mevcut değildir. Bu nedenle, çözeltinin eşit bir ısınması sağlanmakta, böylece tüm numunenin aynı anda ısıtılması kolaylaştırılmaktadır. Molekülün dipol dönüşüne bağlı hidrojen bağının bozulması, mikrodalgalar kullanılarak ekstraksiyon durumunda bir avantajdır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için, numune ve / veya çözücü, mikrodalga emme kapasitesi dielektrik sabitine bağlı olduğu için yeterli dielektrik sabitine sahip olması gerekmektedir. Çözücünün dielektrik sabiti ne kadar büyük olursa ısıtma o kadar uygundur. Aynı zamanda, bazı durumlarda, matrisin kendisi, çevredeki çözücünün düşük bir dielektrik sabitine sahip olduğu için mikrodalgalar ile etkileşime girmektedir [507]. Mikrodalga destekli ekstraksiyon için kullanılan çözücüler geniş bir polariteyi kapsamaktadır. Bununla birlikte,

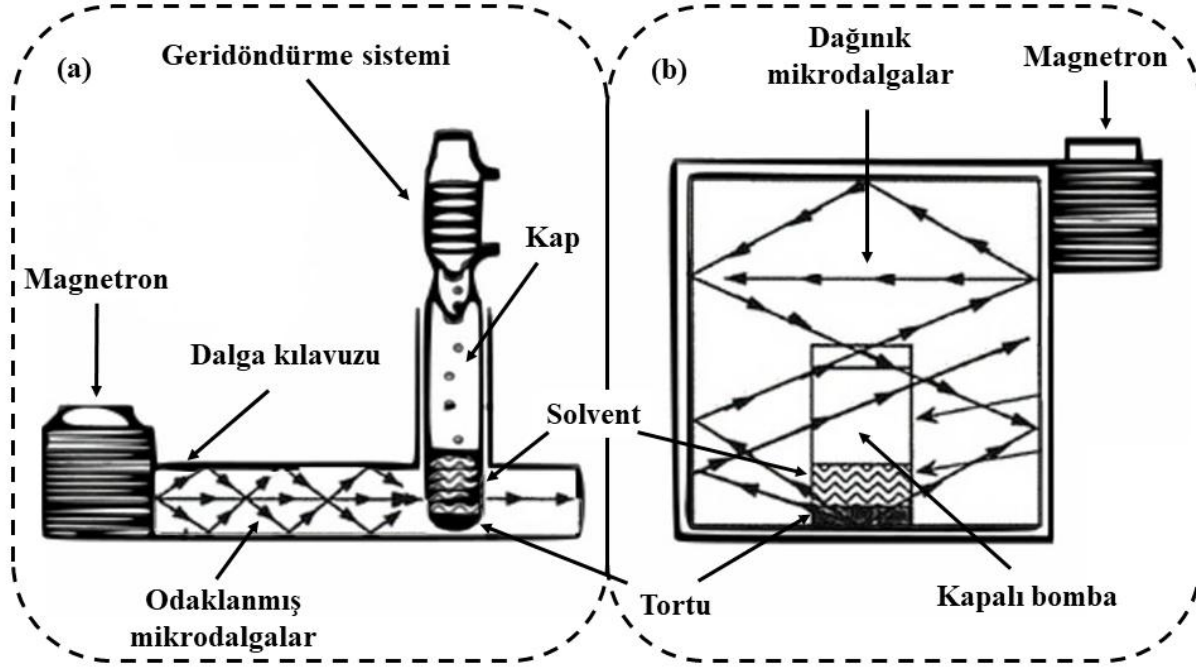
ekstraksiyon seçiciliğini ve ortamın mikrodalga ile etkileşime girme kabiliyetini geliştirmek için birden fazla çözücünden oluşan bir kombinasyon kullanılabilir [507]. Su en yüksek mikrodalga emilimine sahip olmakta, oysa heksan mikrodalgalara tam anlamıyla şeffaf olduğundan ısınmamaktadır [613]. Sonuç olarak, numune matrisindeki nem içeriği, suyun lokal olarak süper-ısınmasıyla daha fazla ekstraksiyonu arttırmakta ve analitleri çevreleyen ortama salınmasını teşvik etmektedir. Matrisin neminin daha fazla kontrol edilmesi, tekrarlanabilen ekstraksiyonları garanti etmektedir [614, 615]. Mikrodalga radyasyonu genellikle kısa aralıklarla uygulanarak soğutma için bir aralık takip ettiğinden aşırı ısınma önlenmektedir. Sıcaklık kızılötesi sensör tarafından harici olarak izlenmektedir. Bu özellikler yakın zamanlarda mikrodalga destekli ekstraksiyonu, doğal biyoaktif bileşiklerin sayısız matrislerden ekstraksiyonu için en gelişmiş tekniklerden biri olarak kullanılmasına yol açmıştır. MAE, çok çeşitli doğal biyoaktif bileşiklerin geri kazanımı için uygun olmasına rağmen, esas olarak, doğal biyoaktif bileşiklerin, fenolik bileşikler ve karotenoidler gibi antioksidan kapasiteleri ile geri kazanımı için uygulanmıştır [616-620]. Terpenoidler, alkaloidler ve saponinler gibi diğer doğal biyoaktif bileşikler de MAE kullanılarak geri kazanılmıştır. Bu çalışmaların çoğu, MAE kullanımının, çözücü tüketimini ve ekstraksiyon sürelerini azaltmaya olanak sağladığını, daha iyi antioksidan kapasite ve diğer yöntemlere göre eşdeğer veya daha yüksek özütlenme verimi sağladığı sonucuna varmıştır. Örnek olarak, dönen ekstraksiyona göre, domates, fıstık kabuğu, narenciye, mandalina ve soğan kabuk özütlerinde daha yüksek verim ve daha yüksek antioksidan aktivite elde edilmiştir [621-624]. Radix Astragali ve kiraz posasında sırasıyla, mikrodalga destekli ekstraksiyon ile elde edilen fenolik bileşiklerin veriminin, sokslet ve döndürücü 'rotator' ekstraksiyon gibi geleneksel ekstraksiyonla benzer olduğunu fakat zamanı önemli ölçüde kısaltmış olduğu gösterilmiştir [618, 625]. Benzer bir şekilde keten tohumu içinde ana fenolik bileşikler için mikrodalga destekli ekstraksiyonunun geleneksel ekstraksiyona kıyasla daha yüksek verimler sağladığını bularak benzer sonuçlar elde edilmiştir [626]. Doğal biyoaktif bileşiklerin mikrodalga destekli ekstraksiyonu, güç, frekans ve mikrodalga süresi, nem içeriği ve numune matrisinin parçacık boyutu, çözücü tipi ve konsantrasyonu, katı ile sıvı oranı, ekstraksiyon sıcaklığı, ekstraksiyon basıncı ve ekstraksiyon döngüsü sayısı gibi çok çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir [627]. Bununla birlikte, bu faktörler arasında, en kritik olanı, çözücünün olduğu görülmektedir. Uygun solvent seçimi için solventin çözünürlüğü, dielektrik sabiti ve dağılma faktörleri olarak üç ana fiziksel parametre vardır. Su ve polar çözücüler gibi

yüksek dielektrik sabiti olan çözücüler, yüksek mikrodalga enerjisini absorbe edebilir ve genellikle polar olmayan çözücülerden daha iyi çözücülerdir. Buna ek olarak, mikrodalga altında farklı çözücülerin ısıtıldığı etkinlik olarak dağılma faktörü önemli bir rol oynamaktadır. Örnek olarak, daha yüksek bir dağılma faktörü ile ilişkili olan su ile kıyasla etanol veya metanol gibi çözücüler kullanılarak fenolik bileşiklerin geri kazanımının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir [608]. Su, etanol veya metanolden daha yüksek bir dielektrik sabitine sahip olmasına rağmen, dağılma faktörünün daha düşük olması, onun numune matrisi içindeki nemi ısıtmak ve doğal biyoaktif bileşiklerin süzülmesini tetikleyen bir basınç oluşturmak için verimsiz hale getirmektedir. Bu nedenle, yakın zamanda ortaya konulduğu gibi, yüksek dielektrik sabiti ve yüksek dağılma faktörü olan, su ve etanol veya metanol gibi diğer çözücü karışımları ile elde edilebilen çözücülerin kullanılması daha iyidir [618]. MAE, nispeten yeni bir ekstraksiyon teknolojisi olup, düşük çevre kirliliği, daha yüksek ekstraksiyon verimi ve daha kısa ekstraksiyon süresi gibi geleneksel ekstraksiyon teknikleri üzerinde birçok avantajı olan çeşitli doğal ürünlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, endüstriyel uygulamalarda dikkate alınmak için, polar olmayan bileşiklerin geri kazanımı ve biyoaktivitelerini değiştirebilen ve uygulamalarını sınırlandırabilen hedef bileşiklerin kimyasal yapısının modifikasyonu olarak en azından iki önemli sınırlamanın geliştirilmesi gerekmektedir [507, 513].

MAE için kapalı damarlı mikrodalga ekstraktör ve odaklanmış açık-kapılı mikrodalga ekstraktör olarak iki tip alet mevcuttur (Şekil 2.50). Enstrümantasyon kapalı damarlı mikrodalga ekstraktör ve odaklanmış açık-kapılı mikrodalga ekstraktör arasındaki ana farktır. Kapalı damarlı mikrodalga ekstraktörde, numune ve çözücü içeren kap kapatılır, odaklanmış açık-kapılı mikrodalga ekstraktörde ise açıktır. Kapalı damarlı mikrodalga ekstraktör durumunda, kontrollü basınç altında ekstraksiyon yapılmakta ve sıcaklık artışı hızla sağlanmaktadır. Basınç, kapalı damarlı mikrodalga ekstraktördeki atmosferik koşullar altında kaynama noktasının yaklaşık 100°C üzerinde çözücülerini ısıtılabilirdiğinden çözücünün hacimine ve kaynama noktasına bağlıdır. Sıcaklık, 100-1000 W arasında bulunan mikrodalga gücünün ayarlanmasıyla sabitlenebilmekte ve aşırı ısınmayı önlemek için, analit ve aşırı basıncın bozulmasına yol açacak şekilde gücün uygun şekilde seçilmesi gerekmektedir. Bu prosedürde hem ekstraksiyon verimliliği hem de hızın arttığı rapor edilmiştir [507]. Odaklanmış açık-kapılı mikrodalga ekstraktör içerisindeki mikrodalga destekli ekstraksiyonu atmosfer basıncında gerçekleştirilmekte ve maksimum sıcaklık, çözücünün kaynama noktasına bağlı olmaktadır. Çözücü ısıtılıp örnek boyunca geri

akıtılmaktadır. Burada, mikrodalga kabına yerleştirilmiş numunenin üzerine odaklanmaktadır. Bu homojen ve etkili bir ısıtma oluşturmaktadır. Kapalı kap sistemi ile karşılaştırıldığında, açık kap mikrodalga destekli ekstraksiyonunun daha iyi güvenlik sağladığı ve daha büyük bir numunenin ekstrakte edilmesine olanak sağladığı [507, 628]. Çeşitli çalışma parametrelerinin, örneğin mikrodalga gücü, çözücü ve ışınlama süresinin, azadirachtin ile ilgili limonoitlerin tohum çekirdeğinden, tohum kabuğundan, yaprak ve yaprak kökünden geri kazanılmasında etkisi bildirilmiştir. Ekstraksiyon verimi, geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. MAE, mikroyapıya sahip farklı parçalardan azadirachtin ile ilgili limonoitlerin ekstraksiyonunu arttırmıştır. Solvent mikrodalga destekli ekstraksiyonun seçiciliğini etkilemektedir. Kokain yapraklarından kokain ve benzoyleconin mikrodalga destekli ekstraksiyon kullanılarak ekstrakte edilmiştir [629]. Kokainlerin yapraklardan kantitatif geri kazanımı 30 saniyede gerçekleşmiş ve mikrodalga destekli ekstraksiyon tarafından üretilen ekstrakt, geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden elde edilen ekstraktlara benzemiştir. Sokslet ve ultrasonik destekli ekstraksiyonu yöntemleri, çözücü ve ekstraksiyon süresi açısından mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile karşılaştırılmıştır. Çözücü olarak metanol (%70) kullanılarak hem mikrodalga destekli ekstraksiyonu hem de ultrasonik destekli ekstraksiyonu, Sokslet'e kıyasla daha üstün bulunmuştur. Hem mikrodalga destekli ekstraksiyonu hem de ultrasonik destekli ekstraksiyonu, çözücü sistemi olarak farklı bir metanol-su oranı (%60-70) uygulanarak da değerlendirilmiştir. Ekstraksiyon verimleri, %70-100 metanol aralığında mikrodalga destekli ekstraksiyonunda ultrasonik destekli ekstraksiyonundan daha yüksek ama %60 metanol oranında aynıdır. *Artemisia annua*'dan artemisinin ekstrakte edilmesi için öğütme derecesi, çözücü madde oranı ve dielektrik sabitinin etkisi optimize edilmiştir [507]. Mikrodalga destekli ekstraksiyonu için 12 dakikalık ışınlama süresi, en az 0.125 mm'lik hammadde çapı ve 11.3'ten fazla çözücü-örnek oranı olarak en uygun işlem koşulları bulunmuştur. Mikrodalga destekli ekstraksiyonu optimum koşulları altında verimi %92.1 ve %60 verimine sahip olan soksletten ve normal karıştırma ekstraksiyonundan daha yüksek bulunmuştur. Karbondioksit kullanarak gerçekleşen süperkritik sıvı ekstraksiyonu en düşük ekstraksiyon verimine sahip olarak gözlenmiştir. MAE dahil dört ekstraksiyon metodu, *Nothapodytes foetida*'dan elde edilen ve anti-kanser ilacı olarak kullanılan kamptotesin geri kazanımı için karşılaştırılmıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonu ile kamptotesinin ekstraksiyonunun maksimum yüzdesi 2.67 olarak bulunmuştur. Sırayla sokslet, karıştırma ekstraksiyonu, ultrasonik destekli ekstraksiyonu ve mikrodalga destekli ekstraksiyonu

işlem süresi 120, 30, 30 ve 3 dakika bulunarak mikrodalga destekli ekstraksiyonu en kısa süreye sahibi olarak rapor edilmiştir. Kimyasal yapı ve ilişki çalışmaları, daha fazla sayıda hidroksil tipi süstitüsüyonu içeren bileşiklerin ekstraksiyon koşulları altında daha kolay bozulduğunu ortaya çıkarmıştır [507, 513]. Fitokimyasalların ekstraksiyonu için mikrodalga destekli ekstraksiyonunun bazı uygulamaları tablo 2.3'te özetlenmiştir.



**Şekil 2.50:** Mikrodalga destekli ekstraksiyon için (a) odaklanmış açık-kapılı MAE sistemi, (b) kapalı damarlı MAE sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 513, 630].

### **2.6.1.8. Ultrasonik destekli ekstraksiyonu (UAE)**

Ultrason teknolojisinin gelişimi yeni değildir [631]. 20 kHz'den daha yüksek frekanslara sahip olan ses dalgaları, bir malzemenin içinde hareket edebilmekte ve ortamdaki hareketi sırasında genişleme ve sıkıştırma döngülerini içerebilmektedir. 18-40 kHz aralığındaki frekans, ultrason destekli ekstraksiyonu desteklemek için mükemmel bir enerji kaynağı olarak kabul edilmiştir. UAE katı ve sıvı faz arasındaki yüksek temas yüzey alanı nedeniyle geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden çok daha hızlıdır. Yüksek frekanslı ses enerjisi bitki materyallerinden kavitasyon yoluyla fitokimyasalları ayırabilmektedir. Kavitasyonlar veya mikroskobik kabarcıkların oluşumu ve çökmesi, ısı, basınç ve mekanik makaslama gibi muazzam bir enerji açığa çıkarmaktadır. Böylece kütle transferini artırıp hücreye çözücü erişimini kolaylaştırmaktadır [513, 632]. Bu anlamda, doğal biyoaktif bileşiklerin farklı doğal kaynaklardan geri kazanılmasında kullanılmasına özel önem verilmiştir. Bu açılımlar ve kompresyonlar, katı bir yüzeyde kabarcık ve çökme yaratmakta ve ekstraksiyon verimi ve kinetikleri üzerinde daha büyük bir etkiye sahip olmaktadır. Böylece, çözücünün hücrel materyallere nüfuz etme gücünü arttırmakta ve kütle transferini geliştirmektedir. Ekstraksiyon prosesinde ultrason, biyolojik hücre duvarlarını bozabilip iç içeriğin serbest bırakılmasını kolaylaştırabilmektedir. Mikrodalga destekli ekstraksiyonu gibi diğer ileri ekstraksiyon teknikleri ile karşılaştırıldığında daha ucuz ve çalışması daha kolaydır [538]. Ultrason destekli ekstraksiyonu, daha düşük solvent tüketimi ve / veya daha hızlı analiz ve biyoaktivite özellikleri ile hedeflenen bileşiklerin daha iyi geri kazanılmasını sağlamakla, geleneksel çözücü ekstraksiyonuna bir alternatif olarak önerilmiştir. Daha iyi ekstraksiyon verimliliği, akustik kavitasyon denilen olay ile ilgilidir. Ultrason yoğunluğu yeterli olduğunda, genişleme çevrimi sıvı içinde boşluklar veya mikro kabarcıklar oluşturabilmektedir. Oluşturulduktan sonra, kabarcıklar ses dalgalarından gelen enerjiyi emer ve genişleme çevrimleri sırasında büyür ve sıkıştırma çevrimi sırasında yeniden sıkıştırılmaktadır. Ayrıca, kabarcıklar başka bir seyrelme döngüsü başlatabilir veya çökeltebilir ve bu da birkaç yüz atmosfer ve yaklaşık 4727°C sıcaklık gibi aşırı basınç ve sıcaklık koşullarının şok dalgalarına yol açabilmektedir [631, 633, 634]. Böylece kavitasyon kabarcıkları patlaması katı matrisin yüzeyine çarpabilir ve istenen bileşiklerin salınmasına neden olan hücreleri parçalayabilir. Ultrason enerjisi, bitki hücresinin rehidrasyonunu veya kütle transferinden doku matrisinin parçalanması eşlik ederek bitki hücresinin şişmesini hızlandırmak ve çözücünün hücre içine girmesini hızlandırmak suretiyle bitkisel dokulardan ekstraksiyonu arttırdığı gösterilmiştir [635, 636].

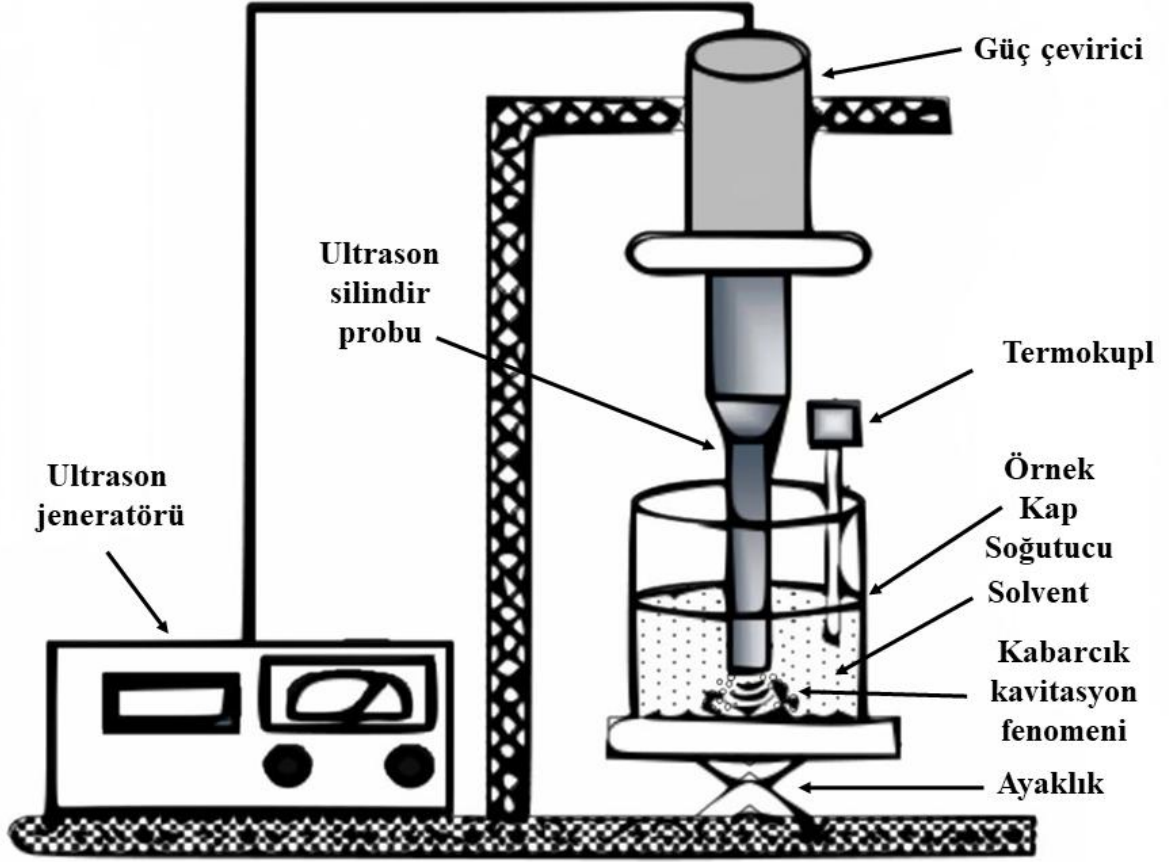
Günümüzde, ultrason destekli ekstraksiyon, değerli moleküllerin ekstraksiyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Örnek olarak, polisakkarit-protein kompleksinin, proteinlerin, şekerin, yağın ve diğerlerin ekstraksiyonları için kullanılmıştır [637-639]. Bununla birlikte, fenolik bileşikler gibi antioksidanların ekstraksiyonu, deneysel tasarım yoluyla elde edilen verim ve antioksidan kapasitesine dayanarak iyileşmelerini optimize etmek üzere özel olarak ele alınmıştır. Çalışmalarda [640-642], ekstraksiyon süresinin, sıcaklığın ve sıklığının en önemli ekstraksiyon değişkenleri olduğunu göstermiştir. Ekstrakt edilen bileşiklerin stabilitesi ile ilgili bazı hususlar tam olarak ele alınmamıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar, fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonunda diğerlerine göre daha az bozulduğunu ve optimize edilmiş koşullar altında bile bozulma olmadığını göstermiştir [643, 644]. Bununla birlikte, ultrason destekli ekstraksiyonda, diğer teknolojilere kıyasla önemli bir bozulma gözlemlendiği için, karotenoidler gibi kararsız bileşiklerin ekstrakt edilmesinde dikkatli bir şekilde kullanılması gerekmektedir [619]. Çözücü karışımındaki ultrasonik kaviteasyonların miktarı yüzey gerilimi, viskozite ve buhar basıncından etkilenmektedir. Düşük buhar basıncı sahip çözücüler az kaviteasyon üretirken, yüksek buhar basıncı olanlar daha fazla kaviteasyon üretmektedir. Fakat daha az yoğunlukla çıktığından ekstraksiyonda çok etkili değildirler. Düşük viskoziteli solventlerde daha kolay bir şekilde kaviteasyon meydana gelmekte ve uygulanan ultrasonik yoğunluk, solventin moleküler kuvvetlerini daha kolay aşabilmektedir. Düşük viskoziteli sıvılar daha düşük yoğunluğa ve yüksek dağılıma sahip olduklarından, bitki materyallerinin gözeneklerinde kolayca yayılabilmektedir. Yüzey gerilimi de kaviteasyon etkilerini etkilemektedir. Düşük yüzey gerilimli çözücüler, kaviteasyon üretmek için düşük enerjiye ihtiyaç duymaktadır [507, 645, 646]. Ultrason destekli ekstraksiyon, Sokslet ve soğuk sızma yöntemleri gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında hızlı ve solvent hacmini düşük tutarken analitik verimi artırma potansiyeline sahiptir. Bu yöntemde, çözücü ile karıştırılmış ince toz haline getirilmiş bitki materyali, belirli bir sıcaklıkta yaklaşık 10-60 dakika boyunca bir ultrasonik cihazda soniklenmektedir. Eğer bileşik termal olarak dengesiz ise, termal bozunma veya hasarı önlemek için düşük bir sıcaklıkta ekstraksiyon yapılmaktadır. Polar olmayan çözücüler, polar çözücüler ve polar olmayan ve polar çözücülerden oluşan bir kombinasyonu ultrason destekli ekstraksiyonunda kullanılabilir. Ultrasonik enerjili polar olmayan ve polar çözücülerden oluşan bir kombinasyonun, bir emülsifikasyon-ekstraksiyon gibi davranacağı rapor edilmiştir. Bu da katı matrislerden hızlı ve etkin bir şekilde total lipidlerin ekstraksiyonu ile



sonuçlanmaktadır [647]. Ultrason destekli ekstraksiyonu etkileyen önemli parametreler ultrasonik güç, çözücü, çözücü-numune oranı, ekstraksiyon süresi ve pH değerleridir. Ultrasoniklerin etkileri 100'den fazla bitki türü üzerinde çalışılmış ve antrakinonların, fenollerin, ginsenosidlerin ve polisiklik hidrokarbonların ekstraksiyonu için UAE bildirilmiştir [648-651]. Ultrason destekli ekstraksiyonunun *Angelica sinensis*'ten ferulik asit ekstraksiyonunda oldukça etkili olduğunu bildirilmiştir [652]. Ultrason destekli ekstraksiyonunun ahudududan elde edilen antosiyaninlerin klasik çözücü ekstraksiyonuna kıyasla daha etkin ve hızlı olduğunu ve muhtemelen ultrasonik akustik kaviteasyon altında meyve doku yapısının bozulmasına bağlı olduğu bildirilmiştir. Bulgular taramalı elektron mikroskobu çalışmaları ile desteklenmiştir. Bununla birlikte, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile teyit edildiği gibi antosiyaninlerin bileşiminde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Geleneksel ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon üç Chresta türünden steroid ve triterpenoid ekstraksiyonu için karşılaştırılmıştır [507, 653]. Toplam ekstraksiyon süresi ultrason destekli ekstraksiyonunda anlamlı olarak azalmıştır ve bu yöntemin steroidlerin ve triterpenlerin çoğunun çıkarılmasında daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ultrason destekli ekstraksiyonunun, klasik yöntemlere kıyasla, *Eucommia ulmoides* ve diğer Çin ilaçlarından klorojenik asitin çıkarılması için yüksek derecede verimli olduğu bildirilmiştir. Değişkenlerin etkisi, taze yapraklardan elde edilen klorojenik asitin ekstraksiyon etkinliği ve *E. ulmoides*'in taze ve kurutulmuş kabukları ile incelenmiştir. Optimum ekstraksiyon koşulları, 3 x 30 dakika olarak 90 dakikalık bir ekstraksiyon süresi ile 20:1'e (v/v) eşit bir çözelti-numune oranında sulu metanol %70 olarak bulunmuştur. *Rosmarinus officinalis*'den elde edilen karnosik asidin izolasyonu için etanolün ekstraksiyon verimliliği geliştirilmiştir. Konvansiyonel koşullar altında karnosik asit ekstraksiyonu için zayıf bir çözücü olan etanol, MAE'de etil asetat ve butanonunkine benzer bir ekstraksiyon seviyesine sahiptir. Karnosik asit verimi de artırılmış ve ekstraksiyon süresi aynı sıcaklıkta kısaltılmıştır [654]. Bitkisel yağın kısa zincirli alkollerle 28 kHz ve 40 kHz olarak baz-katalizli transesterifikasyonunun mekanik karıştırmadan çok daha kısa olduğunu bildirilmiştir. Transesterifikasyon için gerekli katalizör miktarı da iki ila üç kez azaltılmıştır. 40 kHz ultrasonun reaksiyon süresinin kısalmasında çok daha etkili olduğu, ancak verimin 28 kHz'de daha iyi olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, yüksek frekanslar, yağlı asitlerin transesterifikasyonu için kullanışlı değildir. Ekstraksiyon sıcaklığı dikkate alınması gereken bir faktördür. Bu, ginseng köklerinden saponin ekstraksiyonu ile gösterilebilmektedir. UAE,

konvansiyonel sokslet ekstraksiyonuna göre üç kat daha hızlı ve daha etkili bulunmuştur [648]. Ultrason ışımasının uygulaması, bitki hücre zarlarının düşük sıcaklıkta parçalanmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece molekülleri hücresel yapılardan serbest bırakmakta ama elde edilmiş elstrakt sonunda çözücünden tamamen ayrılmamaktadır. Genel olarak, UAE diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilmekte ve bu da bitki materyallerinde termal olarak kararsız bileşenlerin bozulmasını önlemeye yardımcı olmaktadır [507, 508, 513]. Fitokimyasalların ekstraksiyonu için bazı ultrason destekli ekstraksiyonu uygulamaları tablo 2.3'te özetlenmiştir. Şekil 2.51'de ise UAE sistemi gösterilmiştir.





Şekil 2.51: Ultrason destekli ekstraktör sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 508, 513, 655].

### 2.6.1.9. *Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HAE)*

Homojenlik ve heterojenlik, bir maddenin tekdüzeliği ya da eksikliğiyle ilgili kavramlardır. Homojen olan bir materyal, kompozisyon veya karakterde eşittir ama heterojen olanda bu özelliklerin birinde tekdüzelik yoktur. Kavramlar, atomlardan hayvanlara veya insanlara, galaksilere kadar her karmaşıklık düzeyindeki kombinasyonlara uygulanabilmektedir. Dolayısıyla, aynı madde içinde daha küçük ölçekte heterojen olmasıyla karşılaştırıldığında, bir madde daha büyük ölçekte homojen olabilmektedir. İlk olarak 1899 yılında Auguste Gaulin homojenleştirici üzerinde bir patent almıştır. Patent, ürünün, basınç altında bir veya daha fazla sac benzeri tüp boyunca zorlandığı 3 pistonlu bir pompayı kapsamaktadır. 1900'te Paris'te düzenlenen Dünya Fuarında, Auguste Gaulin buluşunda süt işlenmesi için bir süreç sergilemiştir. Bu döneme ait literatüre ve yayınlara göre, "homojenize" kelimesi ilk olarak Gaulin makinesinin işlediği sütleri tanımlamak için kullanılmıştır. Bu döneme ait literatüre ve yayınlara göre, "homojenize" kelimesi ilk olarak Gaulin makinesinin işlediği sütleri tanımlamak için kullanılmıştır. Homojenleştirici, temel olarak, bir homojenizasyon vanası tertibatının eklendiği bir karşıt hareketli pompadan oluşmaktadır. Pompa, basınç altında homojenizasyon vanasından akışkanları zorlamaktadır. Homojenizasyon terimi, homojenizasyon vanası tertibatı içinde gerçekleşen işlem veya eylemi ifade etmektedir. Homojenizasyon alanı çok geniş bir alanı kapsamaktadır. Homojenize kelimesi, "aynı kompozisyona, yapıya veya karaktere sahip" anlamına gelirken, "homojen hale getirmek veya oluşturmak" anlamına da gelmektedir. Homojenleştirmek demek, aslında harmanlamak, uyum sağlamak, karıştırmak, parçalamak, emülsifiye etmek, dağıtmak ve çalkalamak gibi işlemlerden birini veya daha fazlasını ifade etmektedir. Mevcut işlemler veya homojenizasyon yöntemleri basınçla, mekanik ve ultrason ile olmak üzere üç ana kategoriye ayrılabilir [656].

Mekanik homojenleştiriciler rotor stator homojenleştiriciler ve bıçak tipi homojenleştiriciler olarak iki ayrı kategoriye ayrılabilir. Rotor-stator homojenizatörleri ayrıca kolloid değirmenler veya Willems homojenleştiriciler olarak adlandırılmakta ve bitki ve hayvan dokusu uygulamalarına uygun olduğundan genellikle kesme bıçağı tipi karıştırıcılardan daha iyi performans göstermektedir. Cam boncuklar ile birleştirildiğinde, rotor-stator homojenleştirici mikroorganizmaları parçalamak için başarıyla kullanılmıştır. Rotor stator homojenleştirici ile hücre parçalanması, hidrolik ve mekanik kesme ve kavitasyonu içermektedir. Homojenizasyon

alanındaki bazı çalışmalar, daha az ölçüde yüksek enerjili sonik ve ultrasonik basınç gradyanlarının söz konusu olduğunu iddia etmektedirler. Bazıları teoride, yüksek enerjili sonik ve ultrasonik basınç gradyanlarının mekanik homojenizatörlere dahil olduğuna inanmaktadır. Ultrasonik ve mekanik (rotor-stator) homojenizasyonunun ortak olduğu tek şey, her iki yöntemin bir dereceye kadar kavitasyona yol açması ve kullanmasıdır. Kavitasyon, akan bir sıvıda düşük basınçlı buhar boşluklarının oluşması ve çökmesi olarak tanımlanmaktadır. Kavitasyon, katı bir nesneyi yüksek bir hızda bir sıvıdan geçirirken oluşturulmaktadır. Ultrasonik olarak, hareket ettirilen nesne, çok yüksek bir hız üreten kavitasyonda titreşen probtur. Mekanik rotor-stator homojenizasyonunda, rotor olarak bıçak yüksek hızda kavitasyon oluşturma hızında sıvıdan taşınmaktadır. Rotor-stator jeneratör tipi homojenizatör ilk olarak dispersiyon ve emülsiyon yapmak için geliştirilmiş ve çoğu biyolojik doku bu aparat ile hızlı ve iyice homojenize edilmektedir. Uygun boyuttaki hücre malzeme, yuva veya delikler içeren statik bir kafa veya stator olarak tüp içinde konumlandırılmış hızlı dönen bir rotor olarak bıçak ile aparat içine çekilmektedir. Materyal, yarıklardan veya deliklerden çıkmak için bir pompada dışarı doğru santrifüj olarak dışarı atılmaktadır. Rotor olarak bıçak çok yüksek bir devir/dakikaya dönüştüğü için, doku, rotor ve stator arasındaki dar aralıkta meydana gelen aşırı türbülans, kavitasyon ve makas benzeri mekanik makaslamanın bir kombinasyonu ile boyut olarak hızla azaltılmaktadır. Çoğu rotor stator homojenleştirici açık bir konfigürasyona sahip olduğundan ürün tekrar tekrar sirküle edilmektedir. İşlem hızlı ve doku örneğinin sertliğine bağlı olarak, istenen sonuçlar genellikle 15-120 saniyede elde edilmektedir. Hücre içi organellerin veya reseptör bölgesi komplekslerinin geri kazanımı için daha kısa süreler kullanılmakta ve rotor hızı azaltılmaktadır. Maksimum verimlilik için optimize edilecek değişkenler aşağıdaki gibidir:

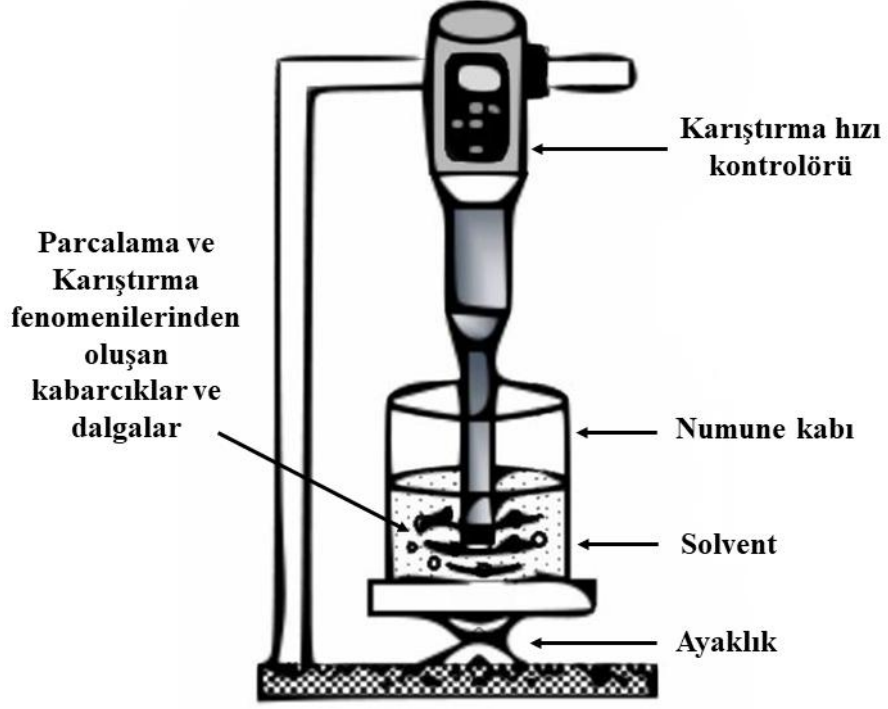
- Rotor statorun tasarımı ve boyutu (jeneratör)
- Rotor ipucu hızı
- Numunenin başlangıç büyüklüğü
- Ortamın viskozitesi
- İşlem süresi veya akış hızı
- Numunenin hacmi ve konsantrasyonu

- Kap şekli ve rotor-statorun konumlandırılması

Jeneratör olarak da adlandırılan rotor-stator probunun boyutu, 0.01-10 mL numune hacmi için bir kalemin çapından, 19,000 litreye kadar parti kapasitelerine sahip olan daha büyük birimler için veya çevrimiçi üniteler için 68,000 litre/saat kapasiteye kadar değişebilmektedir. Rotor hızları, küçük üniteler için 3,000 rpm ve daha büyük üniteler için 8,000-60,000 rpm'a kadar değişmektedir. Prensipte olarak, homojenizatörün rotor hızı, rotor çapının her bir yarısı için iki katına çıkarılması gerekmektedir. Önemli çalışma parametresi olan rotorun uç hızı, motorun devir sayısı değildir. Rotor-stator tasarımı, yapımında kullanılan birçok malzeme ve eğilme kolaylığı gibi diğer faktörler de bir rotor-stator homojenizatörünün seçiminde dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir. Laboratuvar boyutu rotor-stator homojenizatörleri sıvı numuneleri 0.01 mL ila 20 litre aralığında işletilmektedir. Rotor-statorun kapasitesinin, ortamın viskozitesi ve hacmine ve işlenecek olan bitki ve hayvan dokusunun türüne ve miktarına uygun olması gerekmektedir. Homojenizasyonun hızı ve etkinliği, çok küçük bir homojenleştirici kullanılarak büyük ölçüde ayrıştırılmaktadır. Belirli bir homojenleştirici rotor-stator boyutunun da verimli bir şekilde işlev göreceği hacim aralığı sadece yaklaşık 10 kattır. Ayrıca, laboratuvar boyutundaki homojenizatörlerin çoğu, sadece <10,000 cps gibi düşük ve orta viskozite aralığında sıvı numunelerle düzgün şekilde çalışılmaktadır. Bu, konsantre edilmiş örneklerin daha sık çarpışarak daha hızlı bir şekilde parçalanmasının pratik gözlemine karşı dengelenmesi gerekmektedir. Daha yüksek viskozite numuneleri işlenebilmekte, ancak özel olarak şekillendirilmiş homojenleştirme kapları veya benzersiz rotor-stator konfigürasyonları gerektirmektedir. Homojenizatör ile işlenmeden önce numunenin boyutunun, statorun içine çekilecek kadar küçük olması gerekmektedir. Bu nedenle, numuneler genellikle önceden doğranmış, kesilmiş veya parçalanmış olmalıdır. Köpük ve aerosoller, rotor-stator homojenizatörleriyle ilgili bir problem olabilmektedir. Homojenleştiricinin ucunu ortama batırılmış halde tutması ve düzgün boyutlu kapların kullanılması ilk sorunla birlikte yardımcı olmaktadır. Kare şekilli veya oluklu kaplar yuvarlak damarlardan daha iyi sonuçlar vermekte ve daldırılmış ucu merkezden uzak tutmak da yararlı olmaktadır. Aerosoller kapalı kaplar kullanılarak en aza indirilebilmektedir. Bazı laboratuvar rotor-stator homojenizatörleri kapalı motorları kullanmasına rağmen, bunların hiçbiri gerçekten patlamaya dayanıklı değildir. Homojenizasyonu iyi havalandırılan bir kaputta gerçekleştirerek yanıcı organik çözücüler kullanıldığında dikkatli olunması gerekmektedir. Pozitif tarafta, rotor-stator homojenizatörleri çalışma sırasında minimum ısı ürettiğinden dolayı

bu işlem sırasında homojenizasyon kabını buzlu suda soğutmak suretiyle kolayca dağıtılabilmektedir. Daha büyük rotor stator homojenleştiriciler ya laboratuvar modellerinin ya da sıralı homojenizatörlerin çoğaltılmış versiyonlarıdır. İkincisi, dişleri statik bir astarda birbirine yakın toleransla hizalanmış, yatay yönlendirilmiş, çok kanatlı, yüksek hızlı bir pervanenin kenarındaki dişleri içermektedir [656].

Her ne kadar rotor-stator homojenleştiricilerden daha az etkili olsa da karıştırıcılar olarak da adlandırılırlan bıçak tipi homojenleştiriciler, bitki ve hayvan dokusundan elde edilen özütler üretmek için uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Bu homojenleştirici sınıfı üzerindeki kesme bıçakları ya alt ya da üst tahriklidir. Dahası da 6,000 ila 50,000 rpm'lik hızlarda dönmektedir. Mikserler, cam boncuklar veya diğer aşındırıcılar ortama ilave edilmedikçe ve daha sonra rotor-stator homojenleştiriciler için yukarıda bahsedilenlerle aynı problemlerle karşılaşmadıkça, mikroorganizmaların parçalanması için uygun değildir. Birçok bitki dokusu homojenleştiricisi, daha sonraki ayırma prosedürlerini karmaşıklıştırabilen bir biyokimyasal oksidasyon prosesi olan enzimatik kahverengileşmeye uğramaktadır. Enzimatik esmerleşme, oksijen yokluğunda veya merkaptetanol gibi tiyol bileşiklerinin varlığında özütleme gerçekleştirilerek en aza indirilmektedir. Bazen polietilenimin, metal şelatlayıcılar veya Triton X-100 veya Tween-80 gibi deterjanların eklenmesi de yardımcı olmaktadır. Bıçak homojenizatörleri 0.01 mL'den çok galonlara kadar çeşitli sıvı numuneleri için mevcuttur. Daha yüksek rpm homojenleştiricilerden bazıları, akış sitometrik analizi ile belirlenen  $4 \cdot 10^{-6}$  kadar küçük dağılımlarla doku örneklerini tutarlı bir partikül boyutuna indirebilmektedir [656]. Şekil 2.52'de HAE sistemi gösterilmiştir. Tablo 2.3'te ise yine biyoaktif bileşiklerin ekstraksiyonunda HAE uygulamaları özetlenmiştir.



Şekil 2.52: Homojenizatör destekli ekstraktör sistemi.



**Tablo 2.4:** Zeytin yaprağının kurutulması, biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonu ve analizleri ile ilgili yapılmış olan çalışmaların özeti

Zeytin Yapağı	Ekstraksiyon yöntemi	Analiz yöntemi	Kaynak
Taze yaprak: Gemlik çeşidi / Türkiye	UAE Genlik: %30	TPM: FCR AA: DPPH	[375]
Kurutma yöntemi:	Yaprak ağırlığı: 500 mg	Bireysel	
1. Mikrodalga kurutma: 2.45GHz, atmosferik basınç ve sıcaklık (50, 65, 82 ve 100°C)	Solvent: Metanol / %50 (v/v) / 30 mL	fenolik bileşik: HPLC-DAD	
2. Vakumlu fırın kurutma: 180, 90 ve 60, 0.01 MPa ve sıcaklık (50, 70 ve 90°C)	Süre: 1 saat		
3. Atmosferik basınç fırın kurutma: 50, 80 ve 100°C sıcaklık			
Depolama: Karanlık, ve oda sıcaklığı			
Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 0.9-2.00mm			
Taze yaprak: Gemlik çeşidi / Türkiye	HAE Homojenizetör hızı: 10000 rpm	TPM: FCR TFM: AlCl <sub>3</sub>	[376]
Kurutma yöntemi:	Yaprak ağırlığı: 500 mg	AA: DPPH	
1. Mikrodalga kurutma:	Solvent: Metanol /% 50 (v/v) / 35	Bireysel	

2.45GHz, atmosferik basınç ve sıcaklık (50, 65, 82 ve 100°C)

Süre: 83 saniye

fenolik  
bileşik:  
HPLC-DAD

2. Dondurma kurutma: 9.2 Pa ve -55 ° C'de 24 saat

3. Vakumlu fırın kurutma: 180, 90 ve 60, 0.01 MPa ve sıcaklık (50, 70 ve 90°C)

4. Atmosferik basınç fırın kurutma: 270, 75 ve 45 dakika ve 50, 80 ve 100°C sıcaklık

5. Odada kurutma: atmosferik basınç, oda sıcaklığı, karanlık ve 4 gün

Depolama: Karanlık, ve oda sıcaklığı

Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: ~ 1.50mm

Taze yaprak: Bursa / Türkiye UAE

TPM: FCR [377]

Kurutma yöntemi: Karanlık ve oda sıcaklığı

Karıştırma hızı: 40 kHz

pH: 3, 7 ve 11

Depolama: Karanlık ve oda sıcaklığı

Solvent: 18mΩ deiyonize su

Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 0.9-2.00mm

Katı / çözücü oranı: 500/1, 500/15 ve 500/20 mg / L

Süre: 20, 40 ve 60 dakika.

Sıcaklık: 30, 45 ve 60 °C

Taze yaprak: Ayvalık / HAE TPM: FCR [379]

Türkiye

Homojenizatör hızı: 4000 rpm

AA: DPPH

Yaprak ağırlığı: 500 mg

Bireysel

Solvent: Etanol / %10 (v v) / 30 mL

fenolik

bileşik:

HPLC-DAD

Süre: 45 saniye

Taze yaprak: Bursa, Mardin, Ayvalık, Kaş, Tekirdağ ve Çanakkale / Türkiye

HAE

Ekstraksiyo

n verimi

Yaprak ağırlığı: 500 mg

[657]

TPM: FCR

Kurutma yöntemi: Karanlık ve oda sıcaklığı

Solvent: 18mΩ deiyonize su / 10 mL

Depolama: Karanlık ve oda sıcaklığı

Süre: 10 × 3 saniye

Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 0.9-2.00mm

Taze yaprak: Memeli çeşidi / Türkiye

Soxhlet Ekstraksiyonu

Bireysel

[380]

Yaprak ağırlığı: 10g

fenolik

bileşik:

Kurutma yöntemi: Karanlık ve oda sıcaklığı

Solvent: Etanol, hekzan, metanol ve su / 250 mL

HPLC/LC-

ESI-MS/MS

Depolama: Karanlık ve oda

Ekstra solvent (Lipofilik madde

sıcaklığı giderimi): CH<sub>3</sub>OH: C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (3: 2)

Ezilmiş parçacıkları ortalama Süre: 24 saat

çapı: 0.9-2.00 mm

SFE

Solvent: Süperkritik CO<sub>2</sub> (680 bar ve 0°C)

Damar boyutu: 25 mL

Yaprak ağırlığı: 5g

Sıcaklık: 50 veya 100°C

Basınç: 100, 200 veya 300 bar

Akış hızı: 2 L / dakika

Süre: 2 saat

Taze yaprak: Ayvalık HAE TPM: FCR [381]  
(Edremit)

çeşidi / Türkiye

Homojenizatör hızı: 4000, 7000 ve 10000 rpm

AA:

Kurutma yöntemi: Karanlık, oda sıcaklığı ve 4 gün

Yaprak ağırlığı: 500 mg

CUPRAC

Depolama: 4°C

Solvent: Etanol / 10, 40 ve %70 (v / v) / 20, 30 ve 40mL

Bireysel

Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 1 mm

Süre: 30, 45 ve 60 saniye

fenolik

bileşik:

HPLC-DAD

Taze yaprak: Ayvalik (Edremit) çeşidi / Turkey	Solventsiz Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (SFMAE)	TPM: FCR [382]
		AA: ABTS
Kurutulmuş yaprak depolaması: 4°C	Mikrodalga gücü: 250, 300 ve 350W	AA: CUPRAC
Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 0.9-2 mm	Yaprak ağırlığı: 5, 7.5 ve 10g Süre: 2, 2,5 ve 3 dakika. Basınç: 1 atm Ön işlem: Su	AA: DPPH Bireysel fenolik bileşik: HPLC-DAD
Taze yaprak: Memeli çeşidi / Türkiye	SFE Solvent: Süperkritik CO <sub>2</sub> (680bar ve 0°C) Damar boyutu: 25 mL Yaprak ağırlığı: 5g Sıcaklık: 50 veya 100°C Basınç: 100, 200 veya 300 bar Akış hızı: 2 L / dakika Süre: 2 saat Yardımcı solventlar: Etanol ve su Yardımcı solventların akış oranları: 0-1 mL / dakika	Extraction yield [383] Individual phenolic compound: HPLC/LC-ESI-MS/MS

Taze yaprak: Ayvalık çeşidi / Türkiye	UAE	TPM: FCR	[384]
	Yaprak ağırlığı: 500 mg	TFM: AlCl <sub>3</sub>	
Kurutma yöntemi: Karanlık ve oda sıcaklığı	Solvent: Etanol / 10, 40 ve %70 (v/ v) / 10 mL	AA: DPPH	
Depolama: Karanlık ve oda sıcaklığı	Süre: 30, 45 ve 60 dakika		
Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 0.9-2.00mm	Sıcaklık: 27, 32 ve 37°C		
Taze yaprak: Chemlali, Chemchali, Zarrazi ve Chetoui çeşitleri / Tunus	Solvent ekstraksiyonu	TPM: FCR	[385]
	Çözücü: Metanol / %25 (v/v)		
Kurutma yöntemi: Kızılötesi kurutm ve sıcaklık (40, 50, 60 ve 70°C)	Vorteks karıştırma süresi: 10 dakika		
	Santrifüj: 3000 rpm, 10 dakika ve 20°C		
Taze yaprak: Memecik çeşidi / Türkiye	Geleneksel ekstraksiyon	TPM: FCR	[445]
Kurutma yöntemi: Pilot ölçekli ısı pompası konveyör kurutucu, Kurutma bölmesi boyutları (3 × 1 × 1 m)	Solvent: Etanol / % 40 (v/v)	AA: ABTS	
Kurutma hava sıcaklığı: 45- 55°C	Süre: 24 saat		
Kurutma hava hızı: 0.5-1.5 m/s Süre: 270-390 dakika	Sıcaklık: 40°C		
Taze yaprak: Memecik çeşidi / Türkiye	Geleneksel ekstraksiyon	TPM: FCR	[387]
Kurutma yöntemi: Laboratuvar tipi tepsi kurutucu kurutma bölmesi boyutları (0.3 × 0.3 × 0.4 m) Kurutma hava sıcaklıkları (40-60°C)	Solvent: Etanol / % 40 (v/ v)	AA: ABTS	
Kurutma hava hızları: 0.5-1.5	Süre: 24 saat		

m/s Sıcaklık: 40°C  
 Süre: 240-480 dakika  
 Taze yaprak: Serrana çeşidi / - [388]  
 İspanya

Kurutma yöntemi:

Güç ultrason uygulamak için  
 modifiye edilmiş pilot ölçekli  
 konvektif kurutma makinesi

Kurutma sıcaklığı: 40°C

Kurutma hava hızı: 1 m/s

Ultrason dönüştürücüye  
 uygulanan elektrik gücü  
 seviyeleri: 0, 20, 40, 60 ve 80  
 W

Kurutma odasında ultrasonik  
 güç yoğunluğu: 0, 8, 16, 25 ve  
 33 kW / m<sup>3</sup>

Taze: Memecik çeşidi / - [449]  
 Türkiye

Kurutma yöntemi:

İnce katmanlı kurutucu

Kurutma hava sıcaklıkları: 50,  
 60 veya 70°C

Kurutma hava hızları: 0.5, 1.0  
 veya 1.5 m/s

Fresh: Chemlali, Chemchali, Solvent ekstraksiyonu TPM: FCR [658]  
 Zarrazi ve Chetoui çeşitleri /  
 Tunus Çözücü: Metanol / % 25 (v/v) AA: DPPH

Kurutma yöntemi:

Laboratuvar konvektif güneş  
 kurutucu

Kurutma hava sıcaklıkları: 40,  
 50 ve 60°C

Kurutma hava akışları: 1.6 ve  
 3.3 m<sup>3</sup>/dakika

75 numunene Taze: Chemlali, Sayali, Meski, Zarrazi ve Chétoui çeşitleri / Tunus Kurutma yöntemi: Mikrodalga fırın, İki kere, 2 dakika ve maksimum güç 800 W Depolama: 4°C ve karanlık Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: Toz	-	-	[391]
Taze yaprak: Serrana çeşidi / İspanya Kurutma yöntemi: 1. Sıcak hava kurutması (Güçlenmiş hava kurutma makinesi) • Sıcaklık: 70°C ve 120°C • Süre: 50 ve 12 dakika • Hava akışı: 0.094 m <sup>3</sup> /s • Hava hızı: 0.683 m/s 2. Dondurarak hava kurutması (Dondurma kurutma tanğı) • Başlangıç sıcaklığı: -48 ± 2°C • Raf sıcaklığı: 22 ± 2°C Süre: 48 saat • Basınç: 1.4 × 10 <sup>-1</sup> mbar Depolama: 4°C Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: Toz (<0.05 mm)	Solvent ekstraksiyonu Solvent: Etanol / % 40 (v/v) Karıştırma hızı: 170 rpm Süre: 24 saat Sıcaklık: 22 ± 1°C Yaprak ağırlığı / solvent miktarı: 3.75 g / 30 mL	TPM: FCR AA: FRAP AA: TEAC Bireysel fenolik bileşikler: HPLC- DAD/MS- MS	[659]
Taze yaprak: İzmir / Türkiye Kurutma yöntemi: 37°C ve 3 gün Depolama: karanlık Ezilmiş parçacıklarının ortalama çapı: 90-150 µm	Katı sıvı ekstraksiyon Solventler: Etanol, metanol, aseton ve bunların sulu formları %10 -% 90 (v / v) Süre: 24 saat	TPM: FCR AA: TEAC Bireysel fenolik bileşikler: HPLC	[444]
105 numunene Taze yaprak: Chemlali,	Solvent ekstraksiyonu Yaprak ağırlığı: 1g	Bireysel fenolik	[450]



<p>Sayali, Meski, Zarrazi ve Chetoui çeşitleri / Tunus ve Bouteillan çeşidi / Fransa</p> <p>Kurutma yöntemi: Tunus örnekleri-mikrodalga kurutma: İki kere Süre: 2 dakika Maksimum güç: 800 W Fransız örnekleri-liyofilize Depolama: Karanlık ve 4°C Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: Toz</p>	<p>Solvent : Metanol /% 40 (v/v) / 30 mL Süre: 24 saat</p>	<p>bileşik: HPLC</p>	
<p>Taze yaprak: Arbequina, Picual ve Sikitita çeşitleri</p> <p>Kurutma yöntemi: Açık havada kurutma depolama: 80°C</p>	<p>HAE+UAE Ekstraksiyon iki kez tekrarlanmış Yaprak ağırlığı: 0.5 g Çözücü: Metanol / % 80 (v/v) / 10 mL Süre: 10 dakika</p>	<p>AA: DPPH [395] Bireysel fenolik bileşikler: HPLC- DAD-ESI- TOF- MS</p>	
<p>Taze yaprak: Tunus Depolama: -20°C</p>	<p>Geleneksel Solvent Ekstraksiyonu Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Metanol / % 80 (v/v) /10 mL Süre: 24 saat Ortam aydınlatması ve sıcaklığı : karanlık ve oda sıcaklığı MAE Yaprak ağırlığı: 1.25 g Solvent : Etanol, Metanol / % 40- % 100 (v/v) Süre: 4-16 dakika Işınlama sıcaklığı: 10-120°C</p>	<p>Bireysel [478] fenolik bileşikler: HPLC-ESI- TOF/IT-MS</p>	
<p>Yaprak: toplanılmış, kurutulmuş ve öğütülmüş</p> <p>Depolama: 4°C</p>	<p>MAE Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Etanol /% 80-% 100 (v/v) / 8 mL Güç: 100-200 W Süre: 5-15 dakika Geleneksel ekstraksiyon yöntemi Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Etanol /% 80 (v/v) / 8 mL Sıcaklık: 40°C</p>	<p>Bireysel [397] fenolik bileşikler: HPLC-DAD</p>	

	Karıştırma ortamı ve süresi: karanlık ve 24 saat		
Taze yaprak: Tavşan yüreği çeşidi / Kaş / Türkiye	UAE	TPM: FCR	[398]
Kurutma yöntemi: Karanlık ve oda sıcaklığı	Yaprak ağırlığı: 500 mg Solvent: Etanol / % 0-100	AA: DPPH	
Depolama: Karanlık ve oda sıcaklığı	Katı ile solvent oranı: 25-50 mg / mL		
Ezilmiş parçacıkların ortalama çapı: 0.9-2.00mm	Süre: 20-60 dakika Frekans: 50 Hz Sıcaklık: 25°C		
Yaprak: toplanılmış, kurutulmuş ve öğütülmüş	DUSAE	Bireysel fenolik bileşikler: HPLC-DAD	[420]
Depolama: 4°C	Brinci tasarım: Yaprak ağırlığı: 1 g Prob pozisyonu: 0-4 cm Genlik: % 10 - % 50 Görev döngüsü: %30 - %70 Süre: 6-18 dakika Ekstraktan akış hızı: 4-6 mL / dakika Solvent: Etanol / %70- %90 Su banyosu sıcaklığı: 25-40°C İkinci tasarım: Yaprak ağırlığı: 1 g Prob pozisyonu: 4 cm Genlik: %30 Görev döngüsü: %70 Süre: 18-30 dakika Ekstraktan akış hızı: 5 mL / dakika Solvent: Etanol / %50- %70 Su banyosu sıcaklığı: 40°C Geleneksel ekstraksiyon yöntemi Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Etanol-su karışımı (59:41) / 8 mL Karıştırma sıcaklığı: 40°C Süre: 24 saat		
Taze yaprak: Oueslati, Chetoui, Chemlali, El Hor, Jarbouli ve Chemchali çeşitleri / Tnnisia	Geleneksel çözücü ekstraksiyon Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Metanol /% 80 (v/v) / 10 ml Süre: 24 saat Ortam aydınlatması ve sıcaklığı : Karanlık ve oda sıcaklığı MAE Yaprak ağırlığı: 1.25 g Çözücü: Metanol /% 80 (v/v) / 10	Ekstraksiyo n verimi Bireysel fenolik bileşikler: HPLC-ESI- TOF/IT- MS/ IT-MS <sup>2</sup>	[399]

	ml Süre: 6 dakika Sıcaklık: 80°C SFE Yaprak ağırlığı: 1 g Basınç: 150 bar Sıcaklık: 40°C Solvent: CO <sub>2</sub> + % 6.6 etanol Süre: 2 saat PLE Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Seçilen solvent (etanol veya su) Basınç: 100 bar Sıcaklık: 150°C Süre: 20 dakika SFE Basınç: 30 MPa Ekstraksiyon sıcaklığı: 50°C Ayırma sıcaklığı: 55°C Mod: dinamik Solvent / besleme oranı: 120 veya 290 Yardımcı çözücü: % 5 veya % 20 PLE: Yaprak ağırlığı: 6 g Solvent / besleme oranı: 120 ve 290 Akış hızı: 9.6 kg / saat Basınç: 30 MPa Yardımcı (% ağır): % 5 ve % 20 PLE Yaprak ağırlığı: 1 g Solvent: Etanol ve su Basınç: 100 bar Sıcaklık 150°C Süre: 20 dakika		
Fresh: Koroneiki / Attika Kurutma yöntemi ve depolama: İyi havalandırılmış gölgeli bir yerde kurutulmuş ve daha sonra depolanmış Ezilmiş parçacıkları ortalama çapı: 3 mm		AA: DPPH [400] Bireysel fenolik bileşik: HPLC-DAD	
Numunene: ıspanya Kurutma yöntemi: karanlık, oda sıcaklığı ve 50 gün Depolama: Karanlık ve oda sıcaklığı		Bireysel fenolik bileşikler: HPLC-ESI-TOF/IT-MS	[402]
Fresh: Koroneiki / Attika Kurutma yöntemi ve depolama: İyi havalandırılmış gölgeli bir yerde kurutulmuş ve daha sonra karanlık odada saklanmış Ezilmiş parçacıkları ortalama	PLE Yaprak ağırlığı: 7 g Solvent: Su ve Etanol / %0 ve %100 Sıcaklık: 40 ve 190C Zaman: 5 ve 25 dakika Döngüleri: 1 ve 3	Ekstraksiyon verimi AA: DPPH Bireysel fenolik bileşikler: HPLC-ESI-	[401]

çapı: 3 mm

Flush: % 40 ve % 100  
Purge: 60 ve 180 saniye  
Ön ısıtma: 60 ve 180 saniye  
Hücre hacmi: 33 ve 100 mL

QTOF-MS

Taze yapraklar 8 saat boyunca  
40°C'de kurutulmuş,  
öğütülmüş ve homojenize  
edilmiş Depolama: 4°C.

Katı-sıvı çözücü ekstraksiyonu (3  
tasarım)  
Yaprak ağırlığı: 1 g  
Basınç: 6 bar  
Solvent: Etanol / %60, %70 ve  
%80 (v/v)  
Sıcaklık: 100, 130 ve 150°C  
Statik süre: 6 dakika  
Dinamik ekstraksiyon süresi: 7  
dakika  
Akış hızı: 0.5, 1 ve 1.5 mL/dakika  
Toplam ekstraksiyon süresi: 13  
dakika  
Geleneksel ekstraksiyon  
Yaprak ağırlığı: 1 g  
Solvent: Etanol / %70 (v/v) / 8ml  
Sıcaklık: 40°C  
Karıştırma süresi: 48 saat

Bireysel [660]  
fenolik  
bileşikler:  
HPLC-DAD

## 2.6.2. Ekstaksiyon için katkılar

### 2.6.2.1. *Yüzey aktif madde (surfaktanlar) ve deterjan kullanımı*

Canlı bitkilerin ve tohumların dokusunu öldürmeden, ilgili bileşiklerin eldesi için deterjan, alkol ve dimetil sülfoksit kullanımı bildirilmiştir [661]. Yöntem, kullanılan kimyasalların bölüm katsayılarına, ekstrakte edilecek moleküllerin polaritesine ve çözücülerin dokuya nüfuz etme yeteneğine dayanmaktadır. Etanol, metanol ve uzun zincirli alkoller ve vinil benzen ve XAD-4 olarak deterjanlar gibi çözücüler kullanılmıştır. Canlılık testleri bitkilerle yapılması gerekmektedir [567, 662]. Soya fasülyesi tohumlarından iki izoflavonoid, daidzein ve genistein elde etmek için, bir araştırmacı grubu sulu metanolü test edilmiş ve işlenmiş tohumların yüzdesinin çimlenmesi açısından solventin konsantrasyonunun canlılık üzerindeki etkisini bildirilmiştir. Tohumların yaşayabilirliği, %20'nin ötesinde metanol konsantrasyonundaki artışla azalmıştır. Tohum çimlenmesi 24 saat boyunca %0-20 sulu metanol olarak %80'in üzerinde gözlenmiştir. Bununla birlikte, %30 sulu metanol konsantrasyonunda çimlenme gözlenmemiştir. İyonik olmayan yüzey aktif maddeler de ekstraksiyon için kullanılmıştır. Kritik bir sıcaklığın üzerinde, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler benzersiz bir bulut noktası davranışı gösterilmiştir. Yani iki farklı faza, sürfaktan açısından zengin bir faza ve bir yığın sulu faza ayrılma kabiliyeti gösterilmiştir. Bu prensibi, ginsenosidlerin ekstraksiyonu için ultrason destekli ekstraksiyonu ile birlikte uygulanmıştır. Bulut nokta teknolojisi ile birlikte basınçlı sıvı ekstraksiyonu rapor edilmiştir [663]. Su veya metanol ile karşılaştırıldığında, kritik misel konsantrasyonu üzerindeki bir konsantrasyonda Triton X-100 olarak iyonik olmayan yüzey aktif maddenin varlığı, ultrason destekli ekstraksiyonu ile karşılaştırıldığında, basınçlı sıvı ekstraksiyonu altında Ginseng köklerinden ginsenoside ekstraksiyonunu arttırmıştır [507, 663].

### 2.6.2.2. İyonik sıvı kullanımı

İyonik sıvılar son zamanlarda çeşitli uygulamalar için araştırmacıların ilgisini çekmiştir. İyonik sıvılar,  $<100^{\circ}\text{C}$  olan düşük sıcaklıkta sıvı formda bulunan hacimli organik katyonlar ve inorganik veya organik anyonlardan oluşmaktadır. İyonik sıvı, ihmal edilebilen buhar basıncına, iyi termal kararlılığa, geniş sıvı aralığına, ayarlanabilen viskoziteye ve su ve organik çözücülerle karışabilirliğe sahiptir. İyonik sıvı ekstraksiyon ve reaksiyonlarda kullanılmıştır. İyonik sıvılara yeşil çözücüler denilmiş ve ekstraksiyon için çözücüler veya yardımcı çözücüler olarak geniş ölçüde araştırılmıştır [664]. İyonik sıvı bazlı-ultrason destekli ekstraksiyonu, *Catharanthus roseus*'tan üç alkaloidin, catharanthinin, vindolinin ve vinblastinin ekstraksiyonuna başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmada farklı katyona ve anyonlara sahip on iki adet iyonik sıvı araştırılmıştır. Ultrason gücü ve zamanı ve ekstraksiyon döngüsü sayısı optimize edilmiştir. İyonik sıvı bazlı-UAE 0.5 saatten 4 saate kadar kısa ekstraksiyon süreleri ve dikkate değer bir verim sağlamıştır [665]. İyonik sıvı bazlı-MAE tekniği, üç Çin şifalı bitkisinden podofillotoksinin etkili bir şekilde ekstraksiyonu için geliştirilmiştir. İyonik sıvı bazlı-maserasyon ekstraksiyonu, ısı ekstraksiyonu ve ultrason destekli ekstraksiyonu gibi diğer ekstraksiyon teknikleri ile karşılaştırıldığında, iyonik sıvı bazlı-mikrodalga destekli ekstraksiyonu tekniği sadece daha kısa sürmekle kalmamış, aynı zamanda daha yüksek ekstraksiyon oranı sağlamıştır [507].

### 2.6.3. Ekstraksiyondan önce adımlar

#### 2.6.3.1. Bitki materyalleri

##### a. Seçimi

Tipik bir ekstraksiyon işleminde, hammaddenin seçimi kritiktir. Örnek olarak, karotenoidler gibi ısıya ve ışığa duyarlı bileşiklerin ekstraksiyonu taze ham maddelere ihtiyaç duyarken, bazı yağlı asitler, fenolikler ve steroller kurutulmuş materyalden izole edilebilmektedir. Böylece, bitki materyalinin kurutulması ve öğütülmesi veya taze hammaddenin homojenizasyonu kritiktir. Bir yöntem seçilmeden önce, ekstraksiyonun temel amacının belirlenmesi gerekmektedir [434, 509, 666].

##### b. Toplanması

Bitki materyalleri, tüm bitki, hava parçası ve kabuk, kökler, gövde ve yaprak gibi doku toplanması fitokimyasal işlemede ilk adımdır. Ormanlar birçok şifalı bitkinin ana toplama kaynağıdır. Bununla birlikte, tıbbi bitkilerin sistematik yetiştirilmesi de artmaktadır. Sistematik yetiştirme, ormanlardaki baskıyı azaltmakta ve aynı zamanda konsantrasyonda tekrarlanabilirliği de sağlamaktadır. Toplanacak bitki parçalarının ön bilgisi çok yararlıdır. Hastalıklardan ve mikrobiyal enfeksiyondan arındırılmış bitkilerin veya bitkilerin parçalarının toplanması gerekmektedir. İyi üretim uygulamalarına uygun olarak, bitki materyallerinin toplanması için iyi tarım toplama uygulamalarının takip edilmesi gerekmektedir [507].

##### c. Doğrulanması

Toplanan bitki materyalinin botanik kimliğini oluşturmak için bir botanikçi veya bitki taksonomisti tarafından doğrulanması gerekmektedir. İdeal olarak, bir makbuz örneğinin bir herbaryumda biriktirilmesi gerektiğinden gelecekte incelenen bitki için referans alınabilmektedir [507].

#### ç. Temizlenmesi

Bitki materyalinin temizlenmesi ile kontaminasyon önlenmektedir. Genel olarak, toplanan bitki materyali suyla yıkanmakta veya kir, yağ ve diğer yapışkan maddeleri çıkarmak için yüzey aktif maddelerle işlem edilmektedir [507].

#### d. Kurutma ve depolama

Kimyasal değişimleri önlemek için bitki materyalleri, kontrollü koşullar altında ekstraksiyondan önce kurutulmaktadır. Kurutma için yüksek sıcaklık kullanımı önlenmekte ve yaygın olarak kullanılan kurutma teknikleri arasında, güneşte kurutma, hava ile kurutma, solar kurutma ve vakumla kurutma bulunmaktadır. İyice kurutulmuş bitki materyali ya kuru bir atmosferde ya da düşük bir sıcaklıkta, ekstraksiyondan önce uzun bir süre saklanabilmektedir. Zeytin yaprağı, gıda endüstrisinde büyük bir sömürü potansiyeline sahiptir. Kurutma, zeytin yaprağı işlenmesinde ana işlemdir [387]. Bununla birlikte, bu işlemin ürünün nihai kalitesini etkileyebilecek şekilde olmasına rağmen iyi kontrol edilmemektedir. Endüstriyel amaçlar için, sıcak hava kurutmasının sürecinin değişkenlerinin doğru bir şekilde kontrol edilmesini sağlayabildiğinden dolayı en yaygın kullanılan yöntemdir [667]. Zeytin yapraklarının kurutma davranışının araştırılması ve modellenmesi ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Modelleme, süreç değişkenlerinin kuruma hızı üzerindeki etkisini değerlendirmek ve ölçmek için ilginç bir araç olmakta ve ilgili mekanizmalar hakkında faydalı bilgiler elde edilebilmektedir [668]. Kuruma süresini ve ürün nem içeriğini tahmin etmek, yeni ürünler geliştirmek, uygun ekipmanı tasarlamak ve işlemin optimizasyonu için gereklidir [390]. Tablo 2.3'te, zeytin yaprağı için literatürde bildirilen bazı kurutma süreçleri verilmektedir.

Zeytin yapraklarının oda sıcaklığında veya gölgede kurutulması, besin değeri üzerinde zararlı bir etkiye neden olmamaktadır. Yaprakların 25°C'de oda sıcaklığında kurutulması, oleuropein ve verbaskozit seviyelerini tamamen korurken, 60°C'lik yüksek bir sıcaklıkta kurutmak, çeşitli seviyelerde farklı polifenollerin kaybıyla sonuçlanmaktadır [669]. Gölgede kurutma ya da güneşte kurutma gibi geleneksel kurutma yöntemleri hala kullanılmaktadır. Gölgede hava kuruması, besleyici değerler üzerinde herhangi bir zarar vermeden zeytin yaprağı korunması için basit, düşük maliyetli ve uygun bir prosedür olabilmektedir. İn vivo araştırmalara ihtiyaç



duyulmasına rağmen, zeytin yapraklarının yüksek sıcaklıklarda kurutulmasının, besleyici bir bakış açısıyla doğrulanmadığı anlaşılmaktadır [670].

Yıllar boyunca, pilot ölçekli ısı pompaları konveyör kurutucusu, tepsili kurutucu, ince tabakalı kurutucu, konvektif laboratuvar güneş kurutucu ve dondurarak kurutma makinesi dahil olmak üzere zeytin yapraklarının dehidrasyon amaçları için farklı tipte kurutucular kullanılmıştır. Ancak, zeytin yapraklarının dondurularak kurutulması antioksidan potansiyelini düşürmektedir [372]. Kurutma biyoteknoloji, farmasötik, gıda ve tarım gibi farklı işleme endüstrilerinde önemli bir işlemdir. Tarımsal ürünlerin kurutulması kolay kullanılma, güvenli koruma, daha uzun depolama ve nakliye maliyetinde azalma için gereklidir. Bu işlem, ısı uygulaması ile suyun uzaklaştırılmasını içermektedir. Yanlış kurutma, makul olmayan masraflar, yüksek enerji ve zaman tüketimi ve ürün kalitesinde geri dönüşü olmayan hasarlara yol açabilmektedir [671].

Genelde ağartma ve/veya kızıl ötesi kurutma yöntemi kullanılarak kurutulmuş zeytin yapraklarının toplam fenol içeriğinin, taze yaprakların fenol içeriği ile karşılaştırıldığında arttığını göstermiştir. Kurutma sıcaklığının polifenoller üzerinde etkisi ile ilgili olarak, kızıl ötesi kurutma sıcaklığı, kurutulmuş yapraklarda toplam polifenollerin içeriğinin, taze olanlara göre önemli bir artış göstermiştir [385]. Böylece zeytin yapraklarının gıda veya kozmetik uygulamalarında kullanılmadan önce korunmasını önermektedir [385]. Kızıl ötesi kurutmanın, taze yapraklardan %85'in üzerinde ve 40°C'de  $\approx$  162 dakika ile 70°C'de 15 dakika gibi kısa kuruma süresinde önemli ölçüde nem gidermeye neden olduğu bildirilmiştir. Diğer araştırmacılar, kurutma koşullarını optimize etmek için bir tepki yüzeyi metodolojisi kullanarak bir pilot ölçekli ısı pompası konveyör kurutucusunun etkisini araştırmışlardır. Hava hızı 0.64 m/s, sıcaklık 53.43°C, ve süre 288.32 dakika olarak optimum çalışma koşulları bulunmuştur. Bu optimum noktada, toplam fenolik madde kaybı, toplam antioksidan aktivite kaybı, nihai nem içeriği ve dış etken madde verimi sırasıyla %9.77, %44.25, %6.0 ve %69.55 olarak bulunmuştur. Pilot ölçekli ısı pompası taşıyıcı kurutucunun düşük işletme maliyetine sahip olduğundan araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Laboratuvar tipi tepsi kurutucuları göz önünde bulundurularak ve hıza hızı 1.01m/dakika, kurutma süresi 298.68 dakikada ve 51.16°C'lik bir sıcaklıkta çalıştırılarak, sıralıya antioksidan aktivite, ekserjetik verimlilik, nem içeriği ve toplam fenolik %41.88, %65.50, %6.0 ve %10.25 oranlarında yanıt yüzey metodolojisine göre optimal değerler elde edilmiştir. Bu, kurutma hava sıcaklığının düşürülmesi ve kurutma hava hızının

arttırılmasıyla verimin arttığını göstermektedir [387, 672]. Diğer bir çalışmada tepsili kurutucuda, enerji kullanımı ve ekserji verimliliği oranı değerleri sırasıyla %14.05-26.21 ile %55.95 - 75.12 arasında değişmiştir. İnce tabakalı kurutma işlemi sırasında zeytin yapraklarının kurutma oranı esas olarak hava sıcaklığından etkilenmiştir [390].

Zorunlu hava laboratuvarı kurutucu yöntemleri ile sıcak hava ve ve dondurarak kurutma, zeytin yapraklarında belirlenen ana polifenollerin konsantrasyonu üzerinde önemli bir etki göstermiştir. Sıcak hava ile kurutma, özellikle oleuropein içinde, dondurarak kurutmadan daha yüksek bir fenolik içerik sağlamıştır. 120°C'de kurutma en iyi işleme koşulu olarak kabul edilmiştir [659]. Dondurma yöntemine bağlı olmamasına rağmen, dondurma muhtemelen oksidaz aktivasyonuna bağlı olarak taze yapraklara kıyasla antioksidan potansiyelini azaltmıştır [659]. Laboratuvar konvektif güneş kurutucuları kullanılarak 40 ile 60°C sıcaklıklar ve 1.62 ve 3.3 m<sup>3</sup>/dak hava akış hızları olarak hava ile kurutma koşullarının, zeytin yapraklarının toplam fenol içeriğini etkilemiş olduğu bulunmuştur [658]. Ek olarak, taze yapraklarında radikal süpürme kapasitesi kuru olanlara göre daha yüksek bulunmuştur [658]. Diğer bir çalışmada, orta kızıl ötesi spektroskopi kullanılarak Fransız ve Tunus'da elde edilmiş zeytin yapraklarında oleuropein içeriğinin incelenmesi için en fazla 800 W olarak 2 kez mikrodalga fırın kurutma ve liyofilizasyon uygulanmıştır [394]. Zeytin yapraklarının kurutulması için bir ultrason enerji sisteminin uygulanması da araştırılmış ve bunun kurutma hızını arttırmanın ilginç bir yolu olabileceği bildirilmiştir [668]. Son çalışmalarda [461], biyoaktif bileşenlerinin ekstraksiyonu için kullanılan zeytin yapraklarının kurutulması için 250 W'da 2 dakika süre ile mikrodalga fırını kullanılmıştır.

### **2.6.3.2. Ekstraksiyon parametreleri**

Bitki ve hayvan gibi doğal kaynaklardan saf bileşiklerin elde edilmesine yönelik klasik bir proses ya tek bir çözücü ya da çözücülerin bir kombinasyonu ile bir dizi çözücü ile ekstrat edilmektedir. Ekstraksiyon modu izole edilen maddeye bağlıdır. Ekstraksiyonu, yabancı maddeleri uzaklaştırmak için bazı inert materyallerle filtrasyon yapılmaktadır. Elde edilen ekstrakt, polar olmayan, yarı polar ve polar çözücüler içinde fitokimyasalların dağılmasını sağlayan artan polaritede çözücülerle sırayla ayrılmaktadır.

#### **a. Ekstraksiyon yönteminin seçimi**

Farklı yöntemler arasındaki önemli ayırt edici özellikler, zaman ve geniş kapsamlı bir ekstraksiyon için gereken çözücü miktarıdır. Analitlerin ekstraksiyon yönteminin seçimi de sonuçları etkilemektedir.

#### **b. Solvent seçimi**

Biyoaktiflerin ekstraksiyonu için bir çözücü seçerken, bileşenlerin ekstrakt edilme kabiliyeti göz önünde bulundurulmalıdır. Örnek olarak, iyonik çözünenler sulu çözücülerden özütlenebilmektedir. Asit-baz özellikleri, yük, kararlılık ve moleküler boyut, izolasyon sürecini anlamaya yardımcı olan biyoaktif molekülün genel özellikleridir. Hem ekstraksiyon verimi hem de ekstraktların antioksidan kapasitesi, farklı polariteye ve ekstrakte edilen bileşiklerin farklı antioksidan potansiyeline bağlı olarak solvent tarafından kuvvetle etkilenmektedir [673]. Bu sebeple, ekstraksiyon için solvent seçimi kritik bir adımdır. Tek çözücünün, doğal bitki materyallerinden tüm biyoaktif bileşik gruplarını çıkarması olası değildir. Çoğu durumda, bu yöntemler bitki materyalleri ve söz konusu çözünenler açısından gereksinimlerimize göre iyileştirilmektedir. Bir ekstraksiyon işleminden beklenen sonuç, yüksek saflıkta ürün, yeterli miktarda biyoaktif bileşik ve molekülün stereokimyasını teyit etmesidir. Dünya çapında, çay veya kahve yapılırken su ekstraksiyonu uygulanmaktadır. Temel olarak, ön işleminden geçirilmiş bitki materyali, bileşenlerin aroma, tat ve rengini alan sıcak su ile ekstrakte edilmektedir. Filtrelemeden sonra ekstrakt, tüketim için hazır olmaktadır. Belirli biyoaktif bileşiklerin bitki materyalinden sıvı ekstraksiyonu ile izolasyonu durumunda, bazı teknolojik problemlerin çözülmesi gerekmektedir [674]. Öncelikle, makul ekstraksiyon verimleri elde etmek için bitki

materyalinin ön işlemden geçirilmesi gerekmektedir. Diğer bir problem ise ekstraksiyon prosedüründe kullanılmak üzere özel çözücülerin gerekmesidir [675]. Daha yakın zamanlarda, gıda endüstrisinde kullanılabilecek spesifik bileşiklerin izolasyonuna odaklanılmıştır. Özellikle ilgi çekici olan, bitkilerden ve meyvelerden biyoaktif bileşiklerin, aromaların ve kokuların ayrıştırılmasıdır [676, 677]. Benzen, heksan, heptan, petrol eteri ve toluen gibi polar olmayan çözücüler, aseton, diklorometan, kloroform, etil asetat ve metil etil keton gibi orta polarlıkta çözücüler ve asetonitril, etanol, metanol ve su gibi polar çözücüler çeşitli polaritelerde çözücüler olarak rapor edilmektedir. Bu nedenle, yüksek polariteye sahip bir organik çözücü, fenolik bileşiklerin polar olmayan bir çözücüye göre nicel olarak geri kazanılmasında daha etkili ve birçok çalışmada fenoliklerin zeytin yaprağı dahil bitkilerden ekstraksiyonu için iyi bir çözücü olarak metanol bildirilmiştir. Bununla birlikte, metanolün son ekstraktlarda kabul edilemez düzeylerde toksik kalıntılara yol açabilmesi, etanol ve suyu güvenliği ve bolluğu nedeniyle en çok kullanılan çözücüler haline getirmiştir [3, 673]. Tek başına etanolün zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için bir çözücü olarak etkili olmadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda su, ekstrakte edebildiği polifenollerin bitki dokularından difüzyonunu arttırarak ekstraksiyon prosesinde önemli bir role sahiptir [444]. Etanol konsantrasyonundaki değişiklikler, çözücünün yoğunluk, dinamik viskozite ve dielektrik sabiti gibi fiziksel özelliklerini modifiye etmektedir. Bileşiklerin çözünürlüğü, etanol konsantrasyonundaki değişikliklerle de modifiye edilebilerek fenoliklerin ekstraksiyonunu etkileyebilmektedir [678]. Çalışmada etanol konsantrasyonunun toplam fenolik verim üzerine etkisini araştırmak için %40-60 oranında kullanılmıştır. %50 etanol seviyesinin en düşük verimi sağlaması ortaya çıkarılarak ortamdaki etanol konsantrasyonunun, görünüşte iki fazlı bir etkiye sahip olduğu keşfedilmiştir. Aksine, etanol konsantrasyonunu düşürürken veya arttırırken gözlenen eğilimler, her iki durumda da polifenol ekstraksiyonunun tercih edildiğini göstermiştir. Zeytin yaprağı fenoliklerinin çoğu glikozitler olduğu için, kendi çözünürlüklerinin %40'te %50'den daha yüksek olabileceği varsayılabilmektedir. Öte yandan, önemli ölçüde daha az polar olan oleuropein, %60'de %50'den daha fazla çözünmektedir. Bu, etanol değişikliklerine yanıt olarak böyle bir iki fazlı eğilimin sebebi olabilmektedir [502]. Zeytin yaprağı için araştırmacılar [161, 397, 669] tarafından kullanılan ana çözücüler arasında butanol, etanol, etil asetat, dietil eter, heksan, kaynar su, kloroform ve metanol bulunmuştur. Bu çözücülerden en yaygın olarak sulu metanol veya sulu etanol kullanılmış ve çözücünün konsantrasyonu %40 ile %80 arasında değişmiştir [161, 397,

669]. Etanol kullanıldığında, etanol ve suyun karışımı belirli bir fraksiyonda tek tek bileşenlerin toplamından daha az hacme sahip olduğu ve bir etanol ve su karışımı ekzotermik olduğu gibi bazı önlemler alınması gerekmektedir. Ayrıca %50 (v/v)'den fazla etanol çözeltileri yanıcıdır. İlginç bir şekilde, doğal malzemelerden etil asetat ile ekstrakt edilen polifenollerin güçlü antioksidan kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Etil asetat gibi daha az polar çözücüler, etanole veya metanole göre daha aktif özütler sağlamıştır. Ancak etanol ve metanol ekstreleri de yüksek lipid peroksidasyonu önleme kapasitesi göstermiştir [3].

Uygun bir çözücünün veya karışımın seçimi ilk adımdır. Petrol eteri gibi polar olmayan çözücüler, polar olmayan bileşikler için mükemmel çözücülerdir. Bununla birlikte, polar bileşikler çıkarma yetenekleri genellikle zayıftır. İlgili bileşiğin ve ekstraksiyon çözücüsünün polaritesinin eşleştirilmesi optimum ekstraksiyon için kritik öneme sahiptir. Çok sayıda metabolitin varlığından dolayı, bunların hepsini tek bir çözücü ile ekstrakt etmek mümkün değildir. Toksikite, çözündürme gücü, seçicilik ve kimyasal reaktivite, bir çözücü seçilirken dikkat edilmesi gereken önemli faktörlerdir. İdeal durumlarda, çözücü toksik olmamak ve yüksek çözülme gücüne sahip olmak gerekmektedir. Çözme gücü ve seçicilik bir çözücünün önemli özellikleridir. Çözme gücü, bir çözüneni çözme gücü iken, seçicilik, mevcut çeşitli bileşiklerin polariteleri çok farklı olmadığında belirli bileşikler çözme kabiliyetidir. 1978 yılında Synder [507] tarafından çeşitli çözücüler için bir polarite indeksi hesaplanmış ve farklı karışımların polaritesini ayarlamak için aşağıdaki denklemi önerilmiştir:

$$P' = \phi P_a + \phi P_b \quad 2.8$$

Burada  $\phi$  hacim fraksiyonu ve sırayla,  $P_a$  ve  $P_b$  çözücü  $a$  ve çözücü  $b$ 'nin polarite indisleri ifade etmektedir. Yeşil solvent, klorlu ve aromatik solventler üzerinde daha iyi bir seçimdir. Petrol eteri gibi sıfır dielektrik sabiti olan solventler mikrodalga destekli ekstraksiyonu için uygun değildir. Bu nedenle, mikrodalga destekli ekstraksiyonu için çözücüler, mikro dalgaların emiliminin yeterli olması için bir dielektrik sabitine sahip olması gerekmektedir. Bir sonraki adım optimum numune çözücü oranıdır [507]. Yaygın olarak kullanılan bazı çözücülerin fiziksel özellikleri Tablo 2.4'te özetlenmiştir.

**Tablo 2.5:** Ekstraksiyon için kullanılan bazı yaygın çözücülerin fiziksel özellikleri [507].

<b>Solvent</b>	<b>Dielektrik sabiti</b>	<b>Kaynama noktası (°C)</b>	<b>Yoğunluk (g/mL)</b>
Asetik asit	6.2	118	1.05
Aseton	20.7	56	0.79
Diklorometan	8.9	40	1.33
Etanol	24.6	78	0.79
Etil asetat	6.0	77	0.90
Formik asit	58.5	101	1.22
Hekzan	1.9	69	0.66
Karbon disülfid	2.6	46	1.26
Kloroform	4.8	61	1.49
Metanol	32.7	65	0.79
<i>n</i> -Bütanol	17.5	118	0.81
<i>n</i> -Propanol	20.3	97	0.80
Sikloheksan	2.0	81	0.78
Su	80.2	100	1.0
Tolüen	2.4	111	0.87

### c. Sıcaklık

Ekstraksiyon, bileşiğin ne kadar hızlı çözüldüğünün ve dengenin sıvı çözücülerle elde edildiğinin bir fonksiyonudur [679]. Sıcaklık çözünürlük, kütle transfer oranı olarak difüzyon katsayısı ve fenolik bileşiklerin stabilitesi üzerinde etkisi vardır [680]. Ayrıca sıcaklık hem bileşiğin çözünürlüğünü hem de çözücünün örnek matrisi boyunca yayılabilirliğini etkilediğinden dolayı sıcaklık, ekstraksiyon verimi üzerinde önemlidir. Sıcaklıkta bir artış ve viskozitede azalma, difüzyon oranını önemli ölçüde artırmamaktadır. Oda sıcaklığına kıyasla, çözücünün analitleri çözme kapasitesi, daha yüksek sıcaklıkta artmaktadır. Çözücünün sıcaklığı 5°C ila 15°C arasında arttırıldığında hidrokarbonların çözünürlüğü birkaç yüz kat artmaktadır. Suyun organik çözücüler içinde çözünürlüğü de artan sıcaklıkla artmaktadır. Bu nedenle, çözücü içinde çözülecek olan analitlerin olasılığı artmaktadır. Sıcaklık ve ekstraksiyon döngüsü sayısı gibi ekstraksiyon süresi etkili bir şekilde optimize edilmeleri gerekmektedir. Sıcaklığın 40°C'den 90°C'ye yükseltilmesi durumunda, siyah fenomdan toplam fenoliklerin yaklaşık %30'luk bir ekstraksiyon verimi artışı gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, daha fazla sıcaklık artışı, muhtemelen fenoliklerin kararsız doğasına bağlı olarak verimi %20'e düşürmüştür [507, 681].

### ç. Süre

Zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda araştırmacılar [334, 413, 682] tarafından çeşitli ekstraksiyon sıcaklıkları ve zamanları kullanılmıştır. Genel olarak artan sıcaklıkta daha az ekstraksiyon süresi gereklidir. Çözücü olarak etanol kullanıldığında, ekstraksiyon işlemi en çok kullanılan oda sıcaklığında ya da çalkalama altında 24-48 saat boyunca 40°C'lik yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir [334, 413, 682]. Statik ve kolay bir ekstraksiyon işlemi ve kullanıldığında gerekli sıcaklıklara ulaşmak için bir su banyosu kullanılmıştır. Araştırmacılar [507, 669, 683] tarafından kaynar su, 10 ila 30 dakikalık ekstraksiyon süresi kullanılmıştır.

### d. Parçacık büyüklüğü ve numune-çözücü oranı

Ekstraksiyon için itici güç, parçacıklar içindeki konsantrasyon gradyanıdır. Bu itici kuvvet, çözücü ve katı oran ile ilgilidir. Ekstraksiyon oranı, daha yüksek bir konsantrasyon gradyanı ile artmaktadır [678]. Parçacık boyutu ve örnek-çözücü oranı, etkilerin literatürde iyi bir şekilde

belgelenmemesine rağmen, çözücü kullanımında ve ekstraksiyon veriminde de etkililerdir. Parçacık büyüklüğünün azalması, yüzey alanı arttırmaktadır. Böylece numune-çözücü arasında daha iyi bir etkileşim sağlanarak daha iyi ekstrakt edilebilirlik sağlanmaktadır. Numune-çözücü oranındaki büyük değişiklikler rapor edilmiştir [684]. Çözücünden katı orana normal olarak, mililitre olarak çözücü hacminin ve gram olarak ekstraksiyon numunesinin ağırlığına oranı olarak ifade edilmektedir Araştırmacılar tarafından zeytin yaprağı ekstraksiyonu için kullanılan solvent-katı oran 4'e 100 arasında değişmektedir. Ama literatürde 10 ile 50 arasında bir oran çoğunlukla bildirilmiştir. Bir araştırma gurubu [397, 420] bütün çalışmalarında 8 mL çözücü ve 1 gram kurutulmuş zeytin yaprağı kullanmıştır.

#### e. pH

Ekstraksiyon ortamının pH'ı, çözünebilir bileşiklerin çözünürlüğünün derecesini belirlemekte ve aynı zamanda hidrolize edilebilir fraksiyonların muhtemel çözünmesini etkilemektedir. Ortamın pH'ının zeytin yaprağı ekstraktları üzerindeki etkisi incelenerek sırasıyla seyreltilmiş sulu hidroklorik asit çözeltileri ve sodyum hidroksit, pH 2 ve pH 12'de ekstraksiyon elde etmek için kullanılmıştır. pH 2, pH 8 ve pH 12'de elde edilen ekstraktların karşılaştırılması, pH 12'de ekstrakte edilen zeytin biyoaktif fenoliklerin miktarının apigenin-7-glukozit için %27, oleuropein ve luteolin-7-glukozit için %35 ve verbascoside için %40 muhtemelen ester bağ hidrolizinden dolayı azaldığını göstermiştir. Bununla birlikte, hedef analitlerin pH 2'deki konsantrasyonu, pH 8'deki ekstrakttakilere benzer olmuştur [420]. Bir başka çalışma da [502], artan pH değerlerinin, zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için elverişsiz olduğunu göstermiştir.



## 2.7. ANALİZLER

### 2.7.1. Spektrofotometrik Yöntemler

#### 2.7.1.1. İlkeleri

Spektrofotometrik yöntemler analitik kimyada en eski yöntemlerden biridir. Görünür ışığın belirli kimyasal maddeler tarafından emilmesi, konsantrasyonlarının görsel olarak belirlenmesi için uzun yıllardır kullanılmaktadır. Kolorimetri/renkölçme terimi, kimyasal elementlerin, bilinmeyen numunelerin renginin, ya dereceli silindirlerde ya da görsel karşılaştırmalarda karşılaştırılmasıyla belirlendiği analitik yöntemler için kullanılmıştır. Fotoelektrik enstrümanların kullanımı, analiz edilen numunelerden geçerken radyasyonun emiliminin ölçülmesine yol açarak görünür bölge dışında olan yararlı radyasyon aralığının genişletilmesini sağlamıştır [685].

Günümüzde, spektrofotometri, ultraviyole (UV, 200 - 380 nm), görünür (VIS, 380 - 780 nm) ve yakın kızılötesi bölgede olan elektromanyetik radyasyonun emiliminin ölçülmesine dayanan bir enstrümental teknik olarak kabul edilmektedir. Anorganik analiz, UV-VIS spektrofotometrisini kullanmaktadır. Spektrofotometrik yöntemler, kantitatif analizde kullanılabilirliklerinden bağımsız olarak temel çalışmalarda da kullanılmıştır. Örnek olarak, kimyasal bileşiklerin bileşiminin, asitlerin ve bazların ayrılma sabitlerinin veya kompleks bileşiklerin kararlılık sabitlerinin belirlenmesinde uygulanmaktadır [685].

Spektrofotometri bir ölçüm tekniği olarak teknolojideki ilerlemenin ve yeni materyallerin ve veri işleme yöntemlerinin geliştirilmesinin bir sonucu olarak büyük ölçüde gelişmiştir. Özel optiklerin ve spektrofotometre operasyonunu kontrol eden mikroişlemcilerle birleştirilmiş spektrofotometrelerin geliştirilmeleri, bu aletlerin kullanım olanaklarını, absorpsiyon spektrumlarını kaydetme ve toplanan verilerin işlenmesini önemli ölçüde genişletilmiştir. Spektrofotometrik yöntemlerin hem analitik prosedürlerde hem de verilerin işlenmesinde otomasyon için özellikle uygun olduğu kanıtlanmıştır. Otomatik akış enjeksiyon analizinde en sık kullanılan tespit tekniklerine aittir [685].

### a. Absorpsiyon ve moleküler yapı

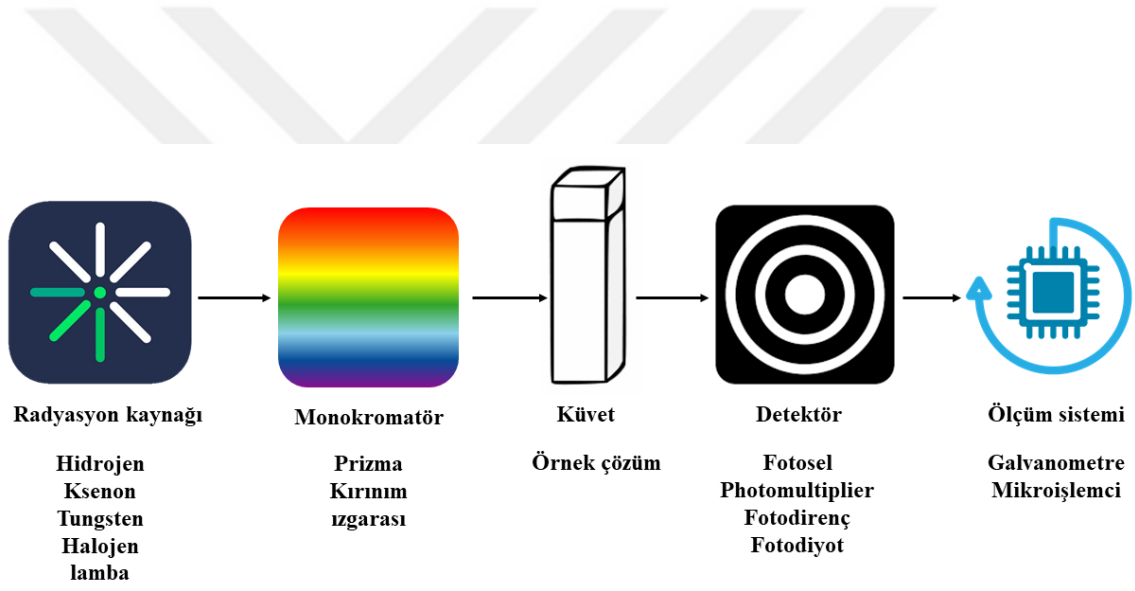
Spektrofotometrik maddelerin tanımlanması ve belirlenmesi yöntemleri, bir yandan elektromanyetik radyasyonun absorpsiyon bantlarının pozisyonu ve şiddeti ile diğeri üzerindeki moleküler yapı arasındaki ilişkilerin varlığına dayanmaktadır. Elektronik spektrumlar, UV-VIS bölgesinde olan absorpsiyonun bir sonucu olarak elektronların [ $\sigma$ ,  $\pi$  ve serbest elektron çiftleri (n)] enerji durumlarında olan değişikliklerden sonuçlanmaktadır. Değişiklikler, molekülün bireysel enerji durumları arasında olan elektronik geçişlerin olasılığına bağlıdır. Absorpsiyon bantlarının sayısı ve bunların pozisyonları, şekilleri ve yoğunlukları kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan spektral parametrelerdir [686]. Spektrumlarda kaydedilmiş bireysel absorpsiyon bantlarının pozisyonları, emilmiş radyasyonun enerjisine bağlıdır. Yakın kızılötesi bölgeden gelen radyasyon, bir molekülde dönme ve titreşim enerjisi durumlarında değişikliklere yol açmaktadır. Dalga sayısındaki küçük değişikliklerden kaynaklanan dar bantlar, fonksiyonel gruplar gibi karakteristik atom gruplarıyla bağlantılı kurup bu grupların tanımlanması için kullanılmaktadır. Genellikle spektrofotometrik ölçümleri, seçilen dalga boyunda bir tek renkli radyasyon ışınının yolunda yerleştirilen bir ölçüm hücresinde bulunan suda veya organik çözücülerde çözeltiler üzerinde yapılmaktadır. Absorbans, gelen ışın yoğunluğunun iletilen ışının yoğunluğuna oranının bir algoritmasıdır [685, 687-691].

### b. Spektrofotometrik aparatlar

Ölçme aracının kalitesi, elde edilen sonuçların güvenilirliği üzerinde güçlü bir etkiye sahip olmaktadır. Modern analitik laboratuvarlarda kullanılan standart spektrofotometrik aparatlar, bu tekniğin ilk uygulama döneminde kullanılan ekipmandan çok farklıdır. 1980'lerin ortasına kadar spektrofotometrik aparatların geliştirilmesinde yapılan ilerlemeler açıklanmıştır [692]. Radyasyon absorpsiyon spektrumunu kaydetmemizi sağlayan bileşenler seti, monokromatörden, küvetten, radyasyon kaynağından ve veri işleme sistemi ile detektörden oluşmaktadır [685].

### c. Spektrofotometre sisteminin diyagramı

Kaynak tarafından yayılan ışığın yoğunluğu, monokromatizasyonunun etkililiği ve dedektörün duyarlılığı, spektrofotometrenin kalitesi için belirleyicidir. Şekil 2.53'te spektrofotometre sisteminin diyagramı gösterilmiştir.



Şekil 2.53: Spektrofotometre sistemi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resimler Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [685, 693-695].

### c.1. Monokromatörler

Spektrofotometreler UV ve VIS olarak iki bağımsız radyasyon kaynağıyla donatılmıştır. Genellikle UV kaynağı, sırasıyla 180-400 nm veya 190-750 nm aralığında radyasyon yayan bir döteryum veya ksenon lambadır. UV radyasyon kaynaklarının geliştirilmesi gözden geçirilmiştir[696]. Görünür ışık yayan kaynaklar tungsten ve halojen lambalardır. Halojen lambaların özellikleri arasında daha geniş spektral aralığı, daha yüksek radyasyon şiddeti ve daha uzun kullanım ömrü bulunmaktadır. Modern spektrofotometrelerde UV ve VIS arasında olan karşılıklı değiştirim otomatik olarak devam etmektedir. Lazerlerin yüksek yoğunluklu monokromatik radyasyon kaynağı olarak kullanımını artmaktadır [697]. Spektrofotometrenin ana unsuru, kaynak tarafından yayılan radyasyonun yayılmasına ve belirli dalga boyunda tek renkli radyasyon demetinin izolasyonuna hizmet eden monokromatördür. Monokromatör, dağınık radyasyona odaklanmak için bir yarık sisteminden, bir kolimatörden, bir ışık dağıtıcı elemandan ve lensler veya aynalardan oluşmaktadır. Dispersiyon sistemi monokromatörün temel parçasıdır. Monokromatizasyon derecesi dağıtma elemanının önemli bir özelliğidir. Monokromatik radyasyonun ışınları veya belirtilmiş dar bir aralıkta oluşan dalga boyunun radyasyonu filtreler, kırınım ızgaraları veya prizmalar vasıtasıyla izole edilmektedir. Sınırlı bir dalga boyu aralığında ışınım demetleri, uygun spektrumlardan uygun şekilde seçilmiş renk filtreleri ile ayrılmaktadır [685].

Modern spektrofotometreler, dağılımı kullanılan malzemeden ve uygulanan radyasyon dalga boyundan bağımsız olan difraksiyon ızgaraları ile donatılmıştır. UV bölgesi için 1,800 ve 2,400 kanallar/mm olan ızgaralar kullanılmakta ve görünür ışık için 600 ile 1.200 kanallar/mm olanlar uygulanabilmektedir. Izgara sabit olarak belirtilen kanalların ayrılması, verilen ızgara için parametre karakteristiğidir. Kanalların oluşturulmasının yüksek hassasiyeti ve ayırmalarının düzenliliği, 6,000 kanallar/mm'den fazla olan holografik kırınım ızgaraları için karakteristiktir. Prizmalar için kırınım ızgaralarının değiştirilmesi, araştırmacıların spektral çözünürlüğü arttırmalarını ve absorpsiyon ölçeğinde ölçüm aralığını 1'den 4'e çıkarmasını sağlamıştır. Gerekli bir dalga boyu aralığında bir difraksiyon spektrumu verilerinin kaydedilmesi için, belirli bir dalga boyunun ışını izole etmek için ızgaranın konumunu değiştirmek için gereklidir. Eski enstrümanlarda kullanılan pozisyonun değiştirilmesinin manuel metodu, mekanik sistemlerle

değiştirilmiştir. Kırınım ızgarasının pozisyonundak olan hızlı ve hassas değişiklikler, bir lazer ışını vasıtasıyla elde edilebilmektedir [685].

### c.2. Ölçüm küvetleri

Numune çözeltilerinin yerleştirildiği ölçüm küvetleri, ölçümde kullanılan radyasyon aralığına bağlı olarak çeşitli malzemelerden yapılmaktadır. UV'de ölçümler kuartz küvetlerin kullanımıyla gerçekleştirilmektedir. Metal izleri ile daha az kirlenen sentetik kuvars daha iyi optik özelliklere sahiptir. VIS aralığında ölçümler kuvars, cam veya plastik küvetler kullanılarak yapılmaktadır. Küvet, radyasyonun maksimum iletimini ve kesini, ışık emici tabaka olarak bilinen kalınlığını sağlaması gerekmektedir. Farklı kalınlıklarda 5 ~  $\mu\text{m}$  - 10 cm aralığında küvetler üretilmektedir. 100  $\mu\text{L}$ 'den daha az hacme sahip olan örneklerini kabul edebilen küçük küvetler de mevcuttur. Radyasyon ışınının birden fazla geçişini sağlayan küçük hacimli küvetler özel ilgi alanına sahiptir [685]. Küvet malzemesinin kimyasalların etkisine dayanıklı olması gerekmektedir. Küvetler, radyasyon ışınının yolunda numunenin doğru ve tekrarlanabilen korunumunu sağlayan özel yuvalarda ölçüm odalarına yerleştirilmektedir. Özel tasarımlı küvetler, geniş sıcaklık ve basınç aralıklarında veya sürekli akış koşullarında olan ölçümler için kullanılmaktadır. Küvetlerin temizlenmesi için otomatik bir yöntem önerilmiştir [685, 698].

### c.3. Dedektörler

Radyasyon ölçüm küvetini geçtikten sonra dedektörü etkilemektedir. Dedektörün rolü, gelen elektromanyetik radyasyonun elektrik enerjisine dönüştürmektir. Sinyal dönüşümünün doğrusal olması gerekmekte, bu da üretilen elektrik sinyalinin alınan optik sinyale orantılı olması gerektiği anlamına gelmektedir. Bu durum fotoçoğaltıcılar, fotodiyotlar, fotorezistörler ve fotoseller tarafından başarılı bir şekilde gerçekleştirilmektedir. UV ve VIS spektrofotometride kullanılan çeşitli dedektörlerin karşılaştırması yapılmıştır. Fotoçoğaltıcıların ve fotosellerin çalışması harici fotoelektrik etkisine dayanmaktadır. Fotosellerin ve foto çoğaltıcıların çalışması harici fotoelektrik etkisine dayanmaktadır. Foto katot olarak ışığa duyarlı katot yüzeyine çarpan fotonlar, daha sonra katot ile anot arasında elektrik alanı hızlanılıp dış devrede elektrik akımına neden olmaktadır. Bir fotosel spektral duyarlılığı foto katodun malzemesine bağlıdır. Genellikle Foto katot, gümüş gibi metallardan yapılmış iletken bir tabaka, bimetalik veya oksit tabakası olarak yarı iletken bir tabaka ve genellikle Cs gibi alkali metal grubundan bir metaldan yapılmış

ince emici bir yüzey tabakası olarak üç tabakadan oluşulmaktadır. Bileşimin bir foto katodu, Ag, Cs-Sb alaşımı, mavi fotosel olan Cs, 650 nm'nin üzerindeki dalga boyu aralığında ışığa duyarlı olmakta ve daha uzun dalga boyları için Ag, Cs -O- Cs, kırmızı fotosel olan Cs ile kullanılmaktadır. Fotoselin tepki süresi (zaman sabiti)  $10^{-8}$  siyedir. Fotoçoğaltıcılar, foto katodun yaydığı elektronların yönlendirildiği birkaç ek diyotlar ile donatılmıştır. Dinotları etkileyen elektronlar, ardışık dinotlardan ikincil elektronların yayılmasına neden olduğundan  $10^8$ 'den fazla olan bir faktör tarafından üretilen sinyali arttırılmaktadır. Fotodiyotlarda ve fotoresistörlerde iç fotoelektrik fenomen ve yarı iletken malzemelerin spesifik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Işığa duyarlı eleman üzerinde sıkışan fotonlar, fotokondüktör boyunca akan ve küçük bir uygulanan voltajın etkisi ile güçlendirilen bir elektrik akımı üretilmektedir. Akım şiddeti artışı ışığa duyarlı elemente çarpan fotonların yoğunluğu ile orantılıdır. Cam veya kuvars olarak bir dielektrik plaka üzerinde biriken kurşun (II) sülfürün mikrokristal tabakası, 700 nm'nin üzerindeki dalga boyu aralığında uygulanan bir fotoreseptörün bir örneği olarak işlev görebilmektedir. Fotodiyotlar, uygun katkı maddeleri içeren iki veya üç katmanlı yarı iletken malzemedden yapılmaktadır. UV-VIS aralığında silikon fotodiyotlar kullanılmaktadır. Modern spektrofotometreler, çok sayıda fotodiyot dizisi olarak fotodiyodu içeren çok kanallı tespit cihazları ile donatılmış ve spektrumun tüm aralığı boyunca eşzamanlı tespiti etkinleştirir. Spektrofotometrik ölçümlerde tasarımın detayları ve bu tür dedektörlerin kullanılmasının avantajları sunulmuştur [685, 699, 700].

#### c.4. Veri kayıdı ve işlemi

Mikroişlemcilerin uygulanması ve bilgisayar tekniklerinin hızlı bir şekilde geliştirilmesi, analitik işlemlerin, örnekleme aşamasından elde edilen verilerin tam işlenmesinden otomatik hale getirilmesini mümkün kılmıştır. Modern spektrofotometrelerde, önceden manuel olarak çalıştırılan birçok işlemi kontrol etmek için mikroişlemciler uygulanmaktadır. Mikroişlemciler tarafından gerçekleştirilen fonksiyonlar arasında lambanın ve analitik dalga boyunun seçimleri olarak optik sistemin kontrolü, örnek olarak absorbans, konsantrasyon gibi toplanan veri türünün seçimi, sıfır ayarı, otomatik kalibrasyon ve ölçüm parametrelerinin kontrolü yer almaktadır [685]. Mikroişlemci, regresyon eğrisinin denklemini belirliip sonuçların istatistiksel olarak işlenmesini sağlanmaktadır. Aynı zamanda, absorbansı, seçilen bir dalga boyundaki transmitans yüzdesini veya ölçülen absorbans ve konsantrasyon arasında kurulan doğrusal veya doğrusal

olmayan olarak ilişkiye dayanan konsantrasyonu ölçmek üzere programlanabilmektedir. Gelişmiş spektrofotometreler, sonuçların kaydedilmesini ve elde edilen verilerin işlenmesini kolaylaştıran bilgisayarlarla birleştirilmiştir. Uygun yazılımla, sonuçların ekranda gösterilmesini, elde edilen spektrumun düzgünleştirilmesini, taban çizgisine göre tepe yüksekliğinin hesaplanmasını ve analiz edilen örneğin bireysel bileşenlerine bağlı olarak sinyallerin çözülmesini sağlayan sonuçların matematiksel olarak işlenmesini sağlamaktadır. Bilgisayar tekniklerinin geliştirilmesi, UV-VIS spektrumlarının kataloglarına hızlı ve kolay erişim sağlayarak kimyasal bileşik yapılarının belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Kaydedilen veriler ve elde edilen sonuçlar bilgisayar hafızasında saklanabildiğinden dolayı elde edilen sonuçların karşılaştırılması ve daha fazla sayıda veri ile hızlı karşılaştırma ile kalitelerinin değerlendirilmesi olasıdır. Elde edilen sonuçların eleştirel bir değerlendirmesi her zaman analistin görevidir [685].

### **2.7.1.2. Antioksidan aktivite / kapasite analizlerinin sınıflandırılması**

Antioksidanların kimyasal çeşitliliği, antioksidanları, kombine eylemlerinin daha uygun olabileceği gıda ve biyolojik matrislerden ayırmayı ve nicelleştirmeyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, toplam antioksidan kapasite / aktivite seviyesinin doğrudan bitki ekstraktları ve biyolojik sıvılardan ölçülmesi arzu edilmektedir. Antioksidan kapasite/aktivite analizlerinin alternatif bir sınıflandırması, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına ve tek elektron transferine (SET) dayanmaktadır. Kemilüminesan toplam antioksidan kapasite analizlerinin kesin mekanizması hala tartışılabilen bir konu olmasına rağmen, yenilebilen yağların analizinde antioksidan aktivite, oksidatif stabilite, lipid hidroperoksit içeriği ve bitkisel yağların sınıflandırılması veya karıştırılması gibi lüminesans yöntemleri etkili bir şekilde ön işlem uygulanılmadan kullanılmıştır. Son zamanlarda, çay, kakao, kahve, meyve ve sebze dahil olmak üzere birçok gıda maddesinin ve içeceğin insan sağlığı üzerinde bulunan faydalı etkisinin antioksidan aktivitelerinden kaynaklandığı kabul edildiğinde gıda bileşenlerinin antioksidan kapasitesinin in vitro tayini için en yaygın kullanılan yöntemler, her yöntemin bazı önemli avantajları ve eksiklikleri ile birlikte gözden geçirilmiştir [150, 507, 701].

Çalışmalarda gösterildiği gibi [702, 703], 2002 yılında Sanchez tarafından antioksidan analizleri, standart koşullar altında bir lipid veya lipoprotein substratının kullanılmış gibi ve oksidasyon inhibisyonunun derecesinin ölçülmüş gibi lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için ve serbest radikal süpürme kabiliyetinin ölçülmesi için kullanılan analizler olarak iki kategoriye ayrılmıştır. Herhangi bir analiz için temel özellikleri uygun bir substrat, bir oksidasyon başlatıcı ve kimyasal, enstrümantal veya duyuşal yöntemler olabilen son noktanın uygun bir ölçüsüdür. Analizlerin çoğu ikinci gruba aittir [2]. 2005 yılında iki farklı araştırma gurpları [702, 703] tarafından bu analizlerin arkasında olan kimyaya bakıldıktan sonra meydana gelen son sınıflandırma 2002 yılında Sanchez tarafından temel olarak metodolojiye dayanan yapıldığı sınıflandırmadan birçok gıda kimyacıları tarafından daha çok kabul görünmüştür. Tablo 2.6'da 2005 yılında Huang ve arkadaşları [702] tarafından yapıldığı sınıflandırma olarak ana HAT-temelli ve SET-temelli analizleri gösterilmektedir. Genel olarak, SET-temelli analizleri, reaksiyonu ve reaksiyon uç noktasının bir göstergesini izlemek için bir prob olarak Fe gibi oksitleyici ajan ile redoks reaksiyonunu içermektedir. Tersine, HAT temelli analizlerin çoğu, rekabetçi reaksiyon kinetiklerini izlemektedir. Aynı zamanda bütün kantitasyonlar kinetik eğriden



türetilmektedir. HAT-temelli analizleri genellikle bir antioksidandan, bir moleküler probdan ve sentetik bir serbest radikal jeneratörden oluşturulmaktadır. Bu iki yöntemin de radikal veya oksidan süpürme kapasitesini ölçmesi amaçlanmıştır [702].

Antioksidan oksidative aktivitesi / toplam antioksidan kapasitesi (AOA / TAC) ölçümlerinin sınıflandırılması açısından 2010 yılında Niki [704] tarafından yapıldığı uygulamalara göre antioksidan analizleri in vitro ve in vivo olarak sınıflandırılırken, 2013 yılında Sahu ve Saxena [705] tarafından Etki mekanizmalarına dayalı olarak HAT ve SET temelli analizler iki sistem önerilmiştir. Aynı yılda diğer araştırma gurubu [37] tarafından in vitro analizleri kimyasal ve hücre temelli analizlere olarak ayrılmıştır. Bu sınıflandırmaların çoğu sınırlı ve aşırı basitleştirilmiş olma eğilimindedir. Ama son zamanlarda AOA / TAC testlerinin sınıflandırılmasıyla ilgili çok sayıda kapsamlı kapsamlı derleme yayınlanmıştır. 2015 yılında Shahidi ve Zhong [709] AOA / TAC analizlerinin model sistemlerde mevcut oksidasyon geçerli durumunun ölçümü ve radikal süpürücü analizler olarak iki kategoriye ayrılabilceğini önerirken antioksidan etkilerin ve teknolojilerin mekanizmalarına dayanan bir sistem önermişlerdir. Bu katkı, bu son önerilerin kısa bir özeti olarak hizmet etmeyi amaçlamaktadır [706-709]. Geleneksel olarak antioksidanlar birincil veya zincir kırıcı antioksidanlar ve ikincil veya önleyici antioksidanlar olarak iki sınıfa ayrılmıştır [150, 507, 701]. Bu nedenle, bir antioksidan reaktif türleri süpürerek veya onların oluşumunu inhibe ederek doğrudan etki gösterebilmektedir veya endojen antioksidan savunmaları düzenleyerek dolaylı olarak etki edebilmektedir. Direkt antioksidan etkileri, HAT, SET, azaltma gücü, lipid peroksidasyonunu önleme, metal şelasyonu ve ROS / RNS süpürme aktiviteleri gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir [710, 711]. Zincir kırma mekanizmaları aşağıdakilerle temsil edilmektedir.



$FR^{\bullet}$ ,  $AH$ ,  $FRH$  ve  $A^{\bullet}$ 'nin, sırasıyla serbest radikaller, antioksidanlar, lipidler / proteinler / DNA molekülleri ve antioksidan radikalleri temsil ettiği durumlar. Denklem 2.9'de gösterilmiş reaksiyon, antioksidanların klasik etki mekanizmasının temelini oluşturmakta ve radikal başlatma veya yayılma aşamalarını inhibe etmek için bir hidrojen atomunu ( $H^{\bullet}$ ) ve bir elektronu ( $e^{-}$ ) veya her ikisini de transfer edebildiklerini göstermektedir. Böylece, bu enzimatik olmayan

zincir kırma AOA / TAC ölçümleri, ROS / RNS süpürme aktivitesini ölçmek için yaygın olarak HAT ve SET temelli analizler olarak sınıflandırılmaktadır [150, 507, 701].

Krosin ağartma, Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC), toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) ve toplam peroksil radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP) gibi AOA ölçüm yöntemleri, genellikle rekabetli HAT-temelli analizler ama genellikle TAC analiz rekabetli değil ve SET ve karışık mod (SET / HAT) mekanizmaları üzerinde çalışmaktadır [706]. Antioksidan aktivitelerinin önemli bir göstergesi olan antioksidanların azaltıcı gücü SET-temellidir. İkincil veya koruyucu antioksidanlar lipid oksidasyonunu geciktirmekte veya önlemektedir. Demir (Fe) ve bakır (Cu) gibi redoks aktif metaller, redoks döngü reaksiyonlarına uğrar, biyolojik sistemlerde süperoksit radikal anyonu ve nitrik oksit gibi reaktif radikaller üretmekte ve birçok fizyolojik fonksiyonda önemli rol oynamaktadır [712]. Aynı anda, çelatlayıcı antioksidanlar  $\text{Cu}^+$  ve  $\text{Fe}^{2+}$  gibi geçiş metal iyonlarını tecrit ederek Fenton rea tipi reaksiyonları engelleyebilmektedir.



Esas olarak, bir önleyici antioksidan, Lewis bazı olarak bir antioksidan ve Lewis asidi olarak bir metal iyonu arasında, nötralizasyon reaksiyonu yoluyla, hidrojen atomlarının ( $\text{H}^\cdot$ ) veya elektronların ( $e^-$ ) antioksidan tarafından kullanılmasını gerektirmeden çalışmaktadır [706]. Bu nedenle, bu önleyici antioksidan ölçümleri, geçiş metali iyon şelatlama yeteneğini ölçmektedir. Diğer yandan, bir biyolojik sistemdeki fizyolojik antioksidan etkileri, sadece serbest radikalleri süpürmeden değil, aynı zamanda, detoksifiye edici enzimlerin ve antioksidan savunmanın, gen ekspresyonunun modülasyonunun ve hücrese seviyede redoks hücre sinyallemesinin yukarı regülasyonunu da içermektedir. Hücre kültürüne dayanan biyoanalizler ve redoks kontrol sisteminden ve hücre sinyali transkripsiyon faktörlerinden kaynaklanan biyobelirteçlerin analizleri, AOA / TAC analizlerinin önemli ve yeni bir sınıfıdır. HAT-temelli analizler, SET -temelli analizler, karışık mod (HAT / SET) analizleri, in vivo antioksidan aktivite / kapasite analizleri ve çeşitli yöntemler olarak AOA / TAC analizleri beş kategoride sınıflandırılmıştır. Bu analizlerin sınıflandırması tablo 2.5'ya özetlenmiştir ve bu testlerin kısa bir açıklaması aşağıda verilmiştir [150, 507, 701].

a. HAT-temelli analizler:

HAT-temelli analizler, genellikle biyolojik olarak daha alakalı olduğu düşünülen peroksil radikallerini gibi H-atom bağıışı ile serbest radikalleri söndürmek için bir antioksidanın yeteneğini ölçmektedir. Antioksidan etkisinin HAT mekanizmaları, bir fenolün (ArOH) hidrojen atomunun (H) bir ROO<sup>•</sup> radikaline aktarılmasını olarak tanımlanmaktadır. Aşağıdaki gösterilen reaksiyon ile özetlenebilmektedir:

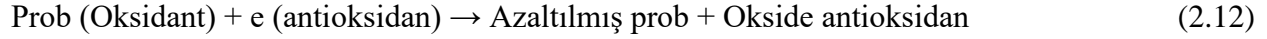


Burada antioksidan fenolün peroksil radikali ile reaksiyonundan oluşmuş (ArO<sup>•</sup>) ariloksi radikali rezonansı ile stabilize edilmektedir. AH ve ArOH türleri, korunan biyomolekülleri ve fenolik antioksidanları göstermektedir. Etkili fenolik antioksidanlar, biyomoleküllerin oksidasyona karşı korunması için serbest radikallerle biyomoleküllerden daha hızlı reaksiyona girmek gerekmektedir. HAT-temelli antioksidan analizlerde hem floresan prob hem de antioksidanlar ROO<sup>•</sup> ile reaksiyona girdiğinden, antioksidan aktivite, antioksidanların yokluğunda ve varlığında probun floresan çürümesi eğrisini ölçerek ve aralarındaki farkı bularak kompetisyon kinetiğinden belirlenebilmektedir. HAT-temelli reaksiyonlar solventten ve pH'dan bağımsız ve genellikle oldukça hızlı olduğundan tipik olarak saniyelerde veya dakikalarda tamamlanmaktadır [150, 507, 701-703, 713, 714].

b. SET-temelli analizler:

SET-temelli analizlerin çoğunda, antioksidan etkisi, antioksidanlar peroksil radikalleri yerine floresan veya oksitleyici ajan gibi renkli bir proba reaksiyona girerek uygun bir redoks potansiyeline sahip olan prob ile simüle edilmektedir. ET (elektron transferi) analizleri de denilen tek elektron transfer temelli analizleri ve bir antioksidanın karbonilleri, metal iyonlarını ve radikalleri azaltmak için bir elektron aktarma yeteneğini tespit etmektedir [715]. Renk değıişiminin derecesi, toplam antioksidan kapasitesinin konsantrasyonu ile ilişkilidir. Bu nedenle, spektrofotometrik SET-temelli analizleri, azaltılarak renk değııştiren bir oksidanın indirgenmesinde bir antioksidanın kapasitesini ölçmektedir. Ayrıca, elektrokimyasal ve nanoteknolojik yöntemler de SET-temelli analizlerine aittir [150]. Belirli bir dalga boyunda probun absorbansının artması veya azalması olarak renk değıişiminin derecesi, numunedeki

antioksidanların konsantrasyonu ile ilişkili olmaktadır. SET-temelli analizler, potansiyel bir antioksidanın, karboniller, metaller ve radikaller dahil olmak üzere herhangi bir bileşiği azaltmak için bir elektronu bağışlama veya aktarma yeteneğini belirlemektedir [716-718]. SET-temelli reaksiyonlar pH'dan bağımsız ve genellikle yavaş olduğundan dolayı tamamlanması için uzun bir süre gerekebilmektedir [701]. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki reaksiyon ile tanımlanabilmektedir.



Diğer bir açıklamada SET reaksiyonların HAT-temelli analizlerden daha yavaş olduğunda ve çözücü ve pH'a bağımlı olduğunda, SET antioksidan etkisinin belirtilen mekanizmalar, aşağıdaki reaksiyonlar ile özetlenebilmektedir [706].



Orada, ArOH olan ariloksi radikali daha sonra, karşılık gelen Ar=O olarak quinone'ye oksitlenmektedir. Ariloksi radikali ne kadar stabil olursa, redoks potansiyeli azaldıkça ArOH'dan Ar = O'ya oksidasyon daha kolay olmaktadır. Bu analizlerdeki antioksidan etki genellikle peroksil radikalleri yerine uygun bir floresan veya renkli prob ile simüle edilmektedir [719].

ABTS / TEAC ve DPPH dekolorizasyon analizleri iken, folin toplam fenol analizinde, FRAP'da ve CUPRAC'de antioksidan kromojenik reaktif ile reaksiyona girdiğinde önceden belirlenmiş bir dalga boyunda absorbansta bir artış olmaktadır. SET-temelli analizler, genellikle ilgili redoks reaksiyonu için sabit bir zaman belirlip bu süre boyunca oksidasyon gibi termodinamik dönüşümü ölçmektedir. Bir numunenin indirgenme kapasitesi, radikal süpürme kabiliyeti ile doğrudan ilişkili olmasa rağmen antioksidanların çok önemli bir parametresidir [150, 507, 701].

**Tablo 2.6:** AOA/TAC analizlerin sınıflandırması

<b>Analiz tipi</b>	<b>Analiz</b>
HAT-temelli	ORAC
	TRAP
	ABTS
SET-temelli	CUPRAC
	DPPH
	FRAP
	TEAC

### 2.7.1.3. Antioksidan Kapasite Ölçümü

Gıda ürünlerinin antioksidan kapasitesinin ölçülmesi antioksidan maddelerin kantitatif katkısı, oksidasyona karşı direnç veya yutulduğunda organizmanın içinde mevcut olabilecek antioksidan aktivitesi gibi çeşitli bilgiler sağlayabildiğinden dolayı artan bir ilgi konusudur [702, 720]. Antioksidan aktiviteyi ölçmenin çeşitli yöntemleri, reaksiyon mekanizmasında, hareket ettikleri hedef maddede, hangi şartlarda gerçekleştirildiklerinde ve sonuçların nasıl ifade edildiğinde farklılık göstermektedir. Bu yöntemler, beslenme, farmakoloji, fizyoloji, ve gıda bilimi gibi farklı alanlarda kullanılmakta ve sonuçların doğru yorumlanmasını sağlamak için en uygun yöntemi seçmeyi güçleştirilmektedir [721]. Antioksidan kapasitenin belirlenmesi, toplam antioksidan kapasite, çeşitli antioksidanların kombine aktivitelerine atfedildiğinden dolayı çeşitli antioksidanların toplam konsantrasyonlarının ve bileşimlerinin hesaba katılması gerekmektedir. Antioksidan ölçümü, çeşitli radikallerin etkilerini ortadan kaldırma yeteneklerini değerlendirmek için çeşitli analizlerle ölçülmektedir. Farklı laboratuvarların sonuçlarını karşılaştırmak ve sonuçları doğrulamak için standart bir analizin gerekliliği çok önemlidir. Resmi standart bir yöntem yok olduğundan dolayı her bir değerlendirmenin çeşitli oksidasyon koşulları ve farklı yöntemlerle yapılması önerilmektedir [722]. Ekstraktların, saf bileşiklerin ve vücut sıvılarının toplam antioksidan aktivitesini ölçmek için analizlerin birçok çeşidi tanıtılmıştır [723]. Her bir metot, çeşitli mekanizmalarla hareket eden farklı bir radikalın oluşumu ve sabit bir zamanda veya bir aralıkta bir dizi uç nokta ölçüsü ile ilgilidir [150, 507, 701].

Yaklaşımın iki tipi alınmıştır:

- a. Önceden hazırlanmış bir serbest radikalın hidrojen veya elektron bağıışı ile süpürme derecesinin antioksidan aktivitenin işareti olduğu inhibisyon analizleridir.
- b. Radikallerin oluşumu sırasında antioksidan sistemlerin varlığını içeren analizlerdir.

Gıdaların antioksidan kapasitesi, substratların kolloidal özellikleri, oksidasyonun durumu ve aşamaları ve farklı fazlarda antioksidanların lokalizasyonu gibi birçok faktöre bağlıdır. Bir de, bir numunenin hesaplanan antioksidan kapasitesi, ölçümde hangi teknolojinin ve serbest radikal jeneratörü veya oksidanın kullanıldığına bağlıdır. Bu nedenle, toplam antioksidan kapasitenin belirlenmesi için farklı analitik yöntemlerin karşılaştırılması, bir yöntemin seçiminde ve sonucun

anlaşılmasında önemli bir faktördür. Gıda ürünlerinin toplam antioksidan kapasitesini (TAC) değerlendirmek için çok sayıda in vitro çalışma tanımlanmıştır. Resmi standart bir yöntem olmadığından, her bir değerlendirmenin çeşitli oksidasyon koşulları ve farklı ölçüm yöntemleri ile yapılması önerilmektedir [722].

Diğerleri arasında DPPH, ABTS, FRAP ve ORAC dahil olmak üzere birçok analizler, sıklıkla antioksidan kapasitelerinin tayin edilmesi için kullanılmaktadır. Analizlerin, bunların prensipleri ve deney koşulları açısından farklılığını gösterilmektedir [150, 507, 701]. Özel antioksidanlar toplam antioksidan potansiyeline değişken katkılar göstermektedir. En yaygın kullanılan antioksidan analiz yöntemleri DPPH ve ABTS<sup>•+</sup>'dir. Her iki analiz, belirli analiz koşulları altında mükemmel tekrarlanabilirlik ile karakterize edilmektedir. Aynı zamanda antioksidanlara tepkilerinde önemli farklılıklar göstermektedirler. DPPH serbest radikal (DPPH<sup>•</sup>) özel bir hazırlık gerekli olmadan ABTS radikal katyonunun oluşturulması gerekmektedir. Yine, ABTS<sup>+</sup>, numunedeki bileşiklerin hidrofilik ve lipofilik doğasına bağlı olarak antioksidan aktivitenin ölçülebildiği sulu ve organik ortam içinde çözülebilmektedir. DPPH sadece organik ortamda, özellikle metanol veya etanolde çözülebildiğinden bu hidrofilik antioksidanların rolünü yorumlarken önemli bir sınırlamadır. Her iki radikal, birçok antioksidan ile benzer iki fazlı kinetik reaksiyonlar göstermektedir. Çoğu analizde, biyolojik numunenin radikali süpürme veya redoks aktif bileşiği azaltma kabiliyeti, trolox eşdeğer kapasite (TEAC) veya C vitamini eşdeğer antioksidan kapasite gibi antioksidan kapasitesinin niceliğini belirtilmesi için uygun bir standart uygulayarak bir spektrofotometre tarafından izlenerek ve bir sentetik renkli radikal veya redoks aktif bileşik üretilerek aynı ilke geçerlilerdir [150, 507, 701].

SET-temelli analizler, bir antioksidanın kapasitesini, bir oksidanın indirgenmesinde, azaldığında renk değiştiren ve renk değişiminin derecesi, numunenin antioksidan konsantrasyonu ile korele olan kapasitesini ölçmektedir. Diğer yaklaşımda, antioksidanlar ve substratın termal olarak üretilen peroksil radikalleri için yarıştığı ORAC testi gibi bir hidrojen atomu transferi (HAT) bulunmaktadır. HAT-temelli analizlerin çoğunluğu, antioksidanların ve substratların, azo bileşiklerinin ayrıştırılması yoluyla termal olarak üretilen peroksi radikalleri için yarıştığı bir rekabetçi şemaya dayanmaktadır [150, 507, 701].

## a. Analizler

### a.1. 2-2-Azinobis- (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) analizi

ABTS, yüksek suda çözünürlüğe ve kimyasal stabiliteye sahiptir. Bir peroksidaz substratıdır ve hidrojen peroksit varlığında oksitlendiğinde, 414 nm'de karakteristik absorpsiyon spektrumu ve yüksek molar emiciliğe sahip bir metastabil radikal üretmektedir [724]. Bununla birlikte, 645, 734 ve 815 nm dalga boylarında ikincil absorpsiyon maksimumları vardır. ABTS analizi, antioksidan aktiviteye bağlı bir zaman ölçeğinde reaksiyon ortamındaki antioksidanlar ile azaltılabilen bir mavi / yeşil ABTS<sup>•+</sup> oluşumuna dayanmaktadır. Bu ABTS radikal katyonunun renk giderme analizi, flavonoidler, hidroksisinnamatlar, karotenoidler ve plazma antioksidanları dahil olmak üzere hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir. ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikal katyonunun üretilmesi, bu spektrofotometrik antioksidan analizin temelini oluşturmaktadır. ABTS<sup>•+</sup>'nin önceden oluşturulmuş radikal mono katyonu, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksitlenmesiyle üretilmekte ve hidrojen verici antioksidanların varlığında azalmaktadır (Şekil 2.54) [150, 507, 701]. Önceden oluşturulmuş radikal katyona antioksidanların eklenmesi, antioksidan aktivitesine, antioksidanların konsantrasyonuna ve reaksiyon süresine bağlı olarak ABTS'ye bir dereceye kadar ve bir zaman zarfında azalmaktadır. ABTS<sup>•+</sup> radikal katyonunun yüzde inhibisyonu olarak dekolonizasyonun kapsamı, konsantrasyon ve zamanın bir fonksiyonu olarak belirlenmekte ve standart olarak ve aynı koşullar altında troloksun reaktivitesine göre hesaplanmaktadır. ABTS, su içinde 7 mM konsantrasyona kadar çözülür. ABTS radikal katyonu, ABTS solüsyonunun 2.45 mM potasyum persülfat ile reaksiyona girmesi ve karışımın kullanımdan önce 12-16 saat boyunca oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmesiyle üretilmektedir [150, 507, 701].

Fenolik bileşikler ve gıda ekstraktlarının araştırılması için, ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi etanol ile ve 5 mM fosfat tamponlu salin pH 7.4 ile plazma antioksidanları için 734 nm'de 0.70±0.02'lik bir absorbansa kadar seyreltilip 30°C'da dengelenmektedir. Etanol veya fosfat tamponlu salin içinde 1.0 ml seyreltilmiş ABTS<sup>•+</sup> çözeltisi ( $A_{734}=0.70\pm 0.02$ ) ile 10 antl antioksidan bileşikler veya trolox standartları (nihai konsantrasyon=0-15µM) ilavesinden sonra absorbans okuması, ilk karıştırılmadan tam olarak 1 dakika sonra ve 6 dakikaya kadar 30°C'de kaydedilmiştir. Her

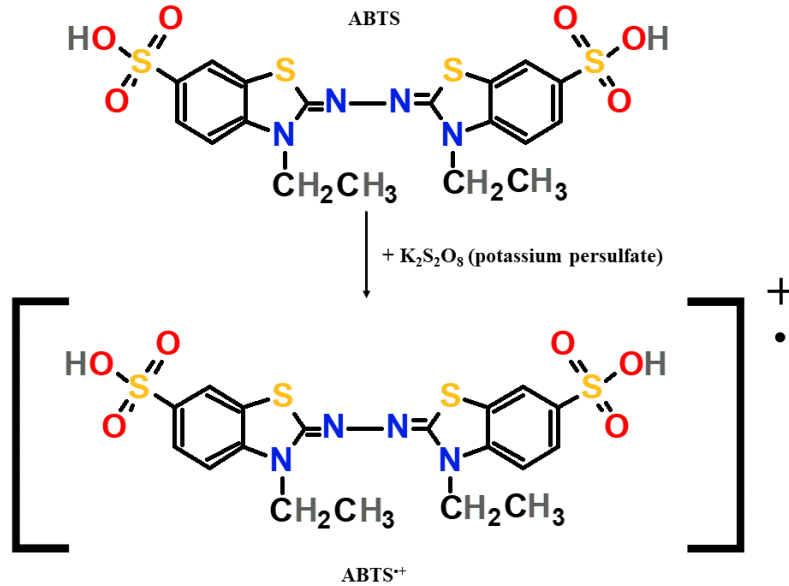


deneyde uygun çözücü boşlukları çalıştırılmaktadır. Bütün tespitler en az üç kez ve üç kez yapılmaktadır. Absorbansın azaltılması aşağıda gösterilmiş denkleme göre hesaplanmaktadır:

$$\text{İnhibisyonu (\%)} = (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=t}) / \text{Abs}_{t=0} \times 100 \quad (2.16)$$

Burada  $\text{Abs}_{t=0}$ , 0 dakikada absorbansı ve  $\text{Abs}_{t=t}$  t dakikadan sonra absorbansı ifade etmektedir. 734 nm'de absorbans inhibisyon yüzdesi hesaplanmaktadır [725]. Standart ve referans veriler için antioksidan ve trolox konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizilmektedir. Absorbansın azaltılması, bir regresyon çizgisi çizmek için numune miktarına karşı çizilmektedir. Örnek ve trolox'un regresyon çizgisi eğimi arasında olan oran hesaplanmakta ve TEAC olarak ifade edilmektedir. Sonuçlar kuru ekstrakranın miligramı başına mikromol trolox eşdeğerleri (TEAC) olarak ifade edilmektedir. Daha yüksek TEAC değerleri daha yüksek antioksidan aktiviteye karşılık gelmektedir [150, 507, 701].

ABTS uygulamalarında çok sayıda numune kısa sürede taranabilmektedir. Yine de fizyolojik olmayan radikalleri kullandıkları için sınırlıdır. Bağlı antioksidan kapasitesi, farklı gıdaların veya iki veya daha fazla kimyasal analizle ölçülen gıda bileşenlerinin antioksidan kapasitesini karşılaştırmak için entegre bir yaklaşım olarak tanımlanmıştır [726].

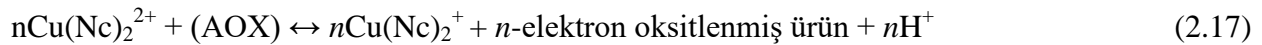


Şekil 2.54: ABTS<sup>•+</sup> radikalinin oluşumu için reaksiyon.

## a.2. Bakır(II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite (CUPRAC) analizi

CUPRAC, dünya literatürüne İstanbul Üniversitesi analitik kimya laboratuvar tarafından tanıtılan antioksidan kapasite ölçümü bir yöntemidir [727]. CUPRAC, CUPRAC reaktifi, bis (neokuproin) bakır (II) katyonu [Cu(II)-Nc] ile antioksidanların redoks reaksiyonunun bir sonucu olarak oluşan CUPRAC kromoforu Cu(I)-neocuproine (Nc) şelatının absorbands ölçümüne dayanmaktadır. Burda absorbandsın maksimum ışık absorpsiyonu dalga boyunda 450 nm olduğu kaydedilmiştir. Ayrıca bu analiz, seçici bir Cu(I) stabilize edici ligand, neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) varlığında Cu(II)-Cu(I) redüksiyonu ile ilişkili çeşitli AOA / TAC modifiye edilmiştir. Toplam antioksidan kapasitesi anaizinin CUPRAC yöntemi, gıda bitkilerinde, insan serumu ve hidroksil radikal toplayıcılarda antioksidanlara başarıyla uygulanmıştır. İnsan serum antioksidanlarının analizinde hidroksilik antioksidanlar HClO<sub>4</sub> ile proteinlerin çökeltilmesinden sonra ölçülürken,  $\alpha$ -tokoferol ve  $\beta$ -karoten gibi lipofilikler *n*-heksan ekstraksiyonu, buharlaşma ile belirlendi, ardından CUPRAC reaksiyonlarından oluşan Cu (I)-Nc yükleme-transfer kompleksi olan diklorometan içinde renk gelişimi izlenmiştir [728]. Fazların ön ayrımı yapılmadan minyatürize edilmiş bir CUPRAC yönteminde, serum numuneleri %10 toplam antioksidan kapasitesi çökteltesinden sonra santrifüj edilip CUPRAC doğrudan supernate uygulanmıştır. Esasen flavonlar ve flavonoller temel olarak polar olmayan kompleksler halinde lantan (III) ile şelatlandırılabilir [729]. Aynı zamamda antioksidan aktivite da aynı koşullar altında karmaşık olmayan veya çok zayıf hidrofilik kompleksler oluşturmamıştır. Lantan (III) kompleksleri olarak flavonoidlerin ön ekstraksiyonu ile CUPRAC reaksiyonunun yüksek bir redoks denge sabiti ile antioksidan aktivite analizi gerçekleştirilmiştir. Antioksidan aktivite,  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -tokoferol, kuersetin ve diğerler gibi lipofilik ve hidrofilik antioksidanlar, aynı solvent ortamındaki asetonit-su (9: 1, v / v) modifiye bir CUPRAC yöntemiyle eşzamanlı olarak analiz edilebilmektedir [730]. Metabisülfit, tiyo üre, glukoz, lizin ve diğerler gibi bazı suda çözünen bileşiklerin hidroksil radikal süpürücü aktivitesinin ölçülmesinde, *p*-aminobenzoat, 2,4-dimetoksi-benzoat ve 3,5-dimetil oksibenzoat problemleri hidroksil radikallerini tespit etmek için kullanılmaktadır [731]. Bu bileşiklerin  $\cdot$ OH süpürücü hız sabitleri, rekabet kinetiği ile belirlenmektedir. Polifenollerin hidroksil radikal süpürücü aktivitelerinin ölçümünde, fenolik bileşiklerin redoks döngüsünü önlemek için özel önlemler alınmıştır. Bu yeni geliştirilen yöntemde, Fenton reaksiyonu, 10 dakika sonunda hidrojen peroksiti bozmak için katalaz ilavesiyle durduruldu ve  $\cdot$ OH üretimini durdurmuş ve hidroksil radikal atak altında salisilat

sondasından oluşan dihidroksibenzoatlar CUPRAC yöntemi ile ölçülmüş ve hız sabitleri rekabet kinetikleriyle hesaplanmıştır [732]. Bir başka modifiye edilmiş CUPRAC yönteminde, süperoksit anyon radikali, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşturulmuş ve enzimin inhibisyonu, polifenollerin sisteme eklenmesiyle ölçülmüştür [733]. Polifenollerin hidrojen peroksit süpürücü (HPS) aktivitesi, HPS-CUPRAC yöntemi ile katalizör olarak Cu(II) varlığında ölçülmüştür [734]. Bir düşük yoğunluklu optik antioksidan sensör (CUPRAC sensörü) Cu(II) -Nc reaktifi perfluoro sülfonat katyon değişim polimer membran matrisi üzerine hareketsiz kılarak geliştirilmiştir [735]. Kompleks bitki matrislerinde polifenollerin seçici tayini için yeni bir on-line HPLC-CUPRAC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem, bitki özlerinde antioksidanların kromatografik ayrışmasını, bileşen analizini ve postkolümen tanımlamasını birleştirmektedir [736]. Üre tamponu içinde CUPRAC da gıdada tiyol içeren proteinlere cevap vermiştir. CUPRAC yöntemi, flavonoidler, fenolik asitler, hidroksisinnamik asitler, tiyoller, sentetik antioksidanlar ve C ve E vitaminleri için basit ve yaygın olarak uygulanan bir antioksidan kapasite analizinin geliştirilmesini betimlemektedir [737]. CUPRAC analizi için kullanılan kromojenik oksitleyici reaktif Cu(II)-Nc katyonu ve CUPRAC kromoforu Cu(I)-Nc katyonudur. Bu reaktif pH 7'de faydalı ve redoks reaksiyonu sonucu oluşan polifenoller ve C ve E vitaminleri ile oluşan Cu(I) şelatının absorpsiyonu 450 nm'de ölçülmektedir. Turuncu-sarı renk, oluşan Cu(I)-Nc yüklenme-transfer kompleksinden kaynaklanmaktadır. Serbest bırakılan protonlar, amonyum asetat ortamında tamponlanmaktadır. CUPRAC reaksiyonları, çoğu gıda / biyolojik anti-oksidan için esasen 30 dakika içinde tamamlanmaktadır. Geliştirilmiş CUPRAC yönteminin, yani Cu(II)-Nc'nin kromojenik oksitleyici reaktifi, aşağıda bulunan şekilde n-elektron indirgeyici antioksidanlarla (AOX) reaksiyona girmektedir.



Bu reaksiyonda, polifenolik antioksidanların reaktif Ar-OH grupları karşılık gelen kinonlara (Ar=O) okside edilmekte ve Cu(II)-Nc, 450 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren yüksek derecede renkli  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$  şelatına indirgenmektedir.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının konsantrasyonu CUPRAC reaktifinde Nc'nin stoikiyometrik fazlalığından fazla olmasına rağmen (denklem 2.17) tarafından temsil edilen redoks denge reaksiyonunun sağa doğru sürülmektedir. Gerçek oksidan  $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$  türüdür ve  $\text{Cu}^{2+}$  değil, çünkü Cu(II/I)-Nc'nin standart redoks potansiyeli, 0.6V,  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  çiftinden (0.17V) çok daha yüksektir [738]. Sonuç olarak, polifenoller Cu(II)-Nc ile  $\text{Cu}^{2+}$ 'dan ve renkli

ürün miktarından çok daha hızlı ve verimli bir şekilde oksitlenmektedir. Serbest bırakılan protonlar, amonyum asetat ortamında tamponlanmaktadır. Normal CUPRAC yönteminde, oksidasyon reaksiyonları esas olarak 30 dakika içinde tamamlanmaktadır. Flavonoid glikozitler, antioksidan etkilerini tam olarak sergilemek için karşılık gelen aglikonlarına asit hidrolizi gerektirmektedir [727, 728]. Yavaş reaksiyon gösteren antioksidanlar CUPRAC reaktifi ile oksidasyonunu tamamlamak için yüksek sıcaklıkta inkübasyona ihtiyaç duyabilmektedir. Çok çeşitli polifenolik ve flavonoidlerin CUPRAC antioksidan kapasiteleri deneysel olarak test edilen antioksidan bileşiğin 1 mM solüsyonunun indirgeyici eşdeğer mmol-Trolox/L biriminde ifade edilen konsantrasyonu olarak tanımlanan TEAC olarak rapor edilmiştir. Deneysel olarak, TEAC değerleri (birimsiz), her bir bileşiğin molar emiliminin, CUPRAC analizinde Trolox'a oranı olarak bulunmuştur. Analiz edilmiş antioksidanların CUPRAC metoduna göre absorban ve konsantrasyon olarak lineer kalibrasyon eğrileri, 0.1-1.1 arası faydalı absorban aralığı içinde birliğe ( $r = 0.099$ ) yakın korelasyon katsayıları vermiştir [727]. Bu sırayla epikateşin epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşin gallat, fisetin, gallat, kafeik asit, kateşin, kateşin, klorojenik asit, kuersetin, gallik asit, rosmarinik asit ve rutin için CUPRAC yöntemindeki en yüksek antioksidan kapasiteleri gözlenmiştir [150, 507, 701].

### a.3. 2,2-Difenil-1-pikirilhidrazil (DPPH) analizi

İlk olarak 1958 yılında Blois [742] tarafından bildirilen stabil kromojen radikal DPPH<sup>\*</sup>, tiyol içeren amino asit sisteinine dayanan antioksidan içeriğinin nicelleştirilmesi için kullanılmıştır. Daha sonra fenol reaktifi veya referans noktası olarak kullanılmıştır [272, 716, 739]. DPPH ile reaksiyon, radikal söndürme kinetiklerini ölçmek için uyarlanmış ve o zamandan beri, DPPH testinin çok sayıda varyasyonu, protokolleri ve reaksiyonun izlenmesi için zamanı değiştirerek ve reaksiyon stokiometrisi ile nispi antioksidan etkiyi hesaplamak için rapor edilmiştir [716, 740]. Bu, Resmi Tarım Kimyacıları Derneği tarafından yiyecek ve içecek örnekleri için resmi bir yöntem olarak kabul edilmiştir [741].

2,2-Difenil-1-picirilhidrazil (DPPH), birkaç kararlı ve ticari olarak temin edilebilen organik nitrogen radikallerinden biridir. DPPH, diğer radikallerle, indirgeyici ajanlarla veya HAT yeteneğine sahip bileşiklerle 515 nm'de renk kaybına ve elektron paramanyetik rezonans (EPR) serbest radikal sinyalinin kaybına yol açan koyu mor renkte stabil bir radikaldir [739, 742]. Normalde 30 dakikalık bir zaman periyodu boyunca antioksidan molaritesi veya mol DPPH serbest radikalleri olarak ifade edilmiş olan farklı antioksidan konsantrasyonları için 515 nm'de absorbanstaki azalma ölçülerek, reaksiyon kinetikleri geriye kalan DPPH serbest radikalının zamana karşı kararlı halde yüzdesini çizerek elde edilebilmektedir [716]. ABTS<sup>++</sup> gibi, DPPH<sup>\*</sup> daha yavaş olmasına rağmen, her iki donörleri ile reaksiyona girmektedir. Aynı zamanda radikal siteye sterik erişilebilirlik açık bir konudur [740, 743]. Hiçbir antioksidan analizlerin, popüleritesi ve yaygın kullanımı için kullanılan DPPH analizinden daha basit veya daha az maliyetli olduğu yoktur. Sadece reaktifler, bazı kuvvetler ve bir UV-vis spektrofotometre ihtiyaç duyulmakta ve bunlar en ilk laboratuvarlarda bile bulunmaktadır. DPPH kristalleri EtOH veya MeOH içerisinde çözündürülmekte, başlangıç DPPH<sup>\*</sup> absorbans kaydedilmekte, analiz antioksidantının bir kısmı eklenmekte, karışım 30 dakika inkübe edilmekte ve nihai absorbans kaydedilmektedir. Nispeten kararlı organik radikal DPPH, tek bileşiklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmıştır [744]. DPPH analizi organik ortamda çözünmüş bir radikal kullanıldığından ve morfolojik olarak DPPH<sup>\*</sup>'in 1,1-difenil-2-pikirilhidrazine indirgenmesine dayandığından hidrofobik sistemlere uygulanabilmektedir. DPPH<sup>\*</sup>, 515 nm'de karakteristik absorpsiyona sahip sabit bir serbest radikaldir ve bitki ekstraktlarının radikal süpürücü etkilerini incelemek için kullanılmaktadır. Renk değişikliği

derecesi, örnek antioksidanın temizleyici potansiyelini göstermektedir. Antioksidanlar bu radikallere protonlar bağışladıkça, absorpsiyonu azalmaktadır (Şekil 2.55) [150, 507, 701]. Absorpsiyonda olan azalma, radikal süpürme derecesinin bir ölçüsü olarak alınmaktadır. 515 nm'de daha düşük absorbans, daha yüksek DPPH süpürme aktivitesini temsil etmektedir. DPPH süpürücü aktivitenin yüzdesi, aşağıda gösterilmiş denklemlerle ifade edilmektedir:

$$\text{İnhibisyonu (\%)} = [1 - (\text{analiz örneği absorbansı} / \text{blank örneği absorbansı})] \times 100 \quad (2.18)$$

Sonuçlar, başlangıçtaki DPPH' konsantrasyonunu %50 oranında azaltmak için antioksidan konsantrasyonu açısından ihtiyaç duyulan numune miktarına karşılık gelen EC50 cinsinden ifade edilmektedir. EC50, antioksidan konsantrasyonu ve ortalama yüzde antioksidan aktivitesinin çizilmesiyle elde edilen doğrusal bir denklemden hesaplanmaktadır. Antiradikal güç (ARP) sonuçları ifade etmenin başka bir yolu ve ekstraktın ARP'si  $ARP = (1 / EC50)$  olarak hesaplanmıştır. Daha verimli antioksidan olduğunda EC50 değeri daha küçük olmaktadır [745]. Reaksiyon karışımında olan yüksek konsantrasyonda DPPH, spektrofotometre ölçümünün doğruluğunun ötesinde absorbans vermektedir. Farklı araştırma grupları tarafından yaygın olarak kullanılan protokollerin bir sonucu olarak, EC50 değerleri askorbik asit ve BHT gibi standart antioksidanlar için bile değişmektedir. Reaksiyon karışımının ışığı, oksijeni ve pH değerini, DPPH'nin absorbansını etkilemektedir [746]. Spektrofotometrik ölçümlerin doğruluk aralığı, %20-60'lık bir transmitansa eşit olan 0.221-0.698'lik bir absorbansa girmektedir [747]. Bu aralığa karşılık gelen DPPH konsantrasyonu 30 dakika boyunca sabit bulunan 25 ila 70 µm'dir. Ayrıca DPPH deneyi için uygun çözücü, polar olmayan ve polar bileşiklerin / ekstrelerin antioksidan analizi için metanol veya tamponlanmış metanoldür. DPPH radikal süpürücü aktivitesi, reaksiyon ortamının polaritesinden, radikal temizleyicinin kimyasal yapısından ve reaksiyon karışımının pH'ından etkilenmektedir [746, 748, 749]. Metanolde ve tamponlanmış metanolde askorbik asit, BHT ve propil galat olarak üç standart antioksidan EC50 değerleri rapor edilmiştir [744]. Askorbik asit ve propil galatın radikal süpürücü profilleri, çözücüler olarak metanol ve tamponlanmış metanolde benzermiştir. Bununla birlikte, askorbik asit ve propil galattan farklı olarak, BHT'nin DPPH radikal süpürücü aktivitesi, saf metanole kıyasla tamponlanmış metanolde belirgin şekilde yüksektir. Metanol ve tamponlanmış metanol içinde BHT'nin EC50 değerlerinde fark, yukarıda tarif edildiği gibi bir veya daha fazla faktöre bağlı olabilmektedir. Araştırmacılar, a-tokoferol (3.85), BHA (2.11), C vitamini (3.70), gallik



radikal söndürme gerçekleşmemektedir. DPPH' stabil bir radikal, bu nedenle yavaş antioksidan reaksiyonlar deneysel olarak tespit edilebilmektedir. Bununla birlikte, bu yavaş reaksiyonların gıda ve dokularda kısa ömürlü hidroksil ve lipid radikallerinin söndürülmesi ile ilgisi oldukça tartışılması gerekmektedir. Uzun inkübasyon sürelerinin mantığı, antioksidan ürünlerin etkilerini tespit edilirse, gerçek sistemlerde radikaller bu ürünleri karşılaşmaya yeterince uzun süre hayatta yoktur ve ürün radikallerinin kendileri tepkimeye girerek reaksiyonlarda oluştukları için söndürmek için birikir yoktur. Bu nedenle, DPPH analizinin yönelimi, HO', HOO', LO(O)' ve NO' gibi kararsız radikallerle aktif olması muhtemel olan erken süreçleri belirlemek için değiştirilmesi gerekmektedir. Bu, tercihen 4 dakikadan fazla ve 6-10 dakikadan fazla olmayan reaksiyonların kaydedilmesi anlamına gelmektedir. Kimyada yapılmış araştırma, bu hızlı reaksiyon bileşeninin mekanistik karmaşıklıklarını ve onu ölçen zorlukları tanımlamıştır. Bu nedenle, DPPH' dahil olmak üzere hızlı reaksiyonlarda en erken türleri tespit etmek için rutin olarak nabız radyoizisi ve durdurulmuş akış metodolojileri kullanılmaktadır [751, 752]. Ucuz durdurma-akışlı şırınga düzenekleri mevcuttur, bu nedenle DPPH kullanan antioksidan deneyler bu teknolojiye taşınması gerekmekte ya da en azından mikropılaka okuyucularda anlık absorbans kaydı ile otomatik düzenleme yapılması gerekmektedir [150, 507, 701].



#### a.4. Ferrik Azaltıcı Antioksidan Kapasite (FRAP) analizi

FRAP analizi, fenoliklerin, elektron verici antioksidanların etkisiyle, sarı ferrik tripitridiltriiazin kompleksini (Fe(III)-TPTZ) mavi demir kompleksine (Fe(II)-TPTZ) indirgeme yeteneğine dayanmaktadır. Elde edilen, 593 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülen mavi renk, elektron veren antioksidanların toplam indirgeme kapasitesi ile doğrusal olarak ilişkilidir. FRAP anaizi demir çözünürlüğünü korumak için pH 3.6 gibi asidik koşullara ihtiyaç duymaktadır. Bir FRAP birimi, 1 mol Fe(III)'ün Fe(II)'ye indirgenmesi olarak denklem 2.19'de tanımlanmaktadır [753, 754].



TPTZ, 2,4,6-tripiridil-S-triazin ligandını ve Fe (II) kompleksinin absorpsiyon maksimum dalga boyu ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 593 nm'de belirtmektedir [754]. Bu yöntem, hem gıda hem de biyolojik sıvı örneklerinde bir antioksidanın azaltma gücünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmıştır. Demirli indirgeyici antioksidan gücün (FRAP), ayrıca demirli iyon şelatlama kabiliyeti deneyi olarak bilinmekte, serbest radikaller içermediği için diğer analizlerden farklı olmakta, fakat ferrik demirin ( $\text{Fe}^{3+}$ ) demir demirine ( $\text{Fe}^{2+}$ ) indirgenmesi izlenmektedir. Yaygın olarak gıda sistemlerinde bulunan demir iyonu, yüksek reaktivitesi nedeniyle etkili bir pro-oksidan olarak bilinmektedir. Demirli iyon, lipid oksidasyonunun doğrudan veya dolaylı olarak başlatılmasına katılmaktadır [755]. FRAP analizi, bir maddenin oksidasyon katalitik demir iyonu ile bağlanabilme kabiliyetini belirlemek için gerçekleştirilmektedir. FRAP yöntemi, pH 3'ten daha düşük olan asidik ortamda antioksidanlar tarafından, renksiz bir ferrozine analogu,  $\text{Fe}^{3+}$  tripiridiltriiazin  $\text{Fe (TPTZ)}^{3+}$  kompleksinin, yoğun mavi renkli demir ( $\text{Fe}^{2+}$ ) kompleksi,  $\text{Fe (TPTZ)}_2^{2+}$ 'ya indirgenmesine dayanmaktadır. Bir  $\text{Fe}^{2+}$ /ferrozine kompleksi, 562 nm'de güçlü bir absorbansa sahiptir. Ferrozine,  $\text{Fe}^{2+}$  ile kantitatif olarak kompleks oluşturabilmektedir. Kompleks oluşumu, diğer kenetleme maddelerinin varlığında bozulmakta ve sonuç olarak kompleksin rengi azalmaktadır. Renk azaltma oranının bir ölçüsü, birlikte bulunan şelatörün şelatlama aktivitesinin tahmin edilmesine izin vermektedir [507]. Analiz numunesinin demir iyonu kenetleme kabiliyeti ne kadar yüksekse daha düşük absorbans vermektedir.  $\text{Fe}^{2+}$ /ferrozine kompleksinin oluşumunun inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formülü kullanarak hesaplanmaktadır:

$$\text{İnhibisyonu (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{numune}})/A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2.20)$$

Burada  $A_{control}$ ,  $Fe^{2+}$ /ferrozine kompleksinin absorbansı ve  $A_{numune}$ , test bileşiğinin absorbansıdır. Absorbans inhibisyon yüzdesi, standart referans verileri için etilen diamin tetra asetik asit konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak çizilmektedir. Sonuçlar mikromol etilen diamin tetra asetik asit eşdeğer kuru ekstrenin gramı başına olarak etilen diamin tetra asetik asit eşdeğerleri cinsinden ifade edilmektedir. FRAP analizi, sadece saf bileşiklerin değil, aynı zamanda meyve, şarap ve hayvan dokularının antioksidan kapasitesini ölçmek için hızlı ve basittir [756]. Bu analiz için referans antioksidan, skorbik asit, troloks veya ürik asit gibi suda çözünebilmesi gerekmektedir. Bu yöntem çoğunlukla diğer analizlerle konjugasyonda kullanılmaktadır. Bununla birlikte, azaltma kapasitesi mutlaka antioksidan aktiviteyi yansıtmamaktadır [150, 507, 701, 757, 758].

#### a.5. Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasite (TEAC) analizi

TEAC analizi, antioksidanların radikalleri söndürme kabiliyetini test etmek için ABTS'nin yoğun olarak renkli katyon radikallerini kullanmaktadır. TEAC analizi, gıda örneklerinde antioksidan kapasitesinin test edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. TEAC analizi, Miller ve ark. (1993) ve Re ve diğ. (1999) tarafından geliştirilmiştir. Ayrıntılı olarak Miller ve Rice-Evans tarafından bazen TEAC I olarak adlandırılan ve geliştirilen orijinal analiz,  $HO^{\bullet}$ 'yi oluşturmak için metmyoglobin- $H_2O_2$ 'yi kullanmış ve daha sonra  $ABTS^{+}$  katyon radikalini oluşturmak için ABTS ile reaksiyona girmiştir [725, 759-761]. Bununla birlikte, antioksidan etkilerin kantitatif olması antioksidanların orijinal radikal oksidan ve  $ABTS^{+}$  ile reaksiyona girebildiğinden antioksidan aktivitenin aşırı tahmin edilmesine neden olmuştur. Analiz, önce manganez dioksit ve potasyum persülfat gibi oksitleyici maddeler kullanılarak  $ABTS^{+}$ 'nin temiz bir şekilde üretilmesi, ardından antioksidanların eklenmesi ve radikal ile doğrudan reaksiyonun ölçülmesi için revize edilmiştir. Bu yaklaşımın varyasyonlarında lakkaz,  $Br_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2^+$  horseradish peroksidaz ve peroksil radikalleri de oksidan olarak kullanılmıştır. Tüm bunlardan, yüksek  $ABTS^{+}$  verimleri ve radikal/antioksidan inertliği için persülfat oksidasyonu tercih edilmektedir. Bu format (TEAC II) mevcut olan TEAC analizleri için temel oluşturmaktadır. TEAC II analizlerinin yapılması oldukça basittir. Yoğunlaştırılmış  $ABTS^{+}$ 'nin stok çözümleri üretilmekte ve birkaç ay stabil bulunmuş olarak buzdolabında saklanmaktadır [725]. Reaksiyon için, stok çözelti, su veya tamplanmış çözelti ile uygulanabilen bir absorbansa seyreltilmektedir. Örnek olarak, 734 nm'de  $A=1.0$ , 736 nm'de  $ABTS^{+}$  çözeltisinin başlangıç absorbansı kaydedilmiştir. Antioksidan

eklendikten sonra absorbanstaki düşüş, dört dakikadan birkaç saate kadar değişen reaksiyon sürelerinden sonra ölçülmektedir [150, 507, 701].

1991 yılında Re ve arkadaşları [725] tarafından önerilen geliştirilmiş bir TEAC analizi, sulu ve lipofilik sistemlerde hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir. Orijinal TEAC analiziyle karşılaştırıldığında, bu dekolorizasyon analizi, serbest radikal katyon  $ABTS^{*+}$ 'nin antioksidan ilavesinden önce ABTS ve potasyum persülfat arasındaki reaksiyon yoluyla kararlı bir biçimde önceden oluşturulduğu şekilde geliştirilmekte ve onun yerine daha çok radikal üretimi daha sürekli olarak antioksidan varlığında gerçekleştirilmektedir.  $ABTS^{*+}$  mavi renkte olmakta ve bir antioksidan ile reaksiyonundan sonra renksiz nötr formuna indirgenebilmektedir. Bu nedenle, antioksidan kapasite, farklı konsantrasyonlarda antioksidanlar için belirlenen zaman noktalarında 734 nm'de absorbans azaltma yüzdesi olarak ölçülen  $ABTS^{*+}$ 'nin renklendirilmesiyle belirlenmektedir. Antioksidan aktivite Trolox eşdeğer antioksidan aktivite olarak TEAC değeri ve nispi antioksidan aktivite olarak AUC değeri olarak iki şekilde tarif edilebilmektedir [725]. RANDOX kiti (Randox Laboratories Ltd, Ardmore, İngiltere) kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir [762].

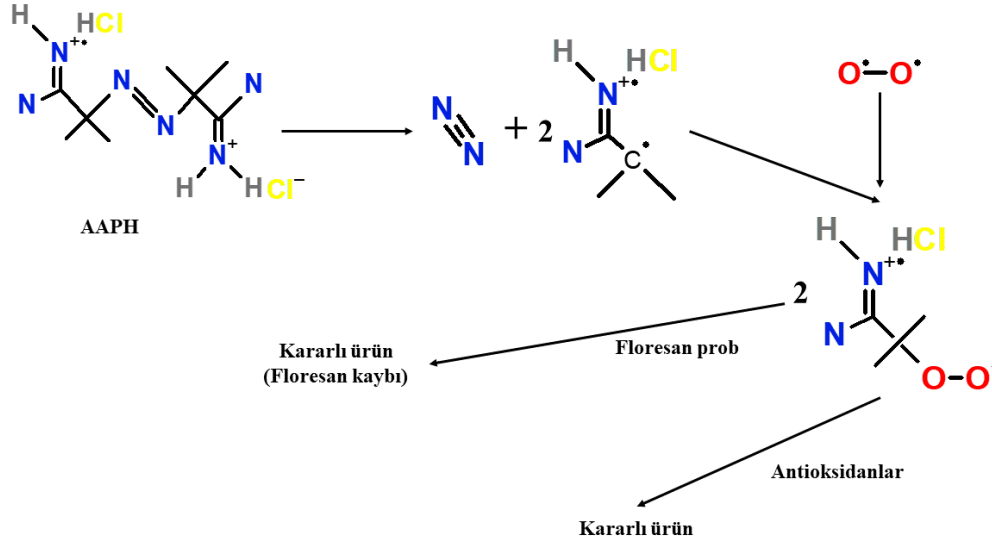
Bu analiz, antioksidan bileşiklerin Trolox olarak adlandırılan 6-hidroksi-2,-5,-7-8-tetrametilkroman-2-karboksilik asidin antioksidan gücü ile karşılaştırıldığında radikalleri süpürmek için antioksidanların nispi kabiliyetlerini ölçmektedir [762]. Trolox, a-tokoferolün suda çözünen bir türevi ve yaygın olarak bir referans serbest radikal toplayıcı olarak kullanılmaktadır [760, 763]. Kavram olarak, uygulamada denklem (2.21), TEAC'ın çeşitli şekillerde hesaplanmış olması, laboratuvarlar arasında verilerin karşılaştırılmasında problem oluşturmaktadır.

$$TEAC \text{ değeri} = \frac{\text{Test bileşikleri tarafından inhibisyon}}{\text{Trolox tarafından inhibisyon}} \quad (2.21)$$

Uygulamada, TEAC değeri birimsiz ve çeşitli şekillerde hesaplandığından dolayı laboratuvarlar arasında verilerin karşılaştırılmasında sorunlara yol açmaktadır.

#### a.6. Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) analizi

ORAC analizi, Glazer'in, Ghiselli ve arkadaşlarının ve Cao ve arkadaşlarının çalışmalarına dayanmaktadır [764-766]. ORAC biyolojik örnekler için en uygun yöntem olarak bulunmuştur. ORAC peroksil radikallerinin absorbans kapasitesi ölçmektedir [766, 767]. ORAC analizi, toplam inhibisyon zamanını ve antioksidan tarafından serbest radikal hasarının yüzdesini tek bir niceliğe birleştiren tek sistemdir [766, 768]. Bu analiz, serbest radikal bir saldırının neden olduğu bir flüoresan molekülünde kimyasal değişimin saptanmasına dayanmaktadır. 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorürün (AAPH) termal ayrışmasıyla oluşan peroksil radikallerine karşı antioksidan süpürme aktivitesini ölçmektedir (Şekil 2.56) [150, 507, 701]. AAPH bir standart olarak bir floresan prob ve trolox olarak bir peroksil radikal jeneratör, floresein olarak kullanılmaktadır [702, 703, 766]. Floresein'in floresans kaybı, peroksil radikalleri ile reaksiyonundan kaynaklanan hasarın boyutunun bir göstergesidir. [766]. ORAC analizi, floresan filtreleri olan çok etiketli bir sayaçta gerçekleştirilmektedir. Başlangıçta 1993 yılında Cao ve arkadaşları [766] tarafından geliştirilen analiz, bir peroksil radikalleri (ROO) kaynaklı oksidatif hasara uğradığında, konformasyonun kaybı sonucu bir proteinin floresansındaki azalmayı ölçmekten ibarettir. Analiz, numunede bulunan antioksidanların oksidatif hasardan proteini koruma becerisini ölçmektedir. Bir antioksidanın koruyucu etkisi, floresansın bozulma eğrisi altındaki alanın değerlendirilmesiyle ölçülmekte ve antioksidan aktivite, gıda veya biyolojik numunelerin kuru ağırlığının her bir gramındaki mikromol trolox eşdeğerleri cinsinden ifade edilmektedir [769]. ORAC son derece hassastır. Numunelerin interferansı önlemek için, analizden önce uygun bir şekilde seyreltilmesi gerekmektedir [764-766].



**Şekil 2.56:** ORAC analizi sırasında AAPH radikalinin ve antioksidanın reaksiyonları.

Temel deney, yeterli oksijen varlığında ısıtıldığında peroksil radikalleri üretmek için AAPH [2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklörür] gibi bir bis azid başlatıcı kullanılmaktadır [766, 770]. Peroksil radikalleri daha sonra flüoresanını gidermek için bir floresan prob ile reaksiyona girmektedir. Flüoresanstaki azalma optik olarak takip edilir ve antioksidan aktivitesi, antioksidan varlığında floresan kaybının yavaşlatılmasıyla belirlenmektedir. Analizler küvetlerde tek örneklerle el ile yapılabilmekte veya mikropalakalarda otomatikleştirilebilmektedir. Fluoresein şu anda tercih edilen floresan prob, çünkü ORAC'ın ilk versiyonunda kullanılan  $\beta$ -fikoeritrin'den daha kararlı ve daha az reaktiftir. Yani orijinal ORAC analizi, radikal hedef olarak floresan protein  $\beta$ -fikoeritrin kullanılarak geliştirilmiştir. Bununla birlikte, fluoresein pH'ya duyarlı ve bu dikkatle izlenmesi gerekmektedir [761, 771, 772]. ORAC analizi sadece meyve ve sebzelerin, besin takviyelerinin, şarapların, meyve sularının ve nutrasötiklerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinde değil, aynı zamanda plazma veya serum örneklerinde de kullanılmıştır [764-766, 772].

Analiz, bir Cobas Fara II santrifüj analizörü ile otomatikleştirilmiş ve çay ve meyveler, yulaf özüleri ve sebzelerin antioksidan kapasitesini ölçmek için uygulanmıştır [773-775]. Daha sonra, reaktif tutarsızlığı, ışık duyarlılığı ve polifenollerin bağlanması ile ilgili sorunlar nedeniyle,  $\beta$ -fikoeritrin yerine fluoresein konulmuştur [767]. Radikal-söndürme etkileri, probun aktif çürümesinden önce azalan gecikme sürelerinde, azalan azalma oranlarında veya her ikisinde de

yansmaktadır. Analitik bir araç olarak gecikme süreleri her zaman mevcut olmadıkları için problemlidir, doğru bir şekilde tespit etmek zor ve ilk reaksiyon noktasını belirlemek için birçok farklı yöntem, verileri karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve ikincil antioksidan ürünlerin potansiyel etkileri, redoks döngüsü ve yavaş antioksidan reaksiyonlar gibi örnek olarak alınan oksidasyonun erken aşamalarının ötesine geçen etkileri tam olarak açıklamak için ORAC analizi, floresan bozunuma eğrileri altında net entegre alanların karşılaştırmalarıyla gecikme sürelerinin yerini almaktadır. Analiz numunelerinin AUC'leri, bir dizi Trolox konsantrasyonu üzerinde belirlenen AUC'lerden hazırlanan bir standart eğri ile karşılaştırılarak suda çözünebilir bir tokoferol eşdeğeri olarak Trolox'a karşılık gelmektedir. Alternatif olarak, numunenin Trolox eşdeğerleri aşağıdaki ilişkiyi kullanarak AUC'lerden hesaplanabilmektedir [767]:

$$ORAC \left( \frac{U}{mL} \right) = \left( \frac{AUC_{numune} - AUC_{blank}}{AUC_{Trolox} - AUC_{blank}} \right) * \frac{M_{Trolox}}{M_{numune}} \quad (2.22)$$

Burada M (mol/L)'de molar konsantrasyon (molarite) ve sırayla  $AUC_{numune}$ ,  $AUC_{blank}$  ve  $AUC_{Trolox}$  numunenin, blank çözeltinin ve Trolox'un değerleri için eğri altındaki alandır

Molarite bilinmediğinde

$$ORAC \left( \frac{U}{mL} \right) = \left( \frac{AUC_{numune} - AUC_{blank}}{AUC_{Trolox} - AUC_{blank}} \right) * 50_{(Seyreltme)} \quad (2.23)$$

ROO\* reaksiyonlarını tespit eden orijinal versiyona ek olarak, ORAC deneyleri başlatıcıları modifiye ederek OH ve diğer radikallerin tespiti için ve lipofilik antioksidanların tespiti ile bu bileşikler rastgele metillenmiş  $\beta$ -siklodekstrin kapsüllemek suretiyle modifiye edilmiştir [150, 507, 701]. Plaka okuyucular kullanan yüksek verimli deneyler, örneğin, Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı tarafından derlenen faaliyetlerin bir veri tabanının temeli için, geniş bir yelpazedeki plazma, biyolojik materyaller ve gıdalara uygulanmıştır. ORAC analizlerinin tüm versiyonları Brunswick Labs tarafından ticarileştirilmiştir [150, 507, 701].

#### a.7. Toplam Radikal Yakalama Antioksidan Parametresi (TRAP) analizi

Wayner ve arkadaşlarının orijinal çalışmalarına dayanarak, TRAP analizi, peroksil radikalleri ve bir hedef prob arasında olan reaksiyonu engellemek için antioksidan yeteneğini ölçmektedir [776-778]. TRAP analizi, başlangıçta insan plazmasının toplam antioksidan durumunu ölçmek için kullanılmıştır. TRAP analizi prensip olarak ORAC analizlerinin varyantları, fakat daha geniş bir inisiyator, prob ve son nokta ölçümleri aralığı kullanmaktadır. Radikallerin başlatılması, AAPH {ABAP veya [2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür]}, yabancurpu peroksidaz gibi enzimler ya da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-hemin, NO<sup>\*</sup> veya tekli oksijen gibi azidler tarafından selektif olarak üretilmiştir. TRAP analizi için kullanılan sondalar arasında diklorofluoresase diasetat, fikoeritrin, floresein, luminol ve ABTS bulunmaktadır [765, 778-784].

Bu analiz, plazmanın bir peroksil radikalleri akışını sabit bir oranda yakalayabilme yeteneğine dayanmaktadır. Peroksil radikalleri, 37°C'de sulu tamponlanmış çözeltide AAPH'ın termal ayrışmasıyla kontrollü bir hızda üretilmektedir [2]. TRAP analizi, bir flüoresan prob olarak R-fikoeritrin kullanmakta ve R-fikoeritrin'in floresan yoğunluğu, peroksil radikallerinin akışı altında zamanla azalmaktadır. Antioksidanlar içeren test edilmiş bir numunenin varlığında, R-fikoeritrin floresansının bozunması geciktirilmektedir. Reaksiyon ilerlemesi fluorometrik olarak izlenmektedir ( $\lambda_{\text{eksitasyon}}= 495 \text{ nm}$  ve  $\lambda_{\text{emisyon}}=575 \text{ nm}$ ) [2, 753, 785]. Bu, Trolox'unkiyle karşılaştırılır ve daha sonra, plazmanın antioksidan kapasitesi ile niceliksel olarak ilişkilidir. Ayrıca TRAP analizi, kırmızı şarap ve yeşil çay gibi içeceklerin ve gıdaların antioksidan aktivitesini değerlendirmek için in vitro olarak kullanılmıştır [2]. Özet olarak, ORAC ve TRAP analizleri, peroksil radikallerine karşı hem hidrofilik hem de lipofilik zincir kırma antioksidan kapasitesi için uygulanabilmektedir. ORAC analizi kinetik eğri altındaki alanı (AUC) belirerek, TRAP ise gecikme süresine dayanarak bu iki analiz arasındaki en önemli fark, nicel yaklaşımlardır. AUC yaklaşımının avantajı, farklı gecikme fazı ve gecikme fazı sergilemeyen ve antioksidanlar için eşit derecede iyi uygulanılmaktadır. Ayrıca farklı moleküler problemler kullanılmaktadır. TRAP analizi R-fikoeritrin ve ORAC analizi floresein kullanılmakta ama her iki yöntem de AAPH'yi radikal başlatıcı olarak kullanılmaktadır [150, 507, 701].

## b. Analiz yöntemlerinin kıyaslaması

DPPH için oksijen radikalleri ile antioksidan reaksiyonlarını modellemek için nitrojen merkezli radikal kullanmanın sınırlamalarının kabul edilmesi gerekmektedir. Buna göre, DPPH ile antioksidan reaksiyonun kinetik ve spesivitesinin, diğer antioksidan analizlerden elde edilen sonuçlarla eşleşmesinin beklenilmesi gerekmemektedir. Bu antioksidanların reaksiyonu doğal kimyasal özelliklerden ziyade sterik etkiler tarafından çok güçlü bir şekilde etkilenmekte ve bazı durumlarda kontrol edilmektedir. Küçük reaktif bileşiklere tercih edildiğinden ve büyük molekülü antioksidanlar küçümsendiğinden dolayı bu analizi ekstraktların antioksidan aktivitesini taramak için kabul edilmesi, farklı yapısal sınıfların antioksidanlarını karşılaştırılması veya bilinmeyen kompozisyona ve ve konsantrasyona sahip olan ekstraktlarını karşılaştırılması mümkün değildir. Bu dezavantajları kabul etmekle birlikte, DPPH ile fenollerin ve diğer moleküllerin reaksiyonları üzerinde çok büyük bir temel kimyasal araştırma vardır. Bu, reaksiyon ürünlerini ve ölçüm oranlarını ve reaksiyonun yapının bir fonksiyonu olarak kapsamını tanımlar. Şablonlar olarak bu çalışmalar ile, DPPH reaksiyonları ekran antiradikal aktivite yerine antioksidan kimyasalı açıklamak için yeniden yönlendirme eğer hala çok yararlı bir araştırma aracı sağlayabilmektedir. 30 dakika veya daha uzun süre inkübasyondan önce ve sonra kör kör kayıt absorbansı uygulamaları, kimyada hali hazırda kurulmuş prosedürler izlenerek kinetik ve ürün analizleriyle değiştirilmesi gerekmektedir. Reaksiyonlar optik veya elektron paramanyetik rezonans analizleri kullanılarak karıştırma noktasından sürekli olarak izlenmeli ve çok yavaş reaktörler hariç, ilk 30 saniyede kinetikler hesaplanması gerekmektedir. Burada 1 veya 5 dakika uç noktaları duyarlılık için yerleştirilebilmektedir. Uzun süreli inkübasyonlar, ilk hızlı reaksiyonları görmezden gelmekte ve yavaş reaksiyonlara gereksiz ağırlık verir, bu nedenle terk edilmesi gerekmektedir. DPPH'yi numuneye dahil etmek için doğru olan ve tekrarlanabilen otodispenserli plaka okuyucuları, manuel numune transferi ile sağlanabilecek olandan çok daha erken olan ilk veri noktasını yaklaşık 0.2 saniye içinde toplayabilmektedir. Böylece, bu test için plaka okuyucuların kullanılması teşvik edilmesi gerekmektedir. Ek olarak, erken reaksiyonu daha doğru ölçmek için durdurulan teknikler kullanılarak standartlaştırılmış analizlerin geliştirilmesine dikkat edilmesi gerektir. DPPH reaksiyonları, maksimum konsantrasyonun DPPH konsantrasyonunu büyük ölçüde aşmadığı üç büyüklük derecesini 1 mM ila 1 $\mu$ M başlangıç çözeltileri gibi kapsayan bir dizi antioksidan konsantrasyon kullanılarak yürütülmesi gerekmektedir. DPPH'ye göre 10-100 kat fazla antioksidan kullanılarak belirlenen reaktivite,



özellikle bilhassa büyük moleküllerin ve bilinmeyen bileşimin özütlerinin analiz edilmesi durumunda oldukça tartışılması gerekmektedir. DPPH reaksiyonları, en az MeOH ve MeOH: H<sub>2</sub>O'da (1:1, v/v) çoklu çözücülerde test edilmesi gerekmektedir. Su fazının çeşitli yüksek saflıkta su olduğu yerlerde, su, Ultrex HCl veya eşdeğeri ile pH 5'e asitlendirilmiş ve Ultrex NaOH ile pH 9'a yükseltilmiştir. Bu çözücüler, SET ve HAT mekanizmaları arasında ilk ayırım sağlamaktadır. Her antioksidan oksijen etkileri açısından değerlendirilmesi gerekmektedir. Oksijen, ajanları ve reaktif ara maddeleri indirgemek için tepkimeye sokarak reaksiyon akışından uzaklaştırmaktadır. Örnek olarak, DPPH ile antioksidan aktevesi reaksiyonu daha az oto-oksiasyona uğradığından dolayı solüsyonlar nitrogen veya argon ile doyurulduğunda daha hızlı olmaktadır. Kimyada olan DPPH reaksiyonlarının kinetik çalışmaları, nitogen veya argon altında gerçekleştirilmektedir. Bu, yan reaksiyonları önlemek için antioksidan analizler ile de standart uygulama haline gelmesi gerekmektedir. DPPH<sup>\*</sup> indirgeme ürünü DPPH<sub>2</sub>, bir proton verici ve hidrojen bağlayıcıdır. Böylece birçok fenolün HAT reaksiyonlarını inhibe etmekte ve görünür reaktivitelerini azaltmaktadır. DPPH analizinde bu etkinin rutin belirlenmesi için bir yöntem geliştirilmesi gerekmektedir. Tüm radikal reaksiyonlar eser metaller ve adventif kontaminantlardan etkilendiği için, tüm antioksidan analizler yüksek saflıkta damıtılmış, 18 MΩ rezistivitenin deiyonize su içinde yürütülmesi gerekmektedir. Buna ek olarak, bu deneylerden önce metalleri ve diğer kirlenici maddeleri temizlemek için cam yıkaması için standartlar oluşturulması gerekmektedir. Toplam fenoller ve tam kompozisyon analizi, antioksidan aktivite için test edilen tüm doğal ekstreler için standart gerekli uygulama haline gelmesi gerekmektedir. Bu bilgi, sinerjistik ve antagonistik etkileşimleri açıklamak ve fenol reaktivitesinin reaksiyon ortamı ile nasıl değişebileceğini anlamak için spesifik bileşiklerle aktivitenin korelasyonu için bir baz oluşturmak için kullanılabilir [150, 507, 701].

Genel olarak, TEAC analizleri, geniş bir aralıktaki malzemelerin antioksidan aktivitelerini taramada yaygın popülarlığına katkıda bulunacak birçok avantaj sunmaktadır. TEAC operasyonel olarak basit olmakta, reaksiyonlar hızlı olmakta ve geniş bir pH aralığında çalışmaktadır. Tek başına pozitif yüklü katyonik radikal olan ABTS<sup>\*+</sup>, hem sulu hem de organik çözücüler içinde çözünmekte ve iyonik güçten etkilenmeyebildiğinden hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitesini belirlemek için çoklu ortamlarda kullanılmıştır. Reaksiyonlar otomatikleştirilebilmekte, mikropalakalara ve akış-enjeksiyon ve durdurma-akış yöntemlerine uyarlanabilmektedir. Bununla birlikte, TEAC'ın bazı önemli dezavantajları da vardır. ABTS<sup>\*+</sup>'nin

734 nm'de  $1.50 \times 10^4$  L/mol.cm gibi yüksek sönme katsayısı, doğru olarak yaklaşık 1.5-70  $\mu$ M nihai konsantrasyonlara kadar analiz edilebilen yararlı antioksidan konsantrasyon aralığını sınırlamaktadır. Bu aralık dışında olan antioksidan konsantrasyonları, doğru optik ölçümler için çok fazla veya çok az ABTS<sup>•+</sup> gerektirmektedir. Ek olarak, ORAC deneylerinde olduğu gibi, birçok reaksiyon faktörü laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilecek tekrarlanabilen reaksiyonlar için ABTS<sup>•+</sup> jenerasyonu için kullanılan oksitleyici ajanı, ABTS<sup>•+</sup>'nin dönüşümünün pH'ı ve zamanını, Tampon ve pH kontrol ajanlarını, ABTS<sup>•+</sup> izleme dalgaboyunu, ABTS<sup>•+</sup> çözümünün yaşını, depolama koşullarını, ABTS<sup>•+</sup> ve antioksidan konsantrasyonlarını, analiz sıcaklığını, ABTS<sup>•+</sup> ve antioksidan arasındaki reaksiyon süresini, solvent fazı ve faz dengelerini, antioksidan aktivite veya diğer güçlü indirgeyici ajanlar mevcut olduğunda oksijen konsantrasyonlarını ve hesaplama yöntemini dikkatli bir şekilde kontrol edilmesi gerekmektedir. Bütün meseleler standardizasyon için önemli olsa da bu değerlendirme sadece analizin geçerliliğini etkileyen ABTS<sup>•+</sup> konuları, reaksiyon izleme ve zamanlama, moleküler boyut ve sterik erişilebilirlik ve hesaplama / raporlama yöntemlerine odaklanacaktır [150, 507, 701].

TEAC analizi birçok şekilde yaygın olarak kullanılmasına rağmen, kullanışlılığı ve doğruluğu sorgulanmaktadır. TEAC'ın farklı fenol sınıflarının ve karışık antioksidanlarla ekstraktlarının nispi antioksidan aktivitesini ölçmek için rutin bir test olarak kullanılmasını tavsiye edilmektedir. Ayrıca ABTS<sup>•+</sup> ile reaktivite, öncelikle ve en önemlisi, test edilecek antioksidanların kimyasal özelliklerinden ziyade fenolik-OH gruplarının ABTS<sup>•+</sup> radikal bölgesine sterik erişilebilirliği ile kontrol edildiğinden dolayı, ABTS<sup>•+</sup> reaksiyonlar karmaşık ve antioksidan mekanizma açısından yorumlanması zor olduğundan, halen gerçekleştirildiği gibi, deney stokiyometri rapor edilebilmesine rağmen gerçek yaşam uygulamalarında kontrol faktörü olan reaksiyon oranlarındaki farklılıkları ayırt edilmesi mümkün olmadığından, analiz, yapı-aktivite ilişkileri olarak SAR'ların konstrüksiyonu için veya yukarıda listelenen tüm nedenlerden dolayı yapısal sınıflar dahilinde bile antioksidanların doğru sıralanması için kullanılması mümkün olmadığından dolayı, spesifik olmayan yan reaksiyonlar yaygın olduğundan, ABTS<sup>•+</sup>'daki N<sup>•</sup>'nin kimyası, gıdalarda veya biyolojik dokularda radikal reaksiyonları doğru olarak modellemediğinden dolayı, proteinler ve glutatyon dahil olmak üzere in vivo antioksidan etkisine güçlü katkıda bulunan bileşikler ve ABTS<sup>•+</sup> ile zayıf ya da hiç tepki göstermediğinden dolayı in vivo koruyucu etkileri öngörmektedir [150, 507, 701].

ORAC için reaksiyonun odak kayması taramasından antioksidan reaksiyonunun karakteristiklerinin açıklamasına geçmektedir. Floresein'i floresan söndürme, yan tepkiler ve ara hareketlere duyarlı olmayan bir hedefle değiştirmektedir. Ekstraktlar artı floresein ile boşluklar (blank çözümler) ve floresein için eksitasyon / emisyon spektrumları, özütleme ve etkileşimli etkileşimleri tanımlamak için iki ekstrakt konsantrasyonu kombinasyonları gerektirmektedir. Hız sabitleri geliştirmek, aktivite için eşik de dahil olmak üzere reaktivitenin konsantrasyon bağımlılığını belirlemek ve potansiyel prooksidant konsantrasyon aralıklarını belirlemek için antioksidan konsantrasyonlarının tamamını ölçmektedir [150, 507, 701].

ORAC reaksiyonları sırasında sıcaklığı izlenmesi ve doğru kontrol edilmesi için kılavuzlar geliştirilmesi gerekmektedir. Antioksidan aktivite analizlerinde plaka okuyucu performansı için standartlar geliştirilmesi, bu standartları resmi protokollere dahil edilmesi ve üreticilerin enstrümantasyonunu uygun şekilde yeniden tasarlamaya zorlamak için sertifikalandırma yapılması gerekmektedir. AUC hesaplamaları için bir program geliştirilmesi ve tüm kullanıcılar için uluslararası olarak kullanılabilen hale getirilmesi gerekmektedir. Alternatif olarak, Excel gibi yaygın olarak bulunan bilgisayar programlarını kullanarak AUC hesaplamaları için adım adım yönergeler geliştirilmesi ve standart protokollere dahil edilmesi gerekmektedir. Sonuçları ifade ederken kullanılacak örneğin kuru ve ıslak ağırlık gibi formu ve büyüklüğü için zorunlu birimleri ve tabanları oluşturulması gerekmektedir. ORAC ile karşılaştırmak için aktivite profillerini geliştirmeye başlamak için en az toplam fenol içeriği gibi tüm ekstraların bileşimsel analizi edilmesi gerekmektedir. Fenolik olmayan bileşiklerin ekstraların antioksidan aktivitesine katkılarını belirtirilmesi için polivinilpirrolidon ile fenollerin bağlanmasından önce ve sonra doğal ürün ekstralarının ORAC analizlerini gerçekleştirilmesi gerekmektedir [150, 507, 701].

#### ***2.7.1.4. Folin-Ciocateu Reaktifi (FCR analizi) ile toplam fenol analizi***

FCR analizi, alkali ortamda elektronların, fenolik bileşiklerden fosfomolibdik ve fosfotungstik asitlere transferine (molibdungastofosfat heteropolyanyon reaktifi ile oksidasyonuna) dayanmaktadır. Oksidasyondan sonra yeşil-mavi bir kompleks oluşmakta ve 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Fenoliklerle spesifik bir etkileşimden dolayı, bu yöntem ayrıca toplam fenolik içerik tahmini için de sıklıkla kullanılmaktadır. Gallik asit standart olarak kullanılırsa toplam fenolik içerik gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmektedir. FRC analizi, bitkisel ekstraktların antioksidan kapasitesinin genel bir tayin aracıdır [150].

#### ***2.7.1.5. Alüminyum klorür kolorimetrik ( $AlCl_3$ analizi) ile toplam flavonoid analizi***

Alüminyum klorür kolorimetrik yöntemin prensibi, alüminyum klorürün C-4 keto grubuyla ve flavonların ve flavonollerin C-3 veya C-5 hidroksil grubuyla asit kararlı kompleksler oluşturmasıdır. Ek olarak, alüminyum klorür flavonoidlerin A veya B halkasında orto hidroksil gruplarıyla asit kararsız kompleksler oluşturmaktadır. Flavonoid içeren bitki ekstraktları, 415 nm'de spektrofotometrik olarak okunan sarı bir renk oluşturmak için alüminyum klorür ile reaksiyona girmektedir [786].

## 2.7.2. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, moleküllerin yapılarında farklılıklara dayanarak moleküllerin ayrılmasını inceleyen bir bilimdir. Kromatografide, bir bileşik kompleksi, bu destekle farklı etkileşimlere göre sabit bir destek üzerinde ayrılmaktadır. Yani, desteği ile daha güçlü veya daha zayıf olarak bu farklı etkileşimlere göre, bu kompleks hızla ya da daha çabuk hareket etmektedir. Bu şekilde, kimyasal olarak benzer moleküller bile birbirinden ayrılabilir. Kromatografik ayrımlar, kağıt kromatografisi (PC), ince tabaka kromatografisi (TLC), gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) olarak çeşitli türlere sahiptir. [787-789].

### 2.7.2.1. Türleri

#### a. Kağıt kromatografisi (PC)

Kağıt kromatografisi (PC) en yaygın kromatografi tiplerinden biridir. Kılcal etki, çözücülerini kağıdın içinden çekip çözücülerini ayırmak için kullanılmaktadır. Kağıt kromatografisi, esas olarak, pigmentler gibi renklendirilebilen karışımları ayırmak ve tanımlamak için bir analitik tekniktir. Numune karışımında bulunan farklı bileşikler, çözücüde çözünürlüklerinde farklılıklara ve kağıdın liflerine çekilmesinde farklılıklara göre farklı oranlarda hareket etmektedir. Numune karışımında bulunan farklı bileşikler, bunların çözücü içinde çözünürlüklerinde farklılıklara ve bunların kağıdın liflerine çekilmesinde farklılıklara göre farklı oranlarda hareket etmektedir. Kağıt kromatografisi, geliştirme için birkaç dakikadan birkaç saate kadar sürmektedir. Kağıt ile reaksiyona giren veya bağlanan herhangi bir maddenin bu teknik kullanılarak ölçülmesi mümkün değildir. Gelişmeden sonra, farklı bileşiklere karşılık gelen lekeler, renklerine göre, UV ışığı altına koyarak veya iyot buharları ile işlenerek tabii tutulmaktadır. Deneyden sonra kalan kağıt, bir kromatogram olarak bilinmektedir. Alıkonma faktörü ( $R_f$ ) belirli bir bileşiğin belirli bir çözücüde ne kadar ilerlediğinin niceliksel bir göstergesidir.  $R_f = D_1/D_2$  olarak tanımlanmaktadır. Burada,  $D_1$ , çözünenin hareket ettiği mesafe ve  $D_2$  çözücü önünün kat ettiği mesafedir.

Ayrılan bileşenler kendi  $R_f$  'lerinde farklı olmaktadır. Bulunan  $R_f$  değerleri bilinen değerlerle karşılaştırılabilir ve bu sonuçlardan çıkarılabilir. Kağıt kromatografisindeki orijinal çalışma esas olarak Whatman birinci filtre kağıdında gerçekleştirilmiştir. Kağıt kromatografisi hareketli fazın kılcal kuvvetler ile hareketi olarak prosedürün yavaş ayırma

süresinin nedeniyle, kağıt kromatografisinin kullanımı, büyük ölçüde kağıt kromatografisi yerini alan ince tabakalı kromatografinin yükselmesiyle azalmıştır. Bununla birlikte, hala güçlü bir öğretim aracıdır [789-791].

#### b. İnce tabaka kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), esasen cam veya alümina plakaları üzerinde, sabit faz olan ince bir yüzey katmanı tatbik etme kromatografik tekniğidir. Bu polar ince tabakalı hücre ve karışımın bileşenlerinin ve mobil faz olarak kullanılan çözücünün polariteleri, analiz altındaki bileşiğin ne kadar hızlı hareket ettiğini belirleyen faktörlerdir. Bu tip kromatografi ayrıca, kağıt kromatografisi gibi, çözücüyü sabit fazdan hareket ettirmek için kılcal hareket gibi kullanılmaktadır. Alıkonma faktörü ( $R_f$ ), kağıt kromatografisindeki gibi ince tabaka kromatografisinde aynı önemli rolü oynamaktadır. İnce tabaka kromatografisi, organik ve farmasötik laboratuvarlarda kısa bir süre sonra standart analitik kromatografik yöntem haline gelmiş ve basitliği ve yüksek hızı nedeniyle diğer yöntemlerle tamamen yer değiştirmemiştir [789].

#### c. Kolon kromatografisi (CC)

Kolon kromatografisi (CC), bir karışımın bileşenlerini ayırmak ve saflaştırmak için kullanılmaktadır. Sabit faz, dikey bir cam kolon içine yerleştirilmiş bir toz adsorbenttir. Analiz edilecek karışım bu sütunun üstüne yüklenmektedir. Hareketli faz, yüklenen sütunun üstüne dökülen bir çözücüdür. Çözücü kolondan aşağı akması karışımın bileşenlerinin toz adsorbant ve çözücü arasında dağılmasına neden olmaktadır. Böylelikle, karışımın bileşenleri, çözücünün kolonun dibinden dışarı akacak şekilde ayrılmasıyla, bazı bileşenler, erken fraksiyonlar ve geç fraksiyonlar ile elüt edilen diğer bileşenler ile ayrılmaktadır. Kolon kromatografisi sıklıkla mikrogramlardan kilograma kadar olan ölçeklerde preparatif uygulamalar için kullanılmaktadır. Klasik preparatif kromatografi kolonu, 10 ila 100 mm çapa ve 10 cm ila 1 m yüksekliğe sahip bir cam tüpdür. Burada bir bulamaç elüent ve sabit fazlı tozdan hazırlandıktan sonra sütuna dökülmektedir. Elüsyon maddesi organik materyali ilerletmek için kolondan yavaşça geçirilmektedir. Tek bileşenler sabit faz tarafından farklı şekilde tutulur ve bir dizi fraksiyonda elüent ile kolondan birbirinden ayrılmaktadır. Sabit fazlar genellikle ince öğütülmüş tozlar veya jellerdir ve / veya arttırılmış bir yüzey için mikro gözeneklidir. Hareketli faz veya elüan ya saf

bir çözücü ya da farklı olanların bir karışımıdır. Farklı bileşiklerin etkili bir şekilde ayrılabilmesi için seçilmektedir. Elüent, aynı sabit faz ile ince tabaka kromatografisi kullanılarak küçük bir ölçekte optimize edilmiştir. Son yıllarda yeni kromatografik kolonlar tanıtılıp biyoteknoloji olarak kullanılmıştır. Bunlar daha yüksek basınçlarda ( $> 15$  psi) yüksek akış oranlarına izin verecek şekilde tasarlanmıştır. Paslanmaz çelik, yüksek yoğunluklu cam veya akrilik bileşenlerin özel kolonları, daha önce kullanılan standart cam veya plastik kolonların yerini almıştır. Yeni kolon tasarımları, yüzlerce ila binlerce psi gibi yüksek basınçları idare edebilen çelik kolonlar ve kromatografik ortamların geliştirilmesiyle mümkün kılan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yeni kromatografi türlerinin geliştirilmesine izin vermiştir [789, 790, 792, 793].

#### ç. Gaz kromatografisi (GC)

Gaz kromatografisi (GC), durağan faz, ince uzun cam veya metal bir kolon içine olan yüksek kaynama noktalı mumsu veya viskoz yağ gibi bir madde ile doldurulmuş bir kromatografi türüdür. Analiz edilecek karışım bu sütunda şırınga ile yüklenmektedir. Hareketli faz, karışım bileşenlerinin sabit yüksek kaynama noktalı sıvı arasında dağıtıldığı ve kolon içinden hareket ettiği kolon boyunca sürekli akan bir inert gazdır. Gaz karışımı, kolonun sonunda bir detektörden akmakta ve eğer başarılı bir şekilde ayrıldıysa, bileşenler bir kayıt cihazında farklı tepe noktaları göstermektedir. Gaz kromatografisinde,  $R_f$ , bir bileşenin ne kadar hızlı hareket ettiğini ve genellikle ama her zaman değil bileşiğin kaynama noktasını göstermektedir. Gaz kromatografisi kolonunda bir polar yüksek kaynama noktalı sıvı adsorbenti kullanılıyorsa, bileşenlerin polaritesi elüsyon sırasını belirlemektedir [789, 794-798].

#### d. Sıvı kromatografisi (LC)

Sıvı kromatografisi afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, ters faz kromatografisi ve benzeri şekilde sınıflara ayrılabilir. Sıvı kromatografisi afinite kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, ters faz kromatografisi ve benzeri şekilde sınıflara ayrılabilir.

##### d.1. İyon Değişim Kromatografisi

İyon kromatografisi olarak iyon değişim kromatografisi, moleküllerin yük özelliklerine bağlı olarak iyonların ve polar moleküllerin ayrılmasını sağlayan bir işlemdir. Proteinler, nükleotidler ve amino asitler dahil olmak üzere neredeyse her tür yüklü molekül için kullanılabilir. Enjekte edilecek çözelti genellikle bir örnek olarak adlandırılmakta ve ayrı ayrı ayrılmış bileşenler analitler olarak adlandırılmaktadır. Protein saflaştırmasında, su analizinde ve kalite kontrolünde sıklıkla kullanılmaktadır [789, 792, 793].

##### d.2. Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi

Proteinlerde bulunan genel amino asitlerin hepsi yüklü moleküller değildir. Yüklü olmayan hidrokarbon yan zincirleri içeren bazı amino asitler vardır. Bu nedenle iyon değişim kromatografisinde yer alanlar aynı prensiplerle saflaştırılmazlar. Bu hidrofobik amino asitler genellikle proteinin içine gömülmektedir. Hidrofobik grupların çoğu yüzeyde olmadığından, hidrofobik etkileşimli iyon kromatografisi kullanımı, bu hidrofobik amino asitlerin immobilize edilmiş hidrofobik grupları içeren bir destek üzerine bağlanması yoluyla iyon değişim kromatografisi için gözlemlenenenden çok daha büyük bir seçicilik sağlamaktadır [789, 792, 793].

##### d.3. Jel Filtrasyon Kromatografisi

Bu teknik, proteinleri boyutlarına ve şekline göre ayırmaktadır. Jel filtrasyon kromatografisi desteği, gözenekler adı verilen belirli boyutlarda delikler içeren boncuklardır. Gözeneklere nüfuz edemeyen daha büyük moleküller, boncukların etrafında hareket etmekte ve gözeneklere nüfuz edebilen daha küçük moleküllerden boncukları daha hızlı ayıran boşluklardan geçmektedir. Bu, proteinin bir desteğe bağlanmasını içermeyen tek kromatografik tekniktir [789, 792, 793].



#### d.5. Afinite Kromatografisi

Bu yöntem, mevcut en güçlü bir tekniktir. Hedef molekülün tek adımlı bir arıtılmasına potansiyel olarak izin verebilmektedir. Çalışmak için, hedef proteini tanıyan bir molekül olarak spesifik bir ligand, bir destek üzerinde, hedef moleküle bağlanmasına izin verecek şekilde hareketsiz hale getirilmesi gerekmektedir. Bu teknik, herhangi bir proteinin saflaştırılması için, spesifik bir ligandın mevcut olması şartıyla, örneğin rekombinant proteinlerin saflaştırılması için veya lektinlerin örnek içindeki bileşenleri ayırmak için lektin afinite kromatografisi için kullanılma potansiyeline sahiptir [789, 792, 793, 799, 800].



### 2.7.2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC olarak ve aynı zamanda yüksek basınçlı sıvı kromatografisi olarak da bilinen yüksek performanslı sıvı kromatografisi, analitik kimyada ve ayrıca bileşikleri ayırmak, tanımlamak ve nicelleştirmek için biyokimyada kullanılan bir sütun kromatografisidir. HPLC, kromatografik paketleme malzemesi olarak durağan fazı, mobil fazı veya fazları kolondan hareket ettiren bir pompa ve izlenen moleküllerin alıkonma sürelerini (faktörü) ( $R_f \equiv R_t$ ) gösteren bir detektör kullanmaktadır. Alıkonma süresi, durağan faz, analiz edilen moleküller ve seçilen elüsyon (solvenler) arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişmektedir [789, 790].

#### a. Türleri

##### a.1. Normal Faz-HPLC

Normal faz HPLC (NP-HPLC), analitlerin polaritesine göre ayrıldığı bir yöntemdir. NP-HPLC'de bir polar durağan faz ve polar olmayan bir hareketli faz kullanılmakta ve esas olarak polar analitler için etkili bir şekilde çalışmaktadır. Hareketli fazda daha polar çözücülerin kullanılması, analitlerin alıkonma sürelerini azaltırken, daha hidrofobik çözücüler, alıkonma sürelerini arttırmaya eğilimlidir. Normal fazlı HPLC, retansiyon zamanlarının tekrarlanamazlığı nedeniyle ters fazlı HPLC'nin geliştirilmesi ile 1970'lerde gözden düşmüştür [789, 790].

##### a.2. Ters Faz-HPLC

Ters fazlı HPLC (RP-HPLC veya RPC), polar olmayan bir durağan faza ve sulu, orta derecede polar bir hareketli faza sahiptir. Analitin ters fazlı HPLC durağan fazına bağlanması, sulu eluent içindeki ligand ile bağlantılı olarak analit molekülünün polar olmayan bölümünün etrafındaki temas yüzey alanı ile orantılıdır. Suyun yüzey gerilimini azaltmak için mobil faza daha az asetonitril, metanol ve diğerler gibi polar bir çözücü ilave edilerek retansiyon azaltılabilmektedir. Gradyan elüsyonu, analiz prosedürü sırasında mobil fazın polaritesini otomatik olarak değiştirerek bu etkiyi kullanmaktadır. Bir başka önemli bileşen bir pH'ın etkisidir. Çünkü bu, analitin hidrofobikliğini değiştirebilmektedir. Bu nedenle çoğu yöntem pH'ı kontrol etmek için tamponlama ajanları kullanmaktadır. Asetik asit veya formik asit gibi organik asitler de sıklıkla mobil faza eklenmektedir. Asit ve tamponların etkileri uygulamaya göre değişmekte ama genellikle kromatografik sonuçları geliştirmektedir [789, 790, 792, 793].

### a.3. Boyut Dışlama Kromatografisi (SEC)

Jel filtrasyon kromatografisi olarak da bilinen boyut dışlama kromatografisi, parçacıkları boyut bazında ayırmaktadır. Genellikle düşük çözünürlüklü bir kromatografidir. Sık sık bir saflaştırma işleminin son aşaması için ayrılmaktadır. Saflaştırılmış proteinlerin tersiyer veya kuaterner yapısının belirlenmesi için de yararlıdır. Boyut dışlama kromatografisi, polisakaritlerin molekül ağırlığını belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır ve ticari olarak temin edilebilen düşük moleküler ağırlıklı heparinlerin moleküler ağırlık karşılaştırması için Avrupa Farmakopesi tarafından önerilmiş olan resmi tekniktir [789, 790, 792].

### a.4. İyon Değişim Kromatografisi

İyon değişimi kromatografisinde, alıkoyma, durağan faza bağlanan çözünen iyonlar ve yüklü bölgeler arasındaki farklı çekime dayanmaktadır. İyon değiştirici tipleri arasında brinci olarak daha büyük gözenek boyutlarına ve düşük yüklü yoğunluklarına sahip olan ve protein ayrımı için uygun hale getiren selüloz ve dekstran iyon değiştiriciler (jeller), ikinci olarak zincirin stabilitesini artıran çapraz bağlantıya izin veren polistiren reçineler ve üçüncü olarak kontrollü gözenekli cam veya gözenekli silika içermektedir. Bu tip kromatografi, su arıtma, proteinlerin iyon değişimi kromatografisi, karbonhidratlar ve oligosakkaritlerin yüksek pH anyon değiştirme kromatografisinde ve benzerlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [789].

### a.5. Bio-Afinite Kromatografisi

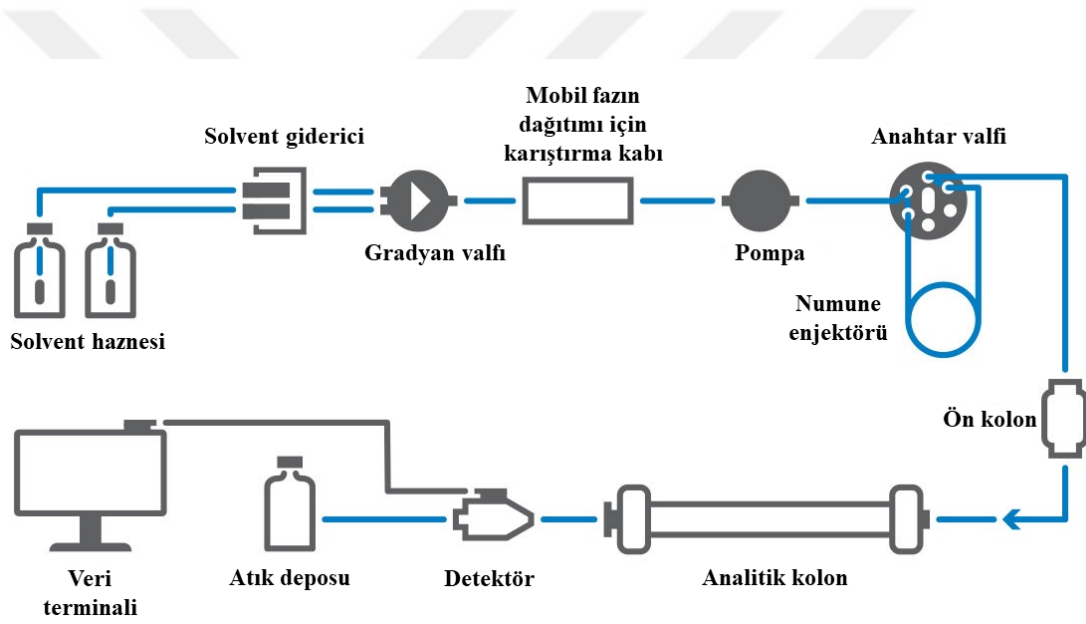
Bu kromatografik işlem, biyolojik olarak aktif maddelerin kararlı, spesifik ve geri dönüşümlü kompleksler oluşturma yeteneğine dayanmaktadır. Bu komplekslerin oluşumu, elektrostatik etkileşim, ikiucaylı-ikiucaylı etkileşimi, hidrojen bağı, hidrofobik etkileşim ve Van der Waals etkileşimi gibi yaygın moleküler güçlerin katılımını içermektedir. Etkin, biyo-spesifik bir bağ, bu kuvvetlerin birkaçının tamamlayıcı bağlanma yerinde uyumlu bir eylemiyle oluşturulmaktadır [789].

#### a.6. İsookratik Akış ve Degrade Elüsyonu

Mobil faz bileşiminin prosedür boyunca sabit kaldığı bir ayırma, isocratic olarak “sabit bileşim” anlamına gelerek adlandırılmaktadır. Ayırma işlemi sırasında mobil faz bileşiminin değiştirildiği bir ayırma gradyan elüsyonu olarak tanımlanmaktadır [789].

#### b. HPLC çalışma mekanizması

Kromatografi, yapıları veya bileşimlerindeki farklılıklar nedeniyle bileşiklerin ayrılmasına dayanan analitik bir tekniktir. Genel olarak kromatografi, bir numunenin sistem üzerinden bir sabit faz üzerinde hareket ettirilmesini içermektedir. Numunedeki moleküllerin farklı eğilimleri ve etkileşimleri, sabit destek ile moleküllerin ayrılmasına yol açmaktadır. Sabit faz ile daha güçlü etkileşimlere sahip olan örnek bileşenler, zayıf etkileşimlere sahip bileşenlere kıyasla kolonda daha yavaş hareket etmektedir. Bu temelde, farklı bileşikler kolondan geçerken birbirlerinden ayrılabilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), çözelti içinde çözülmüş olan bileşikleri ayırmak ve ölçmek için kullanılan bir tip kromatografidir. HPLC şu anda bitkisel kaynaklardan ilaç keşfinde en çok kullanılan niteliksel ve niceliksel analiz yöntemidir. 80'li yılların başlarından, HPLC, doğal numuneleri karmaşık numune hazırlama ihtiyacı olmadan doğrudan ham ekstraktta ayırmak için en çok yönlü teknik olarak kabul edilmiştir. Tipik olarak bir HPLC sistemi aşağıdaki şekilde gösterilmiş bileşenlerden oluşmaktadır (Şekil 2.57).



Şekil 2.57: HPLC sisteminin şematik diyagramı<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [507, 801].

### b.1. Pompa

Daha gelişmiş aletler iki ile dört pompadan ve numunenin kalitatif ve kantitatif karakterizasyonu için birden fazla detektörden oluşmaktadır. Mobil fazın sürekli akışını korumak için pompa sistemleri kullanılmaktadır. Basınç genellikle 1500-2000 barlara ulaşmaktadır. Bazı durumlarda olduğu gibi, çok yüksek basınç önlenemez ve modern cihazlar 6000 atmosfere kadar dayanabilmektedir. Gradyan programlama kullanarak solvent kompozisyonunu kromatografi boyunca değiştirmek mümkündür [507].

### b.2. Kolon

Kullanılan kolon, kolon içinde ayırma gerçekleştiği için HPLC sisteminin kalbidir. Farklı faz kimyası, özellikle ters faz kolonları ile kolonların geliştirilmesi, neredeyse her tür doğal ürünün ayrılmasını sağlamıştır. Sabit faz gözenek boyutunda farklılık gösteren kolonlar, başlangıçta, ayrıştırma verimliliğine, en yüksek şekle ve ayırma süresine dikkat edilerek, bileşenleri çözme potansiyelleri açısından taranmaktadır. Çok yüksek pH-kararlı fazların, sub 2  $\mu\text{m}$  partiküllerin ve monolit kolonların piyasaya sürülmesi, HPLC sistemlerinin performansını, hız, çözünürlük ve tekrarlanabilirlik açısından önemli ölçüde artırmıştır [507, 802, 803]. HPLC analizinde kullanılan sütunlar, küçük parçacık boyutuna sahip olan sabit bir fazdan yapılmaktadır. Bu nedenle, çözücü veya hareketli faz kolondan geçtiğinde yüksek bir geri basınç üretilmektedir. HPLC kolonları sabit faz (C-8, C-12, C-18), partikül boyutu (3-5  $\mu\text{m}$ ), gözenek boyutu (80-200  $\text{Å}$ ) ve uzunluk (10-25 cm) cinsinden farklıdır. Bir HPLC sütunu için en popüler ambalaj malzemeleri silika esaslıdır. Oktadecil silika (ODS-silika) en yaygın kullanılan malzeme ve bir C18 kaplaması içermektedir. C1, C2, C4, C6, C8 ve C22 kaplamalarını içeren diğer malzemeler de kullanılmaktadır. Spesifik bileşiklerin saflaştırılması için farklı tipte kimyasal parçalar da tasarlanmıştır. Monolitik, zirkonya ve polimer paketleme malzemesi tabanlı kolonlar da mevcuttur. Silika bazlı parçacıklar iyi mekanik mukavemete sahiptir. Fakat sınırlı bir pH aralığı ve temel analitlerin taranması dahil olmak üzere bir dizi dezavantajdan muzdarip olabilmektedir. Polimerik kolonlar pH sınırlamalarının üstesinden gelebilmektedir. Karbon gruplarını metil grupları halinde içeren hibrid kolonlar, yüksek verimlilikle mekanik olarak güçlü ve genişletilmiş bir pH aralığında çalışmaktadır. Köprülü etan melez gibi ikinci nesil bir hibrit kolon, silis matrisinde metil grubunun köprülenmesiyle geliştirilmiştir [507, 804]. Yöntem geliştirme için,

farklı HPLC kolonları, daha iyi ayırma verimliliği, en yüksek şekil ve alıkonma süresi elde etme amacı ile taranmaktadır. Daha küçük parçacık büyüklüğünde bir sütun kullanılarak, akış oranı azaltılabilmektedir. Ayrıca, kolon sıcaklığındaki artış ayrıca ayırma süresinde önemli ölçüde azalmaya yol açmaktadır. Yüksek sıcaklık, viskoziteyi düşürmenin ve analitlerin yayılımını arttırarak kütle transferinin arttırılmasının iki avantajını sağlamaktadır [507, 805].

### b.3. Mobil faz

Mobil fazın polaritesi ve bileşimi, bileşenlerin ayrılmasını etkilemektedir. HPLC’de yöntem geliştirmek için değişen polaritelerde çözücüler kullanılmaktadır. Normal faz HPLC’de, genellikle çözücü polar değil ve ters fazlı HPLC’de, çözücü normal olarak bir su ve bir polar organik çözücü karışımıdır. Ayırma, çoğunlukla asetonitril-metanol-su ile ters faz kromatografisinde veya izokratik veya gradyan elüsyon modunda ikiden fazla çözücünün bir kombinasyonunda gerçekleştirilmektedir. Mobil fazın pH’ı, fonksiyonel grubun iyonlaşmasını etkilemektedir. Bu da iyon çiftinin oluşumunu ve çözünenlerin tutulmasını etkilemektedir. Organik çözücü ile birlikte, asetik asit, fosfat tamponu, trifloroasetik asit ve diğerler gibi düşük ultraviyole (UV) kesicilere sahip olan modifiye ediciler de kullanılmaktadır [507].

### b.4. Numune girişi

Kromatografik işlem, kromatografi sisteminin mobil faz ile dengelenmesinden önce kolonun enjektör ucundaki numunenin enjeksiyonu ile başlamaktadır. Bileşenlerin ayrılması, analitler ve hareketli faz kolondan pompalanırken gerçekleşmektedir. Hareketli faz, degrade elüsyon modunda karışımın değişen polaritesine ayarlanabilirken, çok daha fazla sayıda bileşik bir karışımda ayrılabilir. Ek olarak, gradyan elüsyon modunda, kromatografik tepeler çok daha kısa sürede daha keskin hale gelmektedir. Temel sürüklenmeyi en aza indirmek için bir izokratik akış sistemi de seçilmiştir. Ayrıca, izokratik elüsyon, bir gradyan sisteminden daha basit, hassas, doğru ve kararlı olduğundan kalite kontrol ve rutin analiz için daha uygundur [507, 806]. Sütundan çıkan bileşenler, veri terminaliyde tepeler olarak görünmektedir [507].

### b.5. Dedektör

Doğal ürünlerin fiziko-kimyasal özelliklerinin çeşitliliği nedeniyle uygun bir dedektör seçimi çok önemlidir. Kırılma indeksi dedektörü en basit ve en pahalı dedektördür. Bu detektör

karbohidratlar ve polimerler gibi bileşikleri tespit etmek için yararlı, ancak duyarlılıktan yoksun ve ortam sıcaklığı, basınç ve akış hızındaki değişikliklere karşı çok hassastır. Üstelik, gradyan elüsyonu için kullanılması mümkün değildir. Bu sınırlamalar nedeniyle, kırılma indeksi detektörü diğer dedektörler ile değiştirilmiştir. Tüm HPLC dedektörleri arasında UV detektörü en basit ve en yaygın kullanılmaktadır. Dedektör hücresinden geçen ışığın yoğunluğu ve çözünme yoğunluğu arasındaki ilişki Beer'nin yasasıyla verilmektedir. Belirli bir dalga boyunda bir analitin sönüm katsayısının büyüklüğü, algılamanın hassasiyetini kontrol etmektedir. Bu dedektör, kromofor içermeyen doğal ürünler için kullanılması mümkün değildir. Ayrıca, zayıf kromoforlarla analitlerin saptanmasını önleyebildiğinden dolayı UV dalga boyuna sahip olan mobil fazının bileşenlerden korunulması gerekmektedir [507, 807]. Fotodiyod dizi dedektörü, çoklu dalga boyu UV dedektörüdür. Aynı zamanda sabit dalga boyu dedektöründen daha çok yönlüdür. Bileşenin UV spektrumları ayırma sırasında bile izlenebilmektedir. Zayıf bir kromofor içeren bileşiklerin belirlenmesi için 200 nm'ye yakın spesifik olmayan bir dalga boyu kullanılmaktadır [507, 808]. Floresan dedektörleri daha fazla duyarlılık sağlamaktadır. Burada, fotonların moleküler absorpsiyonu, daha uzun dalga boylu başka bir fotonun emisyonunu tetikleyicilerdir. Dalga boylarındaki bu fark daha fazla seçicilik sağlamaktadır. Floresan ışık çok düşük bir ışık seviyesine göre ölçülmektedir. UV ile karşılaştırıldığında, doğal ürünlerin tespiti için flüoresan dedektörleri nadiren kullanılmıştır. Doğal ürün sınıfı doğal floresan içerdiğinden uygulamaların çoğu, gıdalardaki aflatoksinlerin çok hassas bir şekilde saptanmasıyla ilgilidir [507, 809]. Doğal olarak flüoresan olmayan doğal ürünlerin tespiti floresan etiketlerin eklenmesiyle başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir [507, 810]. Kemilüminesan nitrojen tespiti, femtogram aralığına kadar çok yüksek hassasiyete sahip geniş bir ilaç yelpazesi dahil, azot içeren moleküllerin saptanması için nispeten yeni bir teknolojidir [507, 811]. Birçok bileşik kemilüminesan olmadığından, sadece türetildikten sonra kemilüminesans ile tespit edilebilmektedir [507, 812]. Hippophae rhamnoides içeren fitopatolojiklerde flavonoidlerin analizi bildirilmiştir. Prosedür, bir sülfürik asit ortamında bir seryum rodami sistemi ile flavonoidlerin kemilüminesan artışına dayanmaktadır [507, 813]. Elektrokimyasal aktiviteye sahip doğal ürünler yaygındır. Elektroaktif gruplara sahip olan doğal ürünler kolayca ölçülebilmekte ve elektrokimyasal algılama ile sıvı kromatografisiyle tespit edilebilmektedir. Bu teknik, oksidasyon veya redüksiyon modunda çok sayıda analite uygulanabilmektedir. Aromatikler, aminler, fenoller, kinolonlar, tiyoller ve diğerler gibi fonksiyonel gruplar oksidasyona duyarlıdır.



Aldehitler, eterler, esterler, ketonlar, kinonlar, olefinler ve diğerler gibi fonksiyon grupları, indirgeme ile uyumludur. Bir elektrokimyasal dedektörün hücreleri üç elektrottan, çalışma, sayaç ve referans elektrotlardan oluşmaktadır. Bu elektrotlar için iki tasarım olmasına rağmen, bunlar birkaç farklı geometride hizalanabilmektedir. Elüent, elektrometre boyunca, kuarometrik sistemlerde yönlendirilirken, elüent, amperometrik sistemlerde elektrotu geçmektedir. Elektrokimyasal algılama genellikle, çalışma elektrodunun potansiyelini referans elektrod ile ölçülen sabit bir değerde tutulmasıyla gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal reaksiyon, çalışma ve referans elektrotlar arasında uygulanan sabit potansiyel farktan kaynaklanmaktadır. Elde edilen akım, elüsyon süresinin bir fonksiyonu olarak ölçülmekte ve picomolar seviyesinde tespit edilmesine izin vermektedir. Elektrokimyasal dedektör numuneyi değiştirdiğinden dolayı diğer dedektörlerden farklı ve flüoresan dedektörden daha az seçicidir. Bu tespit yöntemi ucuz, hassas ve geniş çapta kabul edilmektedir. Erişilebilir potansiyel aralığı, bu aralıkta aktif olan bileşiklerin sayısı ve tek tek sinyallerin yarı genişliğinde elektrokimyasal dedektörün seçiciliği belirlenmektedir [507, 807]. Darbe tekniklerini içeren çok adımlı potansiyel zaman dalga formları, elektrokimyasal tespit için de mevcuttur. Burada, tekdüze ve tekrarlanabilen elektrot aktivitesi korunmakta ve amperometrik veya koulometrik tespit gerçekleştirilmektedir. Elektrokimyasal dedektörlerin uygun kullanımı redoks reaksiyonları ve bunların mobil faz bileşimine bağımlılıklarını gerektirmektedir. Doğal ürünlerin elektrokimyasal reaksiyon mekanizmalarının incelenmesi, canlı hücrelerle etkileşimlerinin oluşturulmasını destekleyebilmektedir [507, 814]. 1966 yılında evaporatif ışık saçma dedektörü tanıtılmıştır [507]. Optik, elektrokimyasal veya diğer analit özelliklerine bakılmadan mobil fazdan daha az uçucu olan herhangi bir analit, evaporatif ışık saçma dedektörü kullanılarak tespit edilebilmektedir. Elüsyon, bir nitrojen akışı kullanılarak şişelenebilmekte ve ortaya çıkan aerosol, ısıtılmış bir sürüklenme borusu içinden taşınmaktadır. Uçucu bileşenler ve çözücüler, sürüklenme borusunda buharlaşmaktadır. Kalan katı kısım daha sonra bir tespit hücresine sokulmaktadır. Parçacıklara bir ışık ışını yönlendirilmektedir. Dahası da bir fotodiyot veya fotoçoğaltıcı tarafından tespit edilen gelen ışığın saçılmasına neden olmaktadır. Şişelenmiş gaz akışı ve sürüklenme borusu sıcaklıkları, evaporatif ışık saçma dedektörü sinyal yanıtını etkileyen en önemli parametrelerdir. Gaz akış oranı, buharlaşma meydana gelmeden önce kolon atık suyunun damlacık boyutunu etkilemektedir. Daha yüksek akış oranı, daha küçük aerosol damlacıklarının oluşmasına ve ışığın daha az saçılmasına ve bu da daha düşük bir duyarlılığa

neden olmakta, fakat sabit bir taban çizgisine izin vermektedir. Sürtünme borusu sıcaklığı, uçucu olmayan çözücünün ışık saçma tepkisinin münhasıran belirlenebilmesi için şişelenmiş aerosolün buharlaşmasını kolaylaştırmaktadır. Yarı uçucu mobil ile karşılaştırıldığında, daha yüksek bir sıcaklık, uçucu olmayan analit ve aynı zamanda yüksek bir sulu içeriğe sahip bir hareketli faz için gereklidir. Yeni nesil evaporatif ışık saçılım dedektörü, elüentin düşük bir sıcaklıkta buharlaşmasını sağlayarak yarı-uçucu analitlerin tespitini kolaylaştırmaktadır [815, 816]. Konsantrasyona bağlı olan UV dedektörünün aksine, evaporatif ışık saçma dedektörü kütleyle bağımlıdır. Bu nedenle, teorik olarak, evaporatif ışık saçma dedektörü, mevcut kütle miktarları ve dolayısıyla evrensel bir tepki faktörü için benzer bir tepki üretmektedir. Evaporatif ışık saçılma dedektörü tepkisi, aynı zamanda, bu tür kantifikasyon prosedürlerini deneysel olarak erişilemeyen hale getiren, gradyan elüsyonu durumunda bileşiğin ve hareketli faz bileşiminin uçuculuğuna da bağlıdır. Böylece, çeşitli faktörlerin karşılıklı etkileşimi doğrusal olmayan bir tepkiye yol açmaktadır. Bu dezavantaj, kalibrasyon eğrileri için yanlış regresyona neden olmaktadır [817]. Evaporatif ışık saçılım dedektörü, kromofor içermeyen analitler veya zayıf kromoforlar için UV dedektörüne alternatif olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [803]. Evaporatif ışık saçılım dedektörü teknikleri, UV tespitiyle birlikte sıklıkla kullanılmaktadır. Evrensel HPLC dedektörü için yeni bir teknoloji olarak yüklü bir aerosol dedektörü tanıtılmıştır. Yüklü aerosol dedektörünün ilk adımı, evaporatif ışık saçma dedektörüne benzer olmakta ve kurutulmuş parçacık akımı, bir korona boşaltma iğnesi ile doldurulmaktadır. Üretilen akım bir elektrometre ile ölçülmektedir [507, 817]. Gaz kromatografisinin genel bir dedektörü olan alev iyonizasyon dedektörü (FID), ve HPLC'ye uygulanmıştır [507, 816]. HPLC-FID eşleşmesi, mobil faz olarak %100 su ile çalışmayı gerektirmektedir. Bununla birlikte, su, oda sıcaklığında ters fazlı sıvı kromatografisinde çok zayıf bir hareketli fazdır. Uygun sabit fazlara sahip seçilmiş bileşikler için, ortam sıcaklığında saf su ile ayırmalar sağlanmıştır [507, 818].

#### b.6. Piklerin tanımlanması

Piklerin tanımlanması ve nicelendirilmesi, aynı numunelerin tekrarlanan enjeksiyonunun aynı alıkonma süresi ve tepe alanları elde edildiğinde yapılmaktadır. Pikler, alıkonma süreleri ve UV absorpsiyon bantlarını, standart bileşiklerin alıkonma süresi ve UV emilim bantları ile karşılaştırarak tanımlanmaktadır. Ayrıca, HPLC dedektörleri tarafından elde edilen UV emilim bantları, absorpsiyon bantlarının literatür değerleri ile karşılaştırılmaktadır. Kalibrasyon eğrisi

genellikle bilinen miktarlarda numuneler enjekte edilerek ve pik yükseklik veya tepe alanı ölçülerek elde edilmektedir. Bir bileşiğin konsantrasyonu, tepe alanı veya yüksekliğini standart bileşenin konsantrasyonuna göre çizerek belirlenmektedir. Hem pik alanı hem de pik yüksekliği, iyi çözülmüş piklerin konsantrasyonu ile orantılıdır. Bileşenlerin nicelenmesi için üç farklı kalibrasyon yöntemi uygulanabilmektedir. Harici standart kalibrasyon yöntemi, üç yöntemin en basitidir. Bu yöntemin doğruluğu, enjeksiyon hacminin tekrarlanabilirliğine bağlıdır. Burada, bilinen standart solüsyon konsantrasyonları hazırlanıp her konsantrasyonda sabit bir hacim enjekte edilmektedir. Pik alanı veya yüksekliği, bir lineer denklem elde etmek için konsantrasyona karşı çizilmektedir. Doğrusal regresyon denkleminde, bilinmeyen bir örnekte bileşenin konsantrasyonu elde edilebilmektedir. En doğru ve kesin niceliği elde etmek için iç standart metot kullanılmaktadır. Bu yöntemde, örnekte bulunmayan bir bileşik olan bir iç standardın eşit bir miktarı hem örnek hem de standart çözeltilere eklenmektedir. Kuantifikasyon, bileşiğin tepe yüksekliğinin veya tepe noktasının oranlarının dahili standartlara göre yapılmasıyla yapılmaktadır. Dahili standart sabit olması, benzer bir alıkonma süresine sahip olması ve örnek bileşenlerden herhangi birine müdahale etmemesi gerekmektedir. Kalibrasyon eğrisinin yapımı için standart ekleme yöntemi de kullanılmaktadır [507].

### 2.7.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

#### 2.7.3.1. Prensipleri

1962 yılında W. C. Nixon [819] tarafından yapılan bir çalışmada taramalı elektron mikroskobunda, üstteki elektron tabancası kondenser mercekleri tarafından kontrol edilen ışın açısı ile numune aydınlatılmaktadır. Numunenin altındaki mercekler, son ekranda binlerce kez büyütülmüş olarak görüntülenen numunenin görüntüsünü büyütmek için kullanılmaktadır. İkinci bir elektron tabancası, kolonun alt kısmındaki floresan ekranının altına yerleştirilirse ve elektron ışını, aynı merceklerden yukarı doğru yansıtılırsa, bu ikinci elektron kaynağı, numune görüntüsünün büyütülmüş olduğu aynı büyüklükte küçülmektedir. Bu etki, hem bütün elektron tabancalarıyla aynı anda gözlemlenebilmekte hemde elektron mercek sistemleri aracılığıyla ışınların tersinirliğini gösterilmektedir. Bu şekilde, flüoresan ekran üzerinde veya fotografik plaka üzerinde bulunan numune görüntüsünde olan işlenmiş nokta, numunenin düzlemindeki odaklanmış elektron probuna eşittir. İki boyutlu bir görüntü elde etmek için, sondayı numunenin üzerinde hareket ettirmek ve iletilen veya yansıtılan elektronları zamanla değişen bir sinyal olarak toplamak gereklidir. İki tür alet arasındaki bu benzerlik, tarama mikroskobu transmisyonda kullanıldığında hem problama sisteminin hem de görüntü oluşumunun anlaşılmasında faydalıdır. Tarama mikroskobu, geleneksel elektron mikroskobunda olduğu gibi kolonun üst kısmına yerleştirilen sadece bir elektron tabancasına ve yan elektroniklere ihtiyaç duymaktadır [819, 820].

#### 2.7.3.2. SEM Cihazı

Şekil 2.58'deki şematik diyagram, taramalı elektron mikroskobunun temel bileşenlerini göstermektedir. Elektron tabancası, taban katodu ve kontrol ızgarası / ızgaraları üzerinde az voltaja, birkaç kilovolt veya on kilovolt'a göre toprak potansiyelinde tutulan anotlara doğru hızlanan bir elektron kaynağı oluşturmaktadır. Bu elektronlar bir veya daha fazla elektron merceğinden geçmektedir. Elektron kaynağının görüntüsü, birkaç ondan birkaç on nanometre çapına kadar olan bir ardışık indirgemeden sonra, numunenin düzleminde oluşturulmaktadır. Yol boyunca bazı noktalarda elektron ışını, tarama jeneratörü tarafından kontrol edilen alanlar tarafından saptırılmaktadır. Sonuç olarak, kiriş, numunenin yüzeyi üzerinde, bir kare televizyon tipi raster, bir daire, bir spiral, dijital bir girişi takiben aşamalı olarak artan bir tarama veya başka

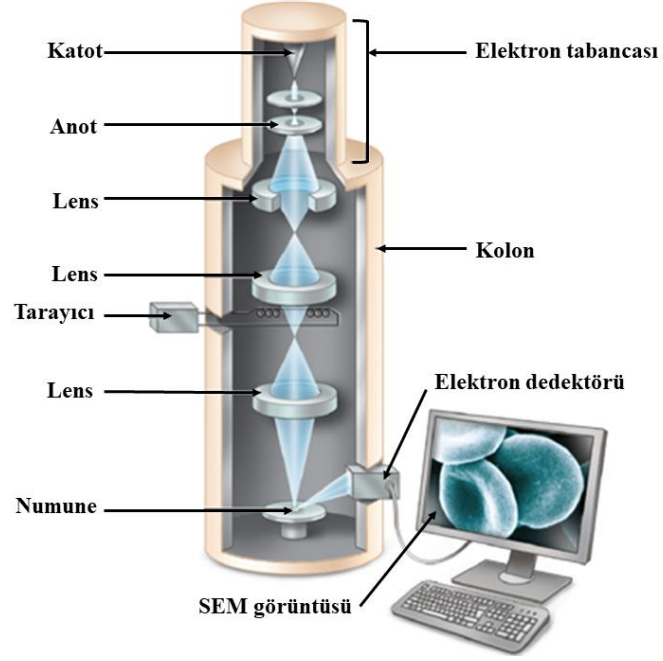
bir kontrol gibi önceden belirlenmiş bir biçimde hareket ettirilmektedir. Bu birincil elektronlar, numune yüzeyinde ikincil elektronlar üretmekte ve bir elektron toplayıcısı tarafından tespit edilmektedir. Kollektör, sırayla ya da aynı anda diğer tüm sinyallerle uğraşmak üzere ayarlanabilmektedir. Örnek, mekanik olarak x, y ve z yönlerinden hareket ettirilebilmekte, döndürülmekte, birkaç eksene göre eğimli, ısıtılmış, soğutulmuş, gerilmiş, süzölmüş, problemlenmiş veya mikroskop içinde denenebilmektedir. Amplifikatör toplanan sinyali arttırmaktadır. Ayrıca elektron ışını yüzeyde tarandığında numuneden gelen bilgileri kontrast değiştirebilmekte, farklılaştırabilmekte, bütünleştirebilmekte veya başka şekilde işleyebilmektedir. Tarama jeneratörü de katot-ışını tüpüne bağlanarak tüpteki elektron ışını, ana elektron optik kolonundaki ana giriş ile aynı şekilde taranmaktadır. Bununla birlikte, ana boruya tedarik edilen tarama gücü, gösterge tüpü sabit bir alan üzerinde tarandığında istenildiğinde zayıflatılabilmektedir. Sonuç olarak, taranan alanın numunedeki herhangi bir azalması, tüp ekranı yüzünün (sabit), numune taranan alana (değişken) olan oranı ile gösterilen görüntülenen büyütmede bir artışa yol açmaktadır. Depolama tüpleri, faks yazıcıları, doğrudan analiz için bilgisayar arayüzleri, teyp kayıtları, sinema filmi, elektrografi, kapalı devre televizyonu ve diğerler gibi diğer dış okumalar yapılabilmektedir. Taramalı elektron mikroskobunun avantajları, katı bir numunenin yüzeyinin deney için mevcut olması gerçeğinden yola çıkmakta ve optik mikroskoptan çok daha iyi bir çözünürlükte ve daha büyük bir büyüklükteki alan derinliği ile basit gözlem içermektedir. Elektron üzerindeki yük, elektrostatik ve manyetik alanların kolaylıkla doğrudan görselleştirilebileceği anlamına gelmektedir Konvansiyonel transmisyon elektron mikroskopları veya optik mikroskoplarla doğrudan bir analogun olmaması daha önce mümkün olmayan yeni uygulamalara yol açmıştır. Numunenin bir vakum içine yerleştirilmesi, bir hava kilidi ile hızlı bir şekilde yapılmaktadır. Bu, tamamlanırken, tüm sütun yüksek veya ultra yüksek vakum altında tutulmaktadır. Canlı malzeme bu şartlarda özel durumlar altında incelenmiştir [819, 820].

#### a. Alan derinliği

Elektron prob oluşturma sisteminin çok küçük açısal menfezi, bir kerede odakta geniş bir alan derinliğine izin vermektedir. Optik mikroskop çözünürlükte aynı düzenin bir alan derinliği olmaktadır. Tarama mikroskobu, bu çözünürlükte 7000 pm'ye kadar bir alan derinliğine sahip olmaktadır. Sonuç olarak, polen taneleri, mikrofosiller, kemik ve diş yüzeyleri gibi çok przli yüzeyler tüm örnek üzerinde odakta görülebilmektedir. Daha yüksek büyütmede, 10 nm veya daha büyük yüzeylerden daha iyi bir çözünürlüğe ulaşıldığı zaman, alan derinliği hala noktadan noktaya çözünürlük için olan değerin yüz katından daha byktir [819, 820].

#### b. Kontrast

Taramalı elektron mikroskopunun üçüncü özelliği, katı numuneler için optik mikroskoba göre yüksek çözünürlük ve geniş alan derinliğine ek olarak kontrasttır. Elektron ışınının bir açısına eğimli olan katıların mikrograflarının taranması, göz elektron ışını eksenini boyunca yerleştirilmiş gibi görünüp aydınlatma, bir tarafa yerleştirilen elektron toplayıcısından örnek üzerine düşmüştür. Bu, tek bir mikrografa bakarken bile görülen üç boyutlu etkisini artırmaktadır. rnek, kirişe göre eğilebilmekte veya tam tersi ve bir stereografik çift vermek üzere birleştirilecek iki mikrograf kaydedilebilmektedir. nc boyut, hava fotoğrafılığından fotogrametrik teknikler kullanılarak doğrulukla ölçülebilmektedir [819, 820].



**Şekil 2.58:** Taramalı elektron mikroskobunun temel bileşenleri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Resim Google görseller sitenden seçilip alınmış ve teorik kaynaklar iyi derecede okunduktan sonra şekil tasarlamak için kurulmuş fikirlere göre resimler modifiye edilmiştir [819-821].

## 2.8. STABİLİTE

Stabilite, bir biyoaktif maddenin veya biyoaktif ürününün, yeniden test veya son kullanma tarihleri boyunca kimliğini, dayanıklılığını, kalitesini ve saflığını korumak için belirlenmiş özellikler dahilinde kalması kapasitesi olarak tanımlanmaktadır [822-825]. Olası bileşimleri nedeniyle, farmasötikler özellikle çevresel faktörlere duyarlıdır. Bütünlük ve ürün etkinliğinin sürdürülmesi için sıkı depolama koşulları gereklidir. Dolayısıyla, biyoaktif stabilitesinin, terapötik değerlerin hastalara verilmesini sağlamanın güvenli bir yolu olduğu düşünülmektedir [826]. Bir aktif maddenin veya bitmiş ürünün stabilite testi, bir biyoaktif maddenin veya biyoaktif ürününün kalitesinin, sıcaklık, nem ve ışık gibi çeşitli çevresel faktörlerden etkilenen zamanla nasıl değiştiğine ilişkin kanıt sağlamaktadır. Stabilite çalışmalarından bilgi, biyoaktif maddenin ortamlarının uzun vadeli etkilerinin anlaşılmasını sağlamaktadır. Stabilite testi bozunma mekanizmalarının, potansiyel degradasyon ürünleri, biyoaktif ve farmasötik ekstremler arasında, ilacın ve etkileşim mümkün bozulma yolları ile ilgili bilgiler sağlamaktadır. Sonuçlar uygun bir üretim sürecinin geliştirilmesi, uygun ambalajlama, depolama koşulları, ürünün raf ömrü ve son kullanma tarihlerinin seçilmesi için uygulanmaktadır. Birçok sulu biyoaktif çözeltisi için pH, sıcaklık, ışık ve oksitleyici atmosfer gibi stres koşulları bazen ilacın maksimum stabilitesini etkileyebilmektedir. Bir ilacın stabilitesi, “bir biyoaktif maddenin veya biyoaktif ürününün, yeniden test veya son kullanma tarihi boyunca kimliğini, gücünü, kalitesini ve saflığını korumak için belirlenmiş spesifikasyonlar içinde kalması kapasitesi” olarak tanımlanmaktadır. İstenilen farmakolojik etkilerin elde edilmesini sağlamak için kullanımından sonra sentezinden sonra yeterli bir süre boyunca biyoaktif maddenin stabilitesini sürdürmek çok önemlidir. Bir ilacın kararsızlığı, performansında istenmeyen değişikliklere neden olabilir veya başarısızlığa yol açabilmektedir [823]. İlacın zaman içinde toksik bir maddeye dönüşebileceği göz önüne alındığında, ilacın ne kadarının kaybolduğunun ölçülmesiyle birlikte, her zaman bozulmayı tanımlamak önemlidir [823, 827, 828].



### **2.8.1. Raf Ömrü**

Bir biyoaktif maddenin raf ömrü veya son kullanma tarihi, ilacın gücü ve saflığı gibi ortalama biyoaktif özellikleri gibi üretimden sonra onaylanmış özelliklerinin kalmasına beklenen zaman aralığı değişmektedir [829]. Parti yığınının varyasyonundan dolayı, farklı partilerin gerçek raf ömrü farklılık gösterebilmekte ve biyoaktif stabilitesi, sıcaklık, nem, ışığa maruz kalmaya ve diğer olası değişkenler arasında kabın sınıfına bağlı olan bir rastgele değişken olarak ele alınması gerekmektedir. Bu nedenle, herhangi bir stabilite çalışmasının tasarımı, benzer koşullar altında üretilen ilacın geleceği tüm partilerine uygulanabilen bir raf ömrü oluşturulması gerekmektedir [830-833].

### **2.8.2. Stabilite türleri**

Gerçekte, herhangi bir biyoaktif ürünü için fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik olarak üç stabilite modu vardır. Bunlar kısaca şu şekilde açıklanmaktadır.

#### ***2.8.2.1. Fiziksel Stabilite***

Bu durum, biyoaktif ürününün raf ömrü boyunca, görünüşü, organoleptik özellikleri, kırılabilirliği, parçacık büyüklüğü ve sertliği gibi fiziksel özelliklerinde hiçbir değişiklik olmadan kaldığını göstermektedir. Bu stabilite, biyoaktif maddenin etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için gerekli olduğundan dolayı biyoaktif ürün formülasyonunun, üretiminin, ambalajının ve depolamanın tüm aşamaları boyunca muhafaza edilmesi ve ilgi alanına göre karşılaştırılan özel testlerle yakından izlenip değerlendirilmesi gerekmektedir [832].

#### ***2.8.2.2. Kimyasal stabilite***

Bu, biyoaktif maddenin formülasyonunun kimyasal bileşiminde herhangi bir değişiklik olmaması anlamına gelmektedir. Genellikle, zamanla biyoaktif ürünleri çoğu fotoliz, hidroliz ve oksidasyon gibi kimyasal reaksiyonlarla bozunmaya maruz kalabilmektedir. Bu reaksiyonlar, ilacın aktif bileşen konsantrasyonlarında azalmaya ve istenmeyen yan ürünlerin oluşmasına neden olabilmektedir. Bu da biyoaktif maddenin daha az terapötik etkiye sahip olmasına veya herhangi bir terapötik etkiye sahip olmamasına veya hatta zararlı veya toksik bir madde içermesine neden olabilmektedir. Aynı zamanda kimyasal degradasyona biyoaktif ürünlerinde

bulunan koruyucu ve yardımcı maddelere ve aynı istenmeyen kimyasal dengesizliğe yol açan ambalajlarına da yol açabilmektedir. Katı dozaj formlarının, daha yavaş bir degradasyona uğradıkları için sıvı dozaj formlarından daha kararlı oldukları fark edilmiştir [832].

### **2.8.2.3. Mikrobiyolojik stabilite**

Bu, biyoaktif biyoaktif maddenin formülasyonunun sterilliğine ve farklı tipte olan bakteriler ve mantarlar gibi mikroorganizmaların kontaminasyon eksikliğine değinmektedir. Açıkçası, bir biyoaktif üründe mikrobiyal büyüme güvenliğini tehlikeye atabilip ciddi etkilere yol açabilmektedir. Yüksek nem içeriğinden dolayı, çözeltiler ve su bazlı yarı katı biyoaktifler, mikrobiyal kontaminasyondan muzdarip olmaktan daha sorumludur. Bu, sterilite sağlamak için gerekli olan biyoaktif dozaj formlarına antimikrobiyal koruyucuların ilave edilmesini sağlamaktadır. Dahası, depolama sırasında formülasyonun kirlenmesini önlemek için, kap, tercihen tek bir doz kabı kullanılarak uygun şekilde tasarlanması gerekmektedir [832].

### **2.8.3. Gıda ve İlaç İdaresi stabilite kuralları**

Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), biyoaktif üretimi ve pazarlamasını denetleyen Amerika Birleşik Devletleri federal ajansıdır. İlaç geliştirme sürecinin yakından izlenmesi ve onaylanması yoluyla, FDA, biyoaktif ürününün güvenli olduğunu ve belirtilen raf ömrü boyunca müşterilerin sabit kalmayacağını ve zarar vermeyeceğini garanti etmektedir [822, 830]. 1984 yılında FDA ilk olarak stabilite çalışması testi gerekmektedir. Bununla birlikte, FDA kılavuzunun yayınlandığı 1987 yılına kadar, istatistiksel tasarım ve insan uyuşturucu ve biyolojikler için stabilite çalışmalarının analizi ile ilgili özel şartlar belirlenmemiştir. Ayrıca, biyoaktif şirketlerinin, biyoaktif ürünlerinin idantitesini, gücünü, etkisini ve saflığını koruyacakları ve ortalama biyoaktif özelliklerini talep edilen raf ömrü süresi içinde onaylanmış spesifikasyonları karşılayabildiğini gösteren verileri sunmaları FDA tarafından talep edilmektedir. FDA stabilite kılavuz çizgisine göre, son kullanma tarihi süresi, ortalama degradasyon eğrisi için bağlı düşük güven onaylanmış düşük spesifikasyon sınırı ile kesiştiği taraflı olan %95 zamandır. Bu degradasyon, doğrusal fraksiyonda zamanla azalmasının beklenen biyoaktifleri için de geçerlidir. Zaman degradasyona ilişkisi doğrusal değilse, aritmetik veya logaritmik ölçekte kübik fonksiyon, doğrusal veya kuadratik gibi uygun bir transformasyon işlemi kullanılarak yapılabilmektedir [833]. Son kullanma tarihini belirlemede toplu değişkenliğine toplu sorununu

aşmak için, FDA stabilite kılavuzu, biyoaktif ürününün gelecekteki tüm partilerine uygulanabilecek daha kesin bir son kullanma tarihinin tahmin edilmesi için üç partinin veya daha fazlasının çalışılmasını gerektirmektedir [830]. Maddeler olarak kaplar biyoaktiflerle yakın temas halinde olduğundan, biyoaktif ürünlerinin stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu gerçek, FDA kılavuzunun, şişe ambalajları ve flakonları gibi kapların stabilite çalışmalarına dahil edilmesi gerektiğini gösterdiğini ortaya koymuştur [832].

## **2.8.4. Malezma formlara göre stabiliteyi etkilen faktörler**

### **2.8.4.1. Sıvı formu**

Sıvı dozaj formları stabilitesi aşağıda gösterilen faktörlerden etkilenmektedir

#### **a. Çözücü**

Bazı biyoaktiflerde hidrolizden önlemek için, su içeriği alkol veya propilen glikol gibi bir çözücü ile değiştirilebilmektedir. Bununla birlikte, eğer böyle bir prosedür diğer biyoaktiflere uygulanırsa, aslında degradasyon oranını arttırabilmektedir [832, 834].

#### **b. İyonik Gücü**

Bazı biyoaktif solüsyonları, tonitelerini ayarlamak için elektrolitlerin eklenmesini gerektirmektedir. Fakat, bunun stabilite üzerinde bir etkisi olduğu bulunmuştur [832].

#### **c. Oksijen**

Oksijenin varlığı oksidasyonu indükleyebildiğinden dolayı uygun paketlenme, solüsyonun oksijen içeriğini daha az tutarak ve biyoaktif ürünü ile kapak arasındaki çok az boşluk bırakarak oksidasyona engellemek için yöntemlerdir. Bazı durumlarda, oksijen depolama kaplarında nitrojen veya karbon dioksit ile değiştirilebilmektedir [832, 834].

#### **ç. PH**

PH, sıvı formunda olan hidroliz oranını etkileyebileceğinden en önemli faktördür. Bazı biyoaktifler güçlü asitler ve bazlar varlığında hızlı bir oranda hidrolize uğradıklarından stabilitenin en yüksek olduğu pH değerini belirlemek önemlidir [832, 834].

#### d. Sıcaklık

Sıcaklık arttıkça, çözeltide biyoaktiflerin hidroliz oranının ciddi ölçüde arttığı bulunmuştur. Bazı biyoaktifler oda sıcaklığında bile stabil olmadıklarından gerekli biyoaktif stabilitesini korumak için soğuk depolama koşulları sağlanması gerekmektedir [832, 834].

#### e. Yüzey etkin madde

Çözelti içeren biyoaktiflere eklendiğinde iyonik olmayan, katyonik ve anyonik yüzey aktif maddeler misel oluşturmakta ve biyoaktif partikülleri miselde sıkışmaktadır. OH gibi hidrolitik gruplar, misel kapağına nüfuz etmeyebildiğinden dolayı biyoaktif partiküllerine ulaşmayarak hidroliz oranı azalmaktadır [832, 834].

#### 2.8.4.2. Katı formu

Katı dozaj formları stabilitesi aşağıda bulunan faktörlerden etkilenmektedir:

##### a. Işık ve Oksijen

Birçok biyoaktif, ışıl ayrışma veya oksidasyona maruz kalabildiklerinden ışıktan ve oksijenden uzak tutulması gerekmektedir. Su oksijeni içerdiğinden, biyoaktifler nemden korunması için kuru koşullar altında saklanması gerekmektedir [832, 834].

##### b. Nem

Suda çözünebilir katı biyoaktifler neme maruz kaldıklarında, sıvı dozaj formları gibi benzer bir şekilde bozunmaya uğramaktadır. Örnek olarak, nem biyoaktiflerde amid veya ester bağlarının hidrolitik bölünmesini indükleyebilmektedir. Bu nedenle, üretim, paketlenme ve depolama olarak biyoaktif yapım aşamaları dikkatli bir şekilde seçilerek biyoaktifler nemden korunması gerekmektedir [832, 834].

##### c. Sıcaklık

Sıcaklık doğrudan ilacı veya yardımcı maddelerini doğrudan ya erime ya da polimorfizmi tetikleyerek etkileyebilmektedir. Sıcaklık, bağıl nemi değiştirerek ilacın ayrışmasını dolaylı olarak etkileyebilmektedir [832, 834].

#### ç. Yardımcı maddeler

İlacın bozulmasının, yardımcı maddelerlerin su içeriği ile orantılı olduğu bulunmuştur. Magnezyum trisilikat, nişasta ve povidon olarak yüksek nem içeriğine sahip olan yardımcı maddelerin örnekleridir. Katı dozaj formlarında bulunan yardımcı maddeler arasındaki kimyasal etkileşimler bozunma oranını arttırabilmektedir [832, 834].

### 2.8.5. Malzeme Bozunmasının Mekanizması

Sıvı, katı ve yarı katı dozaj formları gibi farklı dozaj formlarına sahip olan biyoaktif ürünleri, genellikle bir tür kimyasal bozulmaya veya zamanla bozulmaya uğrayabilmektedir. Dozaj formunda olan bu değişiklik ya renk değişikliği ya da kimyasal yapısı gibi ilacın fiziksel görünüşünü potansiyelinde ya da güvenliğinde bir değişiklikte değiştirebilmektedir. Çeşitli bozunma modları fitokimyasal ayrışma, hidroliz, izomerizasyon ve polimerizasyon olarak tanımlanmıştır. Gerçekleştirilecek olan bozulma modu, biyoaktif moleküllerinde mevcut olan kimyasal grupların tipine göre belirlenmektedir. Bazı biyoaktifler birden fazla bozulma moduna girebilmektedir.

#### a. Fitokimyasal

Işık maruziyeti, bazı biyoaktif ürünlerinin kimyasal bozulmasını başlatabilmektedir. Fitokimyasal reaksiyonlar ya foto-oksidasyonu olarak oksijene bağlı ya da dehidrojenasyon, yeniden düzenleme ve dimerizasyon gibi oksijenden bağımsız olabilmektedir. Bazı durumlarda, fitokimyasal degradasyon, ilacın renginin bozulması olarak ortaya çıkabilmektedir. İlaçların foto-degradasyonunu önlemesinin etkin bir yolu, çözelti dozaj formları için amber renkli cam kaplar kullanılmaktadır. Diğer araçlar arasında, tabletler için ışığı absorbe edebilen ve aynı zamanda ışığa duyarlı biyoaktif ürünlerinin karanlıkta saklanabildiği karton kaplamaların, alüminyum folyo sargıların ve film kaplamanın kullanımı yer almaktadır [832, 834].

#### b. Hidroliz

Hidroliz bir terim olarak su içinde bölme anlamına gelmektedir. Hidrolitik bozunma, bir karboksilik asit türevi veya bir amid, ester, imid, karbamat, laktam veya lakton gibi bu kısma dayanan bir moleküler grup içeren bir biyoaktif için oluşmaktadır. Örnek olarak, bu tür biyoaktiflere asetilsalisilik asit, fizostigmin ve metildopa dahil olmaktadır. Hidroliz, hem spesifik

asit-kataliz olarak hidrojen iyonları veya spesifik baz-kataliz olarak hidroksil iyonları hem de asidik veya bazik türler içeren tampon ile katalize edilebilmektedir. Asit-baz katalizli hidrolize karşı olan ilacın dayanıklılığını sağlamak için çeşitli yolları mevcuttur. En yaygın olanı, maksimum stabilitede belirlenmiş pH'nın değerleriyle biyoaktif formüle edilmektedir. Hidroliz ayrıca alkol, gliserin veya propilen glikol gibi sulu olmayan çözücülerin eklenmesiyle de olabilmektedir. Dekstroz, glukonat, sitrat ve sorbitol gibi katkı maddeleri kullanılarak ilacı daha az çözünür hale getirmek degradasyonu engellemek için başka bir yöntemdir. İlaç ile kompleks oluşturan bir bileşik veya bir ilacın yüzey etkin maddelerle çözündürülmesi, birçok ilacın stabilitesini artırabilmektedir [832, 834].

### c. İzomerizasyon

İzomerizasyon, ilacın optik veya geometrik izomerlerine değişme sürecini ifade etmektedir. Bu gibi izomerler, genellikle terapötik bir etkililiğine sahip değildir. İzomerizasyon düşük pH ile katalize edilebilmektedir [832, 834].

### ç. Oksidasyon

Bu biyoaktif bozulmasının başka bir yaygın yoludur. Hidroliz ile eşzamanlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Oksidasyon, elektropozitif bir atom, radikal veya elektron kaybı veya elektronegatif bir atom veya radikalın eklenmesiyle oluşmaktadır. Genellikle oksidasyon işlemi, oksijeni serbest radikallerle oldukça yavaş zincir reaksiyonları yoluyla birleştirmeyi içermektedir. Bu serbest radikaller çoğunlukla ışık, ısı veya eser metallerin etkisi ile organik bileşiklerden kaynaklanmaktadır. Oksidasyon ile bozunabilen biyoaktifler arasında fenolik bileşikler bulunmaktadır. Oksidasyonu önlemek ve biyoaktifleri stabilize etmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntem onları anaerobik koşullar altında saklamaktır. Bu, kaplarda bulunan oksijen nitrogen veya karbon dioksit ile değiştirilmektedir. Ayrıca, demir, kobalt ve nikel gibi ağır metaller, oksidasyon işlemi için katalizörler olarak hareket edebildiklerinden, depolama veya üretim sırasında bu metallerden yapılmış kapların kullanılmasının önlenmesiyle oksidasyona karşı koruyucu bir yöntem olabilmektedir. Diğer yöntemler, depolama sıcaklığının azaltılmasını ve birçok durumda yararlı olduğu kanıtlanmış olan küçük miktarlarda antioksidanlar veya indirgeyici maddelerin eklenmesini içermektedir [832, 834, 835].

**Tablo 2.7:** Biyoaltif bileşiklerinin stabilitesinin incelenmesinde literatürde gösterilmiş çalışmaların özeti

Stabilite ölçümünde incelenmiş parametre			Bileşik / Bitki	Stabilite hakkında yapıldı yorum	Kaynak
Ana parametre	Değeri / Türü	Ekstra parametre			
Işık	Floresan lambası	25-55°C Oksijen	Kızılılık antosiyaninleri	Işık ile 40°C'de antosiyaninlerin çoğunu bozulmuşlardır Işık, renk stabilize eden antosiyaninlerde içeren koimiarik asidinin süstitüentlerinin trans-cis-izomerizasyonua bir yolu sunamaktadır	[836, 837]
			Askorbik asit Karotenoidler Siyanidin-3- $\alpha$ - <i>O</i> -ramnozidde		
Işık	-	-	Pelargonidin-3- $\alpha$ - <i>O</i> -ramnozidde Siyanidin-3-glukozit Siyanidin-3-rutinosid	Stabilite reaksiyon kinetiğinin modeli birinci derecedendir. Sistemin bozunma oranı, karanlıkta ışığın altından 7.1 kat daha hızlıdır.	[837, 838]
Işık	UV ve görünür ışık	-	Betalain	UV ve görünür ışık, kromoforun elektronlarının daha enerjik bir duruma uyarılmasıyla sonuçlanmıştır. Böylece molekülün daha yüksek	[839-841]

				reaktivitesi veya azaltılmış aktivasyon enerjisi ortaya çıkarmaktadır	
Işık	2200-4400 lux	-	Betalain	Betalain stabilitesi ve ışık şiddeti arasındaki ters ilişki vardır	[836]
Işık	-	>25°C 40°C<	Betalain	>25°C (Işığın etkisini gözlenmiştir) 40°C< (Işığın etkisi yoktur)	[842, 843]
Işık	-	Oksijen Sıcaklık	Karotenoidler	Işığın ısıya göre $\beta$ -karoten cis-izomerlerinin izomerizasyonu ve degradasyonu üzerinde daha büyük bir etkisi vardır.	[844]
Işık	-	Sıcaklık	Likopen pigmentleri	Işığın etkileri yüksek sıcaklıktan daha yıkıcıymıştır	[845]
Işık	Floraslan lambası Morötesi ışık	-	Karotenoidler	Görünür ışığa göre ultraviyole daha şiddetli olarak etkiliymiştir	[845]
Işık	Doğrudan güneş ışığı Morötesi ışık	-	Karotenoidler	Bu tip ışıklar, trans-cis fotoizomerizasyonunu ve karotenoidlerin foto-destrüksiyonu oluşturmaktadır Karotenoidler üzerindeki çalışmaların hafif kısık ışık altında yapılmasını gerekmektedir. Örnek olarak, tüm ekstraksiyon prosedürleri, karotenoidlerin izomerizasyonunu veya bozunmasını önlemek için kısık	[846]



Işık	-		Saf karotenoidler Karotenoid- arabinogalaktan kompleksleri	ışık altında gerçekleştirilmiştir.  Saf karotenoidlere kıyasla, karotenoid-arabinogalaktan kompleksleri, fotodegradasyona karşı gelişmiş bir stabilite sergilemektedir  Karanlıkta, I3C, 1 saat sonra toplam radyoaktiviteyi oluşturan benzersiz bileşiktir	[847]
Işık	-	Karanlık	I3C 3,3'- diindolilmetan	Sadece 24 saatlik bir inkübasyon döneminden sonra 3,3'- diindolilmetanın %4 olarak çok zayıf bir oranında gözlenmiştir.  Bu, miyrosinazın enzimatik aktivitesinin aydınlatma koşullarından etkilenmediğini göstermiştir.	[848]
Işık	-	Karanlık	Glukorafanin	Fakat indol türevleri ışığın varlığında daha reaktif ve bu yoğunlaşmanın fotokimyasal olarak başlatılması gerekmektedir  Ekstraksiyon dokuz gün boyunca aydınlatıldığında glucoraphanin içeriği 0.0548 mg / mL'ye kadar azaltmıştır.	[845]
Işık	-	-	Karotenoidler Proteinler	Dokuz gün boyunca karanlıkta saklandığında, 0.0775 mg / mL'ye kalmıştır.  Işık birçok gıda sisteminde oksidasyona neden olmuştur	[849-852]

## Lipidler

## Vitaminler

				Gıdaların depolanması sırasında karotenoid destrüksiyonunu başlıca nedeni oksidasyondur.	
Işık	-	Oksijen Enzimler	Karotenoidler	Işığa ve enzimlere maruz kaldıklarında oksidasyona duyarlıdırlar.	[853-855]
				Ancak ortamın azaltılmış su aktivitesi koruyucu bir role sahiptir	
				Karotenoidlerin oksidasyonu ya oksijen varlığında oto-oksidasyon ya da ışık varlığında foto-oksidasyon nedeniyle oluşmaktadır	
Işık	-	Oksijen	Karotenoidler	Karotenoidlerin oksidasyonu, epoksi, hidroksil ve karbonil gruplarına sahip bileşikler gibi renksiz son ürünlerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır	[856]
				Genel olarak, karotenoid oksidasyon oranı karotenoid yapına, oksijene, sıcaklığa, ışığa, su aktivitesine, pH'a, metallere, enzimlere, doymamış lipidlerin varlığına, mevcut karotenoidlerin türü ve fiziksel durumuna, işlemin şiddeti ve süresine, ambalaj malzemesine, depolama koşullarına ve pro ve antioksidanların varlığına bağlıdır	Namitha and Negi, 2010).
Işık	-	Tüm	Karotenoidler		
Işık	-	Tüm	Likopen	Likopen stabilitesi ışık, su aktivitesi, oksijen, pH, sıcaklık ve	[857]

			pro-oksidan veya antioksidanların varlığının bir işlevidir.	
			Oksijen bağımsız reaksiyonlar, sarı tutku meyvesi meyve suyu rengini ve antioksidan aktivitesini etkilemektedir	
	-	Karotenoidler	Aynı zamanda askorbik asit ve sükroz'ün zenginleştirilmesi karotenoidlerin stabilitesini artırmaktadır	[858]
			Kurutulmuş sebzeler, depolama sırasında havaya maruz kaldıklarında yüksek oranda doymamış moleküllerin oksidasyonuna bağlı olarak renk kaybetmektedir	[859]
Işık	-	Karotenoidler	Aynı zamanda $\beta$ -karoten degradasyonu, kurutulmuş havuçlarda istenmeyen bir lezzetin gelişimi ile ilişkilidir.	
			Çaydaki predominant fenolik bileşikler, karanlıkta düşük sıcaklıktan daha yüksek stabilite göstermiştir.	
Işık	-	Karanlık Sıcaklık	EGC EGCG EGC	[860]
			Bu da, sıcaklık ve ışık olarak iki saklama koşullarının, yeşil çay saklama sırasında fenolik stabiliteyi etkilemek için anlamlı bir faktörler olduğunu gösterilmiştir	
Işık		Karanlık	Fenoller	[861]
			Sıcaklıkta altı ay süren sızma zeytinyağının depolanması	

	Sıcaklık (6-18°C)		sırasında toplam fenollerde neredeyse %60'lık bir azalma meydana gelmiştir.
	Karanlık		Karanlık depolaması 12 ay sonra toplam fenollerin %50'sinde azalmaya neden olmuştur.
Işık	Karanlık Sıcaklık (20°C)	Fenoller	Kapalı şişelerde saklanan sızma zeytinyağında fenolik bileşiklerin anlamlı kayıpları bulunmuştur [862]
Işık	Karanlık Sıcaklık (25°C)	Fenoller	Sızma zeytinyağında 12 ay sonra fenol içeriğinde anlamlı bir azaltmayı gösterilmiştir [863]
	Karanlık		Sonraki oksidatif stabilite kaybı da belirlenmiştir
Işık	Sıcaklık (8°C)	Askorbik asit	Askorbik asit, 52 gün boyunca hava geçirmez kaplarda depolanan meyve suyuna ışık etkisinden etkilenmemiştir [850]
Işık	Karanlık Sıcaklık (3°C)	Askorbik asit	Folyo kaplı şişelerdeki saklanan ticari meyve suyu, 18 gün boyunca şeffaf şişelerden daha yüksek askorbik asit tutmuştur [845]
Işık	Karanlık Sıcaklık	Askorbik asit	Işık geçirmez ambalaj içinde saklanan yeşil çay, daha yüksek askorbik asit tutmuştur [845]
Işık	-	Betalain	Işık maruziyeti betalain stabilitesini azaltmaktadır [864-867]
Işık	Oksijen	Betalain	Askorbik ve izoaskorbik asitlerle suplementasyonunun, oksijenin giderilmesiyle betalain stabilitesini [868] .

			artırdığı bildirilmiştir.
			Işığın etkisi tek başına % 15.6 olarak betanin bozulmasına neden olmuştur.
Işık	Oksijen	Betalain	Oksijen'in etkisi tek başına % 14.6 olarak betanin bozulmasına neden olmuştur. [867]
			Işığın ve oksijen'in beraber etkilendiğinde % 28.6 olarak betanin bozulmasına neden olmuşlardır.
Işık	Oksijen	Betalain	Işık, oksijen varlığında Betalain'in bozulmasına neden olmuştur [836]
Işık	Oksijen	Betalain	Anaerobik koşullar altında ışığın etkisinin ihmal edilebildiğini bulunmuştur. [842]
Işık		Betasianin	Kırmızı pancar ve mor pitaya meyve sularının asitlerle suplementasyonları, meyve suyu depolama sırasında ışığa bağlı betayanin degradasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. [864, 865]
Işık	Karanlık Sıcaklık (38°C)	Gül ekstraktı	Depolama sırasında gül ekstraktlarında ışığa maruz kalanlar, karanlıkta tutulandan % 15 olarak daha belirgin bir azalma göstermiştir [869]
Oksijen		Betanin	Stabilite artan oksijen konsantrasyonu ile doğrusal olarak azalmıştır [870]

Oksijen	Nitrojen	Betanin	Anlamlı ölçüde stabilite artmıştır	[868]
Oksijen	Hidrojen peroksit	Betanin	Betanin degradasyonu hızlanmıştır	[871]
Oksijen		Antosiyaninler Polifenol	Renkli pirinçte toplam antosiyanin içeriği % 0.5 ve 10 olarak düşük O <sub>2</sub> konsantrasyonları altında tutulmuştur  Polifenol içerikleri, 4 aylık depolama süresince polifenol içeriği önemli ölçüde azalmıştır	[845]
			Serbest ve çözünen konjuge fenolik içerikli polifenol içerikleri, O <sub>2</sub> içermeyen depoda minimum kayıp göstermiştir	
			%5 olarak O <sub>2</sub> ieren depoda örneklerde asgari çözünmeyen bağlı fenolik kaybı tespit edilmiştir	
Oksijen		Betanin	Stabilite oksijen konsantrasyonu ile negatif bir korelasyon göstermiştir	[870]
Oksijen		Betanin	O <sub>2</sub> ile etkilenen betaninin bozunma kinetiği rapor edilmiştir	[872]
Oksijen	Nitrojen	Betanin	Stabilitenin gelişimini gözlenmiştir	[845]
Oksijen		Amarantin Betanin	Amaranthin, anaerobik koşullar altında betaninden daha az kararlıymıştır	[842]
Oksijen		$\beta$ - karoten	Oksijensiz ortamda tozların depolanması, onların raf ömrünü uzatmaktadır	[873]

Oksijen		Karotenoidler	Kırmızı biber oleoresinleri gibi yağlı gıda katkı maddelerinde karotenoidlerin bozulmasını önlemek için daha uygun bir stratejinin, gıdaların oksijen ile temasını en aza indirgeyeceğini belirtmişlerdir	[874]
Oksijen	101.325 kPa O <sub>2</sub> 1.5 kPa O <sub>2</sub> 15 kPa CO <sub>2</sub>	Glukozinolatlar	Kuramsal atmosfer altında depolama, 4 ila 7 gün arasında kalitenin muhafaza edildiğini ortaya çıkarmıştır	[875]
Oksijen		Brokoli	1.5 kPa O <sub>2</sub> ve 15 kPa CO <sub>2</sub> altında depolama, en az 14 gün boyunca bir kaliteyi göstermiştir	[876]
Oksijen	% 1-2 O <sub>2</sub> % 5-10 CO <sub>2</sub> Sıcaklık (0-5°C)	Brokoli	Kontrollü atmosfer depolama, brokoli kalitesinin korunmasında çok etkili olmakta ve hasat sonrası iki katına çıkabilmektedir	[877]
Oksijen	1.5 O <sub>2</sub> 6□□CO <sub>2</sub> Sıcaklık (4°C, 20°C)	Glukozinolatlar	Kaliteyi korumak için yaşamın ideal atmosferi kaydedilmiştir	[878]
			Brokoli kafaları, kontrollü bir atmosfer altında, 4°C'de 25 gün boyunca, aynı sıcaklıktaki havada depolanan kafalardan anlamlı ölçüde daha yüksek glukofanin seviyeleri için depolanmıştır	[878]
			Glukografanin ve glukoziberin içeriği toplam glukozinolatlardaki artışları yansıtmaktadır	
			Depolamadan sonra kafaların havaya aktarılması, glukosinolat	

içeriği üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır

Glikosfaninin hava altında rapor edilen artışı şaşırtıcı, çünkü 4 ve 20°C'de havada tutulan brokoli başlarındaki glukosinolatlarda düşüş gösteren depolama çalışmasının büyük bir kısmı ile çelişmiştir

Oksijen	% 1-2 O <sub>2</sub>	% 5-10 CO <sub>2</sub>	Sıcaklık (20°C)	Glukorafaninin	Havada ve 20°C'de depolanmış brokoli 7 gün içinde %50 glukorafanini kaybetmiştir	[845]
Oksijen			pH	Kateşinler	Hidroksil serbest radikalleri üzerinde daha az belirgin etkiye sahiptirler.	[879, 880]
Sıcaklık	8°C			Antosiyanin pigmentleri	Kateşin oksidasyon oranının pH ve oksijen konsantrasyonu ile arttığı gösterilmiştir	
					1 gün depolamadan sonra antosiyaninlerde küçük bir artış bulunmuş ve bunu 7 gün depolamadan sonra azalma izlemiştir	[881]
					Bireysel antosiyaninlerin stabilitesinde büyük bir fark olduğu gözlenmiştir	
					Glikozitler karşılık gelen arabinosidlerden daha	



				kararlıymıştır
				Malonlanmış antosiyaninler, karşılık gelen asilatlanmamış pigmentlerden daha kararlıymıştır
				Kırmızı etli patateslerden ve kırmızı turplardan iki asillenmiş pelargonidin bazlı antosiyanin ve 25°C'de ve karanlıkta 2°C'de 65 haftalık depolama süresince C-18 reçinesi ve meyve suyu işleme olarak iki ekstraksiyon yöntemi değerlendirilmiştir
Sıcılık	2°C 25°C	Karanlık	Antosiyaninler	10 haftalık yarı ömüre sahip olan patates suyu konsantresi ile en düşük stabilitenin ve 22 haftalık yarı ömüre sahip plan C-18 saflaştırılmış turp antosiyaninleri daha yüksek stabilitenin elde edildiği gösterilmiştir [882]
				Antosiyanin degradasyonu büyük ölçüde depolama sıcaklığına, 25°C'de ikinci dereceden bir model ve 2°C'de lineer bir modelin ardından bozunma kinetiğine bağlıymıştır
Sıcılık	-15°C	Sakaroz	Antosiyaninler	Dondurmadan önce çileklere ağırlıkça 10, 20 ve 40 sakarozun eklenmesi üç yıl boyunca -15°C'de saklandıktan sonra antosiyanin bozunması üzerinde koruyucu bir etki göstermiştir [883]
Sıcılık	20°C	Sakaroz	Antosiyaninler	Sükroz ilavesi, esmerleşme ve polimerik renk oluşumunu [884]

-80°C

geciktirmiştir

Ek olarak, çözülmenin antosiyanin stabilitesi üzerindeki etkisi, 20°C'de 20 saat boyunca çilek örneklerinin muhafaza edilmesiyle incelenmiş ve çözülmüş örnekler 80°C'de yeniden dondurulmuş ve analiz için toz haline getirilmiştir.

Sonuç, çözündürmenin renk dekompozisyon oranını arttırdığını ortaya çıkarmıştır

Çilek meyvesi ve şeker pektin ve sitrik asit ile karıştırılmış, 15 dakika süreyle 78°C'de 500 mm-Hg vakum altında üretilmiş, 92°C'de ısıtılmış ve cam kavanozlara doldurulmadan önce 88°C'ye soğumaya bırakılmıştır

Reçeller 200 gün boyunca karanlıkta incelenen sıcaklıkta depolanmıştır

	20°C	Şeker	
Sıcılık	30°C	Pektin	Antosiyaninler
	37°C	Sitrik asit	

Sonuç, işleme sırasında siyanidin 3-glukozit, pelargonidin 3-glukozit ve pelargonidin 3-rutinoz, sırayla % 35.30, % 44.71 ve % 33.02 olarak en yüksek antosiyanin degradasyonu oranlarını göstermiştir [841]

Aynı sıcaklıkta çeşitler arasında antosiyaninlerin degradasyon kinetiğinde farklılıklar yokmuştur

Düşük sıcaklıkta çok daha kararlı

Sıcılık	4°C 15°C	Şeker	Antosiyaninler	olan depolama sıcaklıkları altında antosiyanin stabilitesinde farklılıklar bulunmuştur  Veriler, hafiflik değerinin, 28 gün boyunca ve 4°C ve 15°C sıcaklıkta önemli ölçüde azaldığını göstermiştir	[885]
Sıcılık	24°C 32°C 40°C	Işık (lamba 1.5 W) Karanlık Oksijen	Monomerik antosiyanin pigmentleri	Antosiyaninler için reaksiyon oranının sabiti 0.0095 gün <sup>-1</sup> 'den 0.0171 güne <sup>-1</sup> artmıştır  0.01 HCl içeren damıtılmış su içinde yeniden çözülmüş pigmentlerin ekstraktı, incelenen koşullarda depolanmış ve 1, 3, 6, 8 ve 14 günlük olarak depolama sonrasında analiz edilmiştir.  Peonidin-3-glukozit ve malvidin-3 glukozitin toplam dekompozisyon oranının depolama süresine ve sıcaklığa bağlı olduğu sonucuna varılmıştır.  Işık dekompozisyon oranı üzerinde ihmal edilebilen bir etki yapmıştır	[886]
Sıcılık			Lutein  $\alpha$ -karoten  $\beta$ -karoten  A vitamini	Havuç suyunun depolanması sırasında, artan depolama sıcaklığı ile incelenen bireysel bileşiklerin konsantrasyonu azalmıştır	[887]
Sıcılık	20°C		$\beta$ - karoten	9 ay boyunca 20°C'de saklanmış olan havuç suyundaki karoten	[845]

				renginde hiçbir etki yokmuştur
				Luteinin tüm trans ve cis formlarının içerikleri, depolama sıcaklığının artmasını takiben azalmıştır
				Bu da, ışığın yokluğunda bile bozulmanın devam edebileceğini göstermiştir
Sıcılık	4°C 25°C 35°C	Işık Karanlık	<i>Trans</i> -Lutein 9- <i>sis</i> -Lutein 13- <i>sis</i> -Lutein	Tüm trans-lutein 5 hafta boyunca 4 ve 25°C'de saklandıktan sonra [888] tespit edilmemiştir
				Aynı olay, tüm trans-lutein 35°C'de 4 hafta boyunca saklandıktan sonra ortaya çıkmıştır.
				Işık altında 9-cis- ve 13-cis-lutein bozulması, karanlıktan daha hızlı olma eğilimindedir
Sıcılık	4°C		Glukozinolatlar	4°C'de soğutma ve dondurma, brokoli'de içeren yüksek seviyede glukosinolatların muhafaza [876] edilmesi için en iyi koruma süreçleri olabilmektedir
				Dondurulmuş sebzeleri 4-8°C'de gibi evsel bir buzdolabında saklandığında, tek ve toplam glukosinolatların içeriği 7 gün boyunca saklanmaktadır [845]
Sıcılık	12-22°C -85°C		Glukozinolatlar	İlk 3 gün depolamada küçük değişiklikler olmuştur
				Depolamadan sonra, 7 gün

boyunca toplam glukozinolat analit içeriği %11-%27 azalmıştır

Bireysel glukosinolatlar için, glucoiberin, glukorafanin ve glukosalin kaybı, sinigrin, glukonapin ve progoitrin'den daha yüksektir

Brokoli içerisindeki glucoiberin kaybı %40-%50'imiştir

Oysa glukonapin kaybı incelen tüm sebzelerde %5-%10'imiştir

12-22°C gibi ortam sıcaklığında saklandığında incelenen Brassica sebzelerinin glukozinolat içeriğinde anlamlı bir azalma olmamıştır.

Ama o zaman, sebzeler gözle görülen biçimde çürümeye başlamıştır

85°C'de depolama, bitki hücrelerinin donma-çözülme kırılması ve groskazanın glukosinolatlara erişilebilirliğinin glukosinolatların çözülme sırasında izotiyosiyanatlara daha sonraki enzimatik dönüşümü ile erişilmesi nedeniyle önemli ölçüde glukosinolat kaybına neden olabilmektedir

Ayrı glukosinolatların kaybı %10-%53'miş ve 4-8°C'de buzdolabında saklamaktan toplam

				glukosinolatların kaybı 33 daha yüksektir	
				Düşük depolama sıcaklığı, kateşinlerin raf ömrünü uzatabilmektedir	
Sıcılık	4°C	pH (4.0)	Kateşin	4°C gibi düşük sıcaklık ve 4 gibi asidik pH, kateşin korunumu için en uygun depolama koşulları olarak bulunmuştur	[889]
Sıcılık	37°C	Butile hidroksitolü en (BHT)	Kateşin	BHT'nin 0.1 seviyesinde eklenmesi, depolanan 130 günde kalan 90 EGCG ile kateşinlerin daha uzun stabilitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir.	[890]
Sıcılık	50°C	Butile hidroksitolü en (BHT)	Gliserin	Gliserindeki BHT'nin $t_{90}$ 'ı 76 güne kadar artırdığı bulunmuştur	[891]
	10°C		Isoflavone	10°C gibi daha düşük depolama sıcaklığında 7 güne kadar, etanol ekstraksiyon çözeltilerindeki ayrı ayrı izoflavon konsantrasyonları sabit kalmıştır	[892]
Sıcılık	25°C		Malonylglucosides		
	40°C		Aglikonlar	Fakat 25 ve 40°C gibi daha yüksek sıcaklıklarda malonylglucosides glukosil formlarına düşürülmüş ve aglikonlar değişmemiştir	
			Fitokimyasallar	Bir fitokimyasal stabilitesi, depolama ortamına ve depolama süresine bağlıdır	[893];
				Depolama sırasında çeşitli fitokimyasalların genel stabilitesini	

			etkileyen en önemli faktörün sıcaklık olduğu belirtilmiştir
		Prosiyanidin B2 (PC-B2)	Hawthorn meyvesinde, incelenen tüm bireysel bileşikler, 4°C'lik bir depolama sıcaklığında 6 ay boyunca stabildir.
Sıcılık	4°C	(-) Epikateşin (EC)	Oda sıcaklığında, %8 kayıp oranı bulunarak HP'nin ve IQ'nın stabilitesi nispeten stabil, %30 kayıp oranı bulunarak CgA'nın stabilitesi orta stabil ve %50 kayıp bulunarak EC'nin ve PC-B2'nin stabilitesi oldukça kararsız arasında değişmiştir.
	25°C	Klorojenik asit (CgA)	
	40°C	Hiperosid (HP)	
		Isoquercitrin (IQ)	Bütün bu bileşikler 40°C'nin yüksek sıcaklığında kararsızdır
Sıcılık	5-8°C	Aktif maddeler	Sarı bükümsüz taze kaktüs meyvesi, 3 ila 4 haftalık depolama sırasında aktif maddelerin [845]
		Fenolik asit	konsantrasyonunda artış göstermiştir
Sıcılık	25°C	Fenolik asit	Öğütülmüş pirinçte, depolama sırasında fenolik asit muhtevasında tutarlı bir düşüş varmış ve [895]
	37°C		gerileme, 37°C'de 25°C'ye göre daha büyümüştür
Sıcılık		Askorbik asit	Depolamanın süresi ve sıcaklığının artmasıyla kurutulmuş guava'da askorbik asit içeriğinde progresif bir azalma olmuştur [896]
Sıcılık	10°C	C vitamini	Yeşil yapraklarda ve havuçlarda [897, 898]
			içeren toplam C vitamini,

Sıcalık	C vitamini	depolama sıcaklığında ve sürede bir artışla azalmıştır.	[845]
		Greylfurt suyundaki toplam C vitamini, 12 haftalık depolama sonunda en düşük sıcaklıkta daha yüksek tutulmuştur	
		Bir alkollü portakal suyu içeceğinin askorbik asit bozunması sıcaklıktan etkilenmemiştir	
Sıcalık	Askorbik asit	Esmerleşme derecesi, furfural ve limonen içeriğinin birikmesi gibi diğer kalite parametreleri, depolama sıcaklığı ile yüksek korelasyonlu vardır	[899]
		Meyve suları, antosiyaninlerle birlikte meyve birleştirmelerinin çoğunda bulunan askorbik asit olarak fitokimyasalların stabilitesini arttırmak için soğutulmasını gerektirmektedir	
		Aynı zamanda daha yüksek sıcaklıklarda karşılıklı olarak destrüktif olabilmektedir	
Sıcalık	Askorbik asit Antosiyaninler	Bu destrüktif, dehidroaskorbik asit parçalanma ürünlerinin oluşumuyla ilişkilendirilmiştir.	[845, 900-902]
		Ancak, olumsuz etkileşimleri için tam mekanizma tam olarak aydınlatılmamıştır.	
		Askorbik asit stabilitesi antosiyanin içeren meyve suyu karışımlarında önemli, çünkü	



askorbik asidin bozunma ürünleri  
antosiyeninleri bozabilmektedir

Askorbik asit eklenmiş ve eklenmeksizin üzüm suyu model sisteminde toplam antosiyeninlerde %12 olarak azalma bildirilmiştir.

Eklenen askorbik asit, polifolollerin antosiyeninleri stabilize etmeye yardım ettiği şarap yerine, antosiyenin stabilitesini azaltmıştır

Siyanidin-3-glukozit içeren meyve suyu renginin %90'ını 10°C'de 60 gün boyunca tutmuştur

25°C'de depolamada renk kaybı %10-17 iken, 38°C'de %35-49'a çıkmıştır

Termal olarak işlenmiş yabanmersini sularında antosiyeninlerin degradasyonunda artan depolama sıcaklıklarıyla anlamlı ölçüde hızlandırılmıştır

100-700 MPa, 40-121°C olarak kombine edilmiş basınçlı sıcaklık işlenmesi, pastörize edilmiş meyve suyunun, ortam basıncındaki ısı işlemlerine kıyasla, depolama sırasında toplam antosiyeninlerin biraz daha hızlı bir şekilde bozulmasına yol açmıştır

15 dakika boyunca 400 ve 550 MPa olarak yüksek hidrostatik

Sıcılık

10°C

25°C

38°C

Siyanidin-3-  
glukozit

[903]

Sıcılık

25°C

40-121°C

0.1 MPa

100-700

MPa

Antosiyeninler

[904]

Sıcılık

25°C

Fitokimyasallar

[902]

basınç işleminden sonra askorbik asit ile zenginleştirilmiş muscadine üzüm suyunda fitokimyasallar 21 gün boyunca stabil olmuştur.

Biberiye ve kekik polifenolik ekstralarının eklenmesi, muscadine üzüm suyu rengini, antioksidan aktivitesini arttırmış ve depolama sırasında fitokimyasal kayıpları azaltmıştır

Ticari çay yapraklarının 20°C'de 6 ay süreyle depolanması, toplam fitokimyasal içeriğin giderek azalmasıyla sonuçlanmıştır

Çoğu epigalokateçin 3-gallate ve epikateçin 3-gallate'deki kayıplara bağlanmıştır

Epigalokateçin, birkaç gün sonra depolama sırasında (-)-catechin içine izomerize edilmiştir

Yeşil çay infüzyonunun antioksidan kapasitesindeki değişiklikler, daha düşük pH değerinde önemli ölçüde daha yüksek stabilite gösteren kateçinlerdeki değişikliklerle doğrudan ilişkiliymiştir

Yağ/su emülsiyonlarında kullanılan yeşil çay kateçinlerin, başlangıçtaki içeriğin oda sıcaklığında %70'ine düştüğü ve neredeyse altı ay sonra 40°C'de ihmal edilebilen miktarın kaldığı

Sıcılık 20°C Fitokimyasallar [905]

Sıcılık 40°C Epigalokateçin [906]

Sıcılık 40°C pH Kateşinler [845]

Sıcılık	25°C	Prosiyanidinler	bulunmuştur.	[907]
Sıcılık	25°C	Prosiyanidinler	Kateşin, epikateşin ve B1, B2, B3 ve B4 olarak prosiyanidinler dahil olmak üzere prosiyanidinlerin tam degradasyonları, konsantre edilmiş elma suyunun 25°C'de 9 ay boyunca depolanmasından sonra gözlenmiştir	[908]
Sıcılık	>4°C	Işık Karanlık	Kırmızı ahududu reçelinde bulunan izokurosin ve kaempferol 3-glukozit içerekleri, 6 aylık depolama sonrası hafifçe azalmışlardır	Zafrilla <i>et al.</i> , 2001)
Sıcılık	4°C	Kateçin	Catechin, aydınlatılmış depolamaya kıyasla karanlıkta depolanan sulu çözeltilerde daha kararlıdır	[845]
Sıcılık	23°C	Kateçin	80 günlük depolama süresi boyunca soğutma sıcaklığında saklandığında, kateşin stabilitesi daha da geliştirilmiştir.	[909-911]
			Meyve suyundaki kateşinlerin bozunması, yüksek depolama sıcaklığında, düşük depolama sıcaklığından daha fazla ve bozunma yolu, oksidatif süreçlerle ilgilidir.	
			Oksidasyon çeşitli sıcaklık koşulları altında meydana gelebilmektedir	
			Reaksiyon oranları genellikle daha yüksek sıcaklıklarda daha hızlı ve	

sulu çözültide çözülmüş oksijene bağlıdır

Bireysel olarak hızlı dondurulmuş siyah ahududu,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de uzun süreli depolama sırasında antosiyaninleri korumuştur [912]

Sıcılık  $-20^{\circ}\text{C}$

Antosiyaninler

Ancak 6 ay boyunca depolamanın ardından ısıtma, toplam antosiyaninlerde %49-75 arasında değişen büyük kayıplarla sonuçlanmıştır

Hager *et al.*, 2008).

Sıcılık  $-25^{\circ}\text{C}$

Antosiyaninler

Ön-ısı işleminden sonra 6 ay boyunca  $-25^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış yaban mersini'nin toplam antosiyaninlerinde %62-85 oranında kayıp göstermiştir

[845]

Farklı süreler için  $95^{\circ}\text{C}$ 'deki ısı işleminin, çay kateşinlerinin başlangıç konsantrasyonu üzerinde bir etkisi olmamıştır.

Sıcılık

$95^{\circ}\text{C}$

Kateşinler

Isıl işlem, tüm çay kateşinlerinin depolama stabilitesini düşürmüştü ve ısıtma süresi, polifenolik stabilitesinde bir faktör değilmiştir

[913]

$85^{\circ}\text{C}$

Yeşil çayda,  $85^{\circ}\text{C}$  gibi hafif ısı pastörizasyonu, daha yüksek sıcaklıklara göre daha uzun depolama süresi için karakteristik renk ve lezzetini korumuştur

Sıcılık

Bağıl nem

Polifenolik

Karotenler

Yüksek sıcaklık, zaman süresinin dikkatı alınmadan depolama sırasında polifenol stabilitesini

[914]

düşürerek negatif bir etki yaratmaktadır

Hangi ısıl işlem ile askorbik asit kaybına atfedilebilmiştir

Depolama koşullarından bağımsız olarak taze sebzelerin karoten içeriğinde bir azalma bildirilmiştir.

Uygun olmayan bağıl nem ve sıcaklığın taze ürünün depolanması sırasında karoten kaybını hızlandırdığı gösterilmiştir.

Ispanak, solgunluktan sonra orijinal karotenoidlerin neredeyse %63.5'ini kaybetmiştir

Elde soyulmuş havuç disklerinde bulunan toplam karotenoidler, 8 günlük depolama süresince ince veya kaba karborundum plakaları aşınma soyulmuş havuç disklerinden anlamlı ölçüde yüksekmiştir

Sıcılık	4°C	Karotenoidler	[915]
	-10°C		
	2°C		
Sıcılık	10°C	<i>Trans</i> - Likopen	[916]
	20°C		
	37°C		
Sıcılık	-80°C	Fitokimyasallar	[917]
	4°C		

Domateslerin ve işlenmiş ürünlerinin depolanması sırasında tüm *trans*-likopen 20°C'de -10, 2 ve 37°C'ye kıyasla daha stabilmiş, çünkü bu sıcaklıkta *cis*- *trans*-'a yeniden izomerizasyonuna tercih edilmiştir

14 ay boyunca incelenen sıcaklıklarda beş çeşit siyah soya fasulyesinin fitokimyasal

25°C

bileşimlerinin stabilitesi belirlenmiştir.

Düşük sıcaklık depolama, uzun bir süre boyunca siyah soya fasulyelerindeki yağlı-çözünebilen fitokimyasalların kaybını azaltabilmektedir

Bununla birlikte, 14 ay boyunca depolama sırasında siyah soya fasulyesi toplam fenollerinde anlamlı bir azalma bulunmamıştır.

Oda sıcaklığında 1 aylık depolama süresinde lutein ve tokoferol önemli ölçüde bozulmuştur

Oysa 4°C'de 6 aya kadar ve -80°C'de 14 aya kadar stabit kalmışlardır

Soğuk preslenmiş kolza tohumu yağı içindeki tokoferol içeriğinin, 60°C sıcaklıkta, 7-11 günlük depolamada, taze yağda yaklaşık 200 mg/kg başlangıç değerinden sıfıra düştüğü bulmuşlardır. [918]

Sıcaklık

60°C

□- tokoferol

Tokoferol 14-15 günlük depolama süresinden sonra 600 mg/kg olarak başlangıç değerinin %5-10'una tutulmuştur

Sıcaklık

25°C

□- tokoferol

Oda sıcaklığında 12 ay süren depolama süresinden sonra zeytinyağında bulunan tokoferol tamamen yok olmuştur [861, 863]

Ancak düşük sıcaklıklarda 12 ay

süren depolama süresinden sonra %60 kayıp oranı bulunarak tokoferolün daha yavaş bir şekilde azaltılmıştır

Kapsül kabuğu bileşiminin, 60 gün boyunca 25°C'de ve %60 RH'de saklanan taze ve formüle edilmiş *Hypericum perforatum* ekstrakt kapsüllerinde fitokimyasalların stabilitesi üzerindeki etkisi belirlenmiştir.

Sıcılık 25°C Fitokimyasallar [845]

Fitokimyasallar kapsül kabuk kompozisyonuna karşı değişken bir stabiliteye sahiptir

*Neat Hypericum perforatum* ekstrakti tipik olarak kabuk kompozisyonuna karşı çok hassastır.

Ham havuç küplerinin -24°C'de uzun süreli depolanması, falkarinol içeriğini neredeyse %35 oranında azaltmıştır.

Sıcılık -24°C Falcarinol [919]

Uzun süreli depolama sırasında buharlı ağartmanın ardından falcarinol içeriğinde daha fazla azalma bildirilmemesine rağmen, depolamadan önce ağartma, havuçun falkarinol içeriğinin neredeyse üçte birini azaltmaktadır.

Sıcılık Polikosanol [845]

Asit hidrolizi, bazik hidroliz, oksidasyon, fotolitik bozunma ve termoliz tercih eden ortamlarda

Policosanol (PC) tamamlayıcının stabilitesi, orijinal PC tamamlayıcı için 5 yıllık bir raf ömrü olduğunu göstermiştir.

Depolama sıcaklığının ilk depolama süresi sırasında biksinin bozunması üzerinde hiçbir etkisi yokmuş, fakat daha sonraki aşamalarda, sıcaklık ile bozulmayı hızlanmış ve ikinci derece oranlı kinetik izlemiştir

Sıcaklık

Oksijen

Biksin

[869]

Reaksiyon oranları, oksijen molekülleri ve biksin arasındaki etkileşimi artırarak artmış ve sıcaklık, daha hızlı bozulmaya neden olan reaksiyon oranı üzerinde pozitif bir etkiye sahip olmuştur.

Brokoli'de hasat sonrası kalitenin korunması için 98-100 gibi yüksek bir bağıl nem önerilmektedir.

Hasat sonrası sıcaklıklar yaklaşık 4°C'nin üzerine çıktığında, RH sadece glukozinolat tutulmasında kritik bir faktör olarak görünmektedir.

Bağıl nem (RH)

nem

Yüksek RH

4°C

20°C

Glukosinolat

Düşük RH

Oksijen

[876]

Glukografanın içeriği düşük RH ve 20°C'de 5 gün boyunca bırakılan brokoli kafalarında 80'den fazla düşüş göstermiştir.

20°C'de düşük bağıl nem içeren açık kutularda depolanan brokoli kafaları, ilk üç gün boyunca



glukorafanın içeriğinde 50 azalma göstermiştir

90'den daha yüksek RH değerine sahip plastik torbalarda depolanan kafalarda 20°C'de belirgin bir kayıp görülmemiştir.

Glukoraphanın'deki azalma, belirgin bir görüntü kalitesi kaybı ile çakışarak, membran bütünlüğünün olası kaybını ve glikozinolatların düşük RH'de miyrosinaz ile karıştırıldığını göstermektedir

Su aktivitesi, su bağımlı hidrolitik reaksiyonu, reaktantların hareketliliğinin hızının azalması ve sınırlı oksijen çözünürlüğü nedeniyle aldinine bağ ayrılmasına karşı betanın duyarlılığında önemli bir rol oynamaktadır

Düşük su aktivitesi ile betanın stabilitesinin geliştirildiği bildirilmiştir [845]

Burada su aktivitesinin azaltılmasının en etkili olduğu değer 0.63'dir.

Su aktivitesi 0.32'den 0.75'e çıktığında, betain degradasyon oranında yaklaşık bir büyüklük büyüklüğünde bir artış gözlenmiştir.

$a_w < 0.63$   
Su aktivitesi  $0.32 < a_w$   
( $a_w$ )  $< 0.75$

Betain

Su aktivitesi  $a_w = 0.64$

Betain

Betain'in, kapsüllenmiş pancar [920]

$(a_w)$ 

pigmentlerinde 0.64 olarak  $a_w$ 'nin değerinde en büyük bozunmasını izlenmiştir

Bu da düşük  $a_w$  değerlerinde reaktantların hareketliliğinin azaltılmasıyla açıklanmıştır

Su aktivitesi

 $(a_w)$ 

Beta-siyanürler

Sprey kurutması ve konsantrasyon ile  $a_w$  indirgenmesinden sonra [921, beta-siyanol stabilitesinin arttığı 922] bildirilmiştir.

Genistein, enzimatik olmayan Maillard reaksiyonunda kendi başına veya lizin ile reaksiyona girebileceği rapor edilmiştir

Su aktivitesi

 $(a_w)$  $0.3 > a_w$ 

4°C

Izoflavonlar

Böylece, soya proteini izolatlarının ılımlı koşullarda depolanması sırasında izoflavon kaybına yol açmaktadır [923]

Maillard reaksiyonunu önlemek için 0.3'ten daha az bir su aktivitesine ve 4°C'den daha yüksek bir sıcaklığa sahip olan bir depolama koşulu önerilmiştir

Su aktivitesi

 $(a_w)$ 

30°C

Fitokimyasallar

Dondurularak kurutulmuş elma ürünlerinin 30C'de 45 günden daha fazla bir depolama sırasında fitokimyasal stabilitesi su aktivitesi [924] ile en çok etkilenmiş ve en yüksek nem aktivitesinde en yüksek kayıplar gözlenmiştir.

Su aktivitesi

 $(a_w)$ 

Fitokimyasallar

Eklenen yeşil çay ekstraktları için [845] fitokimyasal degradasyonu, nem

içeriğinden bağımsız olarak depolama süresi boyunca stabil olan kafein'in haricinde, daha yüksek nem içeriğinde daha hızlı gerçekleşmiştir

Aserola konsantresi ile nemin absorpsiyonu, fitokimyasalların stabilitesini etkilemiş ve fenoliklerin neredeyse %65 olarak yarısı bağıl nemde depolamanın ilk saatinde kaybolmuştur

Amaranthus pigment tozlarının üstün stabilitesi sulu çözeltilere kıyasla daha düşük  $a_w$  değerlerine bağlanabilmektedir

Sprey kurutmasının, muhtemelen kuru maddenin varlığının artırılmasıyla, beta-siyanların stabilitesini arttırdığı bulunmuştur.

Su aktivitesi  
( $a_w$ )

Düşük  $a_w$

Beta-siyanürler

Bu nedenle, pigmentin nem içeriğinin, stabiliteğini arttırmak için %5'in altında tutulması önerilmiştir.

[840, 866,  
925]

Pektin, muhtemelen  $a_w$  değerini düşürdüğüyle guar sakızı ve keçiyoynuzu zamkı gibi bazı matriks bileşiklerinin kırmızı pancar çözeltilerinin depolama stabilitesini arttırdığı gösterilmiştir.

pH

Asidik ortam

Fenolik

Fenolik bileşiklerin stabilitesi yüksek pH'ye bağlı ve yapısal konformasyona bağlı olarak

[926-928]

			değişmektedir
			Flavan-3-ols asidik koşullar altında yüksek depolama stabilitesi göstermektedir
			Ancak nötr pH'ta kararsızdır
			Asitlerin eklenmesi, çay içeceklerine stabilite kazandırmaktadır
pH	Düşük pH	Kateşin	Çünkü daha düşük bir pH, depolama sırasında çay [927] kateşinlerini stabilize etmek için daha etkilidir
			Ama, nötr pH'lı çay kateşinleri daha çabuk bozulmaktadır
			Narenciye aromasını taklit etmek için askorbik asit'in veya sitrik ve malik asit gibi organik asitlerin eklenmesi, muhtemelen pH'ın düşürülmesiyle, yeşil çayın aromalarını ve stabilitesini [929, 930] arttırmaktadır.
pH	Düşük pH	Polifenoller	Ayrıca, askorbik asit düşük pH'ta daha karalıdır. Bu da polifenoller üzerindeki koruyucu etkinin daha düşük pH'ta daha yüksek olduğunu göstermektedir
pH	Düşük pH	Predominant	pH'in indirgeyicisi, oksidatif bozulma sırasında klorojenik asit ve klorojenik asit izomerleri gibi oluşan predominant bileşiklerinin azalmasını yavaşlatmasında [931]

etkilidir.

Yeşil çayda, değişen pH, hidrojen peroksit üretim oranını etkilemektedir

pH Düşük pH Fenolikler Yeşil çay infüzyonu pH'ı [932]  
düşüğünde, hidrojen peroksit ve süperoksit üretim oranı anlamlı ölçüde azalmıştır

pH Yüksek pH Antosiyanin 3-deoksifosiyenin varlığı, yüksek pH'ta antosiyanin stabilitesini arttırmaktadır. [933]

Bu da gıda kullanımı için iyi bir renklendiricidir

Polifenoller depolama sırasında kolayca oksitlenmekte ve bu  $H_2O_2$  üretimi ile sonuçlanmaktadır

pH Düşük pH Polifenoller Depolama sırasında üretilen  $H_2O_2$ , polifenol bakımından zengin bir ürünü bozabilmekte ve askorbik asit,  $H_2O_2$ 'nin söndürülmesiyle depolama sırasında oksidatif [929, 932, 934-936]  
bozulma oranını azaltmada etkili olabilmektedir

Askorbik asit zenginleştirilmesi, polifenol bakımından zengin içeceklerde pH'ı düşürerek serbest radikal üretimini azaltabilirken, çay içeceğinin pH'ı nötr olduğunda koruyucu etki gözlenmemiştir.

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. MALZEME

##### 3.1.1. Bitkisel Malzeme

Gemlik türü zeytin yaprakları, Kasım ayında (2016) Marmara Bölgesi'ne bağlı Avşa Adası'nda yetişen ağaçlardan elle toplanmıştır. Zeytin yaprakları toplandıktan sonra kısa bir süre buzdolabında saklanmıştır. Ortalama boyutları, 100 adet taze toplanmış yaprağın uzunluğu, genişliği ve kalınlığının hassas kumpas aleti kullanılarak sırayla 10.72 mm, 55.74 mm ve  $\sim 2.6391667$  mm olarak ölçülüp aritmetik ortalamalarının alınması suretiyle bulunmuştur. Ekstraksiyon işleminden önce karanlıkta ve oda sıcaklığında muhafaza edilerek kurutulmuş zeytin yaprağı parçacıklarının çapı  $\approx 1.0$  mm olacak şekilde öğütülmüştür. Hazırlanmış örnekler kullanılana kadar karanlıkta ve oda sıcaklığında plastik torbalara koyularak kapalı bir ortamda saklanmıştır.

##### 3.1.2. Kimyasal Malzeme

Çalışmalarımızda polar, toksik özellik taşımayan ve ucuz bir çözücü olarak etanol seçilmiştir. Etanol (>%99.8 oranında kütle fraksiyon saflığı), alüminyum klorür, sodyum nitrit ve potasyum persülfat Merck'ten alınmıştır. Oleuropein, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin), folin-ciocalteu reaktifi, (+)-kateşin, sodyum karbonat, gallik asit, hidroklorik asit, sodyum hidroksit, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilroman-2-karboksilik asit (trolox) Sigma-Aldrich'den alınmıştır. Karışım analizlerini hazırlamak için Millipore Milli-Q su arıtma sisteminden  $8\text{m}\Omega$  deiyonize su kullanılmıştır.

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Ekstraksiyon

#### 3.2.1.1. Metodları

##### a. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HAE)

Zeytin yaprağı miktarı (g) sabit tutularak, homojenizatör destekli ekstraksiyon (HAE) yöntemi ile 4 parametre (ekstraksiyon süresi (saniye), karıştırma hızı (rpm), çözücü hacimi (mL) ve çözücü konsantrasyonu (% v/v)) incelenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktları homojenizatör (IKA T25 ULTRA TURRAX) kullanılarak hazırlanmıştır. 0.45 µm'lik bir şırınga filtresi ekstraktların süzülmesi için kullanılmıştır. Elde edilen ekstrakt numuneleri 2 mL kapasiteye sahip olan mikrosantrifüj plastik test tüplerde ve -20°C'de saklanmıştır.

##### b. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UAE)

Zeytin yaprağı miktarı (g) sabit tutularak, ultrason destekli ekstraksiyon (UAE) yöntemi ile 4 parametre (ekstraksiyon süresi (dakika), ultrasonik titreşimlerin genliği (%), çözücü hacmi (mL) ve çözücü konsantrasyonu (% v/v)) incelenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarının hazırlanması, farklı amplitüd değerleri ile birlikte pulse modunda (açık / kapalı) bir prob (VCX 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar 0.45 µm şırınga filtresi ile filtrelenmiştir. Elde edilen ekstrakt numuneleri 2 mL kapasiteye sahip olan mikrosantrifüj plastik test tüplerde ve -20°C'de saklanmıştır.

##### c. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Çözücü hacimi (mL) sabit tutularak, mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE) yöntemi ile 4 parametre (ekstraksiyon süresi (dakika), mikrodalga gücü (W), zeytin yaprağı miktarı (g) ve çözücü konsantrasyonu (% v/v)) incelenmiştir. Ekstraksiyon, 2.45 GHz'de ve 900 W'lık maksimum güçte çalışan bir mikrodalga cihazında (NEOSGR, Milestone Srl, İtalya) gerçekleştirilmiştir. Belirli bir yazılıma sahip olan mikrodalga cihazı bir video kamera ile donatılmıştır. Ekstraksiyon prosedürü atmosferik basınçta gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış ekstraktlar 0.45 µm'lik bir şırınga filtresi ile süzülmüştür. Elde edilen ekstrakt numuneleri 2 mL kapasiteye sahip olan mikrosantrifüj plastik test tüplerde ve -20°C'de saklanmıştır.

### 3.2.1.2. Ön Denemeleri

#### a. HAE

- a.1. Ekstraksiyon süresi (30, 45, 60, 75, 90 ve 105 saniye)
- a.2. Karıştırma hızı (3000, 6000, 9000 ve 12000 rpm)
- a.3. Çözücü hacimi (25 mL)
- a.4. Çözücü konsantrasyonu (%50, v/v)
- a.5. Zeytin yaprağı miktarı (0.5 g)

#### b. UAE

- b.1. Ekstraksiyon süresi (10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 dakika)
- b.2. Ultrasonik titreşimlerin genliği (15, 25, 35 ve 50%)
- b.3. Çözücü hacimi (40 mL)
- b.4. Çözücü konsantrasyonu (%50, v/v)
- b.5. Zeytin yaprağı miktarı (0.5 g)

#### c. MAE

- c.1. Ekstraksiyon süresi (1 ile 5 dakika)
- c.2. Mikrodalga gücü (100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 W)
- c.3. Çözücü hacimi (25, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 mL)
- c.4. Çözücü konsantrasyonu (%0, 10, 20, 30, 40 ve 50, v/v)
- c.5. Zeytin yaprağı miktarı (3, 4, 5, 6 ve 7 g)



### 3.2.2. Analizler

#### 3.2.2.1. Spektrofotometrik analizler

##### a. Toplam fenolik içeriğinin belirlenmesi

UV spektrofotometrisi (PG Instruments, T60 / Leicestershire ve İngiltere), ekstraktlarda bulunan toplam fenolik içeriğin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu yöntemine göre belirlenmiştir [909]. Kısaca, 20  $\mu\text{L}$  elde edilen ekstrakt numuneler 350  $\mu\text{L}$  distile suya eklenmiştir. Daha sonra, karışıma 2000  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteu reaktif maddesi (%10, v/v) ve 1600  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (%7.5, w/v) ilave edilmiştir. Karışımlar 30 dakika inkübe edilmiştir. Absorbans 765 nm'de ölçülmüştür. Çözücünün farklı konsantrasyonlarının kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde saf gallik asit kullanılmıştır. Toplam fenolik içeriğin miktarı (TPM) gram kurutulmuş ağırlık başına miligram galik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg-GAE / g-KY).

##### b. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Sakanaka ve ark.'nın yöntemi modifiye edilerek, ekstraktların toplam flavonoid içeriğini belirlemek için kullanılmıştır (510 nm) [937]. 25  $\mu\text{L}$  elde edilen ekstrakt numunelere 2225  $\mu\text{L}$  distile su ilave edilmiştir. Sonra çözeltiliye 113  $\mu\text{L}$   $\text{NaNO}_2$  (%5, w/v) ilave edilmiştir. 6 dakika sonra, karışıma 225  $\mu\text{L}$   $\text{AlCl}_3$  (%10, w/v) ilave edilmiş ve karışımın 5 dakika beklemesi sağlanmıştır. Bu çözeltiliye 750  $\mu\text{L}$   $\text{NaOH}$  (%4, w/v) ve 412  $\mu\text{L}$  ilave edilmiştir. Çözücünün farklı konsantrasyonlarının kalibrasyon eğrisinin elde edilmesinde saf kateşin kullanılmıştır. Toplam flavonoid içeriği (TFM) gram kurutulmuş ağırlık başına miligram (+)-kateşin eşdeğeri cinsinden ifade edilmiştir (mg-CE / g-KY).

##### c. Antioksidan aktivitenin (AA) belirlenmesi

###### c.1. DPPH tayini

Yu ve ark.'nın modifiye edilmiş yöntemi, elde edilen ekstrakt numuneler üzerinde 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testi uygulamak için kullanılmıştır [938]. Konsantre DPPH çözeltisi, 0.0079 g 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilin'e 40 mL metanol (%80, v/v) ekleyerek hazırlanmıştır. Her 10 mL çözeltiliye 40 mL metanol (%80, v/v) ilave edilerek seyreltilmiştir. Analiz 600  $\mu\text{L}$  metanolun (%80, v/v) 100  $\mu\text{L}$  ekstrakt numunelerine eklenerek başlatılmıştır. Ardından 3000  $\mu\text{L}$

seyreltilmiş DPPH, karışıma ilave edilmiştir. Karışımlar 25°C 'de 30 dakika boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Absorbans DPPH içermeyen boş çözeltinin numunesine katılarak 517 nm'de bir spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. DPPH radikalini süpürme kabiliyeti aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$AA(\%inhibisyon) = \frac{A_{Kontrol} - A_{Örnek}}{A_{Kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

Çözücünün farklı konsantrasyonlarının kalibrasyon eğrisi için saf troloks kullanılmıştır. Antioksidan kapasitesinin miktarı gram kurutulmuş ağırlık başına miligram troloks eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg-TEAC / g-KY).

### c.2. CUPRAC tayini

Apak ve ark.'nın metodu ekstraktların antioksidan kapasitesinin belirlemesi için kullanılmıştır [939]. 1000  $\mu$ L (0.02 M)  $Cu^{+2}$  çözeltisine, 1000  $\mu$ L (0.0075M) neokuprin ve 1000  $\mu$ L (1M)  $NH_4Ac$  ilave edilmiştir. Ardından, 25  $\mu$ L ekstrakt ve 1075  $\mu$ L distile su ilave edilmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Absorbans 450 nm'de okunmuştur. Çözücünün farklı konsantrasyonuna kalibrasyon eğrisi saf troloks kullanılarak yapılmıştır. Antioksidan kapasitesinin miktarı gram kurutulmuş ağırlık başına miligram troloks eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg-TEAC / g-KY).

### 3.2.2.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Oleropein kantitatif analizi, kuaterner pompa, bir dezenfektan ve manuel enjektör ile donatılmış bir HPLC sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC çalışma koşulları aşağıdaki gibi ve gradient elusyon programı tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Model: Agilent 1260 HPLC sistemi (Agilent, Waldbronn, ABD)

Kolon: Agilent Eclipse Plus (3.0 mm x 5.0 mm; 1.8  $\mu$ m; C18)

Dedektör: Diyot Dizi Dedektörü (DAD)

Mobil faz: A= Asetonitril + %0.1 formik asit (v/v) ve B= Su + %0.1 formik asit (v/v)

Dedeksiyon: 276 nm

Akış hızı: 0.8 mL/dakika

Kolon sıcaklığı: 40°C

Enjeksiyon miktarı: 20  $\mu$ L

**Tablo 3.1:** HPLC sisteminin gradient elusyon programıdır

Süre (dakika)	A (%)	B (%)
0.0 - 7.0	100	0
7.0 - 7.1	60	40
7.1 - 8.6	0	100
8.6 - 10.0	100	0

### **3.2.2.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)**

SEM (Quanta FEG 450, FEI, Oregon, ABD), HAE, UAE ve MAE yöntemlerinden önce ve sonra zeytin yapraklarının morfolojik değişimini aydınlatmak için kullanılmıştır. Taze ve işlenmiş yapraklar, 25°C'de vakumlu fırında kurutulmuştur. Numuneler 5 nm'lik ince bir altın film tabakası ile kaplanmış ve yüksek vakum altında 20 kV'luk bir çalışma voltajında gözlemlenmiştir (50  $\mu$ m).

### **3.2.3. Yönetimlerin modellemesi**

Yukarıda belirtildiği gibi ön denemeler ile belirlenmiş şartlar ile proses parametrelerinin sayısı ve seviyeleri belirlenmiş olup HAE, UAE ve MAE yöntemlerine uygulanarak Cevap Yüzey Yöntemi (CYY) ile Design Expert (9. ve 10. sürüm) paket programı kullanılarak deneysel tasarım uygulanmıştır. Tablo 3.2'ye zeytin yapraklarının HAE, UAE ve MAE metotları ile ekstraksiyonunda kullanılan bağımsız parametreler, birimleri, değişkenlerin sembolleri ve seviye değerleri sunulmuştur.

**Tablo 3.2:** HAE, UAE ve MAE'nin optimizasyonu için CYY'de kullanılan bağımsız değişkenlerin değerleri, seviyelerin kodu ve sembolleri.

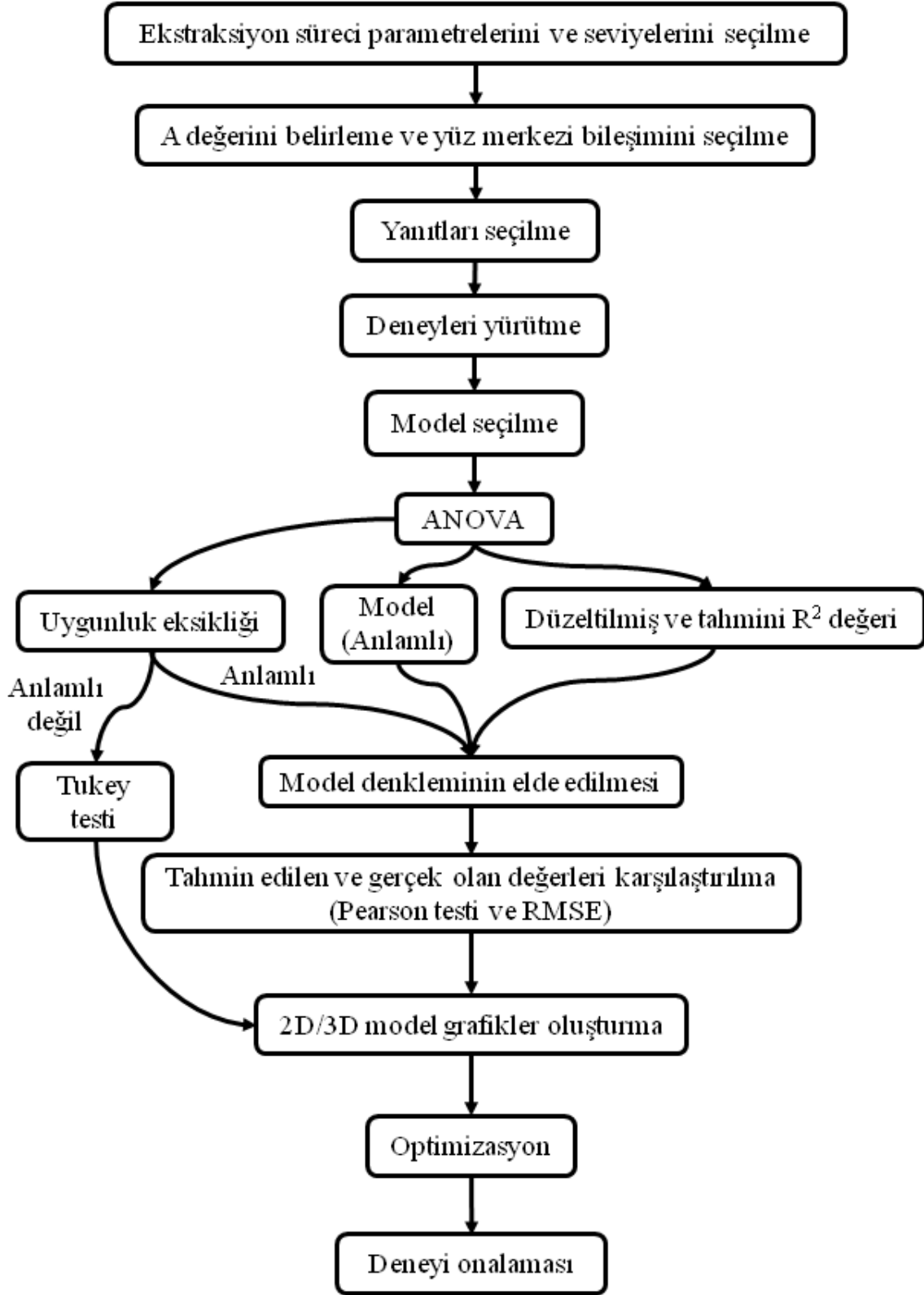
Metod	Bağımsız değişken	Birim	Değişkenlerin Sembolu	Seviyelerin Kodu		
				-1	0	1
HAE	Karıştırma hızı	rpm	X <sub>1</sub>	4000	7000	10000
	Ekstraksiyon süresi	saniye	X <sub>2</sub>	30	60	90
	Çözücü konsantrasyonu	%, v/v	X <sub>3</sub>	0	50	100
	Çözücü hacimi	mL	X <sub>4</sub>	15	25	35
UAE	Ultrasonik titreşimlerin genliği	%	X <sub>5</sub>	25	30	35
	Ekstraksiyon süresi	dakika	X <sub>6</sub>	40	50	60
	Çözücü konsantrasyonu	%, v/v	X <sub>7</sub>	0	50	100
	Çözücü hacimi	mL	X <sub>8</sub>	15	25	35
MAE	Mikrodalga gücü	W	X <sub>9</sub>	150	200	250
	Ekstraksiyon süresi	dakika	X <sub>10</sub>	0.5	1.0	1.5
	Çözücü konsantrasyonu	%, v/v	X <sub>11</sub>	10	25	40
	Zeytin yaprağı miktarı	g	X <sub>12</sub>	5	6	7

Tablo 3.2’de gösterdiği gibi farklı ekstraksiyon yöntemlerinin seçilmiş parametreleriyle elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarında bulunan TPM, TFM ve AA miktarlarına bağlı değişkenlerin etkileri ve dört faktörlü merkezi kompozit tasarım (MKT) kullanılarak planlanan deneylerin modellenmesi gerçekleştirilmiştir. Her yöntem için sırayla (HAE, UAE ve MAE olarak) toplam fenolik içeriği (Y<sub>1</sub>, Y<sub>3</sub> ve Y<sub>5</sub>) ve toplam flavonoid içeriği (Y<sub>2</sub>, Y<sub>4</sub> ve Y<sub>6</sub>) yanıtlardır. Her ekstraksiyon yöntemi için X<sub>1</sub>'den X<sub>12</sub>'ye kadar dört seviye de dahil olmak üzere ön deneylere

dayanarak seçilen bağımsız değişken bulunmaktadır. Design-Expert (9. Ve 10. yazılımı deneme sürümü) kullanılarak CYY'yi uygulanmasıyla her ekstraksiyon yöntemi için 30 deney gerçekleştirilmiştir. Deneysel veriler kuadratik modele oturtulmuştur.

#### **3.2.4. Yönetimlerin istatistiksel analizleri**

Numunelerin her biri için üç tekrarlı ekstraksiyon gerçekleştirilmiş, ardından her ekstraktan en az üç spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. Değişkenler arasındaki etkileşimi ve Design-Expert programını kullanarak yanıtı tanımlamak için varyans analizi (ANOVA) testi uygulanmıştır. Ayrıca, antioksidan aktivite analiz araçlarının istatistiksel analizi, InStat® yazılımının, 3.0 versiyonu (GraphPad, San Diego, CA, ABD) ANOVA prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ortalamalar arasındaki anlamlılık Tukey testi ile belirlenmiştir. Diğer taraftan, InStat® yazılımı, her bir deneyde elde edilen TPM/ TFM ve AA değerleri arasındaki korelasyonu belirlemek için Pearson korelasyon katsayısı ( $r$ ) tayini için kullanılmıştır. Ayrıca, belirleme katsayısı ( $R^2$ ) ve ortalama karekök hatası ( $RMSE$ ) deney ve tahmin edilen sonuçlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için kullanılmıştır. Şekil 3.1'de yöntemlerin istatistiksel analizleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Yöntemin istatistiksel analizleri.

### 3.2.4.1. İstatistiksel analizlere genel bakış ve deney tasarımının önemi

Deneysel tasarım, çeşitli geçerlilik biçimleri, genelleme, güç, maliyet ve pratiklik gibi çeşitli özelliklerin dikkatli bir şekilde dengelenmesidir. Bu özelliklerden birindeki değişimin diğer özellikler üzerinde zararlı bir etkisi olduğunu bilmeniz gerekmektedir. Bu özelliklerin önceden düşünülmüş bir şekilde dengelenmesi, belirli bir bilimsel alanda mevcut bilgi düzeyini değiştirmek için yararlı kanıtlar sağlama konusunda en iyi şansa sahip bir deneyime yol açmaktadır. Öte yandan, birçok denemenin önlenebilen kusurlarla tasarlanması talihsiz bir durumdur. Bu durumlarda istatistiksel analizler araştırmacıyı kurtarabilmektedir. Bu nedenle, hedefimiz her zaman, iyi istatistiksel analizin, olaydan sonra kusurları düzeltebileceğini ummaktan ziyade, anlamlı ve savunmasız kanıtlar üretme konusunda en iyi şansa sahip bir deneyi aktif olarak tasarlamaktır [940].

Deneysel sonuçların istatistiksel analizi, grafiksel ve grafiksel olmayan keşfedici veri çözümlemesi ile başlamaktadır. Doğrulayıcı istatistiksel analizler, hataların tespit edilmesi, varsayımların kontrol edilmesi, açıklayıcı değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi, açıklayıcı ve sonuç değişkenleri arasındaki ilişkilerin yönünü ve kaba boyutunu değerlendirilmesi ve bir sonuç değişkeni ile bir veya daha fazla açıklayıcı değişken arasındaki ilişkinin uygun modellerinin ön seçiminin yapılması için yararlıdır. En doğrulayıcı istatistiksel analizler, modellere dayanmaktadır. İstatistiksel modeller, gözlemleyebildiği özelliklerin ideal ve matematiksel temsilidir. Modeller en iyi iki bileşene ayrılmaktadır. Modelin yapısal bileşeni, açıklayıcı değişkenler ile sonuç değişkenlerinin ortalama arasındaki ilişkileri belirlemektedir. Modelin rastgele veya hata bileşeni, bireysel gözlemlerin ortalamadan sapmasını karakterize etmektedir. Burada “hata”, “yanlılık” anlamına gelmemektedir. İki model bileşeni de sırasıyla sinyal ve gürültü olarak adlandırılmaktadır. İstatistikçiler, matematiksel modellerin gerçek dünyanın kusursuz temsilleri olmadığını fark etmektedir. Ama bazıları gerçeğe çok yakındır. İstatistiksel çıkarımlar varsayımlar olmaksızın imkansız olduğundan dolayı ve varsayımlardan gerçekliğin yeterli sapmasında herhangi bir istatistiksel çıkarımı geçersiz kılacağından dolayı bir modelin tam bir açıklamasının, yapılan tüm varsayımları içermesi gerekmektedir. Biraz farklı bir bakış açısı, modellerin, sonuçların dağılımının açıklayıcı değişkenlerdeki değişikliklerle nasıl değiştiğini açıkladığını söylemektedir. Böylece, istatistiksel modeller, sırasıyla, ortalamadan



sapmanın yolunu ve modelini tanımlayan bir yapısal bileşene ve rastgele bir bileşene sahiptir [940].

Bir istatistiksel test her zaman belirli model varsayımlarına dayanmaktadır. Öğrendiğimiz her istatistiksel analizin arkasındaki varsayımların anlaşılması, istatistiksel sonuçların inandırıcı olup olmadığına karar vermek açısından çok kritik ve önemlidir. İstatistiksel analizler, farklı durumlarda farklı şekillerde çerçevelenebilmekte ve raporlanabilmektedir. Ancak tüm istatistiksel ifadelerin, en azından belirsizlik düzeyleriyle ilgili bilgileri içermesi gerekmektedir. Temel raporlama mekanizmaları, belirli hipotezler için bilinmeyen miktarlar ve p-değerleri ve güç tahminleri için güven aralıklarıdır. Çoğu çalışmada, farklı raporlama yöntemlerinin farklı miktarlarda yararlı bilgiler verdiği bir durum örneği verilmiştir. Sadece p-değerlerinden, olası herhangi bir etkinin büyüklüğü veya yönü hakkında bir şey öğrenmek mümkün değildir. Sadece bir sonuç çıkarmak için yeterli kanıtımız olduğu bilinmektedir. Bu nedenle  $\rho$ -değerleri, çıkarımsal sonuçları ifade etmenin tek yolu değil ve bazı durumlarda yetersiz veya hatta yanıltıcıdır [940].

#### **3.2.4.2. Yanıt Yüzey Metodolojisi ve Merkezi Kompozit Tasarım**

Çok değişkenli istatistiksel bir araç olan yanıt yüzey metodolojisi, deneysel tasarıma göre elde edilen deneysel verilere ampirik modellerin uyumunu temel alan bir matematiksel ve istatistiksel teknikler grubundan oluşmaktadır. Düşük dereceli bir polinom kullanmaktadır. Aynı zamanda kimyasal proses uygulamaları için güvenilen bir istatistiksel yöntem olduğu kanıtlanmıştır. Yanıt yüzey metodolojisi kategorisinde, ikinci mertebeden polinom denklemlerine uymak için uygun olan merkezi kompozit tasarım, birçok araştırma problemini optimize etmek için sıklıkla tartışılmıştır [941]. Bir Merkezi Kompozit Tasarımın aşağıdaki gibi üç tasarım noktası grubu vardır:

- a. Birinci olarak +1 ve -1 düzeyindeki faktörlerin olası kombinasyonlarından oluşan iki seviyeli faktöriyel veya fraksiyonel faktöriyel tasarım noktaları ( $2^k$ ).
- b. İkinci olarak bazen yıldız noktaları olarak adlandırılan eksenel noktalar ( $2k$ ) eksenel olarak uzak mesafeden sabitlenmekte ve merkezden ikinci dereceden terimler üretilmektedir.

c. Üçüncü olarak merkez puanlar, tekrarlanan terimleri temsil eder ve bu merkez noktaları, deneysel hatanın iyi ve bağımsız bir tahminini sağlamaktadır.

Bu noktaları dikkate alarak, merkezi kompozit tasarım tarafından tasarlanan deneylerin sayısı aşağıdaki denklemle hesaplanmaktadır:

$$N=k^2 + 2k + n \quad (3.2)$$

Burada,  $N$ , toplam deney sayısı,  $k$ , incelenen faktörlerin sayısı ve  $n$ , tekrarların sayısıdır. Yanıt yüzey metodolojisi altında merkezi kompozit tasarım, normalde Design Expert software veya Minitab kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Merkezi Kompozit Tasarımda,  $\alpha$  değeri, deneysel alandaki aksel noktaların konumunu belirleyebildiğinden hesaplanması açısından önemlidir.  $\alpha$  değerine bağlı olarak, dönebilir, ortogonal, tasarım küresel veya yüz merkezlidir [941]. Pratik olarak, yüz merkezli ve küresel arasındadır ve aşağıdaki denklemle hesaplanmaktadır:

$$\alpha = (2^k)^{0.25} \quad (3.3)$$

Faktöriyel bölüm bölgesi içindeki aksel noktanın konumunu sağlanması için  $\alpha$  değerinin 1 değeri istenmektedir. Bu sebeple yüz merkezli tasarım olarak adlandırılmakta ve deneysel tasarım matrisine konulacak faktörler için üç seviye sunmaktadır [941]. Yanıtlar ve bağımsız değişkenler arasındaki korelasyon, bunları ikinci dereceden polinom denklemine yerleştirerek elde edilmektedir:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{i \neq j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3.4)$$

Burada  $Y$  cevapları,  $k$  toplam sayı bağımsız faktörü,  $\beta$  bir kesişme,  $i$ ,  $ii$  ve  $ij$  ile  $\beta$ , sırasıyla doğrusal, kuadratik (ikinci dereceli) ve etkileşim efektleri için katsayı değerleri ve  $x_i$  ve  $x_j$  bağımsız değişkenler için kodlanmış seviyeleri göstermektedir [941].

### 3.2.4.3. Varyans analizi (ANOVA)

Varyans analizi (ANOVA) deney grubu araçları arasındaki farklılıkları tespit etmek için kullanılan istatistiksel bir araçtır. ANOVA, sürekli bir parametrik sayısal sonuç ölçüsü olan bir bağımlı değişken ve bir veya daha fazla bağımsız kategorik değişkene sahip birden fazla deney grubu olan deneysel tasarımlarda garantilidir. ANOVA terminolojisinde, bağımsız değişkenler faktörler olarak adlandırılmakta ve her bir faktör içindeki gruplar seviyeler olarak adlandırılmaktadır [942].

### 3.2.4.4. Varyasyon katsayısı (CV)

Varyasyon katsayısı, birim ölçeklere bağı olmayan ve farklı değişkenleri içeren deney sonuçlarının karşılaştırılmasına izin veren bir dağılım ölçümüdür. Varyasyon katsayısının hesaplaması, hem hassasiyet hem de güvenilirlik doğrulanabildiğinden dolayı laboratuvarlarda yapılan deneyler için çok önemlidir. Bu sebeple araştırmacıların deneylerinin değişkenliğini ölçmek için kullanılmıştır. Aşağıda gösterilmiş deneklemlerle varyasyon katsayısı hesaplanmaktadır (Deneklem 3.5) [943-945]. Varyasyon katsayısı değerleri 0'den yüze kadar bulunmakta ve 0'den uzaklaşınca güvenilirlik derecesi azalarak deneylerin tekrar edilmesi gerekmektedir:

$$\%CV = \frac{SD}{M} * 100 \quad (3.5)$$

Burada  $SD$ , standart sapma ve  $M$ , ortalamadır [943-945].

### 3.2.4.5. Ortalama ( $M$ )

Ortalama, tüm veri değerlerinin toplamı veri sayısına bölünerek elde edilmektedir (Deneklem 3.6).

$$M = \frac{\sum x}{n} \quad (3.6)$$

Burada  $x$ , veri değeri ve  $n$  verilerin sayısıdır [946].

### 3.2.4.6. Standart sapma (SD)

Standart sapmanın (SD) tahmini, birtakım gözlemlerin setin ortalama değerinin bir tahmininden ortalama dağılımını ölçmektedir. SD aşağıdaki denklem olarak hesaplanmaktadır

$$SD = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2} \quad (3.7)$$

$\mu$ , gözlem setinden hesaplanan doğru değer tahmini,  $n$  gözlemlerin sayısı ve  $x_i$  gözlemlerinin kümelerinden biridir [947].

### 3.2.4.7. Ortalama Karekök Hatası (RMSE)

RMSE aşağıdaki denklem olarak hesaplanmaktadır:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2} \quad (3.8)$$

Burada,  $\mu$ 'nin bilinen doğru değer,  $n$ ,  $x_i$ 'nin gözlem sayısı ve  $x_i$  gözlemlerinin bir kümesinden biridir. RMSE'nin tanımı, M'nin doğru değerini veya  $\mu$ 'nin doğru değerine inanılan değeri bilmeyi gerektirmektedir [947].

### 3.2.4.8. Pearson katsayısı (r)

Pearson Ürün-Moment ( $r^2$ ) korelasyonu olarak da bilinen Pearson katsayısı, veri görüntüleme ve eğri uydurma için kullanılabilen modern yazılım paketlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Pearson katsayısı, varyansların kareköküne normalize edilerek bir dizi sayısal veriyi temsil eden iki değişkenin kovaryans oranı olarak tanımlanmaktadır [948]. Denklem 3.9'de Pearson katsayısının hesaplanmasını göstermektedir:

$$r = \frac{CV_{xy}}{\sqrt{SD_x SD_y}} \quad (3.9)$$

Burada,  $CV_{xy}$   $x$  ve  $y$  verilerin kovaryansı ve  $SD_x$  ve  $SD_y$ ,  $x$  ve  $y$  verilerin standart sapmalarıdır [948].

### **3.2.4.9. Tukey testi**

Tukey çoklu karşılaştırma analizi yöntemi, her kontrol grubuna karşı her bir deney grubunu test etmektedir. Deney ve kontrol grupları arasında eşit olmayan grup boyutları varsa, Tukey yöntemi tercih edilmektedir [949].

Alternatif çoklu karşılaştırma testleri arasında Bonferroni testi, Dunnett testi, Newman-Keuls testi, SheffeÂ testi ve Tüm çiftlerde t-testleri içermektedir. Sadece iki gözlem grubuyla, iki grup aracını bir t-testi kullanarak karşılaştırabilmektedir. İki'den fazla gruba sahip olduğumuzda, her bir çiftin birden fazla testten dolayı bir t testi kullanarak karşılaştırılması uygun değildir. Analizin yapılmasının doğru yolu, herhangi bir kanıt olup olmadığını değerlendirmek için tek yönlü ANOVA kullanmaktır [949].

### **3.2.5. Stabilite çalışması**

#### ***3.2.5.1. Numunelerin Hazırlanması***

Her bir ekstraksiyon metodunun optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra her yöntemin belirlenmiş optimum koşullarına göre ve incelenecek farklı depolama koşullarının sayısına göre ekstrat numuneleri hazırlanmıştır. Örneklerin fenolik profilinin stabilitesinde asidik ve alkali depolama koşullarının etkisinin incelenmesi, ekstraktların farklı pH değerlerinin sağlanması için hazırlanmış ekstrakt numunelerine NaOH (0.1 N) veya HCL (0.1 N) çözeltilerinden birkaç damla eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Numuneler, polipropilenden yapılmış olan ve 15 mL kapasiteye, 17 mm x 120 mm boyutlara ve -50°C'den 80°C'e kadar sıcaklığa dayanımı olan tüpler içerisinde muhafaza edilmiştir. Her numuneden 2 tüp hazırlanmıştır.

#### ***3.2.5.2. Numunelerin Depolaması***

Tablo 3.3'te depolama koşulları ve numunelerin ayrıntıları gösterilmiştir.

#### ***3.2.5.3. Numunelerin stabilitelerinin belirlenmesi***

Numunelerin bozunması, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değişimlerine göre gözlenmiştir. Fiziksel olarak numunenin renginin değişmesiyle ve kimyasal olarak oleuropein içeriğinin, toplam fenolik içeriğinin, flavonoid içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin %50'ye kadar degradasyonlarıyla belirlenmiştir.

**Tablo 3.3:** Depolama koşulları ve numunelerin ayrıntıları

Depolama koşulları		Numune miktarı (mL)
pH	4	14 + 14 = 28
	7	14 + 14 = 28
	10	14 + 14 = 28
Aydınlatma	Normal oda aydınlatması	14 + 14 = 28
	Lambadan 20 cm uzak mesafe	14 + 14 = 28
Sıcaklık	Karanlık	14 + 14 = 28
	-20°C	14 + 14 = 28
1 atm	4°C	14 + 14 = 28

## 4. BULGULAR

### 4.1. KALİBRASYON ÇALIŞMALARI

Farklı etanol konsantrasyonlarında gallik asit, kateşin ve troloks saf çözeltilerinde toplam fenolik içeriğinin, toplam flavonoid içeriğinin ve antioksidan kapasitesinin spektrofotometrik ölçümlerinin kalibrasyon denklemlerine ait değerler tablo 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.1:** Farklı konsantrasyondaki etanol içerisindeki gallik asit, kateşin ve troloks çözeltilerinin farklı analiz metodları için oluşturulan kalibrasyon denklemlerinin parametreleri

Bileşik	Spektrofotometrik analiz metodu	Kalibrasyon eşitliği $y=ax+b$	Etanol (% v/v)		
			0	10	25
Gallik asit	TPM-Folin	a	0.0006	0.0006	0.0007
		b	-0.0001	0.0004	0.0004
		$r^2$	0.9999	0.9999	0.9999
Kateşin	TFM- $AlCl_3$	a	0.0001	0.0001	0.0002
		b	0.0016	0.0005	0.0008
		$r^2$	0.9996	0.9997	0.9999
Troloks	AA-DPPH	a	0.325	0.5187	0.3512
		b	-0.2831	0.0097	-0.0436
		$r^2$	0.9996	0.9999	0.9999
Troloks	AA-CUPRAC	a	0.0004	0.0004	0.0004
		b	-0.002	0.0011	-0.0002
		$r^2$	0.9999	0.9998	0.9999



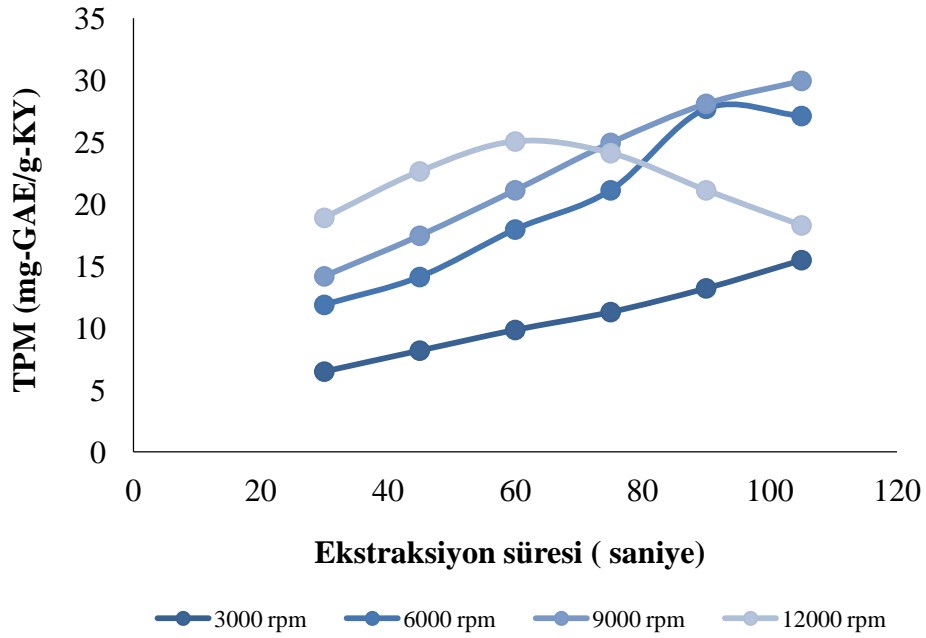
**Tablo 4.2:** Farklı konsantrasyondaki etanol içerisindeki gallik asit, kateşin ve troloks çözeltilerinin farklı analiz metodları için oluşturulan kalibrasyon denklemlerinin parametreleri

Bileşik	Spektrofotometrik analiz metodu	Kalibrasyon eşitliği $y=ax\pm b$	Etanol (% v/v)		
			40	50	100
Gallik asit	TPM-Folin	a	0.0007	0.0007	0.0008
		b	-0.0008	0.0013	0.0043
		$r^2$	0.9999	0.9999	0.9999
Kateşin	TFM- $AlCl_3$	a	0.0002	0.0002	0.0003
		b	0.0006	0.001	0.0005
		$r^2$	0.9998	0.9999	0.9999
Troloks	AA-DPPH	a	0.264	0.2445	0.1784
		b	0.0557	0.0871	0.0073
		$r^2$	0.9999	0.9999	0.9999
Troloks	AA-CUPRAC	a	0.0004	0.0004	0.0003
		b	-0.0003	-0.0015	0.0006
		$r^2$	0.9999	0.9998	0.9999

## 4.2. ÖN DENEMELER

### 4.2.1. Homojenizatör Destekli Ekstraksiyon (HAE)

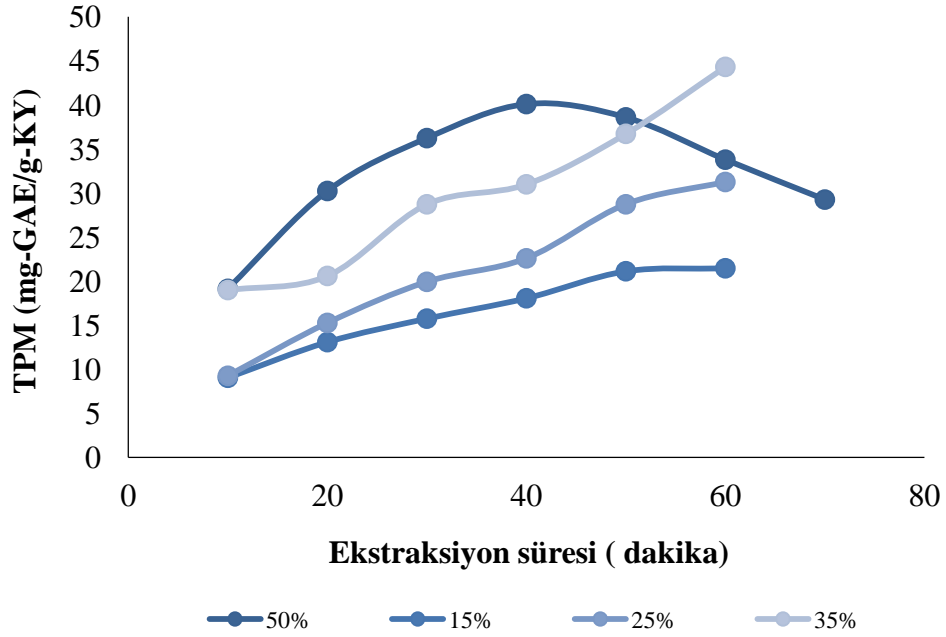
Tezin yöntem kısmında bahsedilmiş olan parametreler tek tek irdelenmiş ve TPM açısından HAE' nin verimine etkileri gözlenmiştir. Şekil 4.1, HAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve karıştırma hızının toplam fenolik madde miktarına etkisini göstermektedir.



**Şekil 4.1:** HAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve karıştırma hızının ekstraksiyon verimine etkisi.

#### 4.2.2. Ultrason Destekli Ekstraksiyon (UAE)

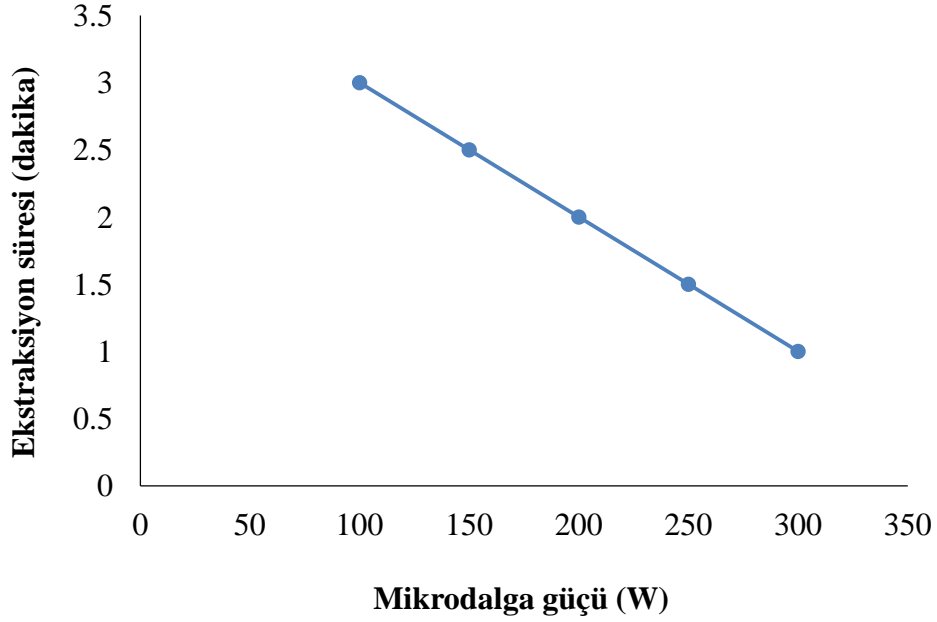
Tezin yöntem kısmında bahsedilmiş olan parametreler tek tek irdelenmiş ve TPM açısından UAE' nin verimine etkileri gözlenmiştir. Şekil 4.2, UAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve ultrasonik titreşimlerin genliğinin toplam fenolik madde miktarına etkisini göstermektedir.



**Şekil 4.2:** UAE yönteminde ekstraksiyon süresi ve ultrasonik titreşimlerin genliğinin ekstraksiyon verimine etkisi.

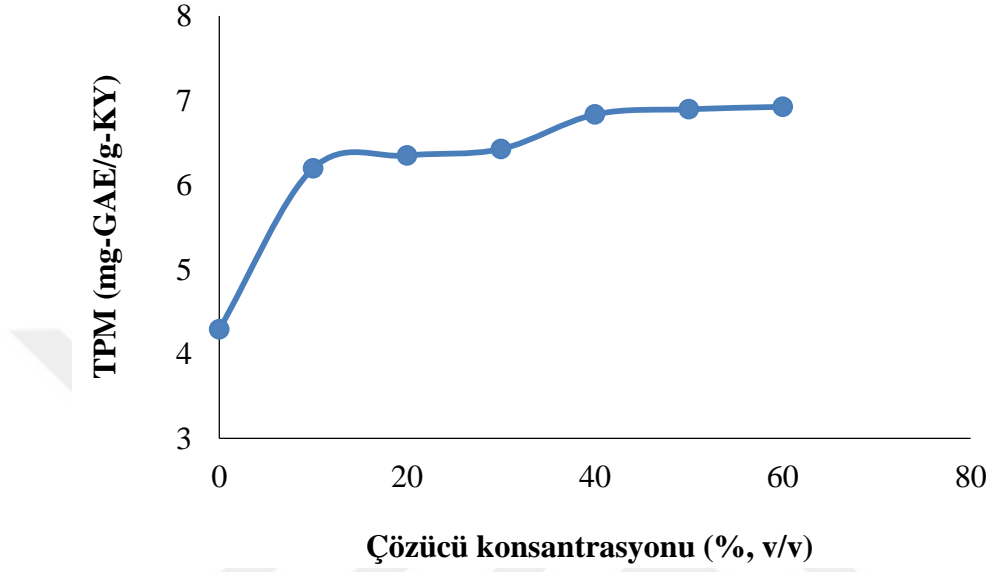
### 4.2.3. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon (MAE)

Tezin yöntem kısmında bahsedilmiş olan parametreler tek tek irdelenmiş ve TPM açısından MAE' nin verimine etkileri gözlenmiştir. Şekil 4.3, MAE yönteminde ekstraksiyon süresinin mikrodalga gücü ile değişimini göstermektedir.

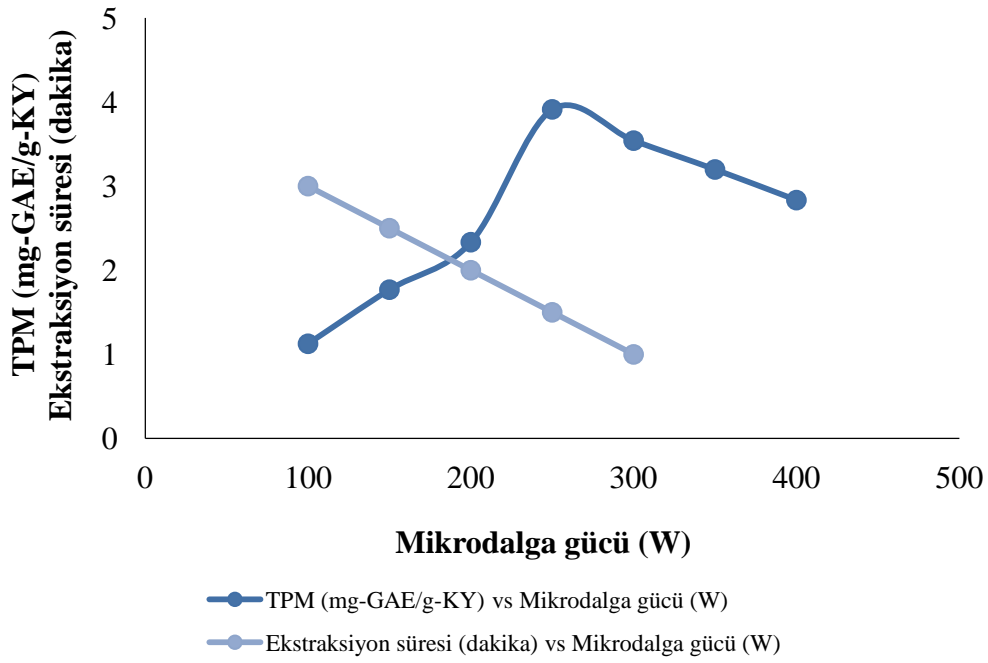


**Şekil 4.3:** MAE yöntemi ile mikrodalga gücüne göre ve işlem sıcaklığının 50°C'den fazlasına geçmeden işlem süresinin değişimidir

Şekil 4.4 ise MAE yönteminde mikrodalga gücünün toplam fenolik madde miktarına etkisini göstermektedir.



Şekil 4.4: MAE yönteminde çözücü konsantrasyonunun ekstraksiyon verimine etkisi



Şekil 4.5: MAE yönteminde mikrodalga gücünün göre ekstraksiyon süresi ve ekstraksiyon verimine etkisi.

Şekil 4.5 ile mikrodalga gücünün toplam fenolik madde miktarına ve ekstraksiyon süresine etkileri gösterilmiştir. Şekil 4.6 ile de ham madde miktarı ile TPM veriminin değişimi gösterilmektedir.



Şekil 4.6: MAE yönteminde zeytin yaprağı miktarının ekstraksiyon verimine etkisi.

### 4.3. DENEYSEL TASARIM VE MODELLEME

Tablo 4.3 HAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının deneysel tasarımını ve TPM ve TFM açısından verimlerini ve ilgili model denklemleri ile hesaplanan sonuçları karşılaştırmalı olarak vermektedir.

**Tablo 4.3:** HAE yönteminin bağımsız değişkenleri ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  ve  $X_4$ ) ve deneysel sonuçlar\*

No	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	TPM		TFM	
					(mg-GAE / g-KY)		(mg-CE / g-KY)	
					Deneysel	Öngörülen <sup>a</sup>	Deneysel	Öngörülen <sup>b</sup>
1	10000	90	100	35	22.99±0.018	23.12	20.14±0.054	19.74
2	4000	90	100	15	18.56±0.014	20.12	16.60±0.027	17.64
3	10000	90	0	35	34.85±0.005	34.16	37.35±0.032	36.02
4	4000	30	0	35	12.69±0.081	13.27	16.80±0.027	17.11
5	7000	60	50	25	37.65±0.028	37.63	36.75±0.028	36.38
6	10000	60	50	25	40.48±0.036	42.23	40.25±0.068	40.91
7	10000	30	0	35	30.27±0.024	29.35	33.15±0.077	32.01
8	4000	30	100	15	12.68±0.056	12.95	10.30±0.042	9.96
9	7000	30	50	25	30.81±0.007	32.89	30.10±0.033	30.77
10	4000	90	0	35	16.89±0.046	19.74	20.20±0.062	21.62
11	10000	30	100	15	16.03±0.025	13.82	9.20±0.031	7.67
12	10000	30	100	35	18.21±0.002	20.52	16.37±0.002	16.47

13	7000	60	50	35	41.27±0.072	37.41	40.75±0.015	37.21
14	7000	60	50	15	35.83±0.002	38.79	35.75±0.037	36.32
15	7000	60	100	25	18.73±0.004	18.08	16.33±0.005	14.89
16	7000	60	0	25	27.30±0.043	27.04	29.68±0.052	28.15
17	7000	60	50	25	38.00±0.063	37.63	37.00±0.031	36.38
18	10000	90	100	15	20.33±0.033	19.33	16.83±0.047	14.85
19	7000	60	50	25	37.48±0.031	37.63	36.59±0.027	36.38
20	4000	90	100	35	16.67±0.071	17.58	14.37±0.084	15.01
21	7000	90	50	25	41.86±0.075	38.88	42.25±0.088	36.61
22	4000	60	0	15	31.91±0.351	29.19	30.41±0.078	28.63
23	7000	60	50	25	33.84±4.057	37.63	32.69±4.074	36.38
24	10000	90	0	15	35.33±0.039	37.28	34.50±0.047	35.50
25	4000	30	100	35	14.62±0.027	13.31	12.33±0.061	11.23
26	7000	60	50	25	38.48±0.062	37.63	37.08±0.054	36.38
27	10000	30	0	15	30.90±0.013	29.57	29.90±0.057	27.58
28	7000	60	50	25	37.62±0.007	37.63	35.95±0.087	36.38
29	4000	30	0	15	19.31±0.007	19.83	19.89±0.046	20.20
30	4000	60	50	25	37.24±0.027	34.59	38.48±0.023	34.85

---

TPM için öngörülen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.744164 ve diğer noktalarda 3.399016'dır. TFM için tahmin edilen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.650675 ve diğer noktalarda 2.781732'dir



<sup>a</sup> Öngörülen değer deneklem 1'e dayalıdır

<sup>b</sup> Öngörülen değer deneklem 2'ye dayalıdır

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.4 ise HAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının iki farklı yöntem (DPPH ve CUPRAC) ile ölçülmüş olan AA sonuçları karşılaştırmalı olarak vermektedir.

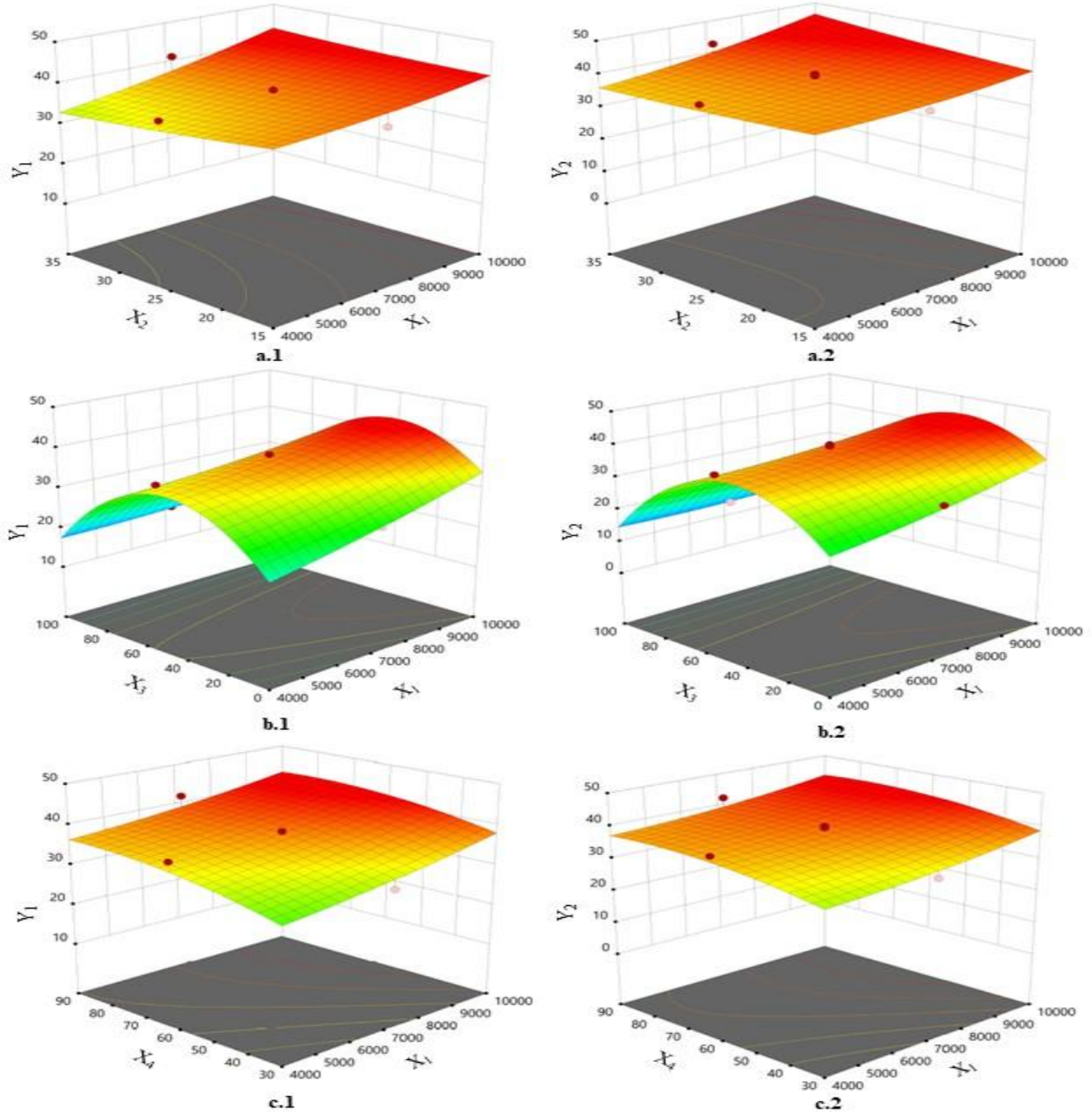
**Tablo 4.4:** HAE yönteminin bağımsız değişkenleri (X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub> ve X<sub>4</sub>) ve deneysel sonuçlar \*

No	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	AA	
					(mg-TEAC / g-KY)	
					DPPH	CUPRAC
1	10000	90	100	35	16.70±0.086abc	70.64±0.030
2	4000	90	100	15	16.21±0.086ad	65.05±0.045a
3	10000	90	0	35	18.14±0.044ef	96.82±0.007b
4	4000	30	0	35	16.08±0.018bd	64.95±0.054a
5	7000	60	50	25	18.39±0.077e	98.75±0.077c
6	10000	60	50	25	18.65±0.083e	100.99±0.045
7	10000	30	0	35	17.72±0.038e	93.62±0.012d
8	4000	30	100	15	15.77±0.023d	60.92±0.031e
9	7000	30	50	25	17.70±0.066e	92.21±0.014f
10	4000	90	0	35	16.45±0.020cd	68.59±0.015g
11	10000	30	100	15	15.88±0.042d	61.37±0.035e
12	10000	30	100	35	16.33±0.053cd	65.71±0.066h

13	7000	60	50	35	18.71±0.017f	101.51±0.082i
14	7000	60	50	15	18.16±0.065e	96.96±0.004b
15	7000	60	100	25	16.25±0.098cd	65.81±0.086h
16	7000	60	0	25	17.41±0.048gh	90.90±0.040
17	7000	60	50	25	18.39±0.042e	99.10±0.086c
18	10000	90	100	15	16.31±0.098cd	65.68±0.069h
19	7000	60	50	25	18.39±0.063e	98.58±0.073c
20	4000	90	100	35	16.16±0.053ad	64.99±0.045a
21	7000	90	50	25	18.72±0.091f	101.54±0.078i
22	4000	60	0	15	17.67±0.022e	93.13±0.099d
23	7000	60	50	25	18.39±0.057e	98.98±0.044c
24	10000	90	0	15	18.03±0.019eh	95.97±0.016
25	4000	30	100	35	15.96±0.040d	62.30±0.018
26	7000	60	50	25	18.39±0.084e	99.94±0.097
27	10000	30	0	15	17.59±0.016g	92.37±0.060f
28	7000	60	50	25	18.39±0.055e	98.72±0.005c
29	4000	30	0	15	16.55±0.012cd	68.88±0.002g
30	4000	60	50	25	18.31±0.057e	98.05±0.068

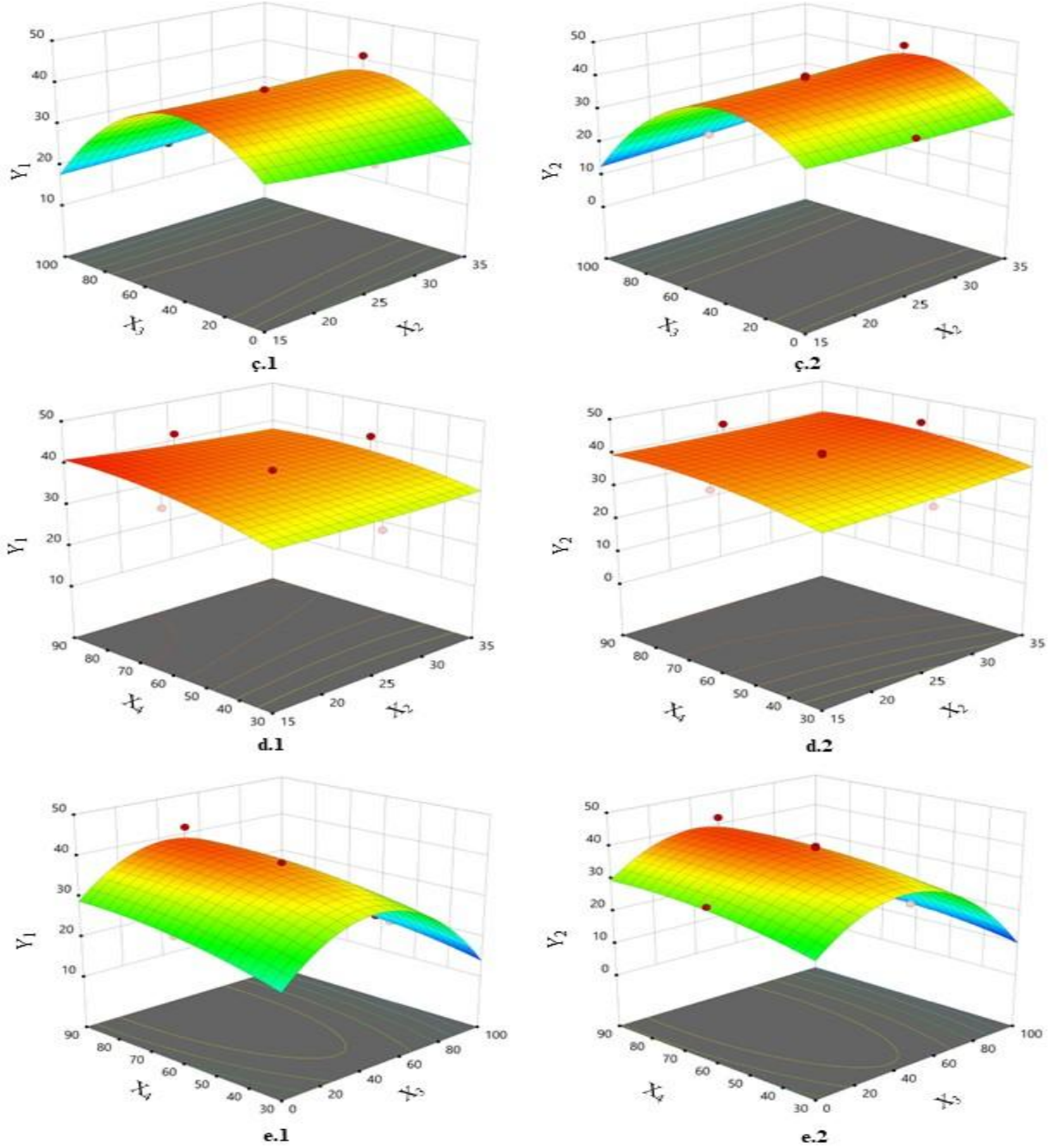
\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Şekil 4.7 ile 4.8 ise HAE metodu ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda proses parametrelerinin cevap değerleri üzerine etkilerini görsel olarak sunmaktadır.



**Şekil 4.7:** (a.1) TPM- $Y_1$  ve (a.2) TFM- $Y_2$ 'nin karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %50, v/v ve çözücü hacmi = 25 mL), (b.1) TPM- $Y_1$  ve (b.2) TFM- $Y_2$ 'nin karıştırma hızı ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 60 saniye ve çözücü hacmi = 25 mL) ve (c.1) TPM- $Y_1$  ve (c.2) TFM-

$Y_2$ 'nin karıştırma hızı ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 60 saniye ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) 3D yüzey grafikleri



**Şekil 4.8:** (ç.1) TPM- $Y_1$  ve (ç.2) TFM- $Y_2$ 'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı = 7000 rpm ve çözücü hacmi = 25 mL), (d.1) TPM- $Y_1$  ve (d.2) TFM- $Y_2$ 'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı

= 7000 rpm ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) ve (e.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin çözücünün konsantrasyonu ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (karıştırma hızı = 7000 rpm ve ekstraksiyon süresi = 60 saniye) 3D yüzey grafikleri

Tablo 4.5 ise UAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının deneysel tasarımını ve TPM ve TFM açısından verimlerini ve ilgili model denklemleri ile hesaplanan sonuçları karşılaştırmalı olarak vermektedir.

**Tablo 4.5:** UAE yönteminin bağımsız değişkenleri (X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> ve X<sub>8</sub>) ve deneysel sonuçlar\*

No	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	TPM		TFM	
					(mg-GAE / g-KY)		(mg-CE / g-KY)	
					Deneysel	Öngörülen <sup>c</sup>	Deneysel	Öngörülen <sup>d</sup>
1	30	50	50	15	30.46±0.030	31.40	33.63±0.056	35.94
2	35	40	0	15	19.05±0.045	16.38	17.85±0.039	16.32
3	30	50	50	25	34.12±0.070	36.60	37.30±0.046	39.92
4	35	60	100	15	12.59±0.054	12.96	11.37±0.022	12.38
5	25	60	0	15	26.05±0.077	23.57	17.16±0.01	17.83
6	35	40	0	35	24.14±0.045	23.88	20.31±0.070	19.44
7	25	50	50	25	34.26±0.012	36.88	37.46±0.067	39.89
8	35	50	50	25	36.19±0.031	35.62	39.64±0.098	39.85
9	25	40	0	35	26.24±0.061	25.61	20.11±0.016	20.69
10	30	50	0	25	22.66±0.041	25.29	16.98±0.008	20.97
11	30	50	50	35	35.27±0.035	36.38	38.14±0.027	38.47

12	35	60	100	35	17.82±0.066	16.13	14.30±0.066	13.40
13	25	60	0	35	33.94±0.082	33.50	29.35±0.051	26.91
14	35	40	100	15	12.06±0.004	12.24	10.81±0.076	10.99
15	25	40	100	35	8.55±0.038	5.85	4.47±0.072	2.48
16	30	40	50	25	32.26±0.040	34.92	35.21±0.014	38.89
17	30	50	50	25	40.62±0.086	36.60	44.63±0.079	39.92
18	30	50	50	25	41.62±0.069	36.60	45.75±0.013	39.92
19	30	50	100	25	15.15±0.073	14.57	12.77±0.016	11.42
20	25	60	100	15	13.75±0.045	13.76	12.60±0.053	11.21
21	30	50	50	25	37.34±0.078	36.60	40.93±0.092	39.92
22	25	60	100	35	13.80±0.099	16.21	10.03±0.037	13.15
23	30	50	50	25	34.84±0.044	36.60	38.11±0.012	39.92
24	30	50	50	25	37.19±0.016	36.60	40.76±0.012	39.92
25	35	60	0	35	25.31±0.018	25.29	20.20±0.098	21.42
26	30	60	50	25	39.84±0.097	39.23	43.74±0.001	42.70
27	25	40	0	15	17.40±0.026	18.83	18.01±0.026	16.65
28	35	60	0	15	12.20±0.005	14.64	13.52±0.088	13.25
29	35	40	100	35	10.04±0.090	12.26	6.05±0.045	6.97
30	25	40	100	15	6.78±0.068	6.55	5.21±0.005	5.58

---

TPM için öngörülen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.873275 ve diğer noktalarda 1.987892'dir. TFM için tahmin edilen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.960587 ve diğer noktalarda 2.186645'tir

<sup>c</sup> Öngörülen değer deneklem 3'e dayalıdır

<sup>d</sup> Öngörülen değer deneklem 4'e dayalıdır

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.6 da UAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının iki farklı yöntem (DPPH ve CUPRAC) ile ölçülmüş olan AA sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

**Tablo 4.6:** UAE yönteminin bağımsız değişkenleri (X<sub>5</sub>, X<sub>6</sub>, X<sub>7</sub> ve X<sub>8</sub>) ve deneysel sonuçlar\*

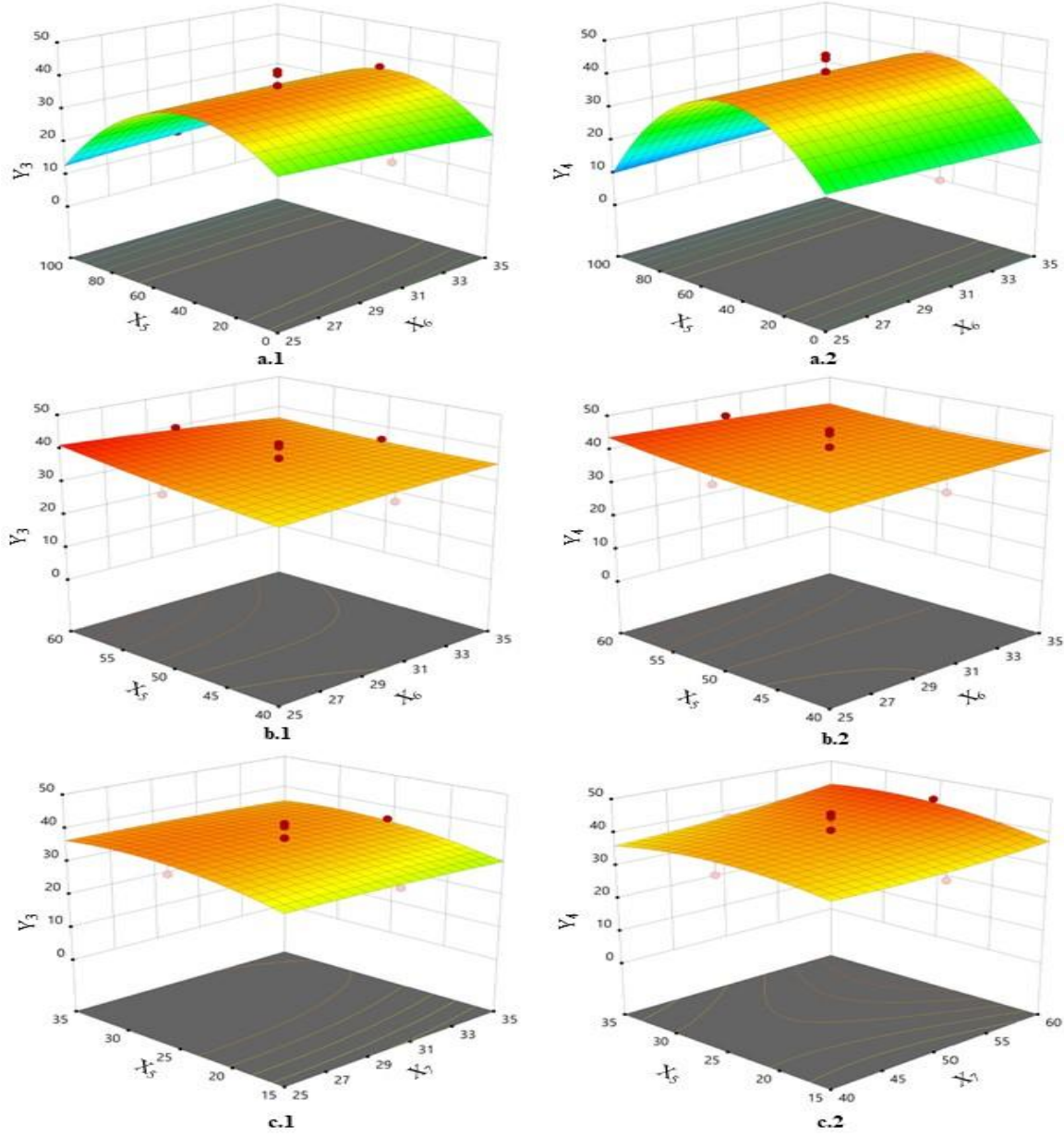
No	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	AA	
					(mg-TEAC / g-KY)	
					DPPH	CUPRAC
1	30	50	50	15	17.89±0.012ab	90.05±0.025a
2	35	40	0	15	16.47±0.081c	61.89±0.028
3	30	50	50	25	18.63±0.079d	99.45±0.010b
4	35	60	100	15	15.80±0.034ef	53.89±0.014
5	25	60	0	15	16.80±0.021gh	68.39±0.025
6	35	40	0	35	16.87±0.007g	75.62±0.031
7	25	50	50	25	18.29±0.081ij	93.82±0.051
8	35	50	50	25	18.50±0.008i	95.93±0.060
9	25	40	0	35	16.97±0.025	76.21±0.030
10	30	50	0	25	16.62±0.072ch	67.24±0.030
11	30	50	50	35	18.38±0.054j	92.49±0.010

12	35	60	100	35	16.23±0.007k	62.71±0.062c
13	25	60	0	35	17.85±0.091a	89.82±0.029a
14	35	40	100	15	15.74±0.026e	46.92±0.009
15	25	40	100	35	15.23±0.0011	36.27±0.020
16	30	40	50	25	18.07±0.053bi	86.91±0.042
17	30	50	50	25	18.63±0.057d	99.21±0.240b
18	30	50	50	25	18.63±0.084d	99.17±0.260b
19	30	50	100	25	16.01±0.046ef	46.02±0.077
20	25	60	100	15	15.92±0.071e	45.25±0.027
21	30	50	50	25	18.63±0.024d	99.21±0.065b
22	25	60	100	35	15.79±0.062e	51.91±0.044
23	30	50	50	25	18.63±0.089d	99.41±0.050b
24	30	50	50	25	18.63±0.022d	99.48±0.030b
25	35	60	0	35	16.92±0.017g	78.73±0.030
26	30	60	50	25	18.91±0.059	107.17±0.076
27	25	40	0	15	16.40±0.048ck	62.40±0.028c
28	35	60	0	15	15.89±0.044e	51.14±0.030
29	35	40	100	35	15.39±0.019l	39.00±0.026
30	25	40	100	15	15.18±0.085l	36.46±0.053

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

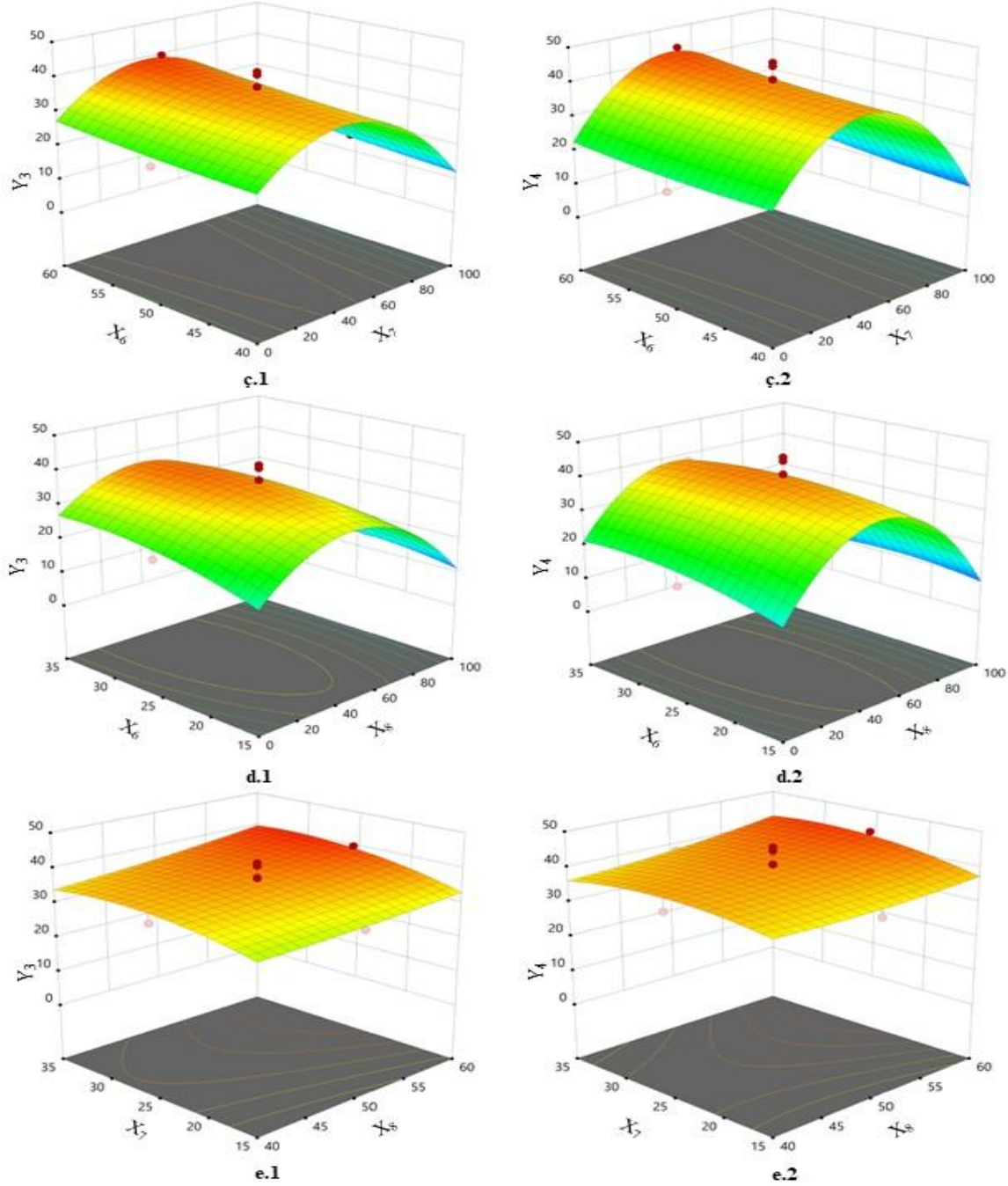


Şekil 4.9 ve 4.10 ise UAE metodu ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda proses parametrelerinin cevap değerleri üzerine etkilerini görsel olarak sunmaktadır.



**Şekil 4.9:** (a.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (a.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %50, v/v ve çözücü hacmi = 25 mL), (b.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (b.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 50 dakika ve çözücü hacmi = 25 mL) ve (c.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (c.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ultrasonik titreşimlerin genliğinin ve çözücü

hacminin bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 50 dakika ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) 3D yüzey grafikleri



**Şekil 4.10:** (ç.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (ç.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve çözücü hacmi = 25 mL), (d.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (d.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak

(ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve çözücü konsantrasyonu = %50, v/v) ve (e.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin çözücü konsantrasyonu ve çözücü hacminin bir fonksiyonu olarak (ultrasonik titreşimlerin genliği = %30 ve ekstraksiyon süresi = 50 dakika) 3D yüzey grafikleri

Tablo 4.7 ise MAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının deneysel tasarımını ve TPM ve TFM açısından verimlerini ve ilgili model denklemleri ile hesaplanan sonuçları karşılaştırmalı olarak vermektedir.

**Tablo 4.7:** MAE yönteminin bağımsız değişkenleri (X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> ve X<sub>12</sub>) ve deneysel sonuçlar\*

No					TPM		TFM	
	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	(mg-GAE / g-KY)		(mg-CE / g-KY)	
					Deneysel	Öngörülen <sup>e</sup>	Deneysel	Öngörülen <sup>f</sup>
1	200	1	40	6	5.35±0.018	5.12	3.89±0.037	3.55
2	200	1	25	6	10.28±0.013	9.55	8.32±0.000	7.77
3	150	0.5	40	5	8.66±0.048	8.12	6.17±0.088	5.75
4	200	1	25	5	14.17±0.057	13.83	10.99±0.007	10.91
5	200	1	10	6	3.39±0.002	3.81	3.05±0.025	3.57
6	250	1.5	40	7	7.22±0.081	6.68	5.26±0.008	5.09
7	250	0.5	10	7	5.62±0.074	4.94	4.62±0.088	4.08
8	250	0.5	10	5	9.44±0.046	9.83	7.59±0.035	7.88
9	250	0.5	40	7	5.22±0.089	5.43	3.77±0.025	3.75
10	150	0.5	40	7	3.13±0.085	3.82	1.99±0.025	2.64
11	200	1	25	6	9.21±0.008	9.55	7.49±0.029	7.77

12	250	1	25	6	10.33±0.094	10.99	8.38±0.060	8.99
13	250	1.5	40	5	13.14±0.059	12.83	9.95±0.000	9.65
14	150	0.5	10	7	2.72±0.027	2.96	2.44±0.073	2.66
15	200	1	25	6	9.44±0.036	9.55	7.68±0.071	7.77
16	200	1.5	25	6	9.24±0.059	10.80	8.05±0.063	8.98
17	200	1	25	6	9.94±0.004	9.55	7.88±0.088	7.77
18	150	1	25	6	9.08±0.045	8.60	7.48±0.013	7.04
19	250	1.5	10	7	4.78±0.026	5.24	4.74±0.067	5.08
20	150	1.5	10	5	8.19±0.064	7.90	6.94±0.007	6.88
21	250	0.5	40	5	10.16±0.081	10.64	7.13±0.013	7.52
22	200	1	25	7	8.24±0.031	8.76	6.800±0.038	7.06
23	150	1.5	40	5	9.31±0.086	10.02	6.60±0.088	7.18
24	150	1.5	10	7	3.42±0.009	2.97	3.32±0.013	2.96
25	150	0.5	10	5	6.37±0.018	6.94	5.59±0.025	5.79
26	150	1.5	40	7	5.23±0.072	4.77	3.66±0.004	3.29
27	200	1	25	6	9.14±0.022	9.55	7.50±0.005	7.77
28	200	0.5	25	6	11.07±0.019	9.69	8.54±0.075	7.77
29	250	1.5	10	5	11.75±0.015	11.08	10.27±0.049	9.66
30	200	1	25	6	9.87±0.008	9.55	8.29±0.084	7.77

---

TPM için öngörülen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.262989 ve diğer noktalarda 0.598657'dir. TFM için tahmin edilen değerlerin standart hatası, merkez noktasında 0.190481 ve diğer noktalarda 0.43003'tür

<sup>e</sup> Öngörülen değer deneklem 5'e dayalıdır

<sup>f</sup> Öngörülen değer deneklem 6'ya dayalıdır

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.8 de MAE yöntemi ile elde edilen zeytin yaprakları ekstraktının iki farklı yöntem (DPPH ve CUPRAC) ile ölçülmüş olan AA sonuçları karşılaştırmalı olarak verilmektedir.

**Tablo 4.8:** MAE yönteminin bağımsız değişkenleri (X<sub>9</sub>, X<sub>10</sub>, X<sub>11</sub> ve X<sub>12</sub>) ve deneysel sonuçlar\*

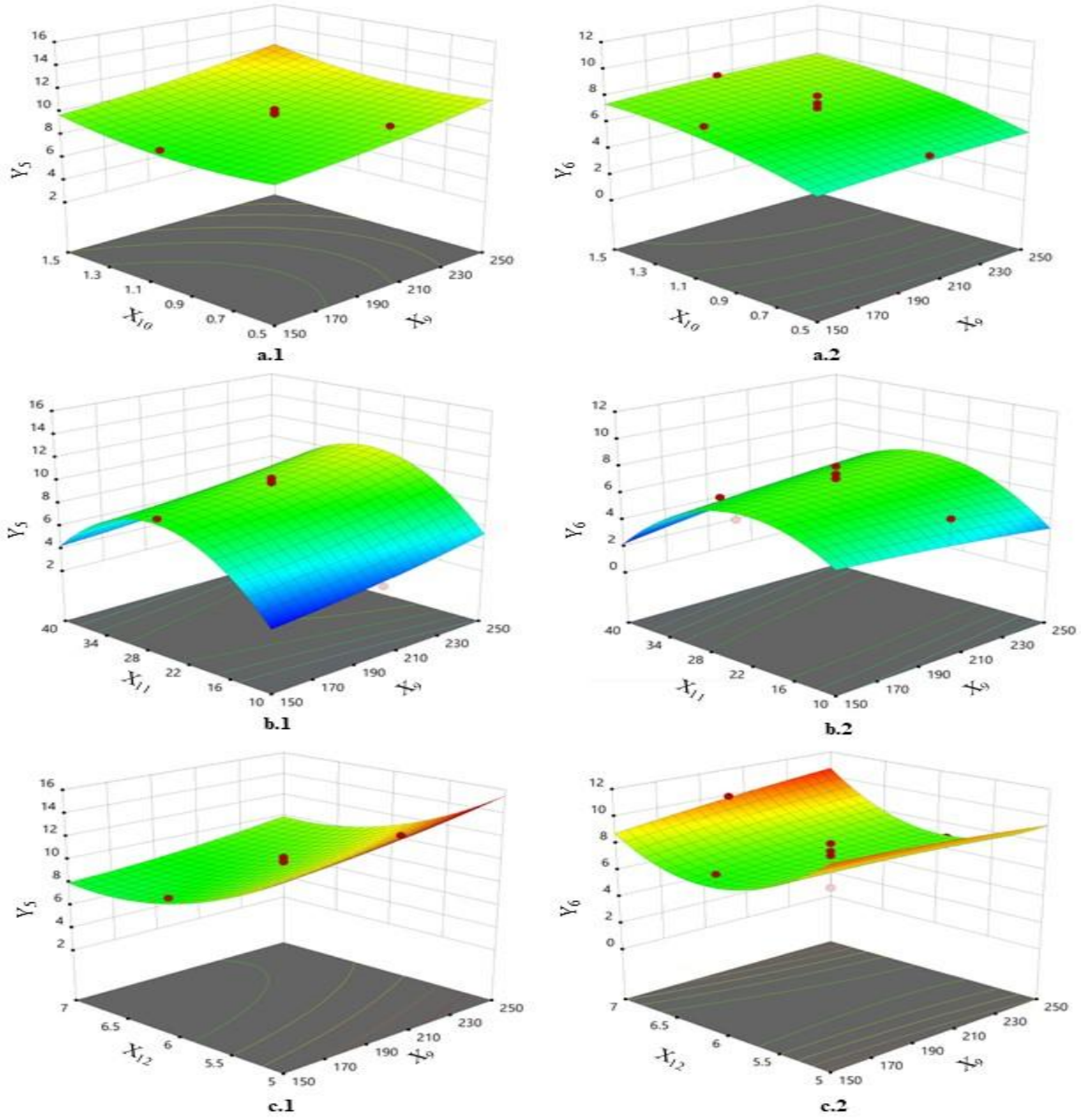
No	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>	X <sub>11</sub>	X <sub>12</sub>	AA	
					(mg-TEAC / g-KY)	
					DPPH	CUPRAC
1	200	1	40	6	2.89±0.042a	9.10±0.24abc
2	200	1	25	6	3.40±0.089bcd	9.47±0.049d
3	150	0.5	40	5	3.45±0.071	9.42±0.014d
4	200	1	25	5	4.01±0.014e	9.85±0.008ef
5	200	1	10	6	2.34±0.096f	8.86±0.027agh
6	250	1.5	40	7	3.06±0.064a	9.27±0.072bd
7	250	0.5	10	7	2.60±0.005gh	9.07±0.068b
8	250	0.5	10	5	3.21±0.092b	9.41±0.074d
9	250	0.5	40	7	2.79±0.024ag	9.09±0.027bh
10	150	0.5	40	7	2.51±0.001h	8.92±0.058bg
11	200	1	25	6	3.26±0.05b	9.38±0.04cd

12	250	1	25	6	3.41±0.087b	9.48±0.085d
13	250	1.5	40	5	4.04±0.035e	9.78±0.001ei
14	150	0.5	10	7	2.21±0.004f	8.81±0.051c
15	200	1	25	6	3.29±0.02b	9.40±0.018d
16	200	1.5	25	6	3.25±0.074b	9.33±0.083ad
17	200	1	25	6	3.35±0.04b	9.46±0.04d
18	150	1	25	6	3.23±0.083b	9.36±0.094cd
19	250	1.5	10	7	2.48±0.061fh	8.92±0.074bg
20	150	1.5	10	5	3.03±0.004a	9.27±0.056bd
21	250	0.5	40	5	3.63±0.094c	9.57±0.085dfi
22	200	1	25	7	3.06±0.012b	9.29±0.068bd
23	150	1.5	40	5	3.51±0.086d	9.48±0.023d
24	150	1.5	10	7	2.30±0.036f	8.84±0.06cg
25	150	0.5	10	5	2.79±0.001ag	9.10±0.056bh
26	150	1.5	40	7	2.78±0.04a	9.10±0.021bch
27	200	1	25	6	3.24±0.07bh	9.37±0.049cd
28	200	0.5	25	6	3.50±0.036b	9.58±0.021dfi
29	250	1.5	10	5	3.50±0.08b	9.52±0.066d
30	200	1	25	6	3.33±0.019b	9.41±0.009d

---

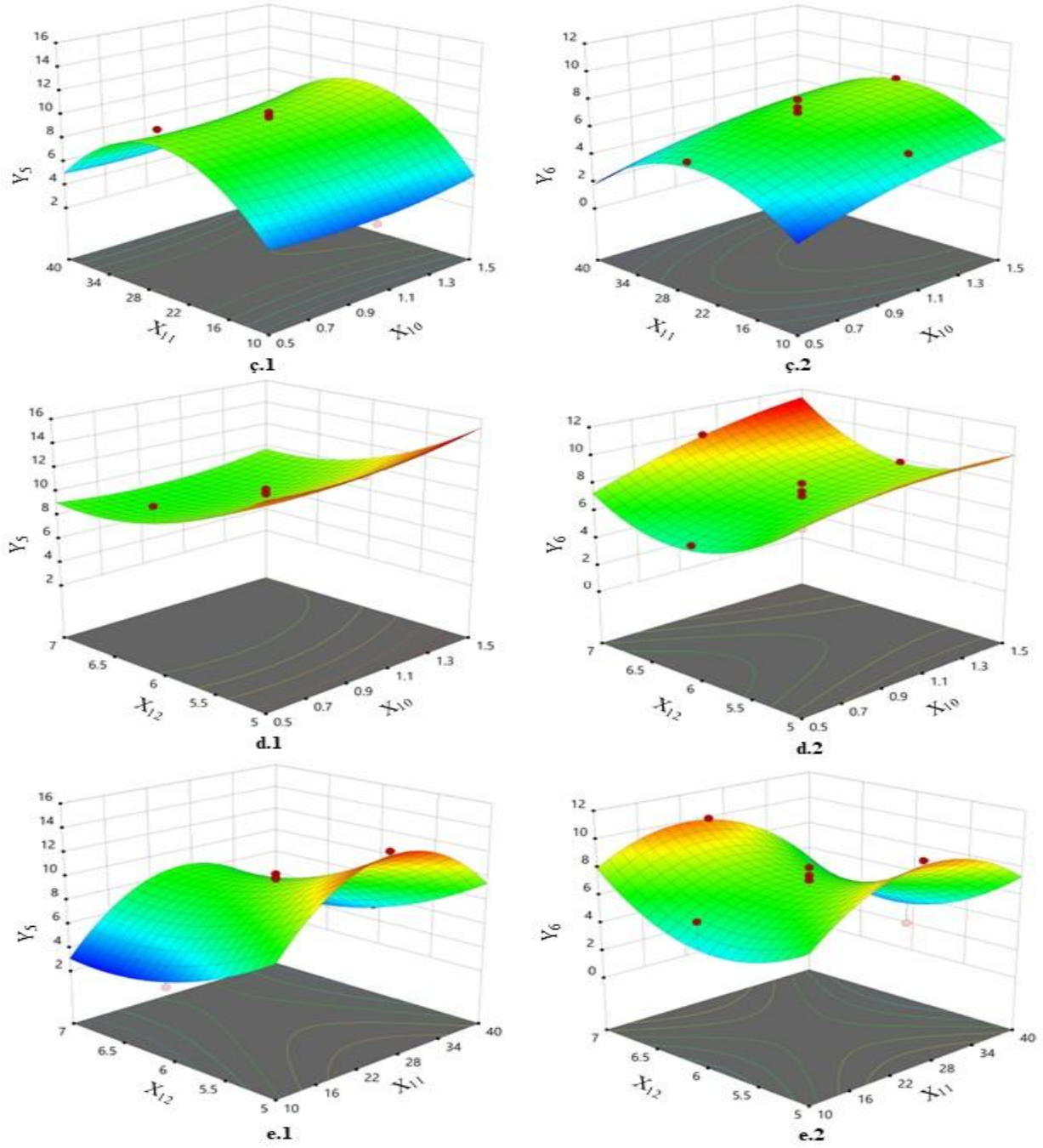
\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Şekil 4.11 ve 4.12 ise MAE metodu ile zeytin yaprağı ekstraksiyonunda proses parametrelerinin cevap değerleri üzerine etkilerini görsel olarak sunmaktadır.



**Şekil 4.11:** (a.1) TPM- $Y_1$  ve (a.2) TFM- $Y_2$ 'nin mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresinin bir fonksiyonu olarak (çözücü konsantrasyonu = %25, v/v ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g), (b.1) TPM- $Y_1$  ve (b.2) TFM- $Y_2$ 'nin mikrodalga gücü ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 1 dakika ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g) ve (c.1) TPM- $Y_1$  ve (c.2)

TFM-Y<sub>2</sub>'nin mikrodalga gücü ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak (ekstraksiyon süresi = 1 dakika ve çözücü konsantrasyonu = %25, v/v) 3D yüzey grafikleri



**Şekil 4.12:** (ç.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (ç.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak (mikrodalga gücü = 200 W ve zeytin yaprağı miktarı = 6 g), (d.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (d.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin ekstraksiyon süresi ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak



(mikrodalga gücü = 200 W ve çözücü konsantrasyonu = %25, v/v) ve (e.1) TPM-Y<sub>1</sub> ve (e.2) TFM-Y<sub>2</sub>'nin çözücü konsantrasyonu ve zeytin yaprağı miktarının bir fonksiyonu olarak (mikrodalga gücü = 200 W ve ekstraksiyon süresi = 1 dakika) 3D yüzey grafikleri

İlgili sistemlerin ikinci dereceden model denklemleri sırasıya eşitlik 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6 ile ifade edilmiştir:

$$\begin{aligned} \text{HAE-TPM}=Y_1= & 15.79798-0.000243871X_1+0.44326X_2+0.55221X_3-0.70172X_4-0.00000460042X_1X_2- \\ & 0.0000147976X_1X_3+0.0000528075X_1X_4-0.00036703X_2X_3 \\ & 0.00241832X_2X_4+0.00345655X_3X_4+0.0000000867044X_1^2-0.00193719X_2^2- \\ & 0.00602598X_3^2+0.00470816X_4^2 \end{aligned} \quad (4.1)$$

$$\begin{aligned} \text{HAE-TFM}=Y_2= & 16.09718-0.00199608X_1+0.55394X_2+0.52744X_3-0.49853X_4-0.00000140918X_1X_2- \\ & 0.0000161052X_1X_3+0.0000626683X_1X_4-0.000123856X_2X_3- \\ & 0.00325817X_2X_4+0.00218635X_3X_4+0.000000166303X_1^2-0.00299166X_2^2- \\ & 0.00594569X_3^2+0.00381605X_4^2 \end{aligned} \quad (4.2)$$

$$\begin{aligned} \text{UAE-TPM}=Y_3= & -30.8552+1.83096X_5+0.45154X_6+0.34712X_7+1.288028X_8-0.032425X_5 \\ & X_6+0.00814X_5X_7+0.003575X_5X_8+0.0012325X_6X_7+20.007875X_6X_8-0.0037375X_7X_8- \\ & 0.013874X_5^2+0.00478158X_6^2-0.00666674X_7^2-0.027068X_8^2 \end{aligned} \quad (4.3)$$

$$\begin{aligned} \text{UAE-TFM}=Y_4= & 1.45496+1.01398X_5-0.47084X_6+0.65943X_7+1.17206X_8- \\ & 0.021213X_5X_6+0.0057425X_5X_7-0.0045875X_5X_8+0.00222625X_6X_7+0.012606X_6X_8- \\ & 0.00357125X_7X_8-0.0021614X_5^2+0.00870965X_6^2-0.00949161X_7^2-0.02719X_8^2 \end{aligned} \quad (4.4)$$

$$\begin{aligned} \text{MAE-TPM}=Y_5= & 64.59657+0.012308X_9-0.95439X_{10}+1.20001X_{11}-21.89412X_{12}+0.00294187X_9X_{10}- \\ & 0.000121498X_9X_{11}-0.00452008X_9X_{12}+0.031176X_{10}X_{11}-0.47367X_{10}X_{12}- \\ & 0.00532601X_{11}X_{12}+0.0000971602X_9^2+2.76493X_{10}^2-0.022628X_{11}^2+1.73919X_{12}^2 \end{aligned} \quad (4.5)$$

$$\begin{aligned} \text{MAE-TFM}=Y_6= & 47.275780477398-0.0038320381012337X_9- \\ & 2.9388469318822X_{10}+0.94245358871676X_{11}-15.402931194514X_{12}+0.0069570295253209X_9X_{10}- \\ & 0.00010363591569665X_9X_{11}-0.0033108761322751X_9X_{12}+0.011602276316452X_{10}X_{11}- \\ & 0.39345000128495X_{10}X_{12}+0.00043397621819035X_{11}X_{12}+0.000096982397549423X_9^2+2.416320838 \\ & 9864X_{10}^2-0.018728801739163X_{11}^2+1.2104058151887X_{12}^2 \end{aligned} \quad (4.6)$$

Design Expert paket programı kullanılarak uygulanan CYY ile üretilmiş olan istatistiksel analiz (ANOVA) sonuçları her bir sistem için tek tek verilmiş ve ilgili istatistiksel belirteçler Tablo 4.9 ile sunulmuştur.

**Tablo 4.9:** HAE, UAE, MAE yöntemleri ile elde edilen TPM ve TFM için üretilmiş olan varyans testi göstergeleri

Kaynak	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	$\rho$
Model-(Y <sub>1</sub> )					
HAE-TPM	2641.543332	14	188.6816665	25.69615	< 0.0001
R <sup>2</sup> = 0.9636					
R <sup>2</sup> <sub>a</sub> = 0.9296					
X <sub>1</sub>	263.0507393	1	263.0507393	35.82432	< 0.0001
X <sub>2</sub>	8.552405502	1	8.552405502	1.164734	0.2797
X <sub>3</sub>	361.1051915	1	361.1051915	49.17814	< 0.0001
X <sub>4</sub>	161.2888298	1	161.2888298	21.96558	0.0002
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	40.15633682	1	40.15633682	5.468805	0.0281
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	78.82899538	1	78.82899538	10.73555	0.0039
X <sub>1</sub> X <sub>4</sub>	2.742842023	1	2.742842023	0.373542	0.5349
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	47.7909132	1	47.7909132	6.508542	0.0181
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	8.421523389	1	8.421523389	1.146909	0.2832
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	4.849599199	1	4.849599199	0.660457	0.4116

$X_1^2$	1.913060148	1	1.913060148	0.260536	0.6369
$X_2^2$	0.783075145	1	0.783075145	0.106645	0.7753
$X_3^2$	581.8669282	1	581.8669282	79.24321	< 0.0001
$X_4^2$	7.178464292	1	7.178464292	0.97762	0.2988
Kalıntı	110.141978	15	7.342798536		
Uyum eksikliği	91.26140359	10	9.126140359	2.416807	0.1099
Saf hata	18.88057445	5	3.77611489		
Kor Toplamı	2751.68531	29			
<hr/>					
Model-( $Y_2$ )					
HAE-TFM	3772.747	14	269.4819	61.41718	< 0.0001
$R^2 = 0.9766$					
$R_a^2 = 0.9548$					
$X_1$	202.0801	1	202.0801	46.05574	< 0.0001
$X_2$	12.6082	1	12.6082	2.873513	0.0034
$X_3$	901.2874	1	901.2874	205.4109	< 0.0001
$X_4$	120.6922	1	120.6922	27.50675	< 0.0001
$X_1 X_2$	56.55332	1	56.55332	12.88898	0.0039
$X_1 X_3$	93.37625	1	93.37625	21.28123	0.0005
$X_1 X_4$	0.257359	1	0.257359	0.058654	0.8216

X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	34.48854	1	34.48854	7.860226	0.0666
X <sub>2</sub> X <sub>4</sub>	5.807163	1	5.807163	1.323501	0.0973
X <sub>3</sub> X <sub>4</sub>	5.031672	1	5.031672	1.14676	0.7414
X <sub>1</sub> <sup>2</sup>	2.528858	1	2.528858	0.576348	0.293
X <sub>2</sub> <sup>2</sup>	0.360147	1	0.360147	0.082081	0.7849
X <sub>3</sub> <sup>2</sup>	781.9912	1	781.9912	178.2223	< 0.0001
X <sub>4</sub> <sup>2</sup>	12.55445	1	12.55445	2.861265	0.0688
Kalıntı	65.81593	15	4.387729		
Uyum eksikliği	48.2023	10	4.82023	1.368324	0.2119
Saf hata	17.61363	5	3.522726		
Kor Toplamı	3838.563	29			

---

Model-(Y<sub>3</sub>)

UAE-TPM

3396.412      14      242.6009      30.69572      < 0.0001

R<sup>2</sup> = 0.9663

R<sup>2</sup><sub>a</sub> = 0.9348

X<sub>5</sub>      7.178591      1      7.178591      0.90829      0.3556

X<sub>6</sub>      516.521      1      516.521      65.35419      0.0054

X<sub>7</sub>      83.53038      1      83.53038      10.5689      < 0.0001

X<sub>8</sub>      111.3974      1      111.3974      14.09484      0.0019

$X_5 X_6$	66.3037	1	66.3037	8.38925	0.0358
$X_5 X_7$	42.07414	1	42.07414	5.323542	0.0111
$X_5 X_8$	0.509142	1	0.509142	0.06442	0.8027
$X_6 X_7$	6.089584	1	6.089584	0.770501	0.3944
$X_6 X_8$	55.92235	1	55.92235	7.075723	0.2801
$X_7 X_8$	9.929064	1	9.929064	1.256301	0.0179
$X_5^2$	0.306739	1	0.306739	0.038811	0.8453
$X_6^2$	719.9439	1	719.9439	91.09279	0.788
$X_7^2$	0.590371	1	0.590371	0.074698	< 0.0001
$X_8^2$	19.00494	1	19.00494	2.40465	0.142
Kalıntı	118.5512	15	7.903412		
Uyum eksikliği	73.27567	10	7.327567	0.80922	0.6379
Saf hata	45.27551	5	9.055102		
Kor Toplamı	3514.964	29			
<hr/>					
Model-( $Y_4$ )					
UAE-TFM	5210.498	14	372.1784	38.91933	< 0.0001
$R^2 = 0.9732$					
$R_a^2 = 0.9482$					
$X_5$	0.007091	1	0.007091	0.000741	0.9791

X <sub>6</sub>	409.5227	1	409.5227	42.82448	0.0197
X <sub>7</sub>	65.08606	1	65.08606	6.806159	< 0.0001
X <sub>8</sub>	28.85888	1	28.85888	3.017822	0.1027
X <sub>5</sub> X <sub>6</sub>	32.89766	1	32.89766	3.440164	0.1903
X <sub>5</sub> X <sub>7</sub>	17.99594	1	17.99594	1.881866	0.0831
X <sub>5</sub> X <sub>8</sub>	0.844284	1	0.844284	0.088288	0.7708
X <sub>6</sub> X <sub>7</sub>	19.80698	1	19.80698	2.071249	0.1705
X <sub>6</sub> X <sub>8</sub>	51.01766	1	51.01766	5.335003	0.1238
X <sub>7</sub> X <sub>8</sub>	25.41857	1	25.41857	2.658063	0.0356
X <sub>5</sub> <sup>2</sup>	0.007505	1	0.007505	0.000785	0.9779
X <sub>6</sub> <sup>2</sup>	1459.201	1	1459.201	152.5911	0.6568
X <sub>7</sub> <sup>2</sup>	1.969026	1	1.969026	0.205904	< 0.0001
X <sub>8</sub> <sup>2</sup>	19.13896	1	19.13896	2.001393	0.1774
Kalıntı	143.4423	15	9.562817		
Uyum eksikliği	85.95692	10	8.595692	0.747642	0.6755
Saf hata	57.48533	5	11.49707		
Kor Toplamı	5353.94	29			
<hr/>					
Model-(Y <sub>5</sub> )	246.8731	14	17.6338	24.60138	< 0.0001
MAE-TPM					

---

 $R^2 = 0.9583$

$R^2_a = 0.9193$

X <sub>9</sub>	25.82591	1	25.82591	36.03041	< 0.0001
X <sub>10</sub>	5.457042	1	5.457042	7.613263	0.0146
X <sub>11</sub>	7.669428	1	7.669428	10.69982	0.0052
X <sub>12</sub>	115.6396	1	115.6396	161.3318	< 0.0001
X <sub>9</sub> X <sub>10</sub>	0.086546	1	0.086546	0.120742	0.7331
X <sub>9</sub> X <sub>11</sub>	0.132855	1	0.132855	0.185349	0.6729
X <sub>9</sub> X <sub>12</sub>	0.817246	1	0.817246	1.140161	0.3025
X <sub>10</sub> X <sub>11</sub>	0.874739	1	0.874739	1.220372	0.2867
X <sub>10</sub> X <sub>12</sub>	0.897461	1	0.897461	1.252071	0.2808
X <sub>11</sub> X <sub>12</sub>	0.102119	1	0.102119	0.142469	0.7111
X <sub>9</sub> <sup>2</sup>	0.152865	1	0.152865	0.213266	0.6508
X <sub>10</sub> <sup>2</sup>	1.237947	1	1.237947	1.727093	0.2085
X <sub>11</sub> <sup>2</sup>	67.16103	1	67.16103	93.69813	< 0.0001
X <sub>12</sub> <sup>2</sup>	7.836961	1	7.836961	10.93355	0.0048
Kalıntı	10.75171	15	0.716781		
Uyum eksikliği	9.720623	10	0.972062	4.713758	0.0505
Saf Hata	1.031091	5	0.206218		

Kor Toplamı 257.6249 29

---

Model-(Y<sub>6</sub>)

MAE-TFM

155.4826 14 11.1059 29.5352 < 0.0001

$R^2 = 0.9649$

$R^2_a = 0.9322$

X<sub>9</sub> 17.04427 1 17.04427 45.3278 < 0.0001

X<sub>10</sub> 6.638175 1 6.638175 17.65367 0.0008

X<sub>11</sub> 0.001043 1 0.001043 0.002775 0.9578

X<sub>12</sub> 66.55145 1 66.55145 176.988 < 0.0001

X<sub>9</sub> X<sub>10</sub> 0.484003 1 0.484003 1.287164 0.2754

X<sub>9</sub> X<sub>11</sub> 0.096664 1 0.096664 0.257069 0.621

X<sub>9</sub> X<sub>12</sub> 0.438476 1 0.438476 1.16609 0.2959

X<sub>10</sub> X<sub>11</sub> 0.121152 1 0.121152 0.322192 0.5825

X<sub>10</sub>X<sub>12</sub> 0.619212 1 0.619212 1.646741 0.2233

X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> 0.000678 1 0.000678 0.001803 0.9681

X<sub>9</sub><sup>2</sup> 0.152306 1 0.152306 0.405046 0.5332

X<sub>10</sub><sup>2</sup> 0.945456 1 0.945456 2.514361 0.1316

X<sub>11</sub><sup>2</sup> 46.00841 1 46.00841 122.3555 < 0.0001

X<sub>12</sub><sup>2</sup> 3.795895 1 3.795895 10.09486 0.0064



Kalıntı	5.640336	15	0.376022		
Uyum eksikliği	4.947081	10	0.494708	3.568007	0.0867
Saf Hata	0.693255	5	0.138651		
Kor Toplamı	161.1229	29			

CYY ile türetilmiş olan model denklemlerin güvenilirliğinin bir ölçüsü olan  $R^2$  ve RSME değerleri Tablo 4.10 ile verilmiştir.

**Tablo 4.10:** HAE, UAE ve MAE yöntemleri için türetilen model eşitliklerinin güvenilirlik ölçütleri

Response	Yöntem	Denklem	$R^2$	RSME
TPM (mg-GAE / g-KY)	HAE	$y = 0.9636x + 1.031$	0.9636	3.399016
	UAE	$y = 0.9662x + 0.8481$	0.9663	1.987892
	MAE	$y = 0.9583x + 0.3382$	0.9583	0.598657
TFM (mg-CE / g-KY)	HAE	$y = 0.9727x + 0.1946$	0.9764	2.781732
	UAE	$y = 0.9732x + 0.6563$	0.9732	2.186645
	MAE	$y = 0.9734x + 0.2051$	0.9653	0.43003

Tablo 4.11 ise CYY ile bulunan optimum koşulları ve bu koşullarda hesaplanan maksimum cevap değerlerini ve yine bu koşullarda yapılan çalışmalar sonucu elde edilen deneysel sonuçları karşılaştırmalı olarak özetlemektedir.

**Tablo 4.11:** HAE, UAE ve MAE yöntemlerinden ekstrakte edilen TPM ve TFM için hesaplanan optimum koşullar ve sonuçların validasyonu

Yöntem	Optimum		Optimum değer					
	Ekstraksiyon Koşulları		TPM (mg-GAE / g-KY)			TFM (mg-CE / g-KY)		
			Deneysel	Öngörülen	CV%	Deneysel	Öngörülen	CV%
HAE	X <sub>1</sub>	9580.77						
	X <sub>2</sub>	81.86						
	X <sub>3</sub>	45.94	43.722	43.202 <sup>a</sup>	0.85	42.180	42.474 <sup>d</sup>	0.49
	X <sub>4</sub>	32.37						
UAE	X <sub>5</sub>	25.00						
	X <sub>6</sub>	60.00						
	X <sub>7</sub>	43.61	42.854	42.744 <sup>b</sup>	0.18	44.512	44.806 <sup>e</sup>	0.47
	X <sub>8</sub>	30.47						
MAE	X <sub>9</sub>	228.26						
	X <sub>10</sub>	1.07						
	X <sub>11</sub>	27.20	14.633	14.575 <sup>c</sup>	0.28	11.372	11.483 <sup>f</sup>	0.69
	X <sub>12</sub>	5.04						

Her bir bağımlı değişkenin aralarında olan ilişki, Graphpad programı ile hesaplanarak Pearson korelasyon katsayısı ile sunulmuştur. Söz konusu korelasyon değerleri Tablo 4.12 ile verilmiştir.

**Tablo 4.12:** HAE, UAE ve MAE yöntemleri ile elde edildiği zeytin yaprağının ekstraktlarının TPM, TFM ve AA içerikleri arasındaki korelasyon değerleri

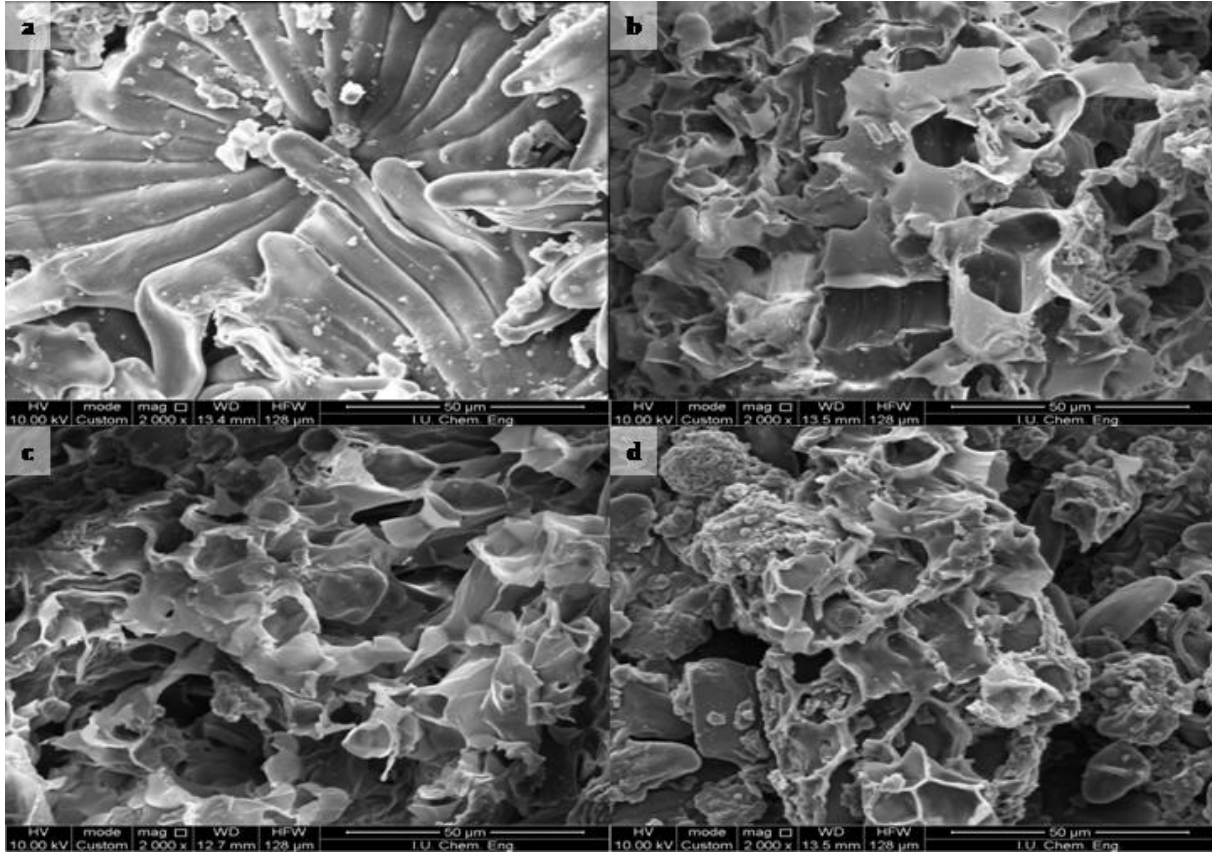
Yanıtların arasında ilişki	Yöntem	r
		Pearson
TPC vs TFC	HAE	0.9772
	UAE	0.9736
	MAE	0.9754
DPPH	HAE	0.9903
	UAE	0.9856
	MAE	0.9632
TPC vs AA	HAE	0.9752
	UAE	0.9823
	MAE	0.9837
DPPH	HAE	0.9884
	UAE	0.9891
	MAE	0.8996
TFC vs AA	HAE	0.9829
	UAE	0.9667

	MAE	0.9225
<hr/>		
	HAE	0.9877
AA (DPPH) vs AA (CUPRAC)	UAE	0.9865
	MAE	0.9917
<hr/> <hr/>		



#### 4.4. SEM ANALİZİ

Her bir ekstraksiyon yönteminde elde edilen fenolik madde verimi ile hücre yapısındaki parçalanma arasında bir ilişki kurabilmek için taramalı electron mikroskobu kullanılarak karakterizasyon analizi de yapılmıştır. Dolayısıyla örneklerin ekstraksiyondan önce ve sonra yapılarındaki değişimin gözlenmesi için SEM ile görüntüleri incelenmiştir. Şekil 4.13 zeytin yapraklarının dokularındaki fiziksel değişimi sergilemektedir.



**Şekil 4.13:** Zeytin yapraklarının SEM görüntüleri (a): İşlem görmemiş; (b) HAE ile ekstrakte edilmiş; (c) UAE ile ekstrakte edilmiş; (d) MAE ile ekstrakte edilmiş.

#### 4.5. STABİLİZASYON ÇALIŞMALARI

Tablo 4.13, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki fenolik madde değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.13:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	TPM (mg-GAE/g-KY)	
		Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	43.77±0.003	21.80±0.009
	7	43.77±0.005	21.65±0.000
	10	43.77±0.006	22.20±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	43.86±0.001	20.20±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafe	43.77±0.000	19.90±0.007
	Karanlık	43.77±0.004	20.55±0.002
Sıcaklık	-20°C	43.77±0.003	21.64±0.002
1 atm	4°C	43.77±0.002	20.10±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.14, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki flavonoid madde değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.14:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	TFM (mg-CE/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	433	42.18±0.000	20.61±0.004
	7	363	42.18±0.000	20.44±0.004
	10	81	42.18±0.001	21.07±0.004
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	369	42.18±0.004	18.81±0.004
	Lambadan 20 cm uzak mesafe	165	42.18±0.003	18.47±0.002
	Karanlık	491	42.18±0.002	19.20±0.005
Sıcaklık	-20°C	578	42.18±0.000	20.43±0.000
1 atm	4°C	491	42.18±0.000	18.69±0.000

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.15, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki inhibisyon cinsinden antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.15:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	AA (% inhibisyon)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	433	91.98±0.001	89.62±0.001
	7	363	91.98±0.001	89.61±0.000
	10	81	91.98±0.000	89.64±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	369	91.98±0.001	89.54±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafe	165	91.98±0.002	89.53±0.000
	Karanlık	491	91.98±0.000	89.56±0.002
Sıcaklık	-20°C	578	91.98±0.000	89.61±0.001
1 atm	4°C	491	91.98±0.000	89.54±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma



Tablo 4.16, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki DPPH ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.16:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

	Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	DPPH	
			AA (mg-TEAC / g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	433	18.72±0.001	18.44±0.001
	7	363	18.72±0.001	18.43±0.000
	10	81	18.72±0.000	18.44±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	369	18.72±0.001	18.42±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	165	18.72±0.002	18.41±0.000
	Karanlık	491	18.72±0.000	18.42±0.002
Sıcaklık	-20°C	578	18.72±0.000	18.43±0.001
1 atm	4°C	491	18.72±0.000	18.41±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.17, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki CUPRAC ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.17:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

	Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	CUPRAC	
			AA (mg-TEAC / g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	433	101.57±0.000	78.90±0.000
	7	363	101.57±0.000	78.75±0.001
	10	81	101.57±0.001	79.32±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	369	101.57±0.002	77.23±0.003
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	165	101.57±0.000	76.92±0.000
	Karanlık	491	101.57±0.000	77.60±0.000
Sıcaklık	-20°C	578	101.57±0.000	78.74±0.000
1 atm	4°C	491	101.57±0.000	77.13±0.001

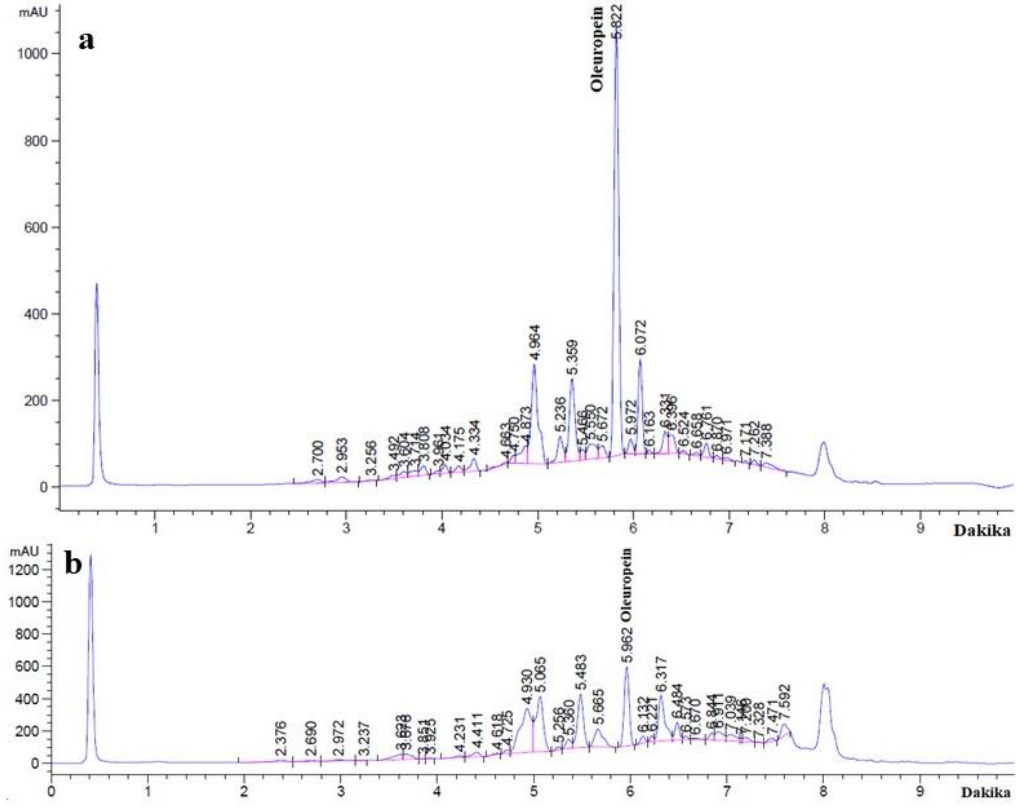
\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.18, HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki oleuropein değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.18:** HAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	Oleuropein (mg/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	433	367.01	188.02
	7	363	367.01	186.71
	10	81	367.01	191.53
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	369	367.37	174.01
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	165	367.01	171.38
	Karanlık	491	367.01	177.10
Sıcaklık	-20°C	578	367.01	186.62
1 atm	4°C	491	367.01	173.13

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma



**Şekil 4.14:** HAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu.

Tablo 4.19, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı

**Tablo 4.19:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	TPM (mg-GAE/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	404	42.85±0.001	22.42±0.003
	7	357	42.85±0.001	22.31±0.001
	10	81	42.85±0.002	21.75±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	363	42.85±0.000	20.44±0.001
	Lambadan 20 cm uzak mesafelik	159	42.85±0.000	19.01±0.002
	Karanlık	462	42.85±0.000	20.78±0.000
Sıcaklık	-20°C	549	42.85±0.003	21.37±0.000
1 atm	4°C	462	42.85±0.001	20.98±0.000

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.20, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki flavonoid madde değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.20:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	TFM (mg-CE/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	404	44.51±0.002	21.38±0.008
	7	357	44.51±0.001	21.19±0.006
	10	81	44.51±0.001	20.58±0.005
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	363	44.51±0.001	19.00±0.005
	Lambadan 20 cm uuzak mesafalık	159	44.51±0.001	17.28±0.001
	Karanlık	462	44.51±0.002	19.42±0.000
Sıcaklık	-20°C	549	44.51±0.002	20.13±0.004
1 atm	4°C	462	44.51±0.002	19.65±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.21, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki inhibisyon cinsinden antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.21:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	%AA (%İnhibisyon)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	404	92.34±0.000	90.47±0.000
	7	357	92.34±0.000	90.46±0.001
	10	81	92.34±0.000	90.44±0.001
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	363	92.34±0.000	90.39±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafelik	159	92.34±0.000	90.33±0.000
	Karanlık	462	92.34±0.000	90.40±0.001
Sıcaklık	-20°C	549	92.34±0.001	90.42±0.001
1 atm	4°C	462	92.34±0.000	90.41±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.22, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki DPPH ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.22:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	DPPH		
		AA (mg-TEAC / g-KY)		
		Başlangıç	Bitiş	
pH 1 atm, 4°C	4	404	18.63±0.000	18.48±0.000
	7	357	18.63±0.000	18.48±0.001
	10	81	18.63±0.000	18.48±0.001
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	363	18.63±0.000	18.47±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	159	18.63±0.000	18.45±0.000
	Karanlık	462	18.63±0.000	18.47±0.001
Sıcaklık	-20°C	549	18.63±0.001	18.47±0.001
1 atm	4°C	462	18.63±0.000	18.47±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma



Tablo 4.23, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki DPPH ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.23:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	CUPRAC	
		AA (mg-TEAC / g-KY)	
		Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	107.17±0.000	79.92±0.01
	7	107.17±0.003	79.73±0.002
	10	107.17±0.001	78.98±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	107.17±0.005	77.11±0.003
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	107.17±0.001	75.08±0.001
	Karanlık	107.17±0.000	77.61±0.002
Sıcaklık 1 atm	-20°C	107.17±0.007	78.44±0.001
	4°C	107.17±0.000	77.88±0.000

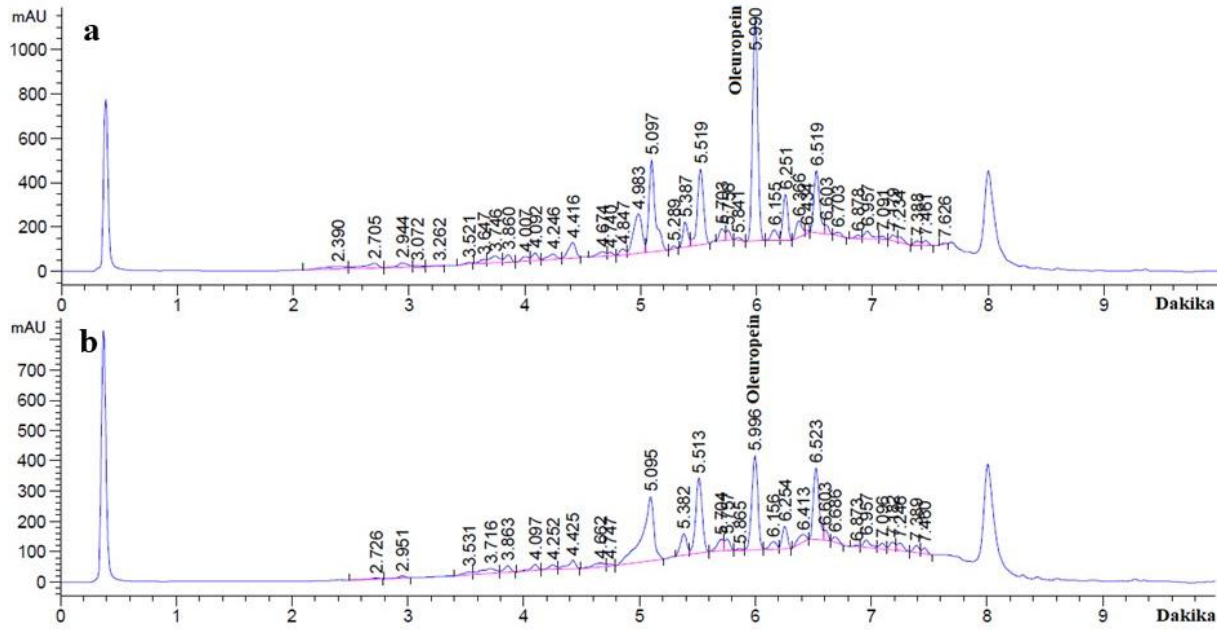
\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.24, UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki oleuropein değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.24:** UAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	Oleuropein (mg/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	404	325.67	170.48
	7	357	325.67	169.41
	10	81	325.67	165.28
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	363	325.67	154.96
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	159	325.67	143.74
	Karanlık	462	325.67	157.68
Sıcaklık	-20°C	549	325.67	162.30
1 atm	4°C	462	325.67	159.21

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma



**Şekil 4.15:** UAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu.

Tablo 4.25, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki fenolik madde değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.25:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	TPM (mg-GAE/g-KY)	
		Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	14.63±0.001	6.32±0.001
	7	14.63±0.001	6.32±0.003
	10	14.63±0.001	6.00±0.001
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	14.63±0.001	6.05±0.005
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	14.63±0.002	6.09±0.001
	Karanlık	14.63±0.002	6.32±0.001
Sıcaklık 1 atm	-20°C	14.63±0.001	6.32±0.001
	4°C	14.63±0.001	6.02±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.26, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki flavonoid madde değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.26:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	TFM (mg-CE/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	213	14.58±0.001	8.10±0.003
	7	183	14.58±0.000	8.10±0.000
	10	39	14.58±0.000	7.85±0.001
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	183	14.58±0.000	7.89±0.004
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	81	14.58±0.000	7.92±0.001
	Karanlık	231	14.58±0.000	8.10±0.005
Sıcaklık	-20°C	285	14.58±0.000	8.10±0.007
1 atm	4°C	243	14.58±0.002	7.87±0.009

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.27, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki inhibisyon cinsinden antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.27:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (% inhibisyon) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	%AA (%İnhibisyon)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	213	91.93±0.000	90.49±0.000
	7	183	91.93±0.000	90.49±0.000
	10	39	91.93±0.000	90.47±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	183	91.93±0.000	90.47±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafelik	81	91.93±0.000	90.48±0.000
	Karanlık	231	91.93±0.000	90.49±0.000
Sıcaklık	-20°C	285	91.93±0.000	90.49±0.000
1 atm	4°C	243	91.93±0.000	90.47±0.000

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.28, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki DPPH ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.28:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (DPPH) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

	Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	DPPH	
			AA (mg-TEAC / g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	213	4.01±0.000	3.95±0.000
	7	183	4.01±0.000	3.95±0.000
	10	39	4.01±0.000	3.95±0.000
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	183	4.01±0.000	3.95±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	81	4.01±0.000	3.95±0.000
	Karanlık	231	4.01±0.000	3.95±0.000
Sıcaklık	-20°C	285	4.01±0.000	3.95±0.000
1 atm	4°C	243	4.01±0.000	3.95±0.000

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

Tablo 4.29, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki CUPRAC ile ölçülen antioksidan aktivite değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.29:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının AA (CUPRAC) içeriklerinin kararlılık süreleri\*

Depolama koşulları	Kararlılık süresi (gün)	CUPRAC	
		AA (mg-TEAC / g-KY)	
		Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	9.85±0.009	9.15±0.002
	7	9.85±0.001	9.15±0.001
	10	9.85±0.001	9.14±0.003
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	9.85±0.006	9.14±0.000
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	9.85±0.005	9.14±0.006
	Karanlık	9.85±0.008	9.15±0.000
Sıcaklık	-20°C	9.85±0.001	9.15±0.001
1 atm	4°C	9.85±0.000	9.14±0.001

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

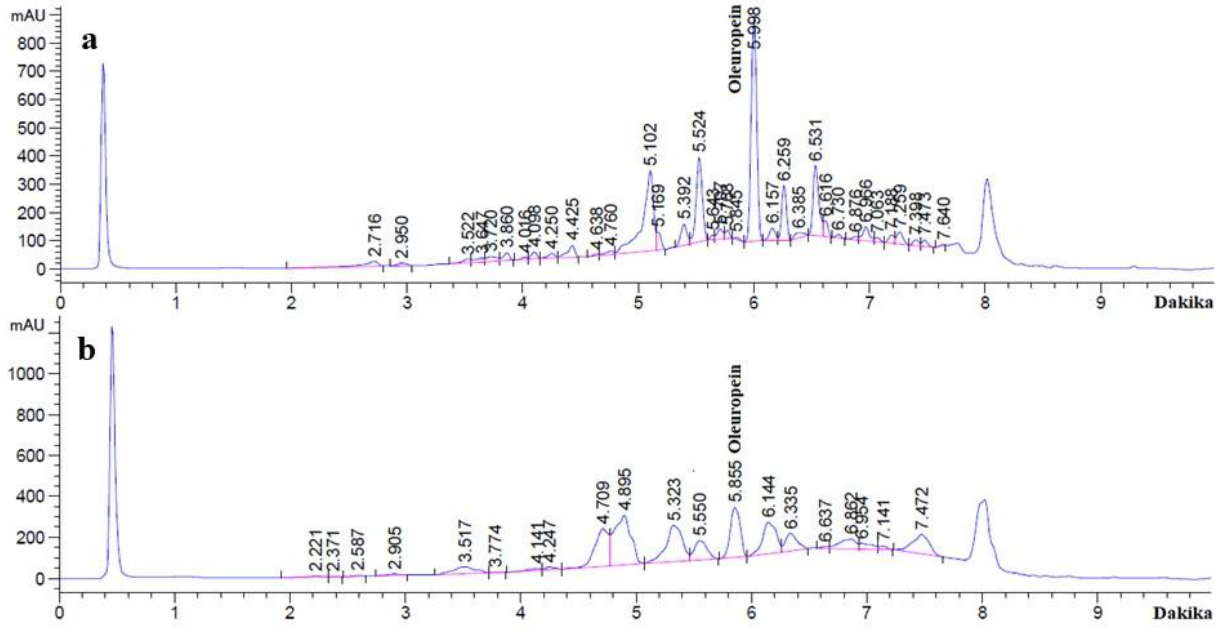


Tablo 4.30, MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki oleuropein değişimini karşılaştırmalı olarak göstermektedir.

**Tablo 4.30:** MAE yönteminin optimum koşullarında elde edilmiş ve farklı depolama koşulları altında incelenmiş zeytin yaprağı ekstraktlarının oleuropein içeriklerinin kararlılık süreleri\*

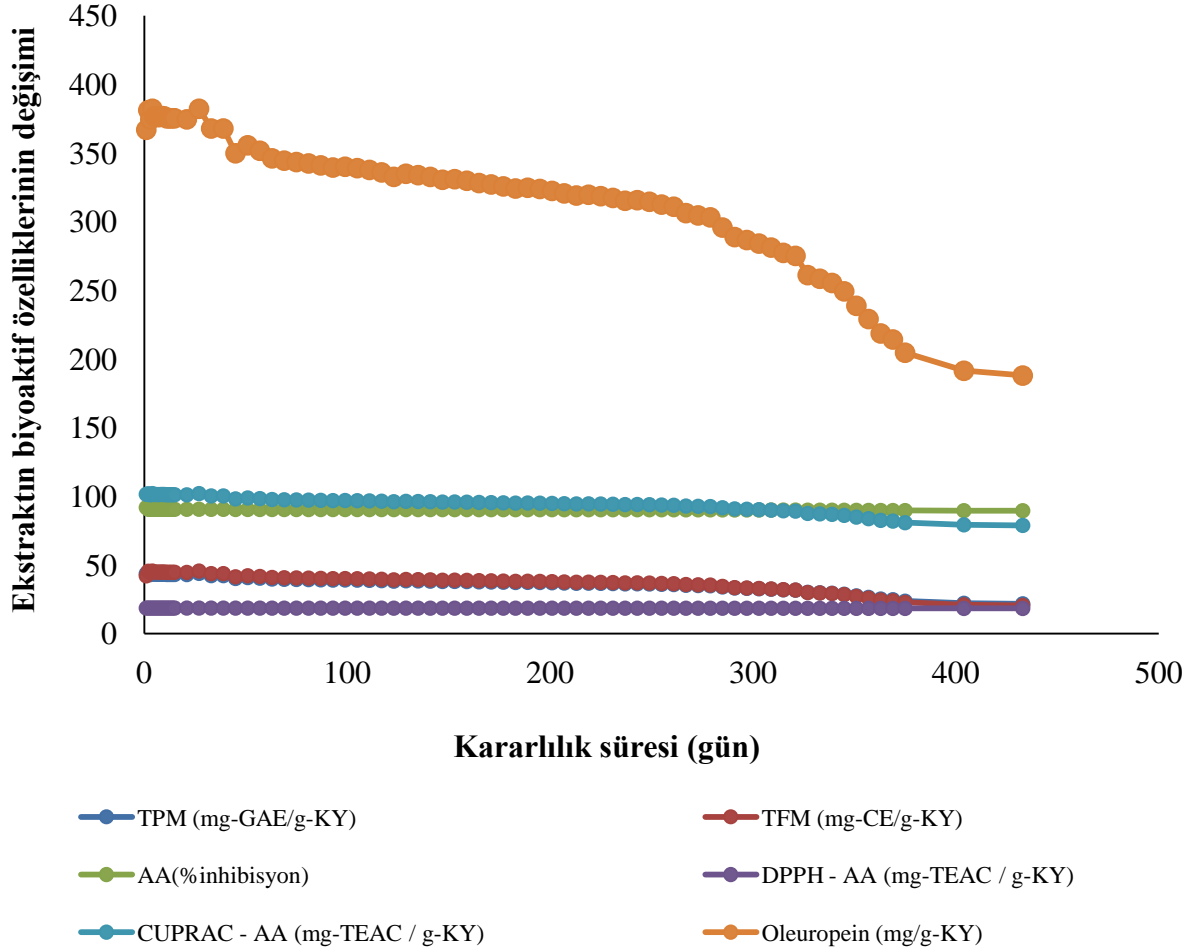
Depolama koşulları		Kararlılık süresi (gün)	Oleuropein (mg/g-KY)	
			Başlangıç	Bitiş
pH 1 atm, 4°C	4	213	142.91	70.79
	7	183	142.91	70.79
	10	39	142.91	68.00
Aydınlatma 1 atm, 25°C	Normal oda aydınlatması	183	142.91	68.44
	Lambadan 20 cm uzak mesafalık	81	142.91	68.78
	Karanlık	231	142.91	70.79
Sıcaklık	-20°C	285	142.91	70.79
1 atm	4°C	243	142.91	68.17

\* Veriler ortalama olarak verilmiştir (n= 3) ± standart sapma

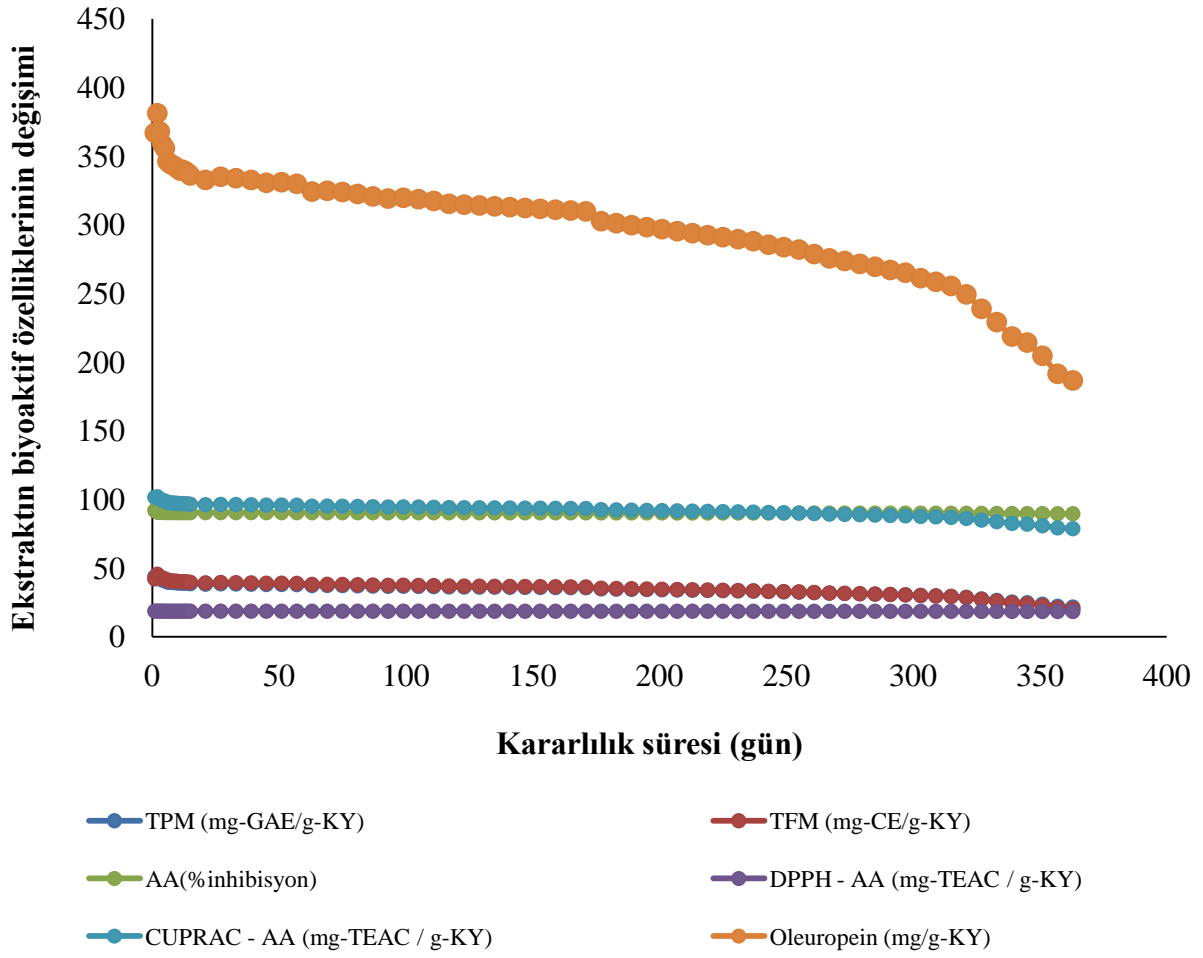


**Şekil 4.16:** MAE'nin optimal koşullarında elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktının farklı muhafaza koşullarındaki HPLC kromatogramları: (a) Başlangıçtaki oleuropein konsantrasyonu ve (b) stabiliteyi kaybettiğindeki oleuropein konsantrasyonu.

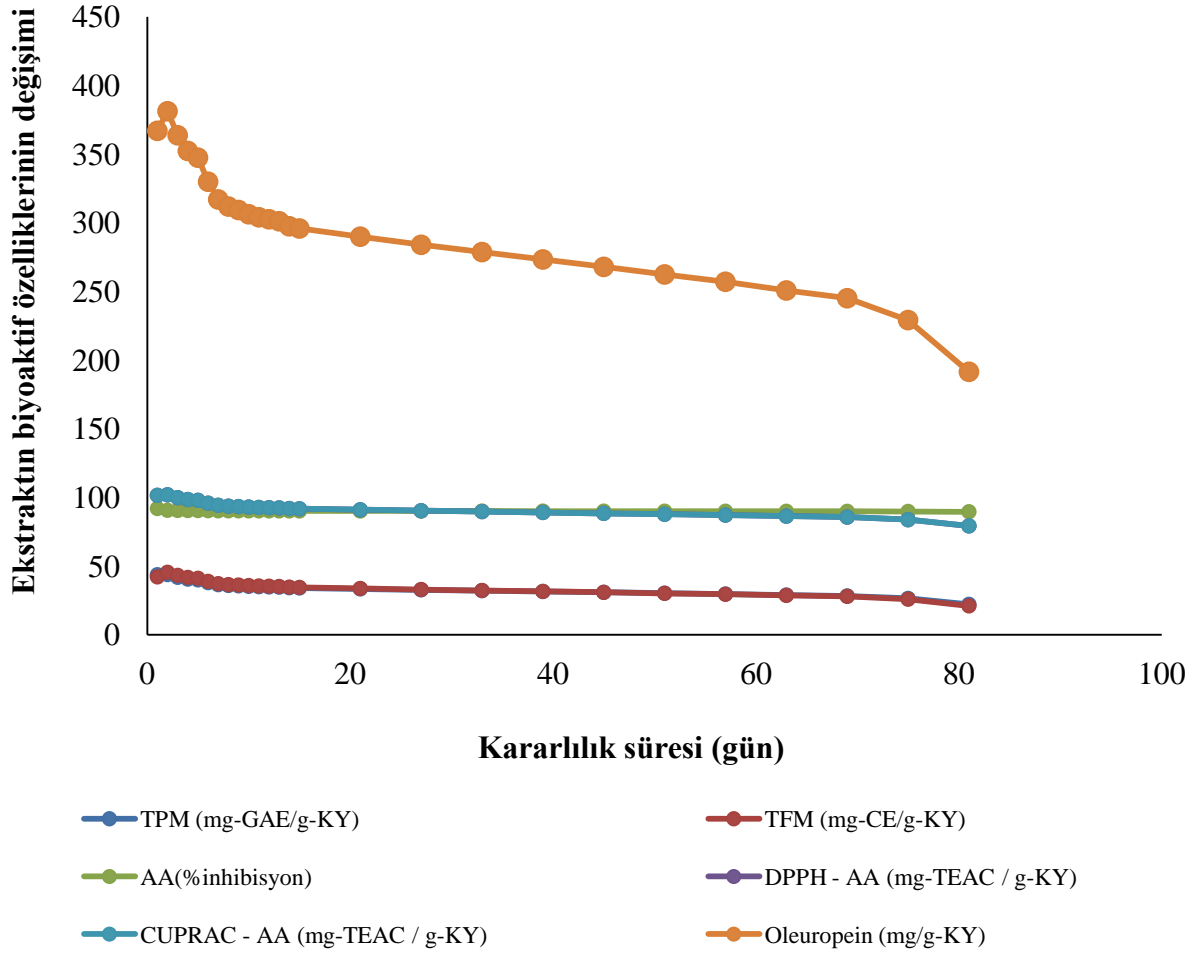
Farklı yöntemler ile elde edilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktlarının farklı muhafaza koşullarında depolanması sonucu çeşitli biyoaktif özelliklerinin stabiliteledeki değişim görsel olarak da sunulmuştur. Şekil 4.17 ile 4.24 arasındaki grafikler HAE ile optimum koşullarda elde edilmiş ve türlü şartlarda depolanan ekstrakt numunelerindeki TPM, TFM, AA ve oleuropein değerlerindeki değişimi göstermektedirler.



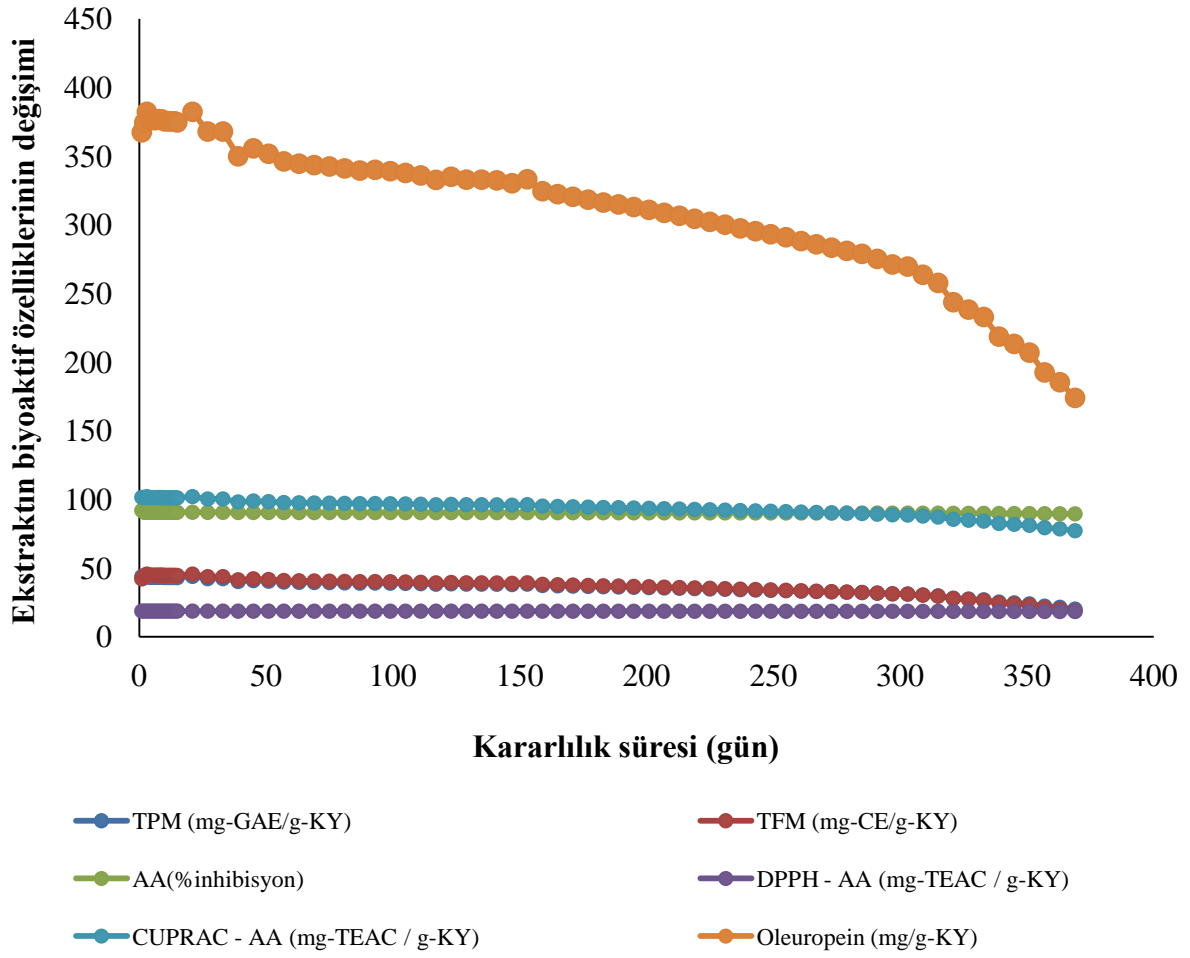
**Şekil 4.17:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



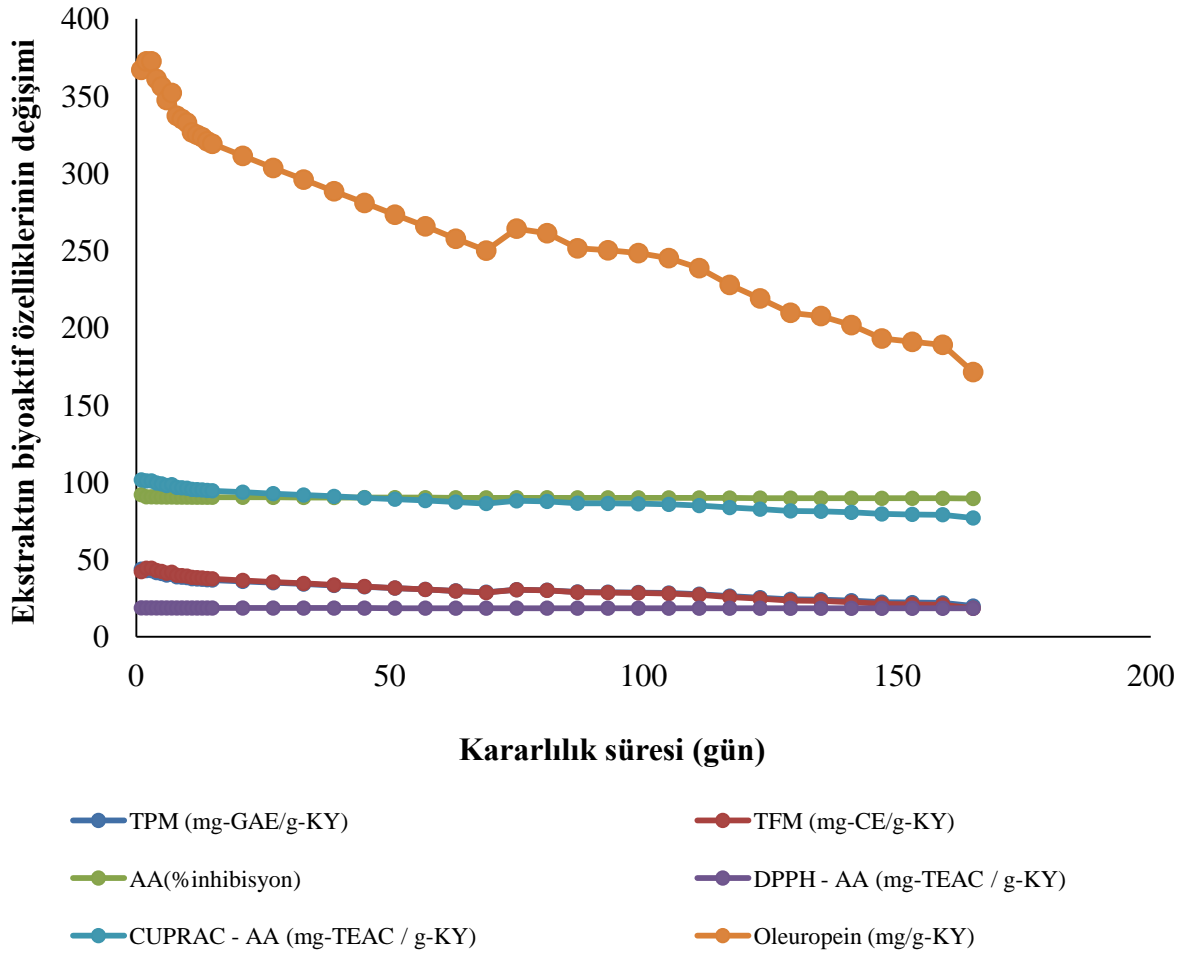
**Şekil 4.18:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



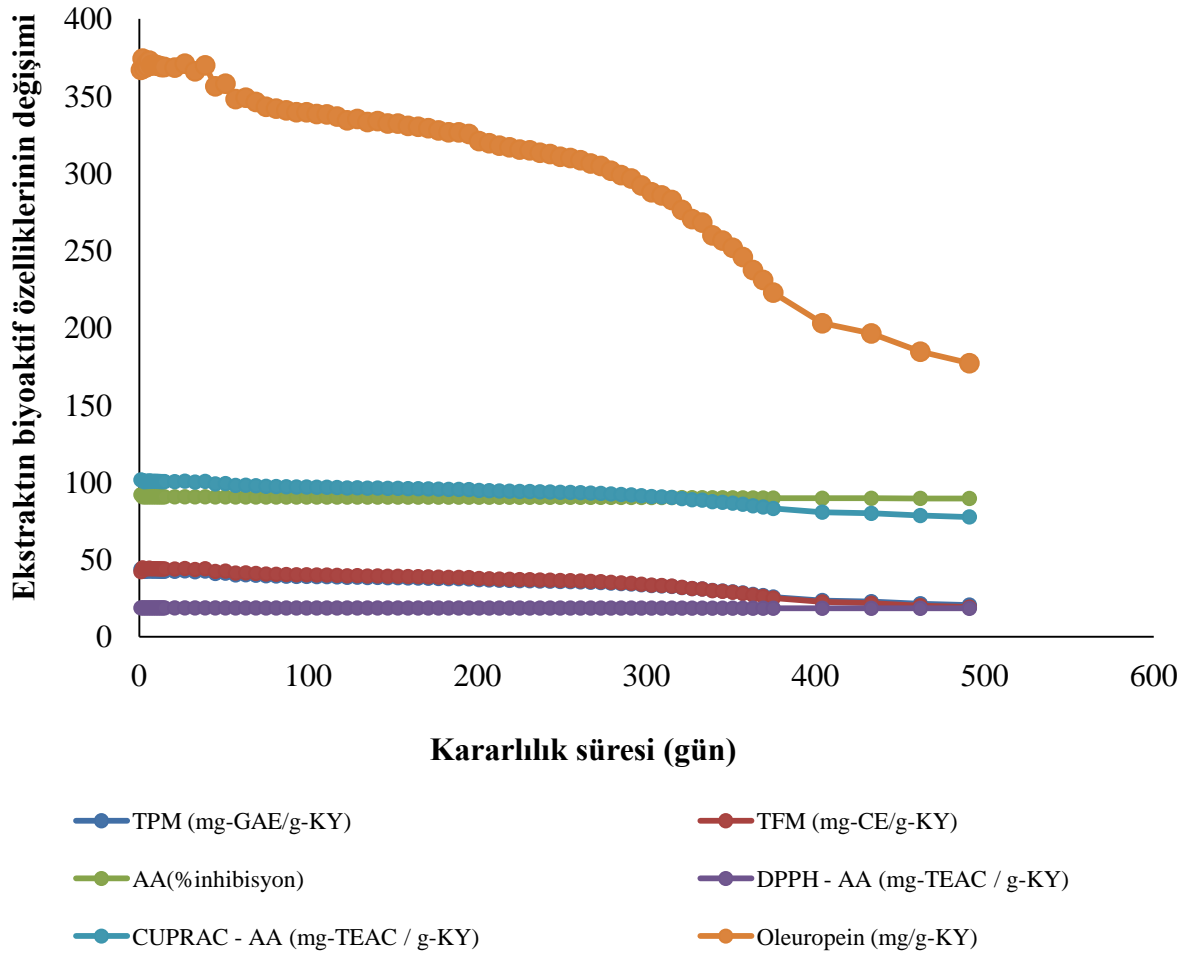
**Şekil 4.19:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



**Şekil 4.20:** HAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

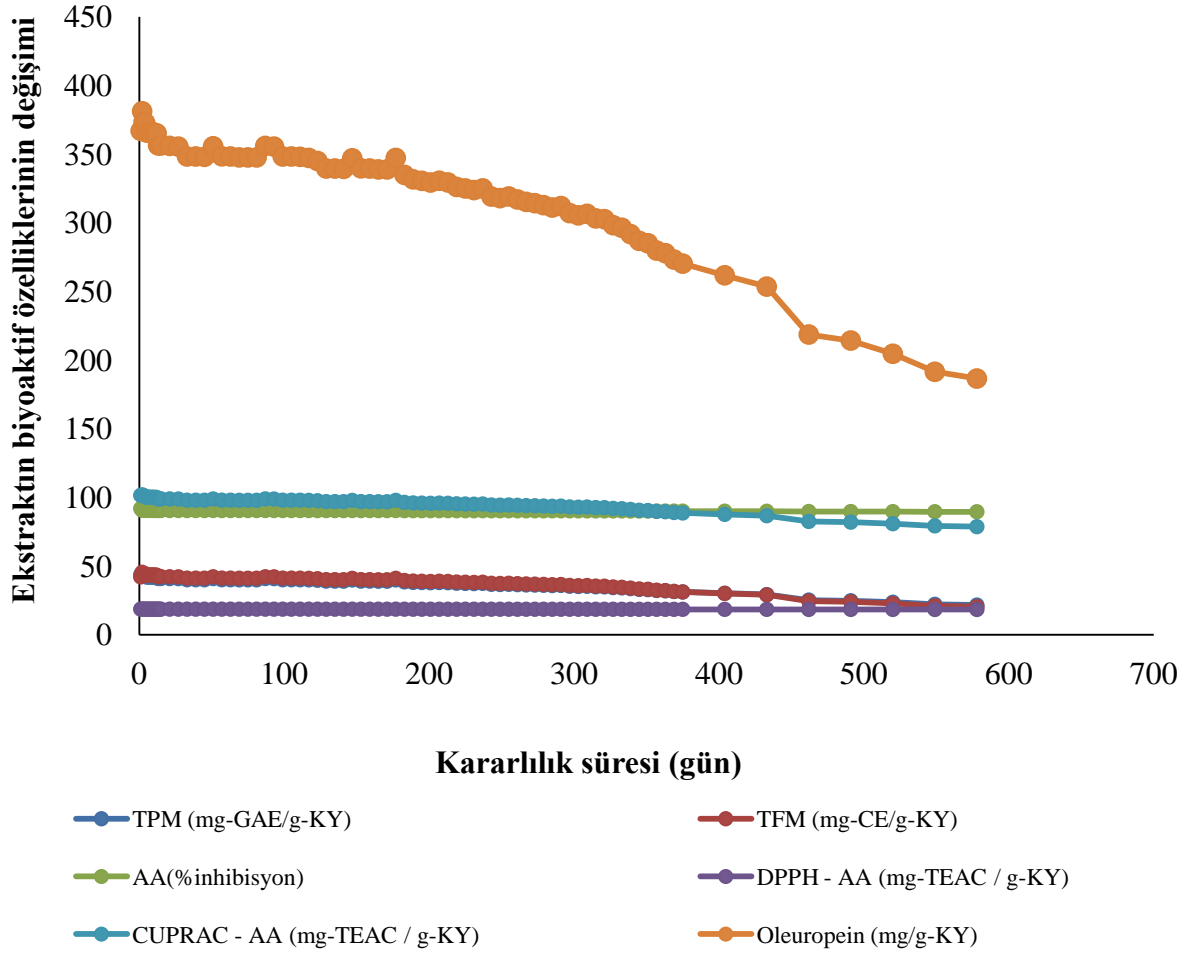


**Şekil 4.21:** HAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

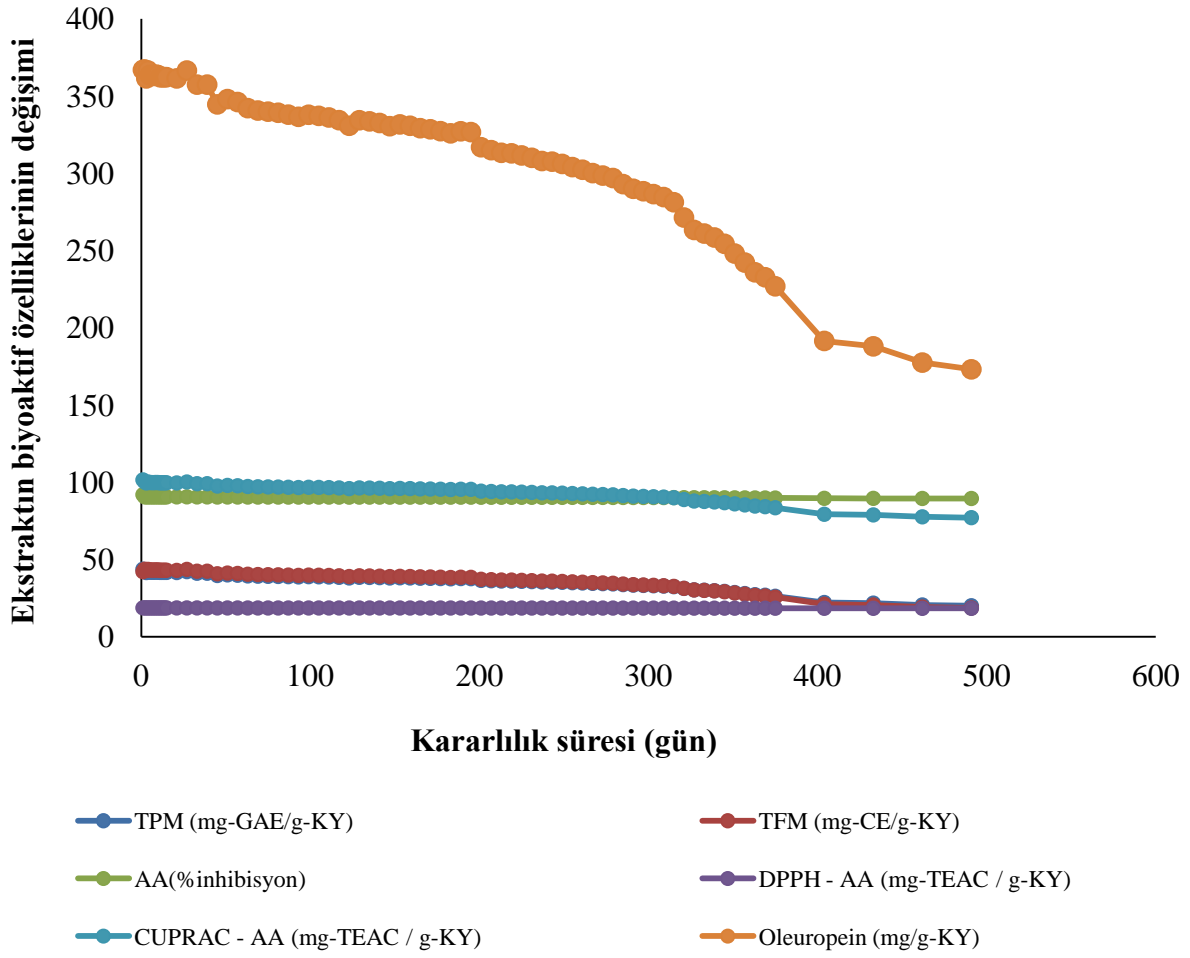


**Şekil 4.22:** HAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



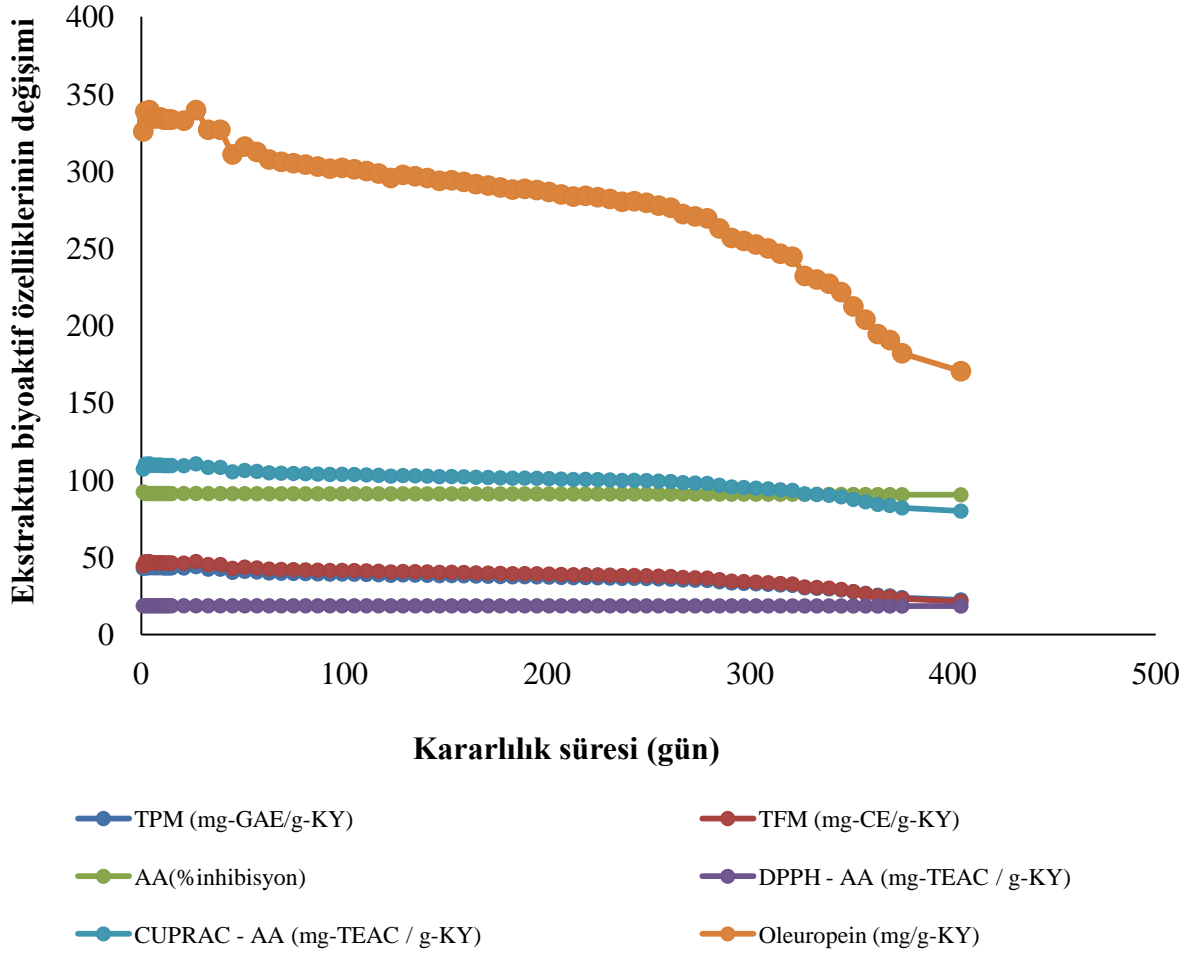


**Şekil 4.23:** HAE ile elde edilmiş ve -20°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

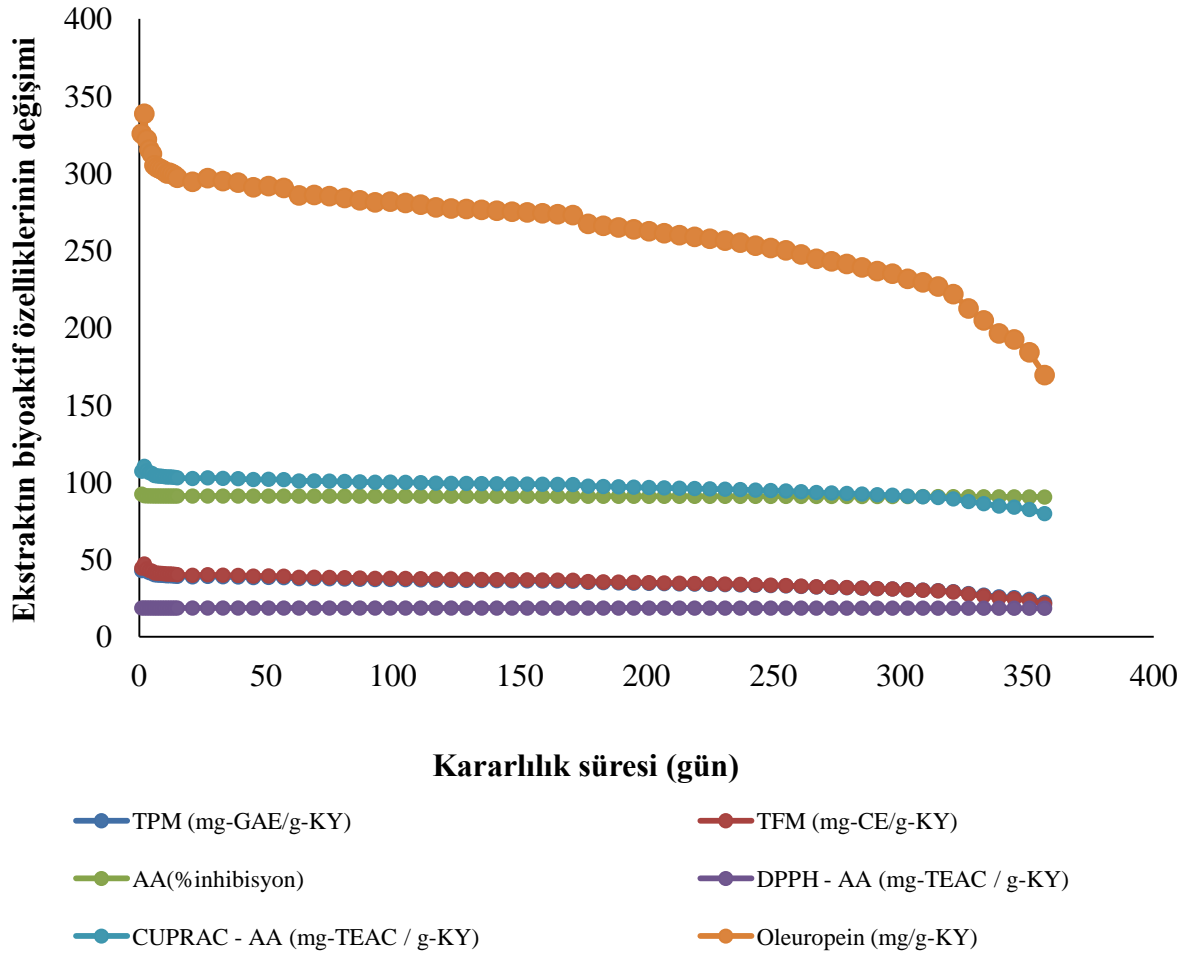


**Şekil 4.24:** HAE ile elde edilmiş ve 4°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

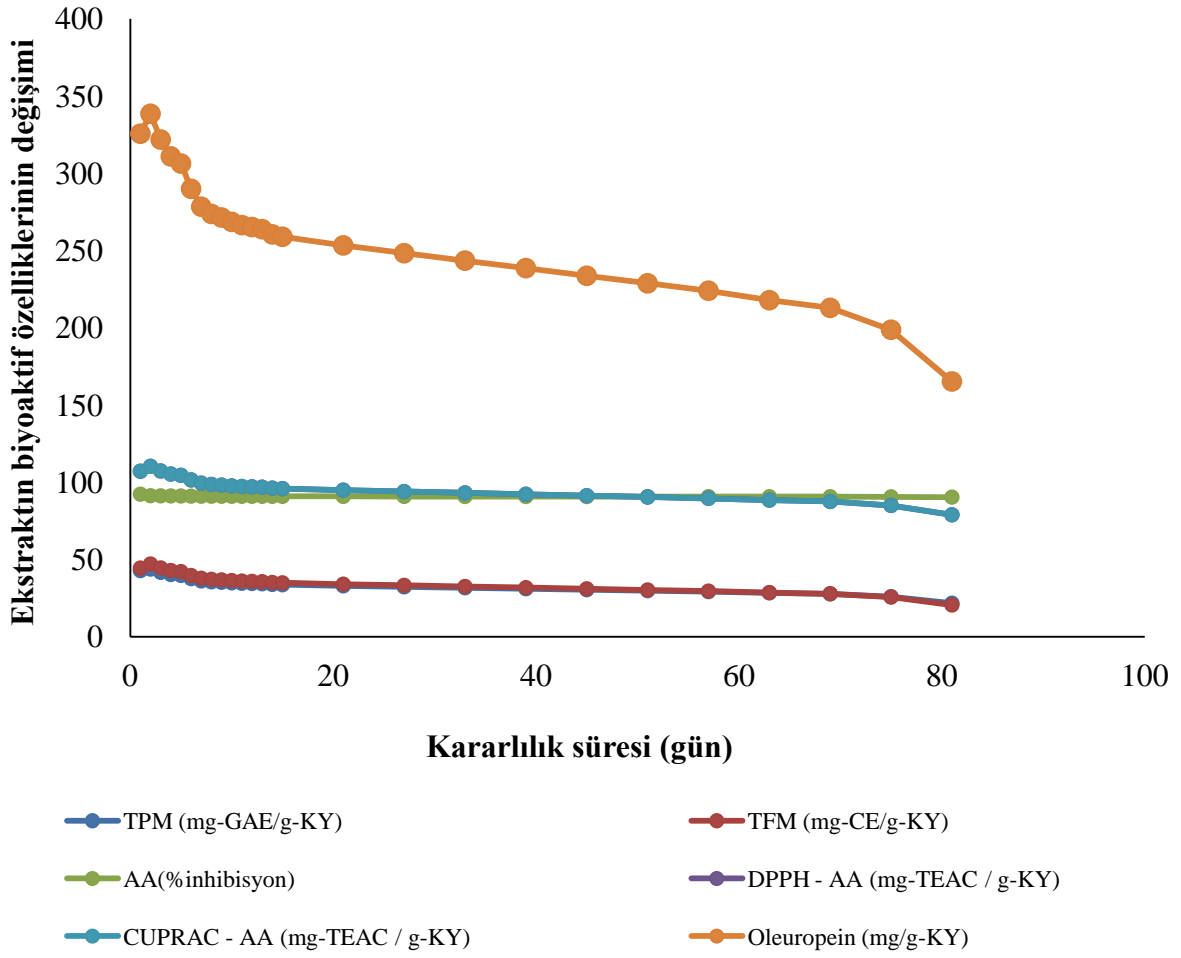
Şekil 4.25 ile 4.23 arasındaki grafikler UAE ile optimum koşullarda elde edilmiş ve türlü şartlarda depolanan ekstrakt numunelerindeki TPM, TFM, AA ve oleuropein değerlerindeki değişimi göstermektedirler.



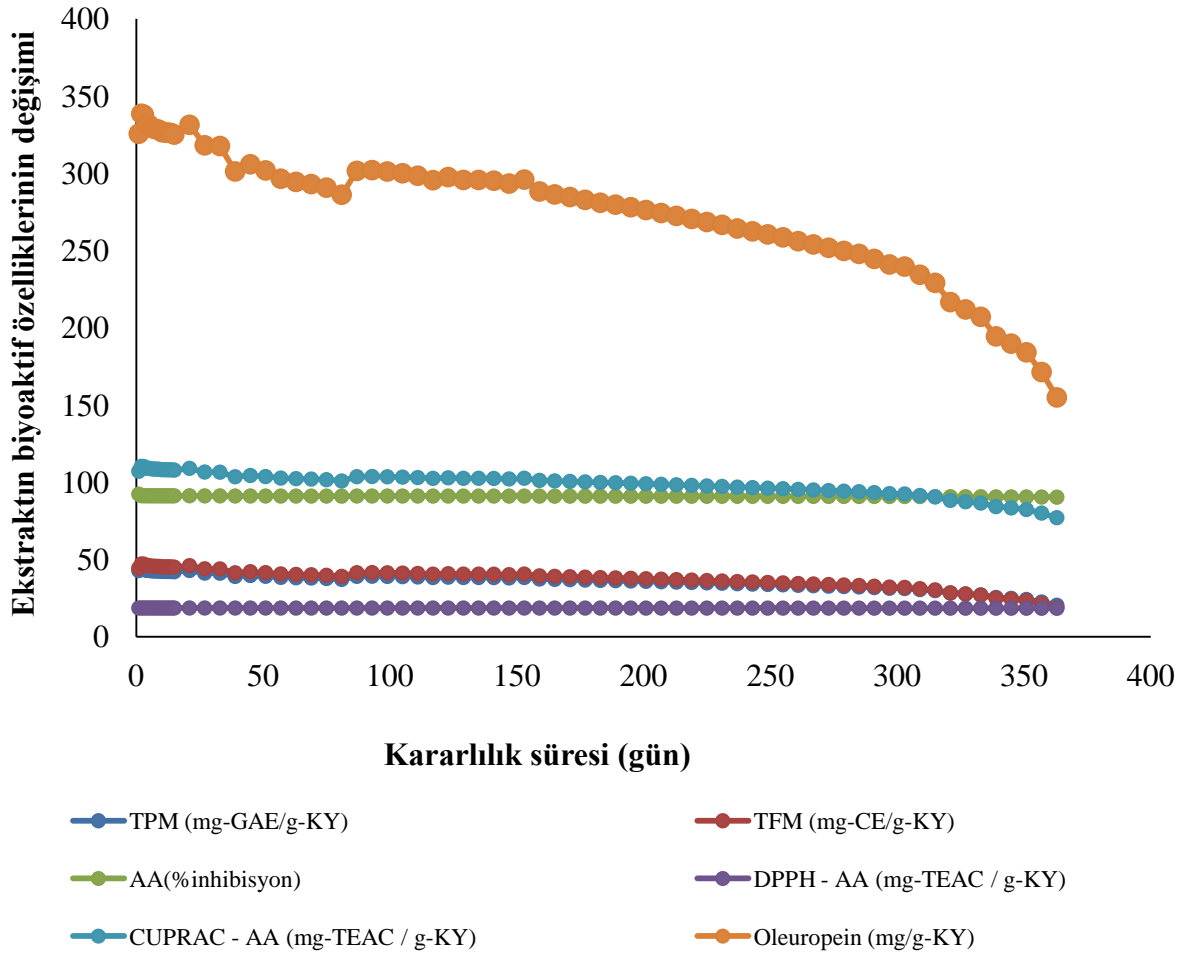
Şekil 4.25: UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



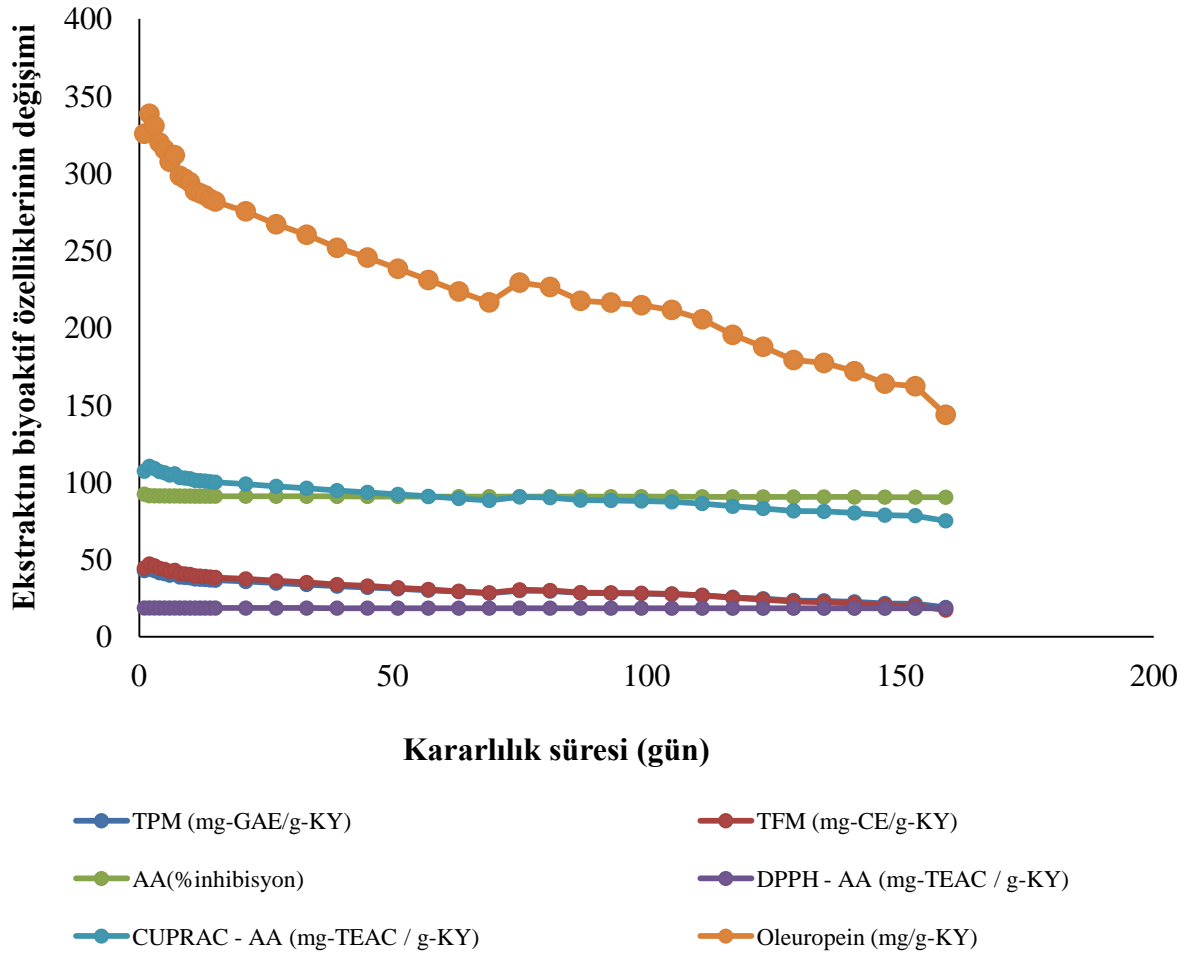
**Şekil 4.26:** UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



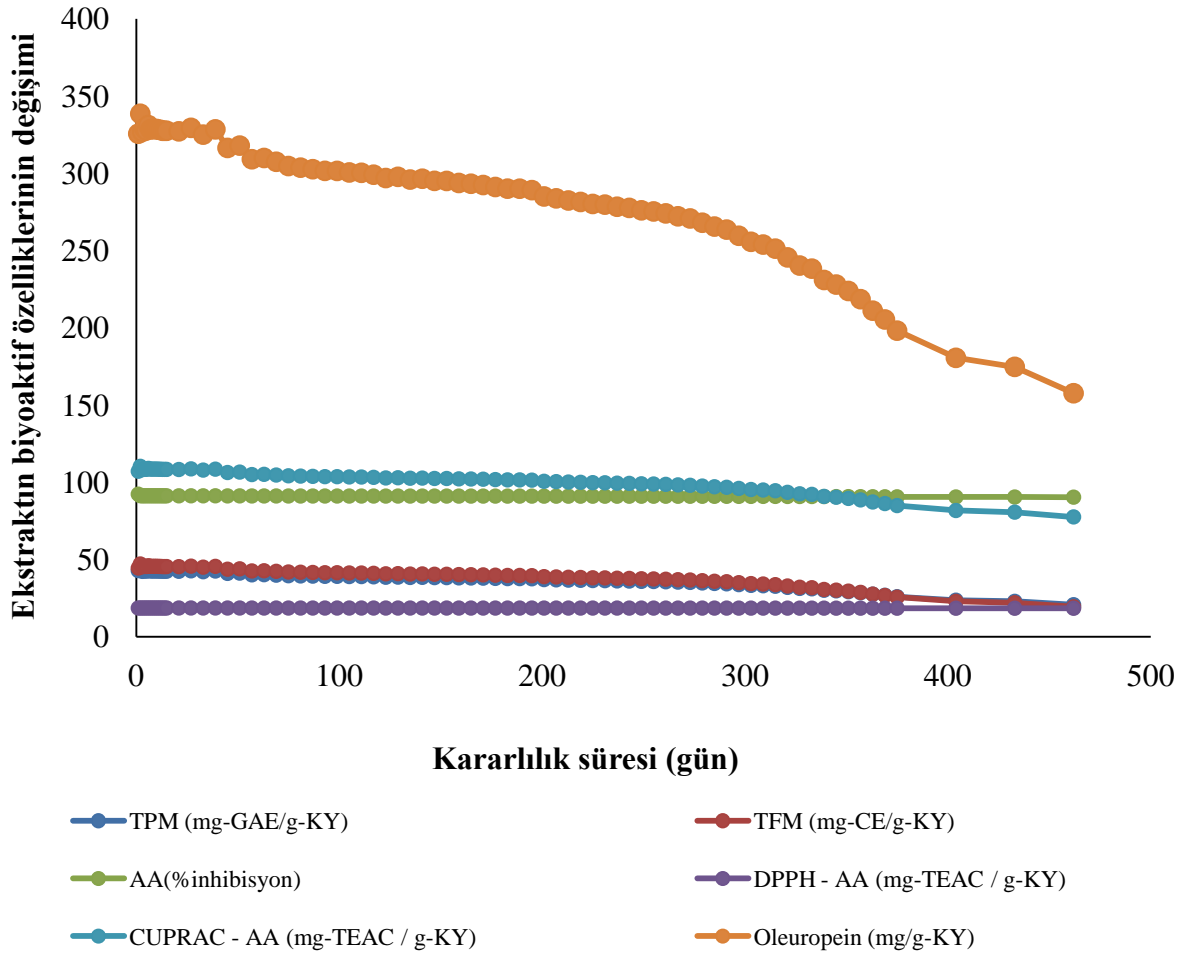
**Şekil 4.27:** UAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



**Şekil 4.28:** UAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

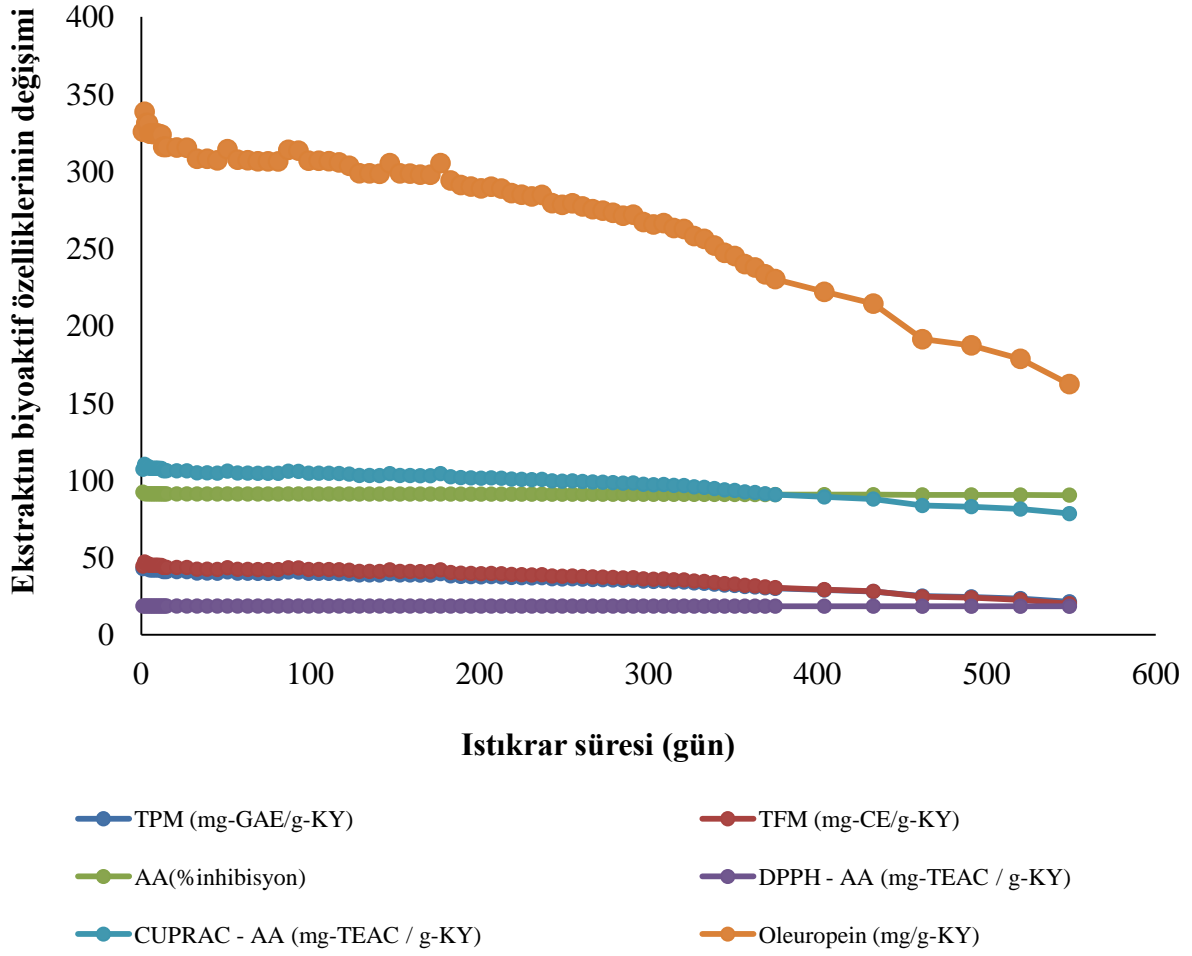


**Şekil 4.29:** UAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

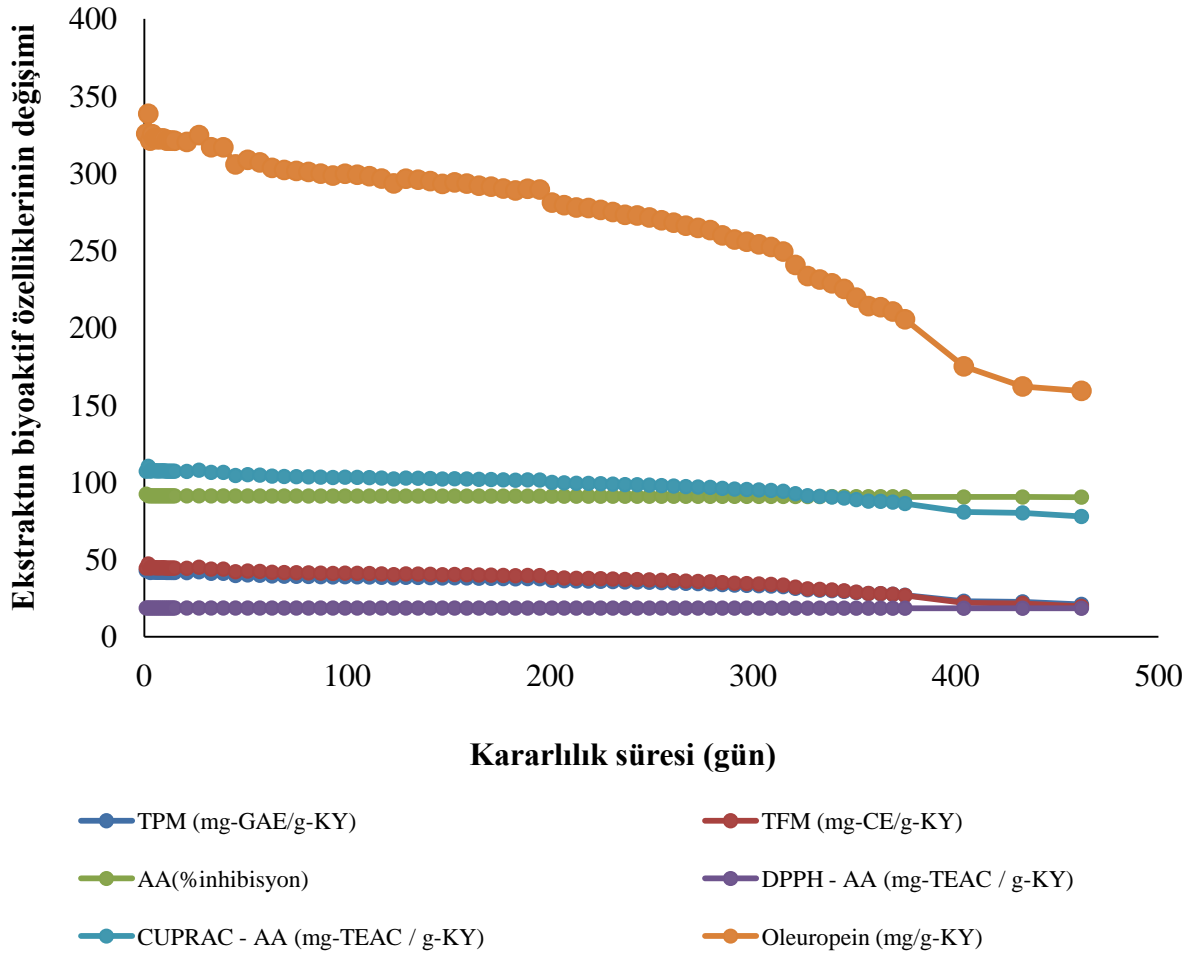


**Şekil 4.30:** UAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



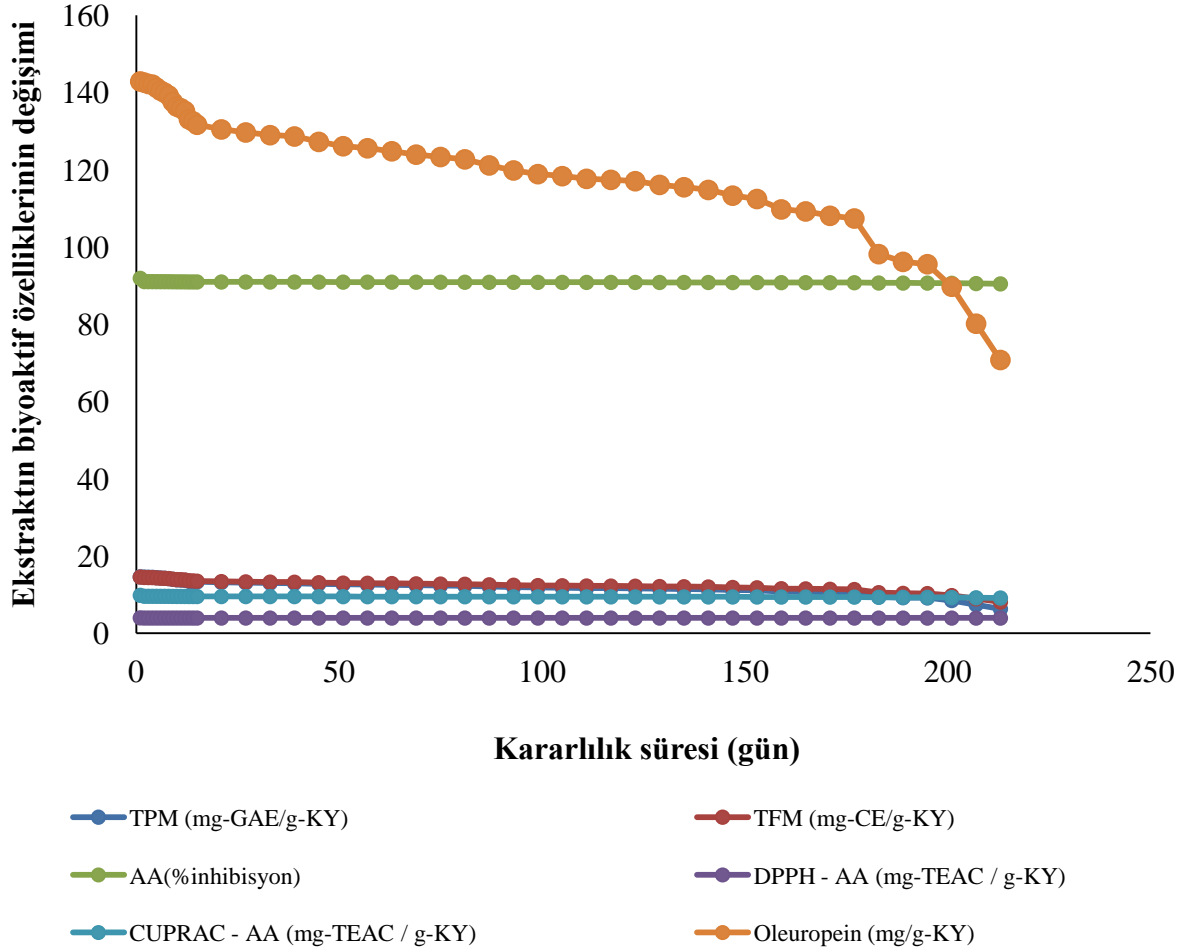


**Şekil 4.31:** UAE ile elde edilmiş ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

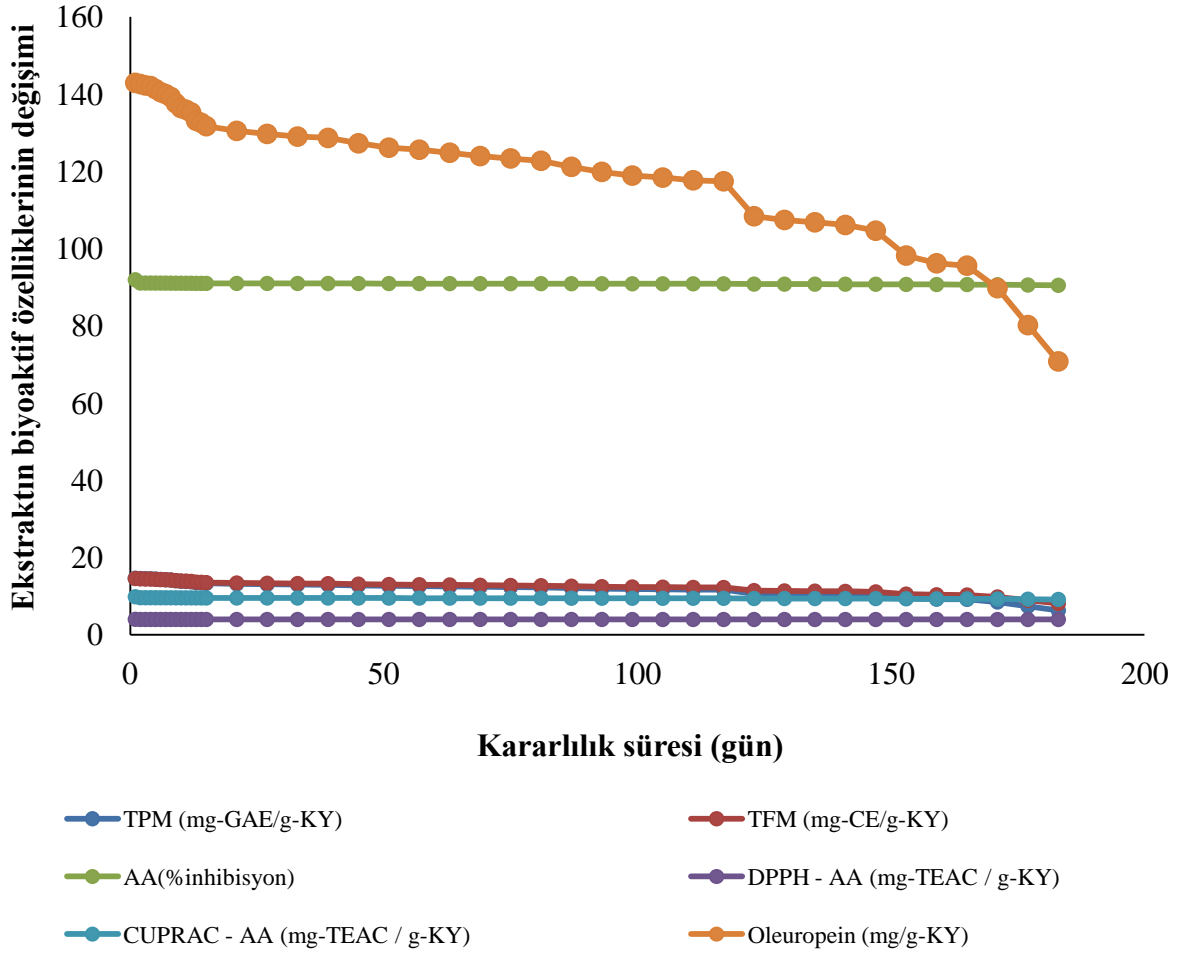


**Şekil 4.32:** UAE ile elde edilmiş ve 4°C’de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

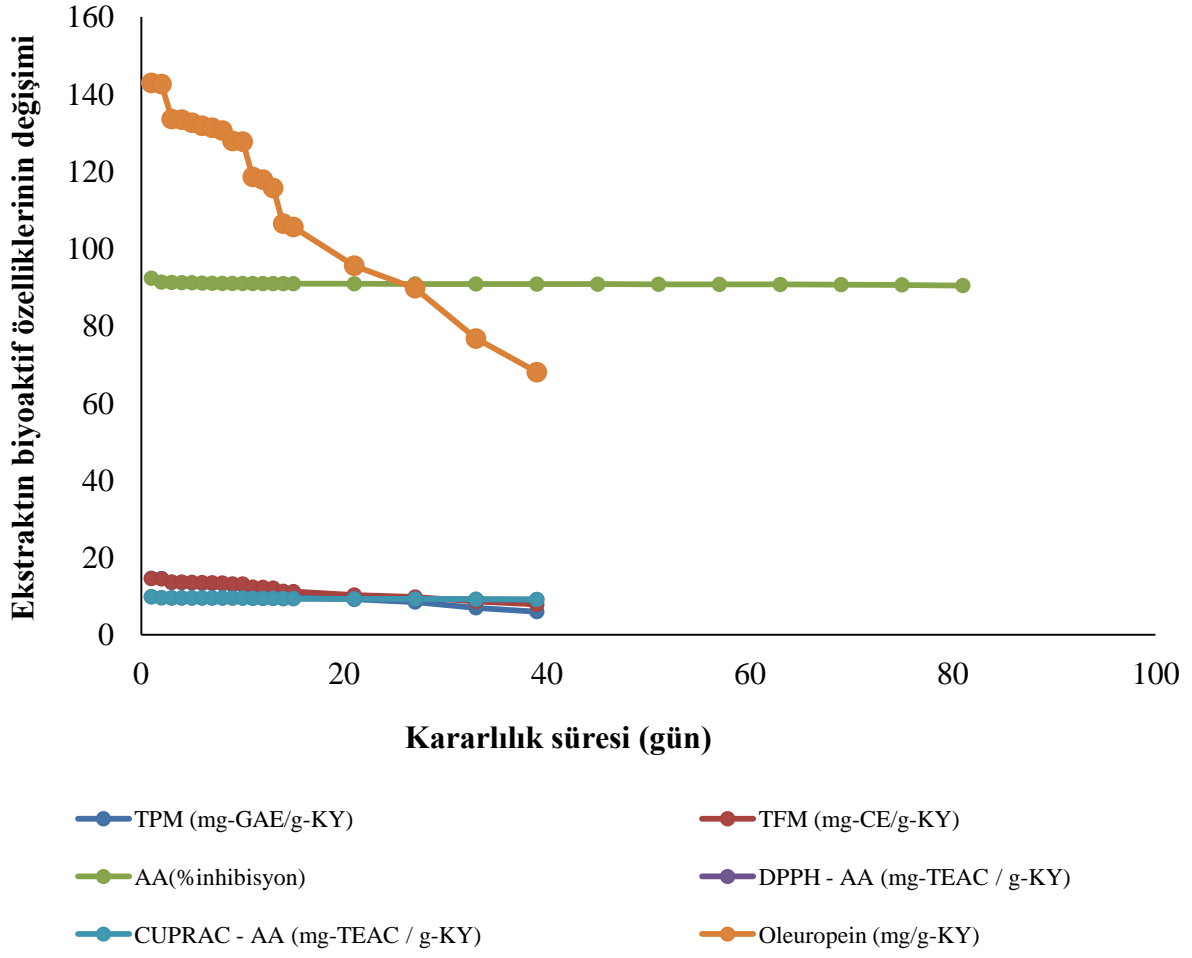
Şekil 4.33 ile 4.40 arasındaki grafikler MAE ile optimum koşullarda elde edilmiş ve türlü şartlarda depolanan ekstrakt numunelerindeki TPM, TFM, AA ve oleuropein değerlerindeki değişimi göstermektedirler.



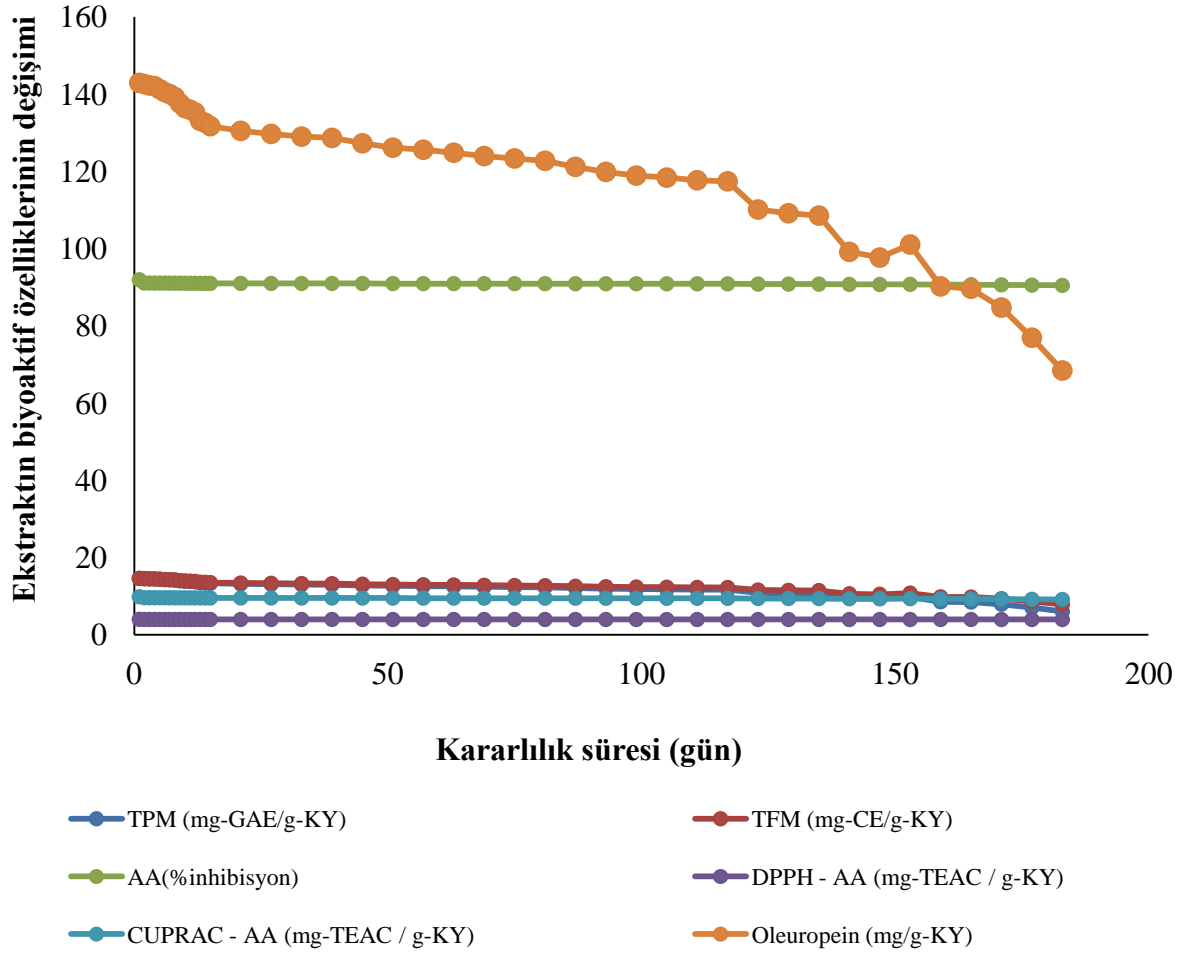
**Şekil 4.33:** MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve asidik ortamda (pH 4) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



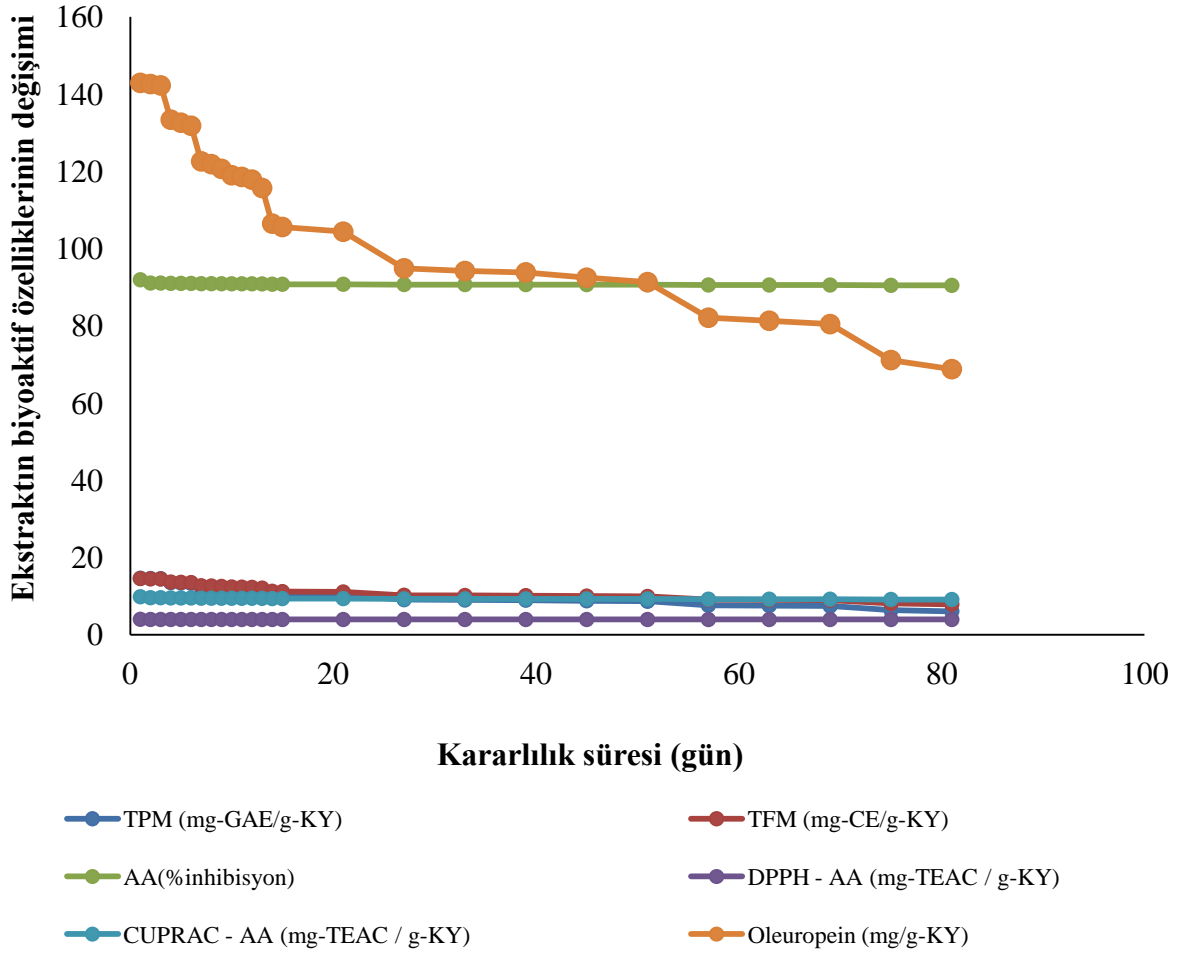
**Şekil 4.34:** MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve nötr ortamda (pH 7) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



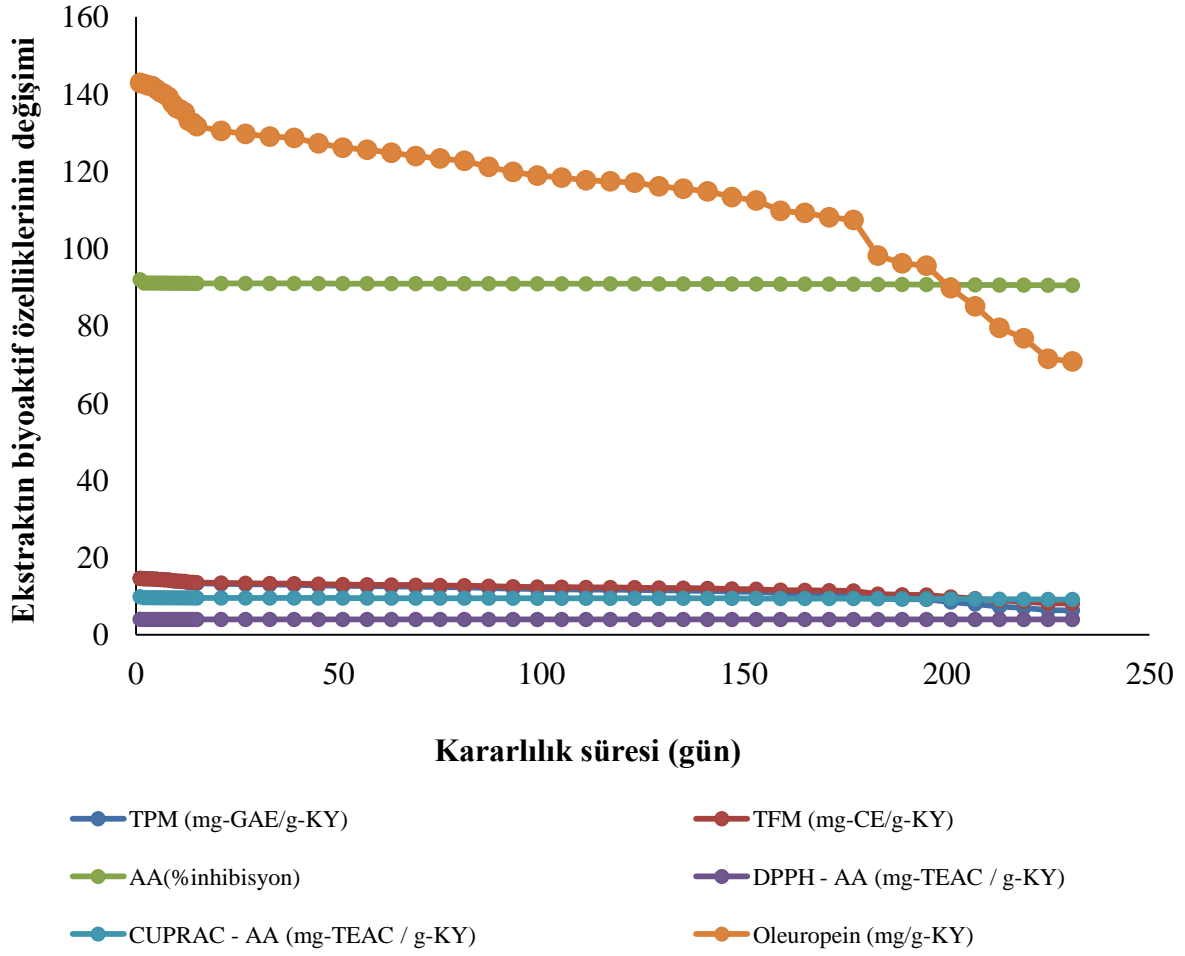
**Şekil 4.35:** MAE ile elde edilmiş ve 4°C ve bazik ortamda (pH 10) depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



**Şekil 4.36:** MAE ile elde edilmiş ve oda aydınlatması ve sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

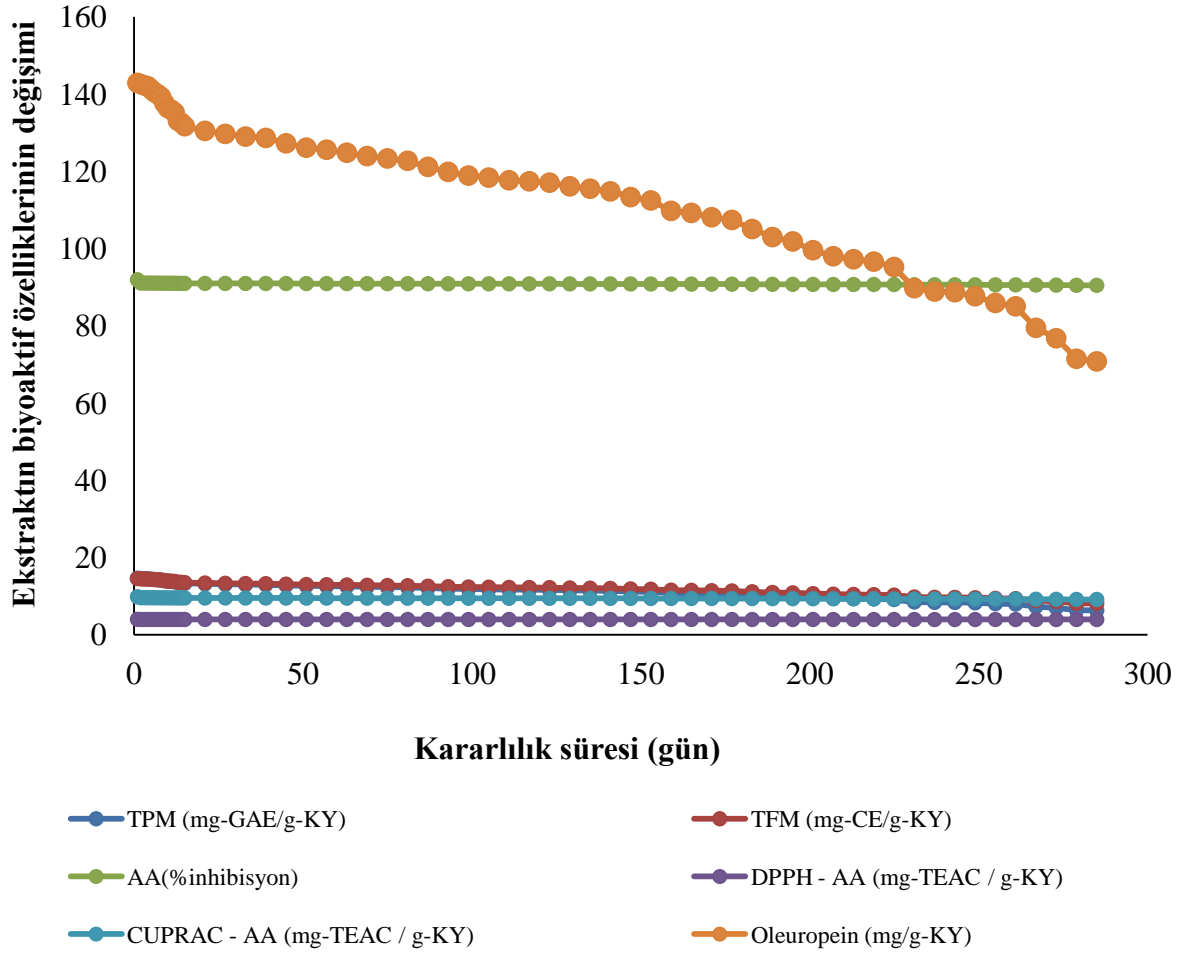


**Şekil 4.37:** MAE ile elde edilmiş ve lambadan 20 cm uzak mesafede ve oda sıcaklığında depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

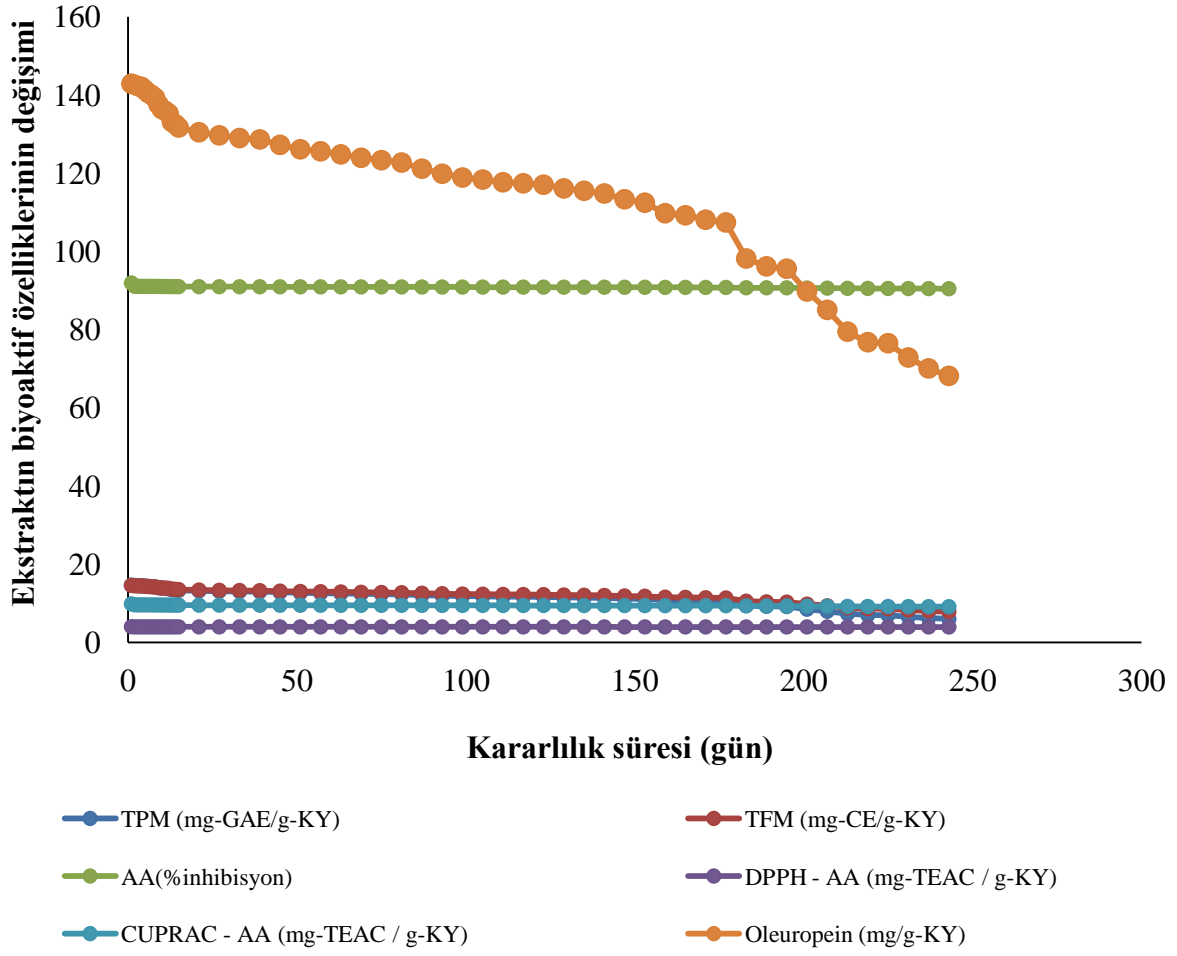


**Şekil 4.38:** MAE ile elde edilmiş ve oda sıcaklığında ve karanlıkta depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi





**Şekil 4.39:** MAE ile elde edilmiş ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi



**Şekil 4.40:** MAE ile elde edilmiş ve 4°C'de depolanmış ekstraktların çeşitli biyoaktif özelliklerinin değişimi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yaprakları yeşil kimya açısından değerli ve genel olarak güvenli kabul edilen bir çözücü olan etanol kullanılarak HAE, UAE ve MAE yöntemleri ile ekstrakte edilmişlerdir. Elde edilmiş ekstraktlarda bulunan toplam fenolik ve flavonoid madde miktarının incelenmesi için farklı tayin metodları kullanılmıştır. Elektron değişimine dayanan bu yöntemlerden toplam fenolik madde tayini Folin Ciocalteu reaktifi uygulanıp spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve sonuçlar galik asit eşdeğeri cinsinden verilmiştir. Toplam flavonoid madde tayini de  $AlCl_3$  kolorimetrik yöntemi kullanılarak ölçülmüş ve deneysel veriler kateşin eş değeri cinsinden sunulmuştur. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri DPPH ve CUPRAC test metodları ile in vitro olarak belirlenmiştir. İki farklı metodun kullanılması sonuçların doğruluğunu kanıtlamak maksadıyla gerçekleştirilmiştir.

Ekstraksiyon yöntemlerinde incelenecek olan bağımsız parametreler ve seviyeleri ön denemeler neticesinde belirlenmiştir. Bütün ön denemelerde ekstraksiyon verimi TPM miktarına dayanılarak gösterilmiştir. Diğer ekstaksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında HAE yöntemi için homojenizatörün istatistiksel olarak en anlamlı bağımsız değişkenleri karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresi olarak bulunmuştur. Bu sebeple HAE ön denemelerinde ekstraksiyon verimini incelenmek için homojenizatörün karıştırma hızı ve ekstraksiyon süresi 2 değişken olarak seçilmiştir. Şekil 4.1’de gösterildiği gibi zeytin yaprağının miktarı 0.5 g olarak sabit tutulup, 25 mL %50’lik etanol çözücüsü kullanılarak 30, 45, 60, 75, 90 ve 105 saniye olarak farklı ekstraksiyon süreleri ve 3000, 6000, 9000 ve 10000 rpm olarak karıştırma hızları uygulandığında 3000, 6000 ve 9000 rpm’de ekstraksiyon süresi arttıkça ekstraksiyon verimi artmış, ama 12000 rpm’de 75 saniyeden sonra ekstraksiyon verimi azalmaya başlamıştır. Ayrıca, 3000 rpm’de bütün süreler boyunca elde edilmiş ekstraksiyon verimi değerleri, diğer ekstraksiyon karıştırma hızlarından elde edilenler ile karşılaştırıldığında daha düşük değerler elde edilmiştir. Literatürde gösterildiği gibi HAE uygulamalarında, polar biyoaktif maddelerin ekstraksiyonu için sulu alkol bir çözücü kullanıldığında %20 ile %80 (v/v) gibi konsantrasyon değerleri en yüksek ekstraksiyon verimini sağlamıştır. Bu bilgiler ışığında daha geniş bir oran seçimi tercih edilmiştir. Zira, numune içerisindeki bazı biyoaktif bileşikler %0 ile %20 veya %80

ile %100 etanol konsantrasyonlarında, zeytin yaprağından çözücüye daha iyi bir geçiş sağlanmaktadır. HAE metodu gerçekleştirildiğinde homojenizatörün karıştırma hareketiyle ve karıştırma hızı arttıkça numunenin sıvı seviyesi yükselmektedir. 50 mL'lik numune tüpü kullanıldığında ve karıştırma hızı 12000 rpm olarak uygulandığında numunenin sıvı seviyesi 40 mL'yi geçtiğinde homojenizatör çalışınca numune tüpün dışına örnek kaçırmaya başlamıştır. Bu nedenle HAE'de incelenmiş olan proses parametrelerinden karıştırma hızı 4000 ile 10000 rpm, ekstraksiyon süresi 30 ile 90 saniye, etanol konsantrasyonu 0 ile %100 (v/v) ve etanolün miktarı 15 ile 35 mL arasında olacak şekilde seçilmiştir.

UAE metodun durumunda ultrasonik titreşimlerin genliği, UAE'nin en anlamlı özelliklerinden biri olarak kabul edilmiştir. HAE'ye benzer şekilde UAE'nin ön denemelerinde ekstraksiyon verimini incelenmek için ultrasonik titreşimlerin genliği ve ekstraksiyon süresi 2 bağımsız değişken olarak seçilmiştir. Şekil 4.2'ye gösterildiği gibi zeytin yaprağının miktarı 0.5 g olarak sabit tutup 40 mL %50'lik etanol çözücüsü kullanılarak 10, 20, 30, 40, 50, 60 ve 70 dakika olarak farklı ekstraksiyon süreleri ve 15, 25, 35 ve 50% olarak ultrasonik titreşimlerin genliği uygulandığında %15, %25 ve %35'te ekstraksiyon süresinin artmasıyla ekstraksiyon verimi artmış ama %50'de 40 dakikadan sonra ekstraksiyon verimi azalmaya başlamıştır. Ayrıca, %15'te bütün süreler boyunca elde edilmiş ekstraksiyon verimi, diğer ultrasonik titreşimlerin genliği ile karşılaştırıldığında daha düşük değerler sağlanmıştır. UAE için sulu alkol kullanımı, %50 (v/v) gibi orta konsantrasyon değerlerinde en yüksek ekstraksiyon verimini sağlamıştır. UAE metodu gerçekleştirildiğinde ultrasonik prob, numuneye ultrasonik dalgalar ile temas ettiğinde belirgin ölçüde numunenin sıvı seviyesinin yükselmesine sebep olmamıştır. Fakat, HAE metodunda 50 mL'lik numune tübü kullanıldığından dolayı ve metodlar arasında ortak parametrelerin değerlerin aynı oranda seçimi tercih edildiğinden dolayı UAE'de de kullanılacak çözücü hacmi HAE'deki gibi alınmıştır. Literatürde gösterildiği gibi UAE uygulamalarında, ultrasonik titreşimlerin genliğinin artırılması numunenin sıcaklığının artmasına neden olmuş ve sıcaklık 50°C'den fazla olduğunda numunede bulunan hedef bileşiklerin bozunmasına sebebiyet vermiştir. Dolayısıyla, çok yüksek bir ultrasonik titreşim genliği ve çok uzun bir ekstraksiyon süresi seçilmemiştir. Böylece, UAE'de incelenen proses parametrelerinden ultrasonik titreşimlerin genliği %25 ile %35, ekstraksiyon süresi 40 ile 60 dakika, etanol konsantrasyonu 0 ile %100 (v/v) ve etanolün miktarı 15 ile 35 mL olacak şekilde seçilmiştir.

Aynı bakış açısıyla değerlendirildiğinde, MAE metodu için mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresi numunenin sıcaklığına önemli ölçüde bağlı olarak ekstraksiyon verimini etkilediklerinden dolayı en anlamlı bağımsız değişkenlerden ikisi olarak bulunmuştur. HAE ve UAE’de olduğu gibi MAE’nin ön denemelerinden numunenin sıcaklığının 50°C’yi geçmemesine dayanılarak ekstraksiyon verimini incelenmek için mikrodalga gücü ve ekstraksiyon süresi 2 değişken olarak seçilmiştir. Diğer taraftan, etanol çözücü olarak yüksek konsantrasyonda bulunduğu ekstaksiyon sürecinde ortamın sıcaklığı yükselebildiğinden alev alabilmektedir. Bu sebeple, ilk olarak boş bir 50 mL %50’lik etanol çözücüsü kullanılarak ve mikrodalga gücü 100 ile 300 W arasında ayarlanarak belirli bir yazılıma sahip olan mikrodalga cihazı bir video kamera ile işlem süresi ve numunenin sıcaklığı kontrol edilmiştir (Şekil 4.3). Şekil 4.4’de gösterildiği gibi mikrodalga gücünü 200 W olarak ayarlayıp, zeytin yaprağı miktarı 5 g olarak sabit tutularak 50 mL’lik çözücü %0, 10, 20, 30, 40 ve 50’lik olarak farklı etanol konsantrasyonları incelendiğinde etanol konsantrasyonunun artmasıyla ekstaksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir. Zeytin yaprağının miktarı 5 g olarak sabit tutulup, 25 mL %50’lik etanol çözücüsü kullanılarak 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 W olarak 5 dakika mikrodalga gücü uygulandığında (Şekil 4.4) ve diğer tarafta şekil 4.5’deki aynı değerler ile 100, 150 ve 200 W’daki ekstraksiyon süresinin artmasıyla ekstaksiyon verimi artmıştır. Fakat, 250 W’da 4 dakikadan sonra ekstraksiyon verimi azalmaya başlamış ve aynı zamanda iki eğri arasındaki çapraz noktaya uygun ekstraksiyon verimi 190 W’da ve 2.10’uncu dakikada ulaşılmıştır. MAE için alkollü çözücü kullanımı, literatürde HAE ve UAE gibi aynı anlam göstermiş ama etanol alev alabildiğinden kullanılacak etanolün konsantrasyonunda %50 (v/v)’den daha fazla alkol olmamasına dikkat edilmiştir. Şekil 4.6’da gösterildiği gibi mikrodalga gücü 200 W ayarlanarak ve etanol çözücü konsantrasyonu %50 (v/v)’de sabit tutularak 3, 4, 5, 6 ve 7 g olarak farklı zeytin yaprağı miktarları incelendiğinde, zeytin yaprağının miktarının arttırılmasıyla ekstraksiyon veriminin arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, MAE’de incelenen parametreler, mikrodalga gücü 150 ile 250W, ekstraksiyon süresi 0.5 ile 1.5 dakika, etanol konsantrasyonu 10 ile %40 (v/v) ve zeytin yaprağının miktarı 5 ile 7 g arasında olacak şekilde karar verilmiştir. Bu bütün seçimler neticesinde çözücü, enerji ve zaman gibi kriterler dikkate alınarak yeşil bir ekstraksiyon metodunun geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Ön denemelerin sonuçlarına göre seçilen bağımlı ve bağımsız faktörlerin ve seviyelerinin belirlenmesinin ardından, Design Expert paket programı kullanılarak, her bir ekstraksiyon metodunun deneysel tasarımı CYY ile gerçekleştirilmiştir. Yine CYY ile modellenen her bir

ekstraksiyon yönteminin optimum koşulları, içeriğindeki maksimum TPM ve TFM değerlerine göre hesaplanmıştır. Ayrıca, teorik olarak bulunan değerler ile deneysel olanlar (optimum ekstraksiyon şartlarında) karşılaştırılmıştır. Kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yapraklarına uygulanan her üç ekstraksiyon yönteminden elde edilen veriler değerlendirildiğinde ultrason ve homojenizatörün birbirine oldukça yakın sonuçlar verdiği ve her iki yönteminde mikrodalga yöntemine göre çok yüksek performans sergilediği gözlenmiştir. Diğer taraftan, homojenizatör yardımı ile ekstrakt elde edilirken çok kısa sürede (81.86 saniyeye karşı 60 dakika) oldukça basit, yatırım maliyeti son derece düşük ve işletme gideri ise nispeten uygun bir yöntem kullanıldığını dikkate aldığımızda en uygun yöntemin HAE olduğunu söyleyebiliriz. Son yıllarda ileri ayırma yöntemi olarak kabul edilen MAE yönteminin de oldukça düşük bir verim ile ekstraksiyonu tamamlaması da gözlemlenen bir diğer önemli husus olmuştur.

Tablo 4.3 ve 4.4'ten de anlaşıldığı gibi, HAE yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının  $12.68 \pm 0.056$  ile  $41.86 \pm 0.075$  mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının  $9.20 \pm 0.031$  ile  $42.25 \pm 0.088$  mg-CE/g-KY arasında ve antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile  $15.77 \pm 0.023$  ile  $18.72 \pm 0.091$  ve CUPRAC ile  $60.92 \pm 0.031$  ile  $101.54 \pm 0.078$  mg-TEAC/g-KY arasında değiştiği görülmüştür. Maksimum verim için en uygun koşulların 7000 rpm hız, 25 mL %50'lik etanol çözücüsü kullanılarak 90 saniye ekstraksiyon sonunda elde edildiği hesaplanmıştır (Tablo 4.3 ve 4.4).

UAE yönteminde ise toplam fenolik madde miktarının  $6.78 \pm 0.068$  ile  $41.62 \pm 0.069$  mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının  $4.47 \pm 0.072$  ile  $45.75 \pm 0.013$  mg-CE/g-KY arasında ve antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile  $15.18 \pm 0.085$  ile  $18.63 \pm 0.084$  ve CUPRAC ile  $36.27 \pm 0.020$  ile  $107.17 \pm 0.076$  mg-TEAC/g-KY arasında değiştiği gözlenmiştir. Maksimum verim için en uygun koşulların %30 genlik ile 25 mL %50 etanol varlığında 50 dakika ekstraksiyon sonunda elde edildiği hesaplanmıştır (Tablo 4.5 ve 4.6).

Tablo 4.7 ve 4.8 ise MAE yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının  $2.72 \pm 0.027$  ile  $14.17 \pm 0.057$  mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının  $1.99 \pm 0.025$  ile  $10.99 \pm 0.007$  mg-CE/g-KY, antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile  $2.21 \pm 0.004$  ile  $4.04.01 \pm 0.014$  ve CUPRAC ile  $8.81 \pm 0.05$  ile  $9.85 \pm 0.008$  mg-TEAC/g-KY arasında değiştiğini göstermektedir. Maksimum verim için en uygun koşulların 200 W mikrodalga gücü ile %25'lik etanol ile 5 gram

zeytin yaprağının 1 dakika ekstraksiyonu sonunda elde edildiği hesaplanmıştır (Tablo 4.7 ve 4.8).

Tablo 4.11'den de anlaşıldığı gibi, HAE yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının 443.722 mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının 42.180 mg-CE/g-KY ve antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile 18.910 ve CUPRAC ile 106.713 mg-TEAC/g-KY olarak belirlendiği görülmüştür. Optimum verim için en uygun koşulların 9580.77 rpm hız, 32.37 mL %45.94'lik etanol çözücüsü kullanılarak 81.86 saniye ekstraksiyon sonunda elde edildiği gözlenmiştir.

UAE yönteminde ise toplam fenolik madde miktarının 42.859 mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının 44.512 mg-CE/g-KY ve antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile 19.109 ve CUPRAC ile 110.006 mg-TEAC/g-KY olarak belirlendiği görülmüştür. Optimum verim için en uygun koşulların %25 genlik ile 30.47 mL %43.61 etanol varlığında 60 dakika ekstraksiyon sonunda elde edildiği gözlenmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11 ise MAE yöntemi ile elde edilen ekstraktların toplam fenolik madde miktarının 14.633 mg-GAE/g-KY, toplam flavonoid madde miktarının 11.372 mg-CE/g-KY, antioksidan kapasitesinin ise DPPH ile 4.033 ve CUPRAC ile 9.836 mg-TEAC/g-KY olarak belirlendiği göstermektedir. Optimum verim için en uygun koşulların 228.26 W mikro dalga gücü ile %27.20'lik etanol ile 5.04 gram zeytin yaprağının 1.07 dakika ekstraksiyonu sonunda elde edildiği gözlenmiştir.

HAE için homojenizatörün karıştırma hızı ( $X_1$ : 4000, 7000 ve 10000 rpm), ekstraksiyon süresinin ( $X_2$ : 30, 60 ve 90 saniye), solvent konsantrasyonunun ( $X_3$ : % 0, 50 ve 100) ve çözücü hacminin ( $X_4$ : 15, 25 ve 35 mL) zeytin yapraklarının TPM, TFM ve AA üzerine etkileri araştırılmıştır. UAE için ultrasonik titreşimlerin genliği ( $X_5$ : % 25, 30 ve 35), ekstraksiyon süresinin ( $X_6$ : 40, 50 ve 60 dakika), solvent konsantrasyonunun ( $X_7$ : % 0, 50 ve 100) ve çözücü hacminin ( $X_8$ : 15, 25 ve 35 mL) zeytin yapraklarının TPC, TFC ve AA üzerine etkileri araştırılmıştır. MAE ile çalışıldığında mikrodalga ışınlama gücünün ( $X_9$ : 150, 200 ve 200 W), ekstraksiyon süresinin ( $X_{10}$ : 0.5, 1 ve 1.5 dakika), solvent konsantrasyonunun ( $X_{11}$ : % 10, 25 ve 40) ve zeytin yaprağı miktarının ( $X_{12}$ : 5, 6 ve 7 g) zeytin yapraklarının TPC, TFC ve AA üzerine etkileri araştırılmıştır. Üç ekstraksiyon yönteminden elde edilmiş olan TPM ve TFM yanıtları

için hesaplanan modellerin, yanıtlar ve işlem parametreleri arasındaki ilişki önemli ölçüde yüksek F-değerleri ile etkili olduğu bulunmuştur ( $\rho < 0.0001$ ) (Tablo 4.9). TPM ve TFM için türetilen modellerin, modelin deneylere yeterince uyduğunu doğruladığı görülmüştür ( $\rho < 0.05$ ). Modellere uyarlanarak elde edilen değerler, X değerleri olarak denklemlerle açıklandığı gibi TPM ve TFM, Y değerleri olarak yanıt değişkenlerinin her biri için dört bağımsız değişken kullanılarak ikinci dereceden bir polinom yüzey denklemine uymak için kullanılmıştır. HAE, UAE ve MAE için TPM ve TFM'nin ANOVA analizi ile elde edilmiş (4.1 ve 4.2), (4.3 ve 4.4) ve (4.5 ve 4.6) denklemler, modellerin anlamlı olduğunu göstermiş ( $\rho < 0.05$ ) ve bu iki farklı düzey faktörünün dört yanıt üzerindeki etkilerini tahmin etmede yararlı olmuştur (Tablo 4.9). Modelin uygunluğu, modelin açıkladığı gibi ortalamadaki varyasyon ölçümünü belirleyen belirleme katsayısı ( $R^2$ ) ile kontrol edilebilmektedir.  $R^2$ 'nin değeri 0.6'dan fazla olduğunda tercih edilmekte ve 0.9'dan fazla olması arzu edilmektedir [950]. HAE, UAE ve MAE yöntemlerinde TPM (0.9636, 0.9663 ve 0.9593) ve TFM (0.9766, 0.9732 ve 0.9649) için hesaplanan belirleme katsayılarının değerleri, ilgili modellerin bu çalışmada seçilen bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiye yeterince uyduğunu göstermiştir. Ayrıca, HAE, UAE ve MAE'de TPM (0.9296, 0.9348 ve 0.9193) ve TFM (0.9548, 0.9482 ve 0.9322) için ayarlanmış belirleme katsayılarının ( $R^2_a$ ) değerleri, sırasıyla TPM ve TFM'nin toplam varyasyonlarının sadece % 7.04 ve 4.52, % 6.52 ve 5.18 ve % .07 ve 6.78'lik kısmının model tarafından açıklanmadığını göstermiştir. Daha önce  $R^2_a$  değerinin, örnek büyüklüğü için  $R^2$  değerini ve modeldeki terimlerin sayısını düzeltebildiği bildirilmiştir [951]. Örnek boyutu çok büyük değilse ve modelde birçok terim varsa  $R^2_a$   $R^2$ 'den belirgin ölçüde daha küçük olabilmektedir. Bu çalışmada, tüm yanıtların  $R^2_a$ 'larının  $R^2$  değerlerine yakın olduğu bulunmuştur. Ayrıca, HAE, UAE ve MAE için hesaplanan düşük RMSE değerleri, TPM ve TFM'nin deneysel ve tahmin edilen sonuçları arasındaki güçlü korelasyonları göstermiştir (Sırayla, RMSE (3.399016 ve 2.781732 HAE için), (1.987892 ve 2.1866 UAE için) ve (0.598657 ve 0.43003 MAE için)). Bir işlem parametresinin F-değerinin yüksek ve  $\rho$ -değerinin düşük miktarına göre ilgili bağımsız parametrenin ilgili sistem üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir [952]. Bu nedenle, HAE metodunda incelenmiş solvent konsantrasyonunun kuadratik etkisi iki yanıt üzerinde son derecede yüksek bulunan F-değerleri ile son derece anlamlı bulunmuş ve ardından homojenizatörün karıştırma hızının doğrusal etkileri de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $X_3$  ve  $X_1$ ;  $\rho < 0.0001$ ). Ayrıca, hem solvent konsantrasyonu ile homojenizatörün karıştırma hızı



arasındaki etkileşimin hem de solvent konsantrasyonu ve çözücü hacmi etkileşimi de TPM ve TFM için anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.9). Aynı manıyla, UAE metodunda incelenmiş solvent konsantrasyonunun kuadratik etkisi iki yanıt üzerinde son derecede yüksek bulunan F değerleri ile son derece anlamlı bulunmuş ve ardından ekstraksiyon süresinin doğrusal etkileri de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $X_7$ ;  $\rho < 0.0001$ ). Ayrıca, hem çözücü konsantrasyonu ile ekstraksiyon süresi arasındaki etkileşimin hem de solvent konsantrasyonu ve çözücü hacmi etkileşimi de TPM ve TFM için anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.9). Diğer taraftan, MAE metodunda incelenmiş zeytin yapraklarının miktarının kuadratik etkisi iki yanıt üzerinde de son derecede yüksek bulunan F değerleri ile son derece anlamlı bulunmuş ve ardından mikrodalga ışınlama gücünün doğrusal etkileri de istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $X_9$  ve  $X_{12}$ ;  $\rho < 0.0001$ ). Ayrıca, hem zeytin yaprağı miktarı ile mikrodalga ışınlama gücü arasındaki etkileşimin hem de zeytin yaprağı miktarı ve çözücü konsantrasyonu etkileşimi de TPM ve TFM için anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.9). Proses parametrelerinin etkileşim etkilerini göstermek için üç boyutlu (3D) tepki yüzeyleri de gösterilmiştir (Şekiller 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11 ve 4.12). Tüm ekstraksiyon prosesleri için elde edilen antioksidan yanıtları (AA-DPPH ve AA-CUPRAC), veriler arasındaki istatistiksel benzerliği araştırmak için ANOVA metodu kullanılarak Tukey testiyle incelenmiştir ( $\rho > 0.05$ ). Yine, üç ekstraksiyon yönteminden elde edilen TPM, TFM ve AA'nın arasındaki ilişkinin belirlenmesi için Pearsons korelasyonu (r) kullanılmıştır. HAE, UAE ve MAE ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının TPM/TFM'nin pozitif korelasyonu (sırasıyla TPM/TFM ( $r=0.9772$ ,  $0.9736$  ve  $0.9754$ ,  $p=0.5$ ), TPM/AA-DPPH ( $r=0.9903$ ,  $0.9856$  ve  $0.9632$ ,  $p=0.5$ ), TPM/AA-CUPRAC ( $r=0.9752$ ,  $0.9823$  ve  $0.9837$ ,  $p=0.5$ ), TFM/AA-DPPH ( $r=0.9884$ ,  $0.9891$  ve  $0.8996$ ,  $p=0.5$ ), TFM/AA-CUPRAC ( $r=0.9829$ ,  $0.9667$  ve  $0.9225$ ,  $\rho = 0.5$ ) and AA-DPPH/AA-CUPRAC ( $r=0.9877$ ,  $0.9865$  ve  $0.9917$ ,  $p=0.5$ )) tüm yanıtların birbirlerine önemli ölçüde katkıda bulunduğunu kanıtlamıştır. CUPRAC testi ile ölçülen AA değerleri, DPPH ile ölçülenden daha yüksek değerler gösterilmiştir. Bu sonuç, Niki ve arkadaşlarının rapor ettiği sonuç ile uyum içindedir [953]. Niki ve ark. bu fenomeni, hedef bileşiklerin antioksidan aktivitesinin, zincir başlatma, geçiş metal iyonu katalizörlerinin bağlanması, peroksitlerin ayrışması, sürekli hidrojen soyutlanmasının önlenmesi ve radikal süpürücünün önlenmesi olan çeşitli mekanizmalara atfedilmesi gerçeğiyle açıklamışlardır [953].

Ekstraksiyon yöntemlerinin belirlenmiş optimum koşullarına göre hazırlanmış ekstrakt numunelerinin oleuropein içerikleri HPLC ile belirlenmiştir. Ayrıca, yaprakların karakterizasyon analizi SEM uygulanarak gerçekleştirilmiş, zeytin yapraklarının mikro gözeneklerinde olan değişim ekstraksiyondan önce ve sonra izlenmiştir (Şekiller 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16).

Optimum koşullar kullanılarak elde edilmiş zeytin yaprağı ekstraktları farklı koşullarda depolanarak belirli aralıklar ile analiz edilmiş ve fenolik profilinin değişimi (toplam fenolik miktarı ve oleuropein içeriği), toplam flavonoid miktarlarının değişimi ve antioksidan özelliklerinin değişimi izlenmiştir. Ekstaktların biyoaktif ve fiziksel özelliklerinin stabilitesindeki değişimi ölçmek için, FDA kılavuzuna göre ve raf ömrüne göre biyoaktif özelliklerinin %50'sinin degradasyonuna kadar ve fiziksel özelliği olan rengindeki değişim izlenerek belirli aralıklar ile analizlere devam edilmiştir.

HAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve 4°C'te depolanmış olan numune (pH 4), TPM, TFM, %AA (%inhibisyon), AA-DPPH, AA-CUPRAC ve oleuropein içeriği olarak biyoaktif özelliklerinin %50'sinin degradasyonu için 433 gün muhafaza edilerek analiz edilmiştir (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.17).

HAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve 4°C'te depolanmış olan numune (pH 7) için ise aynı süreç 363 gün olarak tespit edilmiştir (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.18). Yine aynı durum için fakat bu sefer bazik ortamda (pH 10) muhafaza edilen örnek 81 gün gözlenmiş ve ürünlerin biyoaktivitesinin %50'si 81 gün sonunda degrade olmuştur (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.19).

HAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve normal oda aydınlatmasında, 1 atm basınçta ve 25°C'te depolanmış olan numune biyoaktivite açısından 369 gün takip edilmiştir (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.20). Yine aynı koşullarda fakat bu kez lambadan 20 cm uzak mesafede muhafaza edilen örnek 165 gün stabil olarak biyoaktivitesini korumuştur (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.21). Aynı durum karanlık ortam açısından da değerlendirilmiş ve bu kez örnek 491 gün boyunca stabilitesini korumuştur (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.22).

HAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune, 578 gün biyoaktivesini (TPM, TFM, %AA, AA-DPPH, AA-CUPRAC ve oleuropein açılardan) korumuştur (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.23). Aynı durum  $4^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune için incelendiğinde süreç 491 gün olarak gözlenmiştir (Tablolar 4.13, 4.18, 4.15, 4.16 ve 4.17 ve şekil 4.24).

UAE'nin optimum optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve  $4^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune asidik ortamda (pH 4) 404 gün boyunca stabilitesini korumuştur (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.25). Nötr ortamda (pH 7) bu süreç 357 gün (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.26), bazikte (pH 10) ise 81 gün olarak tespit edilmiştir (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.27).

UAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve normal oda aydınlatmasında, 1 atm basınçta ve  $25^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune için 363 gün (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.28), lambadan 20 cm uzak mesafede muhafaza edilen örnek 159 gün (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.29) ve son olarak karanlıkta depolanan örnek 462 gün stabil olarak biyoaktivitesini korumuştur (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.30).

UAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune, 562 gün biyoaktivesini (TPM, TFM, %AA, AA-DPPH, AA-CUPRAC ve oleuropein açılardan) korumuştur (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.31). Aynı durum  $4^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune için incelendiğinde süreç 462 gün olarak gözlenmiştir (Tablolar 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 ve 4.22 ve şekil 4.32).

MAE'nin optimum optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve  $4^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune asidik ortamda (pH 4) 213 gün boyunca stabilitesini korumuştur (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.33). Nötr ortamda (pH 7) bu süreç 183 gün (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.34), bazikte (pH 10) ise 39 gün olarak tespit edilmiştir (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.35).

MAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve normal oda aydınlatmasında, 1 atm basınçta ve  $25^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune için 183 gün (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.36), lambadan 20 cm uzak mesafede muhafaza edilen örnek 81 gün (Tablolar 4.23, 4.24,

4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.37) ve son olarak karanlıkta depolanan örnek 231 gün stabil olarak biyoaktivitesini korumuştur (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 4.38).

MAE'nin optimum koşullarında hazırlanmış olan ve 1 atm basınçta ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune, 285 gün biyoaktivitesini (TPM, TFM, %AA, AA-DPPH, AA-CUPRAC ve oleuropein açılardan) korumuştur (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 39). Aynı durum  $4^{\circ}\text{C}$ 'te depolanmış olan numune için incelendiğinde süreç 243 gün olarak gözlenmiştir (Tablolar 4.23, 4.24, 4.25, 4.26 ve 4.27 ve şekil 40).

Stabilizasyon sonuçları genel olarak irdelendiğinde, HAE, UAE ve MAE ile hazırlanmış numunelerin DPPH radikalini süpürme etkisi (% inhibisyon), sırayla %2.66, %2.18 ve %1.59 degradasyon oranını izlenmiştir. Bu durum, numunedeki oleuropeinin hidroksitirosolde degradasyonu ile açıklanabilmektedir. Zira, literatürde anlatıldığı gibi hidroksitirosolün antioksidan aktivitesi oleuropeinin antioksidan özelliklerinden daha yüksektir. Ayrıca, DPPH analizi diğer antioksidan kapasite ölçen analizlerden çok daha hassastır [701]. Son olarak, zeytin yapraklarının sulu etanolik ekstraktlarının stabilitelelerinin ölçümlerinden, numunenin alkol içeriğinin oranının arttırılmasıyla, depolamanın ortam aydınlatmasının daha karanlığa geçmesiyle, depolama sıcaklığının düşmesiyle ve pH değerinin azalmasıyla ekstraktların daha uzun bir depolama süresine sahip olduğu gözlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- [1].Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2015, *Free radicals in biology and medicine*, 5<sup>th</sup> ed., Oxford university press, London, ISBN: 978-0-19-871747-8.
- [2].Sánchez-Moreno, C., 2002, Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food science and technology international*, 8 (3), 121-137.
- [3].Moure, A., Cruz, J.M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M.J., Carlos Parajó, J., 2001, Natural antioxidants from residual sources, *Food chemistry*, 72 (2), 145-171.
- [4].Gillman, M.W., Cupples, L.A., Posner, B.M., Gagnon, D., Ellison, R.C., Castelli, W.P., Wolf, P.A., 1995, Protective effect of fruits and vegetables on development of stroke in men, *The journal of the american medical association*, 273 (14), 1113-1117.
- [5].J. Joshipura, K., B. Hu, F., E. Manson, J., J. Stampfer, M., B. Rimm, E., E. Speizer, F., Colditz, G., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., C. Willett, W., 2001, The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease, *Annals of internal medicine*, 9 (3), 483-496.
- [6].Trichopoulou, A., Lagiou, P., Kuper, H., Trichopoulos, D., 2000, Cancer and mediterranean dietary traditions, *Cancer epidemiology biomarkers and prevention*, 9 (9), 869-873.
- [7].Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D., 2008, Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the united, *Journal of agriculture and food chemistry*, 56 (4), 1415-1422.
- [8].Scalbert, A., Johnson, I.T., Saltmarsh, M., 2005, Polyphenols: antioxidants and beyond, *The American journal of clinical nutrition*, 81 (1), 215S-217S.

- [9]. Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., Shahabimajd, N., 2006, Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants, *African Journal of Biotechnology*, 5(11), 1142-1145.
- [10]. Jang, I.-C., JO, E.-K., Bae, S.-M., Bae, M.-S., Lee, H.-J., Park, E., Yuk, H.-G., Ahn, G.-H., Lee, S.-C., 2010, Antioxidant activity and fatty acid composition of four different persimmon seeds, *Food science and technology research*, 16 (6), 577-584.
- [11]. Li, J.W., Ding, S.D., Ding, X.L., 2005, Comparison of antioxidant capacities of extracts from five cultivars of Chinese jujube, *Process biochemistry*, 40 (11), 3607-3613.
- [12]. FAOSTAT, 2017, Food and agriculture organization of the united nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#search/olive>, [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2018].
- [13]. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2012, Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (6), 1817-1825.
- [14]. Bao, J., Zhang, D.W., Zhang, J.Z.H., Huang, P.L., Huang, P.L., Lee-huang, S., 2007, Computational study of bindings of olive leaf extract ( OLE ) to HIV-1 fusion protein gp41, *FEBS Letters*, 581 (14), 2737-2742.
- [15]. Lee-Huang, S., Zhang, L., Lin Huang, P., Chang, Y.-T., Huang, P.L., 2003, Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment, *Biochemical and biophysical research communications*, 307 (4), 1029-1037.
- [16]. Farag, R.S., Mahmoud, E.A., Basuny, A.M., 2007, Use crude olive leaf juice as a natural antioxidant for the stability of sunflower oil during heating, *International journal of food science and technology*, 42 (1), 107-115.
- [17]. Omaki, E.K., Amaguchi, S.Y., Aru, I.M., Inoshita, M.K., Akehi, K.K., Hta, Y.O.,

Sukada, Y.T., 2003, Identification of Anti- $\alpha$ -Amylase Components from Olive Leaf Extracts, *Food science and technology research*, 9 (1), 35-39.

- [18]. Leonardis, A. De, Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., 2008, Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (*Olea europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity, *European food research and technology*, 226 (4), 653-659.
- [19]. Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A.N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., Gerothanassis, I.P., 2009, Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells, *Molecular nutrition and food research*, 53 (5), 600-608.
- [20]. Femia, A. Pietro, Dolara, P., Servili, M., Esposto, S., Taticchi, A., Urbani, S., Giannini, A., Salvadori, M., Caderni, G., 2008, No effects of olive oils with different phenolic content compared to corn oil on 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats, *European journal of nutrition*, 47 (6), 329-334.
- [21]. Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Soares, M.E., Bastos, M.L., Pereira, J.A., 2007, Antioxidant activity and phenolic contents of *Olea europaea* L. leaves sprayed with different copper formulations, *Food chemistry*, 103 (1), 188-195.
- [22]. Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review, *Journal of functional foods*, 18 (Part B), 820-897.
- [23]. Beckman, K.B., Ames, B.N., 1998, The free radical theory of aging matures, *Physiological reviews*, 78 (2), 547-581.
- [24]. Holman, R., Elmer, O., 1947, The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters, *Journal of the American Oil Chemists Society*, 24(4), 127-129.
- [25]. Lund, M.N., Heinonen, M., Baron, C.P., Estévez, M., 2011, Protein oxidation in muscle foods: A review, *Molecular nutrition and food research*, 55 (1), 83-95.

- [26]. Davies, M.J., Fu, S., Wang, H., Dean, R.T., 1999, Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease, *Free radical biology and medicine*, 27 (11/12), 1151-1163.
- [27]. Estévez, M., Ollilainen, V., Heinonen, M., 2009, Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -Aminoadipic and  $\gamma$ -Glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-Electrospray ionization (ESI)-Multistage tandem mass spectrometry (MS), *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (9), 3901-3910.
- [28]. Lund, M.N., Luxford, C., Skibsted, L.H., Davies, M.J., 2008, Oxidation of myosin by haem proteins generates myosin radicals and protein cross-links, *Biochemical journal*, 410 (3), 565-574.
- [29]. Rowe, L.J., Maddock, K.R., Lonergan, S.M., Huff-Lonergan, E., 2004, Influence of early postmortem protein oxidation on beef quality, *Journal of animal science*, 82 (3), 785-793.
- [30]. Morzel, M., Gatellier, P., Sayd, T., Renerre, M., Laville, E., 2006, Chemical oxidation decreases proteolytic susceptibility of skeletal muscle myofibrillar proteins, *Meat science*, 73 (3), 536-543.
- [31]. Wolff, S.P., Dean, R.T., 1986, Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis, *Biochemical journal*, 234 (2), 399-403.
- [32]. Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000, Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, *Nature*, 408 (6809), 239-247.
- [33]. Govindarajan, R., Vijayakumar, M., Pushpangadan, P., 2005, Antioxidant approach to disease management and the role of "Rasayana" herbs of Ayurveda, *Journal of ethnopharmacology*, 99 (2), 165-178.
- [34]. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-Biological*



*interactions*, 160 (1), 1-40.

- [35]. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *International journal of biochemistry and cell biology*, 39 (1), 44-84.
- [36]. Chang, Y.-T., Chang, W.-N., Tsai, N.-W., Huang, C.-C., Kung, C.-T., Su, Y.-J., Lin, W.-C., Cheng, B.-C., Su, C.-M., Chiang, Y.-F., Lu, C.-H., 2014, The Roles of Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant in Alzheimer's Disease: A Systematic Review, *BioMed research international*, 2014, 1-14.
- [37]. López-Alarcón, C., Denicola, A., 2013, Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays, *Analytica Chimica Acta*, 763, 1-10.
- [38]. Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2007, Mitochondria, oxidative stress and cell death, *Apoptosis*, 12 (5), 913-92.
- [39]. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., Crowe, S.E., 2014, Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiological reviews*, 94 (2), 329-354.
- [40]. Kalyanaraman, B., 2013, Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms, *Redox biology*, 1 (1), 244-257.
- [41]. Mangialasche, F., Polidori, M.C., Monastero, R., Ercolani, S., Camarda, C., Cecchetti, R., Mecocci, P., 2009, Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Ageing research reviews*, 8 (4), 285-305.
- [42]. Görg, B., Qvartskhava, N., Voss, P., Grune, T., Häussinger, D., Schliess, F., 2007, Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration, *FEBS letters*, 581 (1), 84-90.
- [43]. Breusing, N., Grune, T., 2008, Regulation of proteasome-mediated protein degradation

during oxidative stress and aging. *Biological chemistry*, 389 (3), 203-209.

- [44]. Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002, Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Radical Biology & Medicine*, 32 (11), 1102-1115.
- [45]. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J.C.J., Telser, J., 2004, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and cellular biochemistry*, 266 (1/2), 37-56.
- [46]. Halliwell, B., Chirico, S., 1993, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance, *The american journal of clinical nutrition*, 57 (5), 715S-725S.
- [47]. Anzai, K., Ogawa, K., Goto, Y., Senzak, Y., Ozawa, T., Yamamoto, H., 1999, Oxidation-Dependent changes in the stability and permeability of lipid bilayers, *Antioxidants & redox signaling*, 1 (3), 339-347.
- [48]. Yehuda, S., Rabinovitz, S., Carasso, R.L., Mostofsky, D.I., 2002, The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane, *Neurobiology of aging*, 23 (5), 843-853.
- [49]. Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003, Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, *Amino Acids*, 25 (3-4), 207-218.
- [50]. Fransen, M., Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O., 2012, Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: Implications for human disease, *Biochimica et biophysica acta (BBA) - Molecular basis of disease*, 1822 (9), 1363-1373.
- [51]. Wittgen, H.G.M., van Kempen, L.C.L.T., 2007, Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications, *Melanoma res*, 17 (6), 400-409.
- [52]. Lu, F., 2007, Reactive oxygen species in cancer, too much or too little? *Medical hypotheses*, 69 (6), 1293-1298.
- [53]. Fruehauf, J.P., Meyskens, F.L., 2007, Reactive oxygen species: A breath of life or

death? *Clinical cancer research*, 13 (3), 789-794.

- [54]. Tuma, R.S., 2008, Reactive oxygen species may have antitumor activity in metastatic melanoma, *Journal of the national cancer institute*, 100 (1), 11-12.
- [55]. Dro, W., 2002, Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function, *Physiological reviews*, 82 (1), 47-95.
- [56]. Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., Rhee, S.G., 2002, Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Journal of biological chemistry*, 277 (23), 20336-20342.
- [57]. Adachi, T., Weisbrod, R.M., Pimentel, D.R., Ying, J., Sharov, V.S., Schöneich, C., Cohen, R.A., 2004, S-glutathiolation by peroxynitrite activates SERCA during arterial relaxation by nitric oxide, *Nature medicine*, 10 (11), 1200-1207.
- [58]. Adachi, T., Pimentel, D.R., Heibeck, T., Hou, X., Lee, Y.J., Jiang, B., Ido, Y., Cohen, R.A., 2004, S-glutathiolation of Ras mediates redox-sensitive signaling by angiotensin II in vascular smooth muscle cells, *Journal of biological chemistry*, 279 (28), 29857-29862.
- [59]. [https://www.google.com.tr/search?q=Radiation+icon&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMoo3U4ezeAhXE2KQKHbkRB14Q\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=DjfrWhgUC4L3-M](https://www.google.com.tr/search?q=Radiation+icon&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjMoo3U4ezeAhXE2KQKHbkRB14Q_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=DjfrWhgUC4L3-M;)., [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [60]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbn=isch&sa=1&ei=ISL5WC6NYnuafPziJgN&q=Heavy+industry+line+design+icons&oq=Heavy+industry+line+design+icons&gs\\_l=img.3...37622.53814..54469...1.0..0.132.1080.8j3.....0....1j2..gws-wiz-img.Clrnge9m4wc#imgrc=eF4pLgffQ8MUbM](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbn=isch&sa=1&ei=ISL5WC6NYnuafPziJgN&q=Heavy+industry+line+design+icons&oq=Heavy+industry+line+design+icons&gs_l=img.3...37622.53814..54469...1.0..0.132.1080.8j3.....0....1j2..gws-wiz-img.Clrnge9m4wc#imgrc=eF4pLgffQ8MUbM): [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [61]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbn=isch&sa=1&ei=8CH5W\\_TZCsT1kwXtyIqYBA&q=atom+logo+sticker&oq=atom+logo+sticker&gs\\_l=img.3...39325.47214..47464...1.0..0.199.1830.15j3.....0....1..gws-wiz-img.....0..0j0i67j0i30j0i5i30j0i8i30.H2YDQ-l80bo#imgrc=1nC2C7X\\_v6JrJM](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbn=isch&sa=1&ei=8CH5W_TZCsT1kwXtyIqYBA&q=atom+logo+sticker&oq=atom+logo+sticker&gs_l=img.3...39325.47214..47464...1.0..0.199.1830.15j3.....0....1..gws-wiz-img.....0..0j0i67j0i30j0i5i30j0i8i30.H2YDQ-l80bo#imgrc=1nC2C7X_v6JrJM)., [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].

- [62]. [https://www.google.com.tr/search?q=7e4c7e135a8f26d95c0de8eac6951b2e&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=BSKzoWyq5Bg\\_MM%253A%252COoK0fJ1tdQFnkM%252C\\_&usg=AI4\\_-kTmsmB933C\\_ZzyiEyz13dtRscfWeg&sa=X&ved=2ahUKEwjmt8qo\\_7\\_eAhXGjSwKHVOMC\\_MQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=BSKzoWyq5Bg\\_MM:](https://www.google.com.tr/search?q=7e4c7e135a8f26d95c0de8eac6951b2e&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=BSKzoWyq5Bg_MM%253A%252COoK0fJ1tdQFnkM%252C_&usg=AI4_-kTmsmB933C_ZzyiEyz13dtRscfWeg&sa=X&ved=2ahUKEwjmt8qo_7_eAhXGjSwKHVOMC_MQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=BSKzoWyq5Bg_MM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [63]. [https://www.google.com.tr/search?q=58176b9ce485474136730f024ba80973&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=bolsVPPvvohOuM%253A%252CQuXmsj-e79x1FM%252C\\_&usg=AI4\\_-kTZlmgQMrnhzaIaGJS4c-WmjKnK-w&sa=X&ved=2ahUKEwjneiS7b\\_eAhUytsKHYTMDpoQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=bolsVPPvvohOuM:](https://www.google.com.tr/search?q=58176b9ce485474136730f024ba80973&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=bolsVPPvvohOuM%253A%252CQuXmsj-e79x1FM%252C_&usg=AI4_-kTZlmgQMrnhzaIaGJS4c-WmjKnK-w&sa=X&ved=2ahUKEwjneiS7b_eAhUytsKHYTMDpoQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=bolsVPPvvohOuM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [64]. [https://www.google.com.tr/search?q=67a97733f53e3269e1c5fa524647340d&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=xgJcoZPzhmyOPM%253A%252C4zA8kh\\_0C4LK1M%252C\\_&usg=AI4\\_-kR2ceyAtqfTDMYKS0yZOGv6vdfZIA&sa=X&ved=2ahUKEwj1vduO\\_b\\_eAhXwsYsKHwJcDVoQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=xgJcoZPzhmyOPM:](https://www.google.com.tr/search?q=67a97733f53e3269e1c5fa524647340d&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=xgJcoZPzhmyOPM%253A%252C4zA8kh_0C4LK1M%252C_&usg=AI4_-kR2ceyAtqfTDMYKS0yZOGv6vdfZIA&sa=X&ved=2ahUKEwj1vduO_b_eAhXwsYsKHwJcDVoQ9QEwAHoECAAQBA#imgrc=xgJcoZPzhmyOPM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [65]. [https://www.google.com.tr/search?q=fe7ee4ff233b3e2e1e719aba4db0099a&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=9a2anUOTKJIFMM%253A%252CF6YwgRpVUUxtPM%252C\\_&usg=AI4\\_-kR9yXA10VoE-0qXRwQjQBNS-weMTQ&sa=X&ved=2ahUKEwiM\\_syC7b\\_eAhVNtIsKHaxDBa8Q9QEwAHoECAAQBA#imgrc=9a2anUOTKJIFMM:](https://www.google.com.tr/search?q=fe7ee4ff233b3e2e1e719aba4db0099a&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=9a2anUOTKJIFMM%253A%252CF6YwgRpVUUxtPM%252C_&usg=AI4_-kR9yXA10VoE-0qXRwQjQBNS-weMTQ&sa=X&ved=2ahUKEwiM_syC7b_eAhVNtIsKHaxDBa8Q9QEwAHoECAAQBA#imgrc=9a2anUOTKJIFMM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [66]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=XCL5W\\_qhEIa6afbsq4AK&q=Thinking+icon&oq=Thinking+icon&gs\\_l=img.3.0.012j0i3018.53301.53301..54080...0.0..0.102.102.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.SydL-IcVFRI#imgdii=IrOGHifXIgSgfM:&imgrc=VspgkOBe88MkxM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=XCL5W_qhEIa6afbsq4AK&q=Thinking+icon&oq=Thinking+icon&gs_l=img.3.0.012j0i3018.53301.53301..54080...0.0..0.102.102.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.SydL-IcVFRI#imgdii=IrOGHifXIgSgfM:&imgrc=VspgkOBe88MkxM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].

- [67]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=nz35W728MImwaf2anLAO&q=enveromenthazardous+material+logo&oq=enveromenthazardous+material+logo&gs\\_l=img.3...3527.67979..68300...14.0..0.161.2309.8j12.....0....1..gws-wiz-img.....0i19. bGSW0pw-oM#imgrc=JV3gwHYXWxzplM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=nz35W728MImwaf2anLAO&q=enveromenthazardous+material+logo&oq=enveromenthazardous+material+logo&gs_l=img.3...3527.67979..68300...14.0..0.161.2309.8j12.....0....1..gws-wiz-img.....0i19. bGSW0pw-oM#imgrc=JV3gwHYXWxzplM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [68]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=jyf5W\\_i gF4SZkgXGq7KYCw&q=free+radical&oq=free+radical&gs\\_l=img.3..0l3j0i30l7.118205.131676..133289...7.0..0.158.2080.6j13.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i67j0i19j0i10i19j0i8i30i19.j-HFPMpLs64#imgdii=pryEO2uIxtiO1M:&imgrc=Y8Ex3hSWEpxVFM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=jyf5W_i gF4SZkgXGq7KYCw&q=free+radical&oq=free+radical&gs_l=img.3..0l3j0i30l7.118205.131676..133289...7.0..0.158.2080.6j13.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i67j0i19j0i10i19j0i8i30i19.j-HFPMpLs64#imgdii=pryEO2uIxtiO1M:&imgrc=Y8Ex3hSWEpxVFM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [69]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=GCj5W-etM4SMLwSG0aHQBg&q=sleeping+icon&oq=sleeping+icon&gs\\_l=img.3..0j0i30l4j0i5i30l5.92593.111584..111904...0.0..0.108.1224.11j2.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i67.A1zm3FZtamM#imgrc=WxaoCBVwNHnTFM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=GCj5W-etM4SMLwSG0aHQBg&q=sleeping+icon&oq=sleeping+icon&gs_l=img.3..0j0i30l4j0i5i30l5.92593.111584..111904...0.0..0.108.1224.11j2.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i67.A1zm3FZtamM#imgrc=WxaoCBVwNHnTFM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [70]. [https://www.google.com.tr/search?q=helix+logo+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcn7iO6uzeAhWOzaQKHd6iAZUQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=S\\_CUGIE2JMarGM:](https://www.google.com.tr/search?q=helix+logo+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjcn7iO6uzeAhWOzaQKHd6iAZUQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=S_CUGIE2JMarGM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [71]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Uyn5W9aUN8y0kwX126yIBQ&q=inflammation+infection+icon&oq=inflammation+infection+icon&gs\\_l=img.3...652.6258..6600...0.0..0.514.1447.6j1j1j5-1.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i8i30i19j0i30j0i8i30.htF7ZtIRePs#imgrc=simpAn78ygmU3M:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Uyn5W9aUN8y0kwX126yIBQ&q=inflammation+infection+icon&oq=inflammation+infection+icon&gs_l=img.3...652.6258..6600...0.0..0.514.1447.6j1j1j5-1.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i8i30i19j0i30j0i8i30.htF7ZtIRePs#imgrc=simpAn78ygmU3M:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [72]. [https://www.google.com.tr/search?q=inflammation+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwigvIPV6uzeAhVC\\_qQKHVHCBkUQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=2TFM5rRyijWqkM:](https://www.google.com.tr/search?q=inflammation+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwigvIPV6uzeAhVC_qQKHVHCBkUQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=2TFM5rRyijWqkM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [73]. Angela M.R., Patrizia B., Stefania Z., Gigliola M., Manuela N., Paola C., Bruno B.,

2010, *Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers*, Bio-Farms for Nutraceuticals, In: Maria T. G., Bruno B., and Giuseppina R. (eds.), Chapter 5, Springer, New York, USA, ISBN: 978-1-4419-7347-4, 52-67.

- [74]. Scognamiglio, V., Raffi, D., Lambrea, M., Rea, G., Tibuzzi, A., Pezzotti, G., Johanningmeier, U., Giardi, M.T., 2009, Chlamydomonas reinhardtii genetic variants as probes for fluorescence sensing system in detection of pollutants, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394 (4), 1081-1087.
- [75]. Kapusta, I., Janda, B., Szajwaj, B., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C., Franceschi, F., Franz, C., Oleszek, W., 2007, Flavonoids in horse chestnut (*Aesculus hippocastanum*) seeds and powdered waste water byproducts, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (21), 8485-8490.
- [76]. Maria T. G., Bruno B., Giuseppina R., 2010, *Bio-Farms for Nutraceuticals*, 1<sup>st</sup> ed, Springer, New York, USA, ISBN: 978-1-4419-7347-4.
- [77]. Abuajah, C.I., Ogbonna, A.C., Osuji, C.M., 2015, Functional components and medicinal properties of food: a review, *Journal of food science and technology*, 52 (5), 2522-2529.
- [78]. Arai, S., Vатtem, D.A., Kumagai, H., 2016, *Functional Foods - History and Concepts*, Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products: Concepts and Applications, In: Dhiraj, A., Vатtem, D.A., Maitin, V. (eds.), Chapter 1, DEStech Publications, Pennsylvania, USA , ISBN: 978-1-60595-101-0, 3.
- [79]. Arai, S., 2005, Functional food science, *Journal of the science of food and agriculture*, 85 (10), 1603-1605.
- [80]. Hasler, C.M., 2002, Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges - A Position Paper from the American Council on Science and Health, *The journal of nutrition*, 132 (12), 3772-3781.
- [81]. Vатtem, D.A., Maitin, V., 2016, *Functional Foods, Nutraceuticals and Natural Products*,

1<sup>st</sup> ed, DEStech Publications, Pennsylvania, USA, ISBN: 978-1-60595-101-0.

- [82]. [https://www.google.com.tr/search?q=IFIC&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWiNksTRjO3eAhUssaQKHV5nDs0Q\\_AUIECgD&biw=1366&bih=608#imgrc=7IZ\\_QiOw-75KyM;](https://www.google.com.tr/search?q=IFIC&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEWiNksTRjO3eAhUssaQKHV5nDs0Q_AUIECgD&biw=1366&bih=608#imgrc=7IZ_QiOw-75KyM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [83]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=N035W-bTFMiVsAfOqKyAAw&q=ILSI&oq=ILSI&gs\\_l=img.3..0j0i30l8j0i5i30.60015.60015..60812...0.0..0.98.98.1.....0....1j2..gws-wiz-img.DNjWMdak7-U#imgrc=RM2b2hBeDrDA-M;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=N035W-bTFMiVsAfOqKyAAw&q=ILSI&oq=ILSI&gs_l=img.3..0j0i30l8j0i5i30.60015.60015..60812...0.0..0.98.98.1.....0....1j2..gws-wiz-img.DNjWMdak7-U#imgrc=RM2b2hBeDrDA-M;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [84]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=d035W52ZN4-0sAemzJGAaw&q=canda&oq=canda&gs\\_l=img.3..0i10.53258.57580..57763...1.0..0.205.1127.3j5j1.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i10.1vDC0vP\\_32k#imgrc=HB37nILU\\_k6aGM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=d035W52ZN4-0sAemzJGAaw&q=canda&oq=canda&gs_l=img.3..0i10.53258.57580..57763...1.0..0.205.1127.3j5j1.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i10.1vDC0vP_32k#imgrc=HB37nILU_k6aGM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [85]. [https://www.google.com.tr/search?q=The+Institute+of+Medicine+of+the+National+Academy+of+Sciences+\(IOM\)+states+logo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj5hr6iju3eAhUOCuwKHcX0B9AQ\\_AUIECgD&biw=1366&bih=608#imgrc=HCsjNlx7b5YN8M;](https://www.google.com.tr/search?q=The+Institute+of+Medicine+of+the+National+Academy+of+Sciences+(IOM)+states+logo&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwj5hr6iju3eAhUOCuwKHcX0B9AQ_AUIECgD&biw=1366&bih=608#imgrc=HCsjNlx7b5YN8M;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [86]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=Bk\\_5W-bDFsSlkwXs4pzwBQ&q=FOSHU+&oq=FOSHU+&gs\\_l=img.3..0i19j0i30i19l2j0i5i30i19.161637.161637..162468...0.0..0.107.107.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.tWhaGBF5cLU#imgrc=mOF-Og4vEZX4YM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=Bk_5W-bDFsSlkwXs4pzwBQ&q=FOSHU+&oq=FOSHU+&gs_l=img.3..0i19j0i30i19l2j0i5i30i19.161637.161637..162468...0.0..0.107.107.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.tWhaGBF5cLU#imgrc=mOF-Og4vEZX4YM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [87]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=Bk\\_5W-bDFsSlkwXs4pzwBQ&q=FOSHU+&oq=FOSHU+&gs\\_l=img.3..0i19j0i30i19l2j0i5i30i19.161637.161637..162468...0.0..0.107.107.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.tWhaGBF5cLU#imgrc=mOF-Og4vEZX4YM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=Bk_5W-bDFsSlkwXs4pzwBQ&q=FOSHU+&oq=FOSHU+&gs_l=img.3..0i19j0i30i19l2j0i5i30i19.161637.161637..162468...0.0..0.107.107.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.tWhaGBF5cLU#imgrc=mOF-Og4vEZX4YM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].

- [88]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=AVD5W\\_fEO4vhkgXE54jIAw&q=The+American+Dietetic+Association+ADA&oq=The+American+Dietetic+Association+ADA&gs\\_l=img.3...432218.433576..433876...1.0..0.106.198.1j1.....0....1j2..gws-wiz-img.5tl76XROQ88#imgrc=CwXdzY2hZkY8LM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=AVD5W_fEO4vhkgXE54jIAw&q=The+American+Dietetic+Association+ADA&oq=The+American+Dietetic+Association+ADA&gs_l=img.3...432218.433576..433876...1.0..0.106.198.1j1.....0....1j2..gws-wiz-img.5tl76XROQ88#imgrc=CwXdzY2hZkY8LM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [89]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=ulH5W5CZDMSRsAeA0Jr4CA&q=The+American+Council+on+Science+and+Health+states+&oq=The+American+Council+on+Science+and+Health+states+&gs\\_l=img.3...1358623.1358623..1359563...0.0..0.129.129.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.y1oHcgNWXo8#imgrc=iKd6jukRV15MZM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=ulH5W5CZDMSRsAeA0Jr4CA&q=The+American+Council+on+Science+and+Health+states+&oq=The+American+Council+on+Science+and+Health+states+&gs_l=img.3...1358623.1358623..1359563...0.0..0.129.129.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.y1oHcgNWXo8#imgrc=iKd6jukRV15MZM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [90]. Saxena, M., Saxena, J., Nema, R., Singh, D., Gupta, A., 2013, Phytochemistry of Medicinal Plants, *Journal of pharmacognosy and phytochemistry*, 1 (6), 168-182.
- [91]. Gibson, E.L., Wardle, J., Watts, C.J., 1998, Fruit and vegetable consumption, nutritional knowledge and beliefs in mothers and children, *Appetite*, 31 (2), 205-228.
- [92]. Hark, L., Deen, D., Morrison, G., 2014, Medical Nutrition and Disease, 5<sup>th</sup> ed, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, IBSN: 978-1118652435.
- [93]. Romeo, J.T., 1989, Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense, 1<sup>st</sup> ed, Springer, Boston, MA, IBSN: 978-1-4615-4689-4.
- [94]. Amy King, Gloria Younge, 1999, Characteristics and Occurrence of Phenolic Phytochemicals, *Journal of the american dietetic association*, 99 (2), 213-218.
- [95]. Narasinga Rao, B.S., 2003, Bioactive phytochemicals in Indian foods and their potential in health promotion and disease prevention, *Asia pacific journal of clinical nutrition*, 12 (1), 9-22.
- [96]. Hahn, N.I., 1998, Are phytoestrogens nature's cure for what ails us? A look at the research, *Journal of the american dietetic association*, 98 (9), 974-976.



- [97]. Walton, N.J., Mayer, M.J., Narbad, A., 2003, Vanillin, *Phytochemistry*, 63 (5), 505-515.
- [98]. Dai, J., Mumper, R.J., 2010, Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, 15 (10), 7313-7352.
- [99]. Battisti, V., Maders, L.D.K., Bagatini, M.D., Santos, K.F., Spanevello, R.M., Maldonado, P.A., Brulé, A.O., Araújo, M. do C., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., 2008, Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients, *Clinical biochemistry*, 41 (7-8), 511-518.
- [100]. Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food chemistry*, 99 (1), 191-203.
- [101]. Mandal, S.M., Chakraborty, D., Dey, S., 2010, Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses, *Plant signaling and behavior*, 5 (4), 359-368.
- [102]. Gryglewski, R.J., Korbut, R., Robak, J., Świąż, J., 1987, On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids, *Biochemical pharmacology*, 36 (3), 317-322.
- [103]. Mole, S., Waterman, P.G., 1986, Tannic acid and proteolytic enzymes: Enzyme inhibition or substrate deprivation?, *Phytochemistry*, 26 (1), 99-102.
- [104]. Mangan, J.L., 1988, Nutritional Effects of Tannins in Animal Feeds, *Nutrition research reviews*, 1(1), 209-231.
- [105]. Schofield, P., Mbugua, D. M., & Pell, A.N., 2001, Analysis of condensed tannins: a review, *Animal Feed Science and Technology*, *Animal Feed Science and Technology*, 91(1), 21-40.
- [106]. Serrano, J., Puupponen-Pimiä, R., Dauer, A., Aura, A.M., Saura-Calixto, F., 2009, Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects, *Molecular nutrition and food research*, 53 (SUPPL. 2), 310-329.

- [107]. Langenheim J. H., 1994, Higher plant terpenoids: A phyto-centric overview of their ecological roles, *Journal of chemical ecology*, 20 (6), 1223-1280.
- [108]. Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R., 1998, Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis, *Proceedings of the national academy of sciences*, 95 (8), 4126-4133.
- [109]. Lásztity, R., Hidvégi, M., Bata, Á., 1998, Saponins in food, *Food reviews international*, 14 (4), 371-390.
- [110]. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H.Z.E., Rahmat, A., 2010, Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe), *Molecules*, 15 (6), 4324-4333.
- [111]. Tapas, A., Sakarkar, D., Kakde, R., 2008, Flavonoids as Nutraceuticals: A Review, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 7 (3), 1089-1099.
- [112]. Atmani, D., Chaher, N., Atmani, D., Berboucha, M., Debbache, N., Boudaoud, H., 2009, Flavonoids in Human Health: From Structure to Biological Activity, *Current nutrition & food science*, 5 (4), 225-237.
- [113]. Dolaro, P., Luceri, C., De Filippo, C., Femia, A. Pietro, Giovannelli, L., Caderni, G., Cecchini, C., Silvi, S., Orpianesi, C., Cresci, A., 2005, Red wine polyphenols influence carcinogenesis, intestinal microflora, oxidative damage and gene expression profiles of colonic mucosa in F344 rats, *Mutation research - fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 591 (1-2), 237-246.
- [114]. Gyamfi, M.A., Aniya, Y., 2002, Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Thonningia sanguinea*, *Biochemical pharmacology*, 63 (9), 1725-1737.
- [115]. Blytt, H.J., Guscar, T.K., Butler, L.G., 1988, Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes, *Journal of chemical ecology*, 14 (6), 1455-1465.

- [116]. McCaskill, D., Croteau, R., 1998, Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants, *Trends in biotechnology*, 16 (8), 349-355.
- [117]. Palav, Y.K., D'mello, P. M., 2006, Standardization of selected Indian medicinal herbal raw materials containing polyphenols as major phytoconstituents, *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 68, 506-509.
- [118]. Degenhardt, J., Gershenzon, J., Baldwin, I.T., Kessler, A., 2003, Attracting friends to feast on foes: Engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies, *Current opinion in biotechnology*, 14 (2), 169-176.
- [119]. Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J., 2004, Biochemistry of Plant Volatiles, *Plant physiology*, 135(4), 1893-1902.
- [120]. Morrissey, J.P., Osbourn, A.E., 1999, Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis, *Microbiology and molecular biology reviews*, 63 (3), 708-724.
- [121]. Takechi, M., Matsunami, S., Nishizawa, J., Uno, C., Tanaka, Y., 1999, Haemolytic and antifungal activities of saponins or anti-ATPase and antiviral activities of cardiac glycosides, *Planta medica*, 65 (6), 585-586.
- [122]. Traore, F., Faure, R., Ollivier, E., Gasquet, M., Azas, N., Debrauwer, L., Keita, A., Timon-David, P., Balansard, G., 2002, Structure and antiprotozoal activity of triterpenoid saponins from *Glinus oppositifolius*, *Planta medica*, 66 (4), 368-371.
- [123]. Andlauer, W., Fürst, P., 2002, Nutraceuticals: A piece of history, present status and outlook, *Food research international*, 35 (2-3), 171-176.
- [124]. Champ, M., Langkilde, A.-M., Brouns, F., Kettlitz, B., Collet, Y.L.B., 2003, Advances in dietary fibre characterisation. 1. Definition of dietary fibre, physiological relevance, health benefits and analytical aspects, *Nutrition research reviews*, 16, 71-82.

- [125]. Charalampopoulos, D., Wang, R., Pandiella, S.S., Webb, C., 2002, Application of cereals and cereal components in functional foods: a review, *International journal of food microbiology*, 79 (1-2), 131-141.
- [126]. Becker, D.J., Lowe, J.B., 2003, Fucose: Biosynthesis and biological function in mammals, 13 (7), 41R-53R.
- [127]. Izydorzcyk, M.S., Dexter, J.E., 2008, Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products-a Review, *Food research international*, 41 (9), 850-868.
- [128]. Duss, R., Nyberg, L., 2004, Oat soluble fibers ( $\beta$ -glucans) as a source for healthy snack and breakfast foods, *Cereal foods world*, 49 (6), 320-325.
- [129]. Chan, G., Chan, W., Sze, D., 2009, The effects of  $\beta$ -glucan on human immune and cancer cells, *Journal of hematology & oncology*, 2 (1), 25.
- [130]. Havrlentová, M., Petrušáková, Z., Burgárová, A., Gago, F., Hlinková, A., Šturdík, E., 2011, Cereal  $\beta$ -glucans and their Significance for the Preparation of Functional Foods-A Review, *Czech journal of food sciences*, 29 (1), 1-14.
- [131]. Ahmad, A., Munir, B., Abrar, M., 2012, Perspective of  $\beta$ -Glucan as Functional Ingredient for Food Industry, *Journal of nutrition & food sciences*, 02 (02), 1-6.
- [132]. Ahmad, A., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H., Din, A., 2009, Physicochemical and functional properties of barley  $\beta$ -glucan as affected by different extraction procedures, *International journal of food science and technology*, 44 (1), 181-187.
- [133]. Akramienė, D., Kondrotas, A., Didžiapetrienė, J., Kėvelaitis, E., 2007, Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system, *Medicina (Kaunas)*, 43 (8), 597-606.
- [134]. Ali, R., Athar, M., Abdullah, U., Abidi, S.A., Qayyum, M., 2009, Nutraceuticals as natural healers: Emerging evidences, *African journal of biotechnology*, 8 (6), 891-898.

- [135]. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health, *Pharmacognosy reviews*, 4 (8), 118-126.
- [136]. Bravo, L., Sources, D., Significance, N., Bravo, L., 1998, Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance, *Nutrition reviews*, 56 (11), 317-333.
- [137]. Kumar, S., 2011, Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System, *Pelagia research library advances in applied science research*, 2 (1), 129-135.
- [138]. Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Pike, M.C., Henderson, B.E., 1990, Serum oestrogen levels in postmenopausal women: Comparison of american whites and japanese in japan, *British journal of cancer*, 62 (3), 451-453.
- [139]. Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K., 1995, Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products, *British journal of nutrition*, 74 (4), 587-601.
- [140]. Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., Stillman, R.J., Shay, N.F., Erdman, J.W., 1998, Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women, *The american journal of clinical nutrition*, 68 (6), 1375S-1379S.
- [141]. Setchell, K.D.R., Cassidy, A., 1999, Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health, *The journal of nutrition*, 129 (3), 758S-767S.
- [142]. Brennan, L.A., Morris, G.M., Wasson, G.R., Hannigan, B.M., Barnett, Y.A., 2000, The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - induced DNA damage in human lymphocytes, *British journal of nutrition*, 84 (2), 195-202.
- [143]. Crandell, K.M., and Duren, S.E., 2007, Nutraceuticals: What are they and do they work?, *Kentucky equine research*, 1998, 34 (3), 29-36.
- [144]. Hardy, G., Hardy, I., McElroy, B., 2002, Purpose: Nutraceuticals - A pharmaceutical viewpoint: Part I., *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 5 (6), 671-

677.

- [145]. Chang, J., 2000, Medicinal herbs: Drugs or dietary supplements? *Biochemical pharmacology*, 59 (3), 211-219.
- [146]. Halt, M., 1998, Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants, *European journal of epidemiology*, 14 (3), 269-274.
- [147]. Chow, J., 2002, Probiotics and prebiotics: A brief overview, *Journal of renal nutrition*, 12 (2), 76-86.
- [148]. Nicoli, M.C., Anese, M., Parpinel, M., Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables, *Trends in food science & technology*, 10 (3), 94-100.
- [149]. Poljsak, B., Šuput, D., Milisav, I., 2013, Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 1-11.
- [150]. Apak, R., Capanoğlu, E., Shahidi F., 2018, Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications, 1<sup>st</sup> ed, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, IBSN: 9781119135388.
- [151]. Frankel, E.N., 1996, Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality, *Food chemistry*, 57 (1), 51-55.
- [152]. Akoh, C.C., David, B.M., 2002, Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, 2<sup>ed</sup> ed, Marcel dekker, New York, USA, ISBN: 0-8247-0749-4.
- [153]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=NCb5W9vzDcr9kwXAja2IBQ&q=Free+redical+&oq=Free+redical+&gs\\_l=img.3..0i10i30.18019.18019..19750...0.0..0.100.100.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.1DyWworMVGGM#imgdii=JOM5P5ZwWpjQNM:&imgrc=vJ7JBnvP5uzpuM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=NCb5W9vzDcr9kwXAja2IBQ&q=Free+redical+&oq=Free+redical+&gs_l=img.3..0i10i30.18019.18019..19750...0.0..0.100.100.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.1DyWworMVGGM#imgdii=JOM5P5ZwWpjQNM:&imgrc=vJ7JBnvP5uzpuM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].

- [154]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Qw0JXJiTLaKNmgXTvJtI&q=food+icon&oq=food+icon&gs\\_l=img.3..0l8j0i30l2.11036.50616.52012...1.0..0.199.1523.0j10.....0...1..gws-wiz-img....0.zBpTJZFBnok#imgdii=SXUrfVvIPk0GoM:&imgrc=4dcouuAQ4bbJyM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Qw0JXJiTLaKNmgXTvJtI&q=food+icon&oq=food+icon&gs_l=img.3..0l8j0i30l2.11036.50616.52012...1.0..0.199.1523.0j10.....0...1..gws-wiz-img....0.zBpTJZFBnok#imgdii=SXUrfVvIPk0GoM:&imgrc=4dcouuAQ4bbJyM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [155]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=eg0JXLikDIeWsAG33rDABg&q=supplement-bottle+icon&oq=supplement-bottle+icon&gs\\_l=img.3...94828.95813..98051...0.0..0.243.598.0j1j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0j0i67.B02x10zNU98#imgrc=PGILJOBVwz5VJM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=eg0JXLikDIeWsAG33rDABg&q=supplement-bottle+icon&oq=supplement-bottle+icon&gs_l=img.3...94828.95813..98051...0.0..0.243.598.0j1j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0j0i67.B02x10zNU98#imgrc=PGILJOBVwz5VJM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [156]. Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
- [157]. Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R., 2003, Antioxidant Properties of Low Molecular Weight Phenols Present in the Mediterranean Diet, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (24), 6975-6981.
- [158]. Winterbourn., C.C., 2008, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nature chemical biology*, 4 (5), 278-286.
- [159]. Scandalios, J.G., 2005, Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses, *Brazilian journal of medical and biological research*, 38 (7), 995-1014.
- [160]. Sies, H., 1993, Strategies of antioxidant defense, *European journal of biochemistry*, 215 (2), 213-9.
- [161]. Lee, O.H., Lee, B.Y., Lee, J., Lee, H.B., Son, J.Y., Park, C.S., Shetty, K., Kim, Y.C., 2009, Assessment of phenolics-enriched extract and fractions of olive leaves and their antioxidant activities, *Bioresource technology*, 100 (23), 6107-6113.
- [162]. Shahidi, F., Zhong, Y., 2010, Novel antioxidants in food quality preservation and

- health promotion, *European journal of lipid science and technology*, 112 (9), 930-940.
- [163]. Shahidi, F., 2015, *Handbook of antioxidants for food preservation*, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier Ltd, Oxford, UK, ISBN:9781845696481.
- [164]. Shahidi, F., Naczk, M., 2004, *Phenolics in food and nutraceuticals*, 2<sup>ed</sup> ed, CRC press, Boca Raton, Florida, ISBN:0-203-50873-4.
- [165]. Nanditha, B., Prabhasankar, P., 2009, Antioxidants in bakery products: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49 (1), 1-27.
- [166]. Udaya N. Wanasundara, Shahidi, F., 1998, Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils, *Food chemistry*, 63, 335-342.
- [167]. Lin, J.K., Chen, P.C., Ho, C.T., Lin-Shiau, S.Y., 2000, Inhibition of xanthine oxidase and suppression of intracellular reactive oxygen species in HL-60 cells by theaflavin-3,3'-digallate, (-)- epigallocatechin-3-gallate, and propyl gallate, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (7), 2736-2743.
- [168]. Biparva, P., Ehsani, M., Hadjmohammadi, M.R., 2012, Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples, *Journal of food composition and analysis*, 27 (1), 87-94.
- [169]. Dolatabadi, J.E.N., Kashanian, S., 2010, A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives, *Food research international*, 43 (5), 1223-1230.
- [170]. Saad, B., Sing, Y.Y., Nawi, M.A., Hashim, N., Mohamed Ali, A.S., Saleh, M.I., Sulaiman, S.F., Talib, K.M., Ahmad, K., 2007, Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC, *Food chemistry*, 2007, 105 (1), 389-394.
- [171]. Iverson, F., 1999, In vivo studies on butylated hydroxyanisole, *Food and chemical toxicology*, 37 (9-10), 993-997.



- [172]. Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., Tatematsu, M., 1986, Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis, *Food and chemical toxicology*, 24 (10-11), 1071-1082.
- [173]. Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I., 2003, Cell death induced by the phenolic antioxidant tert-butylhydroquinone and its metabolite tert-butylquinone in human monocytic leukemia U937 cells, *Food and chemical toxicology*, 41 (5), 679-688.
- [174]. Ambigaipalan, P., De Camargo, A.C., Shahidi, F., 2016, Phenolic compounds of pomegranate byproducts (outer skin, mesocarp, divider membrane) and their antioxidant activities, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (34), 6584-6604.
- [175]. Pearson, A.M., Dutson, T.R., 1997, Production and processing of healthy meat, poultry and fish products, 1<sup>st</sup> ed, Blackie Academic and Professional, London, UK, ISBN: 978-1-4613-1125-6.
- [176]. Peters, M.M.C.G., Rivera, M.I., Jones, T.W., Monks, T.J., Lau, S.S., 1996, Glutathione conjugates of tert-butyl-hydroquinone, a metabolite of the urinary tract tumor promoter 3-tert-butyl-hydroxyanisole, are toxic to kidney and bladder, *Cancer research*, 56 (5), 1006-1011.
- [177]. Amarowicz, R., Naczek, M., Shahidi, F., 2000, Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (7), 2755-2759.
- [178]. Goli, A.H., Barzegar, M., Sahari, M.A., 2005, Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia vera*) hull extracts, *Food chemistry*, 92 (3), 521-525.
- [179]. Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., 2008, Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves, *Food chemistry*, 108 (1), 253-262.
- [180]. McCarthy, T.L., Kerry, J.P., Kerry, J.F., Lynch, P.B., Buckley, D.J., 2001, Evaluation

of the antioxidant potential of natural food/plant extracts as compared with synthetic antioxidants and vitamin e in raw and cooked pork patties, *Meat science*, 58 (1), 45-52.

- [181]. McBride, N.T.M., Hogan, S.A., Kerry, J.P., 2007, Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef, *International journal of food science and technology*, 42 (10),1201-1207.
- [182]. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Wilkinson, M., 2008, Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants, *Rasayan journal of chemistry*, 1 (4), 751-756.
- [183]. Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'Grady, M.N., Kerry, J.P., 2010, Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelf-life stability of packaged raw minced beef patties, *Meat science*, 84 (4), 613-620.
- [184]. Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., Nucci, R., 2002, *Olea europaea* L. leaf extract and derivatives: antioxidant properties, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (17), 4934-4940..
- [185]. Afaneh, I., Yateem, H., Al-rimawi, F., 2015, Effect of Olive Leaves Drying on the Content of Oleuropein, *American journal of analytical chemistry*, 6 (February), 246-252.
- [186]. Naczka, M., Pegg, R.B., Zadernowski, R., Shahidi, F., 2005, Radical scavenging activity of canola hull phenolics, *Journal of the american oil chemist's society*, 82 (4), 255-260.
- [187]. Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015, Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review, *Journal of functional foods*, 18 (Part B), 820-897.
- [188]. Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015, Novel functional food ingredients from marine sources, *Current opinion in food science*, 2, 123-129.
- [189]. Valavanidis, A., Nisiotou, C., Papageorgiou, Y., Kremli, I., Satravelas, N., Zinieris,

- N., Zygalki, H., 2004, Comparison of the Radical Scavenging Potential of Polar and Lipidic Fractions of Olive Oil and Other Vegetable Oils under Normal Conditions and after Thermal Treatment, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (8) pp: 2358-2365.
- [190]. Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Fernández-Gutiérrez, A., 2006, Evaluation of individual antioxidant activity of single phenolic compounds on virgin olive oil, *Progress in nutrition*, 8 (1) pp: 28-39.
- [191]. Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A., 2006, Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood, *Journal of chromatography A*, 1112 (1-2), 311-318.
- [192]. Lee, J., Lee, S., Lee, H., Park, K., Choe, E., 2002, Spinach (*Spinacia oleracea*) powder as a natural food-grade antioxidant in deep-fat-fried products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (20), 5664-5669.
- [193]. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R., 2005, Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods, *Food chemistry*, 91 (4), 621-632.
- [194]. Houhoula, D.P., Oreopoulou, V., Tzia, C., 2004, Antioxidant efficiency of oregano in frying and storage of fried products, *European journal of Lipid science and technology*, 106 (11), 746-751.
- [195]. Gordon, M.H., Kourkimská, L., 1995, The effects of antioxidants on changes in oils during heating and deep frying, *Journal of the science of food and agriculture*, 68 (3), 347-353.
- [196]. Yanishlieva, N. V., Marinova, E.M., Marekov, I.N., Gordon, M.H., 1997, Effect of an ethanol extract from summer savory (*Satureja hortensis* L.) on the stability of sunflower

oil at frying temperature, *Journal of the science of food and agriculture*, 74 (4), 524-530.

- [197]. Abdalla, A.E., Roozen, J.P., 1999, Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion, *Food chemistry*, 64 (3), 323-329.
- [198]. Che Man, Y.B., Tan, C.P., 1999, Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined bleached and deodorized palm olein during deep fat frying of potato chips, *Journal of the american oil chemist's society*, 76 (3), 331-339.
- [199]. Lolos, M., Oreopoulou, V., Tzia, C., 1999, Oxidative stability of potato chips: Effect of frying oil type, temperature and antioxidants, *Journal of the science of food and agriculture*, 79 (11), 1524-1528.
- [200]. Zandi, P., Gordon, M.H., 1999, Antioxidant activity of extracts from old tea leaves, *Food chemistry*, 64 (3), 285-288.
- [201]. Shyamala, B.N., Gupta, S., Lakshmi, A.J., Prakash, J., 2005, Leafy vegetable extracts - Antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils, *Innovative food science and emerging technologies*, 6 (2), 239-245.
- [202]. Benakmoum, A., Abbeddou, S., Ammouche, A., Kefalas, P., Gerasopoulos, D., 2008, Valorisation of low quality edible oil with tomato peel waste, *Food chemistry*, 110 (3), 684-690.
- [203]. Artajo, L.S., Romero, M.P., Morelló, J.R., Motilva, M.J., 2006, Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: Evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (16), 6079-6088.
- [204]. Tian, L.L., White, P.J., 1994, Antioxidant activity of oat extract in soybean and cottonseed oils, *Journal of the american oil chemist's society*, 71 (10), 1087-1094.
- [205]. Drelich, A., Gomez, F., Clause, D., Pezron, I., 2010, Evolution of water-in-oil emulsions stabilized with solid particles. Influence of added emulsifier, *Colloids and surfaces A: Physicochemical and engineering aspects*, 365 (1-3), 171-177,

- [206]. Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Motilva, M.J., 2011, Stability of a phenol-enriched olive oil during storage, *European journal of lipid science and technology*, 113 (7), 894-903.
- [207]. Kiritsakis, A., Shahidi, F., 2017, Olives and olive oil as functional foods: bioactivity, chemistry and processing, 1<sup>st</sup> ed, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, Hoboken, NJ, ISBN:9781119135319.
- [208]. Breton, C.M., Warnock, P., Bervillé, A.J., 2012, *Origin and history of the olive*, Olive germplasm - The olive cultivation, table olive and olive oil industry in Italy, In: Muzzalupo, I. (ed), Chapter 1, IntechOpen limited, London, UK, ISBN: 978-953-51-0883-2, 3-22.
- [209]. Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E., 2012, *Current state of the art*, Domestication of plants in the old world, In: Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E. (eds), Oxford University Press, New York, USA, ISBN: 9780199549061, 1-8.
- [210]. Kelder, J.M., 2009, Royal Gift Exchange between Mycenae and Egypt: Olives as “Greeting Gifts” in the Late Bronze Age Eastern Mediterranean, *American journal of archaeology*, 113 (3), 339-352.
- [211]. Visioli, F., Poli, A., Galli, C., 2002, Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil, *Medicinal research reviews*, 22 (1), 65-75.
- [212]. Conde, C., Delrot, S., Gerós, H., 2008, Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening, *Journal of plant physiology*, 165 (15), 1545-1562.
- [213]. Food and agriculture organization (FAO), 2017, *FAOSTAT*, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2018].
- [214]. <https://mapchart.net/>, [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2018].
- [215]. IOC, 2016, A snapshot of the Turkish olive oil sector, *Olivae 123*, 1 (123), 4-5.

- [216]. IOC, 2016, Olives, a feature of Turkey since 4000 BC, *Olivae 123*, 1 (123), 6-8.
- [217]. TÜİK, *Bölgesel istatistikler*, <https://biruni.tuik.gov.tr/bolgeselistatistik/anaSayfa.do>, [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2018].
- [218]. TÜİK, *İstatistiksel tablolar ve dinamik sorgulama*, [http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1001](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001), [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2018].
- [219]. Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., 1999, Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms, *Theoretical and applied Genetics*, 98 (3-4), 411-421.
- [220]. Baldoni, L., Guerrero, C., Sossey-Aloui, K., Abbott, A.G., Angiolillo, A., Lumaret, R., 2002, Phylogenetic relationships among *Olea* species, based on nucleotide variation at a non-coding chloroplast DNA region, *Plant biology*, 4 (3), 346-351.
- [221]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=aAj7W4ugBsKnsgG724PIDg&q=olive+tree+3d+model&oq=Olive+tree+3d+&gs\\_l=img.1.0.0j0i30l2.11110.17103..20357...0.0..0.363.2467.0j10j1j3.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i8i30.dVzFR-e-aCiA#imgrc=NuhM2aWY1AUKrM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=aAj7W4ugBsKnsgG724PIDg&q=olive+tree+3d+model&oq=Olive+tree+3d+&gs_l=img.1.0.0j0i30l2.11110.17103..20357...0.0..0.363.2467.0j10j1j3.....0....1..gws-wiz-img.....0..0i8i30.dVzFR-e-aCiA#imgrc=NuhM2aWY1AUKrM;) [Ziyaret tarihi: 27 Ağustos 2018].
- [222]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=jwn7W-bhL8ORsgGXvbD4Cw&q=tree-root-wallpaper-3&oq=tree-root-wallpaper-3&gs\\_l=img.3...17239.31121..31786...0.0..0.386.2964.0j9j1j4.....0....1j2..gws-wiz-img.....0..0i19j0i30i19.JommRwxvuu4#imgrc=8ziiwubr2n0dM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=jwn7W-bhL8ORsgGXvbD4Cw&q=tree-root-wallpaper-3&oq=tree-root-wallpaper-3&gs_l=img.3...17239.31121..31786...0.0..0.386.2964.0j9j1j4.....0....1j2..gws-wiz-img.....0..0i19j0i30i19.JommRwxvuu4#imgrc=8ziiwubr2n0dM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [223]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=0gz7W-btNYGqsAHgsIWgCQ&q=Olive+tree+isolated+bud&oq=Olive+tree+isolated+bud&gs\\_l=img.3...27789.43783..46390...1.0..0.754.3241.0j7j3j2j6-1.....0....1j2..gws-wiz-img.V 8IwzSxZEU#imgrc=tb-ErD9TURpeWM;](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=0gz7W-btNYGqsAHgsIWgCQ&q=Olive+tree+isolated+bud&oq=Olive+tree+isolated+bud&gs_l=img.3...27789.43783..46390...1.0..0.754.3241.0j7j3j2j6-1.....0....1j2..gws-wiz-img.V 8IwzSxZEU#imgrc=tb-ErD9TURpeWM;) [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].

- [224]. Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D., 2003, Adherence to a Mediterranean Diet and Survival in a Greek Population, *New England journal of medicine*, 348 (26), 2599-2608.
- [225]. Knuops, K.T.B., de Groot, L.C.P.G.M., Kromhout, D., Perrin, A.-E., Moreiras-Varela, O., Menotti, A., van Staveren, W.A., 2004, Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly european men and women: The HALE project, *JAMA*, 292 (12), 1433-1439.
- [226]. Covas, M.I., 2008, Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: Reduction of heart disease factors and oxidative damage, *Inflammopharmacology*, 16 (5), 216-218.
- [227]. Covas, M.I., Nyssönen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.J.F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., De La Torre, R., Mursu, J., Bäumlner, H., Nascetti, S., Salonen, J.T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J., 2006, The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial, *Annals of internal medicine*, 145 (5), 333-341.
- [228]. Palliotti, A., Bongi, G., 1996, Freezing injury in the olive leaf and effects of mefluidide treatment, *Journal of horticultural science and biotechnology*, 71 (1), 57-63.
- [229]. D'Angeli, S., Altamura, M.M., 2007, Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization, *Planta*, 225 (5), 1147-1163.
- [230]. Barranco, D., Ruiz, N., Gómez-Del Campo, M., 2005, Frost tolerance of eight olive cultivars, *HortScience*, 40 (3), 558-560.
- [231]. Denney, J.O., McEachern, G.R., Griffiths, J.F., 1985, Modeling the thermal adaptability of the olive (*Olea europaea* L.) in Texas, *Agricultural and forest meteorology*, 35 (1-4), 309-327.
- [232]. Ayerza, R., Steven Sibbett, G., 2001, Thermal adaptability of olive (*Olea europaea* L.) to the Arid Chaco of Argentina, *Agriculture, ecosystems and environment*, 84 (3), 277-

285.

- [233]. Ayerza, R., Coates, W., 2004, Supplemental pollination - Increasing olive (*Olea europaea*) yields in hot, arid environments, *Experimental agriculture*, 40 (4), 481-491.
- [234]. Bar-Yosef, B., 1999, Advances in Fertigation, *Advances in agronomy*, 65 (C), 1-77.
- [235]. Fernández-Escobar, R., Marin, L., Sánchez-Zamora, M.A., García-Novelo, J.M., Molina-Soria, C., Parra, M.A., 2009, Long-term effects of N fertilization on cropping and growth of olive trees and on N accumulation in soil profile, *European journal of agronomy*, 31 (4), 223-232.
- [236]. Erel, R., Kerem, Z., Ben-Gal, A., Dag, A., Schwartz, A., Zipori, I., Basheer, L., Yermiyahu, U., 2013, Olive (*Olea europaea* L.) tree nitrogen status is a key factor for olive oil quality, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (47), 11261-11272.
- [237]. Boskou, D., 2006, *Olive oil: Chemistry and technology*, 2<sup>ed</sup> ed, Academic press and AOCS press, Champaign, IL, ISBN:9780128043547.
- [238]. Lanza, B., Di Serio, M.G., Russi, F., Iannucci, E., Giansante, L., Di Loreto, G., Di Giacinto, L., 2014, Evaluation of the nutritional value of oven-dried table olives (cv. Majatica) processed by the Ferrandina style, *Rivista italiana delle sostanze grasse*, 91 (2), 117-127.
- [239]. Manoukas, A.G., Mazomenos, B., Patrino, M.A., 1973, Amino acid compositions of three varieties of olive fruit, *Journal of agricultural and food chemistry*, 21 (2), 215-217.
- [240]. Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J., 2008, Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. Bioresour, *Bioresource technology*, 99 (13), 5261-5269.
- [241]. Martín García, A.I., Moumen, A., Yáñez Ruiz, D.R., Molina Alcaide, E., 2003, Chemical composition and nutrients availability for goats and sheep of two-stage olive cake and olive leaves, *Animal feed science and technology*, 107 (1 - 4), 61-74.



- [242]. Boskou, G., 2010, *Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market*, Olives and olive oil in health and disease prevention, In: Preedy, V., Watson, R., Chapter 99, Academic press, Burlington, USA, ISBN: 9780080922201, 925-934.
- [243]. Sakouhi, F., Herchi, W., Sebei, K., Absalon, C., Kallel, H., Boukhchina, S., 2011, Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L., *Scientia horticulturae*, 132, 7-11.
- [244]. Charoenprasert, S., Mitchell, A., 2012, Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*), *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (29), 7081-7095.
- [245]. Sakouhi, F., Harrabi, S., Absalon, C., Sbei, K., Boukhchina, S., Kallel, H., 2008,  $\alpha$ -Tocopherol and fatty acids contents of some Tunisian table olives (*Olea europea* L.): Changes in their composition during ripening and processing, *Food chemistry*, 108 (3), 833-839.
- [246]. Uylaser, V., Utku Çopur, Ö., 2009, Physico-Chemical Properties and Fatty Acid Composition of Gemlik Variety Olives, *Asian journal of chemistry*, 21 (4), 2861-2868.
- [247]. Owen, R.W., Haubner, R., Würtele, G., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H., 2004, Olives and olive oil in cancer prevention, *European journal of cancer prevention*, 13 (4), 319-326.
- [248]. Kastorini, C.M., Milionis, H.J., Goudevenos, J.A., Panagiotakos, D.B., 2010, Mediterranean diet and coronary heart disease: Is obesity a link? - A systematic review, *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 20 (7), 536-551.
- [249]. Uylaşer, V., Yıldız, G., 2013, Fatty acid profile and mineral content of commercial table olives from Turkey, *Notulae botanicae horti agrobotanici cluj- napoca*, 41 (2), 518-523.

- [250]. García, P., Romero, C., Brenes, M., Garrido, A., 2002, Validation of a method for the analysis of iron and manganese in table olives by flame atomic absorption spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (13), 3654-3659.
- [251]. Soares, M.E., Pereira, J.A., Bastos, M.L., 2006, Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (11), 3923-3928.
- [252]. López, A., García, P., Garrido, A., 2008, Multivariate characterization of table olives according to their mineral nutrient composition, *Food chemistry*, 106 (1), 369-378.
- [253]. Fernandez-Hernandez, A., Mateos, R., Garcia-Mesa, J.A., Beltran, G., Fernandez-Escobar, R., 2010, Determination of mineral elements in fresh olive fruits by flame atomic spectrometry, *Spanish journal of agricultural research*, 8 (4), 1183-1190.
- [254]. Yasemin Sahan, 2010, *Some Metals in Table Olives*, Olives and olive oil in health and disease prevention, In: Preedy, V., Watson, R., Chapter 32, Academic press, Burlington, USA, ISBN: 9780080922201, 299-306.
- [255]. Nergiz, C., Engez, Y., 2000, Compositional variation of olive fruit during ripening, *Food chemistry*, 69 (1), 55-59.
- [256]. Şahan, Y., Basoglu, F., Gücer, S., 2007, ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey, *Food chemistry*, 105 (1), 395-399.
- [257]. IOC, 2017, *World Olive Oil Figures*, <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>, [Ziyaret tarihi: 25 Ağustos 2018].
- [258]. Aydin, C., Özcan, M.M., Gümüş, T., 2009, Nutritional and technological characteristics of olive (*Olea europea* L.) fruit and oil: Two varieties growing in two different locations of Turkey, *International journal of food sciences and nutrition*, 60 (5),

365-373.

- [259]. Boskou, D., 2006, *Olive oil: Chemistry and technology*, 2<sup>ed</sup> ed, Academic press and AOCS press, Champaign, IL, ISBN:9780128043547.
- [260]. Kiritsakis, A., Markakis, P., 1988, Olive Oil: A Review, *Advances in food research*, 31 (C), 453-482.
- [261]. Arslan, D., 2012, Physico-chemical characteristics of olive fruits of Turkish varieties from the province of Hatay, *Grasas y Aceites*, 63 (2), 158-166.
- [262]. Dabbou, S., Sifi, S., Rjiba, I., Esposto, S., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G.F., Hammami, M., 2010, Effect of Pedoclimatic Conditions on the Chemical Composition of the Sigoise Olive Cultivar, *Chemistry and biodiversity*, 7 (4), 898-908.
- [263]. Tanilgan, K., Özcan, M.M., Ünver, A., 2007, Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils, *Grasas y aceites*, 58 (2), 124-147.
- [264]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=8HAAXKeCFoWsrqSv0aboDw&q=3d+olive+fruit&oq=3d+olive+fruit&gs\\_l=img.3...14531.24971..26680...0.0..0.276.2901.0j6j8.....0....1..gws-wiz-img.....0..0j0i67j0i19j0i8i30j0i30j0i5i30.aybLNyhIkoc#imgrc=sS5CZSXE\\_eoqZM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=8HAAXKeCFoWsrqSv0aboDw&q=3d+olive+fruit&oq=3d+olive+fruit&gs_l=img.3...14531.24971..26680...0.0..0.276.2901.0j6j8.....0....1..gws-wiz-img.....0..0j0i67j0i19j0i8i30j0i30j0i5i30.aybLNyhIkoc#imgrc=sS5CZSXE_eoqZM:)  
[Ziyaret tarihi: 4 Eylül 2018].
- [265]. Uygur, Z., 2010, *Zeytin ağacı ve zeytin*, <http://www.yaklasansaat.com/dunyamiz/canlilar/zeytin.asp>, [Ziyaret tarihi: 4 Eylül 2018].
- [266]. Boskou, D., 2008, *Olive Oil: Minor Constituents and Health*, 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, New York, USA, ISBN:9781420059946.
- [267]. Rigane, G., Boukhris, M., Bouaaziz, M., Sayadi, S., Salem, R. Ben, 2013, Analytical evaluation of two monovarietal virgin olive oils cultivated in the south of Tunisia: Jemri-Bouchouka and Chemlali-Tataouin cultivars, *Journal of the science of food and*

*agriculture*, 93 (5), 1242-1248.

- [268]. Diraman, H., Dibeklioglu, H., 2014, Using lipid profiles for the characterization of turkish monocultivar olive oils produced by different systems, *International journal of food properties*, 17 (5), 1013-1033.
- [269]. Kiralan, M., Bayrak, A., 2013, Oxidative and antiradical stabilities of two important virgin olive oils from Ayvalik and Memecik Olive cultivars in Turkey, *International journal of food properties*, 16 (3), 649-657.
- [270]. Loizzo, M.R., Di Lecce, G., Boselli, E., Menichini, F., Frega, N.G., 2012, Radical scavenging, total antioxidant capacity, and antiproliferative activity of phenolic extracts from extra virgin olive oil by Cultivar “Frantoio.”, *International journal of food properties*, 15 (6), 1345-1357.
- [271]. Servili, M., Montedoro, G.F., 2002, Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *European journal of lipid science and technology*, 104 (9-10), 602-613.
- [272]. Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J.J., Gómez-Rey, M.L., 2003, Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (20), 6021-6025.
- [273]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=EIgAXOaxI8fXsAHX4ozQCQ&q=olive+oil+vector&oq=olive+oil+vector&gs\\_l=img.3..0j0i7i30l2.51310.52615..53344...0.0..0.184.1122.0j7.....0....1..gws-wiz-img.vw1swJ09Oso#imgrc=\\_3seIVPHoekSdM](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=EIgAXOaxI8fXsAHX4ozQCQ&q=olive+oil+vector&oq=olive+oil+vector&gs_l=img.3..0j0i7i30l2.51310.52615..53344...0.0..0.184.1122.0j7.....0....1..gws-wiz-img.vw1swJ09Oso#imgrc=_3seIVPHoekSdM;); [Ziyaret tarihi: 13 Eylül 2018].
- [274]. Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E., 1998, Phenolic compounds in different olive varieties, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (1), 32-35.
- [275]. Aparicio, R., Morales, M.T., 1998, Characterization of Olive Ripeness by Green Aroma Compounds of Virgin Olive Oil, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46

(3), 1116-1122.

- [276]. Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S., 2002, Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L., *Scientia horticulturae*, 92 (2), 147-176.
- [277]. Caponio, F., Pasqualone, A., Gomes, T., Caponio, F., Gomes, T., Pasqualone, A., 2001, Phenolic compounds in virgin olive oils: Influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and shelf-life, *European food research and technology*, 212, 329-333.
- [278]. Škevin, D., Rade, D., Štrucelj, D., Mokrovčak, Ž., Nederal, S., Benčić, D., 2003, The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil, *European food research and technology*, 105 (9), 536-541.
- [279]. Bouaziz, M., Chamkha, M., Sayadi, S., 2004, Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (17), 5476-5481.
- [280]. Morelló, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J., 2004, Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (19), 6002-6009.
- [281]. Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G., 2004, Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality, *Journal of chromatography A*, 1054 (1-2), 17-31.
- [282]. García, A., Brenes, M., Martínez, F., Alba, J., García, P., Garrido, A., 2001, High - performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale, *Journal of the american oil chemist's society*, 78 (6), 625-629.
- [283]. Beltrán, G., Del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L., 2004, Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process., *Journal of the science*

*of food and agriculture*, 84 (13), 1783-1790.

- [284]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=NBkNXPiVLlaxswH27pngDQ&q=olive+oil+processing+flow+chart+vectorstock&oq=olive+oil+processing+flow+chart+vectorstock&gs\\_l=img.3...661610.691961..692546...8.0..0.250.6517.0j50j2.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i67j0i30j0i5i30j0i24j0i8i30j0i19j0i8i30i19.0qi9kMVb6oM#imgrc=,](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=NBkNXPiVLlaxswH27pngDQ&q=olive+oil+processing+flow+chart+vectorstock&oq=olive+oil+processing+flow+chart+vectorstock&gs_l=img.3...661610.691961..692546...8.0..0.250.6517.0j50j2.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i67j0i30j0i5i30j0i24j0i8i30j0i19j0i8i30i19.0qi9kMVb6oM#imgrc=,) [Ziyaret tarihi: 15 Eylül 2018].
- [285]. Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., Boskou, D.G., 2002, Biophenols in table olives, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (13), 3688-3692.
- [286]. Tsantili, E., Kafkaletou, M., Roussos, P.A., Christopoulos, M. V., 2012, Phenolic compounds, maturation and quality in fresh green olives for table use during exposure at 20°C after preharvest ReTain treatment, *Scientia horticulturae*, 140, 26-32.
- [287]. Ranalli, A., Gomes, T., Delcuratolo, D., Contento, S., Lucera, L., 2003, Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (9), 2597-2602.
- [288]. Vossen, P., 1998, *Variety and maturity the two largest influences on olive oil quality*, Project report, University of California, Davis, [www.creta.cn/info/v\\_m.pdf](http://www.creta.cn/info/v_m.pdf), [Ziyaret tarihi: 17 Eylül 2018].
- [289]. Dag, A., Harlev, G., Lavee, S., Zipori, I., Kerem, Z., 2014, Optimizing olive harvest time under hot climatic conditions of Jordan Valley, Israel, *European journal of lipid science and technology*, 116 (2), 169-176.
- [290]. Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M.B., Seabra, R.M., Andrade, P.B., 2005, Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin, *Food chemistry*, 89 (4), 561-568.

- [291]. Bodoira, R., Torres, M., Pierantozzi, P., Taticchi, A., Servili, M., Maestri, D., 2015, Oil biogenesis and antioxidant compounds from “Arauco” olive (*Olea europaea* L.) cultivar during fruit development and ripening, *European journal of lipid science and technology*, 117 (3), 377-388.
- [292]. Anastasopoulos, E., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A.C., Kountouri, A., Andrikopoulos, N.K., 2011, The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method, *International journal of food science and technology*, 46 (1), 170-178.
- [293]. Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., De la Torre, M.C., López-Sabater, M.C., 2002, The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil, *Food chemistry*, 78 (2), 207-211.
- [294]. Metzidakis, I., Martinez-Vilela, A., Castro Nieto, G., Basso, B., 2008, Intensive olive orchards on sloping land: Good water and pest management are essential, *Journal of environmental management*, 89 (2), 120-128.
- [295]. Benito, M., Lasa, J.M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L., Sánchez-Gimeno, A.C., 2013, Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard, *Journal of the science of food and agriculture*, 93 (9), 2207-2220.
- [296]. Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K., 2007, Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review, *Food chemistry*, 100 (1), 273-286.
- [297]. Angeros, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R., 2001, Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils, *Food chemistry*, 72 (1), 19-28.
- [298]. Kiritsakis, A., Markakis, P., 1984, Effect of olive collection regime on olive oil quality, *Journal of the science of food and agriculture*, 35 (6), 677-678.

- [299]. Kapatos, E., Fletcher, B.S., 1983, Seasonal changes in the efficiency of mcphail traps and a model for estimating olive fly densities from trap catches using temperature data, *Entomologia experimentalis et applicata*, 33 (1), 20-26.
- [300]. Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., López, M.M., 2000, Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR, *Applied and environmental microbiology*, 66 (6), 2673-2677.
- [301]. Di, D., Delle, S., Vegetali, P., Suolo, D., Dell', E., Agroforestale, A., Ferguson, L., Rosa, U.A., Castro-Garcia, S., Lee, S.M., Guinard, J.X., Burns, J., Krueger, W.H., O'connell, N. V, Glozer, K., Dell'ambiente, E., 2010, Mechanical harvesting of California table and oil olives, *Advances in horticultural science*, 24 (1), 53-63.
- [302]. Gutierrez, F., Perdiguero, S., García, J.M., Castellano, J.M., 1992, Quality of oils from olives stored under controlled atmosphere, *Journal of the american oil chemists society*, 69 (12), 1215-1218.
- [303]. Vichi, S., Romero, A., Gallardo-Chacón, J., Tous, J., López-Tamames, E., Buxaderas, S., 2009, Volatile phenols in virgin olive oils: Influence of olive variety on their formation during fruits storage, *Food chemistry*, 116 (3), 651-656.
- [304]. Kader, A.A., Nanos, G.D., Kerbel, E.L., 1990, Storage potential of fresh "Manzanillo" olives, *California agriculture*, 44 (3), 23-24.
- [305]. Agar, I.T., Hess-Pierce, B., Sourour, M.M., Kader, A.A., 1998, Quality of fruit and oil of black-ripe olives is influenced by cultivar and storage period, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (9), 3415-3421.
- [306]. García, J.M., Gutiérrez, F, Castellano, J.M., Perdiguero, S., Morilla, A., Albi, M.A., 1996, Influence of Storage Temperature on Fruit Ripening and Olive Oil Quality, *Journal of agricultural and food chemistry*, 44 (1), 264-267.
- [307]. Sánchez, A.H., Romero, C., Ramírez, E., Brenes, M., 2013, Storage of mechanically



harvested Manzanilla olives under controlled atmospheres, *Postharvest biology and technology*, 81, 60-65.

- [308]. Rallo, L., Barranco, D., Castro-García, S., Connor, D.J., del Campo, M.G., Rallo, P., 2013, High-density olive plantations, *Horticultural reviews*, 41, 303-383.
- [309]. Yousfi, K., Weiland, C.M., García, J.M., 2012, Effect of harvesting system and fruit cold storage on virgin olive oil chemical composition and quality of superintensive cultivated arbequina olives, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (18), 4743-4750.
- [310]. A. Kiritsakis, G. D. Nanos, Z. Polymenopoulos, T. Thomai, E. M. Sfakiotakis, 1998, Effect of fruit storage conditions on olive oil quality, *Journal of the american oil chemist's society*, 75 (6), 721-724.
- [311]. Clodoveo, M.L., 2012, Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview, *Trends in food science and technology*, 25 (1), 13-23.
- [312]. Moya, M., Espínola, F., Fernández, D.G., Torres, A. de, Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T., Castro, E., 2010, Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction, *Journal of food engineering*, 97 (1), 57-63.
- [313]. Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., 2014, Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils, *Food chemistry*, 158, 534-545.
- [314]. Salas, J.J., Sánchez, J., 1999, The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (3), 809-812.
- [315]. Servili, M., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Taticchi, A., Di Maio, I., Selvaggini, R., Sordini, B., Montedoro, G., 2011, Improvement of bioactive phenol content in virgin olive oil with an olive-vegetation water concentrate produced by membrane treatment, *Food chemistry*, 124, 1308-1315.

- [316]. Stefanoudaki, E., Koutsaftakis, A., Harwood, J.L., 2011, Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil, *Food chemistry*, 127 (4), 1481-1486.
- [317]. Clodoveo, M.L., Durante, V., La Notte, D., 2013, Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil, *Ultrasonics sonochemistry*, 20 (5), 1261-1270.
- [318]. Rodis, P.S., Karathanos, V.T., Mantzavinou, A., 2002, Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (3), 596-601.
- [319]. Altieri, G., Genovese, F., Tauriello, A., Di Renzo, G.C., 2015, Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale, *Journal of food engineering*, 166, 325-334
- [320]. Apetrei, C., Apetrei, I.M., Villanueva, S., de Saja, J.A., Gutierrez-Rosales, F., Rodriguez-Mendez, M.L., 2010, Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness, *Analytica chimica acta*, 663 (1), 91-97.
- [321]. Di Giovacchino, L., Solinas, M., Miccoli, M., 1994, Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil, *Journal of the american oil chemist's society*, 71 (11), 1189-1194.
- [322]. Altieri, G., Di Renzo, G.C., Genovese, F., 2013, Horizontal centrifuge with screw conveyor (decanter): Optimization of oil/water levels and differential speed during olive oil extraction, *Journal of food engineering*, 119 (3), 561-572.
- [323]. Ranalli, A., Angerosa, F., 1996, Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products, *Journal of the american oil chemist's society*, 73 (4), 417-422.
- [324]. Kalogeropoulos, N., Kaliora, A.C., Artemiou, A., Giogios, I., 2014, Composition,

volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters, *LWT - Food science and technology*, 58 (1), 272-279.

- [325]. Ben-Hassine, K., Taamalli, A., Ferchichi, S., Mlaouah, A., Benincasa, C., Romano, E., Flamini, G., Lazzez, A., Grati-kamoun, N., Perri, E., Malouche, D., Hammami, M., 2013, Physicochemical and sensory characteristics of virgin olive oils in relation to cultivar, extraction system and storage conditions, *Food research international*, 54 (2), 1915-1925.
- [326]. Capriotti, A.L., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R., Laganà, A., 2014, Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry, *Food chemistry*, 158, 392-400.
- [327]. Aparicio, P.R., Navarro, M.S., Ferreiro, M.S., 1991, Definite influence of the extraction methods on the chemical composition of virgin olive oil, *Grasas y aceites*, 42 (5), 356-362.
- [328]. Nergiz, C., Ünal, K., 1991, Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil, *Journal of the science of food and agriculture*, 56 (1), 79-84.
- [329]. Vekiari, S. a., Papadopoulou, P., Kiritsakis, a., 2007, Effects of processing methods and commercial storage conditions on the extra virgin olive oil quality indexes, *Grasas y aceites*, 58 (3), 237-242.
- [330]. M. Petruccioli, M. Servili, F. Montedoro, F. Federici, 1988, Development of recycle procedure for the utilization of vegetation waters in the olive oil extraction process, *Biotechnology letters*, 10 (1), 55-60.
- [331]. Vlyssides, A.G., Loizides, M., Karlis, P.K., 2004, Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products, *Journal of cleaner production*, 12 (6), 603-611.
- [332]. Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero, M.A., 2006, An overview on olive mill

wastes and their valorisation methods, *Waste management*, 26 (9), 960-969.

- [333]. Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J.L., Fernández-Bolaños, J., 2009, Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol, *LWT - Food science and technology*, 42 (2), 483-490.
- [334]. Kiritsakis, K., Kontominas, M.G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., Kiritsakis, A., 2010, Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars, *Journal of the american oil chemist's society*, 87 (4), 369-376.
- [335]. Rincón, B., Bujalance, L., Feroso, F.G., Martín, A., Borja, R., 2013, Biochemical methane potential of two-phase olive mill solid waste: Influence of thermal pretreatment on the process kinetics, *Bioresource technology*, 140, 249-255.
- [336]. Casanovas, A., Galvis, A., Llorca, J., 2015, Catalytic steam reforming of olive mill wastewater for hydrogen production, *International journal of hydrogen energy*, 40 (24), 7539-7545.
- [337]. González-González, A., Cuadros, F., 2015, Effect of aerobic pretreatment on anaerobic digestion of olive mill wastewater (OMWW): An ecoefficient treatment, *Food and bioproducts processing*, 95, 339-345.
- [338]. Goula, A.M., Lazarides, H.N., 2015, Integrated processes can turn industrial food waste into valuable food by-products and/or ingredients: The cases of olive mill and pomegranate wastes, *Journal of food engineering*, 167, 45-50.
- [339]. Guzman, J. F.-B., Moreno, A., Gutierrez, G., Arcos, R., Araujo, A., Bejarano, R., 2002, *Method for obtaining purified hydroxytyrosol from products and by-products derived from the olive tree*, <https://patentimages.storage.googleapis.com/48/5a/5e/fd30d1e295f4f6/US20040102657A1.pdf>, [Ziyaret tarihi: 17 Haziran 2018].
- [340]. Proietti, P., Federici, E., Fidati, L., Scargetta, S., Massaccesi, L., Nasini, L., Regni, L.,

- Ricci, A., Cenci, G., Gigliotti, G., 2015, Effects of amendment with oil mill waste and its derived-compost on soil chemical and microbiological characteristics and olive (*Olea europaea* L.) productivity, *Agriculture, ecosystems & environment*, 207, 51-60.
- [341]. Oreopoulou, V., Russ, W., 2007, *Utilization of by-products and treatment of waste in the food industry*, 1<sup>st</sup> ed, Springer, New York, USA, SBN:978-0387-33511-7.
- [342]. Sheabar, F.Z., Neeman, I., 1988, Separation and concentration of natural antioxidants from the rape of olives, *Journal of the american oil chemist's society*, 65 (6), 990-993.
- [343]. Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Carrasco-Pancorbo, A., Fernández-Gutiérrez Alberto, A., 2010, Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 53 (5), 1130-1160.
- [344]. Dashti, N., Ali, N., Khanafer, M., Al-Awadhi, H., Sorkhoh, N., Radwan, S., 2015, Olive-pomace harbors bacteria with the potential for hydrocarbon-biodegradation, nitrogen-fixation and mercury-resistance: Promising material for waste-oil-bioremediation, *Journal of environmental management*, 155, 49-57.
- [345]. Painsi, M., Aliakbarian, B., Casazza, A.A., Perego, P., Ruggiero, C., Pastorino, L., 2015, Chitosan/dextran multilayer microcapsules for polyphenol co-delivery, *Materials science and engineering C*, 46, 374-380.
- [346]. Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Macià, A., Motilva, M.J., 2009, Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (4), 1463-1472.
- [347]. Niaounakis, M., Halvadakis, C.P., 2006, *Olive processing waste management*, 2<sup>ed</sup> ed, Elsevier Ltd, Italy, ISBN: 78-0-08-044851-0.
- [348]. Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013, Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies, *Process biochemistry*, 48 (10), 1532-1552.

- [349]. Arjona, R., Ollero, P., Vidal, F.B., 2005, Automation of an olive waste industrial rotary dryer, *Journal of food engineering*, 68 (2),239-247.
- [350]. Torrecilla, J.S., Aragón, J.M., Palancar, M.C., 2006, Improvement of fluidized-bed dryers for drying solid waste (olive pomace) in olive oil mills, *European journal of lipid science and technology*, 108 (11), 913-924.
- [351]. Milczarek, R.R., Dai, A.A., Otoni, C.G., McHugh, T.H., 2011, Effect of shrinkage on isothermal drying behavior of 2-phase olive mill waste, *Journal of food engineering*, 103 (4), 434-441.
- [352]. Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J., 2004, Agrochemical characterisation of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresource technology*, 91 (2), 195-200.
- [353]. Heredia-Moreno, A., Guillén-Bejarano, R., Fernández-Bolaños, J., Rivas-Moreno, M., 1987, Olive stones as a source of fermentable sugars enzymatic hydrolysis, *Biomass*, 14 (2), 143-148.
- [354]. Liébanes, M.D., Aragón, J.M., Palancar, M.C., Arévalo, G., Jiménez, D., 2006, Fluidized bed drying of 2-phase olive oil mill by-products, *Drying technology*, 24 (12), 1609-1618.
- [355]. Paraskeva, C.A., Papadakis, V.G., Tsarouchi, E., Kanellopoulou, D.G., Koutsoukos, P.G., 2007, Membrane processing for olive mill wastewater fractionation, *Desalination*, 213 (1-3), 218-229.
- [356]. Sierra, J., Martí, E., Montserrat, G., Cruaáas, R., Garau, M.A., 2001, Characterisation and evolution of a soil affected by olive oil mill wastewater disposal, *Science of the total environment*, 279 (1-3), 207-214.
- [357]. Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S., 2005, The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the

stabilization of refined oils: A potential alternative to synthetic antioxidants, *Food chemistry*, 93 (2), 197-204.

- [358]. Di Giovacchino, L., Costantini, N., Serraiocco, A., Surricchio, G., Basti, C., 2001, Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oils obtained by two or three-phases centrifugal decanters, *European journal of lipid science and technology*, 103 (5), 279-285.
- [359]. Azbar, N., Bayram, A., Filibeli, A., Muezzinoglu, A., Sengul, F., Ozer, A., 2004, A review of waste management options in olive oil production, *Critical reviews in Environmental science and technology*, 34 (3), 209-247.
- [360]. Hamdi, M., Garcia, J.L., 1991, Comparison between anaerobic filter and anaerobic contact process for fermented olive mill wastewaters, *Bioresource technology*, 38 (1), 23-29.
- [361]. Russo, C., 2007, A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW), *Journal of membrane science*, 288 (1-2), 239-246.
- [362]. El-Abbassi, A., Kiai, H., Hafidi, A., García-Payo, M.C., Khayet, M., 2012, Treatment of olive mill wastewater by membrane distillation using polytetrafluoroethylene membranes, *Separation and purification technology*, 98, 55-61.
- [363]. Obied, H.K., Prenzler, P.D., Robards, K., 2008, Potent antioxidant biophenols from olive mill waste, *Food chemistry*, 11 (1), 171-178.
- [364]. Ryan, D., Prenzler, P.D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K., 2003, Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (9), 2532-2538.
- [365]. Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Brenes, M., Guillén, R., Heredia, A., 1998, Hydroxytyrosol and tyrosol as the main compounds found in the phenolic fraction of

steam-exploded olive stones, *Journal of the american oil chemist's society*, 75 (11), 1643-1649.

- [366]. Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J.-C., Lorquin, J., Delattre, M., Simon, J.-L., Asther, M., Labat, M., 2001, Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems, *Food chemistry*, 75 (4), 501-507.
- [367]. Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 2002, Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo", *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (23), 6804-6811.
- [368]. Goula, A.M., Adamopoulos, K.G., 2013, A method for preparing a novel solid product from olive mill wastewater: Wastewater characterization and product recovery, *Drying technology*, 31 (3), 339-349.
- [369]. Al-Muhtaseb, A.H., McMinn, W.A.M., Magee, T.R.A., 2004, Water sorption isotherms of starch powders - Part 1: Mathematical description of experimental data, *Journal of food engineering*, 61 (3), 297-307.
- [370]. Farag, R.S., El-Baroty, G.S., Basuny, A.M., 2003, The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil, *International journal of food science and technology*, 38 (1), 81-87.
- [371]. Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., Hammami, M., 2013, Variations in phenolic compounds and antiradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons, *Industrial crops and products*, 49, 256-264.
- [372]. Rahmanian, N., Jafari, S.M., Wani, T.A., 2015, Bioactive profile, dehydration, extraction and application of the bioactive components of olive leaves, *Trends in food science & technology*, 42 (2), 150-172.
- [373]. Salido, S., Pérez-Bonilla, M., Adams, R.P., Altarejos, J., 2015, Phenolic components and antioxidant activity of wood extracts from 10 main Spanish olive cultivars, *Journal*



*of agricultural and food chemistry*, 63 (29), 6493-6500.

- [374]. Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2015, Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits, *Food research international*, 77, 92-108.
- [375]. Elhussein, E.A.A., Şahin, S., 2018, Drying behaviour, effective diffusivity and energy of activation of olive leaves dried by microwave, vacuum and oven drying methods, *Heat and mass transfer*, 54 (7), 1901-1911.
- [376]. Selin, Ş., Elhussein, E., Bilgin, M., Lorenzo, J.M., Barba, F.J., Roohinejad, S., 2018, Effect of drying method on oleuropein , total phenolic content , flavonoid content , and antioxidant activity of olive ( *Olea europaea* ) leaf, *Journal of food processing and preservation*, 42 (2), 1-10.
- [377]. İlbay, Z., Şahin, S., Büyükkabasakal, K., 2014, A novel approach for olive leaf extraction through ultrasound technology: Response surface methodology versus artificial neural networks, *Korean journal of chemical engineering*, 31 (9), 1661-1667.
- [378]. Bilgin, M., Şahin, S., 2013, Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves, *Journal of the taiwan institute of chemical engineers*, 44 (1), 8-12.
- [379]. Şahin, S., Sayım, E., Bilgin, M., 2017, Effect of olive leaf extract rich in oleuropein on the quality of virgin olive oil, *Journal of food science and technology*, 54 (6), 1721-1728.
- [380]. Selin, Ş., Bilgin, M., Dramur, M.U., 2011, Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods, *Separation science and technology*, 46 (11), 1829-1837.
- [381]. Şahin, S., Bilgin, M., 2017, Selective adsorption of oleuropein from olive ( *Olea europaea* ) leaf extract by using macroporous resin, *Chemical engineering communications*, 204 (12), 1391-1400.

- [382]. Şahin, S., Samli, R., Seher Birteksöz Tan, A., J. Barba, F., Farid, C., Giancarlo, C., M. Lorenzo, J., 2017, Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves : Antioxidant and Antimicrobial Properties, *Molecules*, 22 (7), 1056-1069.
- [383]. Selin, Ş., Bilgin, M., 2012, Study on oleuropein extraction from olive tree ( *Olea europaea*) leaves by means of SFE : Comparison of water and ethanol as co-solvent, *Separation science and technology*, 47, 2391-2398.
- [384]. Şahin, S., İlbaý, Z., Kırbaşlar, Ş.İ., 2014, Study on optimum extraction conditions for olive leaf extracts rich in polyphenol and flavonoid, *Separation science and technology*, 50 (8), 1181-1189.
- [385]. Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N., 2009, Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, *Industrial crops and products*, 29 (2), 412-419.
- [386]. Erbay, Z., Icier, F., 2009, Optimization of drying of olive leaves in a pilot-scale heat pump dryer, *Drying technology*, 27 (3), 416-427.
- [387]. Erbay, Z., Icier, F., 2009, Optimization of hot air drying of olive leaves using response surface methodology, *Journal of food engineering*, 91 (4), 533-541.
- [388]. Cárcel, J.A., Nogueira, R.I., García-Pérez, J.V., Sanjuán, N., Riera, E., 2010, Ultrasound effects on the mass transfer processes during drying kinetic of olive leaves (*Olea Europea*, var. Serrana), *Defect and diffusion forum*, 297-301, 1083-1090.
- [389]. Bahloul, N., Kouhila, M., Kechaou, N., Boudhrioua, N., 2009, Effect of convective solar drying on colour , total phenols and radical scavenging activity of olive leaves ( *Olea europaea* L.), *International journal of food science and technology*, 44 (12), 2561-2567.
- [390]. Erbay, Z., Icier, F., 2010, Thin-layer drying behaviors of olive leaves ( *Olea europaea* L.), *Journal of food process engineering*, 33 (2), 287-308.

- [391]. Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Perraud-Gaime, I., Hamdi, M., 2012, Discrimination of five Tunisian cultivars by Mid InfraRed spectroscopy combined with chemometric analyses of olive *Olea europaea* leaves, *Food chemistry*, 131 (1), 360-366.
- [392]. Ahmad-Qasem, M.H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Mulet, A., Garcia-Perez, J.V., 2013, Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential, *Food research international*, 50 (1), 189-196.
- [393]. Altioek, E., Bayçin, D., Bayraktar, O., Ülkü, S., 2008, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin, *Separation and purification technology*, 62 (2), 342-348.
- [394]. Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Perraud Gaime, I., Hamdi, M., 2012, Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses, *Industrial crops and products*, 37 (1), 292-297.
- [395]. Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2014, Determination of phenolic compounds of “Sikitita” olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents “Arbequina” and “Picual” olive leaves, *LWT - Food science and technology*, 58 (1), 28-34.
- [396]. Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2015, Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits, *Food research international*, 77 (Part 2), 92-108.
- [397]. Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M., Luque De Castro, M.D., 2006, Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385 (4), 753-759.
- [398]. Şahin, S., Şamlı, R., 2013, Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology, *Ultrasonics sonochemistry*, 20

(1), 595-602.

- [399]. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajon-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibañez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2012, Use of advanced techniques for the extraction of phenolic compounds from Tunisian olive leaves: Phenolic composition and cytotoxicity against human breast cancer cells, *Food and chemical toxicology*, 50 (6), 1817-1825.
- [400]. Xynos, N., Papaefstathiou, G., Psychis, M., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L., 2012, Development of a green extraction procedure with super/subcritical fluids to produce extracts enriched in oleuropein from olive leaves, *Journal of supercritical fluids*, 67, 89-93.
- [401]. Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L., 2014, Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology, *Separation and purification technology*, 122, 323-330.
- [402]. Quirantes-Piné, R., Lozano-Sánchez, J., Herrero, M., Ibañez, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2013, HPLC-ESI-QTOF-MS as a powerful analytical tool for characterising phenolic compounds in olive-leaf extracts, *Phytochemical analysis*, 24 (3), 213-223.
- [403]. Japón-Luján, R., 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.
- [404]. Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S., 2008, Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves, *Food chemistry*, 108 (1), 253-262.
- [405]. Meirinhos, J., Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M., Pereira, J.A., Dias, A., Andrade, P.B., Ferreres, F., 2005, Analysis and quantification of flavonoidic compounds

from Portuguese olive (*Olea europaea* L.) leaf cultivars, *Natural product research*, 19 (2), 189-195.

[406]. Herrero, M., Temirzoda, T.N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibañez, E., 2011, New possibilities for the valorization of olive oil by-products, *Journal of chromatography A*, 1218 (2), 7511-7520.

[407]. Kontogianni, V.G., Gerothanassis, I.P., 2012, Phenolic compounds and antioxidant activity of olive leaf extracts, *Natural product research*, 26 (2), 186-189.

[408]. Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J.A., 2000, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food chemistry*, 68 (4), 457-462.

[409]. Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A.R., Simonič, M., Knez, Ž., 2005, Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities, *Food chemistry*, 89 (2), 191-198.

[410]. Barrajión-Catalán, E., Taamalli, A., Quirantes-Piné, R., Roldan-Segura, C., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Micol, V., Zarrouk, M., 2015, Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 105, 156-162.

[411]. Lockyer, S., Corona, G., Yaqoob, P., Spencer, J.P.E., Rowland, I., 2015, Secoiridoids delivered as olive leaf extract induce acute improvements in human vascular function and reduction of an inflammatory cytokine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial, *British journal of nutrition*, 114 (1), 75-83.

[412]. Briante, R., La Cara, F., Febbraio, F., Patumi, M., Nucci, R., 2002, Bioactive derivatives from oleuropein by a biotransformation on *Olea europaea* leaf extracts, *Journal of biotechnology*, 93 (2), 109-119.

[413]. Bouaziz, M., Sayadi, S., 2005, Isolation and evaluation of antioxidants from leaves of

a Tunisian cultivar olive tree, *European journal of lipid science and technology*, 107 (7-8), 497-504.

- [414]. El, S.N., Karakaya, S., 2009, Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health, *Nutrition reviews*, 67 (11), 632-638.
- [415]. Sournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K., Balansard, G., 2001, Rapid high-performance liquid chromatography analysis for the quantitative determination of oleuropein in *Olea europaea* leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (2), 618-621.
- [416]. Benavente-garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortun, A., Rio, J.A. Del, 2000, Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves, *Food chemistry*, 68 (4), 457-462.
- [417]. Farag, R.S., El-Baroty, G.S., Basuny, A.M., 2003, Safety evaluation of olive phenolic compounds as natural antioxidants, *International journal of food sciences and nutrition*, 54 (3), 159-174.
- [418]. Paiva-Martins, F., Correia, R., Félix, S., Ferreira, P., Gordon, M.H., 2007, Effects of enrichment of refined olive oil with phenolic compounds from olive leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (10), 4139-4143.
- [419]. Andrikopoulos, N.K., Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., 2007, Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract, *Food science and technology international*, 13 (6), 413-421.
- [420]. Japón-Luján, R., Luque de Castro, M.D., 2006, Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves, *Journal of chromatography A*, 1108 (1), 76-82.
- [421]. Paiva-Martins, F., Gordon, M.H., 2001, Isolation and characterization of the antioxidant component 3,4-dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexenoate from olive (*Olea europaea*) leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (9),

4214-4219.

- [422]. Paiva-Martins, F., Barbosa, S., Pinheiro, V., Mourão, J.L., Outor-Monteiro, D., 2009, The effect of olive leaves supplementation on the feed digestibility, growth performances of pigs and quality of pork meat, *Meat science*, 82 (4), 438-443.
- [423]. Shuichi, H., 2004, Effect of drying temperature on the oleuropein content of olive (*Olea europea* L.) leaves, *Food preservation science*, 3 (4), 191-193.
- [424]. Nenadis, N., Moutafidou, A., Gerasopoulos, D., Tsimidou, M.Z., 2010, Quality characteristics of olive leaf - olive oil preparation, *European journal of lipid science and technology*, 112 (12), 1337-1344.
- [425]. Di Giovacchino, L., Angerosa, F., Di Giacinto, L., 1996, Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation, *Journal of the american oil chemist's society*, 73 (3), 371-374.
- [426]. Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H., Sayadi, S., 2010, Stability of refined olive oil and olive-pomace oil added by phenolic compounds from olive leaves, *European journal of lipid science and technology*, 112 (8), 894-905.
- [427]. Damechki, M., Sotiropoulou, S., Tsimidou, M., 2001, Antioxidant and pro-oxidant factors in oregano and rosemary gourmet olive oils, *Grasas y aceites*, 52 (3-4), 207-213.
- [428]. [https://www.google.com.tr/search?q=Olive+Leaf+Outperforms+Diabetes+Drug&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjzke3YvZPfAhVBnSwKHQjtB4QQ\\_AUIECgD&biw=1366&bih=657#imgrc=4JOuQeIOd9raBM:](https://www.google.com.tr/search?q=Olive+Leaf+Outperforms+Diabetes+Drug&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjzke3YvZPfAhVBnSwKHQjtB4QQ_AUIECgD&biw=1366&bih=657#imgrc=4JOuQeIOd9raBM:), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [429]. Şahin, S., Elhussein, E.A.A., 2018, Valorization of a biomass: phytochemicals in oilseed by-products, *Phytochemistry reviews*, 17 (4), 567-668.
- [430]. Brahmi, F., Flamini, G., Issaoui, M., Dhibi, M., Dabbou, S., Mastouri, M., Hammami, M., 2012, Chemical composition and biological activities of volatile fractions from three Tunisian cultivars of olive leaves, *Medicinal chemistry research*, 21 (10), 2863-2872.

- [431]. Papoti, V.T., Tsimidou, M.Z., 2009, Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (9), 3470-3477.
- [432]. Le Floch, F., Tena, M.T., Ríos, A., Valcárcel, M., 1998, Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves, *Talanta*, 46 (5), 1123-1130.
- [433]. Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G., 2007, Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade, *Molecules*, 12 (8), 1679-1719.
- [434]. Lee, O.H., Lee, B.Y., 2010, Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresource technology*, 101 (10), 3751-3754.
- [435]. Achat, S., Tomao, V., Madani, K., Chibane, M., Elmaataoui, M., Dangles, O., Chemat, F., 2012, Direct enrichment of olive oil in oleuropein by ultrasound-assisted maceration at laboratory and pilot plant scale, *Ultrasonics sonochemistry*, 19 (4), 777-786.
- [436]. Le Tutour, B., Guedon, D., 1992, Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds, *Phytochemistry*, 31 (4), 1173-1178.
- [437]. Erbay, Z., Icier, F., 2010, The importance and potential uses of olive leaves, *Food reviews international*, 26 (4), 319-334.
- [438]. Bilgin, M., Elhoussein, E.A.A., Özyürek, M., Güçlü, K., Şahin, S., 2018, Optimizing the extraction of polyphenols from *Sideritis montana* L. using response surface methodology, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 158, 137-143.
- [439]. Papoti, V.T., Tsimidou, M.Z., 2009, Impact of sampling parameters on the radical scavenging potential of olive (*Olea europaea* L.) leaves, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (9), 3470-3477.



- [440]. Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., Hammami, M., 2012, The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations, *Industrial crops and products*, 38 (1), 146-152.
- [441]. Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G., 2007, Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade, *Molecules*, 12 (8), 1679-1719.
- [442]. Lee, O.H., Lee, B.Y., 2010, Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract, *Bioresource technology*, 101 (10), 3751-3754.
- [443]. Japón-Luján, R., Ruiz-Jiménez, J., De Castro, M.D.L., 2006, Discrimination and classification of olive tree varieties and cultivation zones by biophenol contents, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (26), 9706-9712.
- [444]. Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O., Ülkü, S., 2008, Isolation of polyphenols from the extracts of olive leaves (*Olea europaea* L.) by adsorption on silk fibroin, *Separation and purification technology*, 62 (2), 342-348.
- [445]. Erbay, Z., Icier, F., 2009, Optimization of drying of olive leaves in a pilot-scale heat pump dryer, *Drying technology*, 27 (3), 416-427.
- [446]. Bahloul, N., Boudhrioua, N., Kouhila, M., Kechaou, N., 2009, Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea* L.), *International journal of food science and technology*, 44 (12), 2561-2567.
- [447]. Boudhrioua, N., Bahloul, N., Ben Slimen, I., Kechaou, N., 2009, Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves, *Industrial crops and products*, 29 (2), 412-419.
- [448]. Erbay, Z., Icier, F., 2009, Optimization of hot air drying of olive leaves using response

surface methodology, *Journal of food engineering*, 91 (4), 533-541.

- [449]. Erbay, Z., Icier, F., F., 2010, Thin-layer drying behaviors of olive leaves ( *Olea europaea* L.), *Journal of food process engineering*, 33 (2), 287-308.
- [450]. Aouidi, F., Dupuy, N., Artaud, J., Roussos, S., Msallem, M., Perraud Gaime, I., Hamdi, M., 2012, Rapid quantitative determination of oleuropein in olive leaves (*Olea europaea*) using mid-infrared spectroscopy combined with chemometric analyses, *Industrial crops and products*, 37 (1), 292-297.
- [451]. Ahmad-qasem, M.H., Barrajon-catalan, E., Micol, V., Cárcel, J.A., Garcia-perez, J. V, 2013, Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace, *Journal of food engineering*, 119 (3), 516-524.
- [452]. Salido, S., Pérez-Bonilla, M., Adams, R.P., Altarejos, J., 2015, Phenolic components and antioxidant activity of wood extracts from 10 main Spanish olive cultivars, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (29), 6493-6500.
- [453]. Şahin, S., Bilgin, M., 2017, Olive tree ( *Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review, *Journal of the science of food and agriculture*, 98 (4), 1271-1279.
- [454]. Şahin, S., Bilgin, M., Sayım, E., Güvenilir, B., 2017, Effects of natural antioxidants in the improvement of corn oil quality: olive leaf vs. lemon balm, *International journal of food science & technology*, 52 (2), 374-380.
- [455]. Elhussein, E.A.A., Şahin, S., 2018, Drying behaviour, effective diffusivity and energy of activation of olive leaves dried by microwave, vacuum and oven drying methods, *Heat and mass transfer*, 54 (7), 1901-1911.
- [456]. Orak, H.H., Isbilir, S.S., Yagar, H., 2012, Determination of antioxidant properties of lyophilized olive leaf water extracts obtained from 21 different cultivars, *Food Science and biotechnology*, 21 (4), 1065-1074.

- [457]. Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food control*, 21 (9), 1199-1218.
- [458]. Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Karakas, R., 2006, Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey, *Annals of microbiology*, 56 (4), 359-362.
- [459]. Lee-Huang, S., Huang, P.L., Zhang, D., Lee, J.W., Bao, J., Sun, Y., Chang, Y.T., Zhang, J., Huang, P.L., 2007, Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Integrase inhibition, *Biochemical and biophysical research communications*, 354 (4), 872-878.
- [460]. Dekanski, D., Selaković, V., Piperski, V., Radulović, Ž., Korenić, A., Radenović, L., 2011, Protective effect of olive leaf extract on hippocampal injury induced by transient global cerebral ischemia and reperfusion in Mongolian gerbils, *Phytomedicine*, 18 (13), 1137-1143.
- [461]. Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S., 2011, Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells, *Food and chemical toxicology*, 49 (1), 179-184.
- [462]. Cumaoglu, A., Rackova, L., Stefek, M., Kartal, M., Maechler, P., Karasu, Ç., 2011, Effects of olive leaf polyphenols against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toxicity in insulin secreting  $\beta$ -cells, *Acta biochimica polonica*, 58 (1), 45-50.
- [463]. Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S.M., Montalcini, T., Pujia, A., Russo, D., 2014, Beneficial effects of the olive oil phenolic components oleuropein and hydroxytyrosol: Focus on protection against cardiovascular and metabolic diseases, *Journal of translational medicine*, 12 (1), 1-9.
- [464]. Wang, L., Geng, C., Jiang, L., Gong, D., Liu, D., Yoshimura, H., Zhong, L., 2008, The anti-atherosclerotic effect of olive leaf extract is related to suppressed inflammatory response in rabbits with experimental atherosclerosis, *European journal of nutrition*, 47

(5), 235-243.

- [465]. Singh, I., Mok, M., Christensen, A.M., Turner, A.H., Hawley, J.A., 2008, The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function, *Nutrition, Metabolism and cardiovascular diseases*, 18 (2), 127-132.
- [466]. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008, Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves, *Chemico-Biological interactions*, 176 (2-3), 88-98.
- [467]. Gutierrez, V.R., De La Puerta, R., Catalá, A., 2001, The effect of tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein on the non-enzymic lipid peroxidation of rat liver microsomes, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 217 (1-2), 35-41.
- [468]. Konozi, E., Abbasi, A., Moazeni, R.S., Parastar, H., Jalali-Heravi, M., 2013, Chemometrics-assisted gas chromatographic-mass spectrometric analysis of volatile components of olive leaf oil, *Journal of the Iranian chemical society*, 10 (1), 169-179.
- [469]. Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., Maiuolo, J., D'Agostino, M., Oliverio, M., Procopio, A., Filetti, S., Russo, D., 2013, Antioxidant and antigrowth action of peracetylated oleuropein in thyroid cancer cells, *Journal of molecular endocrinology*, 51 (1), 181-189.
- [470]. Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D'Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M., Procopio, A., Iannone, M., Rotiroti, D., Russo, D., 2011, Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives, *Food chemistry*, 127 (4), 1609-1614.
- [471]. Grawish, M.E., Zyada, M.M., Zaher, A.R., 2011, Inhibition of 4-NQO-induced F433 rat tongue carcinogenesis by oleuropein-rich extract, *Medical oncology*, 28 (4), 1163-1168.
- [472]. Fabiani, R., Sepporta, M.V., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Crescimanno, M., Morozzi, G., 2012, Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on

different tumour cells: The role of extracellular production of hydrogen peroxide, *European journal of nutrition*, 51 (4), 455-464.

- [473]. Fares, R., Bazzi, S., Baydoun, S.E., Abdel-Massih, R.M., 2011, The Antioxidant and Anti-proliferative Activity of the Lebanese *Olea europaea* Extract, *Plant foods for human nutrition*, 66 (1), 58-63.
- [474]. Tavafi, M., Ahmadvand, H., Toolabi, P., 2012, Inhibitory effect of olive leaf extract on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats, *Iranian journal of kidney diseases*, 6 (1), 25-32.
- [475]. Abdel-Hamid, N.M., El-Moselhy, M.A., El-Baz, A., 2011, Hepatocyte lysosomal membrane stabilization by olive leaves against chemically induced hepatocellular neoplasia in rats, *International journal of hepatology*, 2011, 1-6.
- [476]. Sumiyoshi, M., Kimura, Y., 2010, Effects of olive leaf extract and its main component oleuropein on acute ultraviolet B irradiation-induced skin changes in C57BL/6J mice, *Phytotherapy research*, 24(7), 995-1003.
- [477]. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Zarrouk, M., Valverde, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2012, The Occurrence and Bioactivity of Polyphenols in Tunisian Olive Products and by-Products: A Review, *Journal of food science*, 77 (4), R83-R92.
- [478]. Taamalli, A., Arráez-Román, D., Ibañez, E., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2012, Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS2, *Journal of agricultural and food chemistry*, 60 (3), 791-798.
- [479]. Casaburi, I., Puoci, F., Chimento, A., Sirianni, R., Ruggiero, C., Avena, P., Pezzi, V., 2013, Potential of olive oil phenols as chemopreventive and therapeutic agents against cancer: A review of in vitro studies, *Molecular nutrition and food research*, 57 (1), 71-83.

- [480]. Wani, T.A., Shah, A.G., Wani, S.M., Wani, I.A., Masoodi, F.A., Nissar, N., Shagoo, M.A., 2015, Suitability of different food grade materials for the encapsulation of some functional foods well reported for their advantages and susceptibility, *Critical reviews in food science and nutrition*, 56 (15), 2431-2454.
- [481]. Ayala-Zavala, J.F., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodriguez, J.A., Siddiqui, M.W., Dávila-Aviña, J.E., González-Aguilar, G.A., 2011, Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives, *Food research international*, 44 (7), 1866-1874.
- [482]. Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., 2002, Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease, *Circulation*, 106 (21), 2747-2757.
- [483]. Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., Bogiatzis, F., 2011, Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves, *Food chemistry*, 127 (4), 1521-1525.
- [484]. Kranz, P., Braun, N., Schulze, N., Kunz, B., 2010, Sensory quality of functional beverages: Bitterness perception and bitter masking of olive leaf extract fortified fruit smoothies, *Journal of food science*, 75 (6), 308-311.
- [485]. <http://www.sabor-artesano.com/gb/olive-tree-characteristics.htm>, [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [486]. [https://www.google.com.tr/search?q=olive+leaves&tbm=isch&tbs=rimg:CZG9G2HRI MfGIjghEA1xO4awyrrwvcJtmmXb6wCCMjZm-LGo73pVwUOyynFJjQbLiRi-IDM4bE6XIKusmQQzh8A3LoCoSCSEQDXE7hrDKEYPCJJAotNOOKhIJvC9wm2aZdvoRyQOSE8WHD0qEgnAIlyNmb4sahG5UTzvCCBA7SoSCTvelXBQ7LKcEYVVk7AgQ52HKhIJUmNBsuJGL6URkOXkICuHUPwqEgkMzhsTpcgq6xFPe59PrRcyISoSCS ZBDOHwDcugESJ1SvbgOHyv&tbo=u&sa=X&ved=2ahUKEwiPmorX-ZPfAhUCM-wKHabHDt8Q9C96BAgBEBg&biw=1366&bih=608&dpr=1#imgrc=tN0Sk0r\\_SZikKM](https://www.google.com.tr/search?q=olive+leaves&tbm=isch&tbs=rimg:CZG9G2HRI MfGIjghEA1xO4awyrrwvcJtmmXb6wCCMjZm-LGo73pVwUOyynFJjQbLiRi-IDM4bE6XIKusmQQzh8A3LoCoSCSEQDXE7hrDKEYPCJJAotNOOKhIJvC9wm2aZdvoRyQOSE8WHD0qEgnAIlyNmb4sahG5UTzvCCBA7SoSCTvelXBQ7LKcEYVVk7AgQ52HKhIJUmNBsuJGL6URkOXkICuHUPwqEgkMzhsTpcgq6xFPe59PrRcyISoSCS ZBDOHwDcugESJ1SvbgOHyv&tbo=u&sa=X&ved=2ahUKEwiPmorX-ZPfAhUCM-wKHabHDt8Q9C96BAgBEBg&biw=1366&bih=608&dpr=1#imgrc=tN0Sk0r_SZikKM), [Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [487]. Akbaş, Ü.G., Uslu, N., Juhaimi, F. Al, Özcan, M.M., Ghafoor, K., Babiker, E.E.,

- Jamiu, F.G., Hussain, S., 2018, The effect of drying on phenolic compound, antioxidant activity, and mineral contents of leaves of different olive varieties, *Journal of food processing and preservation*, 42 (5), 1-11.
- [488]. Soler-Rivas, C., Espiñ, J.C., Wichers, H.J., 2000, Oleuropein and related compounds, *Journal of the science of food and agriculture*, 80(7), 1013-1023.
- [489]. Schröder, H., 2007, Protective mechanisms of the Mediterranean diet in obesity and type 2 diabetes, *Journal of nutritional biochemistry*, 18 (3), 149-160.
- [490]. Ranalli, A., Contento, S., Lucera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fonzo, V., 2006, Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.), *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2), 434-440.
- [491]. Conde, E., Cara, C., Moure, A., Ruiz, E., Castro, E., Domínguez, H., 2009, Antioxidant activity of the phenolic compounds released by hydrothermal treatments of olive tree pruning, *Food chemistry*, 114 (3), 806-812.
- [492]. Ruiz-Gutiérrez, V., Juan, M.E., Cert, A., Planas, J.M., 2000, Determination of hydroxytyrosol in plasma by HPLC, *Analytical Chemistry*, 72(18), 4458-4461.
- [493]. Visioli, F., Galli, C., Bornet, F., Mattei, A., Patelli, R., Galli, G., Caruso, D., 2000, Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans, *FEBS letters*, 468(2-3), 159-160.
- [494]. Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., 1992, Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC, *Journal of agricultural and food chemistry*, 40 (9), 1571-1576.
- [495]. Manna, C., Della Ragione, F., Cucciolla, V., Borriello, A., D'Angelo, S., Galletti, P., Zappia, V., 1999, *Biological effects of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil endowed with antioxidant activity*, *Advances in Nutrition and Cancer 2*, In: Zappia, V., Ragione, F.D., Barbarisi, A., Russo, G.L., Iacovo, R.D., (eds.), Chapter 11, Springer

science & business media, Newyork, UAS, ISBN: 978-1-4757-3230-6, 115-130.

- [496]. Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., Greco, G., 1997, Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea Europea*, *Applied biochemistry and biotechnology*, 61 (3), 365-377.
- [497]. Galanakis, C.M., 2015, Separation of functional macromolecules and micromolecules: From ultrafiltration to the border of nanofiltration, *Trends in food science and technology*, 42 (1), 44-63.
- [498]. [https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=g7ENXJ\\_vC8ybsAGTxZK4AQ&q=Oleuropein+3d&oq=Oleuropein+3d&gs\\_l=img.3...2482.3506..4154...0.0..0.135.383.0j3.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i24.wYKmaFSxW94#imgrc=cu1AMUrLGDvoM:](https://www.google.com.tr/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=g7ENXJ_vC8ybsAGTxZK4AQ&q=Oleuropein+3d&oq=Oleuropein+3d&gs_l=img.3...2482.3506..4154...0.0..0.135.383.0j3.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i24.wYKmaFSxW94#imgrc=cu1AMUrLGDvoM:), Ziyaret tarihi: 15 Ağustos 2018].
- [499]. Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., Albi, M.A., 1999, Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (1), 121-127.
- [500]. Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G., 2001, Influence of fruit ripening on “Cornicabra” virgin olive oil quality: A study of four successive crop seasons, *Food chemistry*, 73 (1), 45-53.
- [501]. Torres, M.M., Maestri, D.M., 2006, Chemical composition of Arbequina virgin olive oil in relation to extraction and storage conditions, *Journal of the science of food and agriculture*, 86 (14), 2311-2317.
- [502]. Mylonaki, S., Kiassos, E., Makris, D.P., Kefalas, P., 2008, Optimisation of the extraction of olive (*Olea europaea*) leaf phenolics using water/ethanol-based solvent systems and response surface methodology, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392, 977-985.



- [503]. Aguilera, M.P., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A., Uceda, M., 2005, Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: “Frantoio” and “Leccino”, grown in Andalusia, *Food chemistry*, 89 (3), 387-391.
- [504]. Mendoza, M.F. De, De Miguel Gordillo, C., Expósito, J.M., Casas, J.S., Cano, M.M., Vertedor, D.M., Baltasar, M.N.F., 2013, Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives, *Food chemistry*, 141 (3), 2575-2581.
- [505]. Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., Guo, Z., 1985, Medicinal plants in therapy, *Bulletin of the world health organization*, 63 (6), 965-981.
- [506]. Sarker, S.D., Latif, Z., Gray, A.I., Seidel, V., Nahar, L., Gibbons, S., Reid, R.G., Durham, D.G., McAlpine, J.B., Morris, P., Latif, Z., Florence, A.J., Shankland, N., Johnston, A., Dinan, L., Jones, W.P., Kinghorn, A.D., Houssen, W.E., Jaspars, M., Barrow, R.A., Shimizu, Y., Li, B., Martin, S.M., Kau, D.A., Wrigley, S.K., Cannell, R.J.P., 2005, *Natural Products Isolation*, 2<sup>ed</sup>, Humana press, New Jersey, USA, ISBN: 1-59259-955-9.
- [507]. Kumar, S., 2018, *Analytical techniques for natural product research*, 1<sup>st</sup> ed, CABI, Oxfordshire, UK, ISBN: 978-1780644738.
- [508]. Azmir, J., Zaidul, I.S.M., Rahman, M.M., Sharif, K.M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M.H.A., Ghafoor, K., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2013, Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436.
- [509]. Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2016, *Extraction and purification of bioactive ingredients from natural products*, *Functional Foods*, Nutraceuticals and natural products: Concepts and applications, Chapter 7, In: Vatter, D.A., Maitin, V., (eds.), DEStech, Pennsylvania, USA, ISBN:978-1-60595-101-0, 153-175.
- [510]. Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M., 2015, Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: Importance and advances in the analysis of phenolic compounds, *Antioxidants*, 4

(4), 682-698.

- [511]. Zeitoun, M.A.M., M.M. Manso, H., Ezzat, S., El Sohaimy, S.A., 2017, Effect of pretreatment of olive leaves on phenolic content and antioxidant activity, *American journal of food technology*, 12 (2), 132-139.
- [512]. Bhattacharya, S., 2014, *Conventional and advanced food processing technologies*, 1<sup>st</sup> ed, John Wiley & Sons, Ltd, Atrium, UK, ISBN: 978-1-118-40630-4.
- [513]. Joana Gil-Chávez, G., Villa, J.A., Fernando Ayala-Zavala, J., Basilio Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E.M., González-Aguilar, G.A., 2013, Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 12 (1), 5-23.
- [514]. Cooke, M., Poole, C.F., Wilson, I., 2000, *Encyclopedia of separation science*, 1<sup>st</sup> ed, Academic press, San Diego, California, ISBN: 978-0-12-226770-3.
- [515]. Vankar, P.S., 2004, Essential oils and fragrances from natural sources, *Resonance*, 9 (4), 30-41.
- [516]. Presti, M. Lo, Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., Dugo, G., Mondello, L., 2005, A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil, *Journal of separation science*, 28 (3), 273-280.
- [517]. Silva, L. V, Nelson, D.L., Drummond, M.F.B., Dufossé, L., Glória, M.B.A., 2005, Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric, *Food research international*, 38 (8-9), 1087-1096.
- [518]. Spiro, M., Chen, S.S., 1995, Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems, *Flavour and fragrance journal*, 10 (4), 259-272.
- [519]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=mewQXNehLcyuswGNjLPoDg&q=clevenger+apparatus&oq=clevenger+apparatus&gs\\_l=img.3...](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=mewQXNehLcyuswGNjLPoDg&q=clevenger+apparatus&oq=clevenger+apparatus&gs_l=img.3...)

1044399.1044399..1044559...0.0..0.0.0.....0....1..gws-wiz-img.6BM4czzm9VY#imgrc=-uUfuyQL7StsM:, [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].

- [520]. Castro, M.D.L. de, García-Ayuso, L.E., 1998, Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future, *Analytica chimica acta*, 369 (1-2), 1-10.
- [521]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=svAQXIjaMsKI1fAPjsaMyAU&q=soxhlet+apparatus&oq=soxhlet&gs\\_l=img.1.0.0i67j0i9.435576.477109..479355...0.0..0.241.2425.0j16j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0..0i30j0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.YbEiHJsiz8M#imgrc=uIcOt90M-beTiM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=svAQXIjaMsKI1fAPjsaMyAU&q=soxhlet+apparatus&oq=soxhlet&gs_l=img.1.0.0i67j0i9.435576.477109..479355...0.0..0.241.2425.0j16j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0..0i30j0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.YbEiHJsiz8M#imgrc=uIcOt90M-beTiM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [522]. Plaza, M., Amigo-benavent, M., María, D., Ibáñez, E., Herrero, M., 2010, Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction, *Food research international*, 43 (10), 2341-2348.
- [523]. Herrero, M., Cifuentes, A., Iban, E., 2006, Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants , food-by-products, algae and microalgae: A review, *Food chemistry*, 98 (1), 136-148.
- [524]. Jouyban, A., Soltanpour, S., Chan, H.K., 2004, A simple relationship between dielectric constant of mixed solvents with solvent composition and temperature, *International journal of pharmaceutics*, 269 (2), 353-360.
- [525]. Adil, İ.H., Çetin, H.İ., Yener, M.E., 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.
- [526]. Jiménez-Carmona, M.M., Ubera, J.L., Luque De Castro, M.D., 1999, Comparison of continuous subcritical water extraction and hydrodistillation of marjoram essential oil, *Journal of chromatography A*, 855 (2), 625-632.

- [527]. Basile, A., Jime, M.M., Clifford, A.A., 1998, Extraction of rosemary by superheated water, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (12), 5205-5209.
- [528]. Yang, Y., Kayan, B., Bozer, N., Pate, B., Baker, C., Gizir, A.M., 2007, Terpene degradation and extraction from basil and oregano leaves using subcritical water, *Journal of chromatography A*, 1152 (1-2), 262-267.
- [529]. Rodríguez-Meizoso, I., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010, Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 51 (2), 456-463.
- [530]. Hassas-Roudsari, M., Chang, P.R., Pegg, R.B., Tyler, R.T., 2009, Antioxidant capacity of bioactives extracted from canola meal by subcritical water, ethanolic and hot water extraction, *Food chemistry*, 114 (2), 717-726.
- [531]. Garcia-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibanez, E., Garcia-Moreno, C., 2006, Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction, *Analytica chimica acta*, 563 (1-2), 44-50.
- [532]. Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Reina, G.G.-B., Herrero, M., Señoráns, F.J., Ibáñez, E., 2010, Screening for bioactive compounds from algae, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (2), 450-455.
- [533]. Rodríguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2006, Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41 (5), 1560-1565.
- [534]. Kim, J.W., Nagaoka, T., Ishida, Y., Hasegawa, T., Kitagawa, K., Lee, S.C., 2009, Subcritical water extraction of nutraceutical compounds from citrus pomaces, *Separation science and technology*, 44 (11), 2598-2608.

- [535]. [https://www.google.com/search?q=supercritical+water+extraction+apparatus&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjRlsiJmprfAhVMI1AKHQ7QDG0Q\\_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgrc=ETEupEPM90eKHM](https://www.google.com/search?q=supercritical+water+extraction+apparatus&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjRlsiJmprfAhVMI1AKHQ7QDG0Q_AUIDigB&biw=1366&bih=608#imgrc=ETEupEPM90eKHM); [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [536]. Laws, D.R.J., Bath, N.A., Ennis, C.S., Wheldon, A.G., 1980, *Hop extraction with carbon dioxide*, <https://patentimages.storage.googleapis.com/62/f4/62/838e0a5737596c/US4218491.pdf>, [Ziyaret tarihi: 27 Haziran 2018].
- [537]. King, M.B., Bott, T.R., 1993, *Extraction of Natural Products Using Near-Critical Solvents*, 1<sup>st</sup> ed, Springer science+Business media, Dordrecht, Netherlands, ISBN: 978-94-011-2138-5.
- [538]. Wang, L., Weller, C.L., 2006, Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends in food science & technology*, 17 (6), 300-312.
- [539]. Sihvonen, M., Järvenpää, E., Hietaniemi, V., Huopalahti, R., 1999, Advances in supercritical carbon dioxide technologies, *Trends in food science & technology*, 10 (6-7), 217-222.
- [540]. Wang, L., Weller, C.L., Schlegel, V.L., Carr, T.P., Cuppett, S.L., 2008, Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of lipids from grain sorghum dried distillers grains with solubles, *Bioresource technology*, 99 (5), 1373-1382.
- [541]. Cavero, S., García-Risco, M.R., Marín, F.R., Jaime, L., Santoyo, S., Señoráns, F.J., Reglero, G., Ibañez, E., 2006, Supercritical fluid extraction of antioxidant compounds from oregano. Chemical and functional characterization via LC-MS and in vitro assays, *The journal of supercritical fluids*, 38 (1), 62-69.
- [542]. Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2009, Application of supercritical CO<sub>2</sub> in lipid extraction - A review, *Journal of food engineering*, 95 (2), 240-253.
- [543]. Daintree, L.S., Kordikowski, A., York, P., 2008, Separation processes for organic

molecules using SCF technologies, *Advanced drug delivery reviews*, 60 (3), 351-372.

- [544]. Liza, M.S., Abdul Rahman, R., Mandana, B., Jinap, S., Rahmat, A., Zaidul, I.S.M., Hamid, A., 2010, Supercritical carbon dioxide extraction of bioactive flavonoid from *Strobilanthes crispus* (Pecah Kaca), *Food and bioproducts processing*, 88 (2-3), 319-326.
- [545]. Wright, B.W., Wright, C.W., Gale, R.W., Smith, R.D., 1987, Analytical supercritical fluid extraction of adsorbent materials, *Analytical chemistry*, 59 (1), 38-44.
- [546]. Valle, J.M. del, Rogalinski, T., Zetzl, C., Brunner, G., 2005, Extraction of boldo (*Peumus boldus* M.) leaves with supercritical CO<sub>2</sub> and hot pressurized water, *Food research international*, 38 (2), 203-213.
- [547]. Ling, J.Y., Zhang, G.Y., Cui, Z.J., Zhang, C.K., 2007, Supercritical fluid extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. and purification by high-speed counter-current chromatography, *Journal of chromatography A*, 1145 (1-2), 123-127.
- [548]. Castro, M.D.L. de, Valcarcel, M., Tena, M.T., 1994, *Analytical supercritical fluid extraction*, 1<sup>st</sup> ed, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, ISBN: 978-3-642-78675-4.
- [549]. Lehotay, S.J., 1997, Supercritical fluid extraction of pesticides in foods, *Journal of chromatography A*, 785 (1-2), 289-312.
- [550]. Moore, W.N., Taylor, L.T., 1996, Extraction and quantitation of digoxin and acetyldigoxin from the *Digitalis lanata* leaf via near-supercritical methanol-modified carbon dioxide, *Journal of natural products*, 59 (7), 690-693.
- [551]. Burford, M.D., Hawthorne, S.B., Miller, D.J., 1993, Evaluation of drying agents for off-line supercritical fluid extraction, *Journal of chromatography A*, 657 (2), 413-427.
- [552]. Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010, Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications, *Journal of chromatography A*, 1217 (16), 2495-2511.

- [553]. Daintree, L.S., Kordikowski, A., York, P., 2008, Separation processes for organic molecules using SCF technologies, *Advanced drug delivery reviews*, 60 (3), 351-372.
- [554]. Cape, S.P., Villa, J.A., Huang, E.T.S., Yang, T., Carpenter, J.F., Sievers, R.E., 2008, Preparation of active proteins, vaccines and pharmaceuticals as fine powders using supercritical or near-critical fluids, *Pharmaceutical research*, 25 (9), 1967-1990.
- [555]. Benner, B.A., 1998, Summarizing the effectiveness of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from natural matrix environmental samples, *Analytical chemistry*, 70 (21), 4594-4601.
- [556]. Smith, R.M., Burford, M.D., 1992, Supercritical fluid extraction and gas chromatographic determination of the sesquiterpene lactone parthenolide in the medicinal herb feverfew (*Tanacetum parthenium*), *Journal of chromatography A*, 627 (1-2), 255-261.
- [557]. Smith, R.M., Burford, M.D., 1992, Optimization of supercritical fluid extraction of volatile constituents from a model plant matrix, *Journal of chromatography A*, 600 (2), 175-181.
- [558]. Barth, M.M., Zhou, C., Kute, K.M., Rosenthal, G.A., 1995, Determination of optimum conditions for supercritical fluid extraction of carotenoids from carrot (*Daucus carota* L.) tissue, *Journal of agricultural and food chemistry*, 43 (11), 2876-2878.
- [559]. Yoda, S.K., Marques, M.O.M., Petenate, A.J., Meireles, M.A.A., 2003, Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertoni using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + water: Extraction kinetics and identification of extracted components, *Journal of food engineering*, 57 (2), 125-134.
- [560]. Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A., 2004, Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs, *Comptes rendus chimie*, 7 (6-7), 629-633.

- [561]. Caudell, T., 1999, *Practical supercritical fluid chromatography and extraction*, 1<sup>st</sup> ed, CRC press, Amsterdam, Netherlands, ISBN: 9780203744079.
- [562]. Römpp, H., Seger, C., Kaiser, C.S., Haslinger, E., Schmidt, P.C., 2004, Enrichment of hyperforin from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) by pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, *European journal of pharmaceutical sciences*, 21 (4), 443-451.
- [563]. Liu, B., Lockwood, G.B., Gifford, L.A., 1995, Supercritical fluid extraction of diosgenin from tubers of *Dioscorea nipponica*, *Journal of chromatography A*, 690 (2), 250-253.
- [564]. Pourmortazavi, S.M., Sefidkon, F., Hosseini, S.G., 2003, Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from *Perovskia atriplicifolia* Benth, *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 (8), 5414-5419.
- [565]. Yamini, Y., Asghari-Khiavi, M., Bahramifar, N., 2002, Effects of different parameters on supercritical fluid extraction of steroid drugs, from spiked matrices and tablets, *Talanta*, 58 (5), 1003-1010.
- [566]. Choi, Y.H., Kim, J.Y., Ryu, J.H., Yoo, K.-P., Chang, Y.S., Kim, J., 1998, Supercritical carbon dioxide extraction of andrographolide from *Dysosma plelantha* roots, *Planta medica*, 64 (5), 482-483.
- [567]. Wang, H.Y., Komolpis, K., Kaufman, P.B., Malakul, P., Shotipruk, A., 2001, Permeabilization of metabolites from biologically viable soybeans (*Glycine max*), *Biotechnology progress*, 17 (3), 424-430.
- [568]. Abaroudi, K., Trabelsi, F., Recasens, F., 2002, Screening of cosolvents for a supercritical fluid: A fully predictive approach, *AIChE journal*, 48 (3), 551-560.
- [569]. Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S., 2007, Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis, *Journal of chromatography A*, 1163 (1-2), 2-24.
- [570]. Güçlü-Üstündağ, Ö., Temelli, F., 2005, Solubility behavior of ternary systems of



lipids, cosolvents and supercritical carbon dioxide and processing aspects, *Journal of supercritical fluids*, 36 (1), 1-15.

- [571]. Sovová, H., Zarevúcka, M., Vacek, M., Stránský, K., 2001, Solubility of two vegetable oils in supercritical CO<sub>2</sub>, *Journal of supercritical fluids*, 20 (1), 15-28.
- [572]. Björklund, E., Järemo, M., Mathiasson, L., Åke Jönsson, J., Karlsson, L., 1998, Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction, *Analytica chimica acta*, 368 (1-2), 117-128.
- [573]. Ashraf-Khorassani, M., Combs, M.T., Taylor, L.T., 1997, Supercritical fluid extraction of metal ions and metal chelates from different environments, *Journal of chromatography A*, 774 (1-2), 37-49.
- [574]. Modey, W.K., Mulholland, D.A., Raynor, M.W., 1996, Analytical supercritical fluid extraction of natural products, *Phytochemical analysis*, 7 (1), 1-15.
- [575]. Turner, C., Eskilsson, C.S., Björklund, E., 2002, Collection in analytical-scale supercritical fluid extraction, *Journal of chromatography A*, 947 (1), 1-22.
- [576]. Hartono, R., Mansoori, G.A., Suwono, A., 2001, Prediction of solubility of biomolecules in supercritical solvents, *Chemical engineering science*, 56 (24), 6949-6958.
- [577]. Özer, E.Ö., Platin, S., Akman, U., Hortaçsu, Ö., 1996, Supercritical carbon dioxide extraction of spearmint oil from mint-plant leaves, *Canadian journal of chemical engineering*, 74 (6), 920-928.
- [578]. Díaz-Maroto, M.C., Pérez-Coello, M.S., Cabezudo, M.D., 2002, Supercritical carbon dioxide extraction of volatiles from spices: Comparison with simultaneous distillation-extraction, *Journal of chromatography A*, 947 (1), 23-29.
- [579]. Phelps, C.L., Smart, N.G., Wai, C.M., 1996, Past, Present, and Possible Future Applications of Supercritical Fluid Extraction Technology, *Journal of chemical*

*education*, 73 (12), 1163-1168.

[580]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=GvMQXNyRGfZwALf3rr4Bg&q=supercritical+carbon+dioxide+fluid+extraction+apparatus&oq=supercritical+carbon+dioxide+fluid+extraction+apparatus&gs\\_l=img.3...199456.219949.220231...3.0..0.229.3314.5j21j2.....0....1..gws-wiz-img.....0i7i30.9gsCxPx85Ac#imgdii=SPr6TOZK0puHZM:&imgrc=jf7AAXiFKmkeEM](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=GvMQXNyRGfZwALf3rr4Bg&q=supercritical+carbon+dioxide+fluid+extraction+apparatus&oq=supercritical+carbon+dioxide+fluid+extraction+apparatus&gs_l=img.3...199456.219949.220231...3.0..0.229.3314.5j21j2.....0....1..gws-wiz-img.....0i7i30.9gsCxPx85Ac#imgdii=SPr6TOZK0puHZM:&imgrc=jf7AAXiFKmkeEM;); [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].

[581]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=lpQOXIzbIMe8kwXhoAQ&q=maceration+apparatus&oq=maceration+apparatus&gs\\_l=img.3..0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.36410.37192..38594...0.0..0.119.219.0j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0i7i30.oeuY9DPDFmo#imgrc=XEUc9OV7unwetM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=lpQOXIzbIMe8kwXhoAQ&q=maceration+apparatus&oq=maceration+apparatus&gs_l=img.3..0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.36410.37192..38594...0.0..0.119.219.0j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0i7i30.oeuY9DPDFmo#imgrc=XEUc9OV7unwetM:;); [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].

[582]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=lpQOXIzbIMe8kwXhoAQ&q=maceration+apparatus&oq=maceration+apparatus&gs\\_l=img.3..0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.36410.37192..38594...0.0..0.119.219.0j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0i7i30.oeuY9DPDFmo#imgrc=QCKrZ3Cv3\\_VFHM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=lpQOXIzbIMe8kwXhoAQ&q=maceration+apparatus&oq=maceration+apparatus&gs_l=img.3..0i19j0i7i30i19j0i5i30i19.36410.37192..38594...0.0..0.119.219.0j2.....0....1j2..gws-wiz-img.....0i7i30.oeuY9DPDFmo#imgrc=QCKrZ3Cv3_VFHM:;); [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].

[583]. Dunford, N.T., Irmak, S., Jonnala, R., 2010, Pressurised solvent extraction of policosanol from wheat straw, germ and bran, *Food chemistry*, 119 (3), 1246-1249.

[584]. Schäfer, K., 1998, Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material, *Analytica chimica acta*, 358 (1), 69-77.

[585]. Shao, B., Han, H., Li, D., Ma, Y., Tu, X., Wu, Y., 2007, Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food chemistry*, 105 (3), 1236-1241.

[586]. Touré, A., Xueming, X., 2010, Flaxseed lignans: Source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components, and health benefits, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9 (3), 261-269.

- [587]. Miron, T.L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M., 2011, Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants, *Journal of chromatography A*, 1218 (30), 4918-4927.
- [588]. Plaza, M., Amigo-Benavent, M., del Castillo, M.D., Ibáñez, E., Herrero, M., 2010, Neoformation of antioxidants in glycation model systems treated under subcritical water extraction conditions, *Food research international*, 43 (4), 1123-1129.
- [589]. Materska, M., Piacente, S., Stochmal, A., Pizza, C., Oleszek, W., Perucka, I., 2003, Isolation and structure elucidation of flavonoid and phenolic acid glycosides from pericarp of hot pepper fruit *Capsicum annuum* L., *Phytochemistry*, 63 (8), 893-898.
- [590]. Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Jifon, J., Patil, B.S., 2012, Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers, *Food chemistry*, 130 (3), 751-758.
- [591]. Marín, A., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., 2004, Characterization and quantitation of antioxidant constituents of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.), *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (12), 3861-3869.
- [592]. Jiang, L., Kojima, H., Yamada, K., Kobayashi, A., Kubota, K., 2001, Isolation of some glycosides as aroma precursors in young leaves of Japanese pepper (*Xanthoxylum piperitum* DC.), *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (12), 5888-5894.
- [593]. Kaufmann, B., Christen, P., 2002, Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical analysis*, 13 (2), 105-113.
- [594]. Bertrand Matthäus, Ludger Brühl, 2001, Comparison of different methods for the determination of the oil content in oilseeds, *Journal of the american oil chemist's society*, 78 (1), 95-102.
- [595]. Sporring, S., Bøwadt, S., Svensmark, B., Björklund, E., 2005, Comprehensive comparison of classic Soxhlet extraction with Soxtec extraction, ultrasonication

extraction, supercritical fluid extraction, microwave assisted extraction and accelerated solvent extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil, *Journal of chromatography A*, 1090 (1-2), 1-9.

- [596]. Mustafa, A., Turner, C., 2012, Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review, *Analytica chimica acta*, 703 (1), 8-18.
- [597]. Santos, D.T., Veggi, P.C., Meireles, M.A.A., 2012, Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins, *Journal of food engineering*, 108 (3), 444-452.
- [598]. Abboud, J.-L.M., Notari, R., 1999, Critical compilation of scales of solvent parameters. Part I. Pure, non-hydrogen bond donor solvents, *Pure and applied chemistry*, 71 (4), 645-718.
- [599]. Ammann, A., Hinz, D.C., Addleman, R.S., Wai, C.M., Wenclawiak, B.W., 1999, Superheated water extraction, steam distillation and SFE of peppermint oil, *Fresenius journal of analytical chemistry*, 364 (7), 650-653.
- [600]. Clifford, A.A., Basile, A., Al-Saidi, S.H.R., 1999, A comparison of the extraction of clove buds with supercritical carbon dioxide and superheated water, *Fresenius journal of analytical chemistry*, 364 (7), 635-637.
- [601]. Reighard, T.S., Olesik, S. V., 1996, Comparison of supercritical fluids and enhanced-fluidity liquids for the extraction of phenolic pollutants from house dust, *Analytical chemistry*, 68 (20), 3612-3621.
- [602]. Richter, B.E., Jones, B.A., Ezzell, J.L., Porter, N.L., Avdalovic, N., Pohl, C., 1996, Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation, *Analytical chemistry*, 68 (6), 1033-1039.
- [603]. Benthin, B., Danz, H., Hamburger, M., 1999, Pressurized liquid extraction of medicinal plants, *Journal of chromatography A*, 837 (1-2), 211-219.

- [604]. Da Costa, C.T., Margolis, S.A., Benner, B.A., Horton, D., 1999, Comparison of methods for extraction of flavanones and xanthenes from the root bark of the osage orange tree using liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 831 (2), 167-178.
- [605]. Kawamura, F., Kikuchi, Y., Ohira, T., Yatagai, M., 1999, Accelerated solvent extraction of paclitaxel and related compounds from the bark of *Taxus cuspidata*, *Journal of natural products*, 62 (2), 244-247.
- [606]. Brachet, A., Rudaz, S., Mateus, L., Christen, P., Veuthey, J.L., 2001, Optimisation of accelerated solvent extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Journal of separation science*, 24 (10-11), 865-873.
- [607]. Kong, K.W., Khoo, H.E., Prasad, K.N., Ismail, A., Tan, C.P., Rajab, N.F., 2010, Revealing the power of the natural red pigment lycopene, *Molecules*, 15 (2), 959-987.
- [608]. Ajila, C.M., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D., Godbout, S., Valéro, J.R., 2011, Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends, *Critical reviews in biotechnology*, 31 (3), 227-249.
- [609]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=vfQQXMjEOY7TkqXKloS4Aw&q=Pressurized+liquid+extraction+apparatus&oq=Pressurized+liquid+extraction+apparatus&gs\\_l=img.3...429213.429213..431065...0.0..0.104.104.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.M6FXRP9MuiQ#imgdii=djxC67mEATaNZM:&imgcr=RPg96Zv81bM2XM;](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=vfQQXMjEOY7TkqXKloS4Aw&q=Pressurized+liquid+extraction+apparatus&oq=Pressurized+liquid+extraction+apparatus&gs_l=img.3...429213.429213..431065...0.0..0.104.104.0j1.....0....1j2..gws-wiz-img.M6FXRP9MuiQ#imgdii=djxC67mEATaNZM:&imgcr=RPg96Zv81bM2XM;)  
[Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [610]. Zhang, H., Yang, X., Wang, Y., 2011, Microwave assisted extraction of secondary metabolites from plants: Current status and future directions, *Trends in food science & technology*, 22 (12), 672-688.
- [611]. Ganzler, K., Plc, G.R., Valko, K., 1986, A new method for the extraction and high performance liquid chromatography determination of vicine and convicine in faba beans, *Journal of chromatography*, 371, 229-306.

- [612]. Routray, W., Orsat, V., Microwave-assisted extraction of flavonoids : A review, *Food and bioprocess technology*, 5 (2), 409-424.
- [613]. Tatke, P., Jaiswal, Y., 2011, An Overview of Microwave Assisted Extraction and its Applications in Herbal Drug Research, *Research journal of medicinal plants*, 5 (1), 21-31.
- [614]. Onuska, F.I., Terry, K.A., 1993, Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique, *Chromatographia*, 36 (1), 191-194.
- [615]. Budzinski, H., Baumard, P., Papineau, A., Wise, S., Garrigues, P., 1996, Focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic compounds from standard reference materials, sediments and biological tissues, *Polycyclic aromatic compounds*, 9 (1-4), 225-232.
- [616]. Li, Y., Skouroumounis, G.K., Elsey, G.M., Taylor, D.K., 2011, Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols, *Food chemistry*, 129 (2), 570-576.
- [617]. Moreira, M.M., Morais, S., Barros, A.A., Delerue-Matos, C., Guido, L.F., 2012, A novel application of microwave-assisted extraction of polyphenols from brewer's spent grain with HPLC-DAD-MS analysis, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403 (4), 1019-1029.
- [618]. Simsek, M., Sumnu, G., Sahin, S., 2012, Microwave assisted extraction of phenolic compounds from sour cherry pomace, *Separation science and technology*, 47 (8), 1248-1254.
- [619]. Zhao, L., Zhao, G., Chen, F., Wang, Z., Wu, J., Hu, X., 2006, Different effects of microwave and ultrasound on the stability of (*all-E*)-Astaxanthin, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (21), 8346-8351.
- [620]. Pasquet, V., Chérouvrier, J.R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.M., Bérard, J.B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.P., Picot, L., 2011, Study on the microalgal pigments

extraction process: Performance of microwave assisted extraction, *Process biochemistry*, 46 (1), 59-67.

- [621]. Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., Xia, W., 2009, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro, *Separation and purification technology*, 70 (1), 63-70.
- [622]. Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S., 2010, Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins, *Food chemistry*, 120 (4), 1185-1192.
- [623]. Li, H., Deng, Z., Wu, T., Liu, R., Loewen, S., Tsao, R., 2012, Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes, *Food chemistry*, 130 (4), 928-936.
- [624]. Zill-e-Huma, Vian, M.A., Fabiano-Tixier, A.-S., Elmaataoui, M., Dangles, O., Chemat, F., 2011, A remarkable influence of microwave extraction: Enhancement of antioxidant activity of extracted onion varieties, *Food chemistry*, 127 (4), 1472-1480.
- [625]. Xiao, W., Han, L., Shi, B., 2008, Optimization of microwave - Assisted extraction of flavonoid from radix astragali using response surface methodology, *Separation science and technology*, 43 (3), 671-681.
- [626]. Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, É., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M.A., Mesnard, F., 2007, Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed, *Phytochemical analysis*, 18 (4), 275-282.
- [627]. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S., 2007, Microwave assisted extraction - An innovative and promising extraction, *Pharmacognosy reviews*, 1 (1), 7-18.
- [628]. Kaufmann, B., Christen, P., 2002, Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction, *Phytochemical analysis*, 13 (2), 105-113.

- [629]. Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J.L., 2002, Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves, *Phytochemical analysis*, 13 (3), 162-169.
- [630]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=GPcQXM3wIa6NmgW4\\_bjYCW&q=microwave+assisted+extraction+open+and+close+system&oq=microwave+assisted+extraction+open+and+close+system&gs\\_l=img.3...1637.10073..10339...1.0..0.410.3304.2j18j2j0j1.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i30i19j0i5i30i19.396AWUOUD4A#imgdii=lZpAQCy1MLbI2M:&imgrc=nJpifl0KFfm3FM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=GPcQXM3wIa6NmgW4_bjYCW&q=microwave+assisted+extraction+open+and+close+system&oq=microwave+assisted+extraction+open+and+close+system&gs_l=img.3...1637.10073..10339...1.0..0.410.3304.2j18j2j0j1.....0....1..gws-wiz-img.....0i19j0i30i19j0i5i30i19.396AWUOUD4A#imgdii=lZpAQCy1MLbI2M:&imgrc=nJpifl0KFfm3FM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [631]. Soria, A.C., Villamiel, M., 2010, Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review, *Trends in food science and technology*, 21 (7), 323-331.
- [632]. Novak, I., Janeiro, P., Seruga, M., Oliveira-Brett, A.M., 2008, Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Analytica chimica acta*, 630 (2), 107-115.
- [633]. Leighton, T.G., What is ultrasound?, *Progress in biophysics and molecular biology*, 93 (1-3), 3-83.
- [634]. Esclapez, M.D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Cárcel, J.A., 2011, Ultrasound-assisted extraction of natural products, *Food engineering reviews*, 3 (2), 108-120.
- [635]. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., Mason, T.J., 1997, The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials, *Ultrasonics sonochemistry*, 4 (2), 135-139.
- [636]. Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., Mason, T.J., 2001, Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction, *Ultrasonics sonochemistry*, 8 (2), 137-142.



- [637]. Karki, B., Lamsal, B.P., Jung, S., van Leeuwen, J. (Hans), Pometto, A.L., Grewell, D., Khanal, S.K., 2010, Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology, *Journal of food engineering*, 96 (2), 270-278.
- [638]. Cheung, Y.C., Siu, K.C., Liu, Y.S., Wu, J.Y., 2012, Molecular properties and antioxidant activities of polysaccharide-protein complexes from selected mushrooms by ultrasound-assisted extraction, *Process biochemistry*, 47 (5), 892-895.
- [639]. Adam, F., Abert-Vian, M., Peltier, G., Chemat, F., 2012, "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: A green, clean and scalable process, *Bioresource technology*, 114, 457-465.
- [640]. Chukwumah, Y.C., Walker, L.T., Verghese, M., Ogutu, S., 2009, Effect of frequency and duration of ultrasonication on the extraction efficiency of selected isoflavones and trans-resveratrol from peanuts (*Arachis hypogaea*), *Ultrasonics sonochemistry*, 16 (9), 293-299.
- [641]. Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009, Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (11), 4988-4994.
- [642]. Hossain, M.B., Brunton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2012, Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology, *Ultrasonics sonochemistry*, 19 (3), 582-590.
- [643]. Dobiáš, P., Pavlíková, P., Adam, M., Eisner, A., Beňová, B., Ventura, K., 2010, Comparison of pressurised fluid and ultrasonic extraction methods for analysis of plant antioxidants and their antioxidant capacity, *Central european journal of chemistry*, 8 (1), 87-95.
- [644]. Pingret, D., Fabiano-Tixier, A.S., Bourvellec, C. Le, Renard, C.M.G.C., Chemat, F., 2012, Lab and pilot-scale ultrasound-assisted water extraction of polyphenols from apple

pomace, *Journal of food engineering*, 111 (1), 73-81.

- [645]. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., 1996, The uses of ultrasound in food technology, *Ultrasonics sonochemistry*, 3 (3), S253-S260.
- [646]. Roldán-Gutiérrez, J.M., Ruiz-Jiménez, J., Luque de Castro, M.D., 2008, Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction, *Talanta*, 75 (5), 1369-1375.
- [647]. Pérez-Serradilla, J.A., Priego-Capote, F., Luque De Castro, M.D., 2007, Simultaneous ultrasound-assisted emulsification-extraction of polar and nonpolar compounds from solid plant samples, *Analytical chemistry*, 79 (7), 6767-6774.
- [648]. Wu, J., Lin, L., Chau, F.T., 2001, Ultrasound-assisted extraction of ginseng saponins from ginseng roots and cultured ginseng cells, *Ultrasonics sonochemistry*, 8 (4), 347-352.
- [649]. Christensen, A., Östman, C., Westerholm, R., 2005, Ultrasound-assisted extraction and on-line LC-GC-MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 381 (6), 1206-1216.
- [650]. Hemwimon, S., Pavasant, P., Shotipruk, A., 2007, Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*, *Ultrasonics sonochemistry*, 13 (6), 543-548.
- [651]. Ahn, Y.G., Shin, J.H., Kim, H.Y., Khim, J., Lee, M.K., Hong, J., 2007, Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish, *Analytica chimica acta*, 603 (1), 67-75.
- [652]. Quan, C., Sun, Y., Qu, J., 2009, Ultrasonic extraction of ferulic acid from *Angelica sinensis*, *Canadian journal of chemical engineering*, 87 (4), 562-567.

- [653]. Schinor, E.C., Salvador, M.J., Turatti, I.C.C., Zucchi, O.L.A.D., Dias, D.A., 2004, Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta spp*, *Ultrasonics sonochemistry*, 11 (6), 415-421.
- [654]. Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P., Mason, T.J., 2004, Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry, *Ultrasonics sonochemistry*, 11 (3), 261-265.
- [655]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=T\\_kQXIaYE4b8swGLtrGIDA&q=ultrasound+assisted+extraction+schematic+diagram+probe+system&oq=ultrasound+assisted+extraction+schematic+diagram+probe+system&gs\\_l=img.3...80401.80535..81410...0.0..0.164.281.0j2.....0....1..gws-wiz-img.J2Ld63fXDB8#imgsrc=sIUpAjNYVn\\_cM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=608&tbm=isch&sa=1&ei=T_kQXIaYE4b8swGLtrGIDA&q=ultrasound+assisted+extraction+schematic+diagram+probe+system&oq=ultrasound+assisted+extraction+schematic+diagram+probe+system&gs_l=img.3...80401.80535..81410...0.0..0.164.281.0j2.....0....1..gws-wiz-img.J2Ld63fXDB8#imgsrc=sIUpAjNYVn_cM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [656]. Dhankhar, P., 2014, Homogenization Fundamentals, *International organization of scientific research - Journal of engineering*, 4 (5), 1-8.
- [657]. Bilgin, M., Şahin, S., 2013, Effects of geographical origin and extraction methods on total phenolic yield of olive tree (*Olea europaea*) leaves, *Journal of the taiwan institute of chemical engineers*, 44 (1), 8-12.
- [658]. Bahloul, N., Boudhrioua, N., Kouhila, M., Kechaou, N., 2009, Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea* L.), *International journal of food science and technology*, 44 (12), 2561-2567.
- [659]. Ahmad-Qasem, M.H., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Mulet, A., García-Pérez, J.V., 2013, Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential, *Food research international*, 50 (1), 189-196.
- [660]. Japón-Luján, R., 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.
- [661]. Brielmann, H., Kaufman, P., Duke, J., Cseke, L., Warber, S., Kirakosyan, A., 2006,

*Natural Products from Plants*, 2<sup>ed</sup> ed, CRC press, Boca Raton, FL, ISBN: 9781420004472.

- [662]. Komolpis, K., Kaufman, P.B., Wang, H.Y., 1998, Chemical permeabilization and in situ removal of daidzein from biologically viable soybean (*Glycine max*) seeds, *Biotechnology techniques*, 12 (9), 697-700.
- [663]. Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huie, C.W., 2003, Pressurized liquid extraction of active ingredients (Ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions, *Journal of chromatography A*, 983 (1-2), 153-162.
- [664]. Zhao, H., Xia, S., Ma, P., 2005, Use of ionic liquids as “green” solvents for extractions, *Journal of chemical technology and biotechnology*, 80 (10), 1089-1096.
- [665]. Yang, L., Wang, H., Zu, Y. gang, Zhao, C., Zhang, L., Chen, X., Zhang, Z., 2011, Ultrasound-assisted extraction of the three terpenoid indole alkaloids vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* using ionic liquid aqueous solutions, *Chemical engineering journal*, 172 (2-3), 705-712.
- [666]. Jemai, H., Fki, I., Bouaziz, M., Bouallagui, Z., El Feki, A., Isoda, H., Sayadi, S., 2008, Lipid-lowering and antioxidant effects of hydroxytyrosol and its triacetylated derivative recovered from olive tree leaves in cholesterol-fed rats, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (8), 2630-2636.
- [667]. Ahmad-Qasem, M.H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Cárcel, J.A., Garcia-Perez, J. V., 2013, Influence of air temperature on drying kinetics and antioxidant potential of olive pomace, *Journal of food engineering*, 119 (3), 516-524.
- [668]. Cárcel, J.A., Nogueira, R.I., García-Pérez, J.V., Sanjuán, N., Riera, E., 2010, Ultrasound effects on the mass transfer processes during drying kinetic of olive leaves (*Olea Europea*, var. Serrana), *Defect and diffusion forum*, 297-301, 1083-1090.
- [669]. Malik, N.S.A., Bradford, J.M., 2008, Recovery and stability of oleuropein and other phenolic compounds during extraction and processing of olive (*Olea europaea* L.) leaves,

*Journal of food, agriculture and environment*, 6 (2), 8-13.

- [670]. Martín-García, A.I., Molina-Alcaide, E., 2008, Effect of different drying procedures on the nutritive value of olive (*Olea europaea* var. *europaea*) leaves for ruminants, *Animal feed science and technology*, 142 (3-4), 317-329.
- [671]. Mujumdar, A.S., 2006, *Handbook of Industrial Drying*, 3<sup>rd</sup> ed, CRC press/Taylor & Francis group, Boca Raton, FL, ISBN: 978-1574446685.
- [672]. Erbay, Z., Icier, F., 2011, Energy and exergy analyses on drying of olive leaves (*Olea europaea* L.) in tray drier, *Journal of food process engineering*, 34 (6), 2105-2123.
- [673]. Tzia, C., Liadakis, G., 2003, *Extraction optimization in food engineering*, 1<sup>st</sup> ed, Marcel dekker, Inc., New York, USA, ISBN: 0-8247-4108-0.
- [674]. Starmans, I.D.A.J., Nijhuis, H.H., 1996, Extraction of secondary metabolites from plant material: A review, *Trends in food science & technology*, 7 (6), 191-197.
- [675]. Bracco, U., Löliger, J., Viret, J.-L., 1981, Production and use of natural antioxidants, *Journal of the american oil chemist's society*, 58 (6), 686-690.
- [676]. Cu, J., Perineau, F., Delmas, M., Gaset, A., 1989, Comparison of the chemical composition of carrot seed essential oil extracted by different solvents, *Flavour and fragrance journal*, 4 (4), 225-231.
- [677]. Rajagopalan, N., Cheryan, M., 1995, Pervaporation of grape juice aroma, *Journal of membrane science*, 104 (3), 243-250.
- [678]. Cacace, J.E., Mazza, G., 2003, Optimization of Extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol, *Journal of food science*, 68 (1), 240-248.
- [679]. Pinelo, M., Sineiro, J., Núñez, M.J., 2006, Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts, *Journal of food engineering*, 77 (1), 57-63.

- [680]. Luthria, D.L., 2008, Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor, *Food chemistry*, 107 (2), 745-752.
- [681]. Mukhopadhyay, S., Luthria, D.L., Robbins, R.J., 2006, Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction, *Journal of the science of food and agriculture*, 86 (1), 156-162.
- [682]. Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A., Sayadi, S., 2008, Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves, *Chemico-biological interactions*, 176 (2-3), 88-98.
- [683]. Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2007, Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves, *Molecules*, 12 (5), 1153-1162.
- [684]. Luthria, D.L., Mukhopadhyay, S., Krizek, D.T., 2006, Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation, *Journal of food composition and analysis*, 19 (8), 771-777.
- [685]. Marczenko, Z., Balcerzak, M., 2000, *Separation, preconcentration and spectrophotometry in inorganic analysis*, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier science, Amsterdam, Netherlands, ISBN: 9780080541082.
- [686]. Sommer, L., 1989, *Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet*, 1<sup>st</sup> ed, Elsevier, Elsevier science, Amsterdam, Netherlands, ISBN: 9780444597458.
- [687]. Lothian, G.F., 1963, Beer's law and its use in analysis. A review, *Analyst*, 88 (678), 678-685.
- [688]. Buijs, K., Maurice, M. J., 1969, Some considerations on apparent deviations from lambert-beer's law, *Analytica chimica acta*, 47 (3), 469-474.

- [689]. Agterdenbos, J., Vlogtman, J., Broekhoven, L. Van, 1974, The error in absorption measurements, caused by the use of non-monochromatic light-II, *Talanta*, 21 (3), 225-230.
- [690]. Agterdenbos, J., Vlogtman, J., 1974, The error in absorption measurements caused by the use of non-monochromatic light—III Application to linear calibration curves, *Talanta*, 21 (3), 231-235.
- [691]. Youmans, H.L., Brown, V.H., 1976, Selection of optimum ranges for photometric analysis, *Analytical Chemistry*, 48 (8), 1152-1155.
- [692]. Altemose, I.R., 1986, Evolution of instrumentation for UV-visible spectrophotometry Part I, *Journal of chemical education*, 63 (9), A216-A223.
- [693]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=3RcRXO6xNobOwAKb67LQBg&q=digidentity+icon&oq=digidentity+icon&gs\\_l=img.3...16699.19534..20277...0.0..0.122.572.0j5.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i24.IbxGmG8UQa0#imgdii=JYz8goY5u57lqM:&imgrc=5xFNub3Hcy1IQM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=3RcRXO6xNobOwAKb67LQBg&q=digidentity+icon&oq=digidentity+icon&gs_l=img.3...16699.19534..20277...0.0..0.122.572.0j5.....0....1..gws-wiz-img.....0j0i24.IbxGmG8UQa0#imgdii=JYz8goY5u57lqM:&imgrc=5xFNub3Hcy1IQM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [694]. [https://www.google.com/search?q=Detector+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3yp32sJrfAhWEI1AKHZMzB0sQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=Yji2VR-sybkDeM:](https://www.google.com/search?q=Detector+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwi3yp32sJrfAhWEI1AKHZMzB0sQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=Yji2VR-sybkDeM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [695]. [https://www.google.com/search?q=iot+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiey7L9vprfAhWJJIAKHfeMCVoQ\\_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=1HXMxgpv3ybMYM:](https://www.google.com/search?q=iot+icon&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiey7L9vprfAhWJJIAKHfeMCVoQ_AUIDigB&biw=1366&bih=657#imgrc=1HXMxgpv3ybMYM:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [696]. Jones, K.P., 1990, New lamps for old - recent progress in UV sources for absorption detectors in liquid chromatography, *Trends in analytical chemistry*, 9 (6), 195-199.
- [697]. Imasaka, T., Ishibashi, N., 1990, Diode lasers and practical trace analysis, *Analytical chemistry*, 62 (6), 363A-371A.

- [698]. Bautz, D.E., Ingle, J.D., 1987, Automated sample cell cleaner, *Analytical chemistry*, 59 (20), 2534-2535.
- [699]. Grossman, W.E.L., 1989, A comparison of optical detectors for the visible and ultraviolet, *Journal of chemical education*, 66 (8), 697-700.
- [700]. Dose, E.V., Guiochon, G., 1989, Bias and nonlinearity of ultraviolet calibration curves measured using diode-array detectors, *Analytical chemistry*, 61 (22), 2571-2579.
- [701]. Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K.M., Özyürek, M., Güçlü, K., 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report), *Pure and applied chemistry*, 85 (5), 957-998.
- [702]. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005, The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (6), 1841-1856.
- [703]. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10), 4290-4302.
- [704]. Niki, E., 2010, Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo, *Free radical biology and medicine*, 49 (4), 503-515.
- [705]. Sahu, N., Saxena, J., 2013, Different methods for determining antioxidant activity: A review, *INDO american journal of pharmaceutical research*, 3, 7025-7028.
- [706]. Apak, R., Özyürek, M., Guclu, K., Capanoglu, E., 2016, Antioxidant activity/capacity measurement: I. Classification, physico-chemical principles, mechanisms and electron transfer (ET)-based assays, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (5), 997-1027.
- [707]. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016, Antioxidant Activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation Assays, *Journal of agricultural and food chemistry*, 64 (5), 1028-1045.



- [708]. Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., 2016, Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays, *Food chemistry*, 97 (4), 654-660.
- [709]. Shahidi, F., Zhong, Y., 2015, Measurement of antioxidant activity, *Journal of functional foods*, 18 (Part B), 757-781.
- [710]. Halliwell, B., 1995, Antioxidant characterization: Methodology and mechanism, *Biochemical pharmacology*, 49 (10), 1341-1348.
- [711]. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1995, The definition and measurement of antioxidants in biological systems, *Free radical biology and medicine*, 18 (1), 125-126.
- [712]. Finley, J.W., Kong, A.N., Hintze, K.J., Jeffery, E.H., Ji, L.L., Lei, X.G., 2011, Antioxidants in foods: State of the science important to the food industry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 59 (13), 6837-6846.
- [713]. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12 (7), 1496-1547.
- [714]. Çekiç, S.D., Çetinkaya, A., Avan, A.N., Apak, R., 2013, Correlation of total antioxidant capacity with reactive oxygen species (ROS) consumption measured by oxidative conversion, *Journal of agricultural and food chemistry*, 61 (22), 5260-5270.
- [715]. Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A., 2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of the american chemical society*, 123 (6), 1173-1183.
- [716]. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food science and technology*, 28 (1), 25-30.

- [717]. Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C., 1997, Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method, *LWT - Food science and technology*, 30 (6), 609-615.
- [718]. Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the science of food and agriculture*, 76 (2), 270-276.
- [719]. Gupta, D., 2015, Methods for determination of antioxidant capacity: A review, *International journal of pharmaceutical sciences and research*, 6 (2), 546-566.
- [720]. Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2007, Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity, *Food research international*, 40 (1), 15-21.
- [721]. Longhi, J.G., Perez, E., de Lima, J.J., Cândido, L.M.B., 2011, In vitro evaluation of *Mucuna pruriens* (L.) DC. antioxidant activity, *Brazilian journal of pharmaceutical sciences*, 47 (3), 535-544.
- [722]. Frankel, E.N., Meyer, A.S., 2000, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the science of food and agriculture*, 80 (13), 1925-1941.
- [723]. Rice-Evans, C., Miller, N.J., 1994, [24] Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
- [724]. Arnao, M.B., Cano, A., Hernández-Ruiz, J., Garcib A-Cá, F., Acosta, M., 1996, Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: A new approach for determining total antioxidant status of foods, *Analytical biochemistry*, 236, 255-261.
- [725]. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yanga, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay,

*Free radical biology and medicine*, 26 (9-10), 1231-1237.

- [726]. Amensour, M., Sendra, E., Pérez-Alvarez, J.A., Skali-Senhaji, N., Abrini, J., Fernández-López, J., 2010, Antioxidant activity and chemical content of methanol and ethanol extracts from leaves of rockrose (*Cistus ladaniferus*), *Plant foods for human nutrition*, 65 (2), 170-178.
- [727]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (26), 7970-7981.
- [728]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Esin Karademir, S., Altun, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free radical research*, 39 (9), 949-961.
- [729]. Özyürek, M., Güçlü, K., Bektaşoğlu, B., Apak, R., 2007, Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La ( III ) complexes, *Analytica chimica acta*, 588 (1), 88-95.
- [730]. Özyürek, M., Bektas, B., Güçlü, K., Güngör, N., Apak, R., 2008, Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl- $\beta$ -cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica chimica acta*, 630 (1), 28-39.
- [731]. Bektaşoğlu, B., Esin Çelik, S., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2006, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochemical and biophysical research communications*, 345 (3), 1194-1200.
- [732]. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, R., 2008, Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen, *Analytica chimica acta*, 616 (2), 196-

206.

- [733]. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Apak, R., 2009, Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica chimica acta*, 636 (1), 42-50.
- [734]. Özyürek, M., Bektaşoğlu, B., Güçlü, K., Güngör, N., Apak, R., A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology, *Journal of food composition and analysis*, 23 (7), 689-698.
- [735]. Bener, M., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2010, Development of a low-cost optical sensor for cupric reducing antioxidant capacity, *Analytical chemistry*, 82 (10), 4252-4258.
- [736]. Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., 2010, Determination of antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection, *Analytica chimica acta*, 674 (1), 79-88.
- [737]. Christodouleas, D., Fotakis, C., Papadopoulos, K., Dimotikali, D., Calokerinos, A.C., 2012, Luminescent methods in the analysis of untreated edible oils: A review, *Analytical letters*, 45 (5-6), 625-641.
- [738]. Tütem, E., Apak, R., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116 (1), 89-94.
- [739]. Papariello, G.J., Janish, M.A.M., 1996, Diphenylpicrylhydrazyl as an organic analytical reagent in the spectrophotometric analysis of phenols, *Analytical chemistry*, 38 (2), 211-214.
- [740]. Hogg, J.S., Lohmann, D.H., Russell, K.E., 1961, The kinetics of reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl with phenols, *Canadian journal of chemistry*, 39(8), 1588-1594.
- [741]. Plank, D.W., Szpylka, J., Sapirstein, H., Woollard, D., Zapf, C.M., Lee, V., Chen, C.Y.O., Liu, R.H., Tsao, R., Düsterloh, A., Baugh, S., 2012, Determination of antioxidant activity in foods and beverages by reaction with 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH): Collaborative study first action 2012.04, *Journal of AOAC international*, 95 (6), 1562-1569.

- [742]. Blois, M.S., 1985, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- [743]. McGowan, J.C., Powell, T., Raw, R., 1959, 630. The rates of reaction of  $\alpha\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl with certain amines and phenols, *Journal of the chemical society*, 1959 (0), 3103-3110.
- [744]. Sharma, O.P., Bhat, T.K., 2009, DPPH antioxidant assay revisited, *Food chemistry*, 113 (4), 1202-1205.
- [745]. Suja, K.P., Jayalekshmy, A., Arumughan, C., 2005, Food chemistry antioxidant activity of sesame cake extract, *Food chemistry*, 91, 213-219.
- [746]. Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., 2003, Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, *Journal of food science*, 68 (2), 487-490.
- [747]. Ayres, G.H., 1949, Evaluation of accuracy in photometric analysis, *Analytical chemistry*, 21 (6), 652-657.
- [748]. Saito, S., Okamoto, Y., Kawabata, J., 2004, Effects of alcoholic solvents on antiradical abilities of protocatechuic acid and its alkyl esters, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68 (6), 1221-1227.
- [749]. Saito, S., Kawabata, J., 2005, Effects of electron-withdrawing substituents on DPPH radical scavenging reactions of protocatechuic acid and its analogues in alcoholic solvents, *Tetrahedron*, 61 (34), 8101-8108.
- [750]. Sroka, Z., Cisowski, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and chemical toxicology*, 41 (6), 753-758.
- [751]. Barclay, L.R.C., Edwards, C.E., Vinqvist, M.R., 1999, Media effects of antioxidant activities of phenols and catechol, *Journal of the american chemical society*, 121 (26), 6226-6231.
- [752]. Litwinienko, G., Ingold, K.U., 2003, Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph•) in alcohols, *The Journal of organic chemistry*, 68 (9), 3433-3438.
- [753]. Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S., 2009, Review of methods to determine antioxidant capacities, *Food analytical methods*, 2 (1), 41-60.
- [754]. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay, *Analytical biochemistry*, 239 (1), 70-

76.

- [755]. Wettasinghe, M., Shahidi, F., 2002, Iron (II) chelation activity of extracts of borage and evening primrose meals, *Food research international*, 35 (1), 65-71.
- [756]. Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R., 2007, Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food chemistry*, 105 (3), 940-949.
- [757]. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006, Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols, *Food chemistry*, 94 (4), 550-557.
- [758]. Wong, C.C., Li, H. Bin, Cheng, K.W., Chen, F., 2006, A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay, *Food chemistry*, 97 (4), 705-711.
- [759]. Miller, N.J., Rice-evans, C.A., 1997, Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>•+</sup> radical cation assay, *Free radical research*, 26 (3), 195-199.
- [760]. Miller, M., Rao, J.K.M., Wlodawer, A., Gribskov, M.R., 1993, A left-handed crossover involved in amidohydrolase structure catalysis of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase with bound L-aspartate, *FEBS letters*, 328 (3), 275-279.
- [761]. MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: A review, *Journal of the science of food and agriculture*, 86 (13), 2046-2056.
- [762]. Zaporozhets, O.A., Krushynska, O.A., Lipkovska, N.A., Barvinchenko, V.N., 2004, A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (1), 21-25.
- [763]. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical science*, 84 (4), 407-412.
- [764]. Glazer, A. N., 1990, [14] Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in enzymology*, 186, 161-168.
- [765]. Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A., 1995, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free radical biology and medicine*, 18 (1), 29-36.
- [766]. Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free radical biology and medicine*, 14 (3), 303-311.

- [767]. Ou, B., Hampsch-woodill, M., Prior, R.L., 2001, Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (10), 4619-4626.
- [768]. Zulueta, A., Esteve, M.J., Frígola, A., 2009, ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products, *Food chemistry*, 114 (1), 310-316.
- [769]. Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A., 2010, Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems, *Acta biochimica polonica*, 57 (2), 229-234.
- [770]. Cao, G., Prior, R.L., 1999, [5] Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in enzymology*, 299, 50-62.
- [771]. Glazer, A.N., 1990, [14] Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in enzymology*, 186, 161-168,
- [772]. Glazer, A.N., 1988, Fluorescence-based species: assay for reactive oxygen a protective role for creatinine, *The FASEB Journal*, 2 (9), 2487-2491.
- [773]. Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1996, Antioxidant capacity of tea and common vegetables, *Journal of agricultural and food chemistry*, 44 (11), 3426-3431.
- [774]. Handelman, G.J., Cao, G., Walter, M.F., Nightingale, Z.D., Paul, G.L., Prior, R.L., Blumberg, J.B., 1999, Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (12), 4888-4893.
- [775]. Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002, Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (11), 3122-3128.
- [776]. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S., 1985, Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins, *FEBS letters*, 187 (1), 33-37.
- [777]. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R.C., Locke, S.J., 1987, The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma, *Biochimica et biophysica*

acta (BBA) - General subjects, 924 (3), 408-419.

- [778]. D.M. Wayner, D., 1987, Radical-trapping antioxidants in vitro and in vivo, *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 18 (1-3), 219-229.
- [779]. Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.R.J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica chimica acta*, 266 (2), 265-277.
- [780]. Kojima, H., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Hirata, Y., Nagano, T., 1991, Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production, *Angewandte chemie-international edition*, 38 (21), 3209-3212.
- [781]. Tanaka, K., Miura, T., Umezawa, N., Urano, Y., Kikuchi, K., Higuchi, T., Nagano, T., 2001, Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen, *Journal of the American Chemical Society*, 123 (11), 2530-2536.
- [782]. Valkonen, M., Kuusi, T., 1997, Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of lipid research*, 38 (4), 823-33.
- [783]. DeLange, R.J., Glazer, A.N., 1989, Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxyl radicals: A screen for biologically relevant protective agents, *Analytical biochemistry*, 177 (2), 300-306.
- [784]. Bartosz, G., Janaszewska, A., Ertel, D., Bartosz, M., 1998, Simple determination of peroxyl radical-trapping capacity, *Biochemistry and molecular biology international*, 46 (3), 519-528.
- [785]. Roginsky, V., Lissi, E.A., 2005, Food chemistry review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food chemistry*, 92 (2), 235-254.
- [786]. Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970, *The systematic identification of flavonoids*, 1<sup>st</sup> ed, Springer, New York, USA, ISBN: 978-3-642-88460-3.
- [787]. Engelhardt, H., 2004, One century of liquid chromatography From Tswett's columns to modern high speed and high performance separations, *Journal of chromatography B*, 800(1-2), 3-6.
- [788]. Ettre, L.S., Sakodinskii, K.I., 1993, M. S. Tswett and the Discovery of Chromatography h Early Work ( 1899-1903 ), *Chromatographia*, 35 (3-4), 223-231.
- [789]. Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Chinou, I., Zgórká, G., Spitaler, R., Zidorn, C.,



- Skalicka-Woźniak, K., Hanos, M.Ł., Głowniak, K., Hawrył, A., Oniszczyk, A., ChapterRabel, F., Hawrył, M., Markowski, W., Waksmundzka-Hajnos, M., Cieśla, Ł., Hawrył, M., Stecher, G., Mayer, R., Ringer, T., Hashir, M.A., Kasemsook, S., Qureshi, M.N., Bonn, G.K., Wolfender, J.-L., Markowski, W., Waksmundzka-Hajnos, M., Masson, P., Polak, B., 2011, *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*, 1<sup>st</sup> ed, CRC Press, Boca Raton, FL, ISBN: 9781420092608.
- [790]. Snyder, L.R., 1997, Modern practice of liquid chromatography before and after 1971, *Journal of chemical education*, 74 (1), 37-44.
- [791]. Wagner, H., Bladt, S., 1996, *Plant drug analysis*, 2<sup>ed</sup> ed, Springer, Berlin-Heidelberg, Germany, ISBN: 9783642005749.
- [792]. Hostettmann, K., MARSTON, A., Hostettmann, M., 1998, *Preparative chromatography techniques*, 2<sup>ed</sup> ed, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, ISBN:
- [793]. Tyihák, E., Lincsovcics, E., Kalász, H., 1979, New planar liquid chromatographic technique: overpressured thin-layer chromatography, *Journal of chromatography A*, 174 (1), 75-81.
- [794]. Gohlke, R.S., 1959, Time-of-flight mass spectrometry and gas-liquid partition chromatography, *Analytical chemistry*, 31 (4), 535-541.
- [795]. Adams, R.P., 2017, *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*, 4.1<sup>th</sup> ed, Allured publishing corporation, Carol Stream, IL, ISBN: 978-1-932633-21-4.
- [796]. Grob, R.L., Barry, E.F., *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4<sup>th</sup> ed, A John Wiley & Sons, Interscience Publication, New York, USA, ISBN: 9786468600.
- [797]. Kitson, F.G., Larsen, B.S., McEwen, C.N., 1996, *Gas Chromatography and mass spectrometry: A practical guide*, 1<sup>st</sup> ed, Academic press, Boston, MA, ISBN: 0124833853.
- [798]. Niessen, W.M.A., 2011, *Current practice of gas chromatography-mass spectrometry*, Marcel dekker, New York, UAS, ISBN: 0824704738.
- [799]. Cuatrecasas, P., Wilchek, M., Anfinsen, C.B., 1986, Selective enzyme purification by affinity chromatography, *Proceedings of the national academy of sciences*, 61 (2), 636-643.

- [800]. Wilchek, M., Miron, T., 1999, Thirty years of affinity chromatography, *Reactive & functional polymers*, 41 (1-3), 263-268.
- [801]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Cx0RXM e2LLLYxgOr16PYCA&q=HPLC+path+way&oq=HPLC+path+way&gs\\_l=img.3...1120 7.12135..12610...0.0..0.193.897.2j5.....0....1..gws-wiz-img.H30I9g63Uho#imgsrc=t83rP5HoLQvhEM:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=Cx0RXM e2LLLYxgOr16PYCA&q=HPLC+path+way&oq=HPLC+path+way&gs_l=img.3...1120 7.12135..12610...0.0..0.193.897.2j5.....0....1..gws-wiz-img.H30I9g63Uho#imgsrc=t83rP5HoLQvhEM:) [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [802]. Nguyen, D.T.-T., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J., 2006, Review fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure, *Journal of separation science*, 29 (12), 1836-1848.
- [803]. Wolfender, J., 2009, HPLC in Natural Product Analysis: The detection issue, *Planta Medica*, 75 (7), 719-734.
- [804]. Swartz, M.E., 2005, *UPLC: An introduction and review*, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 28 (7-8), 1253-1263.
- [805]. Neue, U.D., Mazzeo, J.R., 2001, A theoretical study of the optimization of gradients at elevated temperature, *Journal of separation science*, 24 (12), 921-929.
- [806]. Sun, S., Su, H., 2002, Validated HPLC method for determination of sennosides A and B in senna tablets, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 29 (5), 881-894.
- [807]. Özkan, S.A., 2007, LC with electrochemical detection. Recent application to pharmaceuticals and biological fluids, *Chromatographia*, 66 (1), 3-13.
- [808]. Ganzera, M., Gampenrieder, J., Pawar, R.S., Khan, I.A., Stuppner, H., 2004, Separation of the major triterpenoid saponins in *Bacopa monnieri* by high-performance liquid chromatography, *Analytica chimica acta*, 516 (1-2), 149-154.
- [809]. Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., 2000, Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis, *Journal of chromatography A*, 882 (1-2), 1-10.
- [810]. Kristl, J., Veber, M., Krajničič, B., Orešnik, K., Slekovec, M., 2005, Determination of jasmonic acid in *Lemna minor* (L.) by liquid chromatography with fluorescence detection, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 383 (5), 886-893.
- [811]. Li, F., Zhang, C., Guo, X., Feng, W., 2003, Chemiluminescence detection in HPLC and CE for pharmaceutical and biomedical analysis, *Biomedical chromatography*, 17 (2-3), 96-105.

- [812]. Ohba, Y., Kuroda, N., Nakashima, K., 2002, Liquid chromatography of fatty acids with chemiluminescence detection, *Analytica chimica acta*, 465 (1-2), 101-109.
- [813]. Zhang, Q., Cui, H., 2005, Simultaneous determination of quercetin, kaempferol, and isorhamnetin in phytopharmaceuticals of *Hippophae rhamnoides* L. by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Journal of separation science*, 28 (11), 1171-1178.
- [814]. Guo, C., Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L., 1997, High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity, *Journal of agricultural and food chemistry*, 45 (5), 1787-1796.
- [815]. Megoulas, N.C., Koupparis, M.A., 2005, Twenty years of evaporative light scattering detection, *Critical reviews in analytical chemistry*, 35 (4), 301-316.
- [816]. Guillarme, D., Rudaz, S., Schelling, C., Dreux, M., Veuthey, J.L., Micro liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detector at ambient and high temperature: Optimization of the nebulization cell geometry, *Journal of chromatography A*, 1192 (1), 103-112.
- [817]. Vervoort, N., Daemen, D., Török, G., 2008, Performance evaluation of evaporative light scattering detection and charged aerosol detection in reversed phase liquid chromatography, *Journal of chromatography A*, 1189 (1-2), 92-100.
- [818]. Foster, M.D., Synovec, R.E., 1996, Reversed phase liquid chromatography of organic hydrocarbons with water as the mobile phase, *Analytical chemistry*, 68 (17), 2838-2844.
- [819]. Nixon, W.C., 1971, The General Principles of Scanning Electron Microscopy, *Philosophical transactions of the royal society of london*, 261 (837), 45-50.
- [820]. C. W., O., W. C., N., R. F. W., P., 2008, Scanning electron microscopy, *Advances in electronics and electron physics*, 21, 181-274.
- [821]. [https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=a4gRXPe8BYXIrgTmhoywBw&q=scanning+electron+microscope+McGraw-Hill+Medical&oq=scanning+electron+microscope+McGraw-Hill+Medical&gs\\_l=img.3...15666.17459..18433...0.0..0.134.1061.5j5.....0...1..gws-wiz-img.urlVpN5jJUy#imgrc=M2DJWHtF3Jpc5M:](https://www.google.com/search?biw=1366&bih=657&tbm=isch&sa=1&ei=a4gRXPe8BYXIrgTmhoywBw&q=scanning+electron+microscope+McGraw-Hill+Medical&oq=scanning+electron+microscope+McGraw-Hill+Medical&gs_l=img.3...15666.17459..18433...0.0..0.134.1061.5j5.....0...1..gws-wiz-img.urlVpN5jJUy#imgrc=M2DJWHtF3Jpc5M:), [Ziyaret tarihi: 20 Ağustos 2018].
- [822]. <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/uc>

[m149499.htm](#), [Ziyaret tarihi: 11 Temmuz 2018].

- [823]. De Haro Moreno, A., Regina Nunes Salgado, H., 2012, Stability study and degradation kinetics of ceftazidime in pharmaceutical preparations, *Advances in analytical chemistry of scientific & academic publishing*, 2 (1), 1-5.
- [824]. Kalinkova, G.N., 1999, Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations, *International journal of pharmaceutics*, 187 (1), 1-15.
- [825]. Ivana, I., Ljiljana, Z., Mira, Z., 2006, A stability indicating assay method for cefuroxime axetil and its application to analysis of tablets exposed to accelerated stability test conditions, *Journal of chromatography A*, 1119 (1-2), 209-215.
- [826]. Waterman, K.C., Adami, R.C., 2005, Accelerated aging: Prediction of chemical stability of pharmaceuticals, *International journal of pharmaceutics*, 293 (1-2), 101-125.
- [827]. Charles, D.J., 2013, *Antioxidant properties of spices, herbs and other sources*, 1<sup>st</sup> ed, Springer, New York, USA, ISBN: 9780874216561.
- [828]. Lalitha, N., Sanjay, P.P.N., Vyshak, M.G., Kadri, U., 2010, Stability-indicating reverse phase HPLC method for the determination of cefazolin, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 9 (1), 45-50.
- [829]. Lu, X., 2006, Simultaneous confidence bounds with applications to drug stability studies, *Tropical journal of pharmaceutical research*, 9 (1), 45-50.
- [830]. Carstensen, J.T., Rhodes, C.T., 2000, *Drug stability: Principles and practices*, 3<sup>rd</sup> ed, Marcel dekker, New York, USA, ISBN: 0824703766.
- [831]. Chow, S.-C., Shao, J., 1991, Estimating drug shelf-life with random batches, *Biometrics*, 47 (3), 1071-1079.
- [832]. Khalifa, N.M., 2010, *Empirical and kinetic models for the determination of pharmaceutical product stability*, Thesis (Master), University of Waterloo.
- [833]. Chow, S.-C., Lin, J.-P., 1995, *Statistical design and analysis in pharmaceutical science: Validation, process control, and stability*, 1<sup>st</sup> ed, Marcel dekker, New York, USA, ISBN: 9780585157450.
- [834]. Florence, A.T., Attwood, D., 2006, *Physicochemical principles of pharmacy*, 4<sup>th</sup> ed, *Pharmaceutical press*, London, UK, ISBN: 9780857111746.
- [835]. Waterman, K.C., Adami, R.C., 2005, Accelerated aging: Prediction of chemical

- stability of pharmaceuticals, *International journal of pharmaceutics*, 293 (1-2), 101-125.
- [836]. Attoe, E.L., Von elbe, J.H., 1981, Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins, *Journal of food science*, 46 (6), 1934-1937.
- [837]. George, F., Figueiredo, P., Toki, K., Tatsuzawa, F., Saito, N., Brouillard, R., 2001, Influence of trans-cis isomerisation of coumaric acid substituents on colour variance and stabilisation in anthocyanins, *Phytochemistry*, 57 (5), 791-795.
- [838]. De Rosso, V.V., Mercadante, A.Z., 2007, Evaluation of colour and stability of anthocyanins from tropical fruits in an isotonic soft drink system, *Innovative food science and emerging technologies*, 8 (3), 347-352.
- [839]. Cai, Y., Sun, M., Corke, H., 1998, Colorant Properties and Stability of *Amaranthus* Betacyanin Pigments, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (11), 4491-4495.
- [840]. Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R., 2006, Betalain stability and degradation - Structural and chromatic aspects, *Journal of food science*, 71 (4), R41-R50.
- [841]. Hendry, G.A.F., Houghton, I.D., 1996, *Natural food colorants*, 2<sup>ed</sup> ed, Springer science + Business media dordrecht, Devon, UK, ISBN: 978-1-4615-2155-6.
- [842]. Huang, A.S., Von Elbe, J.H., 1986, Stability comparison of two betacyanine pigments-amaranthine and betanine, *Journal of food science*, 51 (3), 670-674.
- [843]. Rock, C.L., 1997, Carotenoids: Biology and treatment, *Pharmacology and therapeutics*, 75 (3), 185-197.
- [844]. Gouveia, L., Empis, J., 2003, Relative stabilities of microalgal carotenoids in microalgal extracts, biomass and fish feed: Effect of storage conditions, *Innovative food science and emerging technologies*, 4 (2), 227-233.
- [845]. Tiwari, B.K., Brunton, N.P., Brennan, C.S., 2013, *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*, 1<sup>st</sup> ed, John wiley & sons, Ltd, The Atrium, UK, ISBN: 9781118464717.
- [846]. Chen, J.P., Tai, C.Y., Chen, B.H., Effects of different drying treatments on the stability of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.), *Food chemistry*, 100 (3), 1005-1010.
- [847]. Polyakov, N.E., Leshina, T. V., Meteleva, E.S., Dushkin, A. V., Konovalova, T.A., Kispert, L.D., 2010, Enhancement of the photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles by water-soluble complexes of carotenoids, *Journal of physical chemistry B*, 114 (45),

14200-14204.

- [848]. López-Berenguer, C., Carvajal, M., Moreno, D.A., García-Viguera, C., 2007, Effects of microwave cooking conditions on bioactive compounds present in broccoli inflorescences, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (24), 10001-10007.
- [849]. Pesek, C.A., Warthesen, J.J., 1987, Photodegradation of carotenoids in a vegetable juice system, *Journal of food science*, 53 (3), 744-746.
- [850]. Solomon, O., Svanberg, U., Sahlström, A., 1995, Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8°C, *Food chemistry*, 53 (4), 363-368.
- [851]. Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R., 2008, *Fennema's food chemistry*, 4<sup>th</sup> ed, CRC press, Boca Raton, FL, ISBN: 978-0-8493-9272-6.
- [852]. Wishner, L.A., 1964, Light-induced oxidations in milk, *Journal of dairy science*, 47 (2), 216-221.
- [853]. Zanoni, B., Peri, C., Nani, R., Lavelli, V., 1998, Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying, *Food research international*, 31 (5), 395-401.
- [854]. Minguez-Mosquera, M.I., Jaren-Galan, M., 1995, Kinetics of the decolouring of carotenoid pigments, *Journal of the science of food and agriculture*, 67 (2), 153-161.
- [855]. Saguy, I., Goldman, M., Karel, M., 2006, Prediction of beta-carotene decolorization in model system under static and dynamic conditions of reduced oxygen environment, *Journal of food science*, 50 (2), 526-530.
- [856]. MacDougall, D.B., 2002, *Colour in Food*, 1<sup>st</sup> ed, Woodhead publishing limited and CRC press, Boca Raton, FL, ISBN: 9781855736672.
- [857]. Chou, H.-E, Breene, W.M., 1972, Oxidative decoloration of  $\beta$ -carotene in low-moisture model systems, *Journal of Food Science*, 37 (1), 66-68.
- [858]. Talcott, S.T., Percival, S.S., Pittet-Moore, J., Celoria, C., 2003, Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*), *Journal of agricultural and food chemistry*, 5 (4), 935-941.
- [859]. Ayers, J.E., Fishwick, M.J., Land, D.G., Swain, T., 1964, Off-flavour of dehydrated carrot stored in oxygen, *Nature international Journal of science*, 203, 81-82.
- [860]. Callemien, D., Collin, S., 2007, Involvement of flavanoids in beer color instability during storage, *Journal of agricultural and food chemistry*, 55 (22), 9066-9073.

- [861]. Okogeri, O., Tasioula-Margari, M., 2002, Changes occurring in phenolic compounds and  $\alpha$ -tocopherol of virgin olive oil during storage, *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (5), 1077-1080.
- [862]. Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D., 1992, Phenolic compounds and stability of virgin olive oil-Part I, *Food chemistry*, 45 (2), 141-144.
- [863]. Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., Romero, M.P., 2004, Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction, *Food chemistry*, 85 (3), 357-364 2.
- [864]. Herbach, K.M., Maier, C., Stintzing, F.C., Carle, R., 2007, Effects of processing and storage on juice colour and betacyanin stability of purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) juice, *European food research and technology*, 224 (5), 649-658.
- [865]. Bilyk, A., Kolodij, M.A., Sapers, G.M., 1981, Stabilization of red beet pigments with Isoascorbic acid, *Journal of food science*, 46 (5), 1616-1617.
- [866]. Cai, Y.-Z., Sun, M., Corke, H., 2005, Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae, *Trends in food science & technology*, 16 (9), 370-376.
- [867]. Von Elbe, J.H., Maing, I.-Y., Amundson, C.H., 1974, Colour stability of betanin, *Journal of food science*, 39 (2), 334-337.
- [868]. Attoe, E.L., Von Elbe, J.H., 1982, Degradation kinetics of betanin in solutions as influenced by oxygen, *Journal of agricultural and food chemistry*, 30 (4), 708-712,
- [869]. Prabhakara Rao, P.G., Jyothirmayi, T., Balaswamy, K., Satyanarayana, A., Rao, D.G., 2005, Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana* L.) dye incorporated into some foods, *LWT - Food science and technology*, 38 (7), 779-784.
- [870]. Czapski, J., 1985, The effect of heating conditions on losses and regeneration of betacyanins, *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und forschung*, 180 (1), 21-25,
- [871]. Wasserman, B.P., Eiberger, L.L., Guilfooy, M.P., 1984, Effect of hydrogen peroxide and phenolic compounds on horseradish peroxidase-catalyzed decolorization of betalain pigments, *Journal of food science*, 49 (2), 536-538.
- [872]. Attoe, E.L., von Elbe, J.H., 1984, Oxygen involvement in betanin degradation - Oxygen uptake and influence of metal ions, *Zeitschrift für lebensmittel-untersuchung und forschung*, 179 (3), 232-236.

- [873]. Wagner, L.A., Warthesen, J.J., 1995, Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes, *Journal of food science*, 60 (5), 1048-1053.
- [874]. Pérez-Gálvez, A., Jarén-Galán, M., Mínguez-Mosquera, M.I., 2000, Effect of high-temperature degradative processes ketocarotenoids present in paprika oleoresins, *Journal of agricultural and food chemistry*, 48 (7), 2966-2971.
- [875]. Rangkadilok, N., Tomkins, B., Nicolas, M.E., Premier, R.R., Bennett, R.N., Eagling, D.R., Taylor, P.W.J., 2002, The effect of post-harvest and packaging treatments on glucoraphanin concentration in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), *Journal of agricultural and food chemistry*, 50 (25), 7386-7391.
- [876]. Rodrigues, A.S., Rosa, E.A.S., 1999, Effect of post-harvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli, *Journal of the science of food and agriculture*, 79 (7), 1028-1032.
- [877]. Schouten, R.E., Zhang, X., Verkerk, R., Verschoor, J.A., Otma, E.C., Tijssens, L.M.M., van Kooten, O., 2009, Modelling the level of the major glucosinolates in broccoli as affected by controlled atmosphere and temperature, *Postharvest biology and technology*, 53 (1-2), 1-10.
- [878]. Forney, C.F., Mattheis, J.P., Austin, R.K., Volatile compounds produced by broccoli under anaerobic conditions, 1991, *Journal of agricultural and food chemistry*, 39 (12), 2257-2259.
- [879]. Chen, Z.Y., Zhu, Q.Y., Tsang, D., Huang, Y., 2001, Degradation of green tea catechins in tea drinks, 2001, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (1), 477-482.
- [880]. Mochizuki, M., Yamazaki, S.I., Kano, K., Ikeda, T., 2002, Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins, *Biochimica et biophysica acta - General subjects*, 1569 (1-3), 35-44.
- [881]. Ferreres, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., 1996, Anthocyanins and flavonoids from shredded red onion and changes during storage in perforated films, *Food research international*, 29 (3-4), 389-395.
- [882]. Rodríguez-Saona, L.E., Glusti, M.M., Wrolstad, R.E., 1999, Color and pigment stability of red radish and red-fleshed potato anthocyanins in juice model systems, *Journal of food science*, 64 (3), 451-456.



- [883]. Wrolstad, R.E., Skrede, G., Lea, P., Enersen, G., 1990, Influence of sugar on anthocyanin pigment stability in frozen strawberries, *Journal of food science*, 55 (4), 1064-1065.
- [884]. García-Viguera, C., Zafrilla, P., Romero, F., Abellán, P., Artés, F., Tomás-Barberán, F.A., 1999, Color stability of strawberry jam as affected by cultivar and storage temperature, *Journal of food science*, 64 (2), 243-247.
- [885]. Patras, A., Brunton, N.P., Da Pieve, S., Butler, F., 2009, Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées, *Innovative food science and emerging technologies*, 10 (3), 308-313.
- [886]. Morais, H., Ramos, C., Forgács, E., Cserhádi, T., Oliviera, J., 2002, Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of chromatography B*, 770 (1-2), 297-301.
- [887]. Chen, H.E., Peng, H.Y., Chen, B.H., 2005, Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice, *Food chemistry*, 57 (4), 497-503.
- [888]. Lin, C.H., Chen, B.H., 2004, Stability of carotenoids in tomato juice during storage, *Food chemistry*, 90 (4), 837-846.
- [889]. Bazinet, L., Araya-Farias, M., Doyen, A., Trudel, D., Têtu, B., 2010, Effect of process unit operations and long-term storage on catechin contents in EGCG-enriched tea drink, *Food research international*, 43 (6), 1692-1701.
- [890]. Demeule, M., Michaud-Levesque, J., Annabi, B., Gingras, D., Boivin, D., Jodoin, J., Lamy, S., Bertrand, Y., Béliveau, R., 2002, Green tea catechins as novel antitumor and antiangiogenic compounds, *Current medicinal chemistry - anticancer agents*, 2 (4), 441-463.
- [891]. Proniuk, S., Liederer, B.M., Blanchard, J., 2002, Preformulation study of epigallocatechin gallate, a promising antioxidant for topical skin cancer prevention, *Journal of pharmaceutical sciences*, 9 (1), 111-116.
- [892]. Rostagno, M.A., Palma, M., Barroso, C.G., 2005, Short-term stability of soy isoflavones extracts: Sample conservation aspects, *Food chemistry*, 93 (3), 557-564.
- [893]. Su, Y.L., Leung, L.K., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2003, Stability of tea theaflavins and

catechins, *Food chemistry*, 83 (2), 189-195.

- [894]. Chang, Q., Zuo, Z., Chow, M.S.S., Ho, W.K.K., Effect of storage temperature on phenolics stability in hawthorn (*Crataegus pinnatifida* var. major) fruits and a hawthorn drink, *Food chemistry*, 98 (3), 426-430.
- [895]. Thanajiruschaya, P., Doksaku, W., Rattanachaisit, P., Kongkiattikajorn, J., 2010, Effect of storage time and temperature on antioxidant components and properties of milled rice, *KKU research journal*, 15 (9), 843-851.
- [896]. Uddin, M.S., Hawlader, M.N.A., Ding, L., Mujumdar, A.S., 2002, Degradation of ascorbic acid in dried guava during storage, *Journal of food engineering*, 51 (1), 21-26.
- [897]. Negi, P.S., Roy, S.K., 2001, Retention of quality characteristics of dehydrated green leaves during storage, *Plant foods for human nutrition*, 56 (3) 285-295.
- [898]. Negi, P.S., Roy, S.K., 2000, Effect of low-cost storage and packaging on quality and nutritive value of fresh and dehydrated carrots, *Journal of the science of food and agriculture*, 80 (15), 2169-2175.
- [899]. Rodriguez, M., Sadler, G.D., Sims, C.A., Braddock, R.J., 1991, Chemical changes during storage of an alcoholic orange juice beverage, *Journal of Food Science*, 56 (2), 475-479.
- [900]. Brenes, C.H., Del Pozo-Insfran, D., Talcott, S.T., 2005, Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in a grape juice model system, *Journal of agricultural and Food chemistry*, 53 (1), 49-56.
- [901]. Es-Safi, N.E., Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M., 1999, Studies on the acetaldehyde-induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin 3-O-glucoside in a model solution system, *Journal of agricultural and food chemistry*, 47 (5), 2096-2102.
- [902]. Del Pozo-Insfran, D., Del Follo-Martinez, A., Talcott, S.T., Brenes, C.H., 2007, Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure, *Journal of food science*, 72 (4), S247-S253.
- [903]. Fossen, T., Cabrita, L., Andersen, O.M., 1998, Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region, *Food chemistry*, 63 (4), 435-440.
- [904]. Buckow, R., Kastell, A., Terefe, N.S., Versteeg, C., 2010, Pressure and temperature effects on degradation kinetics and storage stability of total anthocyanins in blueberry

- juice, *Journal of agricultural and food chemistry*, 58 (18), 10076-10084.
- [905]. Friedman, M., Levin, C.E., Lee, S.U., Kozukue, N., 2009, Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months, *Journal of food science*, 74(2), H47-H51.
- [906]. Wang, H., Helliwell, K., 2000, Epimerisation of catechins in green tea infusions, *Food chemistry*, 70 (3), 337-344.
- [907]. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., Heatherbell, D.A., 1990, Influence of processing and storage on the phenolic composition of apple juice, *Journal of agricultural and food chemistry*, 38 (7), 1572-1579.
- [908]. Zafrilla, P., Ferreres, F., Tomás-Barberán, F.A., 2001, Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams, *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 (8), 3651-3655.
- [909]. Malik, N.S.A., Bradford, J.M., 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives, *Scientia horticulturae*, 110 (3), 274-278.
- [910]. Devlin, H.R., Harris, I.J., 1984, Mechanism of the oxidation of aqueous phenol with dissolved oxygen, *Industrial and engineering chemistry fundamentals*, 23 (4), 387-392.
- [911]. Alnaizy, R., Akgerman, A., 2000, Advanced oxidation of phenolic compounds, *Advances in environmental research*, 4 (3), 233-244.
- [912]. Hager, T.J., Howard, L.R., Prior, R.L., 2008, Processing and storage effects on monomeric anthocyanins, percent polymeric color, and antioxidant capacity of processed blackberry products, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (3), 689-695.
- [913]. Kim, E.S., Liang, Y.R., Jin, J., Sun, Q.F., Lu, J.L., Du, Y.Y., Lin, C., 2007, Impact of heating on chemical compositions of green tea liquor, *Food chemistry*, 103 (4), 1263-1267.
- [914]. Akpapunam, M.A., 1984, Effects of wilting, blanching and storage temperatures on ascorbic acid and total carotenoids content of some Nigerian fresh vegetables, *Plant foods for human nutrition*, 34 (3), 177-180.
- [915]. Kenny, O., O'Beirne, D., 2010, Antioxidant phytochemicals in fresh-cut carrot disks as affected by peeling method, *Postharvest biology and technology*, 58 (3), 247-253.
- [916]. Lovrić, T., Sablek, Z., Bošković, M., 1970, Cis-trans isomerisation of lycopene and

colour stability of foam-mat dried tomato powder during storage, *Journal of the science of food and agriculture*, 21 (12), 641-647.

- [917]. Correa, C.R., Li, L., Aldini, G., Carini, M., Oliver Chen, C.Y., Chun, H.K., Cho, S.M., Park, K.M., Russell, R.M., Blumberg, J.B., Yeum, K.J., 2010, Composition and stability of phytochemicals in five varieties of black soybeans (*Glycine max*), *Food chemistry*, 123 (4), 1176-1184.
- [918]. Koski, A., Psomiadou, E., Tsimidou, M., Hopia, A., Kefalas, P., Wähälä, K., Heinonen, M., 2002, Oxidative stability and minor constituents of virgin olive oil and cold-pressed rapeseed oil, *European food research and technology*, 214 (4), 294-298.
- [919]. Hansen, S.L., Purup, S., Christensen, L.P., 2003, Bioactivity of falcarinol and the influence of processing and storage on its content in carrots (*Daucus carota* L.), *Journal of the science of food and agriculture*, 83 (10), 1010-1017.
- [920]. Serris, G.S., Biliaderis, C.G., 2001, Degradation kinetics of beetroot pigment encapsulated in polymeric matrices, *Journal of the science of food and agriculture*, 81 (8), 691-700.
- [921]. Cai, Y.Z., Corke, H., 2000, Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments, *Journal of food science*, 65 (7), 1248-1252.
- [922]. Castellar, M.R., Obón, J.M., Fernández-López, J.A., 2006, The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from *Opuntia stricta* fruits, *Journal of the science of food and agriculture*, 86 (1), 122-128.
- [923]. Davies, C.G.A., Netto, F.M., Glassenap, N., Gallaher, C.M., Labuza, T.P., Gallaher, D.D., 1998, Indication of the maillard reaction during storage of protein isolates, *Journal of agricultural and food chemistry*, 46 (7), 2485-2489.
- [924]. Corey, M.E., Kerr, W.L., Mulligan, J.H., Lavelli, V., 2011, Phytochemical stability in dried apple and green tea functional products as related to moisture properties, *LWT - Food science and technology*, 44 (1), 67-74.
- [925]. Herbach, K.M., Stintzing, F.C., Carle, R., 2006, Stability and color changes of thermally treated betanin, phylloactin, and hylocerenin solutions, *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2), 390-398.
- [926]. Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., Chen, Z.Y., 1997, Stability of green tea catechins, *Journal of agricultural and food chemistry*, 45 (12), 4624-4628.

- [927]. Chen, Z.-Y., Yan Zhu, Q., Fan Wong, Y., Zhang, Z., Yin Chung, H., 1998, Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins, *Journal of agricultural and Food chemistry*, 46 (7), 2512-2516.
- [928]. Xu, J.Z., Leung, L.K., Huang, Y., Chen, Z.Y., 2003, Epimerisation of tea polyphenols in tea drinks, *Journal of the science of food and agriculture*, 83 (15), 1617-1621.
- [929]. Aoshima, H., Ayabe, S., 2007, Prevention of the deterioration of polyphenol-rich beverages, *Food chemistry*, 100 (1), 350-355.
- [930]. Gallarate, M., Carlotti, M.E., Trotta, M., Bovo, S., 1999, On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use, *International journal of pharmaceutics*, 188 (2), 233-241.
- [931]. Schmalko, M.E., Alzamora, S.M., 2001, Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing, *Drying technology*, 19 (3-4), 599-610.
- [932]. Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K., 2003, Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under *Quasi*-physiological conditions, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67 (12), 2632-2640.
- [933]. Awika, J.M., Rooney, L.W., Waniska, R.D., 2004, Properties of 3-deoxyanthocyanins from sorghum, *Journal of agricultural and food chemistry*, 52 (14), 4388-4394,
- [934]. Chai, P.C., Long, L.H., Halliwell, B., 2003, Contribution of hydrogen peroxide to the cytotoxicity of green tea and red wines, *Biochemical and biophysical research communications*, 304 (4), 650-654.
- [935]. Lee, H.L., Ng Bee Lan, A., Teng Yu Hsuan, F., Halliwell, B., 1999, Generation of hydrogen peroxide by “antioxidant” beverages and the effect of milk addition. Is cocoa the best beverage?, *Free radical research*, 31 (1), 67-71.
- [936]. Mortensen, A., Skibsted, L.H., Truscott, T.G., 2001, The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Archives of biochemistry and biophysics*, 385 (1), 13-19.
- [937]. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Okada, Y., 2005, Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha), *Food chemistry*, 89 (4), 569-575.
- [938]. Yu, J., Wang, L., Walzem, R.L., Miller, E.G., Leonard M. Pike, B.S.P., 2005, Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins, *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (6), 2009-2014.

- [939]. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Çelik, S.E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica acta*, 160 (4), 413-419.
- [940]. Seltman, H.J., 2018, *Experimental design and analysis*, <http://www.stat.cmu.edu/~hseltman/309/Book/Book.pdf>, [Ziyaret tarihi: 25 Ağustos 2018].
- [941]. Asghar, A., Raman, A.A.A., Daud, W.M.A.W., 2014, A comparison of central composite design and taguchi method for optimizing fenton process, *Scientific world journal*, 2014, 1-14.
- [942]. Sawyer, S.F., 2009, Analysis of variance: The fundamental concepts, *Journal of manual & manipulative therapy*, 17 (2), 27E-38E.
- [943]. Canchola, J.A., Tang, S., Hemyari, P., Paxinos, E., Marins, E., 2017, Correct use of percent coefficient of variation (%CV) formula for log-transformed data, *MOJ proteomics & bioinformatics*, 6 (4), 316-317.
- [944]. Vaz, M.A.B., Pacheco, P.S., Seidel, E.J., Ansuji, A.P., 2017, Classification of the coefficient of variation to variables in beef cattle experiments, *Ciência Rural*, 47 (11), 1-4.
- [945]. Romano, F. L., Ambrosano, G. M.B., Magnani, M.B.B.A., Nouer, D. F., 2005, Analysis of the coefficient of variation in shear and tensile bond strength tests, *Journal of applied oral science*, 13 (3), 243-246.
- [946]. [www.compton.edu/facultystaff/jmmartinez/docs/Math-150.../Stat-Ch3-Formulas.pdf](http://www.compton.edu/facultystaff/jmmartinez/docs/Math-150.../Stat-Ch3-Formulas.pdf), [Ziyaret tarihi: 25 Ağustos 2018].
- [947]. Meyer, T., 2012, Root mean square error compared to, and contrasted with, standard deviation, *Surveying and land information science*, 72 (3), 107-108.
- [948]. Hall G., 2015, *Pearson's correlation coefficient*, [http://www.hep.ph.ic.ac.uk/~hallg/UG\\_2015/Pearsons.pdf](http://www.hep.ph.ic.ac.uk/~hallg/UG_2015/Pearsons.pdf), [Ziyaret tarihi: 25 Ağustos 2018].
- [949]. Ollevent, N.A., Humphris, G., Roe, B., 1999, How big is a drop? A volumetric assay of essential oils, *Journal of clinical nursing*, 8 (3), 299-304.
- [950]. Cho, H.J., Lee, D.W., Marasini, N., Poudel, B.K., Kim, J.H., Ramasamy, T., Yoo, B.K., Choi, H.G., Yong, C.S., Kim, J.O., 2013, Optimization of self-microemulsifying drug delivery system for telmisartan using Box-Behnken design and desirability function,

*Journal of pharmacy and pharmacology*, 65 (10), 1440-1450.

- [951]. Liu, H.L., Lan, Y.W., Cheng, Y.C., 2004, Optimal production of sulphuric acid by *Thiobacillus thiooxidans* using response surface methodology, *Process biochemistry*, 39 (12), 1953-1961.
- [952]. Li, X.J., Wang, W., Luo, M., Li, C.Y., Zu, Y.G., Mu, P.S., Fu, Y.J., 2012, Solvent-free microwave extraction of essential oil from *Dryopteris fragrans* and evaluation of antioxidant activity, *Food chemistry*, 133 (2), 437-444.
- [953]. Niki, E., Noguchi, N., 2000, Evaluation of antioxidant capacity. What capacity is being measured by which method?, *IUBMB life*, 50(4-5), 323-329.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Elaf Abdelillah Ali Elhussein
Doğum Yeri	Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri
Doğum Tarihi	18.01.1991
Uyruğu	<input type="checkbox"/> T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer:
Telefon	00905385883394
E-Posta Adresi	elafabdelillah@outlook.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	University of science and technology
Fakülte	Faculty of Engineering
Bölümü	Chemical Engineering
Mezuniyet Yılı	22.09.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Mühendisliği
Programı	Temel İşlemler ve Termodinamik

Makale ve Bildiriler	
<b>Bilimsel yayımlar</b>	
<p>1. <b>Elaf Abdelillah Ali Elhussein</b>, Selin Şahin (2018) Drying behaviour, effective diffusivity and energy of activation of olive leaves dried by microwave, vacuum and oven drying methods. <i>Heat and Mass Transfer</i>, <a href="https://doi.org/10.1007/s00231-018-2278-6">https://doi.org/10.1007/s00231-018-2278-6</a>.</p>	
<p>2. Selin Şahin, <b>Elaf Elhussein</b>, Mehmet Bilgin, Jose M. Lorenzo, Francisco J. Barba, Shahin Roohinejad (2018) Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (<i>Olea europaea</i>) leaf. <i>Journal of Food Processing and Preservation</i>, <a href="http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.13604/full">http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.13604/full</a>.</p>	
<p>3. <b>Elaf Abdelillah Ali Elhussein</b>, Selin Şahin, Şahika Sena Bayazit (2018)</p>	



Preparation of CeO<sub>2</sub> nanofibers derived from Ce-BTC metal-organic frameworks and its application on pesticide adsorption. *Journal of Molecular Liquids*, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.165>

4. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Valorization of a biomass: phytochemicals in oilseed by-products. *Phytochemistry Reviews*, <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9552-6>.

5. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Assessment of sesame (*Sesamum indicum* L.) cake as a source of high-added value substances: from waste to health. *Phytochemistry Reviews*, <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9554-4>.

6. Mehmet Bilgin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Özyürek M., Güçlü K., Selin Şahin (2018) Optimizing the Extraction of Polyphenols from *Sideritis montana* L. Using Response Surface Methodology. *Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.05.039>.

7. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Mehmet Bilgin, Kurtulbaş E., Şahika Sena Bayazit (2018) Investigation of extractive interaction between ionic liquids and carbamazepine. *Journal of Molecular Liquids*, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.088>

8. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Kurtulbaş E., Mehmet Bilgin, Birteksöz Tan A.S., Hacıoğlu M., Selin Şahin (2018) Screening of the Most Consumed Beverages and Spices for Their Bioactive Non-Nutrient Contents. *Journal of Food Measurement And Characterization*, <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9846-9>.

9. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Mehmet Bilgin, Selin Şahin (2018) Oxidative Stability of Sesame Oil Extracted from the Seeds with Different Origins: Kinetic and Thermodynamic Studies under Accelerated Conditions, *Journal of Food Process Engineering*, Article DOI: 10.1111/jfpe.12878

### Kongreler

1. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin (2017) Storage Conditions of Olive Leaf Extract: Effect on Oleuropein Stability, *International Conference on Food Science and Bioprocess Technolog*, Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri.

2. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin (2017) Stability of Bioactive Non-Nutrient Resource from Olive Leaf Waste: Ph Influence, *International Conference on Food Science and Bioprocess Technolog*, Dubai, Birleşik Arap Emirlikleri.

3. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Şahika Sena Bayazit (2017) Naproxen Adsorption On Graphene Nanoplatelet/Uio-66 2, 2. *International Conference on Material Science and Technology*, Nevşehir, Türkiye,

4. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin, Şahika Sena Bayazit (2017) Removal Of Ciprofloxacin Antibiotic Using Zirconium Based Metal Organic Frameworks,

*International Conference on Material Science and Technology*, Nevşehir, Türkiye.

5. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Şahika Sena Bayazit (2017) Removal Of Emerging Chemicals Using Uio-66 Metal Organic Frameworks, *International Conference on Material Science and Technology*, Nevşehir, Türkiye.

6. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin, Şahika Sena Bayazit (2017). Preparation Of Graphene Nanoplatelet/Uio-66 Nanocomposite For Removal Of 2,4-D, *International Conference on Material Science and Technology*, Nevşehir, Türkiye.

7. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Ebru Kurtulbaş, Selin Şahin, Mehmet Bilgin, Ayşe Seher Birteksöz Tan (2017) Phytochemicals in the Most Consumed Spices: Antioxidant and Antimicrobial Properties, “*New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare*”, Francavilla al Mare, İtalya.

8. Selin Şahin, Özge Gülmez, Ebru Kurtulbaş, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Mehmet Bilgin (2017). Investigation of the Quality Parameters of Vegetable Oils Treated with Phytochemicals, “*New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare*”, Francavilla al Mare, İtalya.

9. Mehmet Bilgin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin (2017). Investigation of Operation Parameters Influence on Bioactive Ingredients of Endemic Sideritis Montana L. of Turkey, *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, Konya, Türkiye.

10. Mehmet Bilgin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Ebru Kurtulbaş, Selin Şahin, Ayşe Seher Birteksöz Tan (2017). Determination of Individual Phytochemicals with Health Benefits in the Most Popular Beverages, “*New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare*”, Francavilla al Mare, İtalya.

11. Ebru Kurtulbaş, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Özge Gülmez, Selin Şahin, Mehmet Bilgin (2017). Effects of Phytochemicals on the Oxidative Stability of Cottonseed Oil, “*New & Old Phytochemicals: Their Role in Ecology, Veterinary & Welfare*”, Francavilla al Mare, İtalya

12. Ebru Kurtulbaş, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Selin Şahin, Mehmet Bilgin (2017). Screening of Biological Active Ingredients of the Most Consumed Beverages: A Comparative Study, *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, Konya, Türkiye.

13. **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Ebru Kurtulbaş, Selin Şahin, Mehmet Bilgin (2017). Bioactive Contents of Commonly Used Spices in Turkey: A Comparative Study, *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, Konya, Türkiye.

14. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein**, Mehmet Bilgin (2017). Screening of Polyphenol Levels in Olive Tree (*Olea europaea*) Levaes Dried by Several Methods, *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, Konya, Türkiye.

15. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Ph and Temperature Influence on Stability Of Biophenols in Olive Leaf Extract During Storage, *The 4th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, Antalya/ Turkey

16. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Storage stability of olive leaf extract rich in oleuropein: Effect of light, *The 4th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, Antalya/ Turkey

17. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Valorization of Sesame Oil Waste As a Phytonutrient Resource, *The 4th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, Antalya/ Turkey

18. Ebru Kurtulbaş, Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Investigation of Phenolic Antioxidants In Several Parts of Kiwifruit, *The 4th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, Antalya/ Turkey

19. Selin Şahin, **Elaf Abdelillah Ali Elhussein** (2018) Effect of temperature on the stability of phenolic antioxidants in olive leaf extract during storage, *The 4th International Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants*, Antalya/ Turkey

#### **Proje**

Atık Sularındaki Hidroksitorozolce Zengin Biyofenollerin Geri Kazanımında Yüksek Seçimli Adsorban Olarak Grafen Oksidin İncelenmesi: Denge ve Kinetik Modelleri, TÜBİTAK PROJESİ (1002), Bursiyer, 2017- 2018