



**FARKLI ZEYTİN ÇEŞİDİ YAPRAKLARINDAN OLEUROPEİNİN  
EKSTRAKSİYONU, KISMİ SAFLAŞTIRILMASI, ANTİOKSİDAN VE  
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**SEMRA TOPUZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BAYRAM**

**Ocak - 2019**

**Her hakkı saklıdır**

**T.C.  
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI ZEYTİN ÇEŞİDİ YAPRAKLARINDAN OLEUROPEİNİN  
EKSTRAKSİYONU, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI, ANTİOKSİDAN  
VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**SEMRA TOPUZ**

**TOKAT  
Ocak - 2019**

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması;**

**Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2017/98 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Semra TOPUZ tarafından hazırlanan “Farklı Zeytin Çeşidi Yapraklarından Oleuropeinin Ekstraksiyonu, Kısmi Saflaştırılması, Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 21 OCAK 2019 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği / ~~Oy Çokluğu~~ ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

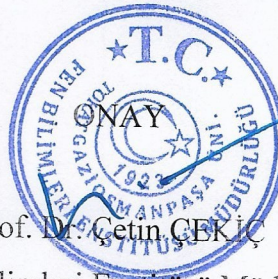
İmza

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BAYRAM  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Üye  
Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Üye  
Doç. Dr. Cemal KAYA  
Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

  
.....  
  
.....  
  
.....



Prof. Dr. Cetin CEKİCİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

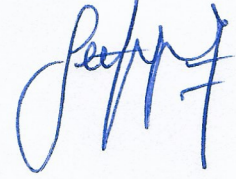
25.01/2019

## TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

**SEMRA TOPUZ**

**21 Ocak 2019**



## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### FARKLI ZEYTİN ÇEŞİDİ YAPRAKLARINDAN OLEUROPEİNİN EKSTRAKSİYONU, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI, ANTİOKSİDAN VE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

SEMRA TOPUZ

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI:DR. ÖĞR. ÜYESİ MUSTAFA BAYRAM)

Zeytin ağacı yetiştiriciliğinin ve zeytin işleme endüstrisinin yan ürünlerinden biri olan zeytin yaprağı fenolik bileşiklerin potansiyel bir kaynağıdır. Zeytin yaprağında bulunan en baskın fenolik bileşik ise oleuropeindir. Bu araştırmada, farklı zeytin çeşidi yapraklarından oleuropeinin ekstrakte edilmesi, saflaştırılması ve antioksidan, antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, Domat, Edremit, Trilye çeşidi zeytin ağacı yapraklarından; zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein elde edilmiştir. Elde edilen zeytin yaprağı ürünlerinin LC-MS/MS ile oleuropein miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik madde miktarı, ABTS ve DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesi ve “96 kuyucuklu MİK Plaka” yöntemiyle *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium ve *Staphylococcus aureus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ürünlerinin oleuropein miktarlarının 215.26-958.22 mg/g aralığında, toplam fenolik madde miktarlarının gallik asit ve oleuropein eşdeğeri cinsinden sırasıyla 102.36-325.02 mg GAE/g ile 308.06-915.33 mg OE/g aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Zeytin yaprağı ürünlerinin ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivitelerinin sırasıyla 104.83-456.50 mg TE/g ile 109.27-456.93 mg TE/g aralığında değiştiği belirlenmiştir. *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ve *S. aureus* kültürleri için MİK değerlerinin ise 1:1 (%10) ile 1:64 (%0.156) aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, farklı zeytin çeşidi yapraklarından elde edilen ham ekstraktların ve bu ekstraktlardan saflaştırılan oleuropeinin belirlenen antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

2019, 87 SAYFA

**ANAHTAR KELİMELER:** Antimikrobiyal, Antioksidan, Fenolik bileşik, Oleuropein, Saflaştırma, Zeytin Yaprağı

## **ABSTRACT**

### **MASTER THESIS**

#### **EXTRACTION AND PARTIAL PURIFICATION OF OLEUROPEIN FROM LEAVES OF DIFFERENT OLIVE VARIETIES, DETERMINATION OF ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL CHARACTERISTICS**

**SEMRA TOPUZ**

**TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY  
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES**

**DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING**

**(SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. MUSTAFA BAYRAM)**

Olive leaf which is one of the by-products of olive tree cultivation and olive processing industry, is a potential source of phenolic compounds. The most dominant phenolic compound in olive leaf is oleuropein. In this study, it was aimed to extract, purify oleuropein from leaves of different olive varieties and determine antioxidant and antimicrobial activity. For this purpose, Olive leaf crude extract, partially purified oleuropein and purified oleuropein were obtained from the leaves of Domat, Edremit, Trilye olive tree varieties. The amount of oleuropein (using LC-MS/MS), total phenolic content (Folin-Ciocalteu method), antioxidant activity (ABTS and DPPH methods) of olive leaf products were determined. Antimicrobial activity of olive leaf products were determined against *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium and *Staphylococcus aureus* microorganisms by “96-well microtiter Plate” method. Oleuropein amount of olive leaf products ranged between 215.26-958.22 mg/g, total phenolic content in terms of gallic acid and oleuropein ranged between 102.36-325.02 mg GAE/g and 308.06-915.33 mg OE/g, respectively. Moreover, ABTS and DPPH methods and antioxidant activities of olive leaf products ranged between 104.83-456.50 mg TE/g and 109.27-456.93 mg TE/g, respectively. It was determined that MIC values for *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* and *S. aureus* cultures ranged between 1:1 (10%) to 1:64 (0.156%). In conclusion, the crude extracts obtained from different olive leaf varieties and oleuropein purified from these crude extracts have potential to extend shelf life of food products due to their determined antioxidant and antimicrobial activities.

2019, 87 PAGE

**KEYWORDS:** Antimicrobial, Antioxidant, Phenolic compound, Oleuropein, Purification, Olive leaf

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması, hazırlanması ve yürütülmesi sırasında değerli bilgi ve katkılarıyla bana yol gösteren her konuda yardımını esirgemeyen danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa BAYRAM'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekstraksiyon aşamasında yardımlarından dolayı Prof. Dr. Ramazan ERENLER ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKŞİT'e mikrobiyoloji çalışmaları sırasında deneyimlerini paylaşan Doç. Dr. Şeniz KARABIYIKLI'ya tezin hazırlanması sırasında bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve tezin değerlendirilmesinde değerli katkılarını sunan jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ ve Sayın Doç. Dr. Cemal KAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte her zaman yanımda olan, her aşamayı heyecanla takip eden, desteklerini hayatım boyunca hissettiğim değerli aileme saygılarımı sunarım.

**SEMRA TOPUZ**

**21 Ocak 2019**



# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	4
2.1. Zeytin Ağacının Kökeni ve Dünyaya Yayılışı .....	4
2.2. Dünyada Zeytincilik.....	5
2.3. Türkiye’de Zeytincilik .....	6
2.4. Zeytin Yaprağı.....	8
2.5. Zeytin Yaprağında Bulunan Fenolik Bileşikler.....	8
2.5.1. Sekoiridoitler .....	10
2.5.2. Oleuropein .....	11
2.6. Oleuropeinin Biyosentezi .....	12
2.7. Oleuropeinin Biyolojik Aktiviteleri .....	14
2.7.1. Antioksidan aktivite .....	14
2.7.2. Antimikrobiyal aktivite .....	16
2.8. Zeytin Yaprağı Ham Ekstraktının ve Oleuropeinin Gıdalarda Kullanım Olanakları .....	22
2.8.1. Yemeklik yağlarda kullanım olanakları .....	22
2.8.2. Et ve et ürünlerinde kullanım olanakları .....	25
2.8.3. Süt ve süt ürünlerinde kullanım olanakları .....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyal .....	29
3.1.1. Bitkisel materyal .....	29
3.1.2. Kimyasal materyal .....	29
3.1.3. Test kültürleri .....	30
3.1.4. Kullanılan alet ve ekipmanlar .....	30
3.2. Yöntem .....	30

3.2.1. Zeytin yaprağından ham ekstrakt ve oleuropein ekstraksiyonu.....	30
3.2.2. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması.....	34
3.2.3. İTK ile birleştirilecek fraksiyonların belirlenmesi.....	34
3.2.4. Oleuropein miktarının analizi.....	34
3.2.5. Toplam fenolik madde tayini.....	35
3.2.6. Katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS <sup>•+</sup> ).....	36
3.2.7. Serbest radikali giderme aktivitesi (DPPH <sup>•</sup> ).....	36
3.2.8. Ekstraktların ve oleuropeinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi.....	37
3.2.9. İstatistiksel analiz.....	38
<b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. Ekstraksiyon Verimi.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2. İTK ile Birleştirilecek Fraksiyonların Belirlenmesi.....</b>	<b>40</b>
<b>4.3. Oleuropein Miktarı.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS<sup>•+</sup>).....</b>	<b>51</b>
<b>4.6. Serbest Radikali Giderme Aktivitesi (DPPH<sup>•</sup>).....</b>	<b>54</b>
<b>4.7. Ekstraktların ve Oleuropeinin Antimikrobiyal Aktivitesi.....</b>	<b>57</b>
<b>5. SONUÇ.....</b>	<b>62</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>65</b>
<b>7. EKLER.....</b>	<b>76</b>
<b>7.1. Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi.....</b>	<b>76</b>
<b>7.2. LC-MS/MS ile Oleuropein Standardının Kalibrasyon Eğrisi.....</b>	<b>77</b>
<b>7.3. ABTS Yönteminde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi.....</b>	<b>78</b>
<b>7.4. DPPH Yönteminde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi.....</b>	<b>79</b>
<b>7.5. <i>E. coli</i> O157:H7'ye Karşı Antimikrobiyal Aktivite.....</b>	<b>80</b>
<b>7.6. <i>L. monocytogenes</i>'e Karşı Antimikrobiyal Aktivite.....</b>	<b>81</b>
<b>7.7. <i>S. aureus</i>'a Karşı Antimikrobiyal Aktivite.....</b>	<b>82</b>
<b>7.8. <i>S. Typhimurium</i>'a Karşı Antimikrobiyal Aktivite.....</b>	<b>83</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>84</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
μ	Mikro ön eki
>	Büyük
≥	Büyük veya eşit
<	Küçük
±	Artı veya eksi
≈	Yaklaşık olarak
a*	(+) Kırmızı, (-) Yeşil
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu
CCl <sub>4</sub>	Karbon tetraklorür
C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>13</sub>	Oleuropein
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
Cu	Bakır
DPPH	2,2 difenil-1-pikrilhidrazil
Fe	Demir
hA	Hektar alan
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HOCl	Hipokloröz asit
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Potasyum peroksidisülfat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum karbonat
NO	Nitrik oksit
ONOO <sup>-</sup>	Peroksinitrit
O <sub>2</sub>	Oksijen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit anyonu
Troloks	(±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
Zn	Çinko

<b><u>Kısaltmalar</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
ATCC	Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin Trifosfat
BHA	Bütillendirilmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş Hidroksitoluen
bkz	Bakınız
dk	Dakika
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FC	Folin–Ciocalteu
g	Gram
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
GES	Geraniol Sentaz
GE10H	Geraniol 10-hidroksilaz
GPP	Geranil Pirofosfat
GT	Glikozil Transferaz
IC50	%50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
kg	Kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
LAMT	Loganik Asit Metil Transferaz
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometresi
log	Logaritmik birim
MAP	Modifiye Atmosfer Paketleme
MBK	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MFC	Minimum Mantar Öldürücü Konsantrasyon
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mL	Mililitre
mg	Miligram
nm	Nanometre

MÖ	Milattan Önce
MS	Milattan Sonra
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NDGA	Nordihidroguairatik Asit
NDHI	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Dezhidrojenaz
OE	Oleuropein Eşdeğeri
ppm	Parts per million
Rf	Alıkonma Zamanı
RSM	Yüzey Cevap Yöntemi
SPSS	Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
TBA	Tiyobarbütirik Asit
TBHQ	Tersiyer Butilhidrokinon
TE	Troloks Eşdeğeri
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole
VIS	Görünür
vb	Ve benzeri
W	Watt

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2.1. Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler .....	10
Şekil 2.2. Oleuropeinin yapısal formülü .....	11
Şekil 2.3. Oleuropeinin $\beta$ -glükozidaz enzimi ile hidrolizi.....	12
Şekil 2.4. Oleuropein bileşiğinin biyosentez yolu .....	13
Şekil 3.1. Domat, Edremit, Trilye çeşitlerine ait zeytin yaprakları .....	29
Şekil 3.2. Zeytin yaprağından ham ekstrakt ve oleuropein ekstraksiyonuna ait akım şeması .....	31
Şekil 3.3. Zeytin yaprağından ham ekstrakt eldesi .....	32
Şekil 3.4. Zeytin yaprağı ham ekstraktından kısmi saflaştırılmış oleuropein eldesi .....	33
Şekil 3.5. Kısmi saflaştırılmış oleuropeinden saflaştırılmış oleuropein eldesi. 33	
Şekil 3.6. MİK plakalarının inkübasyon sonrası görüntüsü ( <i>L. monocytogenes</i> için).....	38
Şekil 4.1. Kolon kromatografisinden toplanan fraksiyonların İTK üzerinde UV ve serik sülfat belirteci ile belirlenmesi .....	41
Şekil 4.2. Oleuropein standardı kromatogramı .....	42
Şekil 4.3. Oleuropein standardı kütle spektrumu.....	42
Şekil 4.4. Zeytin yaprağından elde edilen ürünlere ait bir kromatogram .....	43

## ÇİZELGE LİSTESİ

<b><u>Çizelge</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Dünya zeytin üretim alanı ve üretilen zeytin miktarı .....	5
Çizelge 2.2. Bazı ülkelerin 2017 yılında zeytin üretim alanı ve üretim miktarları .....	6
Çizelge 2.3. Türkiye'nin sahip olduğu zeytin ağacı sayısı ve zeytin üretim miktarı .....	7
Çizelge 3.1. LC-MS/MS koşulları .....	35
Çizelge 3.2. LC-MS/MS gradient sistem çözücü konsantrasyonu .....	35
Çizelge 4.1. Zeytin yapraklarının ekstraksiyon verimleri.....	39
Çizelge 4.2. Oleuropein standardına ait LC-MS/MS verileri .....	42
Çizelge 4.3. Zeytin yapraklarının ve ekstraktların oleuropein miktarları.....	44
Çizelge 4.4. Zeytin yapraklarının ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarları.....	46
Çizelge 4.5. Zeytin yapraklarının ve ekstraktların katyon radikali giderme aktivitesi .....	51
Çizelge 4.6. Zeytin yapraklarının ve ekstraktların serbest radikali giderme aktivitesi .....	55
Çizelge 4.7. Ekstraktların MİK değerleri.....	57

## 1. GİRİŞ

Tarımsal ürünlerin hasat edilmesi ve endüstriyel olarak işlenmesi sonucunda birçok yan ürün ortaya çıkmakta ve bu yan ürünlerin bazıları önemli düzeyde çeşitli fenolik bileşikleri ihtiva edebilmektedir (Souilem ve ark., 2017). Bitkilerin sekonder metabolitleri olan ve bitkinin bazı zararlılara karşı kendini savunmasında rol oynayan fenolik bileşikler (Oskay ve Oskay, 2009) antioksidan, antimikrobiyal aktivite göstermeleri bakımından da büyük önem arz etmektedir (Xu ve ark., 2016). Sentetik antioksidan ve antimikrobiyal maddelerin yan etkisi ve toksisitesine karşı şüphelerin giderek artmasından (Aytul, 2010), ayrıca klinik olarak geniş bir kullanım alanına sahip sentetik antimikrobiyal maddelere zamanla mikroorganizmalar tarafından direnç oluşturulabilmesinden dolayı bu doğal kaynaklar araştırmacıların da ilgisini çekmektedir (Bisignano ve ark., 1999). Bundan dolayı bitkisel orijinli yan ürünlerin gıda, kozmetik, ilaç sanayinde ve çeşitli endüstriyel uygulamalarda doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılmasına yönelik araştırmalar artmaktadır (Şahin ve Bilgin, 2018). Bu ilginin yanısıra, söz konusu yan ürünlerin biyoaktif etkilerini değerlendirmek ve uygun ekstraksiyon tekniklerini belirlemek amacıyla, kimyasal bileşimleri ayrıntılı olarak araştırılmaktadır (Souilem ve ark., 2017). Bu amaçla uygulanabilir süreçlere ulaşmak için, doğrudan gıda maddesi olarak kullanılmayan ve ekonomik açıdan yüksek maliyet gerektirmeyen farklı yan ürünlerin kullanımına yönelik çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Gullón ve ark., 2018). Belirtilen özelliklere sahip, fenolik bileşikler açısından zengin yan ürünlerden biri de zeytin yaprağıdır (Talhoui ve ark., 2015).

Zeytin ağacı, botanik orijin sınıflandırma sistemine göre 29 cinse ve yaklaşık 600 türe sahip Oleaceae familyasının (Bıçakçı ve ark., 2009; Elgin-Cebe ve ark., 2012), Olea cinsinin *Olea europaea* türünün *Olea europaea sativa* alt türüne dahildir (Boskou, 1996).

Dünyanın tropik ve ılıman bölgelerine özgü olan zeytin ağacı, tarımı yapılan en eski bitkilerden biridir (Özcan ve Matthäus, 2017). Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2017 yılı verilerine göre Türkiye zeytin üretim alanı açısından dünyada 6. sırada, zeytin meyvesi üretimi açısından ise dünyada 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2017a). Dünya üzerinde zeytin meyvesi genel olarak sofralık zeytine ve yağa işlenerek



değerlendirilmektedir. Zeytin ağacının kalan kısımları ve zeytinin endüstriyel olarak işlenmesi sonucunda açığa çıkan kalıntılar ise zeytin yan ürünleri olarak kabul edilmektedir (Souilem ve ark., 2017). Bu yan ürünlerin birçoğu teknolojik uygulamalarla değerlendirilmemekte, ayrıca depolanması ve yok edilmesi üreticiler için maliyeti arttırmaktadır. Söz konusu yan ürünlerden biri olan zeytin yaprağı; zeytin ağaçlarının budanması, zeytin meyvelerinin toplanması ve zeytinyağının üretim basamaklarından biri olan temizleme-harmanlama işlemleri sırasında açığa çıkmaktadır. Budama ile açığa çıkan zeytin yaprağı miktarı budama şekli ve ağacın yaşına bağlı olarak 12 ile 30 kg/ağaç aralığında değişkenlik göstermektedir (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Zeytin yaprağı, yağ ekstraksiyonu için toplanan zeytin ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Talhaoui ve ark., 2015). Zeytin ağacı yetiştiriciliğinin yaygın olduğu bazı bölgelerde, zeytin yaprakları çiftlik hayvanlarının beslenmesinde veya zeytin dalları ile birlikte yakacak olarak kullanılabilir (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Bunların yanısıra zeytin yaprağı yüzyıllar boyunca geleneksel olarak, ağız temizliğinde, mide ve bağırsak rahatsızlıklarının, idrar yolu enfeksiyonlarının, ve bronşiyal astımın tedavisinde kullanılmıştır (Sabry, 2014). Günümüzde ise insan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda zeytin yaprağının hipoglisemik (Wainstein ve ark., 2012), antihipertansif (Romero ve ark., 2016), antikarsinojenik (Boss ve ark., 2016), antioksidan (Difonzo ve ark., 2017), antimikrobiyal (Liu ve ark., 2017), antiinflamatuvar (Qabaha ve ark., 2018) etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir. Zeytin yaprağının sahip olduğu bu etkilerin çoğunun zeytin yaprağında bulunan oleuropein bileşiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bundan dolayı, son yıllarda zeytin yaprağından katma değeri yüksek bileşiklerin ekstrakte edilmesine yönelik bazı çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Altıok ve ark., 2008). Ekstraksiyon yönteminin zeytin yaprağından elde edilen ekstrakt miktarını ve bileşimini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir (Taamalli ve ark., 2012). Zeytin yaprağından elde edilen fenolik ekstraktın miktarı ve bileşimini kullanan ekstraksiyon yöntemleri dışında zeytin ağacının cinsi, hasat dönemi, çevresel ve iklimsel şartlar, bitki hastalıkları, toprak çeşidi, coğrafi bölge, olgunluk, nem içeriği gibi birçok faktör etkileyebilmekte, bu noktada uygun zeytin ağacı türünün seçilmesi büyük önem arz etmektedir (Romani ve ark., 1999).

Bu araştırmada, zeytin ağacı yetiştiriciliğinde ve zeytin işleme endüstrisinde açığa çıkan yan ürünlerden biri olan zeytin yaprağından katma değeri yüksek oleuropein bileşiğinin; farklı zeytin çeşidi yapraklarından ekstrakte edilmesi, saflaştırılması ve antioksidan, antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla i) Aynı yetiştirme koşulları altında ve aynı bölgede bulunan 3 farklı zeytin ağacına (Domat, Edremit, Trilye) ait yapraklardan katı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile zeytin yaprağı ham ekstraktları elde edilmiş ii) Zeytin yaprağı ham ekstraktlarının suda özündürülmesinden sonra, sıvı-sıvı ekstraksiyon tekniği ile kısmi saflaştırılmış oleuropein elde edilmiş, iii) Kısmi saflaştırılmış oleuropein Sefadeks LH-20 kolon kromatografiden geçirilerek saflaştırılmış oleuropein elde edilmiş iv) Elde edilen zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin antioksidan aktivitesi ve gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Zeytin Ağacının Kökeni ve Dünyaya Yayılışı

Dünyada tarımı yapılan en eski ağaçlardan biri olan zeytin ağacı (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sativa*), eski tarihlerden beri birçok efsanelere ve geçmiş uygarlıkların yazıt ve kitabelerine konu olmuş, ilahi dinlere ait kutsal kitaplarda yer almıştır. Zeytin ağacının muhtemelen birkaç farklı alanda birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Arkeolojik ve genetik araştırmalara göre, günümüzde yetiştiriciliği yapılan *O. europaea* L. türü zeytinin, 6000 yıl önce Orta Doğu'da var olan *O. oleaster* (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) yabancı türünün ehlileştirilmesi ile yetiştirildiği düşünülmektedir. Her iki tür de genetik olarak birbirine benzerlik göstermektedir (Diez ve ark., 2015).

Suriye ve Filistinli çiftçiler, yaklaşık 6000 yıl önce çeşitli ıslah çalışmaları sonucunda, dikenli yabancı zeytin ağaçlarından Güney Kafkasya'dan İran platolarına kadar uzanan geniş alanlarda dikensiz ve yağ oranı yüksek meyvelere sahip çeşitler elde etmeyi başarmışlardır. Milattan önce (MÖ) 3000-2000 yılları arasında zeytin ağacı Doğu Akdeniz'den Yunanistan ve Ege Adalarına doğru yayılmaya başlamıştır. Bununla birlikte zeytine verilen önem artmış ve zeytin ağacı daha seçici bir ıslaha tabi tutulmuştur. Zeytin ağacının MÖ 1000 yıllarında ise Sicilya ve Tunus'a doğru göç ettirildiği düşünülmektedir. Zeytin MÖ 4. yüzyılda muhtemelen Etrürya bölgesinden Roma topraklarına girmiştir. Bu noktaya kadar zeytinin batıya doğru hareketi Fenikeli ve Yunan tüccarların aracılığı ile gerçekleşmiştir. Zeytin, İspanya, Güney Fransa ve Kuzey Afrika gibi Akdeniz'e kıyısı olan birçok bölgeye yayılmıştır. Romalılar Akdeniz'in dört bir yanındaki tüm toprakları fethederek geniş bir imparatorluk oluşturmuş ve büyüyen iç talebi karşılamak için zeytin yetiştiriciliğini yeni alanlarda da devam ettirmişlerdir. Milattan sonra (MS) 2. ve 3. yüzyıllarda özellikle kuzeyde, aynı zamanda İspanya, Dalmaçya ve Provence'de zeytin yetiştiriciliği çok büyük önem kazanmıştır (Gaetano ve ark., 2016).

Roma İmparatorluğu'nun yıkılmasından sonra, Ortaçağ'ın başlarında geniş alanların terk edilmesi ve nüfusun azalmasından dolayı zeytin sahip olduğu önemini kaybetmiştir. Zeytin daha sonra Arapların hakim olduğu bölgelerde önem arz etmeye başlamıştır.

Avrupa'da sınırlı olan zeytinyağı tüketimi, 15-17. yüzyıllarda artmış ve Ege topraklarından Avrupa'ya ithal gerçekleştirilmiştir. Böylece zeytin tekrardan eski önemini kazanmış ve zeytin yetiştiriciliği tekrar yaygınlaşmıştır. Bu bölgelerde zeytin yetiştiriciliği günümüzde de devam etmektedir. 16. yüzyılın ortalarından sonra zeytin ağacı İspanya'dan Peru'ya, 19. yüzyılın ortasında ise İspanyol misyonerler tarafından Kaliforniya'ya taşınmıştır. İtalyan göçmenler de zeytin ağacının Arjantin'e göçünü sağlamıştır (Gaetano ve ark., 2016).

## 2.2. Dünyada Zeytincilik

Dünyanın pek çok yerinde yetiştirilen zeytin ağacının temel alanı %98 üretim payı ile Akdeniz Bölgesi'dir (Vogel ve ark., 2014). Türkiye, Yunanistan, İtalya, Fransa, İspanya, Portekiz, Fas, Tunus, Cezayir, Mısır, İsrail ve Suriye'yi içeren Akdeniz havzasında; Avustralya kıtasının bir kısmında ve Amerika Birleşik Devletleri'nin Kaliforniya eyaletinde zeytin ağacı yetiştirilmektedir (Başoğlu, 2010).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2017 yılı verilerine göre dünyada 10 804 517 hektar alan (hA) üzerinde 20 872 788 ton zeytin meyvesi üretimi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2.1)

**Çizelge 2.1.** Dünya zeytin üretim alanı ve üretilen zeytin miktarı (Anonim, 2017a)

Yıl	Üretim Alanı (hA)	Üretim Miktarı (ton)
2000	8 351 778	15 654 217
2001	8 441 533	15 334 345
2002	8 463 525	15 965 256
2003	8 825 139	18 463 929
2004	9 110 605	18 051 285
2005	9 188 091	15 965 113
2006	9 252 566	18 713 075
2007	9 354 887	16 979 435
2008	9 460 578	17 781 851
2009	9 659 650	19 022 164
2010	9 899 557	20 422 207
2011	10 037 683	21 226 184
2012	10 223 493	17 691 830
2013	10 250 677	22 022 791
2014	10 131 418	16 204 050
2015	10 141 126	20 595 045
2016	10 604 658	20 344 597
2017	10 804 517	20 872 788

Çizelge 2.2’de belirtildiği gibi İspanya 2 554 829 hA alanı ve 6 549 499 ton zeytin meyvesi üretimi ile hem üretim alanı hem üretim miktarı açısından dünyada 1. sırada yer almaktadır. İspanya’yı üretim alanı sıralamasında 1 685 301 hA ile Tunus, 1 325 451 hA ile İtalya izlemektedir. Türkiye ise 846 062 hA ile dünya zeytin üretim alanı sıralamasında 6. sırada yer almaktadır. Dünya zeytin üretim miktarları açısından ise İspanya’yı 2 720 488 ton ile Yunanistan, 2 576 891 ton ile İtalya izlemektedir. Türkiye ise 2 100 000 ton ile dünya zeytin üretim miktarı sıralamasında 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2017a).

**Çizelge 2.2.** Bazı ülkelerin 2017 yılında zeytin üretim alanı ve üretim miktarları (Anonim, 2017a)

Ülke	Üretim Alanı (hA)	Üretim Miktarı (ton)
İspanya	2 554 829	6 549 499
Tunus	1 685 301	896 807
İtalya	1 325 451	2 576 891
Fas	1 020 569	1 039 117
Yunanistan	871 892	2 720 488
Türkiye	846 062	2 100 000
Suriye	745 278	871 814
Cezayir	432 961	684 461
Portekiz	358 276	876 215
Mısır	81 039	927 595

### 2.3. Türkiye’de Zeytincilik

Ülkemizde zeytin üretimi, Ege Bölgesi’nde: Balıkesir, Manisa, İzmir, Aydın, Denizli, Muğla illerinde (Öztürk ve ark., 2009), Karadeniz Bölgesi’nde: Trabzon, Samsun illerinde ve özellikle Artvin-Yusufeli yöresinde yer alan Çoruh vadisinde, Marmara Bölgesi’nde: özellikle Gemlik ve Mudanya’da, Akdeniz Bölgesi’nde: Hatay ve Adana illeri başta olmak üzere çok az kıyı şeridinde, Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ise Kahramanmaraş, Nizip, Kilis ve Gaziantep’te yapılmaktadır (Başoğlu, 2010).

Türkiye’de tarım yapılan alanların yaklaşık %2’sini; bağ, bahçe tarımı yapılan alanlarımızın ise yaklaşık %22’sini zeytin tarımı yapılan alanlar oluşturmaktadır. Bölgelerimizde zeytin ağaç sayısı ve üretim miktarı çoktan aza doğru Ege Bölgesi, Marmara Bölgesi, Akdeniz Bölgesi, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Karadeniz Bölgesi şeklinde sıralanmaktadır (Menduh, 2015).

Zeytin meyveleri sofralık olarak değerlendirilmesinin yanı sıra yağa işlenerek değerlendirilmektedir. Dünya genelinde üretilen zeytinlerin yaklaşık %10'u yağlık, %90'ı sofralık olarak işlenirken (Anonim, 2015), ülkemizde yağlık olarak işlenen zeytin miktarı sofralık olarak işlenen miktardan daha fazladır (Anonim, 2017b).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2017 verilerine göre (bkz. Çizelge 2.3.), Türkiye genelinde toplam; 148 263 000 adet meyve veren, 26 331 000 adet meyve vermeyen zeytin ağacı mevcut olup, ağaç başına ortalama 14.16 kg zeytin verimi ile 2 100 000 ton zeytin alındığı, bunun 460 000 tonunun sofralık zeytine, 1 640 000 tonunun ise yağlık olarak işlenmek üzere ayrıldığı belirlenmiştir (Anonim, 2017b).

**Çizelge 2.3.** Türkiye'nin sahip olduğu zeytin ağacı sayısı ve zeytin üretim miktarı (Anonim, 2017b)

Yıl	Ağaç Sayısı (Bin)			Üretim Miktarı (Ton)		
	Toplam Ağaç Sayısı	Meyve Veren Ağaç Sayısı	Meyve Vermeyen Ağaç Sayısı	Toplam Üretim Miktarı	Sofralık Üretim Miktarı	Yağlık Üretim Miktarı
2000	97 770	89 200	8 570	1 800 000	490 000	1 310 000
2001	99 000	90 000	9 000	600 000	235 000	365 000
2002	101 600	91 700	9 900	1 800 000	450 000	1 350 000
2003	102 750	92 250	10 500	850 000	350 000	500 000
2004	107 100	94 950	12 150	1 600 000	400 000	1 200 000
2005	113 180	96 625	16 555	1 200 000	400 000	800 000
2006	129 265	97 773	31 492	1 766 749	555 749	1 211 000
2007	144 329	104 219	40 110	1 075 854	455 385	620 469
2008	151 630	106 139	45 491	1 464 248	512 103	952 145
2009	153 723	109 127	44 596	1 290 654	460 013	830 641
2010	156 448	111 398	45 050	1 415 000	375 000	1 040 000
2011	154 611	117 942	36 669	1 750 000	550 000	1 200 000
2012	157 061	120 821	36 240	1 820 000	480 000	1 340 000
2013	167 030	129 161	37 869	1 676 000	390 000	1 286 000
2014	168 997	140 712	28 285	1 768 000	438 000	1 330 000
2015	171 992	144 760	27 232	1 700 000	400 000	1 300 000
2016	173 785	147 430	26 355	1 730 000	430 000	1 300 000
2017	174 594	148 263	26 331	2 100 000	460 000	1 640 000

## **2.4. Zeytin Yaprağı**

Zeytin ağacı yetiştiriciliğinde ve zeytin işleme endüstrisinde çok sayıda yan ürün ortaya çıkmaktadır. Zeytin yaprağı da bu yan ürünlerden birisidir. Zeytin yaprağı yağ ekstraksiyonu için toplanan zeytin ağırlığının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Talhaoui ve ark., 2015). Ayrıca, ağaçların budanması ve zeytin meyvelerinin toplanması sırasında çiftliklerde büyük miktarlarda birilmektedir. Bazı bölgelerde, zeytin yaprakları çiftlik hayvanlarının beslenmesinde veya zeytin dalları ile toplanan yapraklar yakacak olarak kullanılmakta olsada bu yan ürünün depolanması ve yok edilmesi üreticiler için maliyeti arttıran unsurlar olarak ortaya çıkmaktadır (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve Aktaş, 2011). Ayrıca yüzyıllar boyunca zeytin yaprağı Akdeniz halk hekimliğinde ateş, sıtma ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Son zamanlarda yapılan araştırmalar neticesinde, zeytin yaprağının sağlık üzerine olumlu etkilere sahip olduğu belirtilmiş ve bu durum yaprakta bulunan yüksek fenolik bileşik miktarı ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda sentetik bileşiklerin yan etkisi ve toksisitesine karşı şüphelerin giderek artmasından dolayı çeşitli biyolojik aktivitelere sahip fenolik bileşiklerin kimya, gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde kullanımı üzerine çalışmalar artmıştır (Bayçın-Hızal, 2006). Gıda sanayinde bu bileşikler fonksiyonel gıda bileşeni, gıda katkı maddesi ve doğal renklendirici olarak kullanılabilir (Altıok ve ark., 2008). Bundan dolayı literatürde zeytin, zeytin yaprağı ekstraktı ve ekstraktın ana sekoiridoit bileşiğinin (oleuropein) gıdalarda kullanım olanağının araştırılmasına yönelik yapılan çalışmalar her geçen gün artmaktadır (Erbay ve İçier, 2010).

## **2.5. Zeytin Yaprağında Bulunan Fenolik Bileşikler**

Zeytin yaprağının antioksidan (Benavente-Garcia ve ark., 2000), antimikrobiyal (Korukluoğlu ve ark., 2010), hipokolesterolemik (Jemai ve ark., 2009), kardiyoprotektif (Nekooeian ve ark., 2014) gibi birçok etkiye sahip olduğu bildirilmektedir. Zeytin yaprağının sahip olduğu bu yararlı etkiler yapısında bulunan fenolik bileşiklerle ilişkilendirilmektedir (Vogel ve ark., 2014).

Fenolik bileşikler, hemen hemen tüm meyve ve sebzelerde az veya çok miktarda bulunan, bulunduğu meyve ve sebze acılık ve burukluk gibi tat özelliklerinin yanısıra

sarı, sarı-esmer, kırmızı-mavi renk tonlarındaki renk özelliği kazandıran sekonder metabolitlerdir (Bianco ve Uccella, 2000; Nizamlioglu ve Nas, 2010).

*O. europaea* L. bitkisinin yapraklarında, meyvelerinde ve çekirdeklerinde bulunan fenolik bileşiklerin çeşidi ve miktarı farklılık gösterebilmektedir (Özcan ve Matthäus, 2017).

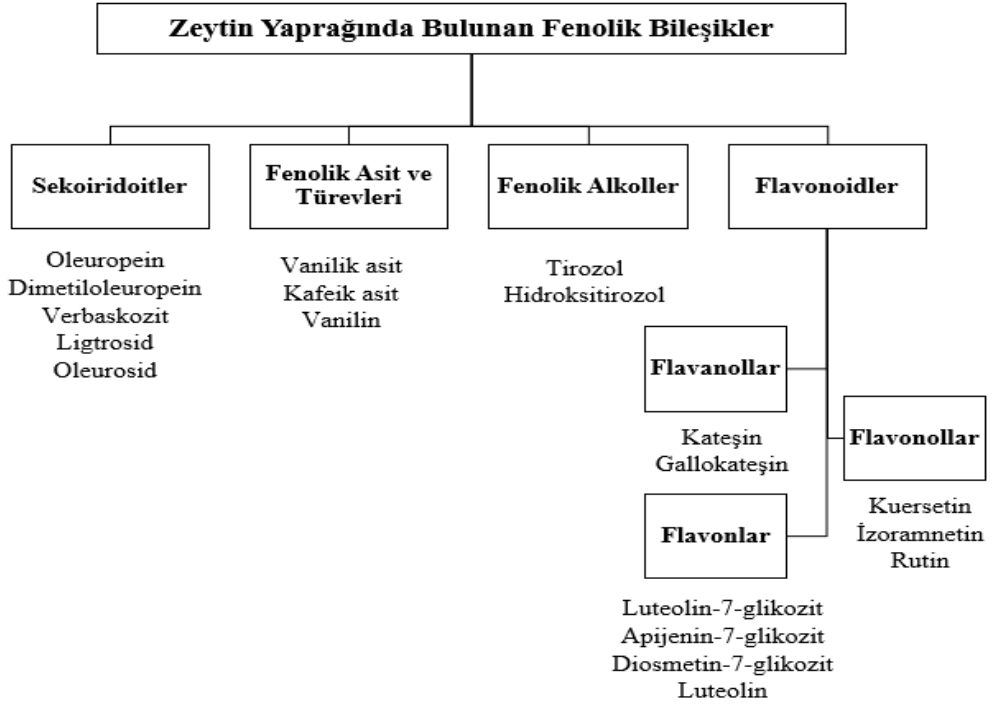
Fenolik bileşikler; bitki dokularının normal gelişimi sırasında sentezlenen önceden oluşmuş “esas fenolik bileşikler” ve fiziksel yaralanmaya, enfeksiyona tepki olarak veya bitkilerin ağır metal-tuzları, ultraviyole (UV) ışını, sıcaklık gibi faktörler tarafından strese girdiği zaman sentezlenen “uyarılmış fenolik bileşikler” olarak ikiye ayrılabilir. Uyarılmış fenolik bileşikler de esas olarak sentezlenebilir fakat sentezleri sıklıkla farklı stres faktörleri altında gerçekleşmektedir. Zeytin yapraklarının fenolik bileşik kompozisyonunu nicel ve nitel olarak değiştiren bu faktörler abiyotik ve biyotik faktörler olarak adlandırılmaktadır (Talhaoui ve ark., 2015).

Abiyotik faktörler, canlı organizmaların ve toprak, su, hava, sıcaklık, nem, ışık gibi ekosistemlerin işleyişini etkileyen canlı olmayan kimyasal ve fiziksel çevre parçalarıdır. Aksine, biyotik faktörler, başka bir organizmayı etkileyen herhangi bir canlı bileşendir. Biyotik faktörler genellikle hayvan ve insan etkilerinin yanısıra bitkiler, mantarlar ve bakterilerden oluşmaktadır. Zeytin yaprağındaki fenolik bileşiklerin miktarını; coğrafi bölge, iklimsel koşullar, hasat zamanı, su stresi, tuzluluk, gübreleme, UV ışını gibi abiyotik faktörlerin yanısıra, funguslar, bakteriler, genotip, yaprak yaşı, periyodisite gibi biyotik faktörlerde etkilemektedir (Talhaoui ve ark., 2015).

Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin sınıflandırılması Şekil 2.1’de verilmiştir. Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler: sekoiridoitler (oleuropein, dimetiloleuropein, verbaskozit, ligitrosid, oleurosid), fenolik asit ve türevleri (vanilik asit, kafeik asit, vanilin), fenolik alkoller (tirozol, hidroksitirozol) ve flavonlar (luteolin-7-glikozit, apijenin-7-glikozit, diosmetin-7-glikozit, luteolin ve diosmetin), flavonollar (kuersetin, izoramnetin, rutin), flavanolları (kateşin, gallokateşin) içeren flavonoidler şeklinde sınıflandırılabilir (Şahin, 2011; Talhaoui ve ark., 2015).



Zeytin yaprağı ekstraktlarındaki ana fenolik bileşikler; oleuropein, hidrokstitirozol, verbaskozit, apijenin-7-glikozit ve luteolin-7-glikozitdir (Özcan ve Matthäus, 2017).



**Şekil 2.1.** Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşikler

Zeytin yapraklarının en baskın fenolik bileşiği oleuropeindir. Bunu hidrokstitirozol, luteolin ve apijenin flavon-7-glikozitleri ve verbaskozit takip etmektedir. Hidrokstitirozol, oleuropeinin temel parçalanma ürünüdür. Meyvenin olgunlaşması sırasında ve zeytinin işlenmesi sonucunda oleuropein miktarında azalma ve hidrokstitirozol miktarında artma meydana gelmektedir (Özcan ve Matthäus, 2017).

### 2.5.1. Sekoiridoitler

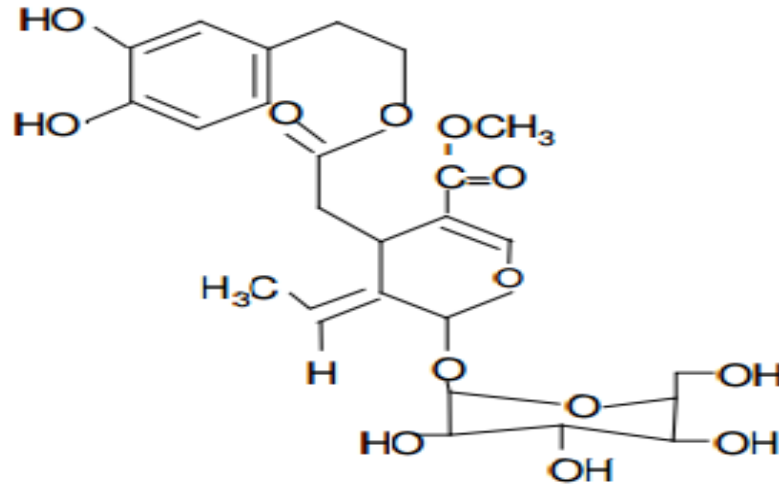
Oleuropein bileşiği Oleaceae familyasına ait pek çok bitkide bol miktarda bulunan sekoiridoit adı verilen kumarin benzeri bileşiklerin çok spesifik bir grubuna ait fenolik bileşiktir. İridoidler ve sekoiridoitler, genellikle glikozidik olarak bağlı, çeşitli indol alkaloidlerin öncüleri olarak terpenlerin sekonder metabolizmasından üretilen bileşiklerdir. Oleaceae'daki sekoiridoitler genellikle oleosit glikozitlerden (oleositler) türemiş olup bunlar elenolik asit ve glikozidik kökün kombinasyonu, bir eksosiklik 8,9-olefinik işlevselliği ile karakterize edilmektedir. Oleuropein,

Oleaceae'nın sekoiridoit glikozitlerine ortak olan 2'-(3',4'-dihidroksifenil) etanolün (hidroksitirozol) ve oleosidik iskeletin bir esteridir (Soler-Rivas ve ark., 2000).

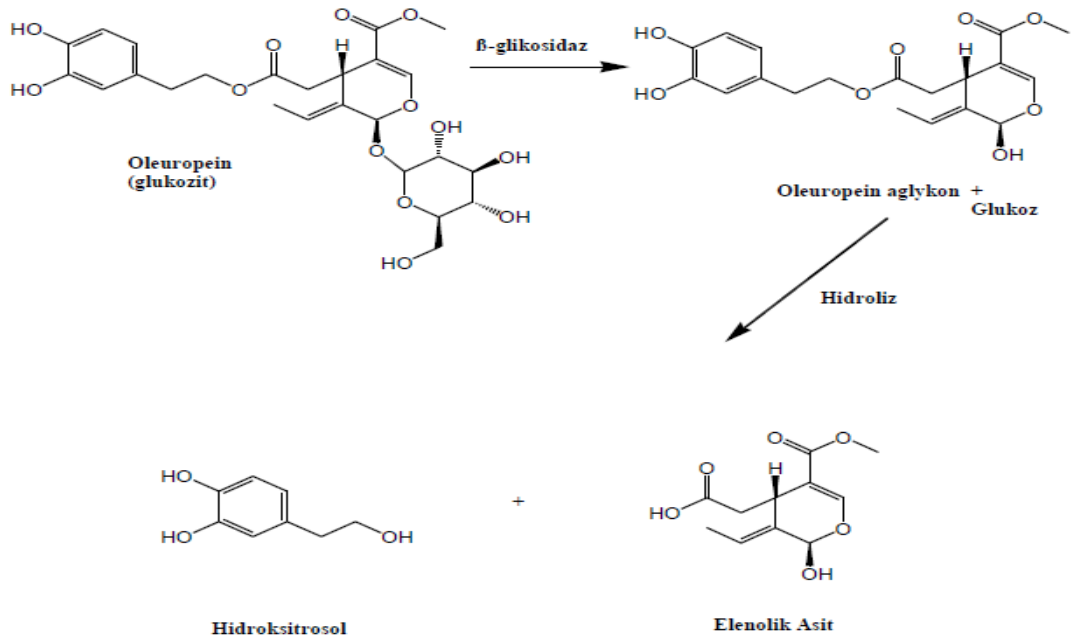
### 2.5.2. Oleuropein

Zeytinde fenolik bileşikler arasında en baskın olanı oleuropeindir (Bouaziz ve Sayadi, 2005). Oleuropein bileşiği ilk kez 1908 yılında Bourquelot ve Vintilesco tarafından keşfedilmiş, bileşiğin yapısı ise 1960 yılında tanımlanmıştır (Panizzi ve ark., 1960).

Elenolik asit ve 3,4-dihidroksifeniletanolün heterozidik esteri olan oleuropein, zeytin meyvesi ve yaprağında doğal olarak bulunmaktadır (Iraqi ve ark., 2005). Yani oleuropein molekülü hidroksitirozol olarak bilinen 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2-diol, elenolik asit olarak adlandırılan sekoiridoit ve glikoz molekülü olmak üzere üç yapısal birimden oluşmaktadır (Omar, 2010a). Oleuropeinin molekül formülü  $C_{25}H_{32}O_{13}$  ve molekül ağırlığı 540.518 g/mol olup (Anonim, 2017c) organik yapısı Şekil 2.2'de parçalanma ürünleri ise Şekil 2.3'te verilmiştir.



Şekil 2.2. Oleuropeinin yapısal formülü (Winkelhausen ve ark., 2015)



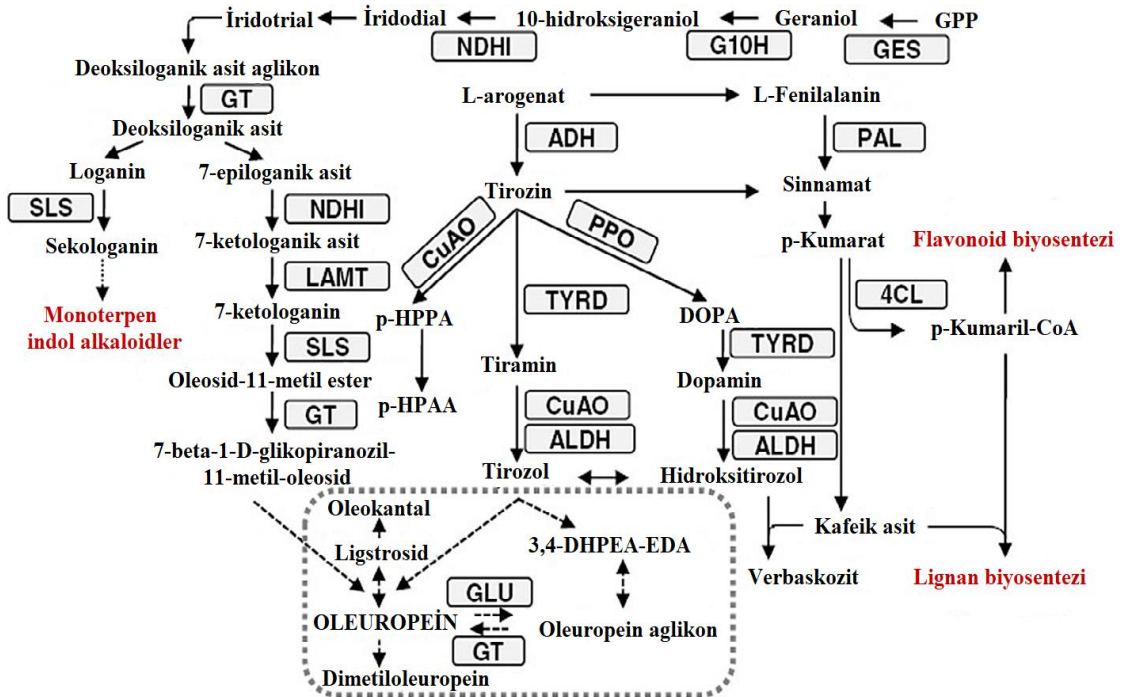
**Şekil 2.3.** Oleuropeinin  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile hidrolizi (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006)

## 2.6. Oleuropeinin Biyosentezi

Oleuropein bileşiği esas olarak Oleaceae familyasında baskın olarak bulunmakta ve bu familyada alt cins sınıflandırılmasında kemotaksonomik bir belirteç sayılmaktadır (Hassen ve ark., 2015).

Bu ailenin içinde oleuropein ayrıca *Syringa pubescens* (Deng ve ark., 2010), *Syringa reticulata* (Bi ve ark., 2011), *Syringa dilatata* (Oh ve ark., 2003), *Syringa oblata* var. *alba* (Nenadis ve ark., 2007), *Ligustrum vulgare* (Tattini ve ark., 2004), *Ligustrum lucidum* (Guo ve ark., 2011), *Jasminum officinale* var. *grandiflorum* (Teerarak ve ark., 2010), *Fraxinus excelsior* (Egan ve ark., 2004), *Fraxinus ornus* (Iossifova ve ark., 1998), *Fraxinus oxycarba* (Hosny, 1998), *Fraxinus americana* (Sanz ve ark., 2012), *Fraxinus angustifolia* (Calis ve ark., 1996), *Phillyrea angustifolia* (DellaGreca ve ark., 2011), *Phillyrea latifolia* (Agati ve ark., 2011), *Osmanthus asiaticus* (Sugiyama ve ark., 1993), *Osmanthus cymosus* (Kubba ve ark., 2005), *Osmanthus austrocaledonica* (Benkrief ve ark., 1998) ve *Chionanthus virginicus* (Boyer ve ark., 2005) gibi türlerden izole edilmiştir.

Oleuropein, geranil pirofosfattan (GPP) türetilen ligstrositten türetilmektedir. Metabolik yolun ilk adımı geraniol sentaz (GES) tarafından katalize edilmekte ve ürün olarak geraniol oluşmaktadır. Geraniol ise 10-hidroksilaz (GE10H) aracılığıyla 10-hidroksigeraniol'a dönüştürülmektedir (GE10H=CYP76B alt familyasına ait bir sitokrom P450 monooksijenaz). NADH dehidrojenaz (NDHI)'ın biyokimyasal aktivitesiyle 10-hidroksigeraniol, deksiloganik asit aglikona çevrilmiştir. Deksiloganik asitin (çeşitli monoterpen indol alkaloidleri ve oleuropein'in bir öncüsü) oluşumu için deksiloganik asit aglikona ait glikozilik grupların transferi glikoziltransferaz (GT) aracılığıyla yapılmaktadır. Deksiloganik asit 7-epiloganik asit oluşturmak üzere siklopentan halkasının 7- $\alpha$ -hidroksilasyonuna uğramakta, ayrıca NDHI aracılığıyla hidroksil grubunun oksidasyonu ile 7-ketologanik aside dönüştürülmektedir. Sonrasında, 7-ketologaninin oluşumunu sağlayan 7-ketologanik asitin metilasyonu ise loganik asit metiltransferaz (LAMT) ile katalize edilmektedir. Bu noktada, sekologanin sentaz (SLS) oleosid-11-metil ester oluşumunu sağlar ve daha sonra oleosid-11-metil ester GT tarafından 7- $\beta$ -1-D-glikopiranosil-11-metil oleoside glikolize edilir. Bu sonuncu bileşen, ligstrosid oluşturmak üzere tirozol ile bir esterifikasyon reaksiyonuna girer ve son aşamada hidroksilasyon reaksiyonuyla oleuropein oluşur (Hassen ve ark., 2015).



Şekil 2.4. Oleuropein bileşiğinin biyosentez yolu (Alagna ve ark., 2012; Hassen ve ark., 2015)

## 2.7. Oleuropeinin Biyolojik Aktiviteleri

Oleuropeini önemli kılan sahip olduğu antimikrobiyal (Sanchez ve ark., 2007) antioksidan (Dua ve ark., 2015), antidiyabetik (Qadir ve ark., 2016), antikanser (Goulas ve ark., 2009), antiinflamatuvar, hipokolesterolemik (Hadrich ve ark., 2016), kardiyovasküler sistemi koruyucu (Bulotta ve ark., 2014), obeziteyi önleyici (Vogel ve ark., 2014) etkileridir. Sahip olduğu bu etkilerden dolayı gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe kullanım olanağı bulabilmektedir (Romero-Garcia ve ark., 2016). Gıda ve ilaçlarda kullanılan bazı ajanlar çok sayıda yan etkiye sahiptir. Örneğin bugüne kadar obeziteyi kontrol altına almak için, açlığı baskılayan ve besinlerin emilimini engelleyen orlistat içerikli ilaçlar kullanılmıştır. Bu ajan uyku bozukluğu halsizlik, kabızlık, mide bulantısı, baş ağrısı, karın ağrısı gibi yan etkilere sebep olabilmektedir (Hadrich ve ark., 2016). Bu gibi durumlar neticesinde yapay bileşiklerin yan etkisi ve toksisitesine karşı şüpheler giderek artmakta böylece bitkisel orijinli doğal kaynaklara olan ilgide hızlı bir artış meydana gelmektedir. Bu duruma paralel olarak doğal bir bileşik olan oleuropeinin kullanım alanları üzerine çalışmalar da hızla artmaktadır (Bouaziz ve Sayadi, 2005).

### 2.7.1. Antioksidan aktivite

Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan oleuropein ve diğer fenolik bileşikler sahip olduğu yüksek antioksidan aktiviteden dolayı gıdalarda doğal antioksidan olarak kullanılabilir. Antioksidanlar gıdaların işlenmesi ve depolanması sürecinde meydana gelen lipid peroksidasyon sürecini geciktiren, raf ömrünü arttıran gıda katkı maddeleri olarak kullanılabilir (Bouaziz ve Sayadi, 2005).

Oleuropein serbest radikalleri temizlediğinden dolayı güçlü bir antioksidan aktiviteye sahiptir (Cicerale ve ark., 2012). Sahip olduğu bu özellik *in vitro* ve *in vivo* testlerle kanıtlanmıştır. Oleuropeinin sahip olduğu potansiyel antioksidan aktivite esas olarak hidroksil gruplarının varlığından (özellikle 1,2-dihidroksibenzen kısmı) kaynaklanmaktadır. Hidroksil grupları oksidasyonu engellemek için kendi hidrojenlerini vererek serbest radikalleri nötralize etmektedir. Oleuropein, hem serbest radikalleri süpürebilme hem de metal şelatlama aktivitesine sahip olduğundan metallerin başlattığı lipid oksidasyonlarından membranları koruyabilmektedir (Hassen ve ark., 2015).

Bu varsayımı destekler nitelikte, Czerwińska ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, oleuropein ve dialdehidik türevi olan oleasinin *in vitro* hücre dışı sistemlerde reaktif oksijen (superoksit anyon,  $O_2^-$ ; hidrojen peroksit,  $H_2O_2$ ; hipokloröz asit, HOCl) ve nitrojen türleri (nitrik oksit, NO; peroksinitrit, ONOO $^-$ ) üretimini baskıladığı tespit edilmiştir. Ayrıca, oleuropeinin HOCl oluşumunu katalize eden miyeloperoksidaz enziminin salınımını azalttığı da belirlenmiştir. Yine hücre dışı sistemlerde, oleuropeinin meme kanseri MCF-7 ve T-47D hücre hatlarından reaktif oksijen oluşumunu tetikleyen  $H_2O_2$ 'yi belirgin bir şekilde inhibe ettiği tespit edilmiştir (Bulotta ve ark., 2011).

Bazı *in vivo* çalışmalarda ise oleuropeinin alloksana bağlı şeker hastalığına sahip tavşanlarda (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006), kolesterol açısından zengin diyetle beslenen sıçanlarda (Jemai ve ark., 2009) ve akut arseniğe maruz kalmış sıçanlarda (Kotyzová ve ark., 2011) süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz gibi enzimatik antioksidanların seviyesini ve aktivitesini ve glutatyon,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların seviyesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca oleuropeinin karbon tetraklorür ( $CCl_4$ ) toksikasyonuna maruz kalmış farelerin stoplazma ve çekirdeklerinde Cu/Zn süperoksit dismutaz aktivitesini ve glutatyon seviyesini artırıp, HO-1 ve Nrf2'nin ekspresyonunu başlattığı, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz ve 3-nitrotirozin seviyelerinde önemli azalmalara neden olduğu belirtilmiştir (Domitrović ve ark., 2012). Bu etkilerin yanısıra, oleuropeinin kreatin fosfokinaz, kreatin fosfokinaz-MB, laktat dehidrogenaz, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz aktivitelerini arttırdığı, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ekspresyonunu inhibe ettiği, tiyobarbütirik asit (TBA) reaktif maddelerini ve protein karbonillerin oluşumunu engellediği belirlenmiştir (Andreadou ve ark., 2007).

Benavente-Garcia ve ark. (2000) zeytin yaprağı ekstraktlarında mevcut olan ana fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini belirlemişlerdir. Hidroksitirozolun, oleuropeinin, kafeik asitin ve tirozolun toksisite bulgusu olmaksızın lökositlerle etkileşerek reaktif oksijen türlerinin oluşumunu önleyebildikleri saptanmıştır.

Oleuropein bileşiğinin serbest radikal oluşumunu önlemesi, serbest radikal oluşum reaksiyonlarını katalize eden Cu ve Fe gibi metal iyonlarını şelatlama ve siklooksijenaz yolunu etkilemeden, lipoksijenaz gibi bazı antiinflamatuvar enzimleri inhibe edebilme

yeteneği ile ilişkili olabileceği belirlenmiştir. Hem oleuropein hemde hidrokstitirozolun, hipoklorik asit turevi radikaller ve n6trofillerin solunum patlamasını engelleyebildiği ve s6peroksit anyonları temizleyebildiği bildirilmiştir (6zcan ve Matth6us, 2017).

Literat6rde oleuropein bileşiğinin gıda teknolojisi alanında antioksidan ajan olarak kullanımına y6nelik 7alışmalar da bulunmaktadır (Dua ve ark., 2015).

Benavente-Garcia ve ark. (2000) yaptıkları 7alışmada, zeytin yaprağında bulunan bazı bireysel fenolik bileşikleri tespit etmiş ve bileşiklerin 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-s6lfonik asit katyon radikalini (ABTS<sup>•+</sup>) giderme aktivitelerini sırasıyla rutin > kateşin ≈ luteolin > zeytin yaprağı ekstraktı ≈ hidrokstitirozol > diosmetin > kafeik asit > verbaskozit > oleuropein > luteolin-7-glikozit ≈ vanilik asit ≈ diosmetin-7-glikozit > apijenin-7-glikozit > tirozol > vanilin olarak belirlemişlerdir.

Bir başka 7alışmada zeytin yaprağı ekstraktının *in vitro* antioksidan aktivitelerini değerlendirmek i7in, zeytin yaprağı ekstraktının 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini giderme aktivitesi 6l76lm6ř ve b6tillendirilmiş hidrokisianisol (BHT) (IC50:17.02 μg/ml) ile karşılaştırılmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktları serbest radikalleri s6p6rmeyi başarmış ve BHT'ye kıyasla daha y6ksek antioksidan aktivite g6stermişlerdir. Nitekim, bir7ok 7eşidin yaprak ekstraktı [Chemlali (IC50: 7.90 μg/mL), Rosicola (IC50: 10.88 μg/mL), Limouni (IC50: 12.25 μg/mL), Chetoui (IC50: 15.09 μg/mL), Meskid (IC50: 15.24 μg/mL) ve Lucques (IC50: 16.10 μg/mL)] BHT'den daha y6ksek aktivite g6stermiştir (Salah ve ark., 2012).

Beltran ve ark. (2014) yaptıkları 7alışmada oleuropeinin par7alanma 6r6nlerinden biri olan hidrokstitirozolu ambalajlama materyallerinde antioksidan olarak kullanmış ve bu bileşiğin aktif ambalajlama teknolojisinde alternatif doğal bir kaynak olabileceğini belirtmişlerdir.

### **2.7.2. Antimikrobiyal aktivite**

Gıda kaynaklı patojenler insan sağlığına 6nemli derecede olumsuz etkide bulunan salgınlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, gıda kaynaklı patojenlerin kontrol6 gıda end6strisi i7in b6y6k 6nem arz etmektedir. Gıda kaynaklı patojenler, sentetik ve doğal

antimikrobiyal bileşikler olarak sınıflandırılabilen gıda koruyucularının kullanılması ile kontrol altına alınabilmektedir. Bitkisel antimikrobiyal maddeler, sentetik gıda koruyucularına kıyasla, genellikle daha güvenli olarak kabul edilmekte ve insan sağlığına yararlı etkileri olabileceğinden daha fazla dikkat çekmektedir. Ayrıca, bitkisel antimikrobiyallerin gıdaların muhafaza süresini uzatmasının yanısıra lezzet verici özelliğinden de yararlanılabilmektedir (Liu ve ark., 2017). Klinik olarak geniş bir kullanım alanına sahip antimikrobiyal ilaçlar ciddi yan etkilere sebep olmalarının yanı sıra sahip oldukları dar antimikrobiyal spektrumdan ve zamanla mikroorganizmalar tarafından kendilerine oluşturulan dirençten dolayı yerini oleuropein gibi bitkisel kaynaklı antimikrobiyal maddelere bırakmaktadır (Bisignano ve ark., 1999).

Bisignano ve ark. (1999) oleuropein ve hidrokstirozolun 5 ATCC bakteri suşuna (*Haemophilus influenzae* ATCC 9006, *Moraxella catarrhalis* ATCC 8176, *Salmonella* Typhi ATCC 6539, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) ve 44 klinik izolata (*H. influenzae*, 8 suş; *M. catarrhalis*, 6 suş; *Salmonella* spp., 15 suş; *V. cholerae*, 1 suş; *V. alginolyticus*, 2 suş; *V. parahaemolyticus*, 1 suş; *S. aureus*, 5 penisiline duyarlı suş ve 6 penisiline dirençli suş) karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Oleuropeinin ATCC suşları için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin 62.5-500 µg/mL, klinik izolatlar için 31.25-250 µg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Hidrokstirozolun ATCC suşları için MİK değerlerinin 0.24-7.85 µg/mL, klinik izolatlar için 0.97-31.25 µg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda hidrokstirozolun oleuropeinden daha etkili olduğu bildirilmiştir.

Furneri ve ark. (2002) tarafından yapılan bir çalışmada, oleuropeinin *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma pirum*'a karşı antimikrobiyal aktivitesi araştırılmış ve oleuropeinin 20-320 mg/L (µg/mL) aralığındaki konsantrasyonlarının yukarıda belirtilen Mycoplasma türlerini inhibe ettiği tespit edilmiştir. *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae* ve *M. pirum* için MİK değerleri sırasıyla 20, 20, 160 ve 320 µg/mL olarak tespit edilmiştir.

Markin ve ark. (2003) su kullanarak zeytin yapraklarından elde edilen fenolik ekstraktının bazı bakteri [*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* ( $10^6$  kob/mL)] dermatofitlere (*Trichophyton*



*mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton robrum* ( $10^5$  kob/mL)] ve mayaya [*Candida albicans* ( $10^5$  kob/mL)] karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. *B. subtilis* hariç diğer bakterilerin tamamı %0.6 konsantrasyonunda zeytin yaprağı ekstraktı tarafından 3 saat içinde inhibe edilmiştir. *B. subtilis*'in inhibisyonu için bu oran %20 olarak tespit edilmiştir. *C. albicans*'ın inhibisyonu %15 konsantrasyonunda zeytin yaprağı ekstraktı ile 24 saatte gerçekleşirken, dermatofitlerin tamamının inhibisyonu %1.25 konsantrasyonunda zeytin yaprağı ekstraktı ile 3 gün olarak tespit edilmiştir. MBK ise *P. aeruginosa* için %0.13, *K. pneumoniae* ve *E. coli* için %0.3, *S. aureus* için %0.6 olarak tespit edilmiştir.

Winkelhausen ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytinyağı etimi sırasında meydana gelen yan ürünlerden biri olan zeytin posasının sahip olduğu fenolik bileşikler ekstrakte edilmiş ve oleuropein içeren bu ekstraktların *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* ve *Fusarium culmorum* küflerinin gelişimini engellediği tespit edilmiştir.

Korukluoğlu ve ark. (2006) taze zeytin yapraklarından farklı ozcler (su, etanol, aseton, etil asetat) kullanarak ekstrakt elde etmiş ve bu ekstraktların *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candia oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata*'ya karşı antimikrobiyal etkinliklerini belirlemişlerdir. Bu ekstraktların antifungal aktiviteleri disk difüzyon testi, MİK testi, ve minimum mantar öldürücü konsantrasyon (MFC) ile belirlenmiştir. ozc olarak su kullanılarak elde edilen ekstraktın test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinliği belirlenememiştir. Diğer ekstraktların MİK değerleri 10-28  $\mu\text{g/mL}$ , MFC değerleri 20-48  $\mu\text{g/mL}$  ve inhibisyon zon çapları 1.5-9.3 mm aralığında belirlenmiştir. Test edilen mayaların aseton ve etil asetat ekstraktlarına karşı daha duyarlı olduğu ve mayalar arasında en dirençli olanın *S. cerevisiae* ATCC 9763'n olduğu tespit edilmiştir.

Oleuropeinin *S. aureus* (Gram-pozitif bakteri) zerine antimikrobiyal etkisinin, *E. coli* (Gram-negatif bakteri) zerine olan etkisinden daha fazla olduğu tespit edilmiş ve bu durum hücre yapılarındaki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir (Sanchez ve ark., 2007).

Yapılan bir çalışmada zeytin yapraklarının sulu ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi Gram-pozitif (*B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*), Gram-negatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) bakteriler ve mayalara (*C. albicans*, *C. neoformans*) karşı araştırılmıştır. Ekstrakt, test edilen tüm bakteri ve mayalara karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının konsantrasyona bağlı olarak geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Pereira ve ark., 2007).

Korukluoğlu ve ark. (2010) zeytin yaprağından farklı çözücüler (aseton, dietileter, etil alkol, su) kullanarak elde ettikleri ekstraktların 11 Gram-pozitif bakteri (*B. cereus*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Leuconostoc mesenteroides*) ve 6 Gram-negatif bakteri (*Salmonella Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Acetobacter* spp.) üzerine antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Aseton, dietil eter, etil alkol kullanılarak elde edilen ekstraktların test edilen mikroorganizmaların tamamına karşı antimikrobiyal aktivitesi belirlenirken, su kullanılarak elde edilen ekstraktın hiçbir mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmada aseton, dietil eter ve etil alkol kullanılarak elde edilen ekstraktların test mikroorganizmaları için MİK değerlerinin sırasıyla 26-170 µg/mL, 25-178 µg/mL, 26-185 µg/mL aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Oleuropeinin virüs ve retrovirüslere karşı da antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Korukluoğlu ve ark., 2010).

Bunların yanı sıra oleuropein bakımından zengin zeytin yaprağı ekstraktı, sahip olduğu antiviral etki sayesinde grip, soğuk algınlığı gibi hastalıkların tedavisinde kullanılabilen ve etkili sonuçlar elde edilebilmektedir (Durlu- Özkaya ve Özkaya, 2011).

Janakat ve ark. (2015) “amurca” diye adlandırdıkları zeytinyağı tortusundan metanol ile elde ettikleri ekstraktın Gram-pozitif (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) ve Gram-negatif (*E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*) bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesini 10 °C ve 37 °C’de mikrodilüsyon ve disk difüzyon metotları ile belirlemiş ve bazı antibiyotiklerin (kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, tetrasiklin) antimikrobiyal

etkileri ile karşılaştırmıştır. Tüm mikroorganizmalar için 37 °C'de 24 saat sonunda amurca ekstraktının MİK ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değeri sırasıyla 60 ve 80 µL/mL, 10 °C'de 7 gün sonunda 40 ve 60 µL/mL olarak belirlenmiştir. Amurca ekstraktı (40 µL/mL) 10 °C'de 7 gün sonunda test edilen tüm patojenlerin sayısını 2.5 ile 3.2 log kob/mL azaltmış, 37 °C'de 24 saat sonunda ise hiçbir inhibisyon gözlenmemiştir. Amurca ekstraktının kloramfenikol ve tetrasikline dirençli *E. coli* O157:H7 02-0628 ve *S. aureus* 26127'u inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Zorić ve ark. (2016) zeytin yaprağı ekstraktının *C. albicans* ATCC 10231 ve *C. dubliniensis* CBS 7987 suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliğini incelemişler ve *C. albicans* için MİK değerini 46.875 mg/mL ve *C. dubliniensis* için MİK değerini 62.5 mg/mL olarak tespit etmişlerdir.

Zehra ve ark. (2016) 4 farklı tıbbi bitki (*Ocimum basilicum*, *Cymbopogon citratus*, *O. europaea*, *Eucalyptus camaldulens*) yapraklarına ait ekstraktların, 4 Gram-pozitif bakteriye (*E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*), 4 Gram-negatif bakteriye (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Typhi*) ve 1 mayaya (*C. albicans*) karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. *S. epidermidis* hariç diğer tüm mikroorganizmalar üzerine en yüksek antimikrobiyal etkinliği *O. europaea*'dan elde edilen ekstraktın gösterdiği belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2017) zeytin yaprağı ekstraktının gıda kaynaklı *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 ve *S. Enteritidis* bakterilerine karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Çalışmada 62.5 mg/mL'lik konsantrasyonda zeytin yaprağı ekstraktının bu üç patojenin gelişmesini neredeyse tamamen engellediği belirlenmiştir. Ayrıca, taramalı elektron mikroskobu ile *L. monocytogenes*'in kamçılarının işlevini yitirmesinden dolayı hücre hareketliliğinde azalma tespit edilmiştir. Bunun yanısıra zeytin yaprağı ekstraktının *L. monocytogenes* ve *S. Enteritidis*'in biyofilm oluşumunu inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Ruiz-Barba ve ark. (1991) alkali uygulanmış, sıcaklık uygulanmış ve herhangi bir işlem uygulanmamış yeşil zeytin salamuralarından ekstrakt elde etmişlerdir. Ekstraktların su ile hazırlanmış çözeltilerinin (4mg/mL) *Lb. plantarum*'a ( $10^6$  kob/mL) karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. 121 °C'de 15 dk. sıcaklık uygulaması

bakterilerin inhibisyonuna neden olurken, alkali uygulanmış oleuropein *Lb. plantarum*'un gelişimini teşvik etmiştir.

#### Oleuropeinin Antimikrobiyal Etki Mekanizması

Oleuropein antimikrobiyal etkisini, diğer fenolik bileşiklerde olduğu gibi bakteriyel membranlara zarar vererek veya hücrenin peptidoglukan tabakasını bozarak gösterdiği düşünülmektedir. Oleuropein ve membran lipitler arasındaki etkileşimi tam anlamıyla açıklayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Bazı araştırmacılara göre bu etkinin nedeni oleuropeinin sahip olduğu orto-difenol yapısıdır. Ancak oleuropeinin antimikrobiyal mekanizması henüz kesin olarak aydınlatılamamıştır (Omar, 2010b). Oleuropeinin antimikrobiyal etkisini kesin olarak aydınlatmak amacıyla bazı çalışmalar yapılmıştır. Antimikrobiyal etkinin ekzosiklik 8,9-olefinik işlevselliği ile karakterize edilen (Ryan ve ark., 2002), yüzey aktif özelliği sayesinde hücre membranlarını parçalayabilen oleosidlerden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (Soler-Rivas ve ark. 2000). Bakteriyel membran fonksiyonlarını bozması, fenolik bileşiklerin bilinen ortak bir özelliğidir. Membran bozulması; membran geçirgenliğinde değişikliklere ve membranla ilişkili enzim fonksiyonlarında kayba neden olabilmektedir. Hücreden düşük molekül ağırlıklı metabolitlerin kaybına otolitik enzimlerin parçaladığı protein ve nükleik asitlerin de eşlik ettiği bildirilmiştir (Hugo ve Bloomfield, 1971).

Juven ve ark. (1972) oleuropeinin (2mg/L) *Lb. plantarum*'dan potasyum ve inorganik fosfat sızıntısına ve ayrıca ATP miktarında azalmaya neden olduğunu bildirmiştir. Fosfat sızıntısı, oleuropein ile muamele edilmiş hücrelerden süpernatantta radyoaktif olarak işaretlenmiş bir potasyum izotopunu ölçen sıvı sintilasyon spektrofotometresi ile ölçülmüştür. İnorganik fosfat 582 nm'deki absorbansın ölçümünden ATP ise enzimatik olarak ölçüm ile belirlenmiştir.

Fosfolipidler ve kolesterol gibi hücrenin lipid bileşenleri, yüzey aktif maddeler için bir hedef olarak düşünülmektedir. Hugo ve Bloomfield (1971), Juven ve ark. (1972) ve Kroll (1981), potasyum sızıntısına fenolik bileşiklerin neden olduğunu ve bu sızıntının nedeninin ise membran parçalanması olduğunu belirtmişlerdir.

Kubo ve ark. (1985) ve Trombetta ve ark. (2002) zeytin yapraklarından elde edilen doymamış aldehyitlerin, gıda kaynaklı bakterilerde ilk olarak lipitleri bozarak plazma membranı üzerinde hareket ettiğini daha sonra ise hücre içi hedef bölgelere yöneldiğini ileri sürmüşlerdir. Trombetta ve ark. (2002) zeytinlerden seçilen alifatik bitki aldehyitlerini incelemiş ve onları model fosfolipit mebranlar (fosfatidilkolinin lipozomları) üzerinde test etmişlerdir. Karboksifluoresin salınımı, hücre zarının hasarını gösteren floresan spektrofotometri ile kanıtlanmıştır. Ayrıca, diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanarak zeytin bitkisi aldehyitleri tarafından membran permeasyonu incelenmiş, bu aldehyitlerin hücre içi bölgelerle etkileşime girebileceği bildirilmiştir. DSC bulguları ile iki katmanlı lipit içerisindeki lipofilik moleküllerin kullanıldığı ve bu iki katmanlı tabakada çatlakların bulunduğu tespit edilmiş bu duruma bitki aldehyitlerinin neden olduğu bildirilmiştir (Trombetta ve ark. 2002).

Zanichelli ve ark. (2005) oleuropeinin etki mekanizmasını araştırmışlar ve oleuropein gibi orto-difenollerin antimikrobiyal aktiviteyi başlatmak için ayrıca bir aktivasyon faktörüne ihtiyaç duyduğu kanısına varmışlardır.

## **2.8. Zeytin Yaprağı Ham Ekstraktının ve Oleuropeinin Gıdalarda Kullanım Olanakları**

### **2.8.1. Yemeklik yağlarda kullanım olanakları**

Yemeklik katı ve sıvı yağlar; ısı, ışık, nem, atmosferik oksijen, metal gibi çeşitli faktörlerin etkisi ile bir seri kimyasal reaksiyon sonucu oksidasyona uğrayabilmektedir. Bu olay yağ oksidasyonu olarak nitelendirilmekte, hidrolitik ve oksidatif (otoksidasyon) oksidasyon olmak üzere iki şekilde meydana gelmektedir. Bu durum neticesinde yemeklik yağların kalitesi ve besin değeri olumsuz yönde etkilenebilmektedir (Targan ve ark., 2008). Oksidatif bozulma olasılığı yüksek durumlarda, otooksidasyon başlamadan önce yağlara çeşitli antioksidanlar eklenebilir ve böylece yağların oksidasyonu geciktirilebilir. Bundan dolayı, bazı ülkeler tarafından gallat, bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyer butilhidrokinon (TBHQ), nordihidroguairatik asit (NDGA) gibi sentetik antioksidanların yağlarda kullanılmasına izin verilmektedir (Başoğlu, 2010). Bitkisel yağlara katılan yüksek stabiliteye sahip bazı sentetik antioksidanlar kanser gelişimini

teşvik ettiğinden bu antioksidan ajanların kullanımını giderek azalmaktadır (Farang ve ark., 2007).

Rafine yemeklik yağlara (mısır, soya fasulyesi, yüksek oleik içerikli ayçiçek, ayçiçek, zeytin, kanola ve kolza tohumundan elde edilen yağlar vb.) zeytin yaprağı ekstraktı ve hidrolizatları eklenerek, yağların oksidatif stabilitesi ve antioksidan kapasitesi arttırılabilir. Böylece sentetik antioksidanlara doğal kaynaklı alternatifler oluşturulabilir (Bouaziz ve ark., 2010). Rafine zeytinyağlarının oksidatif stabilizasyonu zeytin yaprakları kullanılarak sağlanabilmektedir (Jaber ve ark., 2012). Ayrıca zeytin yaprağı ekstraktı, çoklu doymamış yağ asitlerine karşı daha yüksek koruma sağlayarak soya ve kızartma yağlarının da raf ömrünü arttırabilir (Malheiro ve ark., 2013; Zribi ve ark., 2013).

Farang ve ark. (2007) zeytin yaprağının, ayçiçek yağının oksidatif stabilitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Kronakii çeşidi zeytin ağacına ait yapraklardan hidrolik pres yardımıyla zeytin yaprağı suyu elde edilmiş ve bu ürün farklı oranlarda konsantre edilerek polifenol içeriği 600, 1200, 2400 ppm seviyelerine yükseltilmiştir. Daha sonrasında ise farklı konsantrasyonda polifenol içeriğine sahip zeytin yaprağı suları ve BHT, ayçiçek yağına ilave edilmiştir. Zeytin yaprağı suyu ve 200 ppm BHT eklenmiş ayçiçek yağları ard arda 5 gün,  $180\pm 5$  °C'de 5 saat boyunca ısıtma işlemine tabi tutulmuştur. Isıtılmamış ve ısıtılmış ayçiçek yağının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, 800 ppm düzeyinde zeytin yaprağı suyu içeren ayçiçek yağının kayda değer bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve 200 ppm seviyesinde BHT içeren örneklere nazaran yağların stabilitesini arttırdığı tespit edilmiştir.

Bouaziz ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, rafine edilmiş zeytinyağı, zeytin yaprağı ve zeytin yaprağı ekstraktı ile zenginleştirilmiştir. Yaprakların ve ekstraktın fenolik bileşik içeriğine bağlı olarak, yağın oksidatif bozulmaya belirgin bir direnç oluşturduğu tespit edilmiştir.

Rafiee ve ark. (2012) Cronaiky ve Roghani çeşidi zeytin yapraklarından mikrodalga destekli ekstraksiyon tekniği ile aseton, %80 metanol ve su kullanılarak elde ettikleri ekstraktın ayçiçek yağı üzerine antioksidan etkisini araştırmışlardır. Farklı

konsantrasyonlarda ki ekstraktların (200, 500 ve 1000 ppm) oksidasyon sürecini engelleme etkinliği, ayçiçek yağının 70 °C sıcaklığa maruz kalması sonucunda belirlenen peroksit ve tiyobarbütirik asit (TBA) değerleri belirlenerek araştırılmıştır. En düşük peroksit değeri ve TBA değeri, 1000 ppm konsantrasyonunda Cronaiky çeşidinden metanol kullanılarak elde edilen ekstraktı içeren ayçiçek yağında tespit edilmiştir. Cronaiky çeşidine ait metanolik ekstraktın (1000 ppm) oksidasyon üzerinde ki kontrolü, BHA (100, 200 ppm) ve BHT (100, 200 ppm)'den daha iyi sağlayabildiği belirlenmiştir.

Zribi ve ark. (2013) kızartma yağlarının (rafine zeytinyağı ve rafine soya yağı) kullanım ömrünü arttırmak için bu yağlara hidroksitirozol miktarı yüksek zeytin yaprağı hidrolizati (500 ppm) ilave etmişlerdir. Hidrolizat ilave edilen ürünlerde, tavada kızartma süresince oksidatif bozulmaya karşı belirli bir direnç oluşturulmuş ve kontrol örneklerine nazaran daha az miktarda trans-yağ asidi oluşumu tespit edilmiştir. Bu olumlu etkilerin hidrolizatta bulunan hidroksitirozol tarafından sağlandığı bildirilmiştir.

Şahin ve ark. (2017) ticari mısır yağını, limon otu (*Melissa officinalis*) ve zeytin yaprağından elde edilen ekstraktlarla polifenol bileşikleri bakımından zenginleştirmişlerdir. Çalışmada ilk olarak, kurutulmuş ve öğütülmüş bitkilerden homojenizatör destekli ekstraksiyon yoluyla ekstrakt elde edilmiş, ardından ekstraktlar kurutulmuştur. Daha sonra ekstraktlar katı-sıvı özütleme yöntemi ile mısır yağında kısmen çözündürülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı, saf mısır yağına kıyasla zeytin yaprağı ve limon otu ekstraktları eklenmiş yağlarda sırasıyla ve 9.5 ve 2.5 kat artmıştır. Zeytin yaprağı ve melisa ekstraktlarıyla zenginleştirilmiş yağın antioksidan aktiviteleri sırasıyla, muamele edilmemiş yağdan yaklaşık 14 ve 6 kat daha yüksek bulunmuştur. Zeytin yaprağı ekstraktı, karotenoid ve klorofil içeriği açısından kaliteyi melisa ekstraktına kıyasla daha iyi geliştirmiştir. Ayrıca önerilen yöntemin koşulları yüzey cevap yöntemi (RSM) kullanılarak optimize edilmiştir. %0.12-0.15 doğal antioksidan ilavesi, yağın stabilitesinde ( $\approx$ %18) artışa neden olmuştur.

Jiménez ve ark. (2017) patates kızartılması esnasında (180 °C) yüksek oleik asitli ayçiçek yağı ve kanola yağının termal stabilitesi üzerine, avokado ve zeytin yaprağı ekstraktlarının etkisini araştırmışlardır. Ekstraktlarda yapılan analizlerde, zeytin yaprağı ekstraktının avokado ekstraktından daha yüksek fenolik ve antioksidan içeriğe sahip

olduğu belirlenmiştir. Kanola yağı+zeytin yaprağı ekstraktı ve yüksek oleik asit içerikli ayçiçek yağı+zeytin yaprağı ekstraktı, ekstrakt içermeyen yağlara nazaran antipolimerik etki göstermiş ve polar bileşiklerin oluşumunu azaltmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı, yüksek oleik asit içerikli ayçiçek yağı ve kanola yağı üzerine antioksidan etki göstermiştir. Her iki yağın zeytin yaprağı ekstraktı ile ayrı ayrı kombinasyonlarında tokoferollerin tutulumunun arttığı belirlenmiştir.

### **2.8.2. Et ve et ürünlerinde kullanım olanakları**

Zeytin yaprağı ekstraktı ve oleuropein sahip olduğu antioksidan ve antimikrobiyal etkilerden dolayı et ürünlerinde doğal bir koruyucu olarak kullanılabilir (Dua ve ark., 2015).

Hayes ve ark. (2010) zeytin yaprağı ekstraktının (100-200 µg/gram et), paketli pişmemiş dana kıymadan yapılmış köftelerin kalitesi ve raf ömrü üzerine etkisini araştırmışlardır. Köfteler aerobik olarak veya modifiye atmosfer (%80 O<sub>2</sub>: %20 CO<sub>2</sub>) ile paketlenmiş ve 4 °C’de 12 gün depolanmıştır. Zeytin yaprağının, rnlerin TBA değerini %41-80 aralığında azalttığı tespit edilmiştir. Zeytin yaprağı ilave edilmiş, aerob olarak paketlenmiş köftelerde kırmızılığın göstergesi olan a\* değerinin %22, modifiye atmosfer paketlenme (MAP) ile paketlenenlerin a\* değerinin ise %56 arttığı belirlenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının toplam canlı sayısı üzerine herhangi bir etkide bulunmadığı tespit edilmiştir.

Dua ve ark. (2015) yaklaşık olarak %18 oranında oleuropein içeren zeytin yaprağı ekstraktının Hindistan’da geleneksel bir ürün olan kızarmış koyun kaburgalarından yapılan Tabaq-Maz’ın oksidatif stabilitesi ve depolanma kalitesi üzerine olan etkisini araştırmışlardır. Oleuropein içeren örneklerde TBA, serbest yağ asitliği değeri, toplam aerobik mezofilik bakteri, toplam aerobik psikrofilik bakteri, toplam maya ve küf sayıları kontrol örneklerine nazaran daha düşük bulunmuştur. Oleuropein içeren örneklerin duysal parametrelerinde de gelişme tespit edilmiştir. Çalışmada oleuropeinin antioksidan etkisi çok önemli bulunmuş ve et ürünlerinde ticari doğal antioksidan madde olarak kullanılabilceği belirtilmiştir.



Aouidi ve ark. (2017) fonksiyonel bir ürün geliştirmek amacıyla, dana kıymasına zeytin yaprağı ekstraktı ve zeytin yaprağı tozu ilavesinin uygulama olanağını araştırmışlardır. Bu amaçla zeytin yaprağı ekstraktı ve tozunun (100-150 µg fenolik bileşik/gram et) soğukta depolama sũresince çiğ ve pişmiş etin kalitesi ve stabilitesi ũzerine etkisi incelenmiştir. Zeytin yaprağı konsantrasyon ve formuna bağlı olarak TBA değerini %25-65 aralığında azaltarak lipid oksidasyonunu engelleme yeteneği gũstermiřtir. Ayrıca kontrol örneklerinde metmyoglobin oluşumu %43-65 aralığında tespit edilirken, zeytin yaprağı içeren örneklerde metmyoglobin oluşumu %14-35 aralığında tespit edilmiş ve bũylece myoglobin oksidasyonunun da engellendiği tespit edilmiştir. Ayrıca zeytin yaprağının; pişme kaybını, Napole verimini (tuzlama sonrası pişme kaybı) ve duyuasal özellikleri etkilemediği fakat depolama ve zũnme kayıplarını azalttığı belirlenmiştir.

Kurt ve Ceylan (2017) zeytin yaprağı ekstraktının (0, 125, 250 ve 500 ppm), fermente sucukların fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kalitesi ũzerine etkisini araştırmışlardır. Zeytin yaprağı ekstraktının olgunlaşma sũresince ve olgunlaşma sonunda sucuklarda serbest yağ asidi ve TBA değerini azalttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktı depolama sũresince sucuklarda laktik asit bakteri ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayısını da azaltmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktı ilavesinin, sucukların pH ve renk değerlerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirtilmiştir.

Moudache ve ark. (2017) taze domuz kıymasını zeytin yaprağı ekstraktı içeren aktif plastik film ile kaplamıştır. Materyal, çok katmanlı bir polietilen filmde oluşmakta olup, içine 4 farklı konsantrasyonda (%2, %5, %10 ve %15) zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilmiştir. Paketlenmiş et, 16 gũn boyunca 4 C’de tutulmuş ve iki yöntemle (Raman spektroskopisi ve TBA değeri) analiz edilmiştir. Doğal antioksidanlar içeren aktif filmin, taze etin oksidasyon işlemlerine karşı stabilitesini önemli dũzeyde arttırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilerek ũretilen aktif plastik filmlerin taze domuz kıymasının raf mrũnũ iki gũn uzatmak için umut verici bir yöntem olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca, Raman spektroskopisinin ette antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için etkili bir teknik olduğu bildirilmiştir.

### 2.8.3. Süt ve süt ürünlerinde kullanım olanakları

Belirli dozlarda zeytin yaprağı, çiğ sütte doğal olarak bulunan *S. thermophilus* ve *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* gibi bakterilerin canlılığını etkilemeden fermente süt ürünlerinin fonksiyonelleğini arttırabildiğinden zeytin yaprağı ve bundan elde edilecek ekstraktların süt ürünlerinde kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır (De Leonardis ve ark., 2008).

Haddadin (2010) tarafından rekonstitüe yağsız süte, bağırsak kaynaklı *Bifidobacterium infantis*, *Lb. acidophilus* mikroorganizmaları ve farklı çözücüler (etanol, metanol, su) ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktları eklenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktlarının kısa zincirli yağ asitlerinin üretimine ve mikroorganizma sayısı üzerine olan etkisi incelenmiştir. Ekstrakt ilavesi, her üç ekstraktta kontrol örneklerine nazaran mikroorganizma sayısını ve kısa zincirli yağ asidi üretimini arttırmıştır. Her iki bakteri türü için de en yüksek mikroorganizma sayısı ve kısa zincirli yağ asidi üretimi zeytin yaprağı etanol ekstraktının eklendiği örneklerde tespit edilmiştir. Çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktlarındaki polifenol bileşiklerin, probiyotik bakterilerin gelişimini teşvik ettiği öne sürülmüştür. Böylece zeytin yaprağı ekstraktını günlük diyeteye ekleyerek sağlık üzerinde olumlu etkilere sahip probiyotik bakterilerin gelişiminin teşvik edilebileceği, *Clostridium* spp. ve *E. coli* gibi zararlı bakterilerin gelişiminin engellenebileceği ve böylece bağırsak mikroflorasının kontrol altında tutulabileceği bildirilmiştir.

Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının soğukta depolama süresince (21 gün) süt ve yoğurtta bulunan *Lb. acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* gelişimi ve canlılığı üzerine etkisi araştırılmıştır. Araştırmacılar, zeytin yaprağı ekstraktı içeren süt ve yoğurtlarda bulunan *Lb. acidophilus* ve *B. bifidum* sayısının kontrol grubuna nazaran önemli ölçüde yüksek olduğunu belirlemiştir. Ayrıca zeytin yaprağı ekstraktı ile bakteri gelişimi arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmış, artan zeytin yaprağı ekstraktı konsantrasyonunun süt ve yoğurt numunelerinde olumlu bir tada neden olduğu belirlenmiştir (Marhamatizadeh ve ark., 2013).

Peker ve Aslan (2017) kayısıli az yağlı yoğurdun kalitesi üzerine farklı konsantrasyonlarda zeytin yaprağı ekstraktı (%0, 0.1, 0.2 ve 0.4) ilavesinin etkisini

araştırmışlardır. Zeytin yaprağı ilavesinin; kuru madde, kül, protein miktarını, pH değerini ve *S. thermophilus* sayısını önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir. Depolama süresince, örneklerin su tutma kapasitesi değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktı ihtiva eden numunelerin viskozite değerlerinin kontrol örneklerinden önemli ölçüde farklı olmadığı belirlenmiştir. %0.4 düzeyinde zeytin yaprağı ekstraktı içeren yoğurdun depolama sonunda en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Bitkisel materyal

Araştırmada, oleuropein bileşiğinin ekstraksiyonu ve saflaştırılması için aynı yetiştirme koşulları altında, aynı bölgede (Ege Bölgesi) ve aynı yörede (Manisa İli, Şehzadeler Belediyesi, Tilkisüleymaniye Mahallesi) bulunan 3 farklı çeşit (Domat, Edremit, Trilye) zeytin ağacına ait zeytin yaprakları 2017 yılının Ağustos ayında toplanmıştır (Şekil 3.1). Toplanan zeytin yaprakları kurutulmuş ve polipropilen torbalar içerisinde Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Bitki Araştırma Laboratuvarına getirilmiştir. Zeytin yaprakları ekstraksiyon işlemine kadar polipropilen torbalar içerisinde, laboratuvar koşullarında saklanmıştır.



Şekil 3.1. Domat, Edremit, Trilye çeşitlerine ait zeytin yaprakları

##### 3.1.2. Kimyasal materyal

Etanol, metanol, etil asetat Tekkim (Bursa), %80 saflıktaki oleuropein, gallik asit, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), ( $\pm$ )-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Troloks) Sigma-Aldrich (Almanya), triptik soy agar (TSA), triptik soy broth (TSB) Lab M (Lancashire, İngiltere), bakteriyolojik pepton Laboratorios Conda (İspanya), Folin-Ciocalteu reaktifi, sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), potasyum peroksidisülfat ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ) Merck (Darmstadt, Almanya) firmalarından temin edilmiştir.

### **3.1.3. Test kültürleri**

Çalışmada mikrobiyolojik analizlerde kullanılan *L. monocytogenes* (ATCC 19115), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *E. coli* O157:H7 (ATCC 25922) Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir. Analizler öncesi *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* ve *E. coli* 37±2 °C’de, 18-24 saat TSB besiyerinde iki kez geliştirilerek aktive edilmişlerdir.

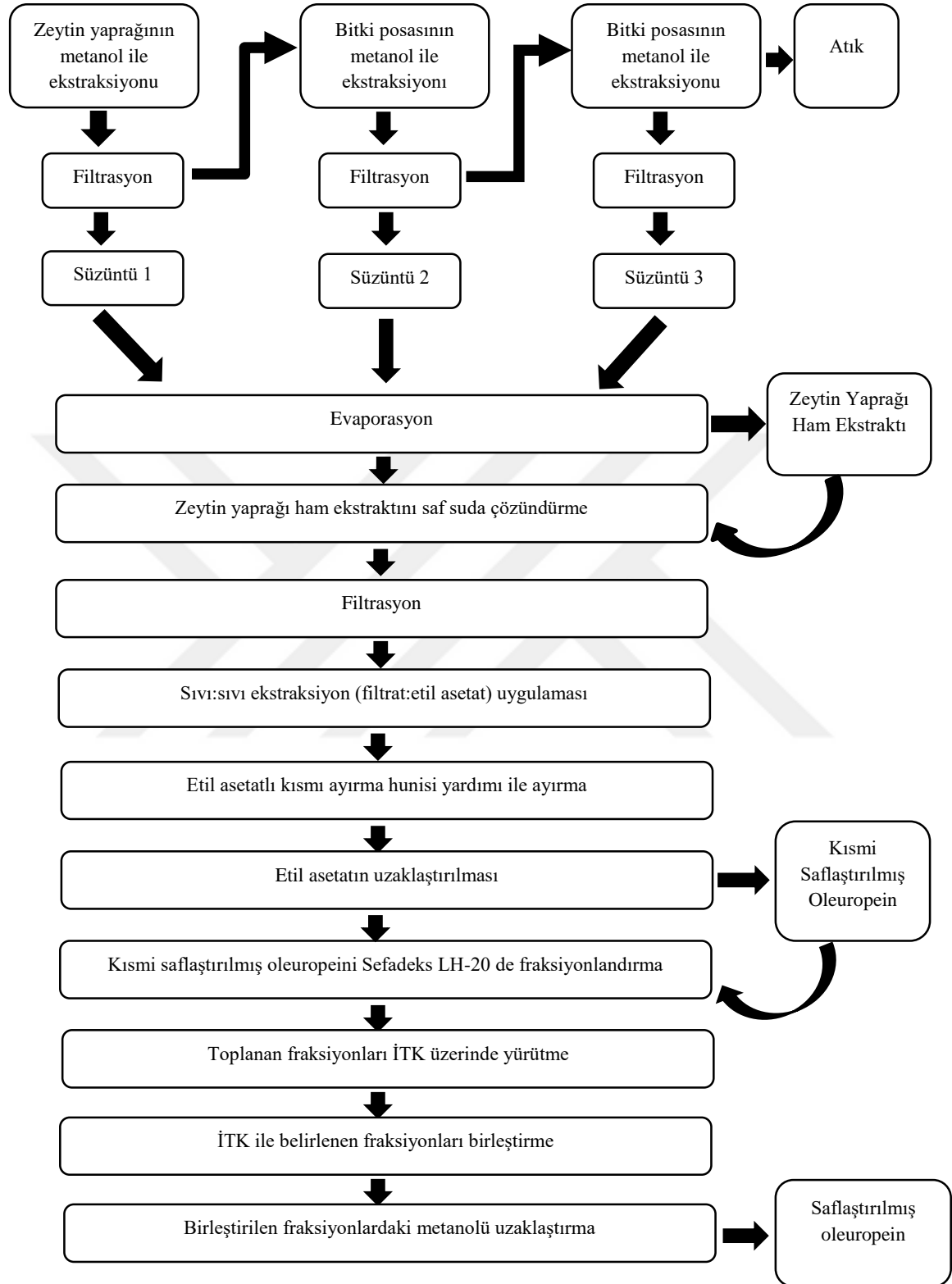
### **3.1.4. Kullanılan alet ve ekipmanlar**

Araştırmanın çeşitli basamaklarında, hassas terazi (Radwag, AS 220 R2, Polonya), öğütücü (Premier, Prg 259, Türkiye), rotary evaporatör (Heidolph, Scwabach, Almanya), peristaltik pompa (Longer pump, Çin), LC-MS/MS cihazı (Shimadzu, LCMS-8050, Japonya), UV-VIS Spektrofotometre (PG Instrument, T80+, İngiltere), inkübatör (Memmert, Almanya), santrifüj (Hettich EBA 21, Almanya), vorteks (Velp Scientifica, İtalya), otoklav (HMC HV-85L, Almanya), kuru sterilizatör (Nüve FN 500, Ankara), steril kabin (Esco, Classic II BSC, Singapur), ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Biosan, MSH 300, Letonya), saf su cihazı (Merck, Millipore, Almanya), koloni sayıcı (JP Selecta, Barselona, İspanya), buzdolabı (Arçelik, 5270 NF-H, Türkiye) kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Zeytin yaprağından ham ekstrakt ve oleuropein ekstraksiyonu**

Çalışmada, ilk aşamada kurutulmuş zeytin yapraklarından ham ekstrakt elde edilmiş, ikinci aşamada ham ekstrakttan kısmi saflaştırılmış oleuropein ve en son aşamada ise kısmi saflaştırılmış oleuropeinden saflaştırılmış oleuropein elde edilmiştir. Zeytin yaprağından ham ekstrakt ve oleuropein ekstraksiyonuna ait akım şeması Şekil 3.2’de verilmiştir.



**Şekil 3.2.** Zeytin yaprağından ham ekstrakt ve oleuropein ekstraksiyonuna ait akım şeması

### Zeytin Yaprağı Ham Ekstraktı Eldesi

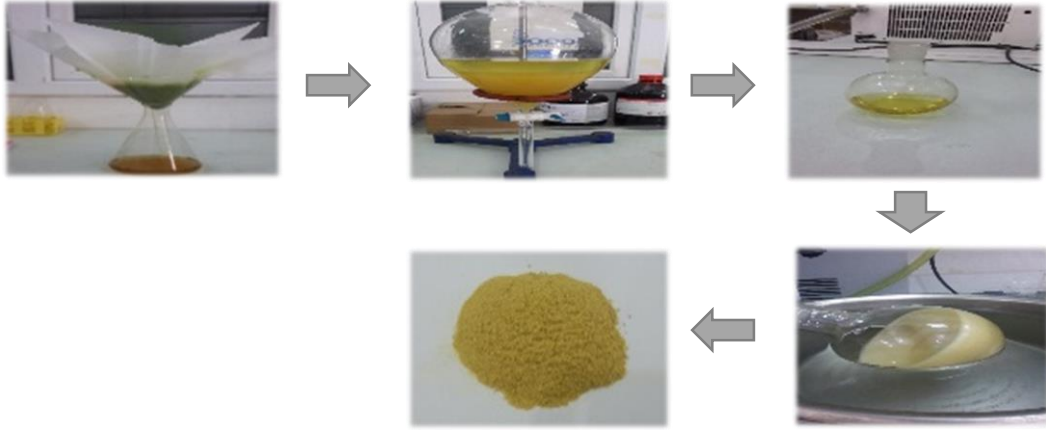
Zeytin yaprağından ham ekstrakt eldesi Şekil 3.3'te verilmiştir. Kurutulmuş zeytin yaprakları öğütücü yardımı ile öğütülmüştür. Öğütülmüş zeytin yapraklarından 200 g ekstraksiyonun yapılacağı kaba tartılmış, daha sonra tartılan yaprak üzerine, yaprağın 5 katı kadar (1 litre) metanol eklenmiş ve oda sıcaklığında 5 saat boyunca ekstraksiyona bırakılmıştır. Ekstraksiyon işlemi sonunda, elde edilen ekstrakt filtre edilmiş ve süzüntü, toplama kabına alınmıştır. İlk ekstraksiyon sonrası kalan posa 2 kez daha metanol ile ekstraksiyon işlemine tabi tutulmuştur. 3 ekstraksiyon işlemi sonrasında elde edilen süzüntüler birleştirilmiş ve süzüntüde bulunan metanol, rotary evaporatör (40 °C) kullanarak uzaklaştırılmıştır. Bu ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstrakt, “zeytin yaprağı ham ekstraktı” olarak adlandırılmıştır.



**Şekil 3.3.** Zeytin yaprağından ham ekstrakt eldesi

### Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein Eldesi

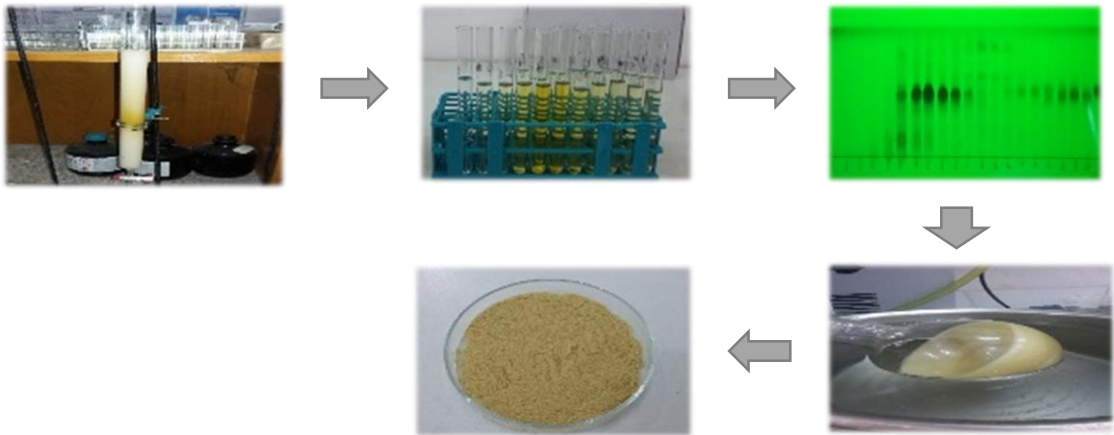
Zeytin yaprağı ham ekstraktından kısmi saflaştırılmış oleuropein eldesi Şekil 3.4'te verilmiştir. Zeytin yaprağı ham ekstraktından 25 gram tartılıp üzerine 250 mL 60 °C'deki saf su eklenmiş ve ekstraktın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra kaba filtre kağıdı kullanılarak çözüldürülen ekstrakt süzümüştür. Süzme sonrasında elde edilen süzüntü 1:1 oranında etil asetat ile karıştırılıp, çalkalanmış ve karışım ayırma hunisine alınmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyon sonrasında ayırma hunisinden ayrılan etil asetatlı kısım rotary evaporatöre (40 °C) alınmış ve etil asetat uzaklaştırılmıştır. Bu ekstraksiyon sonunda elde edilen ekstrakt, “kısmi saflaştırılmış oleuropein” olarak adlandırılmıştır.



**Şekil 3.4.** Zeytin yaprağı ham ekstraktından kısmi saflaştırılmış oleuropein eldesi

### Saflaştırılmış Oleuropein Eldesi

Kısmi saflaştırılmış oleuropeinden saflaştırılmış oleuropein eldesi Şekil 3.5'te verilmiştir. Kısmi saflaştırılmış oleuropeinden 3 gram alınıp üzerine metanol eklenerek çözündürülmüş ve Sefadex LH-20 üzerinde fraksiyonlandırılmıştır. Hareketli faz olarak metanol kullanılmıştır. Hareketli fazın akış hızı peristaltik pompa yardımı ile 0.25 mL/dk akış hızına ayarlanmıştır. Oleuropein içeren fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi (İTK) yardımıyla belirlenmiştir. İTK ile oleuropein bileşiği olduğu tespit edilen fraksiyonlar birleştirilmiş ve fraksiyonlarda bulunan metanol rotary evaporatör (40 °C) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Bu aşamanın sonunda elde edilen ekstrakt, "saflaştırılmış oleuropein" olarak adlandırılmıştır.



**Şekil 3.5.** Kısmi saflaştırılmış oleuropeinden saflaştırılmış oleuropein eldesi



### 3.2.2. Ekstraksiyon veriminin hesaplanması

Öğütülen zeytin yaprağından 30 g tartılmış ve öğütülmüş yaprak 150 mL metanol ile 5 saat ekstraksiyona bırakılmıştır. Elde edilen ekstrakt kaba filtre kağıdından süzölmüş ve süzöntü balona alınmıştır. Bu işlem iki defa daha aynı şekilde tekrarlanmış, süzöntüler aynı balonda toplandıktan sonra, ekstraktta bulunan metanol rotary evaporatör (40 °C) kullanarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen ham ekstraktın ekstraksiyon verimi aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\frac{(M_2 - M_1)}{M} \times 100$$

Eşitlikte;

M<sub>2</sub>: Metanolü uzaklaştırılmış ekstrakt (g) + Balon darası (g)

M<sub>1</sub>: Balon Darası (g)

M: Zeytin yaprağı miktarı (g)

### 3.2.3. İTK ile birleştirilecek fraksiyonların belirlenmesi

Kısmi saflaştırılmış oleuropeinin Sefadeks LH-20 kolondan geçirilmesinden sonra toplanan fraksiyonların saflık kontrollerinde İTK tabakaları kullanılmıştır. Sefadeks LH-20 kolon kromatografiden toplanan fraksiyonlar ve standart oleuropein bileşiği İTK tabakalarına uygulanmış, fraksiyonlarda bulunan maddelerin yürütülmesi, hareketli fazı içeren [7:1:1, etil asetat: metanol: asit karışımı, (250 mL asit karışımı için formülasyon: 11 mL formik asit+10 mL asetik asit+26 mL su+203 mL etil asetat)] cam tankta gerçekleştirilmiştir. İTK uygulamasında görüntüleme işlemi serik sülfat belirteci yardımıyla UV lambası altında gerçekleştirilmiştir.

### 3.2.4. Oleuropein miktarının analizi

Ekstraktlarda bulunan oleuropein, kantitatif olarak LC-MS/MS ile belirlenmiştir. Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerinden elde edilen zeytin yaprağı ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin metanol ile 1 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerden 5 mL alınıp 0.22 µm'lik (Millex-HV) membran

filtreden süzölmüştür. Filtratlar LC-MS/MS cihazı otomatik örnekleyci viallerine aktarılmıştır. LC-MS/MS koşulları Çizelge 3.1’de, gradient sistem çözücü konsantrasyonu Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1. LC-MS/MS koşulları**

<b>HPLC koşulları</b>	
<b>Ekipman</b>	Shimadzu
<b>Degazör</b>	DGU-20A <sub>3R</sub>
<b>Pompa</b>	LC-30AD
<b>Otomatik Örnekleyci</b>	SIL-30AC
<b>Kolon Fırını</b>	CTO-10AS <sub>VP</sub>
<b>Kolon</b>	3 µm, C18 (2.1mm x 150mm)
<b>Fırın Sıcaklığı</b>	40 °C
<b>Kütle Spektrometresi</b>	LC-MS-8050
<b>Mobil faz A</b>	5mM Amonyumasetat
<b>Mobil faz B</b>	Metanol
<b>Akış Hızı (mL/dk)</b>	0.4

**Çizelge 3.2. LC-MS/MS gradient sistem çözücü konsantrasyonu**

<b>Süre (dk.)</b>	<b>Amonyum Asetat (%)</b>	<b>Metanol (%)</b>
0	95	5
8	5	95
8-10.3	5	95
10.3	95	5
10.3-14	95	5

### **3.2.5. Toplam fenolik madde tayini**

Ekstraktların toplam fenolik madde tayini Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraktlar 1 mg/mL olacak şekilde metanol ile seyreltilmiştir. 100 µL ekstrakt çözeltisi üzerine, 200 µL Folin-Ciocalteu reaktifi, 2 mL saf su ilave edilmiş ve karışım oda sıcaklığında 3 dk. bekletilmiştir. Bu karışım üzerine %20’lik

1 mL sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi ilave edilmiş ve vorteks ile karıştırma işlemi uygulanmıştır. Daha sonra karışım oda şartlarında 1 saat inkübasyona bırakılmış, inkübasyon sonrasında karışımın 765 nm'deki absorbansları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Standart olarak kullanılan gallik asit (0, 50, 100, 150, 250, 500 mg/L) ve ticari oleuropeinin (0, 60, 120, 240, 480, 720, 960, 1000 mg/L) değişik derişimleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Örneklerin toplam fenolik madde miktarı standartlara ait kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen veriler seyreltmeler dikkate alınarak mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g ve mg oleuropein eşdeğeri (OE)/g olarak ifade edilmiştir (Ahmad-Qasem ve ark., 2014; Khemakhem ve ark., 2017; Putnik ve ark., 2017).

### **3.2.6. Katyon radikali giderme aktivitesi (ABTS<sup>•+</sup>)**

Örneklerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesinde Re ve ark. (1999) tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntem kullanılmıştır. 7 mM ABTS ve 2.45 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  çözeltisi hazırlanmıştır. ABTS radikal stok çözeltisini hazırlamak için ABTS çözeltisi ve  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  çözeltisi (1:1 oranında) karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında, 16 saat karanlık ortamda bekletilmiştir. ABTS radikali çalışma çözeltisi; 1 mL stok çözeltinin 54 mL etil alkol ile 734 nm'de 0.700 ( $\pm 0.02$ ) absorbans değeri verecek şekilde seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Metanol ile seyreltilmiş ekstraktlardan (0.5 mg/mL), 40  $\mu\text{L}$  alınıp üzerine 4 mL ABTS radikali ilave edilip karıştırıldıktan sonra reaksiyonun gerçekleşmesi için karışım oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 6 dk. bekletilmiştir. Karışımın 734 nm'deki absorbansları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Standart olarak kullanılan troloksun değişik derişimleri (0, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 500 mg/L) ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Örneklerin katyon radikali giderme aktivitesi standarda ait kalibrasyon grafiği kullanılarak mg TE/g olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.7. Serbest radikali giderme aktivitesi (DPPH<sup>•</sup>)**

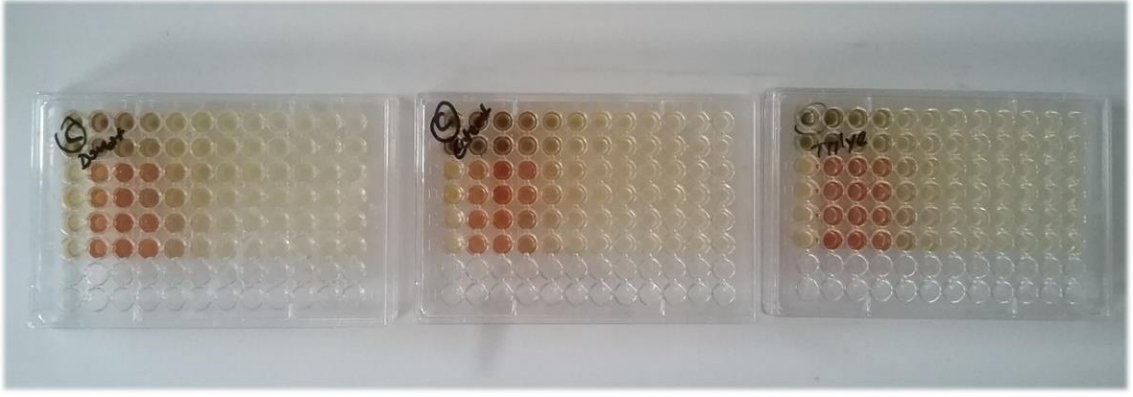
Ekstraktların DPPH serbest radikalini giderme aktiviteleri Blasi ve ark. (2016), uyguladığı yöntemine göre saptanmıştır. İlk aşamada 0.06 mM DPPH çözeltisi hazırlanmış ve bu çözelti 4 °C'de karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir. Daha sonra ise metanol ile seyreltilmiş ekstraktlardan (0.5 mg/mL), 100  $\mu\text{L}$  alınıp üzerine 3.9 mL

DPPH çözeltisi eklenmiş ve karışım vorteks ile çalkalanmıştır. Karışım oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dk. bekletildikten sonra karışımın 517 nm'deki absorbansları spektrofotometre ile ölçülmüştür. Standart olarak troloksun değişik derişimleri (0, 15, 30, 60, 120, 240, 250 mg/L) kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Örneklerin serbest radikal giderme aktivitesi standarda ait kalibrasyon grafiği kullanılarak mg TE/g olarak hesaplanmıştır.

### **3.2.8. Ekstraktların ve oleuropeinin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi**

Zeytin yaprağı ham ekstraktının, kısmi saflaştırılmış oleuropeinin ve saflaştırılmış oleuropeinin saf su ile hazırlanan %10'luk çözeltilerinin; *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktiviteleri "96 kuyucuklu MİK Plaka" yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Geliştirilen 18-24 saatlik mikroorganizma kültürlerinden %0.1'lik peptonlu su kullanılarak 6 log kob/mL düzeyinde süspansiyonlar hazırlanmıştır. Her bir kültür ayrı ayrı denemeye alınmış olup kültür kokteyli şeklinde bir uygulama yapılmamıştır.

Aseptik koşullar altında, ilk kuyucuklara 200 µL %10'luk hazırlanan ekstraktlardan eklenmiştir. Daha sonra ikinci kuyucuk dahil onikinci kuyucuğa kadar her kuyucuğa 100 µL TSB besiyeri eklenmiştir. Ardından ilk kuyucuktan onbirinci kuyucuğa kadar seyreltme işlemi uygulanmış, ekstrakt onikinci kuyucuğa aktarılmayarak son kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Kuyucuklardaki ekstrakt konsantrasyonları sırasıyla 1:1 (%10), 1:2 (%5), 1:4 (%2.5), 1:8 (%1.250), 1:16 (%0.625), 1:32 (%0.313), 1:64 (%0.156), 1:128 (%0.078), 1:256 (%0.039), 1:512 (%0.020), 1:1024 (%0.010) ve 0:1 (Kontrol, %0)'dır. Test bakterilerinin gelişimini görmek için onikinci kuyucuk pozitif kontrol olarak değerlendirildiğinden antimikrobiyal etkisi tespit edilmeye çalışılan ekstraktı içermemektedir. Sonrasında tüm kuyucuklara 100 µL kültür süspansiyonlarından eklenmiş ve 37±2 °C'de 24-48 saat MİK plakalarında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında MİK plakalarındaki her bir kuyucuktan katı besiyerlerine çizim yapılıp inkübasyona bırakılmış ve üremenin olmadığı kuyucuklar tespit edilmiştir.



**Şekil 3.6.** MİK plakalarının inkübasyon sonrası görüntüsü (*L. monocytogenes* için)

### **3.2.9. İstatistiksel analiz**

Araştırma sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi SPSS (versiyon 20.0) istatistik paket programı yardımıyla Duncan testi kullanılarak yapılmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Ekstraksiyon Verimi

Domat, Edremit, Trilye çeşidi zeytin ağaçlarına ait zeytin yapraklarından metanol kullanılarak elde edilen ham ekstrakt verimleri sırasıyla %36.41, %27.83, %45.51 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Zeytin yaprağından elde edilen ham ekstraktların ekstraksiyon verimi Trilye > Domat > Edremit olarak tespit edilmiş olup, Trilye ile Edremit arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ( $P<0.05$ ), Domat'ın, Edremit ve Trilye'den farkı istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.1.** Zeytin yapraklarının ekstraksiyon verimleri

Yaprak Çeşidi	Verim (%)
Domat	36.41±2.15 <sup>ab*</sup>
Edremit	27.83±3.24 <sup>b</sup>
Trilye	45.51±4.65 <sup>a</sup>

\*Aynı sütundaki küçük harfler yaprak çeşitleri arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ).

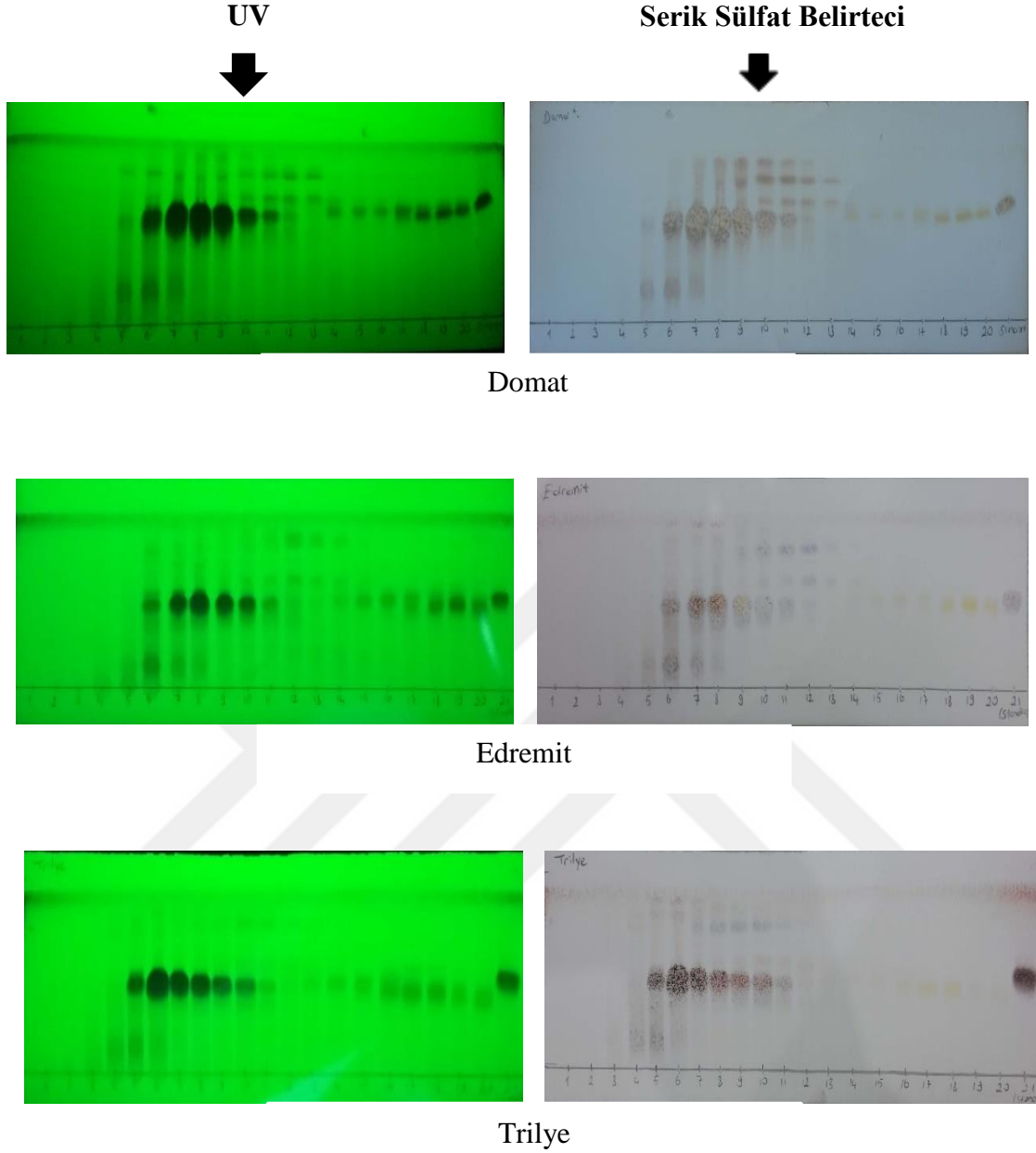
Bilgin ve Şahin (2013) coğrafi orijin ve ekstraksiyon metodunun ekstraksiyon verimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Yapraklar aynı bölgede yetiştirilen aynı çeşidin üç zeytin ağacından toplanmıştır. Coğrafi orijinin etkisini görebilmek için Anadolu'dan 6 farklı alan (Bursa, Mardin, Ayvalık, Kaş, Tekirdağ ve Çanakkale), ekstraksiyon metodunun etkisini görebilmek için ise çözücü olarak metanolün kullanıldığı 2 farklı yöntem (homojenizatör destekli ekstraksiyon ve ultrason destekli ekstraksiyon) seçilmiştir. Ekstraksiyon veriminin, homojenizatör destekli ekstraksiyon yönteminde 102.27 ile 443.16 mg/g kuru yaprak (%10.23 ile 44.32) aralığında, ultrason destekli ekstraksiyon yönteminde ise 88.75 ile 350.82 mg/g kuru yaprak (%8.88 ile 35.08) aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Zeitoun ve ark. (2017) ekstraksiyon öncesi 4 farklı ön işlem (taze, güneşte kurutma, fırında kurutma, soldurma işleminden sonra fırında kurutma) uygulanmış zeytin yapraklarından 3 farklı çözücü (%70'lik etanol, %70'lik metanol, su) kullanarak zeytin yaprağı ekstraktları elde etmişlerdir. Farklı ön işlemlere tabi tutulmuş örneklerde çözücü olarak etanolün kullanıldığı ekstraksiyonlarda, ekstraksiyon veriminin %22.36-%32.03

aralığında, metanolün kullanıldığı ekstraksiyonlarda ekstraksiyon veriminin %20.03-%32.91 aralığında, saf suyun kullanıldığı ekstraksiyonlarda ise ekstraksiyon veriminin %17.96-23.17 aralığında değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi (%32.03) güneşte kurutulmuş zeytin yapraklarından metanol kullanılarak elde edilen ekstraktlarda belirlenmiştir.

#### **4.2. İTK ile Birleştirilecek Fraksiyonların Belirlenmesi**

Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerinden elde edilen kısmi saflaştırılmış oleuropeinden sırasıyla 2.8, 2.8, 3.0 gram tartılmış ve metanolde çözüldürülerek Sefadex LH-20 üzerinde fraksiyonlandırılmıştır. Kolon kromatografisinden hacimleri yaklaşık 16 mL olan 21 fraksiyon toplanmıştır. Toplanan fraksiyonlarda benzer olan kısımların birleştirilmesi için, toplanan fraksiyonlara ve standart bileşik olarak temin edilen ticari oleuropeine İTK işlemi uygulanmıştır. İTK üzerindeki fraksiyonların ve standart bileşiğin UV altında Rf değerleri ve serik sülfat belirteci yardımı ile renkleri belirlenmiştir. Bu işlemlerin sonucunda Domat ve Edremit çeşidi için standart oleuropein bileşiği ile aynı Rf değerine ve aynı renge sahip 6, 7, 8, 9, 10 ve 11. fraksiyon birleştirilmiş, Trilye çeşidi için ise 5, 6, 7, 8, 9 ve 10. fraksiyonlar birleştirilmiştir. Birleştirilen fraksiyonlarda bulunan metanol, rotary evaporatör (40 °C) kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Domat, Edremit ve Trilye için elde edilen saflaştırılmış oleuropein miktarları sırasıyla 1.82 g, 2.03 g, 1.86 g olarak tespit edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Kolon kromatografisinden toplanan fraksiyonların İTK üzerinde UV ve serik sülfat belirteci ile belirlenmesi

### 4.3. Oleuropein Miktarı

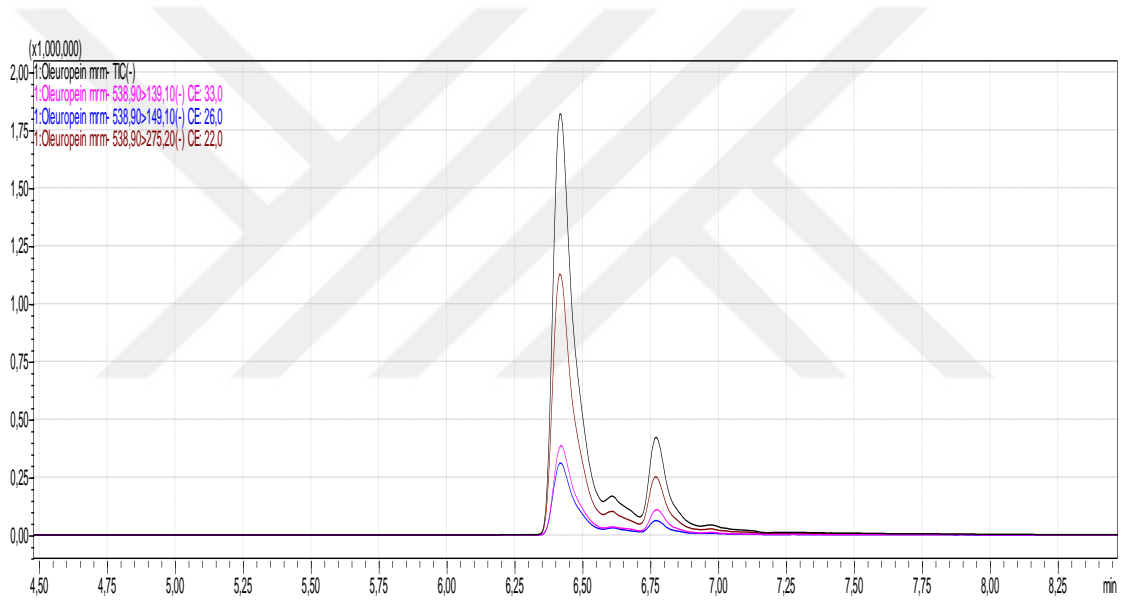
Standart oleuropein bileşiğinin LC-MS/MS ile belirlenmesine ilişkin veriler Çizelge 4.2’de, bileşiğın LC-MS/MS’de çizilen kalibrasyon eğrisi Ek 7.2’de verilmiştir.



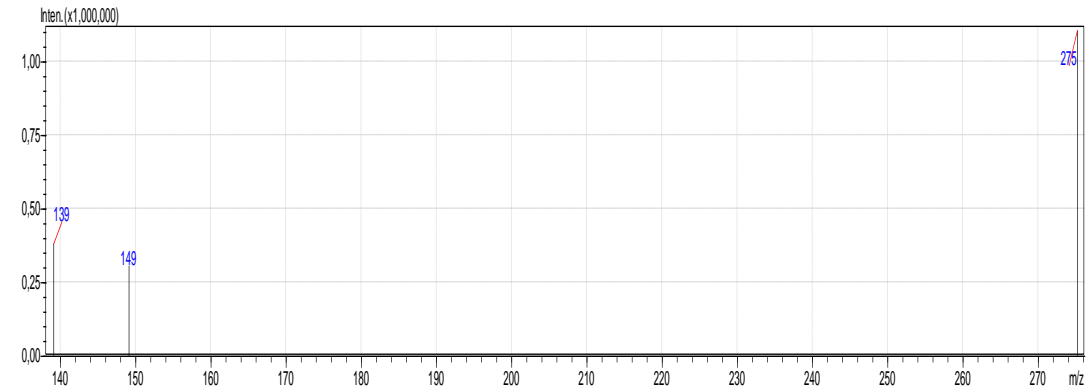
**Çizelge 4.2.** Oleuropein standardına ait LC-MS/MS verileri

Veriler	Değerler
$R^2$	0.9956
Alıkonma zamanı (dk.)	6.4
MS, m/z $M^-$	538.90
MS/MS iyon m/z	139.10, 149.10, 275.20

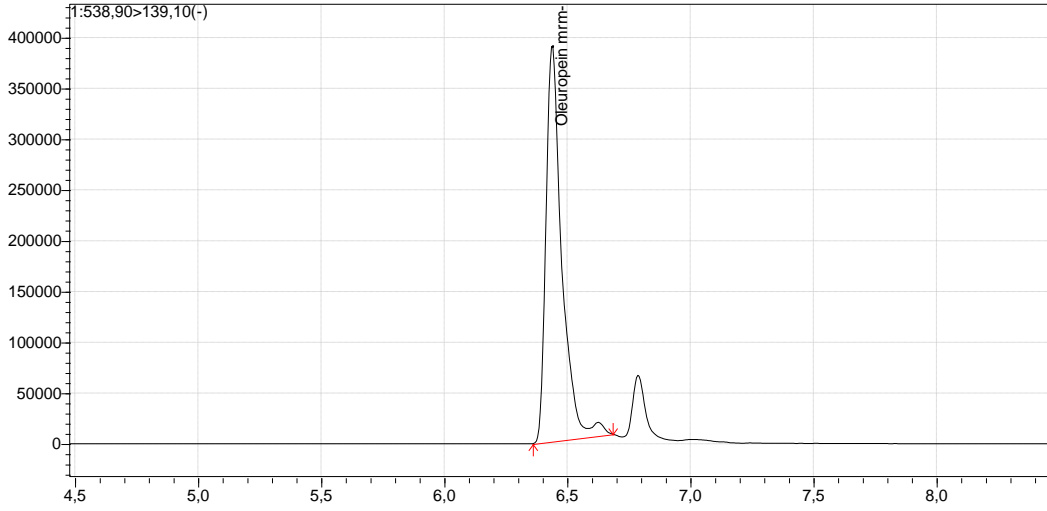
Oleuropein standardı kromatogramı ve standarda ait kütle spektrumu Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’de, zeytin yaprağından elde edilen ürünlere ait örnek bir kromatogram Şekil 4.4’te verilmiştir.



**Şekil 4.2.** Oleuropein standardı kromatogramı



**Şekil 4.3.** Oleuropein standardı kütle spektrumu



**Şekil 4.4.** Zeytin yaprağından elde edilen ürünlere ait bir kromatogram

Zeytin yaprakları ve ekstraktların oleuropein miktarları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait zeytin yapraklarındaki oleuropein miktarları sırasıyla 160.40, 59.90, 139.04 mg/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir. Böylece Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait zeytin yapraklarının bileşiminde sırasıyla %16.04, %5.99 ve %13.90 oranında oleuropein bileşiği belirlenmiştir. Çalışmada zeytin çeşidi yapraklarının oleuropein miktarı açısından sıralaması Domat > Trilye > Edremit olarak belirlenmiş olup, Domat ile Trilye arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ), Domat ve Trilye'nin Edremit ile arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein örneklerinin oleuropein miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ).

Saflaştırma basamakları değerlendirildiğinde, zeytin yaprağından oleuropeinin saflaştırılmasıyla oleuropein bileşiği miktarında artış meydana gelmiştir. Oleuropein miktarları bakımından, Edremit ve Trilye çeşitlerinden elde edilen kısmi saflaştırılmış ve saflaştırılmış oleuropein örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ), kısmi saflaştırılmış ve saflaştırılmış oleuropein örneklerinin, kuru yaprak ve ham ekstrakt örnekleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.3.** Zeytin yapraklarının ve ekstraktların oleuropein miktarları

	<b>Domat</b>	<b>Edremit</b>	<b>Trilye</b>
<b>Kuru yaprak</b>	160.40±4.93 <sup>Da*</sup>	59.90±7.00 <sup>Cb</sup>	139.04±23.15 <sup>Ca</sup>
<b>Ham ekstrakt</b>	440.62±13.54 <sup>Ca</sup>	215.26±25.16 <sup>Bb</sup>	305.64±50.90 <sup>Bb</sup>
<b>Kısmi saflaştırılmış oleuropein</b>	834.65±5.46 <sup>Ab</sup>	781.98±11.11 <sup>Ab</sup>	946.54±42.34 <sup>Aa</sup>
<b>Saflaştırılmış oleuropein</b>	762.96±8.85 <sup>Ba</sup>	889.91±92.77 <sup>Aa</sup>	958.22±82.89 <sup>Aa</sup>
<b>Kuru yaprak</b>	16.04±0.49 <sup>Da</sup>	5.99±0.70 <sup>Cb</sup>	13.90±2.32 <sup>Ca</sup>
<b>Ham ekstrakt</b>	44.06±1.35 <sup>Ca</sup>	21.53±2.52 <sup>Bb</sup>	30.56±5.09 <sup>Bb</sup>
<b>Kısmi saflaştırılmış oleuropein</b>	83.46±0.55 <sup>Ab</sup>	78.20±1.11 <sup>Ab</sup>	94.65±4.23 <sup>Aa</sup>
<b>Saflaştırılmış oleuropein</b>	76.29±0.89 <sup>Ba</sup>	88.99±9.28 <sup>Aa</sup>	95.82±8.29 <sup>Aa</sup>

\*Aynı sütundaki büyük harfler saflaştırma basamakları arasındaki farkı, aynı satırdaki küçük harfler ise zeytin çeşitlerinin yaprakları arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05).

Savournin ve ark. (2001) 14 çeşit zeytin ağacına ait kuru yapraklardaki oleuropein miktarının %9-14.3 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, Bouaziz ve Sayadi (2005) hasat zamanına bağlı olarak kuru zeytin yaprağındaki oleuropein miktarının %12.4-14.2 aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Jemai ve ark. (2008) Chemlali çeşidine ait kuru yapraklardaki oleuropein miktarını %4.32 olarak belirlemişlerdir. Ayrıca Japon-Luján ve ark. (2006a) dinamik ultrason enerji desteğiyle yaptığı ekstraksiyonda kuru zeytin yaprağındaki oleuropein miktarını 22.61 mg/g (%2.3) olarak belirlemişlerdir. Tayoub ve ark. (2012) İran kökenli 7 çeşit zeytin ağacından Nisan ve Ekim aylarında topladıkları yapraklardaki oleuropein miktarlarının aylara göre sırasıyla 5.60-9.20 mg/g, 4.30-8.20 mg/g aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Ansari ve ark. (2011) İran kökenli 7 zeytin yaprağındaki oleuropein miktarının 6.1-13.0 mg/g kuru yaprak aralığında değiştiğini belirlemişlerdir.

Ekstraktlarda bulunan oleuropein miktarı incelendiğinde ise Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait zeytin yaprağı ham ekstraktlarında bulunan oleuropein miktarları sırasıyla 440.62 mg/g, 215.26 mg/g, 305.64 mg/g zeytin yaprağı ham ekstraktı olarak tespit edilmiştir. Böylece Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait zeytin yaprağı ham ekstraktlarının sırasıyla %44.06, %21.53 ve %30.56'sını oleuropein bileşiğinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait kısmi saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarında bulunan oleuropein miktarları sırasıyla 834.65 mg/g, 781.98 mg/g ve 946.54 mg/g olarak belirlenmiştir. Böylece Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait kısmi saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarının sırasıyla %83.46, %78.20 ve %94.65'ini oleuropein bileşiğinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarında bulunan oleuropein miktarları sırasıyla 762.96 mg/g, 889.91 mg/g ve 958.22 mg/g olarak belirlenmiştir. Böylece Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarının sırasıyla %76.30, %88.99 ve %95.82'sini oleuropein bileşiğinin oluşturduğu belirlenmiştir.

Mohamed ve ark. (2018) Güney Tunus'ta 21 çeşit zeytin ağacından elde edilen yaprakların bileşiminde bulunan fenolik bileşikleri LC-MS ile belirlemişlerdir. Çalışmada yapraklardaki oleuropein miktarlarının 0.11-4.74 mg/g kuru yaprak aralığında değiştiği tespit edilmiştir.

Şahin (2011) sokshlet yöntemi ile zeytin yapraklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu gerçekleştirdiği bir çalışmada, çözücü olarak etanol, metanol ve su kullanmıştır. Ekstraksiyon işlemleri sonrasında etanol, metanol, su için oleuropein miktarları sırasıyla; 2.90 mg/g kuru yaprak, 37.55 mg/g kuru yaprak, 3.83 mg/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Japón-Luján ve ark. (2006b) kuru zeytin yapraklarından mikrodalga destekli ekstraksiyon ile fenolik bileşik ekstrakte ettikleri bir çalışmada, %80 etanol konsantrasyonu, 8 dk. süre, 200 W gücü optimum ekstraksiyon koşulu olarak belirlemişlerdir. Bu parametreler kullanılarak yapılan ekstraksiyonda oleuropein miktarı 1.01 mg/g kuru yaprak, verbaskozit miktarı 0.631 mg/g kuru yaprak, apijenin-7-glikozit miktarı 1.08 mg/g kuru yaprak, luteolin-7-glikozit miktarı 1.02 mg/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Şahin (2011) yaptığı çalışmada, süperkritik CO<sub>2</sub> yardımıyla zeytin yapraklarından fenolik bileşik ekstraksiyonu gerçekleştirmiştir. Çalışmada çözücü olarak etanol, metanol ve su kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda oleuropein miktarları etanol,

metanol, su ekstraktları için sırasıyla 2.90 mg/g kuru yaprak, 14.24 mg/g kuru yaprak, 10.91 mg/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

#### 4.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Ekstraktların FC yöntemi ile toplam fenolik madde miktarı gallik asit ve oleuropein bileşiği ile çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmıştır (Ek 7.1). Domat, Edremit, Trilye çeşitlerine ait zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarının gallik asit ve oleuropein eşdeğeri cinsinden toplam fenolik madde miktarı Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çalışmada zeytin çeşitlerinin yapraklarının toplam fenolik madde miktarı açısından sıralaması Domat > Trilye > Edremit olarak belirlenmiş olup, Domat ile Trilye arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ), Domat ve Trilye'nin, Edremit ile arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Ayrıca, Domat, Edremit ve Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein örneklerinin toplam fenolik madde miktarları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ).

**Çizelge 4.4.** Zeytin yapraklarının ve ekstraktların toplam fenolik madde miktarları

	Domat	Edremit	Trilye
<b>Kuru yaprak</b>	49.81±4.99 <sup>Da*</sup>	35.10±2.01 <sup>Cb</sup>	46.58±2.40 <sup>Ca</sup>
<b>Ham ekstrakt</b>	136.80±13.72 <sup>Ca</sup>	126.13±7.22 <sup>Ba</sup>	102.36±5.27 <sup>Bb</sup>
<b>Kısmi saflaştırılmış oleuropein</b>	325.02±11.37 <sup>Aa</sup>	299.36±14.96 <sup>Aa</sup>	319.69±16.68 <sup>Aa</sup>
<b>Saflaştırılmış oleuropein</b>	298.69±10.08 <sup>Ba</sup>	295.80±3.38 <sup>Aa</sup>	302.02±16.79 <sup>Aa</sup>
<b>Kuru yaprak</b>	146.37±13.62 <sup>Da</sup>	103.78±5.48 <sup>Cb</sup>	140.20±6.55 <sup>Ca</sup>
<b>Ham ekstrakt</b>	402.00±37.41 <sup>Ca</sup>	372.91±19.69 <sup>Ba</sup>	308.06±14.38 <sup>Bb</sup>
<b>Kısmi saflaştırılmış oleuropein</b>	915.33±31.02 <sup>Aa</sup>	845.33±40.80 <sup>Aa</sup>	900.79±45.50 <sup>Aa</sup>
<b>Saflaştırılmış oleuropein</b>	843.52±27.49 <sup>Ba</sup>	835.64±9.23 <sup>Aa</sup>	852.61±45.78 <sup>Aa</sup>

\*Aynı sütundaki büyük harfler saflaştırma basamakları arasındaki farkı, aynı satırdaki küçük harfler ise zeytin yaprakları arasındaki farkı göstermektedir ( $P<0.05$ ).

Saflaştırma aşamalarında Edremit ve Trilye çeşitlerinin yapraklarının toplam fenolik madde miktarları değerlendirildiğinde kısmi saflaştırılmış ve saflaştırılmış oleuropein

örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz ( $P>0.05$ ), kısmi saflaştırılmış ve saflaştırılmış oleuropein örneklerinin, kuru yaprak ve ham ekstrakt örnekleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

Elde edilen sonuçlara göre Domat çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 136.80 mg GAE/g ekstrakt, 325.02 mg GAE/g ekstrakt, 298.69 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Domat çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 49.81 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Edremit çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 126.13 mg GAE/g ekstrakt, 299.36 mg GAE/g ekstrakt, 295.80 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 35.10 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Trilye çeşidi zeytin yaprağı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 102.36 mg GAE/g ekstrakt, 319.69 mg GAE/g ekstrakt, 302.02 mg GAE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 46.58 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Zeytin yaprağının fenolik bileşik miktarı abiyotik faktörler (coğrafi bölge, iklimsel koşullar, su stresi, tuzluluk, gübreleme, UV ışını, hasat zamanı, vb.) ve biyotik faktörlerden (genotip, funguslar, bakteriler, yaprak yaşı, periyodisite, vb.) etkilenmektedir (Talhaoui ve ark., 2015).

Şahin (2011) Şubat ve Haziran aylarında topladığı 25 farklı zeytin çeşidine ait yapraklardan %80 metanol çözeltisi kullanarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirmiştir. Yapraklardaki toplam fenolik madde miktarı Şubat ayında toplanan yapraklarda 132.61-267.55 mg GAE/g taze yaprak aralığında, Haziran ayında toplanan yapraklarda ise 34.62-106.51 mg GAE/g taze yaprak aralığında belirlenmiştir. Çalışmada zeytin ağacı çeşidi ve hasat zamanının toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisinin

bulunduğu, Şubat ayından Haziran ayına doğru toplam fenolik madde miktarında azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Mitsopoulos ve ark. (2016) birbirini takip eden iki yılda farklı mevsimlerde farklı zeytin ağaçlarına ait yaprakların toplam fenolik madde miktarını belirlemişlerdir. Araştırmada materyal olarak Yunanistan kökenli 10 tür (Koroneiki, Lianolia Kerkyras, Mastoidis, Adramytini, Megaritikı, Gaidourelia, Kalamata, Konservolia, Chalkidiki), İspanya kökenli 1 tür (Arbequina) kullanılmıştır. Yeni sezon yapraklar Nisan ayında, olgun yapraklar ikinci yılın Ekim ve Aralık aylarında toplanmıştır. Yeni sezon Nisan ayında toplanan yapraklardaki toplam fenolik madde miktarı 12.5-18.7 mg GAE/g taze yaprak aralığında değişmekte olup en yüksek miktar Kalamata çeşidinde tespit edilmiştir. Eylül ayında yapraklardaki toplam fenolik madde miktarı ise 10.6-15.3 mg GAE/g taze yaprak aralığında değişmekte olup en yüksek miktar Arbequina çeşidinde belirlenmiştir. Aralık ayında ise toplam fenolik madde miktarı 10.3-17 mg GAE/g taze yaprak aralığında değişmekte olup, en yüksek miktar yine Arbequina çeşidinde tespit edilmiştir.

Zeytin yaprağından elde edilen fenolik ekstraktın miktarını ve bileşimini ekstraksiyon yöntemi de önemli düzeyde etkilemektedir (Şahin ve Şamlı, 2013).

İlbağ ve ark. (2014) ultrason destekli ekstraksiyon yardımıyla zeytin yapraklarından fenolik madde eldesinin optimizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada, toplam fenolik madde miktarının 22.16–46.21 mg GAE/g kuru yaprak aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Ultrason enerjisi yardımıyla ekstraksiyon için optimum ekstraksiyon koşulları ise 3.53 pH, 59.87 dk., 500 mg:19.78 mL (katı:sıvı oranı) olarak belirlenmiş olup çalışmada toplam fenolik madde miktarı ise 56.17 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Abaza ve ark. (2011) Chétoui çeşidi zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktın toplam fenolik madde miktarı üzerine ekstraksiyonda kullanılan çözücünün etkisini araştırdıkları çalışmalarında; çözücü olarak deiyonize su, %80 metanol, %70 etanol, %80 aseton kullanmışlardır. Kullanılan çözücüler için toplam fenolik madde miktarının 16.52-24.93 mg GAE/g kuru yaprak aralığında değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Alzweiri ve Al-Hiari (2013) Ürdün’de yaptıkları, zeytin yaprağından fenolik madde ekstraksiyonu için çözücü olarak metanolü kullandıkları çalışmada, toplam fenolik madde miktarını 40 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Putnik ve ark. (2017) Croatian çeşidi zeytin (*O. europaea*, cv. Oblica) yapraklarından ekstrakt eldesinde, basınçlı sıvı ekstraksiyon tekniğinin etkinliğini araştırmışlardır. Basınçlı sıvı ekstraksiyon uygulamasındaki parametreler; çevrim sayısı (1, 2), sıcaklık (60, 80, 100 °C) ve zaman (5, 10, 15 dk.) olarak belirlenmiştir. Araştırma sonucunda toplam fenolik madde miktarı ortalamalarının 41.13-62.99 mg GAE/g kuru yaprak aralığında değiştiği tespit edilmiştir. Fenolik ekstrakt eldesinde, optimum parametreler (2 çevrim, 80 °C, 5 dk.) belirlenmiş olup, toplam fenolik madde miktarı 53.15 mg GAE/g kuru yaprak olarak belirlenmiştir.

Cifa ve ark. (2018) Slovenyada Istrska belica zeytin çeşidinin yapraklarından fenolik madde ekstraksiyonu için çözücü olarak %70’lik etanolü kullandıkları çalışmada iki tip ekstraksiyon (ultrason ve maserasyon) tekniği uygulamışlardır. Ultrason destekli ekstraksiyon ve maserasyon ekstraksiyonu için toplam fenolik madde miktarını sırasıyla 138.4 ve 32.7 mg GAE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Blasi ve ark. (2016) İtalya’da yetiştirilen 4 farklı zeytin çeşidinin yaprağını (Dolce Agogia, Moraiolo, Leccino ve Frantoio) 4 farklı ayda (Aralık, Mart, Haziran ve Eylül) toplamış ve yaprak ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarını araştırmışlardır. Toplam fenolik madde miktarının 40.9 mg GAE/g kuru yaprak (Aralık ayında toplanan Frantoio çeşidine ait) ile 66.6 mg GAE/g kuru yaprak (Haziran ayında toplanan Dolce Agogia çeşidine ait) aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada tüm çeşitlerin yaprak ekstraktlarının fenolik madde miktarlarında Aralık ayından Haziran ayına kadar bir artışın olduğunu tespit etmişlerdir. Tüm çeşitler için en yüksek fenolik madde miktarı ise Haziran ayında tespit edilmiştir.

Domat çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 402.00 mg OE/g ekstrakt, 915.33 mg OE/g ekstrakt, 843.52 mg OE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Domat çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 146.37 mg OE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.



Edremit çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 372.91 mg OE/g ekstrakt, 845.33 mg OE/g ekstrakt, 835.64 mg OE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 103.78 mg OE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Trilye çeşidi zeytin yaprağı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein ekstraktlarına ait toplam fenolik madde miktarları sırasıyla 308.06 mg OE/g ekstrakt, 900.79 mg OE/g ekstrakt, 852.61 mg OE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yaprağına ait toplam fenolik madde miktarı ise 140.20 mg OE/g kuru yaprak olarak tespit edilmiştir.

Bitki örneklerindeki toplam fenolik madde miktarını belirleyebilmek için farklı spektroskopik ve kromatografik teknikler kullanılmaktadır. Kromatografik teknikler ile ekstraktta bulunan bireysel fenolik bileşikler tanımlanabilir ve miktar tespiti yapılabilir fakat spektroskopik teknikler için böyle bir durum söz konusu değildir. Bununla birlikte fenolik bileşik tespitinde kullanılan kromatografik tekniklerde örnek hazırlama ve yöntem geliştirme uzun zaman almakta, yüksek maliyet ve bunları yapabilecek nitelikli eleman gerekmektedir. UV-VIS spektrofotometresini kullanarak FC metoduyla toplam fenolik madde miktarı analizi basit ve ucuz bir tekniktir (Margraf ve ark., 2015).

FC metodunda fenolik bileşikler FC reaktifi ile reaksiyona girer ve indirgenmiş mavi renkli metal kompleks solüsyonu, belirli bir dalga boyunda UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Kimyasal olarak benzer birçok bileşik test sonuçlarını etkilemektedir. Kalibrasyon çizimi için kullanılan standart büyük önem arz etmektedir. Eğer standart ve fenolik bileşik arasında kimyasal olarak birbiri ile çok yakınlık varsa FC reaktifinin standart ve fenolik bileşiği indirgeme düzeyi karşılaştırılabilir. Araştırmacılar tarafından genellikle standart olarak gallik asit, ferulik asit, klorojenik asit, vanilik asit ve bazı kateşinler kullanılmaktadır. Aynı test örneğinin toplam fenolik madde miktarı farklı standartlar ile çizilen farklı kalibrasyon eğrileri üzerinden hesaplandığında, farklı sayısal değerlerle karşılaşılabilmektedir. Burada seçilen standart bileşik büyük önem arz etmektedir. Meyve, sebze ve biyokütle ekstraktları gibi çeşitli bitki materyallerinin toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesinde FC

yönteminde standart olarak genellikle gallik asit kullanılmaktadır (Bastola ve ark., 2017).

Bitki ekstraktı içinde bulunan bazı indirgen bileşikler FC ile reaksiyona girerek toplam fenolik madde miktarı sonucunu etkileyebilmektedir. Askorbik asit, dehidroaskorbik asit, indirgen şekerler (glikoz, fruktoz) analizin doğruluğunu etkileyen en önemli bileşikler arasında bulunmaktadır (Sánchez-Rangel ve ark., 2013). Bunlara ek olarak aminoasitler, proteinler ve diğer hidrofilik bileşikler de analiz sonucunu etkileyebilmektedir (Velićanski ve ark., 2014). Son zamanlarda yapılan çalışmalar FC yönteminin toplam fenolik madde miktarı analizi için çok doğru bir analitik yaklaşım olmadığını göstermiştir (Margraf ve ark., 2015).

#### 4.5. Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS<sup>•+</sup>)

Ekstraktların ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesi standart troloks bileşiği ile çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmıştır (Ek 7.3). Ekstraktların ABTS<sup>•+</sup> radikal giderme aktiviteleri Çizelge 4.5'te verilmiştir. Çalışmada zeytin yapraklarının antioksidan aktiviteleri Domat > Trilye > Edremit olarak tespit edilmiş olup, zeytin yapraklarının antioksidan aktiviteleri arasında fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). Domat, Edremit, Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein örneklerinin katyon radikali giderme aktivitesi değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05). Saflaştırma aşamalarında Domat ve Edremit çeşitlerinin yapraklarının katyon radikali giderme aktivitesi değerlendirildiğinde kuru yaprak, ham ekstrakt, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05).

**Çizelge 4.5.** Zeytin yapraklarının ve ekstraktların katyon radikali giderme aktivitesi

	<b>Domat</b>	<b>Edremit</b>	<b>Trilye</b>
<b>Kuru Yaprak</b>	54.86±5.01 <sup>Da*</sup>	35.44±1.45 <sup>Dc</sup>	47.71±0.66 <sup>Cb</sup>
<b>Zeytin Yaprığı Ham Ekstraktı</b>	150.67±13.77 <sup>Ca</sup>	127.33±5.20 <sup>Cb</sup>	104.83±1.44 <sup>Bc</sup>
<b>Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein</b>	388.17±11.27 <sup>Bb</sup>	387.33±6.29 <sup>Bb</sup>	424.83±27.65 <sup>Aa</sup>
<b>Saflaştırılmış Oleuropein</b>	456.50±20.00 <sup>Aa</sup>	449.83±16.07 <sup>Aa</sup>	450.67±17.74 <sup>Aa</sup>

\*Sonuçlar mg TE/g olarak verilmiştir. Aynı sütundaki büyük harfler saflaştırma basamakları arasındaki farkı, aynı satırdaki küçük harfler ise zeytin yaprakları arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05).

Domat çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin ABTS katyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 150.67 mg TE/g ekstrakt (601.98 µmol TE/g ekstrakt), 388.17 mg TE/g ekstrakt (1550.88 µmol TE/g ekstrakt), 456.50 mg TE/g ekstrakt (1823.88 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Domat çeşidi zeytin yaprağına ait ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi ise 54.86 mg TE/g kuru yaprak (219.19 µmol TE/g kuru yaprak) olarak tespit edilmiştir.

Edremit çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin ABTS katyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 127.33 mg TE/g ekstrakt (508.73 µmol TE/g ekstrakt), 387.33 mg TE/g ekstrakt (1547.52 µmol TE/g ekstrakt), 449.83 mg TE/g ekstrakt (1797.24 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yaprağına ait ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi ise 35.44 mg TE/g kuru yaprak (141.60 µmol TE/g kuru yaprak) olarak tespit edilmiştir.

Trilye çeşidi zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin ABTS katyon radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 104.83 mg TE/g ekstrakt (418.83 µmol TE/g ekstrakt), 424.83 mg TE/g ekstrakt (1697.35 µmol TE/g ekstrakt), 450.67 mg TE /g ekstrakt (1800.59 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Trilye çeşidi zeytin yaprağına ait ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi ise 47.71 mg TE/g kuru yaprak (190.62 µmol TE/g kuru yaprak) olarak tespit edilmiştir.

Blasi ve ark. (2016) İtalya'da yetiştirilen 4 farklı zeytin çeşidinin yaprağını (Dolce Agogia, Moraiolo, Leccino ve Frantoio) 4 farklı ayda (Aralık, Mart, Haziran ve Eylül) toplamış ve ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Zeytin yapraklarının antioksidan aktivitelerinin 44.8 mg TE/g kuru yaprak (Eylül ayında toplanan Lecino çeşidine ait) ile 99.8 mg TE/g kuru yaprak (Aralık ayında toplanan Dolce Agogia çeşidine ait) aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Abaza ve ark. (2011) Chétoui çeşidi zeytin yapraklarından 4 farklı çözücü (saf su, %80 metanol, %70 etanol, %80 aseton) kullanarak elde ettikleri ekstraktların ABTS katyon

radikalini giderme aktivitelerinin 629.87-1064.25 µmol TE/g kuru yaprak aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Ahmad-Qasem ve ark. (2014) *O. europaea* var. Serrana çeşidine ait yaprakları sıcak havada (70 °C, 120 °C) ve dondurarak kurutma yöntemleriyle kurutmuşlardır. Kurutulmuş yapraklardan geleneksel çözücü ekstraksiyonuyla ve 120 °C'de kurutulmuş yapraklardan ultrason destekli ekstraksiyon yardımıyla da ekstrakt elde etmişlerdir. Elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri ABTS yöntemi kullanılarak 4.4-7.2 mg TE/g kuru yaprak aralığında tespit edilmiştir.

Difonzo ve ark. (2017) zeytin yapraklarından (taze, dondurularak kurutulmuş, sıcak hava ile kurutulmuş) farklı çözücüler kullanarak (saf su, %30'luk etanol, %70'lik etanol) elde ettikleri ekstraktların ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitelerini 385.0-908.0 µmol TE/g aralığında tespit etmişlerdir.

Daniels ve ark. (2011) *Gethyllis multifolia* bitkisinin yaprak, soğan, kök, çiçek ve meyvelerinin antioksidan aktivitesini ABTS yöntemiyle sırasıyla 28.96, 14.35, 29.76, 105.48, 103.09 µmol TE/g olarak, *G. villosa* bitkisinin yaprak, soğan, kök, çiçek ve meyvelerinin antioksidan aktivitesini ABTS yöntemiyle sırasıyla 76.93, 62.82, 54.53, 107.57, 117.21 µmol TE/g olarak tespit etmişlerdir.

Skowrya ve ark. (2014) doğal bir antioksidan kaynağı olarak değerlendirdikleri *Perilla frutescens* (deli fesleğen) bitkisinin yaprak ve saplarından elde ettikleri ekstraktın ABTS yöntemiyle antioksidan aktivitesini 65.03 mg TE/g kuru yaprak olarak belirlemişlerdir.

Iqbal ve ark. (2015) antikanser, antitümör ve birçok biyoaktiviteye sahip olduğu bilinen *Goniothalamus velutinus* bitkisine ait kök ve yaprakların ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitelerini sırasıyla 78.88 mg TE/g kuru kök, 106.03 mg TE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Popova ve ark. (2016) *M. officinalis* L. (limon otu) bitkisinden çözücü olarak suyu kullanarak dekoksasyon ve infüzyon yöntemi ile 2 farklı ekstrakt hazırlamışlardır. ABTS

yöntemiyle antioksidan aktivite değerleri dekoksasyon ve infüzyon yöntemi için sırasıyla 662.99, 418.32  $\mu\text{M TE/g}$  kuru bitki olarak tespit edilmiştir.

Yuan ve Yuk (2018) yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirledikleri *Syzygium antisepticum* bitkisine ait yapraklardan elde edilen ekstraktın ABTS yöntemiyle antioksidan aktivitesini 138.0 mg TE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Proteggente ve ark (2002) ABTS yöntemi ile bazı taze meyve ve sebzelerin [çilek (25.91  $\mu\text{mol TE/g}$ ), frambuaz (18.46  $\mu\text{mol TE/g}$ ), türbe eriği (18.25  $\mu\text{mol TE/g}$ ), greyfurt (8.61  $\mu\text{mol TE/g}$ ), portakal (8.49  $\mu\text{mol TE/g}$ ), kırmızı lahana (13.77  $\mu\text{mol TE/g}$ ), brokoli (6.48  $\mu\text{mol TE/g}$ ), soğan (5.32  $\mu\text{mol TE/g}$ ), yeşil üzüm (5.94  $\mu\text{mol TE/g}$ ), ıspanak (7.57  $\mu\text{mol TE/g}$ ), yeşil lahana (4.92  $\mu\text{mol TE/g}$ ), bezelye (4.40  $\mu\text{mol TE/g}$ ), karnabahar (2.95  $\mu\text{mol TE/g}$ ), pırasa (2.40  $\mu\text{mol TE/g}$ ), marul (1.71  $\mu\text{mol TE/g}$ ), armut (2.82  $\mu\text{mol TE/g}$ ), elma (3.43  $\mu\text{mol TE/g}$ ), şeftali (2.44  $\mu\text{mol TE/g}$ ), muz (1.81  $\mu\text{mol TE/g}$ ), domates (2.55  $\mu\text{mol TE/g}$ )] antioksidan aktivitesini belirlemişlerdir.

#### **4.6. Serbest Radikali Giderme Aktivitesi (DPPH•)**

Ekstraktların DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitesi standart troloks bileşiği ile çizilen kalibrasyon grafiği yardımıyla hesaplanmıştır (Ek 7.4). Ekstraktların DPPH serbest radikali giderme aktiviteleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çalışmada zeytin çeşitlerinin yapraklarının antioksidan aktiviteleri Domat > Trilye > Edremit olarak tespit edilmiş olup, zeytin yapraklarının antioksidan aktiviteleri arasında ki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Edremit ve Trilye çeşitlerine ait saflaştırılmış oleuropein örneklerinin serbest radikali giderme aktivitesi değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P>0.05$ ). Saflaştırma aşamalarında Domat, Edremit, Trilye çeşitlerinin yapraklarının serbest radikali giderme aktivitesi değerlendirildiğinde kuru yaprak, ham ekstrakt, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropein, örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ).

**Çizelge 4.6.** Zeytin yapraklarının ve ekstraktların serbest radikali giderme aktivitesi

	<b>Domat</b>	<b>Edremit</b>	<b>Trilye</b>
<b>Kuru Yaprak</b>	75.10±0.21 <sup>Da*</sup>	41.73±0.58 <sup>Dc</sup>	49.73±3.20 <sup>Db</sup>
<b>Zeytin Yapağı Ham Ekstraktı</b>	206.27±0.58 <sup>Ca</sup>	149.93±2.08 <sup>Cb</sup>	109.27±7.02 <sup>Cc</sup>
<b>Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein</b>	378.60±6.24 <sup>Bc</sup>	400.93±1.15 <sup>Bb</sup>	410.60±4.36 <sup>Ba</sup>
<b>Saflaştırılmış Oleuropein</b>	436.27±1.53 <sup>Ab</sup>	450.60±5.57 <sup>Aa</sup>	456.93±4.04 <sup>Aa</sup>

\*Sonuçlar mg TE/g olarak verilmiştir. Aynı sütundaki büyük harfler saflaştırma basamakları arasındaki farkı, aynı satırdaki küçük harfler ise zeytin yaprakları arasındaki farkı göstermektedir (P<0.05).

Domat çeşidi zeytin yapağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin DPPH serbest radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 206.27 mg TE/g ekstrakt (824.12 µmol TE/g ekstrakt), 378.60 mg TE/g ekstrakt (1512.65 µmol TE/g ekstrakt), 436.27 mg TE/g ekstrakt (1743.06 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Domat çeşidi zeytin yapağının DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ise 75.10 mg TE/g kuru yaprak (300.05 µmol TE/g kuru yaprak) olarak tespit edilmiştir.

Edremit çeşidi zeytin yapağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin DPPH serbest radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 149.93 mg TE/g ekstrakt (599.03 µmol TE/g ekstrakt), 400.93 mg TE/g ekstrakt (1601.86 µmol TE/g ekstrakt), 450.60 mg TE/g ekstrakt (1800.31 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Edremit çeşidi zeytin yapağının DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ise 41.73 mg TE/g kuru yaprak (166.73 µmol TE/g kuru yaprak) olarak tespit edilmiştir.

Trilye çeşidi zeytin yapağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin DPPH serbest radikalini giderme aktiviteleri sırasıyla 109.27 mg TE/g ekstrakt (436.57 µmol TE/g ekstrakt), 410.60 mg TE/g ekstrakt (1640.50 µmol TE/g ekstrakt), 456.93 mg TE/g ekstrakt (1825.60 µmol TE/g ekstrakt) olarak belirlenmiştir. Trilye çeşidi zeytin yapağının DPPH serbest radikalini giderme aktivitesi ise 49.73 mg TE/g kuru yaprak (198.70 µmol TE/g kuru zeytin yapağı) olarak tespit edilmiştir.

Difonzo ve ark. (2017) zeytin yapraklarından (taze, dondurularak kurutulmuş, sıcak hava ile kurutulmuş) farklı çözücüler kullanarak (saf su, %30'luk etanol, %70'lik etanol) elde ettikleri ekstraktların DPPH yöntemi ile antioksidan aktivitelerinin 277.0-922.0 µmol TE/g aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Goldsmith ve ark. (2014) zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin su ile ekstraksiyon işleminin optimizasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmada, DPPH yöntemi için optimum koşullardaki [(90 °C, 70 dk., katı:sıvı oranı (1:20 g/mL)] antioksidan aktiviteyi 85.26 mg TE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Dekdouk ve ark. (2015) İtalya kökenli 5 çeşit (Coratina, Frantoio, Leccino, Maiatica ve Ogliarola) ve Cezayir kökenli 2 çeşit (Sigoise ve Chemlal) zeytin meyvesinin DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesini araştırmışlardır. Zeytin meyvelerinden elde edilen ekstraktların antioksidan aktiviteleri 27.40-202.62 mg TE/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

Yuan ve Yuk (2018) yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirledikleri *Syzygium antisepticum* bitkisine ait yapraklardan elde edilen ekstraktın DPPH yöntemiyle antioksidan aktivitesini 90.2 mg TE/g kuru yaprak olarak tespit etmişlerdir.

Popova ve ark. (2016) *M. officinalis* L. (limon otu) bitkisinden çözücü olarak suyu kullanarak dekoksasyon ve infüzyon yöntemi ile 2 farklı ekstrakt hazırlamışlardır. DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite değerleri dekoksasyon ve infüzyon yöntemi için sırasıyla 722.0 µmol TE/g, 389.52 µmol TE/g kuru bitki olarak tespit edilmiştir.

Karık (2013) *Salvia fruticosa* Mill. (Anadolu adaçayı) bitkisinin hem doğal (10 örnek) hem de kültür formlarının (10 örnek) antioksidan aktivitesini DPPH yöntemiyle belirlemiştir. Doğal ortamdan alınan örneklerde ortalama antioksidan aktivite 8.48 µmol TE/g kuru bitki olarak belirlenirken, kültür koşullarında yetiştirilmiş bitkilerin antioksidan aktivite ortalaması 8.39 µmol TE/g kuru bitki olarak belirlenmiştir.

#### 4.7. Ekstraktların ve Oleuropeinin Antimikrobiyal Aktivitesi

Domat, Edremit, Trilye çeşitlerinden elde edilen zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin MİK değerleri Çizelge 4.7’de ve MİK değerlerinin belirlenmesine yönelik her bir kuyucuğun katı besiyeri üzerine çizimine ait görseller Ek 7.5; 7.6; 7.7; 7.8’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Ekstraktların MİK değerleri

Kullanılan Antimikrobiyaller		Test Mikroorganizmaları			
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>
Zeytin Yaprığı Ham Ekstraktı	Domat	1:1 (%10)	1:2 (%5)	1:2 (%5)	1:32 (%0.313)
	Edremit	1:1 (%10)	1:2 (%5)	1:2 (%5)	1:32 (%0.313)
	Trilye	1:1 (%10)	1:1 (%10)	1:2 (%5)	1:16 (%0.625)
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein	Domat	1:4 (%2.5)	1:4 (%2.5)	1:8 (%1.25)	1:64 (0.156)
	Edremit	1:4 (%2.5)	1:4 (%2.5)	1:16 (%0.625)	1:64 (0.156)
	Trilye	1:2 (%5)	1:4 (%2.5)	1:8 (%1.25)	1:32 (%0.313)
Saflaştırılmış Oleuropein	Domat	1:4 (%2.5)	1:8 (%1.25)	1:8 (%1.25)	1:64 (%0.156)
	Edremit	1:2 (%5)	1:4 (%2.5)	1:8 (%1.25)	1:32 (%0.313)
	Trilye	1:2 (%5)	1:8 (%1.25)	1:8 (%1.25)	1:64 (%0.156)

Domat çeşidine ait zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin *E.coli* O157:H7 için MİK değerleri sırasıyla 1:1 (%10), 1:4 (%2.5), 1:4 (%2.5) olarak belirlenirken, Edremit çeşidi için sırasıyla 1:1 (%10), 1:4 (%2.5), 1:2 (%5), Trilye için ise 1:1 (%10), 1:2 (%5), 1:2 (%5) olarak tespit edilmiştir.

Gökmen ve ark. (2014) piyasadan temin ettikleri ticari zeytin yaprağı ekstraktının 10 bakteriye karşı (*L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Proteus vulgaris*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter sakazakii*, *E. coli* O157, *S. Typhimurium*)



antimikrobiyal etkisini araştırdıkları çalışmada, antimikrobiyal aktivite disk difüzyon metodu ve mikrodilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda *E.coli* ve *E. coli* O157'ye karşı zeytin yaprağı ekstraktının inhibisyon zon çapları sırasıyla 18.00, 17.67 mm olarak belirlenmiştir. MİK değerleri ise *E.coli* için  $\geq 16$  mg/mL, *E.coli* O157 için  $\geq 32$  mg/mL olarak tespit edilmiştir.

Liu ve ark. (2017) konsantrasyonu 62.5 mg/mL olan zeytin yaprağı ekstraktının *E. coli* O157:H7'nin büyümesini neredeyse tamamen engellediğini tespit etmişlerdir.

Heidari-Soureshjani ve ark. (2016) zeytinyağı, susam yağı ve bu iki yağın kombinasyonun *E. coli* üzerine antimikrobiyal etkisini broth mikro dilusyon yöntemiyle araştırmışlardır. Zeytinyağı için MİK değeri 16 mg/mL, susam yağı için ise 64 mg/mL olarak belirlenmiştir. İki yağın karışımının MİK değerleri 64 mg/mL olarak belirlenmiştir.

Su ve metanol kullanılarak zeytin yaprağından elde edilen ekstraktın *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada; 50 mg/mL konsantrasyonunda metanol ekstraktının *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapı 10.5 mm olarak belirlenirken, sulu ekstraktın *E. coli*'ye karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapı 5.0 mm olarak belirlenmiştir (Dada, 2013).

Dominciana ve ark. (2016) ticari dezenfektan, oleuropein ve bu ikisinin kombinasyonunun *E. coli* için MİK değerlerini araştırmışlardır. Bakteri süspansiyonu ( $10^8$  kob/mL), oleuropein (0.4 mg/mL), paraasetik asit (%2.0), benzalkonium klorit (%1.0), klorheksidin diglukonat (%2.0), sodyum hipoklorit (%2.0) ve hidrojen peroksit (%3.0) solüsyonları kullanılmıştır. Oleuropein, paraasetik asit, benzalkonium klorit, klorheksidin diglukonat, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksit için MİK değerleri sırasıyla 0.2, 0.312, 0.156, 0.312, 2.5, 0.234 mg/L olarak tespit edilmiştir. Ayrıca oleuropein ve ticari dezenfektanların kombinasyonunda, bakterisidal etkinin arttığı belirlenmiştir.

Zehra ve ark. (2016) *O. basilicum*, *C. citratuss*, *O. europaea*, *E. camaldulens* bitkilerine ait yapraklardan elde edilen ekstraktların *E. coli*'ye karşı oluşturdukları inhibisyon zon çaplarını sırasıyla 4, 14, 22, 20 mm olarak belirlemiş olup en yüksek antimikrobiyal aktiviteye zeytin yaprağı ekstraktının neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Domat çeşidine ait zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin *L. monocytogenes* için MİK değerleri sırasıyla 1:2 (%5), 1:4 (%2.5), 1:8 (%1.25) olarak belirlenirken, Edremit çeşidi için sırasıyla 1:2 (%5), 1:4 (%2.5), 1:4 (%2.5), Trilye için ise 1:1 (%10), 1:4 (%2.5), 1:8 (%1.25) olarak tespit edilmiştir.

Gökmen ve ark. (2014) *L. monocytogenes*'e karşı zeytin yaprağı ekstraktının inhibisyon zon çapını 19.33 mm ve MİK değerini  $\geq 32$  mg/mL olarak tespit etmişlerdir.

Dominciana ve ark. (2016) oleuropein, paraasetik asit, benzalkonium klorit, klorheksidin diglukonat, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksitin *L. monocytogenes*'e karşı MİK değerlerini sırasıyla 0.2, 0.56, 0.625, 2.5, 1.25, 0.469 mg/L olarak tespit etmişlerdir.

Liu ve ark. (2017) 62.5 mg/mL'lik bir konsantrasyonda zeytin yaprağı ekstraktının *L. monocytogenes*'in büyümesini neredeyse tamamen engellediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca, taramalı elektron mikroskobu ile *L. monocytogenes*'in hücre hareketliliğinde azalma tespit edilmiş ve bu azalma flagellaların işlevini yitirmesiyle ilişkilendirilmiştir. Dahası zeytin yaprağı ekstraktı *L. monocytogenes*'in biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir.

Domat çeşidine ait zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin *S. Typhimurium* için MİK değerleri sırasıyla 1:2 (%5), 1:8 (%1.25), 1:8 (%1.25) olarak belirlenirken, Edremit çeşidi için sırasıyla 1:2 (% 5), 1:16 (%2.5), 1:8 (%1.25), Trilye için ise 1:2 (%5), 1:8 (%1.25), 1:8 (%1.25) olarak tespit edilmiştir.

Gökmen ve ark. (2014) *S. Typhimurium*'a karşı zeytin yaprağı ekstraktının inhibisyon zon çapını 13.33 mm ve MİK değerini  $\geq 16$  mg/mL olarak tespit etmişlerdir.

Aliabadi ve ark. (2012) zeytin yapraklarından su yardımı ile ekstrakt elde etmişler ve bu ekstraktın *S. aureus*, *S. Typhimurium*, *E. coli*, *K. pneumonia* ve *B. cereus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesini agar kuyu difüzyon metodu ile belirlemişlerdir. Zeytin

yaprağı ekstraktının (50 mg/mL) en yüksek antimikrobiyal aktivitesini 11.5 mm inhibisyon zon çapı ile *S. Typhimurium*'a karşı gösterdiği tespit edilmiştir.

Domat çeşidine ait zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin *S. aureus* için MİK değerleri sırasıyla 1:32 (%0.313), 1:64 (%0.156), 1:64 (%0.156) olarak belirlenirken, Edremit çeşidi için sırasıyla 1:32 (%0.313), 1:64 (%0.156), 1:32 (%0.313), Trilye için ise 1:16 (%0.625), 1:32 (%0.313), 1:64 (%0.156) olarak tespit edilmiştir.

Abbasvali ve ark. (2015) 4 İran kökenli zeytin çeşidinden (Zard, Roghani, Shiraz ve Dezfol), 3 farklı çözücü (aseton, etanol ve metanol) kullanarak elde edilen ekstraktların *S. aureus* üzerine antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada, inhibisyon sıralamasını aseton > metanol > etanol ekstraktı olarak tespit etmişlerdir. Aseton ve metanol ekstraktlarının (5 mg/mL) kontrol grubuna nazaran *S. aureus*'un büyümesinde %94'den fazla inhibisyona sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer çeşitler ile karşılaştırıldığında 5 mg/mL konsantrasyonunda Roghani çeşidi zeytin yaprağı ekstraktının en yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Malik (2015) zeytin yaprağı metanol ekstraktının, *S. aureus*'a karşı inhibisyon zon çapını 6.31 mm, MİK değerini 80 µg/mL, MBK değerini ise 60 µg/mL olarak tespit etmiştir.

Bisignano ve ark. (1999) oleuropeinin 49 mikroorganizma üzerine MİK değerlerini araştırdıkları çalışmada, oleuropeinin en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *S. aureus* (1 ATCC suş, 5 penisiline duyarlı suş ve 6 penisiline duyarlı suş) üzerine gösterdiğini tespit etmişlerdir. *S. aureus* ATCC 25923 için MİK değeri 62.5 µg/mL olarak tespit edilmiş olup, penisiline duyarlı suşlar için bu değer 62.5-125 µg/mL aralığında, penisiline dirençli suşlar için 31.25-125 µg/mL aralığında değiştiği saptanmıştır.

Sudjana ve ark. (2009) ticari zeytin yaprağı ekstraktının 122 çeşit mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada, ekstraktın en yüksek aktiviteyi *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* ve *S. aureus*'a karşı gösterdiğini tespit etmişlerdir. *S. aureus* için MİK değeri %0.78 olarak tespit edilmiştir.

Zehra ve ark. (2016) *O. basilicum*, *C. citratuss*, *O. europaea*, *E. camaldulens* bitkilerine ait yapraklardan elde edilen ekstraktların *S. aureus*'a karşı karşı oluşturdukları inhibisyon zon çaplarını sırasıyla 12.8, 14, 25, 12 mm olarak belirlemiş olup en yüksek antimikrobiyal aktiviteye zeytin yaprağı ekstraktının neden olduğunu tespit etmişlerdir.



## 5. SONUÇ

Zeytin ağacı yetiştiriciliğinde ve zeytin işleme endüstrisinde yan ürün olarak ortaya çıkan zeytin yaprağı, yüksek katma değerli fenolik bileşiklerin potansiyel bir kaynağıdır. Son yıllarda sentetik bileşiklerin yan etkisi ve toksisitesine karşı şüphelerin giderek artmasından dolayı antioksidan, antimikrobiyal aktivitelere sahip fenolik bileşiklerin gıdalarda kullanımına yönelik çalışmalar artmış ve fenolik bileşikler açısından zengin zeytin yaprağının da doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilmesine dair araştırmalar yapılmıştır. Zeytin yaprağının sahip olduğu bu özellikler içeriğinde bulunan oleuropein bileşiği ile ilişkilendirilmiştir.

Bu araştırmada, aynı bölgede, aynı yetiştirme koşulları altında bulunan ve aynı zamanda toplanan, farklı zeytin çeşidi (Domat, Edremit, Trilye) yapraklarından; ham ekstrakt elde edilmesi, ham ekstraktan oleuropeininin ekstrakte edilmesi, saflaştırılması, ekstraktların ve oleuropeinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde farklı zeytin çeşidi yapraklarında bulunan oleuropein miktarının belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Ayrıca bu çalışmaların birçoğunda sadece ham ekstrakt bileşimindeki oleuropein miktarı belirlenmiş, zeytin yaprağından oleuropeini saflaştırmak için herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Bu çalışma, Türkiye’de yetişen farklı zeytin çeşidi yapraklarındaki oleuropein miktarını belirlemeye, saflaştırmaya; ham ekstraktların ve saflaştırılmış oleuropeinin antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerini belirlemeye yönelik bir çalışma olması açısından önemlidir.

Çalışmada, zeytin yapraklarından ham ekstrakt elde etme aşamasında ekstraksiyon verimi, zeytin çeşitleri için Trilye > Domat > Edremit olarak tespit edilmiştir. Zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarı açısından sıralaması ise Domat > Trilye > Edremit olarak belirlenmiştir. Saflaştırma basamakları değerlendirildiğinde, zeytin yaprağından oleuropeinin saflaştırılmasıyla toplam fenolik madde miktarında artış meydana gelmiştir. Ayrıca, çalışmada toplam fenolik madde miktarı değerlerinin analizde kullanılan standart fenolik bileşiğe (gallik asit, oleuropein) göre farklılık göstermesi, çalışmalarda kullanılan hammaddeye göre standart seçilmesinin önemini ortaya koymaktadır.

Çalışmada zeytin yapraklarının oleuropein miktarı açısından sıralaması Domat > Trilye > Edremit olarak belirlenmiştir. Ayrıca, çeşitli saflaştırma işlemlerinin uygulanmasıyla birlikte elde edilen zeytin yaprağı ürünlerindeki oleuropein miktarının arttığı tespit edilmiştir. Oleuropein miktarında belirlenen bu artış, uygulanan saflaştırma işlemlerinin doğruluğunu göstermektedir.

Çalışmada zeytin yapraklarının antioksidan aktiviteleri ABTS ve DPPH yöntemleri uygulanarak belirlenmiş olup her iki yöntem için sıralama Domat > Trilye > Edremit olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, zeytin yaprağından oleuropeinin saflaştırılmasına yönelik uygulanan işlemler neticesinde elde edilen ürünlerin antioksidan aktivitelerinde artış söz konusudur. Her üç yapraktan elde edilen ürünlerin ABTS ve DPPH yöntemleri ile antioksidan aktivite sıralaması saflaştırılmış oleuropein > kısmi saflaştırılmış oleuropein > zeytin yaprağı ham ekstraktı olarak tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal analizler neticesinde; zeytin yaprağı ham ekstraktı, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin *E.coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ve *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Test edilen tüm mikroorganizmalar için, kısmi saflaştırılmış oleuropein ve saflaştırılmış oleuropeinin antimikrobiyal aktivitesi, zeytin yaprağı ham ekstraktından daha etkin bulunmuştur. Ayrıca, *S. aureus*'un diğer mikroorganizmalara nazaran zeytin yaprağından elde edilen bu ürünlere karşı daha duyarlı, *E. coli* O157:H7'nin ise daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Zeytin yaprağından elde edilen bu ürünlerin Gram-pozitif bakteriler ve Gram-negatif bakteriler üzerine olan antimikrobiyal etkileri arasında çok büyük farklılıklar olmadığı söylenebilir.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, zeytin ağacı çeşidinin genetik yapısının yapraktaki fenolik bileşik miktarını etkilediği, oleuropein gibi bireysel fenolik bileşik elde edilirken uygun zeytin ağacı türü seçiminin büyük önem arz ettiği söylenebilir. Ayrıca, farklı zeytin çeşidi yapraklarından elde edilen ham ekstraktların ve bu ekstraktlardan saflaştırılan oleuropeinin gıdalara fonksiyonel özellik katabilme ve gıda ürünlerinin raf ömrünü uzatabilme potansiyeline sahip olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca, piyasada çok yüksek rakamlara satılan (10 mg'ı yaklaşık 118 Euro) ve yurt dışından farklı firmalardan ithal edilen oleuropein standardına yakın saflıkta alternatif

bir ürün ortaya çıkarılması ile ülkemizin değerli kimyasallar konusunda dışa bağımlılığının azaltılmasına katkıda bulunabilme açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir.

İleriki çalışmalarda aynı veya farklı ekstraksiyon metodu kullanılarak değişik aylarda ve coğrafi bölgelerde toplanan zeytin yapraklarının oleuropein bileşiği miktarı üzerine olan etkileri incelenebilir. Ayrıca oleuropein ekstraksiyonunda farklı faktörlerin (çözücü türü, çözücü miktarı, sıcaklık, pH, örnek boyutu vb.) ve gıda teknolojisinde son yıllarda sıklıkla kullanılan güncel ekstraksiyon tekniklerinin (süper kritik akışkan, basınçlı sıvı ekstraksiyon, ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon vb.) ekstraksiyon verimine etkisi araştırılmalıdır. Bunun yanı sıra, yapılan bu çalışma katma değeri yüksek ve ekstraksiyon yöntemi açısından yenilikçi olması, konu ile ilgili bundan sonra yapılacak endüstriyel uygulama projelerine temel oluşturması veya teknolojik uygulama projelerine girdi sağlayacak teknolojik ürün/bilgi üretmeye yönelik olması açısından önemlidir. Özel sektör ile birlikte çalışılarak konunun laboratuvar düzeyinden çıkartılıp endüstriyel boyuta taşınmasının gerekliliği açısından da oldukça önem arz etmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Abaza, L., Youssef, N.B., Manai, H., Haddada, F.M., Methenni, K. ve Zarrouk, M., 2011. Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *grasas y aceites*, 62(1), 96-104.
- Abbasvali, M., Esmaili Koutamehr, M., Moshtaghi, H. ve Eskandari, M.H., 2015. Effect of leaf extract of olive (*Olea europaea*) cultivars on *Staphylococcus aureus*. *Online Journal of Veterinary Research*, 19(8), 519-529.
- Agati, G., Cerovic, Z.G., Pinelli, P. ve Tattini, M., 2011. Light-induced accumulation of ortho-dihydroxylated flavonoids as non-destructively monitored by chlorophyll fluorescence excitation techniques. *Environmental and Experimental Botany*, 73, 3-9.
- Ahmad-Qasem, M.H., Cánovas, J., Barrajon-Catalán, E., Carreres, J.E., Micol, V. ve Garcia-Perez, J.V., 2014. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(26), 6190-6198.
- Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M. ve Baldoni, L., 2012. Olive phenolic compounds: metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC plant biology*, 12(1), 162.
- Al-Azzawie, H.F. ve Alhamdani, M.S.S., 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sciences*, 78(12), 1371-1377.
- Aliabadi, M.A., Darsanaki, R.K., Rokhi, M.L., Nourbakhsh, M. ve Raeisi, G., 2012. Antimicrobial activity of olive leaf aqueous extract. *Annals of Biological Research*, 3(8), 4189-4191.
- Altıok, E., Bayçın, D., Bayraktar, O. ve 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.
- Alzweiri, M. ve Al-Hiari, Y.M., 2013. Analysis and evaluation of hydroxytyrosol in olive leaf extract. *Jordan J. Pharm. Sci*, 6, 314-322.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E.K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E. ve Kremastinos, D.T., 2007. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(3), 549-558.
- Anonim, 2015. TR63 Bölgesi Zeytincilik Sektör Raporu. Doğu Akdeniz Kalkınma Ajansı. <http://www.dogaka.gov.tr>. [Ziyaret Tarihi: 22 Mayıs 2017].
- Anonim, 2017a. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. [Ziyaret Tarihi: 5 Ocak 2019].
- Anonim, 2017b. Türkiye İstatistik Kurumu, TÜİK. <https://www.tuik.gov.tr>. [Ziyaret Tarihi: 28 Haziran 2018].
- Anonim, 2017c. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Oleuropein> [Ziyaret Tarihi: 28 Mayıs 2017].
- Ansari, M., Kazemipour, M. ve Fathi, S., 2011. Development of a simple green extraction procedure and HPLC method for determination of oleuropein in olive leaf extract applied to a multi-source comparative study. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8(1), 38-47.
- Aouidi, F., Okba, A. ve Hamdi, M., 2017. Valorization of functional properties of extract and powder of olive leaves in raw and cooked minced beef meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(10), 3195-3203.



- Aytul, K.K., 2010. Antimicrobial and antioxidant activities of olive leaf extract and its food applications (Doktora Tezi), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H.B. ve Aktaş, B., 2011. Zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ile zeytin karasuyunun antimikrobiyal ve antioksidan etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52(1).
- Bastola, K.P., Guragain, Y.N., Bhadriraju, V. ve Vadlani, P.V., 2017. Evaluation of standards and interfering compounds in the determination of phenolics by Folin-Ciocalteu assay method for effective bioprocessing of biomass. *American Journal of Analytical Chemistry*, 8(06), 416.
- Başoğlu, F., 2010. Yemeklik Yağ Teknolojileri. Dora Yayın Dağıtım, Bursa.
- Bayçın Hızal, D., 2006. Adsorption of Olive Leaf Antioxidants on Silk Fibroin. (Yüksek Lisans Tezi), İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İzmir.
- Beltran, A., Valente, A.J.M., Jimenez, A. ve Garrigos, M.C., 2014. Characterization of Poly( $\epsilon$ -caprolactone)-Based Nanocomposites Containing Hydroxytyrosol for Active Food Packaging. *Journal Agricultural Food Chemistry*, (62), 2244-2252.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A. ve Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves, *Food Chemistry*, 68 (4), 457-462.
- Benkrief, R., Ranarivelo, Y., Skaltsounis, A.L., Tillequin, F., Koch, M., Pusset, J., ve Sévenet, T., 1998. Monoterpene alkaloids, iridoids and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus austrocaledonica*. *Phytochemistry*, 47(5), 825-832.
- Bıçakçı, A., Altunoğlu, M.K., Tosunoğlu, A., Çelenk, S., Canitez, Y., Malyer, H. ve Sapan, N., 2009. Türkiye’de Oleaceae familyasına ait allerjenik Olea (zeytin ağacı) ve Fraxinus (dişbudak ağacı) polenlerinin havadaki dağılımları. *Asthma Allergy Immunol*, 7, 133-146.
- Bi, X., Li, W., Sasaki, T., Li, Q., Mitsuhashi, N., Asada, Y., Zhang, Q. ve Koike, K., 2011. Secoiridoid glucosides and related compounds from *Syringa reticulata* and their antioxidant activities. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(21), 6426-6429.
- Bianco, A. ve Uccella, N., 2000. Biophenolic Components of Olives. *Food Research International*, (33), 475-485.
- Bilgin, M. ve 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.
- Bisignano, G., Tomaino, A., Cascio, R.L., Crisafi, G., Uccella, L. ve Saija, A., 1999. On the In-vitro Antimicrobial Activity of Oleuropein and Hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, (51), 971-974.
- Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M.S., Chiesi, C. ve Cossignani, L., 2016. Seasonal variations in antioxidant compounds of *Olea europaea* leaves collected from different Italian cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89.
- Boskou, D., 1996. Olive oil chemistry and technology. History and characteristics of the olive tree. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1-6.
- Boss, A., Bishop, K., Marlow, G., Barnett, M. ve Ferguson, L., 2016. Evidence to support the anti-cancer effect of olive leaf extract and future directions. *Nutrients*, 8(8), 513.
- Bouaziz, M. ve 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.

- Bouaziz, M., Feki, I., Jemai, H., Ayadi, M. ve 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.
- Bouaziz, M., Feki, I., Ayadi, M., Jemai, H. ve 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.
- Boyer, L., Elias, R., Taoubi, K., Debrauwer, L., Faure, R., Baghdikian, B. ve Balansard, G., 2005. Lignans and secoiridoids from the root bark of *Chionanthus virginicus* L.: isolation, identification and HPLC analysis. *Phytochemical Analysis*, 16(5), 375-379.
- Bulotta, S., Corradino, R., Celano, M., D'Agostino, M., Maiuolo, J., Oliverio, M., Procopio, A., Iannone, M., Rotiroti, D ve Russo, D., 2011. Antiproliferative and antioxidant effects on breast cancer cells of oleuropein and its semisynthetic peracetylated derivatives. *Food Chemistry*, 127(4), 1609-1614.
- Bulotta, S., Celano, M., Lepore, S.M., Montalcini, T., Pujia, A. ve 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.
- Calis, I., Hosny, M. ve Lahloub, M.F., 1996. A secoiridoid glucoside from *Fraxinus angustifolia*. *Phytochemistry*, 41(6), 1557-1562.
- Cicerale, S., Lucas, L.J. ve Keast, R.S.J., 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 129-135.
- Cifa, D., Skrt, M., Pittia, P., Di Mattia, C. ve Poklar Ulrih, N., 2018. Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food Science & Nutrition*, 6, 1128-1137.
- Czerwińska, M., Kiss, A. K. ve Naruszewicz, M., 2012. A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food chemistry*, 131(3), 940-947.
- Dada, E. O., 2013. Antibacterial activities of *Olea europaea* leaf extract on some bacteria isolated from a Refused Dump Site in Akure, Nigeria. *Journal of Biology*, 1(6), 118-124.
- Daniels, C.W., Rautenbach, F., Mabusela, W. T., Valentine, A. J. ve Marnewick, J. L., 2011. Comparative antioxidant-capacity and-content of leaves, bulbs, roots, flowers and fruit of *Gethyllis multifolia* L. Bolus and *G. villosa* Thunb. species. *South African journal of botany*, 77(3), 711-717.
- Dekdouk, N., Malafrente, N., Russo, D., Faraone, I., De Tommasi, N., Ameddah, S., Severino, L. ve Milella, L., 2015. Phenolic compounds from *Olea europaea* L. possess antioxidant activity and inhibit carbohydrate metabolizing enzymes in vitro. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.
- DellaGreca, M., Mancino, A., Previtera, L., Zarrelli, A. ve Zuppolini, S., 2011. Lignans from *Phillyrea angustifolia* L. *Phytochemistry Letters*, 4(2), 118-121.
- De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V. ve Ranalli, G., 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.
- Deng, R.X., Yuan, H., Liu, P., Yin, W.P., Wang, X.S. ve Zhao, T.Z., 2010. Chemical constituents from *Syringa pubescens* Turcz. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38(4), 813-815.

- Diez, C.M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P. ve Gaut, B.S., 2015. Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, 206(1), 436-447.
- Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V.M., Ranieri, M., Pasqualone, A., Summo, C., Tamma, G., Silletti, R. ve Caponio, F., 2017. Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: Antioxidant characterization and biological activity. *Journal of Functional Foods*, 31, 63-70.
- Dominciano, L.C.C., Oliveira, C.A.F., Lee, S.H. ve Corassin, C.H., 2016. Individual and combined antimicrobial activity of oleuropein and chemical sanitizers. *J Food Chem Nanotechnol*, 2(3), 124-127.
- Domitrović, R., Jakovac, H., Marchesi, V.V., Šain, I., Romić, Ž. ve Rahelić, D., 2012. Preventive and therapeutic effects of oleuropein against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Pharmacological research*, 65(4), 451-464.
- Dua, S., Bhat, Z.F. ve Kumar, S., 2015. Effect of oleuropein on the oxidative stability and storage quality of Tabaq-Maz, fried mutton ribs. *Food Bioscience*, (12), 84-92.
- Durlu-Özkaya, F. ve Özkaya, M.T., 2011. Oleuropein using as an Additive for Feed and Products used for Humans. *Journal of Food Processing and Technology*, 2-3.
- Egan, P., Middleton, P., Byres, M., Kumarasamy, Y., Middleton, M., Nahar, L. ve Delazar, A., 2004. GI 5, a dimer of oleoside, from *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1069-1071.
- Elgin-Cebe, G., Konyalıoğlu, S. ve Zeybek, U., 2012. *Olea europaea* var. *europaea* (Zeytin) Yaprak İnfüzyonunun Antioksidan Etkisi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49(3), 209-212.
- Erbay, Z. ve Icier, F., 2010. The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International*, 26(4), 319-334.
- Farag, R.S., Mahmoud, E.A. ve 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 & technology*, 42(1), 107-115.
- Furneri, P.M., Marino, A., Saija, A., Uccella N. ve G. Bisignano., 2002. In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein. *International Journal of Antimicrobial Agents*, (20), 293-296.
- Gaetano, L., Calabrese, G.J. ve Perrino, E.V., 2016. The Origin and Distribution of Olive Tree and Olive Crop.
- Goldsmith, C.D., Vuong, Q.V., Stathopoulos, C.E., Roach, P.D. ve Scarlett, C.J., 2014. Optimization of the aqueous extraction of phenolic compounds from olive leaves. *Antioxidants*, 3(4), 700-712.
- Goulas, V., Exarchou, V., Troganis, A.N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E. ve Gerothanassis, I.P., 2009. Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, (53), 600-608.
- Gökmen, M., Kara, R., Akkaya, L., Torlak, E. ve Onen, A., 2014. Evaluation of antimicrobial activity in olive (*Olea europaea*) leaf extract. *Am J Microbiol*, 5(2), 37-40.
- Gullón, B., Gullón, P., Eibes, G., Cara, C., De Torres, A., López-Linares, J.C., Ruiz, E. ve Castro, E., 2018. Valorisation of olive agro-industrial by-products as a source of bioactive compounds. *Science of The Total Environment*, 645, 533-542.
- Guo, N., Yu, Y., Ablajan, K., Li, L., Fan, B., Peng, J., Yan, H., Ma, F. ve Nie, Y., 2011. Seasonal variations in metabolite profiling of the fruits of *Ligustrum lucidum* Ait. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(12), 1701-1714.

- Haddadin, M.S.Y., 2010. Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(8), 787-793.
- Hadrich, F., Mahmoudi, A., Bouallagui, Z., Feki, I., Isoda, H., Feve, B. ve Sayadi, S., 2016. Evaluation of hypocholesterolemic effect of oleuropein in cholesterol-fed rats. *Chemico-Biological Interactions*, (252), 54-60.
- Hassen, I., Casabianca, H. ve Hosni, K., 2015. Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation—A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 18, 926-940.
- Hayes, J.E., Stepanyan, V., Allen, P., O'grady, M.N. ve 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.
- Heidari-Soureshjani, R., Gholipour, A., Obeidavi, Z., Jafari, A., Abbasi, S. ve Madmoli, Y., 2016. Bactericidal and Bacteriostatic effect of sesame oil, olive oil and their synergism on *Escherichia coli* in vitro. *Advanced Herbal Medicine*. 2(4), 7-12.
- Hosny, M., 1998. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus oxycarpa*. *Phytochemistry*, 47(8), 1569-1576.
- Hugo, W.B. ve Bloomfield, S.F., 1971. Studies on the mode of action of the phenolic antibacterial agent fenchlor against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* II. The effects of fenchlor on the bacterial membrane and the cytoplasmic constituents of the cell. *Journal of Applied Bacteriology*, 34(3), 579-591.
- Iossifova, T., Vogler, B. ve Kostova, I., 1998. Secoiridoid glucosides from *Fraxinus ornus* bark. *Phytochemistry*, 49(5), 1329-1332.
- Iraqi, R., Vermeulen, C., Benzekri, A., Bouseta, A. ve Collin, S., 2005. Screening for Key Odorants in Moroccan Green Olives by Gas Chromatography-Olfactometry/Aroma Extract Dilution Analysis. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (53), 1179-1184.
- Iqbal, E., Salim, K.A. ve Lim, L.B., 2015. Phytochemical screening, total phenolics and antioxidant activities of bark and leaf extracts of *Goniothalamus velutinus* (Airy Shaw) from Brunei Darussalam. *Journal of King Saud University-Science*, 27(3), 224-232.
- İlbağ, Z., Şahin, S. ve 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.
- Jaber, H., Ayadi, M., Makni, J., Rigane, G., Sayadi, S. ve Bouaziz, M., 2012. Stabilization of refined olive oil by enrichment with chlorophyll pigments extracted from Chemlali olive leaves. *European journal of lipid science and technology*, 114(11), 1274-1283.
- Janakat, S., Al-Nabulsi, A.A.R., Allehdan, S., Olaimat, A.N. ve Holley, R.A., 2015. Antimicrobial activity of amurca (olive oil lees) extract against selected foodborne pathogens. *Food Science and Technology*, 35(2), 259-265.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M. ve De Castro, M.L., 2006a. Dynamic ultrasound-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Journal of Chromatography A*, 1108(1), 76-82.
- Japón-Luján, R., Luque-Rodríguez, J.M. ve De Castro, M.L., 2006b. Multivariate optimisation of the microwave-assisted extraction of oleuropein and related biophenols from olive leaves. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 385(4), 753-759.

- Jemai, H., Bouaziz, M., Fki, I., El Feki, A. ve 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.
- Jemai, H., El Feki, A. ve Sayadi, S., 2009. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 8798-8804.
- Jiménez, P., García, P., Bustamante, A., Barriga, A. ve Robert, P., 2017. Thermal stability of oils added with avocado (*Persea americana* cv. Hass) or olive (*Olea europaea* cv. Arbequina) leaf extracts during the French potatoes frying. *Food chemistry*, 221, 123-129.
- Juven, B., Henis, Y. ve Jacoby, B., 1972. Studies on the mechanism of the antimicrobial action of oleuropein. *Journal of Applied Bacteriology*, 35(4), 559-567.
- Karık, Ü., 2013. Marmara bölgesindeki anadolu adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.) populasyonlarının morfolojik ve kalite özelliklerinin belirlenmesi, kültüre alınma olanaklarının araştırılması. (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ.
- Khemakhem, I., Gargouri, O.D., Dhoub, A., Ayadi, M.A. ve Bouaziz, M., 2017. Oleuropein rich extract from olive leaves by combining microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, 172, 310-317.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A. ve Karakas, R., 2006. Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey. *Annals of microbiology*, 56(4), 359.
- Korukluoğlu, M., Şahan, Y., Yiğit, A., Tümay-Özer, E. ve Gücer, Ş., 2010. Antibacterial activity and chemical constitutions of *Olea europaea* L. leaf extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, (34), 383-396.
- Kotyzová, D., Hodková, A. ve Eybl, V., 2011. The effect of olive oil phenolics—Hydroxytyrosol and oleuropein on antioxidant defence status in acute arsenic exposed rats. *Toxicology Letters*, (205), S222.
- Kroll, R.G. ve Anagnostopoulos, G. D., 1981. Potassium leakage as a lethality index of phenol and the effect of solute and water activity. *Journal of Applied Bacteriology*, 50(1), 139-147.
- Kubba, A., Tillequin, F., Koch, M., Litaudon, M. ve Deguin, B., 2005. Iridoids, lignan, and triterpenes from *Osmanthus cymosus*. *Biochemical systematics and ecology*, 33(3), 305-307.
- Kubo, I., Matsumoto, A. ve Takase, I., 1985. A multichemical defense mechanism of bitter olive *Olea europaea* (oleaceae). *Journal of chemical ecology*, 11(2), 251-263.
- Kurt, Ş. ve Ceylan, H.G., 2017. Effects of olive leaf extract on the oxidation stability and microbiological quality of dry fermented sausage (sucuk). *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 9(4).
- Liu, Y., McKeever, L.C. ve Malik, N.S., 2017. Assessment of the antimicrobial activity of olive leaf extract against foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8, 113.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A. ve Pereira, J.A., 2013. Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 509-521.
- Malik, S.N., 2015. Antibacterial activity of olive (*Olea europaea*) leaves and arugula (*Eruca sativa*) seeds extract. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7(2), 307-310.

- Margraf, T., Karnopp, A.R., Rosso, N.D. ve Granato, D., 2015. Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates. *Journal of food science*, 80(11), C2397-C2403.
- Marhamatizadeh, M.H., Ehsandoost, E., Gholami, P. ve Mohaghegh, M.D., 2013. Effect of olive leaf extract on growth and viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* for production of probiotic milk and yoghurt. *Int. J. Farm. Allied Sci*, 2, 572-578.
- Markin, D., Duek, L. ve Berdicevsky, I., 2003. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. Mycoses*, 46(3-4), 132-136.
- Menduh, B., 2015. Zeytin, Zeytin Çekirdeği ve Zeytin Yaprağındaki Oleuropein Bileşiğinin İzolasyonu ve Miktarlarının Karşılaştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M. ve Hagidimitriou, M., 2016. Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Leaves and Drupes of Ten Olive Varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 155-161.
- Mohamed, M.B., Guasmi, F., Ali, S.B., Radhouani, F., Faghim, J., Triki, T., Kammoun, N.G., Baffi, C., Lucini, L. ve Benincasa, C., 2018. The LC-MS/MS characterization of phenolic compounds in leaves allows classifying olive cultivars grown in South Tunisia. *Biochemical Systematics and Ecology*, 78, 84-90.
- Moudache, M., Nerín, C., Colón, M. ve Zaidi, F., 2017. Antioxidant effect of an innovative active plastic film containing olive leaves extract on fresh pork meat and its evaluation by Raman spectroscopy. *Food chemistry*, 229, 98-103.
- Nekooeian, A.A., Khalili, A. ve Khosravi, M.B., 2014. Oleuropein offers cardioprotection in rats with simultaneous type 2 diabetes and renal hypertension. *Indian journal of pharmacology*, 46(4), 398.
- Nenadis, N., Vervoort, J., Boeren, S. ve Tsimidou, M.Z., 2007. *Syringa oblata* Lindl var. *alba* as a source of oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(1), 160-166.
- Nizamlioğlu, N.M. ve Nas, S., 2010. Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1) 20-35.
- Oh, H., Ko, E.K., Kim, D.H., Jang, K.K., Park, S.E., Lee, H.S. ve Kim, Y.C., 2003. Secoiridoid glucosides with free radical scavenging activity from the leaves of *Syringa dilatata*. *Phytotherapy Research*, 17(4), 417-419.
- Omar, S.H., 2010a. Cardioprotective and neuroprotective roles of oleuropein in olive. *Saudi Pharmaceutical Journal*, (18), 111-121.
- Omar, S.H., 2010b. Oleuropein in Olive and its Pharmacological Effects. *Scientia Pharmaceutica*, (78), 133-154.
- Oskay, D. ve Oskay, M., 2009. Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *Ecological Life Sciences*, 4(2), 31-41.
- Özcan, M.M. ve Matthäus, B., 2017. A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*, 243(1), 89-99.
- Öztürk, F., Yalçın, M. ve Dıraman, H., 2009. Türkiye Zeytinyağı Ekonomisine Genel Bir Bakış. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4 (2), 35-51.
- Panizzi, L., Scarpati, M.L. ve Oriente, G., 1960. Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity. *Gazzetta Chimica Italiana*, (90), 1449-1485.

- Peker, H. ve Arslan, S., 2017. Effect of Olive Leaf Extract on the Quality of Low Fat Apricot Yogurt. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), e13107.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. ve Pereira, J.A., 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- Popova, A., Dalemska, Z., Mihaylova, D., Hristova, I. ve Alexieva, I., 2016. *Melissa officinalis* L.-GC Profile and Antioxidant Activity. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res*, 8, 634-638.
- Proteggente, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., Buren, L.V., Wagner, E., Wiseman, S., Van De Put, F., Dacombe, C ve Rice-Evans, C.A., 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical research*, 36(2), 217-233.
- Putnik, P., Barba, F. J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. ve Kovačević, D.B., 2017. Green extraction approach for the recovery of polyphenols from Croatian olive leaves (*Olea europaea*). *Food and Bioproducts Processing*, 106, 19-28.
- Qabaha, K., AL-Rimawi, F., Qasem, A. ve Naser, S.A., 2018. Oleuropein is responsible for the major anti-inflammatory effects of olive leaf extract. *Journal of medicinal food*, 21(3), 302-305.
- Qadir, N.M., Ali, K.A. ve Qader, S.W., 2016. Antidiabetic Effect of Oleuropein from *Olea europaea* Leaf against Alloxan Induced Type 1 Diabetic in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59.
- Rafiee, Z., Jafari, S.M., Alami, M. ve Khomeir, M., 2012. Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. *J. Agr. Sci. Tech.*, 14, 1497-1509.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F.F. ve Cimato, A., 1999, Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 964-967.
- Romero, M., Toral, M., Gómez-Guzmán, M., Jiménez, R., Galindo, P., Sánchez, M., Olivares, M., Galvez, J. ve Duarte, J., 2016. Antihypertensive effects of oleuropein-enriched olive leaf extract in spontaneously hypertensive rats. *Food & function*, 7(1), 584-593.
- Romero-Garcia, J.M., Lama-Muñoz, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Moya, M., Ruiz, E., Fernández-Bolaños, J. ve Castro, E., 2016. Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chemistry*, (210), 457-465.
- Ruiz-Barba, J.L., Garrido-Fernandez, A. ve Jimenez-Diaz, R., 1991. Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against *Lactobacillus plantarum*. *Letters in applied microbiology*, 12(2), 65-68.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K. ve Lavee, S., 2002. Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.
- Sabry, O.M., 2014. Beneficial health effects of olive leaves extracts. *Journal of Natural Sciences Research*, 4(19), 1-9.
- Salah, M.B., Abdelmelek, H. ve Abderraba, M., 2012. Study of phenolic composition and biological activities assessment of olive leaves from different varieties grown in Tunisia. *Med chem*, 2(5), 107-111.

- Sanchez, J.C., Alsina, M.A., Herrlein, M.K. ve Mestres, C., 2007. Interaction between the antibacterial compound, oleuropein, and model membranes. *Colloid Polymer Science*, (285), 1351-1360.
- Sánchez-Rangel, J.C., Benavides, J., Heredia, J.B., Cisneros-Zevallos, L. ve Jacobo-Velázquez, D.A., 2013. The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical Methods*, 5(21), 5990-5999.
- Sanz, M., Simón, B.F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Hernández, T., Estrella, I. ve Pinto, E., 2012. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(7), 905-918.
- Savournin, C., Baghdikian, B., Elias, R., Dargouth-Kesraoui, F., Boukef, K. ve 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.
- Skowrya, M., Falguera, V., Azman, N.A., Segovia, F. ve Almajano, M.P., 2014. The effect of perilla frutescens extract on the oxidative stability of model food emulsions. *Antioxidants*, 3(1), 38-54.
- Soler-Rivas, C., Espín, J.C. ve Wichers, H.J., 2000. Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 1013-1023.
- Souilem, S., Fki, I., Kobayashi, I., Khalid, N., Neves, M. A., Isoda, H., Sayadi, S. ve Nakajima, M., 2017. Emerging technologies for recovery of value-added components from olive leaves and their applications in food/feed industries. *Food and bioprocess technology*, 10(2), 229-248.
- Sudjana, A.N., D’Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, T.V. ve Hammer, K.A., 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- Sugiyama, M., Machida, K., Matsuda, N. ve Kikuchi, M., 1993. A secoiridoid glycoside from *Osmanthus asiaticus*. *Phytochemistry*, 34(4), 1169-1170.
- Şahin, S., 2011. Zeytin Ağacı Yapraklarından Süperkritik-CO<sub>2</sub> ile Ekstrakt Eldesi ve Bileşimindeki Oleuropein Miktarının İncelenmesi. (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Şahin, S. ve Samlı, R., 2013. Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 595-602.
- Şahin, S., Bilgin, M., Sayım, E. ve 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.
- Şahin, S. ve Bilgin, M., 2018. Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(4), 1271-1279.
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Pérez-Sánchez, A., Herrero, M., Ibanez, E., Micol, V., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. ve 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.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A. ve Segura-Carretero, A., 2015. Phenolic compounds in olive leaves: Analytical



- determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- Targan, Ş., Arısoy, K., Abalı, Y. ve Kaya, E., 2008. Ayçiçek yağının raf ömrünün uzatılmasında sitrik asit ve fosforik asidin antioksidan etkisi. *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(1), 67-75.
- Tattini, M., Galardi, C., Pinelli, P., Massai, R., Remorini, D. ve Agati, G., 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytologist*, 163(3), 547-561.
- Tayoub, G., Sulaiman, H., Hassan, A. H. ve Alorfi, M., 2012. Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2, 428-433.
- Teerarak, M., Laosinwattana, C. ve Charoenying, P., 2010. Evaluation of allelopathic, decomposition and cytogenetic activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *grandiflorum* (L.) Kob. on bioassay plants. *Bioresource Technology*, 101(14), 5677-5684.
- Trombetta, D., Saija, A., Bisignano, G., Arena, S., Caruso, S., Mazzanti, G., Uccella, N. ve Castelli, F., 2002. Study on the mechanisms of the antibacterial action of some plant  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes. *Letters in applied microbiology*, 35(4), 285-290.
- Velićanski, A.S., Cvetkovic, D.D., Markov, S.L., Saponjac, V.T.S. ve Vulic, J.J., 2014. Lemon Balm Kombucha Antioxidant Activity. *Food Technol. Biotechnol.*, 52(4), 420-429.
- Vogel, P., Kasper, Machado, I., Garavaglia, J., Zani, V.T., de Souza, D. ve Morelo S.D.B., 2014. Polyphenols benefits of olive leaf (*Olea europaea* L) to human health. *Nutricion Hospitalaria*, 31(3), 1427-1433.
- Wainstein, J., Ganz, T., Boaz, M., Bar Dayan, Y., Dolev, E., Kerem, Z. ve Madar, Z., 2012. Olive leaf extract as a hypoglycemic agent in both human diabetic subjects and in rats. *Journal of medicinal food*, 15(7), 605-610.
- Winkelhausen, E., Pospiech, R. ve Laufenberg, G., 2005. Antifungal activity of phenolic compounds extracted from dried olive pomace. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 24(1), 41-46.
- Xu, Y., Burton, S., Kim, C. ve Sismour, E., 2016. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. *Food science & nutrition*, 4(1), 125-133.
- Yuan, W. ve Yuk, H.G., 2018. Antimicrobial efficacy of *Syzygium antisepticum* plant extract against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* and its application potential with cooked chicken. *Food microbiology*, 72, 176-184.
- Zanichelli, D., Baker, T.A., Clifford, M.N. ve Adams, M.R., 2005. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by oleuropein is mediated by hydrogen peroxide. *Journal of food protection*, 68(7), 1492-1496.
- Zehra, A., Naqvi, S.B.S. ve Ali, S.Q., 2016. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effect of Extracts of Medicinal Plant's Leaves. *J Med Microb Diagn*, 5, 236
- Zeitoun, M.A.M., Mansour, H.M., Ezzat, S. ve El Sohaimy, S.A., 2017. Effect of Pretreatment of Olive Leaves on Phenolic Content and Antioxidant Activity. *American Journal of Food Technology*, 12, 132-139.
- Zorić, N., Kopjar, N., Kraljić, K., Oršolić, N., Tomić, S. ve Kosalec, I., 2016. Olive leaf extract activity against *Candida albicans* and *C. dubliniensis*—the in vitro viability study. *Acta Pharmaceutica*, 66(3), 411-421.

Zribi, A., Gargouri, B., Jabeur, H., Rebaï, A., Abdelhedi, R. ve Bouaziz, M., 2013. Enrichment of pan-frying refined oils with olive leaf phenolic-rich extract to extend the usage life. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(12), 1443-1453.



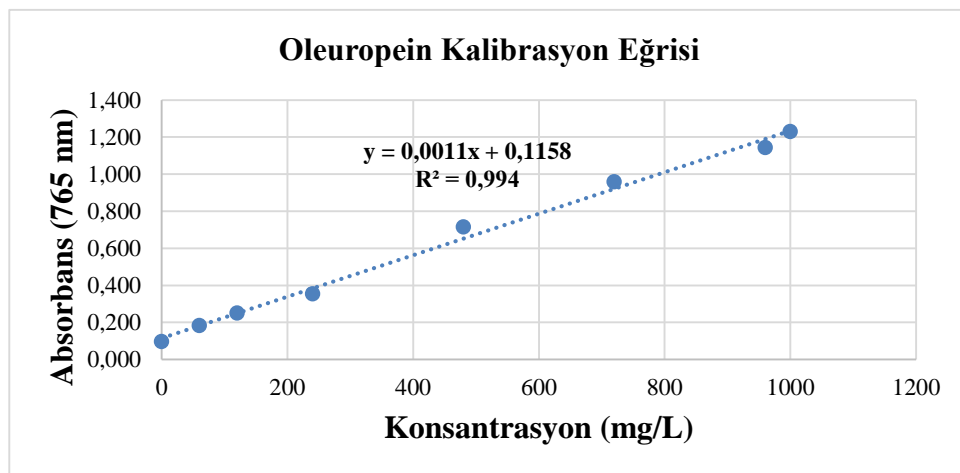
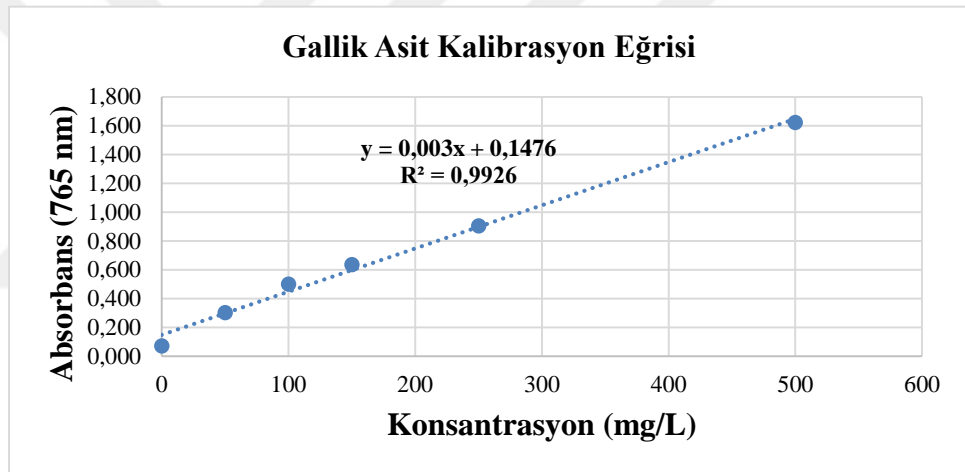
## 7. EKLER

### 7.1. Toplam Fenolik Madde Tayininde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi

**%20' lik sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi:** 20 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  erlene tartılıp bir miktar saf su ile ısıtıcılı manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürüldükten sonra 100 mL'lik balon jöjeye aktarılıp saf su ile çizgisine kadar tamamlanmıştır.

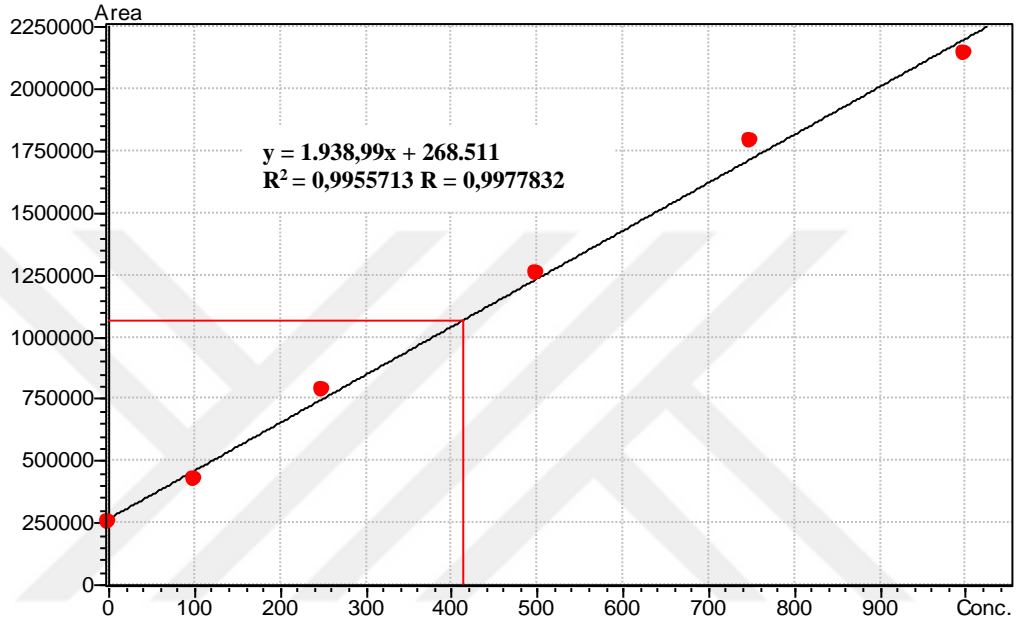
**Stok gallik asit çözeltisi (500 mg/L):** 0.05 g gallik asit tartılıp 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Balon jöje çizgisine %96'lık etil alkol ile tamamlanmıştır.

**Stok ticari oleuropein çözeltisi (1000 mg/L):** 0.025 g ticari oleuropein tartılıp 25 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Balon jöje çizgisine kadar metanol ile tamamlanmıştır.



## 7.2. LC-MS/MS ile Oleuropein Standardının Kalibrasyon Eğrisi

**Oleuropein Standardının Hazırlanması:** Oleuropein standardının metil alkol kullanılarak stok çözeltisi hazırlanmış (1000 ppb) ve çözelti -18 °C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra stok oleuropein çözeltisinin farklı derişimleri (0, 100, 250, 500, 750, 1000 ppb) yardımıyla kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



### 7.3. ABTS Yönteminde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi

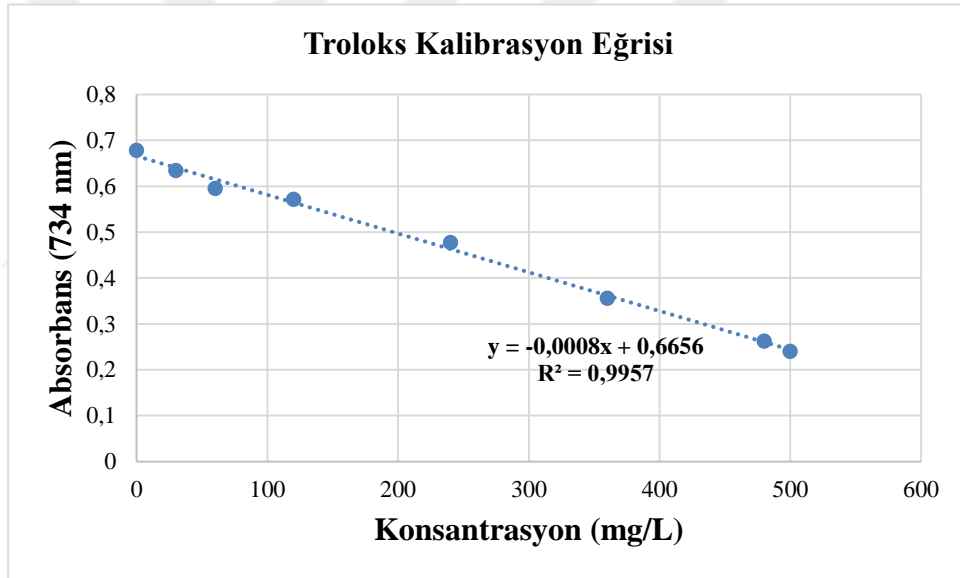
**7 mM ABTS:** 19.2 mg ABTS tartılıp 5 mL saf suda çözündürülmüştür.

**2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>:** 3.3 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> tartılıp 5 mL saf suda çözündürülmüştür.

**Stok ABTS Çözeltisi:** 7mM ABTS ile 2.45 mM K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> çözeltilerin 1:1 oranında karıştırılmış ve karışım oda sıcaklığında 12-16 saat karanlık ortamda bekletilmiştir.

**ABTS Radikali Çalışma Çözeltisi:** 1mL stok çözeltisinin 54 mL etil alkol ile 734 nm'de 0.700 (±0.02) absorbans değeri verecek şekilde seyreltilmesi ile hazırlanmıştır.

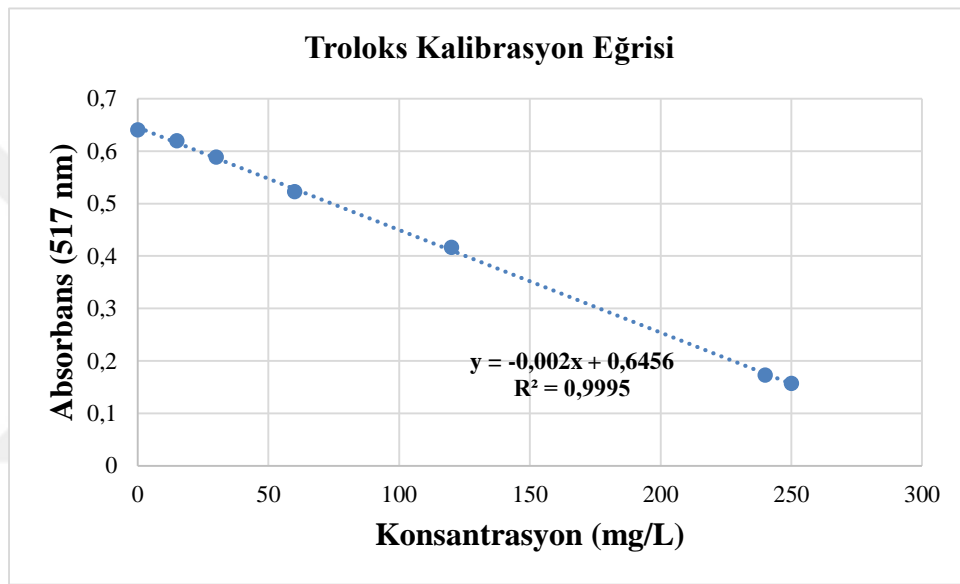
**Stok troloks çözeltisi (500 mg/L):** 0.05 g troloks tartılıp 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Balon jöje çizgisine %96'lık etil alkol ile tamamlanmıştır.



#### 7.4. DPPH Yönteminde Kullanılan Çözeltiler ve Kalibrasyon Eğrisi

**0.06 mM DPPH Çözeltisi:** 5.91 mg DPPH tartılıp 250 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Balon jöje çizgisine %96'lık etil alkol ile tamamlanmış, çözelti 4 °C'de karanlık ortamda 1 saat bekletilmiştir.

**Stok troloks çözeltisi (250 mg/L):** 0.025 g troloks tartılıp 100 mL'lik balon jöjeye aktarılmıştır. Balon jöje çizgisine %96'lık etil alkol ile tamamlanmıştır.



## 7.5. *E. coli* O157:H7'ye Karşı Antimikrobiyal Aktivite

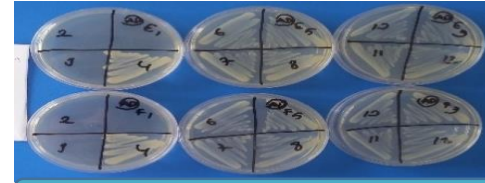
### *E. coli* O157:H7'ye karşı antimikrobiyal aktivite



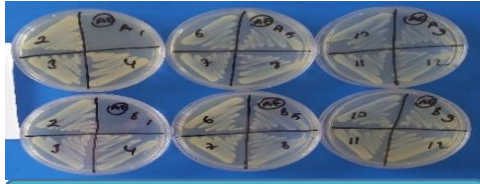
Zeytin Yapağı Ekstraktı (Domat)



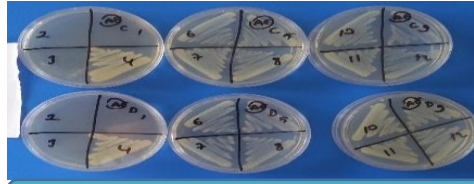
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Zeytin Yapağı Ekstraktı (Edremit)



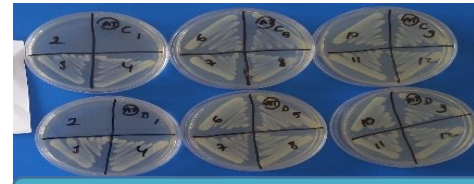
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Zeytin Yapağı Ekstraktı (Trilye)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)



Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)

## 7.6. *L. monocytogenes*'e Karşı Antimikrobiyal Aktivite

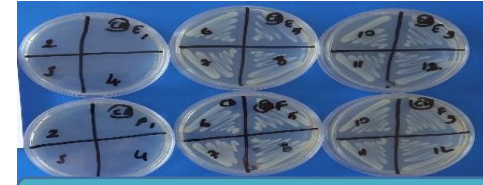
### *L. monocytogenes*'e karşı antimikrobiyal aktivite



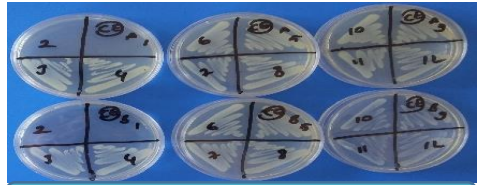
Zeytin Yapağı Ekstraktı (Domat)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Zeytin Yapağı Ekstraktı (Edremit)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Zeytin Yapağı Ekstraktı (Trilye)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)



Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)



## 7.7. *S. aureus*'a Karşı Antimikrobiyal Aktivite

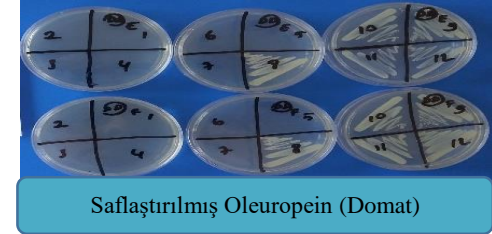
### *S. aureus*'a karşı antimikrobiyal aktivite



Zeytin Yaprığı Ekstraktı (Domat)



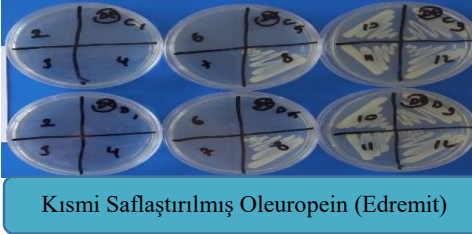
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



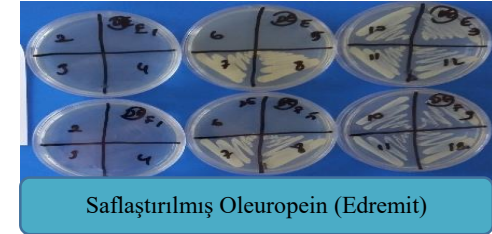
Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



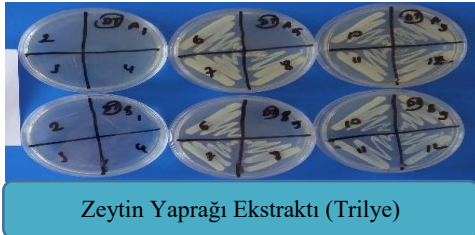
Zeytin Yaprığı Ekstraktı (Edremit)



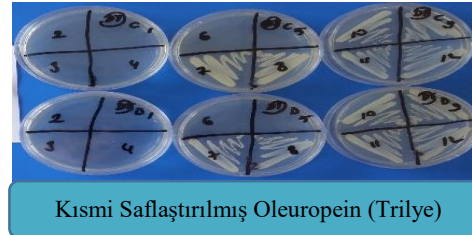
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



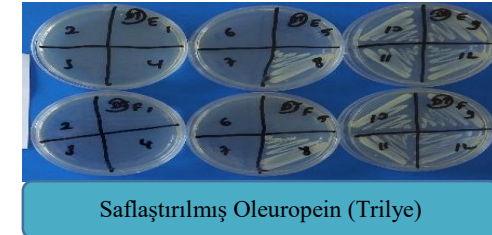
Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Zeytin Yaprığı Ekstraktı (Trilye)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)



Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)

## 7.8. *S. Typhimurium*'a Karşı Antimikrobiyal Aktivite

### *S. Typhimurium*'a karşı antimikrobiyal aktivite



Zeytin Yaprağı Ekstraktı (Domat)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Saflaştırılmış Oleuropein (Domat)



Zeytin Yaprağı Ekstraktı (Edremit)



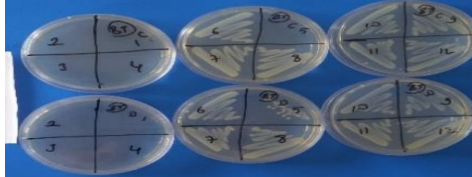
Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Saflaştırılmış Oleuropein (Edremit)



Zeytin Yaprağı Ekstraktı (Trilye)



Kısmi Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)



Saflaştırılmış Oleuropein (Trilye)

## 8. ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler**

Adı Soyadı : Semra TOPUZ  
Doğum Tarihi : 20.01.1991  
Yabancı Dil : İngilizce  
E-posta : [semra.topuz@gop.edu.tr](mailto:semra.topuz@gop.edu.tr)  
Adres : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

### **Öğrenim Durumu**

Lise : Malatya Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2008)  
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2013)

### **İş Denevimi**

Gıda Mühendisi : Dutpınar Gıda Tic. San. Ltd. Şti (2013-2014)  
Araştırma Görevlisi : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2015-2016)  
Araştırma Görevlisi : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü (2016 - Devam Ediyor)

### **Projelerde Aldığı Görevler**

BAP 2016/72 (Araştırmacı) Zeytin Yaprağından Elde Edilen Ham Fenolik Ekstraktından Oleuropeinin Saflaştırılması, Oleuropeinin İnsanlarda Zehirlenme Ve Enfeksiyonlara, Bitkilerde Hastalıklara Neden Olan Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Etkisinin Araştırılması (2016-Devam Ediyor)

BAP 2017/98 (Araştırmacı) Farklı Zeytin Çeşidi Yapraklarından Oleuropeinin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması, Antioksidan Ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Belirlenmesi (2017-Devam Ediyor)

BAP 2017-108 (Araştırmacı) Olgunlaştırma Aşamasında Meşe Yongası Uygulamasının Üzüm Sirkesinin Aroma Bileşiklerine Etkisi (Tamamlandı)

BAP 2017-109  
(Araştırmacı)

Olgunlaştırma Aşamasında Meşe Yongası  
Uygulamasının Üzüm Sirkesinin Fenolik Bileşiklerine  
Etkisi (Tamamlandı)

## **Yayınlar**

### **Makaleler**

Kaya, C., Güldane, M., **Topuz, S.** ve Bayram, M., 2018. Nar suyu ilavesiyle üretilen lokumların bazı özelliklerinin belirlenmesi. Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknolojisi Dergisi, 6(12), 1814-1819.

Güldane, M., Bayram, M., **Topuz, S.**, Kaya, C., Gök, H.B., Bülbül, M. ve Koç, M., 2017. Beyaz, siyah ve yeşil çay kullanılarak üretilen kombuchaların bazı özelliklerinin belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 34(1), 46-56.

Bayram, M., Kayalar, M., Kaya, C. ve **Topuz, S.**, 2016. şarapta fenolik ve aroma bileşikleri üzerine teruar ın etkisi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi 13, 35-46.

### **Bildiriler**

Kaya, C., **Topuz, S.** ve Bayram, M., 2018. Some properties of nectar produced from white and black mulberry. 2nd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 288-291. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Kaya, C., **Topuz, S.** ve Bayram, M., 2018. Pomegranate jam production possibilities and determination of product properties. 2nd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 315-319 (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Bayram, M., **Topuz, S.**, Karabıyıklı, ř. ve Kaya, C., 2018. Antimicrobial effect of olive leaf crude extract and oleuropein on *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus aureus*. 2nd International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 199-202. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Bayram, M., **Topuz, S.** ve Kaya, C., 2018. Effects of oak chips addition on the individual phenolic compounds of grape vinegar in maturation process. International Conference on Innovative Engineering Applications, 885-890. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Kaya, C., Esin-Yücel, E., Bayram, M. ve **Topuz, S.**, 2018. Investigation of sugar beet based cezer production opportunities. International Conference on Innovative Engineering Applications, 1053-1060. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

**Topuz, S.** ve Bayram, M., 2018. Antimicrobial effect of olive leaf products of extracted from different variety of olive leaves on *Escherichia coli* O157:H7 and

*Salmonella Typhimurium*. International Conference on Innovative Engineering Applications, 880-884. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Kaya, C., **Topuz, S.** ve Bayram, M., 2018. Some properties of marmelate produced from white and black mulberry. International Conference on Innovative Engineering Applications, 976-982. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum)

Esin-Yücel, E., Kaya, C., Bayram, M. ve **Topuz, S.**, 2018. Some characteristics of black tea extracts obtained by ultrasonic infusion method. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 217-217. (Özet Bildiri/Poster)

Bayram, M., **Topuz, S.**, Kaya, C., Esin-Yücel, E., Alican, D., Yapal, E. ve Yavuz, N., 2018. Alternative method development to reduce application of sulphure dioxide in winemaking. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 215-215. (Özet Bildiri/Poster)

**Topuz, S.**, Bayram, M., Kaya, C. ve Esin-Yücel, E., 2018. The role of nutraceuticals on health. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 220-220. (Özet Bildiri/Poster)

Esin-Yücel, E., Kaya, C., Bayram, M. ve **Topuz, S.**, 2018. Some characteristics of black tea extracts obtained by classical infusion method. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 216-216. (Özet Bildiri/Poster)

Bayram, M., Zorlu, T., **Topuz, S.**, Kaya, C. ve Esin-Yücel, E., 2018. Techniques to remove pesticide residues from foods. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 214-214. (Özet Bildiri/Poster)

**Topuz, S.**, Bayram, M., Elmastaş, M., Kaya, C. ve Esin-Yücel, E., 2018. Effect of solvent type to extraction of oleuropein from olive leaf. International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 218-218. (Özet Bildiri/Poster)

Akşit, Z., Kaya, C., **Topuz, S.**, Bayram, M. ve Akşit, H., 2018. Some characteristics of instant tea produced from mint (*Mentha Piperita* L.). International Conference on Raw Materials to Processed Foods, 224-224. (Özet Bildiri/Poster)

**Topuz, S.**, Bayram, M., Kaya, C. ve Güldane, M., 2017. Phenolic compounds in olive leaf. 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 5-5. (Özet Bildiri/Poster)

Kaya, C., Akşit, Z., **Topuz, S.**, Bayram, M. ve Akşit, H., 2017. Determination of characteristics of instant tea produced from thyme (*Thymus vulgaris*). 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 11-11. (Özet Bildiri/Poster)

Bayram, M., **Topuz, S.**, Kaya, C. ve Güldane, M., 2017. Why should we drink kombucha. 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 4-4. (Özet Bildiri/Poster)

Esin-Yücel, E., Kaya, C., Bayram, M., **Topuz, S.** ve Ateş, E., 2017. A healty drink:

Black tea. 1st International Symposium on Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies, 12-12. (Özet Bildiri/Poster)

**Topuz, S.**, Bayram, M. ve Kaya, C., 2017. Effect of ultrasound application on wine ageing. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 1162-1162. (Özet Bildiri/Poster)

Kaya, C., **Topuz, S.**, Güldane, M., Bayram, M., Esin-Yücel, E., Erarslanoğlu, S., Giden, G., Işık, S., Durmuşoğlu, R., Çoban, Ş. ve Coşkun, A. L., 2017. Determination of some properties of jams produced with sweet and sour pomegranate. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 1170-1170. (Özet Bildiri/Poster)

**Topuz, S.**, Bayram, M., Kaya, C., Kılıçarslan, F., Demir, F. ve Tuncan, F., 2017. Determination of some properties of wines produced using traditional and ultrasound maceration. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 1161-1161. (Özet Bildiri/Poster)

Kaya, C., Güldane, M., **Topuz, S.**, Esin-Yücel, E., Bayram, M., Çoban, Ş., Durmuşoğlu, R., Erarslanoğlu, S., Işık, S., Giden, G. ve Coşkun, A. L., 2017. Some properties of Turkish delight produced with sour and sweet pomegranate juice. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 243-243. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

Bayram, M., Çetin, S., Kaya, C. ve **Topuz, S.**, 2017. Determination of caffeine amount and colour values of liqueurs produced using different tea concentrations and extraction times. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 949-949. (Özet Bildiri/Poster)

Bayram, M., Çetin, S., Kaya, C. ve **Topuz, S.**, 2017. Some individual phenolic compounds of tea liqueurs produced using different tea concentrations and extraction times. 1st International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies, 1246-1246. (Özet Bildiri/Poster)

Güldane, M., Bayram, M., **Topuz, S.**, Kaya, C., Gök, H.B., Bülbül, M. ve Koç, M., 2016. Determination of some individual phenolic compounds of kombuchas. 1st International Mediterranean Science and Engineering (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

**Topuz, S.**, Bayram, M., Güldane, M., Kaya, C., Armağan, M.B., Şenli, T., Söylemez, A. ve Öztürk, M., 2016. Determination of some properties of boza produced using rice. 1st International Mediterranean Science and Engineering (Özet Bildiri/Poster)

Bayram, M., **Topuz, S.**, Güldane, M., Kaya, C., Şenli, Tuğba, Söylemez, A., Öztürk, M. ve Armağan, M.B., 2016. Determination of some properties of boza produced using bulgur rice wheat. 1st International Mediterranean Science and Engineering (Özet Bildiri /Poster)