



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEYVE TUTUMUNDAN HASADA KADAR GEÇEN SÜREDE GEMLİK
ÇEŞİDİ ZEYTİN YAPRAKLARININ ANTIOKSİDAN AKTİVİTE VE
FENOLİK BİLEŞİKLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ**

Esra DOĞANGÜN

Prof. Dr. Vildan UYLAŞER
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

BURSA-2018

TEZ ONAYI

Esra DOĞANGÜN tarafından hazırlanan “Meyve Tutumundan Hasada Kadar Geçen Sürede Gemlik Çeşidi Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivite ve Fenolik Bileşiklerindeki Değişimin Belirlenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Vildan UYLAŞER

Başkan : Prof. Dr. Vildan UYLAŞER



İmza

Üye : Doç. Dr. Canan Ece TAMER



İmza

Üye : Doç. Dr. Nurcan DEĞİRMENCİOĞLU



İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım



Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

Tarih

29./5./2018

U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

25/05/2018



Esra DOĞANGÜN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEYVE TUTUMUNDAN HASADA KADAR GEÇEN SÜREDE GEMLİK ÇEŞİDİ ZEYTİN YAPRAKLARININ ANTIOKSİDAN AKTİVİTE VE FENOLİK BİLEŞİKLERİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ

Esra DOĞANGÜN

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Vildan UYLAŞER

Zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprakları bünyesinde bulunan fenolik bileşikler nedeniyle antihipertansif, anti-aterojenik, hipokolesterolemik, hipoglisemik, antimikrobiyal, antiviral, antitümöral, anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahiptir. Bu çalışmada, meyve tutumundan hasat dönemine kadar Mudanya ve Gemlik yörelerinden temin edilen Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının kimyasal (kuru madde miktarı, renk) ve fonksiyonel özellikleri (antioksidan aktivite, toplam fenolik madde, fenolik bileşikler) üzerine yöre ve hasat zamanının etkileri belirlenmiştir. Zeytin yapraklarında fenolik maddelerin kantitatif ve kalitatif olarak tayini LC/MS/MS ile yapılmıştır. Zeytin yaprağı örneklerinin DPPH serbest radikali süpürücü aktivite değerlerinin % 91,45-93,86 arasında, toplam fenolik madde miktarlarının ise 154,11 - 373,36 mg GAE/100g arasında değiştiği saptanmıştır. HPLC ile yapılan analizler sonucunda tüm örneklerde en fazla miktarda (94,21-860,21 mg/kg) bulunan fenolik bileşiğin oleuropein olduğu görülmüştür. Zeytin yapraklarının fenolik madde miktarlarının yöre ve hasat zamanına göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$).

Anahtar Kelimeler: Zeytin yaprağı, fenolik bileşikler, HPLC, antioksidan aktivite

2017, ix + 65 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF CHANGES IN ANTIOXIDANT ACTIVITY AND PHENOLIC COMPOUNDS OF GEMLIK OLIVE LEAF FROM SETTING FRUIT TO HARVEST

Esra DOGANGUN

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Food Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Vildan UYLASER

The olive tree (*Olea europaea*) leaves have antihypertensive, anti-atherogenic, hypocholesterolemic, hypoglycemic, antimicrobial, antiviral, antitumoral, anti-inflammatory and antioxidant properties due to the phenolic compounds present in the leaves. In this study, the effects of locality and harvesting time on the chemical (dry matter amount, color) and functional properties (antioxidant activity, total phenolic substance, phenolic components) of Gemlik variety olive leaves obtained from Mudanya and Gemlik regions from setting fruit to harvesting period were determined. Quantitative and qualitative determination of phenolic materials in olive leaves was carried out by LC/MS/MS. It was determined that the DPPH free radical scavenging activity values of the olive leaf samples varied between 91.45% and 93.86% and the total phenolic substance contents varied between 154.11 - 373.36 mg GAE/100g. As a result of HPLC analysis, it was seen that oleuropein was the phenolic compound found in the maximum amount (94.21-860.21 mg/kg) in all samples. The amounts of phenolic substances of olive leaves were found to vary according to locality and harvesting time ($p < 0,05$).

Key words: Olive leaf, phenolic compounds, HPLC, antioxidant activity

2017, ix + 65 pages.

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım danışman hocam Prof. Dr. Vildan UYLAŞER'e,

Analizler için her türlü imkanın sağlanmasında yardımcı olan kurumsal danışmanım Anıl ÇETİNOĞLU'na ve manevi desteğiyle yol gösteren Dr. Murat KAYAR'a,

Materyallerin temin edilmesi sürecinde hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan sevgili babam Prof. Dr. Adem DOĞANGÖN'e ve hayatımın her sürecinde yanımda olan aileme,

Bu çalışmayı yapma imkanı sağlayan kurumum TÜBİTAK BUTAL'e sonsuz teşekkür ediyorum.

Esra DOĞANGÖN

25/05/2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1.Zeytin Yaprağı.....	5
2.2.Zeytin Yaprağının Sağlık Üzerine Etkileri.....	7
2.3. Zeytin Yaprağında Bulunan Fenolik Bileşikler.....	11
2.4. Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivitesi.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
3.1. Materyal.....	28
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Zeytin Yaprağı Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu.....	31
3.2.2. Toplam Nem Miktarı Tayini.....	31
3.2.3. Renk Analizi.....	31
3.2.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini.....	31
3.2.5. Fenolik Bileşiklerin Tayini.....	33
3.2.6. Antioksidan Aktivite Tayini.....	36
3.2.7. İstatistiksel Analiz.....	37
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Toplam Nem Miktarlarına Ait Analiz Sonuçları ve Tartışma.....	38
4.2. Renk Analizi Sonuçları ve Tartışma.....	40
4.3 Toplam Fenolik Madde Miktarlarına Ait Analiz Sonuçları ve Tartışma.....	42
4.4. Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar ve Tartışma.....	45
4.5. Antioksidan Aktivite Sonuçları ve Tartışma.....	55
5. SONUÇ.....	58
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde Değer
β	Beta
g	Gram
kGY	Kilogrey
L	Litre
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
AB	Avrupa Birliği
ABTS	2,2 –azinobis (3-etilbenzotiazolin-sulfonik asit)
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anilin
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
CIE	Commission Internationale de l'Eclairage (Uluslararası Aydınlatma Komisyonu)
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite)
DAD	Diode Array Dedector (Diyot Dizi Dedektör)
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀	Başlangıç DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gereken antioksidan miktarı
ESI	Electrosprey Ionization (Elektrosprey İyonizasyon)
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç)
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü)
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products (Bitkisel Tıbbi Ürünler Komitesi)

Kısaltmalar	Açıklama
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IOC	International Olive Council (Uluslararası Zeytin Konseyi)
LC-MS	Liquid chromatography–Mass Spectrometry (Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektrometresi)
LOD	Limit of Dedection (Tespit Limiti)
LOQ	Limit of Quantification (Tayin Limiti)
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)
MS	Mass Spectrometry (Kütle spektroskopisi)
Sd	Standart sapma
SEM	Scanning Electron Microscopy (Taramalı Elektron Mikroskobu)
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Activity (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Aktivite)
TBHQ	Ter-Bütıl Hidro Kinon
TOF-MS	Time of Flight- Mass Spectrometry (Uçuş Zamanlı Kütle Spektroskopisi)
UV	Ultraviolet (Ultraviyole)

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Oleuropeinin yapısı.....	12
Şekil 2.2. Zeytin yaprağında bulunan başlıca fenolikler.....	14
Şekil 2.3. Antioksidan (DPPH) analizi prensibi.....	16
Şekil 3.1. Mudanya yöresi bahçesine ait seçilen zeytin ağaçları.....	28
Şekil 3.2. Gemlik yöresi bahçesine ait seçilen zeytin ağaçları.....	29
Şekil 3.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi.....	32
Şekil 3.4. Oleuropein standardına ait kalibrasyon eğrisi ($\lambda=240$ nm).....	34
Şekil 4.1. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yapraklarının nem miktarları (%).....	39
Şekil 4.2. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/100 g).....	43
Şekil 4.3. Fenolik madde standart karışımına ait kromatogram (HPLC-DAD).....	46
Şekil 4.4. Fenolik madde standart karışımına ait kromatogram (MS/MS sistemi)..	47
Şekil 4.5. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının hidrositirazol miktarları (mg/kg).....	49
Şekil 4.6. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının tirozol miktarları (mg/kg).....	50
Şekil 4.7. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının kafeik asit miktarları (mg/kg).....	51
Şekil 4.8. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının p-kumarik asit miktarları (mg/kg).....	52
Şekil 4.9. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının oleuropein miktarları (mg/kg).....	53
Şekil 4.10. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçları (%).....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. Dünyada önemli zeytin çeşitleri ve özellikleri.....	2
Çizelge 2.1. Zeytin yaprağı ekstraktındaki fenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri	15
Çizelge 3.1. Fenolik bileşiklerin MS/MS sisteminde iyonları ve parçalanma ürünleri.....	34
Çizelge 3.2. HPLC sistemi için akış profili	35
Çizelge 3.3. Fenolik bileşiklerin tayininde HPLC sistemi için analiz koşulları...	35
Çizelge 3.4. Fenolik bileşiklerin tayininde MS sistemi için analiz koşulları.....	36
Çizelge 4.1. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin toplam nem miktarları (%)	38
Çizelge 4.2. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin L*, a*, b* değerleri.....	41
Çizelge 4.3. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örnekleri ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/100 g).....	42
Çizelge 4.4. HPLC yönteminin analitik parametreleri.....	45
Çizelge 4.5. MS/MS yönteminin analitik parametreleri.....	46
Çizelge 4.6. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerine ait ekstraktların fenolik bileşikleri (mg/kg)	48
Çizelge 4.7. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örnekleri ekstraktlarının DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçları (%).....	55

1. GİRİŞ

Tropik ve ılıman bölgelere özgü bir ağaç olan zeytin ağacı (*Olea europaea* L.) bolluk, ihtişam ve barışın geleneksel bir sembolüdür. *Oleaceae* familyasına ait olan zeytin ağacının yapraklı dalları tarih boyunca olimpiyatlarda ve savaşlarda kahramanlık gösterenleri taçlandırmak için kullanılmıştır (El ve Karakaya 2009, Ghanbari ve ark. 2012).

Tüm dünyada 8 milyondan daha fazla hektar alan üzerinde bulunan zeytin ağaçlarının yaklaşık % 98'i Akdeniz havzasında yer almaktadır (Peralbo-Molina ve Castro 2013, Talhaoui ve ark. 2015). Dünya genelindeki zeytin yetiştiriciliğinin % 90'ı Türkiye'nin de içinde yer aldığı Akdeniz havzası, geriye kalan %10'u ise Latin Amerika ülkelerinde yapılmaktadır (Anonim 2017a). TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) 2016 yılı verilerine göre Türkiye'de 845 542 hektar alanda bulunan zeytin ağaçlarının % 84,8' i meyve vermektedir. Elde edilen zeytinin % 24,9'luk kısmı yemeklik olarak diğer kısmı ise yağlık olarak değerlendirilmektedir (Anonim 2017b). IOC (Uluslararası Zeytin Konseyi) verilerine göre 2015-2016 sezonunda Dünya'daki sofralık zeytin üretimi içerisinde Türkiye 397 tonluk üretimle AB (Avrupa Birliği) ülkeleri ve Mısır'dan sonra 3.sırada bulunmaktadır. AB ülkeleri arasında ise ilk sırayı İspanya almakta ve 2015/16 sezonunda İspanya'nın AB üretimdeki payının % 70 seviyesinde olduğu tahmin edilmektedir (Anonim 2017c). Toplam 2500 civarında olduğu bilinen zeytin çeşitlerinin 250 tanesi, IOC tarafından ticari çeşit olarak sınıflandırılmıştır. İçerisinde Gemlik çeşidinin de yer aldığı dünyada öneme sahip bazı zeytin çeşitlerinin özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Ghanbari ve ark. 2012).

Ülkemizde resmi olarak tescil edilmiş 88 adet yerli çeşit zeytin olmakla birlikte bunların ticari öneme sahip olanlarının sayısı 3-5 arasında değişmektedir (Aktan ve Kalkan 1999, Dıraman 2007). Gemlik çeşidi ülkemizde ekonomik öneme sahip olan zeytin çeşitlerinin başında gelmekte olup, başta sofralık zeytin üretimi olmak üzere zeytinyağı üretiminde de kullanılmaktadır. Gemlik çeşidi zeytinler ince kabuklu, küçük çekirdekli, et miktarı fazla ve aromatik olması gibi yüksek kalite özelliklerine sahiptir. Ayrıca adaptasyon yeteneğinin yüksek olması, şiddetli alternans göstermemesi, erken verime

yatması, çelikten kolayca çoğaltılabiliyor olması gibi nedenlerle Gemlik çeşidi zeytinler, Türkiye’de kendi orijin bölgesi (Bursa) dışında Ege Bölgesi, Doğu – Batı Akdeniz Bölgesi ve hatta Güneydoğu Anadolu bölgesinde de yetiştirilmektedir (Dıraman ve ark. 2011).

Çizelge 1. Dünyada önemli bazı zeytin çeşitleri ve özellikleri

Çeşit	%Yağ verimi	Et/Çekirdek oranı	İrilik (dane sayısı/kg)	Kullanım amacı	Orijin
Hojiblanca	23-29	4.9 ve 6.6:1	230-700	Yağ üretimi ve sofralık zeytin	İspanya
Verdial	22-30	6:1	220-800	Yağ üretimi ve sofralık zeytin	İspanya
Picual	23-27	3.8 ve 6.1:1	270-440	Yağ üretimi ve sofralık zeytin	İspanya
Domat	22	-	180-190	Sofralık yeşil zeytin	Türkiye
Gemlik	27	6:1	270-280	Siyah sofralık zeytin	Türkiye
Memecik	22	6:1	205-215	Yağ üretimi	Türkiye
Memeli	25	7:1	200-210	Sofralık yeşil zeytin	Türkiye
Conservolea	22-25	8:1	180-200	Sofralık zeytin	Yunanistan
Nycchati Kalamon	25	8:1	220-240	Siyah sofralık zeytin	Yunanistan
Chalkidiki	19	-	120-140	Yağ üretimi, sofralık yeşil zeytin	Yunanistan
Sevillano	14	7.3:1	70-80	Sofralık zeytin	İspanya
Accolano	19	8.2:1	110-120	Sofralık zeytin	İtalya
Accolana	17	-	100-180	Sofralık zeytin	İtalya
Barouni	17	6.8:1	130-140	Yeşil-siyah Ripe olive	Tunus
Picholine Marocaine	17	5:1	300-500	Sofralık zeytin	Fas
Arauco	22-24	7:1	125-300	Yağ üretimi ve sofralık zeytin	Arjantin
Galega vulga	-	4:1	430	Siyah sofralık zeytin	Portekiz
Oblitza	22	6.5:1	200	Sofralık zeytin	Yugoslavya
Ladoelia	18-21	4.6:1	330	Sofralık zeytin	Kıbrıs

Zeytin, meyvesi kadar karasu, pirina ve yapraklar başta olmak üzere diğer bir çok yan ürünleri ile de ekonomik ve besinsel değere sahip olan bir üründür. Bu yan ürünler arasında özellikle zeytin hasadı sırasında elde edilen zeytin ağacı (*Olea eurapea* L.) yaprakları, önemli bir yer tutmaktadır. Zeytin ağacının budanması, zeytinin toplanması, yağa işlenecek ya da sofralık olarak değerlendirilecek zeytinlerin temizlenmesi sırasında oldukça fazla miktarda, genellikle de toplam zeytin ağırlığının % 10' u kadar yaprak ortaya çıkmaktadır (Herrero ve ark. 2011, Sevim ve Tuncay 2012).

Zeytin yaprakları biyoaktif bileşenler açısından oldukça zengindir. Zeytin yapraklarının fenolik madde içeriği çeşitli abiyotik (nem eksikliği, tuzluluk, gübreleme, coğrafi bölge, örnekleme zamanı, güneşe maruz kalma, don stresi) ve biyotik (mantar, bakteri, genotip, yaprak yaşı, alternans türü) stres faktörlerine bağlı olarak değişmektedir (Talhaoui ve ark. 2015).

Periyodisite/alternans/var-yok yılı; zeytin ağaçlarının yıldan yıla düzenli ürün vermemesi nedeniyle hasat veriminin yıllara göre değişikliğinin ifadesi olarak tanımlanmaktadır (Anonim 2015). Mert ve ark. (2013) Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının klorojenik, p-kumarik, kafeik asit, 3-hidroksinnamik asit ve skopolin miktarının periyodisiteden önemli derecede etkilendiğini, oleuropein miktarı üzerine etkisinin ise önemli olmadığını bildirmektedir.

Zeytin yapraklarının fenolik bileşiminin doğru bir şekilde ortaya konmasındaki en önemli aşama, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu aşamasıdır. Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için kullanılan yöntemlere göre değişiklik gösteren çözücü türü ve miktarı, sıcaklık, pH, örnek parçacık boyutu gibi faktörlerin ekstraksiyon verimi üzerine etkili olduğu belirtilmektedir (Abaza ve ark. 2011). Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu öncesi zeytin yapraklarına sıcak hava akımında (farklı sıcaklıklarda) kurutma, dondurarak kurutma (Ahmad-Qasem ve ark. 2016), infrared kurutma (Boudhrioua ve ark. 2009) gibi ön işlemler uygulanabilmektedir. Ekstraksiyon aşamasında ise süper kritik akışkan ekstraksiyonu (Le Flosch ve ark. 1998), basınçlı sıvı ekstraksiyonu (Quirantes-Pine ve ark. 2013), mikrodalga destekli ekstraksiyon (Rafiee ve ark. 2011, Taamalli ve ark. 2012), ultrason destekli ekstraksiyon (Ahmad-Qasem ve ark. 2013)

gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının fenolik bileşenlerinin belirlenmesinde yaygın olarak HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile UV dedeksiyon sistemi kullanılmakta olup genellikle 280 nm dalga boyu tercih edilmektedir. Yapısal olarak ilgili fenolik bileşiklerin tam karakterizasyonu için negatif moddaki elektrosprey iyonlaşması yolu ile MS (Kütle Spektroskopisi) dedeksiyon sistemi de kullanılabilir. Bunun yanı sıra yüksek çözünürlüklü MS analizlerinin, MS/MS ve MS_n sistemleri ile parçalanma ürünlerinden yararlanarak doğru kütle ölçümleri ve yapısal bilgi edinme imkanı sağladığı belirtilmektedir (Abaza ve ark. 2015)

Son dönemlerde gerek beslenme gerekse bitkisel tedavi yöntemlerine olan ilginin artması, özellikle fenolik bileşiklerce zengin olan zeytin yaprağı ve ürünlerine olan ilginin, dolayısı ile bu konuda yapılan çalışmaların da artmasına neden olmuştur. Bu çalışmada Marmara Bölgesi, Bursa ili ilçelerinde yetiştirilen ve üretimi bakımından önemli bir potansiyeli olan Gemlik çeşidine ait zeytin yapraklarının, meyve tutumundan hasat dönemi sonuna kadar (Nisan-Aralık) fenolik bileşiklerindeki ve antioksidan aktivitelerindeki değişimin belirlenmesi, bu özellikler üzerine yöre ve zaman faktörlerinin etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Zeytin Yaprağı

Günümüzde zeytin yapraklarının bitki çayı ve gıda takviyesi olarak kullanılan ticari ürünleri tüm dünyada bulunmaktadır ve bu ürünler tamamen kurutulmuş yaprak, toz, ekstrakt, tablet şeklinde olabilmektedir (Tsimidou ve Papoti 2010, Talhaoui ve ark. 2015).

Zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerden en üst düzeyde yararlanabilmek ancak etkin bir ekstraksiyon ve çözünürlük özelliklerinin korunması ile sağlanabilir. Mourtzinou ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada oleuropein bakımından zengin zeytin yaprağı ekstraktlarının beta-siklodekstrin yardımıyla enkapsülasyonunun, yaprak ekstraktında bulunan polifenollerin sulu ortamda çözünürlüğünü arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca oksidatif koşullar altında yapılan Diferansiyel Taramalı Kalorimetre çalışmalarında, zeytin yaprağı ekstraktının beta-siklodekstrin ile enkapsülasyonunun zeytin yaprağını oksitlenmeye karşı koruduğu saptanmıştır.

Zeytin yaprakları yapısında bulunan fonksiyonel biyoaktif bileşikler sayesinde antioksidan özellik göstermektedir. Bu özellik sayesinde zeytin yaprağı ekstraktlarının gıdaların kalitesini ve raf ömrünü uzatmak için de kullanılabileceği bildirilmiştir (Erbay ve İcier 2010, Abaza ve ark. 2015).

Salta ve ark. (2007) polifenollerce zenginleştirmek amacıyla zeytinyağı, ayçiçek yağı, palm yağı ve bitkisel katı yağlara zeytin yaprağı ekstraktı ilave etmişlerdir. Araştırmacılar zeytinyağı ekstraktlarının ilave edildikleri yağların radikal süpürme aktivitesi ve oksidatif stabilitesinin artırılmasına katkıda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarının, polifenol miktarını etkileyen hasat zamanı, ekstraksiyon yöntemi vb. faktörlere bakılmaksızın, bitkisel yağlar gibi yaygın tüketimi olan ürünlerin besinsel özelliklerinin iyileştirilmesi amacıyla, özellikle Akdeniz ülkelerinde kullanılabileceği dile getirilmiştir.

Rafine edilmiş zeytin ve kabuk yağlarının, oleuropein ve hidroksitirazol'ce zengin zeytin yaprağı ile zenginleştirildiği bir çalışmada; zeytin yaprağının içerdiği fenolik antioksidanların etkisi ile söz konusu yağların, oksidatif bozulmaya karşı belirgin bir direnç gösterdiği ve stabilitelerinin artarak depolama süresince bozulmalarının önlediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, zeytin yaprağı ekstraktlarının mükemmel antioksidanlar olduğunu ve sentetik antioksidanlar için bir alternatif oluşturabileceğini dile getirmişlerdir (Bouaziz ve ark. 2008).

Malheiro ve ark. (2013) geç hasat edilen Cobrançosa çeşidi zeytinlerden yağ ekstraksiyonu sırasında ortama zeytin yapraklarının eklenmesinin zeytinyağlarının kalitesi ve bileşimi üzerine etkisini doğrulamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada, ağırlıkça farklı miktarlarda (% 1, % 2,5, % 5 ve % 10; w/w) zeytin yaprağı kullanmışlardır. Çalışmada zeytin yaprağı eklenmesi ile zeytin yağlarının asitlik ve peroksit değerlerinde hafif artış görülürken, oksidasyona karşı direncin önemli ölçüde geliştiği tespit edilmiştir. Ayrıca % 10 oranında yaprak ilavesinin, yapraklardaki α - tokoferol nedeniyle yağlardaki E vitamini miktarını yaklaşık % 30 arttırdığı belirlenmiştir. Araştırmacılar bunlara ilaveten yağ ekstraksiyonu sırasında yaprak ekleme işleminin zeytinyağlarının özelliklerini ve kompozisyonunu, her bir grubun ayrılıp sınıflandırılmasını mümkün kılacak şekilde değiştirdiğini dile getirmişlerdir.

Zeytin yaprağı ekstraktı kullanılarak fonksiyonel gıda üretiminin amaçlandığı bir çalışmada, organik durum buğdayı unu ve zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilerek hazırlanan krakerler ile zeytin yaprağı ekstraktı yerine su kullanılarak aynı formülasyonla hazırlanan krakerler (kontrol grubu) karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda zeytin yaprağı ekstraktı ilave edilerek zenginleştirilen krakerlerin, daha yüksek fenolik içeriğe sahip olduğu ve antioksidan aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar zeytin yaprağı ekstraktlarının hem fonksiyonel bileşenleri içermesi hemde ürünlerin raf ömrünü uzatması nedeniyle kraker üretiminde alternatif olarak kullanılabileceğini dile getirmişlerdir (Palmeri ve ark. 2016).

Zoidou ve ark. (2017) yaptıkları bir çalışmada yeni fonksiyonel ürünler geliştirmek amacıyla hem oleuropeinin saf formunu, hem de kurutulmuş zeytin yaprağını ilave

ettikleri (infüzyon) sütler ile yoğurt üretmişlerdir. Çalışmada oleuropeinin; ısıl işlem ve fermantasyon sırasında kararlı halde bulunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra elde edilen yoğurtların, laktik asit bakterileri, pH ve asitlik bakımından kontrol yoğurduna benzer özellikler gösterdiği; viskozite ve su tutma kapasitesi yönünden ise daha iyi özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca yeni ürünün, geleneksel olanlara benzer kabul edilebilir bir tat, renk ve doku sergilediği belirtilmiştir. Çalışma sonucunda yeni fonksiyonel süt ürünleri üretiminde zeytin yaprağı ekstraktı veya saf oleuropeinin süt ve yoğurt karışımlarına aktif bileşenler olarak ilave edilebileceği ifade edilmiştir.

Kritsakis ve ark. (2017) malaksiyon aşamasında zeytin yaprağı sulu ekstraktının ilave edilmesiyle elde edilen zeytinyağını, ekstrakt ilave edilmeden üretilen zeytinyağı ile karşılaştırmıştır. Araştırmacılar ekstrakt ilave edilerek elde edilen yağlarda toplam fenol miktarı ve antioksidan aktivitenin arttığını tespit etmiştir. Ayrıca karatoneoid ve klorofillerin artması nedeniyle istenilen özelliklerde, daha koyu yeşil renkte bir yağ elde edildiğini saptamıştır. Sonuç olarak çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının, yağların raf ömrünü uzatmak ve fonksiyonel özelliklerini artırmak için doğal bir katkı maddesi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir.

Erarslan (2017) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada salalarda kimyasal koruyucu kullanımına alternatif olarak ticari zeytin yaprağı ekstraktı kullanımının, salçaların mikrobiyolojik özelliklerine etkisi araştırılmıştır. Salça rnekleindeki toplam mezofilik aerobik bakteri, maya ve küf sayılarının zeytin yaprağı ekstraktı ilavesi ile belirgin şekilde azaldığı saptanmıştır. Araştırmacı salalara farklı oranlarda zeytin yaprağı ekstraktı ilavesinin mikrobiyolojik kaliteyi iyileştirdiğini ve raf ömrü üzerine de olumlu etki sağladığını belirtmiştir.

2.2. Zeytin Yaprաının Sağlık zerine Etkileri

Temel biyoaktif bileşeni olan oleuropeinin sağlık üzerine olumlu etkilerinden dolayı zeytin yaprağı, Avrupa İlaç Ajansı (EMA)'nın Tıbbi Bitkisel rnler Komitesi (HMPC) tarafından bitkisel ilaç olarak tanımlanmıştır (Anonim 2011).

Zeytin yaprağı Akdeniz ülkelerinde geleneksel tedavilerde yaygın olarak kullanılan bitki çaylarından biridir (Özcan ve Matthaus 2017). Bu ülkelerde bazı hastalıkların daha az görülüyor olmasında zeytinyağının yanı sıra zeytin yaprağının da etkili olabileceği düşüncesi, araştırmacıların ilgisini bu yöne çekmiştir (Armutcu ve ark. 2011). Zeytin yaprağındaki biyoaktif bileşenlerin sağlık üzerine olan olumlu etkileri konusunda yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Lee-Huang ve ark. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, standardize edilmiş zeytin yaprağı ekstraktı preparatlarının HIV 1 enfeksiyonuna ve replikasyonuna karşı antiviral aktivitesi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ekstraktların HIV 1 akut enfeksiyonunu inhibe ettiği ve enfekte olmamış hücreler için toksik etki göstermediği saptanmıştır.

Korukluoğlu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada farklı çözücüler kullanılarak elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata* üzerine antimikrobiyel etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlara göre zeytin yaprağı ekstraktına karşı en dirençli türün *S. cerevisiae* olduğunu ve zeytin yaprağı ekstraktlarının antimikrobiyel özelliği sayesinde çeşitli endüstrilerde doğal koruyucu olarak kullanılabilirliğini ifade etmişlerdir.

Andredau ve ark. (2007) antrasiklin grubu bir antibiyotik olan Doxorubicin kullanımının kardiyotoksik yan etkileri (özellikle kalp yetmezliği) nedeniyle sınırlandırıldığını ifade etmişlerdir. Bunun için araştırmacılar, insanlarda doxorubicin ile uyarılan kardiyotoksistide oleuropeinin olası koruyucu etkisini ortaya koymak amacıyla 6 gruba ayrılmış sıçanlar üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda, zeytindeki oleuropeinin lipid peroksidasyon ürünlerini inhibe etmesi, oksidatif stresi ve kardiyomiyositlerde indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'ı azaltarak, doxorubicin'in neden olduğu kardiyotoksisteyi başarılı bir şekilde tedavi ettiği saptanmıştır.

Pereira ve ark. (2007) zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşikleri ters faz HPLC/DAD ile belirlemişler, bu fenoliklerin bağırsak ve solunum yolları

enfeksiyonlarının nedeni olabilen Gram pozitif bakteriler (*Bacillus cereus*, *B. subtilis* ve *Staphylococcus aureus*), Gram negatif bakteriler (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*) ve mantarlara (*Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans*) karşı antimikrobiyel etkilerini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda farklı ekstrakt konsantrasyonlarında mikrobiyal büyüme hızı değerlerine göre, zeytin yaprağının en fazla antimikrobiyal etki gösterdiği mikroorganizmalar sırasıyla *B. cereus* ~ *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* ~ *K. pneumoniae* ~ *P. aeruginosa* > *B. Subtilis* olarak belirlenmiştir. Ayrıca *B.cereus* ve *C. albicans*'ın en duyarlı mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir.

Ateroskleroz zerine yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı ekstraktının pıhtılaşma önleyici (anti-platelet) etkisi araştırılmış ve % 1.0 (v/v) düzeyinde zeytin yaprağı ekstraktı uygulaması ile trombosit aktivitesinde önemli bir düşüş olduğu sonucuna varılmıştır. Araştırmacılar zeytin yapraklarında bulunan polifenollerin sağlıklı ve sigara içmeyen bireylerde trombosit aktivasyonunu sınırladığını belirtmişlerdir (Singh ve ark. 2008)

Jemai ve ark. (2009) zeytin yaprağında bulunan oleuropein ve hidrok sitirazol'un antidiyabetik ve antioksidatif aktivitelerini belirlemek amacıyla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, ilk olarak "Alloxan" maddesini sıçanların karın boşluğuna (periton) enjekte ederek diabeti uyarılmışlardır. İşlem sonrasında diyabetik sıçanlarda hiperglisemi, hiperkolesterolemi artmış, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitelerinde azalma görülmüştür. Her bir parametre için 8 ve 16 mg/kg vücut ağırlığı dozunda oleuropein ve hidrok sitirazol açısından zengin ekstraktların 4 hafta süreyle uygulanmasının; serum glikoz ve kolesterol düzeylerini önemli ölçüde azalttığı ve antioksidan sistemindeki bozulmaları düzelttiği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre oleuropein ve hidrok sitirazol'un antidiyabetik etkisinin, bu bileşiklerin antioksidan aktivitesi ile oksidatif stresi sınırlandırmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktının antihipertansif (tansiyon düşürücü) etkisini araştırmak için gerçekleştirilen bir çalışmada; 1.aşama hipertansiyon hastalarında kullanılan "Captopril" isimli ilaç ile zeytin yaprağı ekstraktının etkileri karşılaştırılmıştır. Zeytin

yaprağı ekstraktının hipolipidemik (lipit düşürücü) etkisinin de araştırıldığı bu çalışmada, kan basınçları 8 haftalık tedavi sürecince her hafta, lipit profili ise 4 hafta aralıkla değerlendirilmiştir. Çalışmada zeytin yaprağı ekstraktı grubundaki hastaların trigliserit düzeyinde belirgin bir azalma gözlenirken, captopril grubundaki hastaların trigliserit düzeyinde anlamlı bir azalma gözlenmemiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, 1. aşama hipertansiyonlu bireylerde sistolik ve diyastolik kan basıncını düşürmede günde 2 kez 500 mg zeytin yaprağı ekstraktı kullanımının, günde 2 kez 12,5-25 mg captopril isimli ilaç kullanımı ile benzer etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir (Susalit ve ark. 2010).

Hamad (2015) karbon tetraklorür tarafından uyarılan hepatik hasar üzerine zeytin yaprağı ekstraktının potansiyel koruyucu etkisini araştırmak amacıyla 5 gruba ayrılmış tavşanlar üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Grup A: 4 hafta süreyle bazal diyet, Grup B: 4 hafta süreyle 50 mg/kg vücut ağırlığı dozunda bazal diyet (zeytin yaprağı ekstraktının eklenmesiyle birlikte), Grup C: 4 hafta süreyle haftada iki kere mısır yağında (% 50) 1 mL'lik bir dozda karbon tetraklorür, Grup D: 4 hafta süreyle oral karbon tetraklorid dozunun 2 saat öncesinde günlük zeytin yaprağı ekstraktı (50 mg/kg vücut ağırlığı) ve Grup E: 4 hafta süreyle oral karbon tetraklorür dozu verilmesinden 2 saat önce günlük Silymarin (standart hepato-koruyucu ilaç, 100 mg/kg vücut ağırlığı) uygulanmıştır. Süre sonunda alınan kan serumu örneklerinin AST (Aspartat Aminotransferaz), ALT (Alanin Transaminaz) seviyeleri incelenmiştir. Çalışmada zeytin yaprağı metanol ekstraktının oral yoldan 28 gün boyunca 50 mg/kg dozunda uygulanmasının serum AST ve ALT aktivitelerini önemli ölçüde düşürdüğü ve kan serumunun biyokimyasal parametrelerini karbontetra klorür uygulanan gruba göre normal seviyelere indirdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, zeytin yaprağı metanol ekstraktının güçlü antioksidan özelliği sayesinde karbon tetraklorür'ün yol açtığı karaciğer hasarını önlemede belirgin bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Nasrollahi ve Abolhasannezhad (2015) zeytin yaprağı ekstraktının *C. albicans* (PTCC 5027) üzerindeki etkisini araştırdıkları bir çalışmada, zeytin yaprağı ekstraktının antifungal aktiviteye sahip olduğunu ve ağızda pamukçuk gibi *Candida* kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisi için uygun olabileceğini ifade etmişlerdir.

Liu ve ark . (2017) zeytin yaprağı ekstraktının *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 ve *Salmonella enteritidis* gibi gıda kaynaklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 62,5 mg/mL'lik bir konsantrasyonda zeytin yaprağı ekstraktının bu üç patojenin gelişmesini hemen hemen tamamen inhibe ettiğini tespit etmişlerdir. Ekstrakt ilavesi ile *L. monocytogenes*'deki hücre hareketliliğinin azalmasının nedeninin flegalla kaybı olduğu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir. Ayrıca ekstraktların *L. monocytogenes* ve *S. enteritidis*'in biyofilm oluşturmasını da engellediği saptanmıştır. Araştırmacılar doğal bir ürün olan zeytin yaprağı ekstraktının gıda kaynaklı patojenler için antimikrobiyel olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir.

Al-Quraishy ve ark. (2017) zeytin yaprağı ekstraktının mide mukozasını, HCl /etanol kaynaklı mide mukozal hasarına karşı koruyup koruyamayacağını araştırmak amacıyla sıçanlar üzerinde bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonucunda 200 ve 300 mg/kg zeytin yaprağı ekstraktının önceden uygulanmasıyla hasarın tamamen engellendiği gözlenmiştir. Bununla birlikte HCl/etanol kaynaklı mide iltihabını hafifleterek ve oksidan/antioksidan dengesini düzenleyerek gastrit hastalığında doğal tedavi olarak potansiyel kullanımı olabileceğini dile getirmişlerdir.

Sarbishegi ve ark. (2017)'nin artan yaşla birlikte ortaya çıkabilen, hareket ve davranış problemleriyle sonuçlanan Parkinson hastalığında zeytin yaprağı ekstraktının nöroprotektif etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada; sıçanların deri altına oksidatif stres yaratan Rotenon maddesi (2,5 mg/kg) enjekte edilmiş, ardından 30 gün boyunca oral yoldan zeytin yaprağı ekstraktı verilmiştir. 150 ve 300 mg/kg ekstrakt verilen gruplarda sıçanların denge ve kas kuvvetlerinin önemli ölçüde iyileştiği ve pozitif nöronların tükenmesinin önlendiği görülmüştür. Araştırmacılar bu bulgular sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının sinir hücrelerini koruyucu özelliklere sahip olduğunu ve Parkinson'lu hastalarda dopaminerjik nöronların ölümünü önlemede yararlı olabileceğini dile getirmişlerdir.

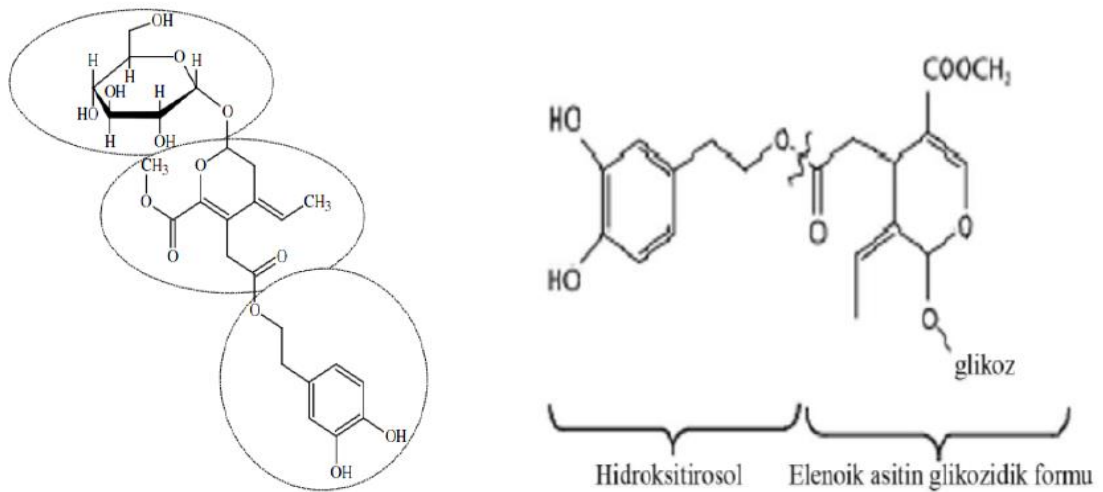
Losada-Echeberria ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada iki meme kanser hücresi modelinde hücre canlılığı testi ile zeytin yaprağı ekstraktlarının toplam

polifenolik içeriği ve antiproliferatif aktivitesi arasında bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek fenolik içeriğe sahip zeytin yaprağı ekstraktının en yüksek anti-proliferatif (hücre çoğalmasını önleyici) etkinliğe sahip olan ekstrakt olduğu belirtilmiştir.

2.3. Zeytin Yaprığında Bulunan Fenolik Bileşikler

Zeytin yaprakları diğer bitkilerle ortak olarak yaygın bulunan fenolik bileşikleri içermektedir. Ancak bunlara ilave olarak sadece *Oleaceae* familyasına özgü sekoiridoitlere ait fenolik bileşikler de içermektedir (Talhaoui ve ark. 2015).

Sekoiridoit olarak sınıflandırılan fenolik bileşikler moleküler yapılarında elenolik asit veya türevlerinin varlığı ile karakterize olup en önemli temsilcilerinden biri oleuropeindir. Oleuropein, üç yapısal alt birimden oluşmakta olup bunlar; hidroksitirazol diğer bir deyişle 4-(2-hidroksietil) benzen-1,2 diol olarak adlandırılan bir polifenol ile sekoiridoit elenolik asit ve glikoz molekülüdür (Yıldız ve Uylaşer 2011). Oleuropein'in moleküler yapısı Şekil 2.1' de verilmiştir (Ötleş ve Özyurt 2012). Oleuropein genel olarak zeytin çeşitlerinde en göze çarpan fenolik bileşiktir ve zeytin meyvelerinin, yapraklarının ve tohumlarının fenolik fraksiyonundan kolayca ekstrakte edilebilmektedir (Talhaoui ve ark. 2014).

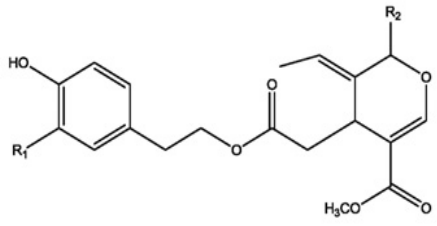
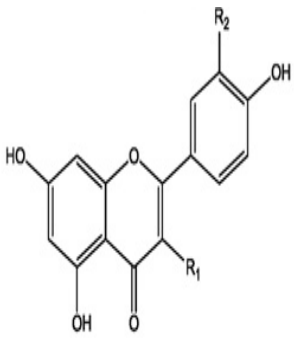
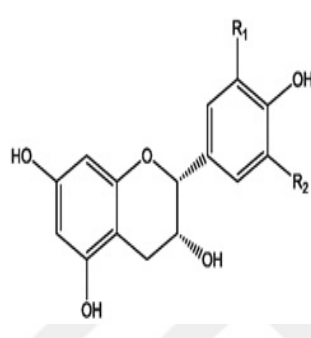
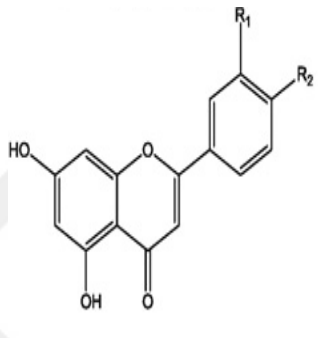
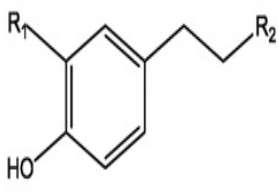
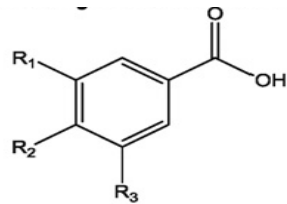
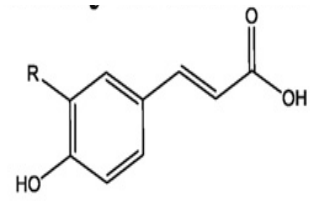


Şekil 2.1. Oleuropeinin yapısı

Zeytin yaprağı çok çeşitli fenolik turevleri içermektedir. Bunlar basit fenoller (en yaygın ve önemli dūřuk moleköl ağırlıklı fenolik bileşikler), flavonoidler (flavonlar, flavanonlar, flavonoller, 3-flavanoller) ve sekoiridoitlerden oluşmaktadır (şekil 2.2).

2.4. Zeytin Yapraklarının Antioksidan Aktivitesi

Zeytin yaprağı ekstraktının ve ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin sahip olduğu antioksidan kapasite değerleri Troloks Eřdeđer Antioksidan Kapasite (TEAC) olarak izelge 2.1’ de verilmiştir (Benavente-Garcia ve ark. 2000; Erbay ve Icier 2010). Hidroksil (-OH) grubu fazla olan fenolik bileşiklerde antioksidan aktivitenin fazla olduğu grölmiş ve tek hidroksil grubu bulunduran tirozol gibi bileşiklerde dūřuk, iki hidroksil grubu bulunduran hidroksitirazol gibi bileşiklerde ise yüksek antioksidan etki gösterdiği saptanmıştır (Benavente-Garcia ve ark. 2000). Zeytin yaprağı ekstraktı içindeki flavanoidler incelendiğinde en çok rutin’de aktivite olduğu, en az ise vanilin’de antioksidan aktivite bulunduğu tespit edilmiştir (izelge 2.1).

SEKOİRİDOİTLER		
 <p>Oleuropein ($R_1=OH, R_2=Glukoza$) Ligstrosid aglikon ($R_1=H, R_2=OH$) Oleuropein aglikon ($R_1=OH, R_2=OH$)</p>		
FLAVONOİDLER		
Flavonoller	Flavanoller	Flavonlar
 <p>Kuersetin ($R_1=OH, R_2=OH$) İzorhamnetin ($R_1=OH, R_2=OCH_3$) Rutin ($R_1=Rutinoz, R_2=OH$)</p>	 <p>Kateşin ($R_1=OH, R_2=H$) Gallokateşin ($R_1, R_2=OH$)</p>	 <p>Apigenin ($R_1=H, R_2=OH$) Luteolin ($R_1, R_2=OH$)</p>
BASİT FENOLLER		
Fenillethanoidler	Hidroksibenzoik asitler	Hidroksisünamik asitler
 <p>Tirozol ($R_1=H, R_2=OH$) Hidroksitirazol ($R_1, R_2=OH$)</p>	 <p>p-hidroksibenzoik asit ($R_1, R_3=H, R_2=OH$) Gallik asit ($R_1, R_2, R_3=OH$)</p>	 <p>p-kumarik asit ($R=H$) Kafeik asit ($R=OH$) Ferulik asit ($R=OCH_3$)</p>

Şekil 2.2. Zeytin yaprağında bulunan başlıca fenolikler (Talhaoui ve ark. 2015).

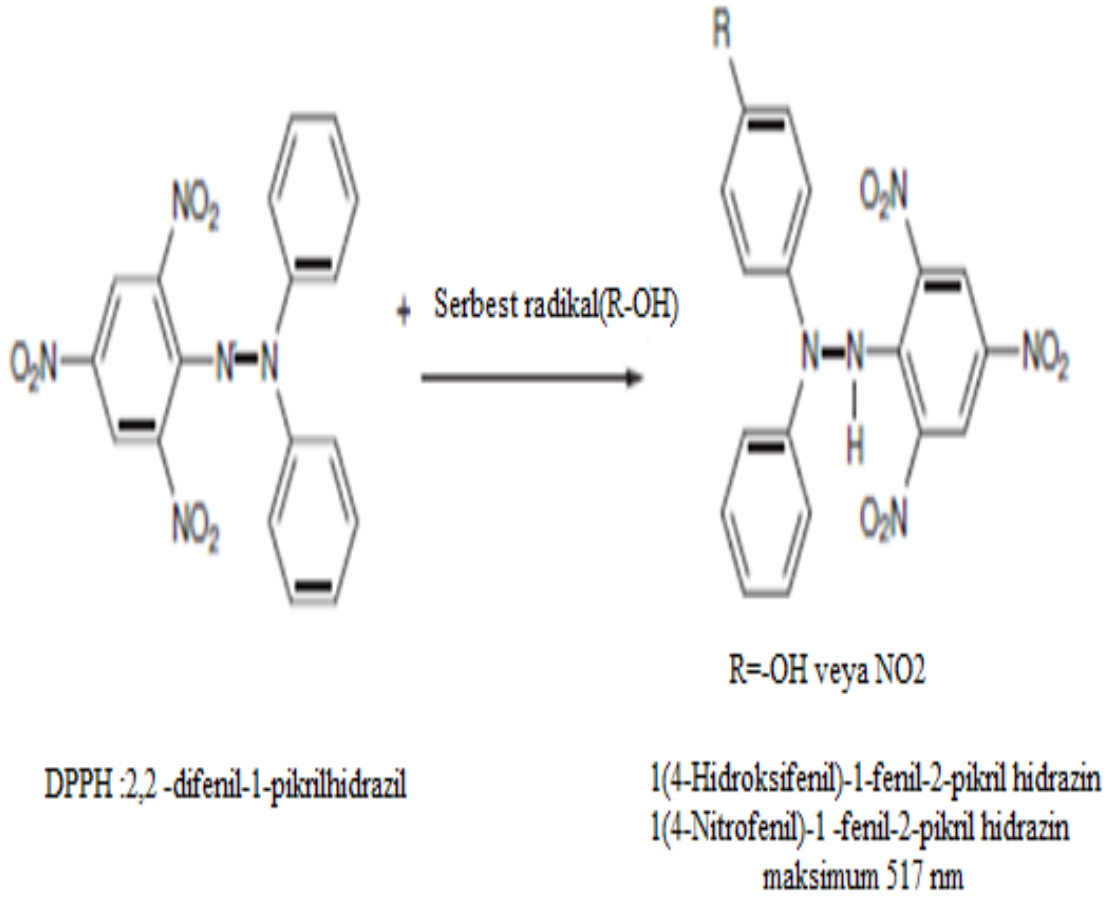
Çizelge 2.1. Zeytin yaprağı ekstraktındaki fenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri

Fenolik Bileşik	Miktar %	TEAC (mM)
Ekstrakt	-	1,58 ± 0,06
Oleuropein	24,54	0,88 ± 0,09
Hidroksitirazol	1,46	1,57 ± 0,12
Luteolin-7-glikozid	1,38	0,71 ± 0,04
Apigenin-7-glikozid	1,37	0,42 ± 0,03
Verbaskozid	1,11	1,02 ± 0,07
Tirozol	0,71	0,35 ± 0,35
Vanilik asit	0,63	0,67 ± 0,09
Diosmetin-7-glikozid	0,54	0,64 ± 0,09
Kafeik asit	0,34	1,37 ± 0,08
Luteolin	0,21	2,25 ± 0,11
Rutin	0,05	2,75 ± 0,05
Diosmetin	0,05	1,42 ± 0,07
Vanilin	0,05	0,13 ± 0,01
Kateşin	0,04	2,28 ± 0,04

DPPH radikali süpürücü aktivite yöntemi

Literatürde antioksidan aktivite miktarının belirlenmesine yönelik birçok yöntemle karşılaşmaktadır. Bu yöntemler arasında araştırmalarda yaygın olarak kullanılan DPPH yöntemi, ilk kez Blois (1958) tarafından 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğinin önerilmesi ile ortaya çıkmıştır. Daha sonra Brand-Williams ve ark. (1995) yöntemi geliştirmiş ve bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından referans olarak kullanılmıştır (Molyneux 2004).

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali, 515-528 nm civarında maksimum absorpsiyon bandı olan kararlı bir serbest radikal olup, bileşiklerin antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi için yararlı bir reaktiftir (Ardestani ve Yazdanparast 2007; Bahloul ve ark. 2009). DPPH radikali süpürücü aktivite metodunun prensibi mor renkli kristal yapıda olan DPPH radikalının bir elektron veya hidrojen verebilen herhangi bir molekül ile reaksiyona girerek mor-sarı renkli difenilpikril hidrazine indirgenmesidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Antioksidan (DPPH) analizi prensibi (Ebada ve ark. 2008)

Zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarları, antioksidan aktivite değerleri ve fenolik bileşenleri ile ilgili yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Ryan ve ark. (2003) Avusturalya’da yetişen Hardy’s Mammoth çeşidine ait yeni sezon (meyve bölgesinin üzerinde büyüyen) ve eski sezon (meyve bölgesinin uzağında ve

dallar arasında büyüyen) yaprakların fenolik profilini iki hasat yılı (1999/2000) boyunca incelemişlerdir. Yeni sezon yapraklarda oleuropein miktarının tirozol eşdeğeri cinsinden 8-267 mg/g kuru madde, eski sezon yapraklarda 6-196 mg/g kuru madde arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada yapraklardaki flavonoid seviyelerinin zeytin meyvesi bakımından yüksek verimli (1999) ve düşük verimli (2000) periyod içerisinde hızlı şekilde dalgalanma gösterdiği saptanmıştır.

Silva ve ark. (2006) Portekiz’de yetişen on zeytin çeşidine ait yapraklarda bulunan fenolik bileşenleri kalitatif olarak HPLC-MS yöntemi ve toplam fenolik madde miktarını ise Folin-Denis yöntemi ile belirlemişlerdir. Standartlar kullanılarak tespit edilen iyonların MS sistemi ile parçalanması yoluyla, zeytin yapraklarında tanımlanan fenolik bileşiklerin hidroksitirazol, rutin, verbaskozid, luteolin-7-glukozid, luteolin-4-glukozid, oleuropein, oleuropein aglikon ve ligstrosid aglikon olduğu belirtilmiştir. Çalışmada toplam fenolik madde miktarının tannik asit cinsinden taze yapraklarda 11,6-17,4 g/kg, kurutulmuş (40 °C’de 48 saat) yapraklarda ise 11,7-40,1 g/kg arasında değiştiği saptanmıştır.

Pereira ve ark. (2007) yaptıkları bir çalışmada Portekiz’in Cobrançosa zeytin çeşidine ait yapraklar üzerindeki küflerin neden olduğu hastalıkları önlemek için, çeşitli konsantrasyonlardaki bakır çözeltilerini yapraklar üzerine spreyleme yoluyla uygulamışlar ve daha sonra DPPH yöntemi ile bu yaprakların antioksidan aktivite miktarlarını incelemişlerdir. Çalışma sonucunda yapraklarda kalan bakırın fenolik bileşikler tarafından nötralize edilen reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına neden olduğu ve bu yüzden bakır uygulaması yapılan yapraklarda antioksidan aktivitenin düştüğü saptanmıştır.

Tunus’un Sfax bölgesinden temin edilen zeytin yapraklarının toplam fenol miktarı ve antioksidan aktivitesi üzerine konvektif güneş enerjisi ile kurutmanın etkisinin incelendiği bir çalışmada taze yapraklardaki DPPH radikal süpürücü aktivitenin 40 °C, 50 °C ve 60 °C’de kurutulan yapraklara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde taze yaprak örneklerinde toplam fenolik madde içeriği 2,203-2,206 mg/100g kafeik asit arasında değişmekte iken, farklı sıcaklıklarda kurutma sonucunda

bu değerin 0,972-2,281 mg/100g kafeik asit arasında olduğu saptanmıştır. Çalışma sonucunda antioksidan aktivite ve toplam fenol miktarının kurutma koşullarından önemli derecede etkilendiği ve sözkonusu etkinin olumsuz yönde olmaması için kurutma sresinin azaltılması gerektiği belirtilmiştir (Bahloul ve ark. 2009).

Saygın (2009) tarafından yapılan bir çalışmada İzmir Zeytincilik Araştırma Enstitüsü bahçesinden hasat edilen Ayvalık, Memecik, Gemlik ve Domat eşidi zeytin yapraklarının fenolik madde miktarları ile antioksidan aktivite değerleri üzerine mevsimsel değişiklerin etkisi araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre mevsimsel değişikliklerin yaprakların fenolik içeriğini ve antioksidan aktiviteyi önemli oranda etkilediği tespit edilmiş, örneklerin tamamında tanımlanan ve en yüksek miktarda olduğu saptanan fenolik bileşiğin oleuropein olduğu belirtilmiştir.

Boudhrioua ve ark. (2009) Chemlali, Chemchali, Zarrazi ve Chetoui eşidi zeytin yaprakların renk değerleri ve toplam fenol miktarı üzerine infrared kurutmanın etkisini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda infrared kurutma ile yaprakların yeşil renginin korunduğu ve parlaklığının arttığı tespit edilmiştir. Chemlali eşidi zeytinlere ait taze yapraklarda toplam fenolik madde miktarı 1,38 g kafeik asit/100 g kuru madde iken, bu değerin 40 C'de kurutma sonucunda 2,13 g kafeik asit/100 g kuru madde ve 70 C'de kurutma sonucunda ise 5,14 g kafeik asit/100g kuru maddeye yükseldiği saptanmıştır. Araştırmacılar diğer zeytin çeşitlerine ait yapraklarda da benzer sonuçların alındığını belirtmişlerdir.

Bilek (2010) Ege Bölgesinde yetişen Memecik eşidi zeytin yapraklarından toplam fenolik madde ekstraksiyonu üzerine çözücü kompozisyonu (etanol-su, % 20-100), ekstraksiyon sıcaklığı (20-60 C), ekstraksiyon süresi (4 - 48 sa) ve çözücü katı oranı (4 - 8) gibi bağımsız dört farklı değişkenin etkisini araştırmıştır. Çalışma sonucunda zeytin yaprağından toplam fenolik madde ekstraksiyonu için önerilen seçilmiş koşullar; çözücü kompozisyonu: % 43 etanol içeren su (v/v), ekstraksiyon sıcaklığı: 50 C, ekstraksiyon süresi: 15 saat ve çözücü/katı oranı: 7 olarak belirlenmiştir. Belirtilen koşullarda gerçekleştirilen ekstraksiyon sonucu kurutulmuş zeytin yaprağının toplam fenolik madde miktarı ise 4586,3 mg GAE/100 g kuru yaprak olarak saptanmıştır.

ve ark. (2010) Yunan zeytin çeşitlerinin (Koroneiki, Megaritik ve Kalamon) fenolik profilini LC/MS ile ve artan polaritede çözücüler (petrol eteri, diklorometan, metanol, metanol-su:60/40) kullanılarak elde edilen ekstraktların antioksidan aktivitelerini ise DPPH yöntemiyle belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu çalışmalarında ayrıca fenolik bileşiklerin lipoksigenaz aktivitesini inhibe etme kabiliyetini araştırmışlar ve elde ettikleri ekstraktların oksidatif stabilite indeksini sentetik antioksidan olan TBHQ (Ter-Bütül Hidro Kinon) ve ticari Oleoresin ile karşılaştırmışlardır. Fenolik bileşiklerin LC/MS ile analizi sonucu, oleuropein miktarının Megaritik, Kalamon, Koroneiki zeytin çeşitlerinde sırasıyla $3,26 \pm 0,1$; $8,48 \pm 0,51$ ve $4,89 \pm 0,26$ mg fenol/100g zeytin yaprağı olduğu tespit edilmiştir. Tüm zeytin çeşitlerinde en yüksek fenol içeriğine ve antioksidan aktiviteye metanol-su:60/40 ekstraktlarında ulaşıldığı saptanmıştır. Megaritik, Kalamon, Koroneiki zeytin çeşitlerinin metanol: su ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı sırasıyla 6,093; 5,579 ve 6,196 mg/kg (mg gallik asit/kg kurutulmuş zeytin yaprağı) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca çeşitler arasında küçük farklılıklar olmakla birlikte metanol: su karışımı ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının lipoksigenaz'ı önemli ölçüde inhibe ettiği ve oksidatif stabilite indeksi değerleri bakımından incelendiğinde de TBHQ > ticari oleoresin > zeytin yaprağı ekstraktı olduğu saptanmıştır.

Chetoui çeşidi zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktlarda fenoliklere ve antioksidan aktivite değerlerine çözücü türünün etkisinin araştırıldığı bir çalışmada % 80'lik methanol, % 70'lik etanol, % 80'lik aseton ve saf su kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre toplam fenolik madde miktarının GAE cinsinden en yüksek $24,09 \pm 0,73$ mg/g kuru madde ile % 80'lik aseton kullanılarak hazırlanan ekstraktta, flavonoid miktarının ise kateşin eşdeğeri olarak en yüksek $21,47 \pm 2,56$ mg kateşin/g kuru madde ile % 80'lik metanol ile hazırlanan ekstraktta olduğu saptanmıştır. Antioksidan aktivite değeri ise % 93,70 inhibisyon olarak en yüksek % 80'lik metanol çözeltisi kullanılarak elde edilen ekstraktlarda bulunmuştur. Çalışmada sonuç olarak, zeytin yapraklarından ekstrakt elde etmede metanolün en verimli ekstraksiyon çözücüsü olduğu belirtilmiştir (Abaza ve ark. 2011).

Harp (2011) tarafından Akdeniz Bölgesinde yetişen Gemlik, Domat, Adana Topağı, Adana Yerli çeşitlerinden elde edilen zeytin yapraklarının toplam fenolik madde içeriği

ve antioksidan potansiyeline farklı derim zamanlarının etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen çalışmada zeytin yaprağı örneklerinin etanol-su ekstraktlarının değerleri ticari olarak alınan ekstraktlar ve sentetik antioksidanlar ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada örneklerin toplam fenolik madde miktarının CAE (Kafeik Asit Eşdeğer) cinsinden 279,4-732,5 mg/100g arasında değiştiği ve en yüksek fenolik madde içeriğinin Eylül ayında hasat edilen Domat eşidi zeytin yapraklarına ait olduğu bulunmuştur. Tüm derim zamanlarında Domat eşidi zeytin yaprağından elde edilen etanol-su ekstraktının, ticari ekstraktan daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahip olduğu ve antioksidan etkisinin sentetik antioksidanlar olan BHT (Bütilenmiş Hidroksi Toluen) ve BHA (Bütilenmiş Hidroksi Anilin)'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Sevim ve Tuncay (2012) tarafından yapılan bu çalışmada Bornova Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü bahçesinden 2008/2009 ve 2009/2010 hasat yıllarında toplanan Ayvalık ve Memecik eşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde miktarları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan Ayvalık eşidi zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarının yıllara göre sırasıyla 237,73 mg CAE/100 g ve 235,64 mg CAE/100 g, Memecik eşidi zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarının ise 230,64 mg CAE/100 g ve 233,73 mg CAE/100 g olduğu saptanmıştır. Zeytin yapraklarının antioksidan aktivitesinin DPPH ve ABTS radikali süpürücü aktivite yöntemiyle belirlendiği bu çalışmada Ayvalık zeytin çeşidi yaprağının DPPH ve ABTS+ radikal süpürücü aktivitesinin Memecik eşidi zeytin yapraklarına göre daha yüksek olduğu grlmştir.

Tayoub ve ark. (2012) Suriye'de sonbahar ve ilkbaharda hasat edilen yedi zeytin çeşidine ait yaprakların oleuropein miktarını incelemişler ve ilkbaharda hasat edilen tüm çeşitlere ait yapraklarda bulunan oleuropein miktarının sonbaharda hasat edilenlere göre daha yüksek olduğu saptamışlardır.

Tunus'da ekim ve ocak aylarında hasat edilen Chemlali ve Neb Jmel eşidi zeytin ve zeytin yapraklarının fenolik bileşenlerinin HPLC, antioksidan aktivitelerinin ise DPPH ve ABTS katyon radikali süpürücü aktivite yöntemi ile belirlendiği bir çalışma sonucunda; gelişmekte olan yapraklarda ve olgun meyvelerde toplam polifenol, toplam

o-difenol ve toplam flavonoid miktarlarının az olduğu görülürken, gelişimini tamamlamış yapraklarda ve olgunlaşmamış meyvelerde ise bu değerlerin arttığı saptanmıştır. DPPH yöntemiyle en yüksek antioksidan aktivite değerine % 98,2 ile ocak ayında, ABTS+ yönteminde ise % 98,65 ile ekim ayında toplanan Chemlali çeşidi zeytin yapraklarında ulaşıldığı görülmüştür. Söz konusu farklılığın Chemlali çeşidi zeytin yapraklarında bulunan fenolik maddelerin (p-kumarik asit, oleuropein ve vanilik asit) DPPH radikaline göre ABTS+ radikali ile daha iyi reaksiyon vermesi nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmiştir (Brahmi ve ark. 2013).

Kocatürk (2014) tarafından gama ışınlarının (radyasyon) zeytin yapraklarındaki fenolik madde içeriğini ve antioksidan kapasiteyi nasıl etkilediğini incelemek amacıyla gerçekleştirilen bir çalışmada Ayvalık ve Gemlik çeşidi zeytin yaprakları mikrodalga, infrared, konveksiyonel ısıtıcı ve oda koşullarında kurutulmuş ve daha sonra kurutulan bu örnekler üç farklı dozda (3, 5, 10 kGy) gama ışını uygulanmıştır. Çalışma sonucunda zeytin yapraklarının antioksidan kapasitesi, fenolik ve flavonoid madde miktarının uygulanan gama ışını dozuna ve kurutma yöntemine göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Her iki çeşitte de en yüksek değerlere mikrodalga ile kurutulan yaprakların sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca gama ışını uygulamasının antioksidan kapasiteyi ve fenolik madde içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir.

Talhaoui ve ark. (2014) İspanya’da yetişen Arbequina, Picual ve Sikitita çeşidi zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerden 30 tanesini HPLC-DAD-TOF-MS ile tanımlamış ve kantitatif olarak tayin etmişlerdir. Arbequina, Sikitita ve Picual çeşidi yapraklarda kantitatif tayin sonucu toplam fenolik madde miktarının sırasıyla 60,644, 52,129 ve 52,579 mg/g kuru yaprak olduğu saptanmıştır. DPPH radikali süpürücü aktivite yöntemiyle yapılan antioksidan aktivite analizleri sonucu EC₅₀ (Başlangıç DPPH konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gereken antioksidan miktarı) olarak en yüksek antioksidan aktivitenin 7,2 mg/mL EC₅₀ değeri ile Arbequina çeşidine ait olduğu belirlenmiştir. Sikitita çeşidi zeytin yapraklarının EC₅₀ değerinin 11,3 mg/mL ve Picual çeşidi zeytin yapraklarının EC₅₀ değerinin 12,3 mg/mL olduğu ve Sikitita ve Picual çeşidi zeytin yaprakları arasında radikal süpürücü aktivite bakımından önemli bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir.

Yateem ve ark. (2014)'nın yaptığı bir çalışmada, Filistin'in Batı Şeria bölgesinde bulunan zeytin ağaçlarından hasat edilen yapraklardan ekstrakte edilen oleuropein miktarına çözücü (tür, bileşim, pH ve sıcaklık) ve ekstraksiyon yönteminin (maserasyon ve soxhlet) etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda oleuropeinin ekstraksiyon veriminin artması için organik çözücülerin su ile karıştırılması gerektiği, sadece saf çözücü kullanılarak ekstraksiyon yapıldığında çok düşük miktarlarda oleuropeinin ekstrakte edilebildiği ve ekstraksiyonda çözücüdeki pH artışının oleuropeinin hidroksil gruplarının iyonizasyonuna bağlı olarak düşük oleuropein geri kazanımlarına yol açtığı bulgularına varılmıştır. Araştırmacılar oleuropeinin ekstraksiyonu için optimum koşulların; yüksek sıcaklık (60°C), asidik pH (3) ve Soxhlet yöntemi olduğunu dile getirmişlerdir.

Khaliq ve ark. (2015) Pakistan'da yetiştirilen sekiz zeytin çeşidine ait yaprak örneklerinin antioksidan aktivitelerini ve fenolik profilini inceledikleri çalışmalarında; zeytin yapraklarının sulu ekstraktlarının, farelerin karaciğerinde pro-oksidan (10 µM FeSO₄) tarafından indüklenen tiyobarbitürik asit reaktif türlerine karşı inhibisyon gösterdiğini saptamışlardır. Çeşitler arasında antioksidan aktivitenin Gemlik > Frantio > Doleca-Agogia > Moriolo > Misyon > Uslu > Leccino > Carotina olarak sıralandığı tespit edilmiştir. DPPH analizleri sonucunda ise EC₅₀ değerlerinin 22,46 ile 198 µg/mL arasında değiştiği belirlenmiştir. En yüksek antioksidan aktivite gösteren Gemlik çeşidinin fenolik madde profilinin elajik asit (29,80 ± 0,02 mg/g), klorojenik asit (3,17 ± 0,03 mg/g), kafeik asit (15,73 ± 0,01 mg/g), gallik asit (15,69 ± 0,01 mg/g), rutin (34,56 ± 0,03 mg/g), kuersetin (6,41 ± 0,01 mg/g), epikateşin (11,04 ± 0,01 mg/g) ve kuersitrin (15,32 ± 0,03 mg/g), kaempferol (7,38 ± 0,02 mg/g) olduğu tespit edilmiştir.

Toth ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, Hırvatistan'ın Novi Vinodolski bölgesinden toplanan zeytin yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerin doğru molekül kütlesi ve formülünün belirlenmesi için LC (sıvı kromatografisi) ve ESI (elektrosprey iyonizasyon) ile birlikte TOF-MS (uçuş zamanlı kütle spektroskopisi) kullanılmıştır. Araştırmacılar zeytin yapraklarında kalitatif olarak tespit edilen 41 fenolik bileşikten 8 tanesini kantitatif olarak belirlediklerini ve zeytin yapraklarında en fazla miktarda

bulunan bileşimin $8,52 \pm 0,21$ g/100 g kuru madde ile oleuropein olduğunu bildirmişlerdir.

Xie ve ark. (2015) Çin'in Kansu bölgesinden toplanan zeytin yapraklarının ve meyvelerinin fenolik bileşimlerini ve antioksidan aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, fenolik bileşiklerin tayinini HPLC/UV yöntemi ile, antioksidan kapasite tayinini ise indirgeme gücü olarak ve DPPH, OH, ABTS+(katyon) ve O_2^- radikali süpürücü kapasite yöntemleri ile gerçekleştirmişlerdir. HPLC ile yapılan analizler sonucu zeytin yapraklarında hidroksitirazol ($0,54 \pm 0,02$ mg/g), vanilik asit ($0,058 \pm 0,01$ mg/g), kafeik asit ($2,17 \pm 0,02$ mg/g), vanilin ($0,57 \pm 0,08$ mg/g), verbaskosid ($0,83 \pm 0,05$ mg/g), luteolin-7- β -D-glukoz ($0,43 \pm 0,03$ mg/g), rutin ($0,13 \pm 0,09$ mg/g), apigenin-7- β -D-glukoz ($0,16 \pm 0,01$ mg/g), oleuropein ($6,53 \pm 0,01$ mg/g) ve luteolin ($0,38 \pm 0,06$ mg/g) tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre, zeytin yaprağının antioksidan kapasitesi indirgeme gücü olarak incelendiğinde askorbik asitten sonra en yüksek indirgeme gücüne sahip olduğu, DPPH radikali süpürücü kapasite olarak incelendiğinde 0,8 mg/mL konsantrasyonunda % 95,48 inhibisyon gösterdiği, hidroksil radikalini süpürücü aktivite olarak incelendiğinde 0,6 mg/mL örnek konsantrasyonunda hidroksil radikalini % 100 oranında yok ettiği, ABTS+ radikal süpürücü kapasite olarak incelendiğinde TEAC cinsinden 1,92 mg/mL ile radikali mükemmel yok etme yeteneğine sahip olduğu ve aktif O_2^- radikalinin otooksidasyonunu engelleyerek süperoksit radikalini süpürücü etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Moudache ve ark. (2016) zeytin yaprağı ekstraktını antioksidan olarak paketleme ambalajı üretiminde polietilen/polietilen (PE/PE) film ve polietilen/kağıt (PE/P) katmanlarında kullanmışlardır. Araştırmacılar farklı konsantrasyonlarda zeytin yaprağı ekstraktı içeren çok katmanlı filmleri, antioksidan kapasitelerini belirlemek için sulu peroksit çözeltisinden üretilen serbest radikallerce zenginleştirilmiş bir gaz akımına maruz bırakmışlardır. Ekstrakt ilave edilmeyen plastik filmlerin (kontrol) hidroksilasyon yüzdesi % 100 referans alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, PE/PE ve PE/P filmlerde kullanılan zeytin yaprağı ekstraktı konsantrasyonu arttıkça hidroksilasyon yüzdesinin azaldığı tespit edilmiştir. Araştırmada % 2 zeytin yaprağı ekstraktı ambalajın migrasyon testleri, % 3'lük asetik asit ve % 10'luk etanolde

40°C’de 10 gün bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Migrasyon testi sonuçlarının ekstraktların önceden LC/MS analizleri sonucu tespit edilen iki ana fenolik bileşen (oleuropein ve Luteolin 7-O-rutinosid) miktarlarının LOQ (dedeksiyon limiti) değerinden küçük olması nedeniyle, ambalajlarda migrasyon olmadığı sonucuna varılmıştır. Zeytin yaprağındaki fenolik bileşiklerin çok katmanlı ambalajlar yapılırken yapışkana tutunduğu, bu yüzden zeytin yaprağı ekstraktı içeren PE/PE aktif filmlerin gıda ve gıda maddeleriyle doğrudan temasının olmadığı, bu yüzden gıdalar için üretilen paketleme ambalajlarında kullanılabilecekleri ifade edilmiştir.

Abaza ve ark. (2016) Tunus’da yetişen Chemlali çeşidine ait zeytinin farklı kısımlarının (meyve, yaprak, çiçek ve tomurcuk) gelişme evrelerine göre fenolik profilini araştırmışlardır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre yeşil meyve olgunlaştıkça oleuropein miktarı 8,6 mg/g’dan 1,28 mg/g kuru maddeye azaldığı, genç yapraklarda 9,4 mg/g kuru madde olan oleuropein miktarının yaşlı yapraklarda 6,71 mg/g kuru madde olarak saptandığı belirtilmiştir. Genç zeytin yapraklarında en fazla bulunan flavonoidlerin sırasıyla luteolin glikozid (1,95 mg/g kuru madde), kuersetin (1,42 mg/g kuru madde) ve luteolin (1,24 mg/g kuru madde) olduğu tespit edilmiştir. Yaşlı zeytin yapraklarında luteolin miktarının azaldığı ve kuersetin tespit edilemediği ifade edilmiştir.

Bir grup araştırmacı İtalya’da yetişen ve farklı zamanlarda (Aralık, Mart, Haziran, Eylül ayı) hasat edilen Dolce Agogia Moraiolo, Leccino ve Frantoio çeşidine ait zeytin yapraklarının fenolik bileşenlerini ve antioksidan aktivitesini incelemiştir. Çalışmada toplam fenol miktarının Kasım ayından Haziran ayına kadar arttığı ve tüm çeşitlerde en yüksek toplam fenol miktarının Haziran ayında olduğu saptanmıştır. En yüksek antioksidan aktivitenin ise % 86,1 ile Mart ayında hasat edilen Leccino çeşidi zeytin yapraklarına ait olduğu görülmüştür. Yapraklardaki oleuropein ve hidrokstitirazol miktarlarında da çeşit ve hasat zamanına bağlı olarak önemli farklılıklar olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, zeytin hasadı ve zeytin ağaçlarını budama dönemi olması nedeniyle zeytin yapraklarının atık olarak en fazla Kasım ve Mart aylarında ortaya çıktığını ve bu dönemdeki zeytin yapraklarının biyoaktif bileşenlerce en zengin içeriğe sahip olduğunu dile getirmişlerdir (Blasi ve ark. 2016).

Çetinkaya ve Kulak (2016) Kilis yağlık zeytin çeşidine ait yaprakların toplam fenolik, toplam flavonoid ve oleuropein miktarı ile ağaçların yaşı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmacılar mevsimsel farklılıkları izlemek için yaprakları yıl içerisinde Şubat, Nisan, Haziran, Ağustos, Ekim, Aralık aylarında topladıklarını ifade etmişlerdir. Çalışma sonucunda genç ağaçların yapraklarında daha fazla miktarda oleuropein ve fenolik madde bulunurken, yaşlı ağaçlarda flavonoid miktarı daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca en yüksek oleuropein miktarının Şubat ayında ve genç ağaçların yapraklarında bulunduğu, oleuropein miktarı ile toplam fenol miktarı arasında güçlü bir korelasyon olduğu, oleuropein miktarının toplam flavonoid miktarına bağlı olarak değişim göstermediğinin tespit edildiği ifade edilmiştir. Çalışmada sonuç olarak, biyolojik açıdan güçlü metabolitlerin yaş faktörlerine, çeşitlere ve ekolojik koşullara bağlı olarak değişebileceği belirtilmiştir.

Durak (2016) tarafından yapılan bir çalışmada Ayvalık, Domat ve Memecik çeşidi zeytin yapraklarının sahip olduğu fonksiyonel özelliklerin farklı hasat zamanlarına göre değişimi incelenmiştir. Araştırmacı serbest radikal (DPPH) süpürücü etkisinin en fazla Ocak ayında Ayvalık çeşidi zeytin yapraklarında görüldüğünü, toplam fenolik madde miktarının ise en yüksek Ocak ayında Memecik çeşidi zeytin yapraklarında saptandığını belirtmiştir. Çalışmada zeytin yapraklarında en fazla bulunan mineralin Ca olduğu ve miktarının 2564,81- 4859,08 mg/kg arasında değiştiği ifade edilmiştir.

Kurtulmuş (2016) tarafından Ayvalık çeşidine ait zeytin yapraklarının fenolik bileşimleri, antioksidan aktivitesi ve mineral bileşimleri üzerine farklı yükseklik ve hasat zamanının etkisinin incelendiği bir çalışmada, yaprak örneklerinde DPPH radikali süpürücü aktivitenin en yüksek Mayıs ayında olduğu saptanmıştır. Ayrıca yükseltisi az olan bölgelerden elde edilen yaprak örneklerinde ağır metallere rastlanıldığı ve yükseltinin fazla olduğu yerlerden elde edilen yaprak örneklerinin fenolik madde miktarlarının da fazla olduğu belirtilmiştir.

Mitsopoulos ve ark. (2016 a,b) Yunanistan oijinli (Koroneiki, Lianolia Kerkyras, Mastoidis, Adramytini, Megaritiki, Gaidourelia, Kalamata, Konservolia, Chalkidiki) ve İspanyol orijinli (Arbequina) zeytin meyvesinin ve yapraklarının iki yıl boyunca

farklı gelişme evrelerinde fenolik profilini, toplam fenolik madde miktarlarını ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar zeytin yapraklarında en yüksek oleuropein miktarının 20,31 mg/g ile Eylül ayında toplanan Arbequine çeşidi zeytin yapraklarına ait olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda her iki yılda da zeytin yapraklarının olgunlaşması sırasında oleuropein miktarında düşüş görülürken, zeytin meyvelerinde bu durumun görülmediği saptanmıştır. Ayrıca yıl ve gelişme evresi farklılığına bakılmaksızın zeytin yapraklarında, yeşil ve siyah zeytin meyvesine göre daha fazla fenolik bileşik tanımlandığı, toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasında pozitif korelasyon olduğu ifade edilmiştir.

Romero ve ark. (2016) yaptıkları bir çalışmada Picual ve Arbequina çeşidi zeytin yapraklarının biyoaktif bileşiklerini kantitatif olarak tayin etmişlerdir. Yapraklardaki oleuropein miktarının en yüksek Picual (72117 mg/kg) ve Arbequina (55577 mg/kg) çeşitlerinde Kasım ayında hasat edilen örneklerde tespit edildiği belirtilmiştir. Araştırmacılar zeytin yapraklarının triterpenik asitlerce de zengin olduğunu (20 g/kg taze ağırlık) ve en fazla bulunan asitin oleanolik asit olduğunu saptamışlardır.

Wissam ve ark. (2016) Suriye’de yetişen zeytin ağaçlarından elde edilen yaprakların fenolik bileşik miktarına ekstraksiyon koşullarının (çözücü türü ve kompozisyonu, süre ve sıcaklık) etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar zeytin yapraklarından fenollerin ekstraksiyonu için metanol ve aseton kullanılarak yüksek verim elde edilmiş olsa da, metanolün yüksek toksisitesi ve gıda sınıfı bir çözücü olmaması nedeniyle, etanolü en uygun çözücü olduğunu belirtmişlerdir. En etkili ekstraksiyonun ise mikrodalgada kurutulmuş yaprak örnekleri için % 40’lık etanol, 60 °C ekstraksiyon sıcaklığı ve 120 dakika ekstraksiyon süresi koşullarında gerçekleştirildiğini dile getirmişlerdir.

Yancheva ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, doğal ortamda yetiştirilen Chondrolia Halkidiki, Kalamon, Koroneiki çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite miktarı ve fenolik madde içeriği, yapay ortamda yetiştirilen Chondrolia Halkidiki çeşidi zeytin yaprakları ile karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar liyofilize edilmiş yaprak örnekleri ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı ve DPPH, ABTS, CUPRAC (Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite), FRAP (Demir (III)

İyonu İndirgeyici Antioksidan Güç) yöntemleri ile gerçekleştirilen antioksidan kapasite sonuçlarına ait en yüksek değerlerin yapay ortamda yetiştirilen örneğe ait olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak yapay ortamda mikroçoğaltma yöntemiyle elde edilen zeytin bitkilerinin biyokütle üretiminde değerli maddelerin ekstraksiyonu için potansiyel kaynak olabileceği ifade edilmiştir.

Temiz ve Temur (2017) Antalya'dan toplanan zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktların polifenolik profiline ve toplam fenolik madde miktarına çözücü farkının etkisini araştırmışlardır. Araştırmada HPLC'de UV dedektörü ile 280 nm'de yapılan ölçümler sonucunda zeytin yapraklarında en yüksek oleuropein miktarına ($3,456 \pm 0,096$ g/100g kuru madde) ve hidrositirazol miktarına metanol ($0,371 \pm 0,001$ g/100g kuru madde), tirozol miktarına ise su ($0,184 \pm 0,0006$ g/100g kuru madde) ekstraktının sahip olduğu tespit edilmiştir. Ekstrakte edilen toplam fenolik madde miktarı bakımından solventler karşılaştırıldığında ise sıralamanın metanol ($3201,7 \pm 120,8$ mg GAE/100 g örnek), metanol/su ($2729,4 \pm 121,4$ mg GAE/100 g örnek) ve su ($1946,1 \pm 105,6$) şeklinde olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar polifenolik bileşiklerin yüksek hidrofilik karakterlerinden dolayı, polaritesi fazla olan metanolik solventlerde daha verimli şekilde ekstrakte edilebileceğini ifade etmişlerdir.

Chemlali çeşidine ait zeytin yapraklarının fenoliklerine hasat döneminin ve yaprak gübrelere ait etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, dört farklı yaprak gübresi spreyleme yolu ile yapraklara uygulanmıştır. Çalışmada en yüksek polifenol ve orto-difenol ve oleuropein içeriğine Nisan ayında ulaşıldığı, değerlerin Ağustos ayında azaldıktan sonra, Kasım ayında tekrar arttığı saptanmıştır. Ayrıca yaprak gübresi kullanımı ile flavonoid miktarının olumsuz olarak etkilendiği belirtilmiştir (Abdeljelil ve ark. 2017).

MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada, materyal olarak Marmara bölgesinde oldukça yaygın olarak yetiştirilen Gemlik çeşidine ait zeytin yaprakları kullanılmıştır. Bursa iline bağlı Mudanya ve (Şekil 3.1) ve Gemlik (Şekil 3.2) ilçelerinden seçilen 2'şer zeytin ağacının yaprakları 2014 Nisan-Aralık ayları süresince her ay, elle ağacın her bölgesinden toplanmış, karıştırılarak homojen özellik kazandırılan yaprak örnekleri polietilen buzdolabı poşetlerine konulmuştur. Bekletilmeden laboratuvara ulaştırılan örnekler, analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (-18 °C) de muhafaza edilmiştir. Hasat ayları süresince seçilen zeytin ağaçlarına ilaçlama yapılmamıştır.



Şekil 3.1. Mudanya yöresindeki bahçeden seçilen zeytin ağaçları



Şekil 3.2. Gemlik yöresindeki bahçeden seçilen zeytin ağaçları

Fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu, tüm örnekler toplandıktan sonra gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ekstraktların toplam antioksidan aktiviteleri DPPH yöntemi ile, toplam fenolik madde miktarları Folin Ciocalteu yöntemiyle spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Fenolik bileşiklerin analizi ise LC-MS/MS ile gerçekleştirilmiştir.

Analizlerde kullanılan Oleuropein, Hidroksitirazol Extrasynthese (Genay, France)'den; DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Troloks (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), Folin & Ciocalteu's fenol reaktifi, p-Kumarik asit, Tirozol, Kafeik asit Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)'den; HPLC saflıktaki metanol Merck (Darmstadt, Germany)' den temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Zeytin Yaprağı Örneklerinden Fenolik Bileşiklerin Ekstraksiyonu

Zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu Morsy ve Abdel-Aziz (2014)'in belirttikleri yöntemde, bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için derin dondurucuda muhafaza edilen örnekler ekstraksiyon öncesi buzdolabına alınarak karanlık ortamda çözünmeleri sağlanmıştır. Yapraklar üzerindeki toz vb. partiküller temizlendikten sonra elle küçük parçalara ayrılmış ve daha sonra $1,5 \pm 0,0001$ g örnek hassas terazide falcon tüplerine tartılmıştır. Tartılan örneğin üzerine 5 mL metanol/ su (80/20:v/v) ilave edilerek 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj (Nüve NF 800) edilmiştir. Süre sonunda karışım filtre kâğıdından (Whatman No 1) süzülmüştür. Filtre kağıdı üzerinde kalan kısım tekrar aynı işleme tabi tutulmuş (her bir örnek için işlem 3 kez tekrarlanmıştır) ve her seferinde üst fazlar amber renkli cam viallere alınarak bir araya toplanmıştır. Bu karışım, metanol-su fazı tamamen uzaklaştırılana kadar, azot gazı (N₂) altında tutulmuştur.

Elde edilen ekstraktlar, analiz edilinceye kadar derin dondurucuda (-18 °C)'de muhafaza edilmiştir. Analiz öncesi derin dondurucudan çıkarılan her bir örnek, üzerine 4 mL metanol/su (80/20:v/v) karışımı eklenerek vortexde 2 dakika karıştırılmış ve ardından ultrasonik banyoda 1 dakika süre ile tutulmuştur. Kalıntının tamamen çözülmesiyle elde edilen ekstraktlar; toplam fenolik madde, fenolik bileşenlerin tayini ve antioksidan aktivite analizlerinde kullanılmıştır.

Ekstrakt verimi tahmini: Analizlerde kullanılacak olan zeytin yaprağı ekstraktlarının konsantrasyon tahmini için önceden sabit ağırlığa getirilmiş alüminyum tartım kabına 1 mL ekstrakt tartılmış ve 105 °C'ye ayarlı etüvde 24 saat tutulmuştur. Süre sonunda ekstrakt miktarı mg ekstrakt (kuru ağırlık)/mL olarak belirlenmiştir (Ekanayake ve ark. 2004). Verim tahmininden elde edilen sonuçlara göre, ekstraktlar 4 mg/mL olacak şekilde seyreltilerek fenolik madde analizlerinde kullanılmıştır.

3.2.2. Toplam Nem Miktarı Tayini

Etüvde sabit ağırlığa getirilmiş kurutma kaplarına zeytin yaprağı örneklerinden yaklaşık $5 \pm 0,0001$ g tartılmıştır. Zeytin yaprağı örnekleri, 105 °C'lik etüvde sabit ağırlığa gelene kadar kurutulduktan sonra desikatöre alınmış ve oda sıcaklığına geldiğinde tartım yapılmıştır. Ağırlık kaybından yararlanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda zeytin yapraklarının nem miktarı g/100g olarak belirlenmiştir (Uylaşer ve Başoğlu 2011).

3.2.3. Renk Analizi

Zeytin yaprağı örneklerinde renk analizi (L^* , a^* ve b^* değerleri) renk ölçüm cihazı (MSEZ-4500L, HunterLab, Virjinya, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Örneklerin renk ölçümlerine geçilmeden önce standart beyaz ve siyah plaka ile cihaz kalibrasyonu yapılmıştır. CIE (Uluslararası Aydınlatma Komisyonu) Renk Değerleri (L^* , a^* , b^*)'nden oluşan üçlü skalada $L^*=100$ beyaz, $L^*=0$ siyah; pozitif (+) a^* kırmızı, negatif (-) a^* yeşil; pozitif (+) b^* sarı ve negatif (-) b^* mavi olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini

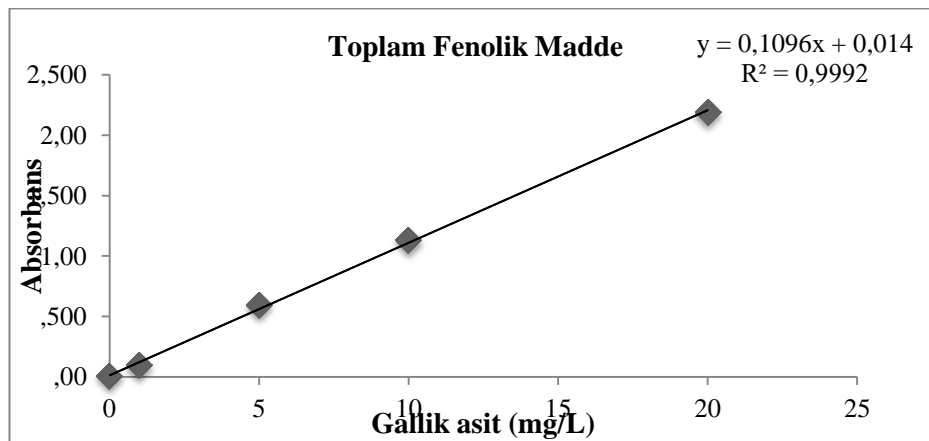
Zeytin yaprağı örneklerinin 3.2.1'de verilen yöntemle göre elde edilen ekstraktlarında toplam fenolik madde miktarı analizi Folin Ciocalteu yöntemi (Gutfinger 1981) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde standart olarak gallik asit kullanılmıştır.

Gallik asit kalibrasyon standartlarının hazırlanması: İlk olarak ana stok çözelti (100 mg/L) hazırlanmıştır. Bunun için 10 mg gallik asit standardı 100 mL hacimli bir balon joje içerisine tartılmış ve saf su ile çizgisine tamamlanmıştır. Hazırlanmış olan ana stok çözeltiden de uygun seyreltme işlemleri yapılarak 0 mg/L, 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L konsantrasyonlarında kalibrasyon standartları hazırlanmıştır.

Zeytin yaprağı ekstraktları analiz öncesi 4 mg/mL konsantrasyonunda olacak şekilde metanol/su (80/20:v/v) ile seyreltilmiştir. Seyreltilmiş olan zeytin yaprağı ekstraktından 1 mL alınmış ve üzerine 0,5 mL Folin Ciocalteu reaktifi ilave edilerek karıştırılmıştır. 3 dakika bekletildikten sonra 1 mL % 35'lik doymuş sodyum karbonat çözeltisi ilave edilmiş ve hacim saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışım 90 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildikten sonra oluşabilecek bulanıklığın tamamen giderilmesi için 3000 rpm de 5 dakika santrifüj (Nüve NF 800) edilmiştir. 3.2.4'de belirtildiği şekilde hazırlanan gallik asit kalibrasyon standartlarına da zeytin yaprağı ekstraktlarına uygulanan analiz aşamaları uygulanmıştır. Süre sonunda kalibrasyon çözeltileri ve ekstraktlarda oluşan berrak mavi rengin absorbans değerleri UV spektrofotometre (Varian Cary 500) ile 725 nm'de kör örneğe karşı okunmuştur. Kör örnek de ise ekstrakt yerine 1 mL metanol/ su (80/20:v/v) kullanılmıştır.

Gallik asit kalibrasyon çözeltilerinin spektrofotometredeki okumaları sonucu gallik asit konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerlerinden kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.3) oluşturulmuştur. Sonuçlar ise elde edilen eğrinin regresyon eşitliğinden yararlanılarak hesaplanmış ve seyreltme oranları dikkate alınarak mg GAE (Gallik Asit Eşdeğeri)/100 g örnek olarak verilmiştir.

$$\text{Absorbans} = \text{Eğim} \times \text{Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg GAE/100g)} \quad (R^2 = 0.999)$$



Şekil 3.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde kullanılan gallik asit kalibrasyon eğrisi

3.2.5. Fenolik Bileşiklerin Tayini

Zeytin yaprağı örneklerinden elde edilen ekstraktlarda fenolik madde bileşimi tayini kalitatif ve kantitatif olarak LC-MS/MS cihazı ile Toth ve ark. (2015)' in belirttikleri yöntemde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir.

Fenolik madde bileşiklerinin tayininde standart olarak hidrokortizol, tirozol, kafeik Asit, p-kumarik Asit ve oleuropein kullanılmıştır.

Stok standart çözeltilerin hazırlanması : Fenolik bileşiklerin ana stok standart çözeltilerinin hazırlanması için her bir fenolik bileşikten 10 mg \pm 0,0001 g ayrı ayrı cam vial içerisine tartılmış ve 1 mL metanol içerisinde çözüldükten sonra önce vortekste karıştırılmış, ardından ultrasonik banyoda 1 dakika tutulmuştur.

Kalibrasyon standartlarının hazırlanması: Kalibrasyon standartlarının hazırlanması için önce, konsantrasyonu 10 000 mg/L olan her bir fenolik bileşiğin ana stok çözeltisinden vial içerisine 0,1 mL alınmış ve metanolla 1 mL hacime tamamlanmıştır. İçerik önce vortekste karıştırılarak çözülmüş ve ardından ultrasonik banyoda 1 dakika tutulmuştur. Böylece 1000 mg/L'lik ara stok çözeltinin hazırlanmıştır. Hazırlanan ara stok çözeltiden de uygun seyreltme işlemleri yapılarak 1 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L konsantrasyonlarındaki kalibrasyon standartları cam vialler içerisine hazırlanmıştır.

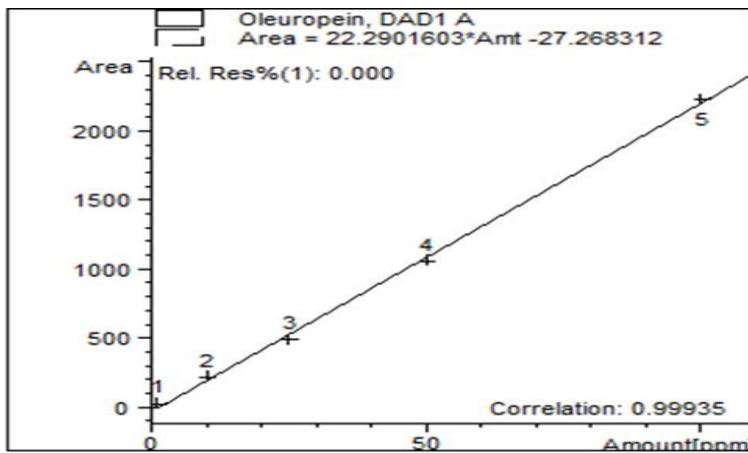
Analiz koşulları : Örneklerin fenolik bileşiklerinin tayininde Agilent 1100 serisi LC-MSD Ion Trap sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. 3.2.1'de belirtildiği şekilde hazırlanan tüm zeytin yaprağı ekstraktları 4 mg/mL olacak şekilde saf su ile seyreltilmiş ve sonra 0,45 μ m membran filtreden geçirilerek cam viallere alınmıştır. Örneklerin analizine başlanmadan önce Agilent ESI Tune çözeltisi ile cihazın MS kısmının kütle ayarları kontrol edilmiştir. Her bir fenolik bileşenin doğru molekül kütlesinin tanımlanabilmesi için standart fenolik bileşikler sisteme tek tek tanıtılarak MS/MS kısmında iyonlar ve parçalanma ürünleri tespit edilmiştir. Çizelge 3.1'de LC/MS/MS

cihazında analiz edilen fenolik bileşiklerin alıkonma zamanları, MW (m/z) molekül ağılıkları, $[M-H]^-$ (m/z) molekül iyonları ve ana parçalanma iyonları verilmiştir.

Çizelge 3.1. Fenolik bileşiklerin MS/MS sisteminde iyonları ve parçalanma ürünleri

Fenolik Bileşik	Alıkonma zamanı	MW (m/z)	$[M-H]^-$ (m/z)	Parçalanma iyonu
Hidroksitirazol	6.0	154	153	123
Tirozol	7.0	138	137	-
Kafeik asit	7.8	180	179	135
p-kumarik asit	8.4	164	163	119
Oleuropein	9.0	540	539	275,307, 377

Sistem analize hazır hale geldiğinde kalibrasyon için hazırlanan standartlar okutulurak, her bir fenolik bileşik için HPLC-DAD ve MS/MS sistemlerinde ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. HPLC-DAD ile yapılan analizlerdeki hesaplamalarda, oleuropein için maksimum absorpsiyon gösterdiği 240 nm'de (Şekil 3.4), diğer fenolik bileşikler için ise 280 nm'de oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden yararlanılmıştır. Dataların analizi Chemstation yazılımı kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 3.4. Oleuropein standardına ait kalibrasyon eğrisi (HPLC-DAD, $\lambda=240$ nm)

Fenolik bileşiklerin tayininde kullanılan LC-MS/MS cihazının HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) sistemi için, akış profili Çizelge 3.2’de, analiz koşulları ise Çizelge 3.3’de verilmiştir. Fenolik bileşiklerin tayininde cihazın MS (kütle spektroskopisi) sistemi için analiz koşulları da Çizelge 3.4’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. HPLC sistemi için akış profili

Zaman	Akış (mL/dakika)	A: Asetik asit/ su (98/2:v/v)	B: Metanol
0. dakika	0,4	% 95	% 5
1. dakika	0,4	% 95	% 5
8. dakika	0,4	% 10	% 90
10. dakika	0,4	% 10	% 90
11.dakika	0,4	% 95	% 5

Çizelge 3.3. Fenolik bileşiklerin tayininde HPLC sistemi için analiz koşulları

HPLC Analiz Koşulları	
Kolon	Ters faz C18 kolon (4.6 ×50 mm, 1.8 µm)
Kolon Fırın Sıcaklığı	25 °C
Dedektör	DAD (Diyot Dizi Dedektör)
Dedektör Dalga Boyu	240 nm, 280 nm
Mobil Faz	A: % 0,2’lik asetik asit , B: metanol (Mobil fazlar hazırlandıktan sonra ultrasonik su banyosunda 15 dakika degaze edilmiştir.)
Mobil Faz Akış Hızı	0,4 mL /dakika
Enjeksiyon Hacmi	5 mikrolitre
Analiz Süresi	15 dakika

Çizelge 3.4. Fenolik bileşiklerin tayininde MS sistemi için analiz koşulları

MS Sistemi Analiz Koşulları	
İyon Kaynağı	ESI (Elektrosprey İyonizasyon)
İyonlaşma modu	Negatif
Tarama modu	MRM (Çoklu Reaksiyon Görüntüleme)
Gaz sıcaklığı	325 °C
Gaz akış hızı	12 mL/dakika
Nebülizer basıncı	45.0 psi
Kapiler voltajı	3500 v

3.2.6. Antioksidan Aktivite Tayini

Zeytin yaprağı örneklerinin 3.2.1’de verilen yönteme göre elde edilen ekstraktlarının sahip olduğu antioksidan aktivite değeri DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak, spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Boskou ve ark. 2006). Bu amaçla 0,1 mL zeytin yaprağı ekstraktı üzerine 3,9 mL DPPH (6×10^{-5} M) çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırılmış ve absorbansın sabitlenmesi için 30 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Süre sonunda absorbans değerleri UV spektrofotometre (Varian Cary 500) ile 517 nm’de ölçülmüştür.

DPPH çözeltisinin hazırlanması: 0,0394 g DPPH radikali amber renkli balon jöjeye tartılıp bir miktar metanolde çözüldükten sonra 100 mL’ye metanol ile tamamlanmıştır (Ana stok DPPH (1mM) çözeltisi). Analizlerde kullanılacak 6×10^{-5} M DPPH çözeltisini hazırlamak için de, ana stok çözeltiden 6 mL alınarak 100 mL’ye metanolle tamamlanmıştır.

Spektrofotometredeki okumalardan elde edilen absorbanst ölçüm sonuçlarından antioksidan aktivite değerleri % olarak hesaplanmıştır. Kr rnek olarak 0,1 mL ekstrakt yerine aynı hacimde saf metanol kullanılmıştır.

$$\% \text{ Antioksidan Aktivite} = \frac{\text{Kr rneğin absorbanst} - \text{örneğin absorbanst}}{\text{Kr rneğin absorbanst}} \times 100$$

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Zeytin yaprağı örneklerine ait verilerin hasat zamanı ve yöre farklılıkları bakımından değerlendirilmesine yönelik istatistiksel analizler Minitab 17 paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır ve analiz sonuçları ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Elde edilen ortalamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde $p < 0,05$ düzeyinde Tukey's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

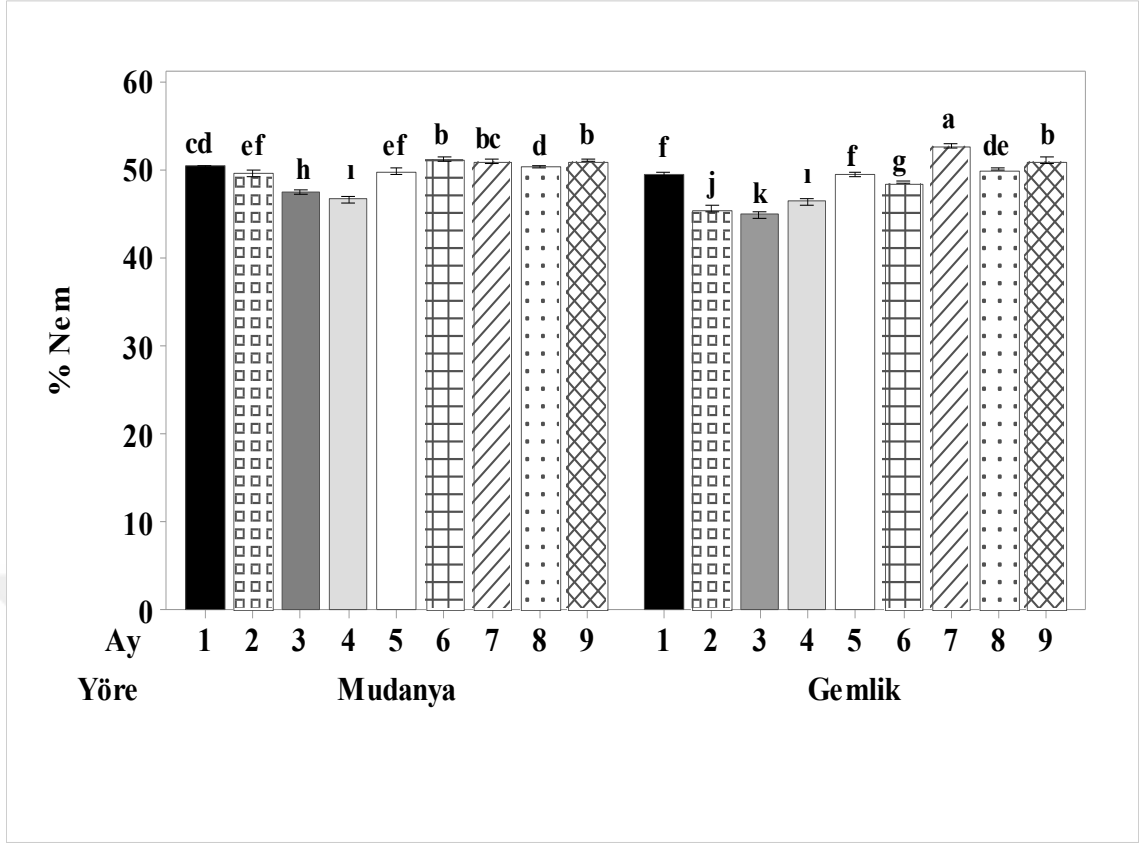
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Toplam Nem Miktarlarına Ait Analiz Sonuçları ve Tartışma

Mudanya ve Gemlik yörelerinden farklı zamanlarda hasat edilen Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin toplam nem miktarlarına ait sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelge 4.1’den de izlenebileceği gibi, Mudanya yöresine ait zeytin yapraklarında nem miktarları % 46,66-51,27 arasında değişirken, Gemlik yöresinde % 44,89-52,74 arasında değişmiştir. Zeytin yapraklarının nem miktarında mevsimsel değişiklikler görülmüştür ve en yüksek nem miktarının, Mudanya yöresinde Eylül ayı, Gemlik yöresinde ise Ekim ayı örneklerinde olduğu tespit edilmiştir. En düşük nem miktarının Mudanya yöresinde Temmuz, Gemlik yöresinde ise Haziran ayı örneklerinde olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerine ait nem miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna ait Tukey testi sonuçları Şekil 4.1’de görülmektedir. Yaprakların nem miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre farklılıklar istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.1. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin toplam nem miktarları (%)

Zaman (Ay)	Yöre		Ortalama \pm Sd
	Mudanya (%)	Gemlik (%)	
(1) Nisan	50,45 \pm 0,13	49,47 \pm 0,21	49,96 \pm 0,70
(2) Mayıs	49,61 \pm 0,40	45,60 \pm 0,34	47,61 \pm 2,84
(3) Haziran	47,39 \pm 0,22	44,89 \pm 0,27	46,52 \pm 1,77
(4) Temmuz	46,66 \pm 0,31	46,39 \pm 0,37	46,14 \pm 0,19
(5) Ağustos	49,78 \pm 0,37	49,51 \pm 0,28	49,64 \pm 0,19
(6) Eylül	51,27 \pm 0,18	48,56 \pm 0,08	49,92 \pm 1,92
(7) Ekim	50,95 \pm 0,17	52,74 \pm 0,23	51,85 \pm 1,27
(8) Kasım	50,38 \pm 0,16	50,09 \pm 0,12	50,24 \pm 0,21
(9) Aralık	51,08 \pm 0,13	51,01 \pm 0,36	51,04 \pm 0,05
Ortalama \pm Sd	49,73 \pm 1,57	48,70 \pm 2,47	



Şekil 4.1. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yapraklarının nem miktarları. Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Saygın (2009) tarafından Ege bölgesinde yetişen zeytin yaprakları üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının nem miktarının % 48,94-50,33 arasında değiştiği ve en yüksek nem miktarının da Eylül ayında görüldüğü

tespit edilmiştir. Durak (2016) tarafından Marmara Bölgesi'nde Edremit'te yetişen Memecik, Ayvalık ve Domat çeşidi zeytin yapraklarında gerçekleştirilen çalışmada ise nem değerlerinin her çeşitte en yüksek Eylül ayında olduğu ve % 49,83-51,89 aralığında değiştiği saptanmıştır. Çizelge 4.1 incelendiğinde Mudanya yöresinden temin edilen Gemlik çeşidi zeytin yapraklarında en yüksek nem içeriğinin Eylül ayında olduğu ve Eylül ayındaki nem miktarlarının yörelere göre % 48,56 ve % 51,27 olarak tespit edildiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre çalışmamızda elde edilen değerler ile diğer araştırmacıların değerleri arasında benzerlik olduğu görülmektedir.

4.2. Renk Analizi Sonuçları ve Tartışma

Zeytin yaprağı örneklerinin (MSEZ-4500L, HunterLab, Virjinya, ABD) renk cihazı ile yapılan ölçümler sonucunda L*, a* ve b* değerlerine ait veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir. Her bir uygulama için 6 farklı yaprak yüzeyinin ölçümünün aritmetik ortalaması alınmıştır. Çizelgeden de görüleceği üzere, Mudanya yöresine ait yaprakların ortalama L* değeri 32,51, a* değeri -1,26 ve b* değeri 8,94; Gemlik yöresine ait yaprakların ortalama L* değeri 32,75, a* değeri -1,13 ve b* değeri 9,10 olarak tespit edilmiştir.

Bahloul ve ark. (2009) Tunus'da yetişen zeytin yapraklarının renk değerlerini incelemişler ve taze yapraklarda L* değerlerinin (29,793-35,027), a* değerlerinin negatif olarak (9,143-5,013) ve b* değerlerinin (6,243-11,370) arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızın materyalini oluşturan taze zeytin yapraklarının L* değerlerinin (29,96-35,71), a* değerlerinin negatif (1,64-0,68) ve b* değerlerinin (6,66-11,27) arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.2). Çalışmamızdaki Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin L* (parlaklık) ve b* (sarılık) değerlerinin bu çalışma ile benzer değerlerde olduğu, yapraklarda yeşil rengin göstergesi olan negatif a* değerlerinin ise daha düşük değerlerde olduğu görülmüştür. Tarımsal ürünlerin renk parametrelerinin çeşit ve bitkilerin yapısında bulunan pigmentlere göre değişebileceği bildirilmiştir (Bahloul ve ark. 2009).

Zeytin yapraklarının L* ve b* değerleri için yöre farklılıklarının etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmazken, zaman farklılıklarının etkisi ($p < 0,05$) düzeyinde önemli bulunmuştur. Yaprakların negatif a* (yeşillik) değerleri için de yöre ve zaman farklılıkları istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerinin L*, a*, b* değerleri

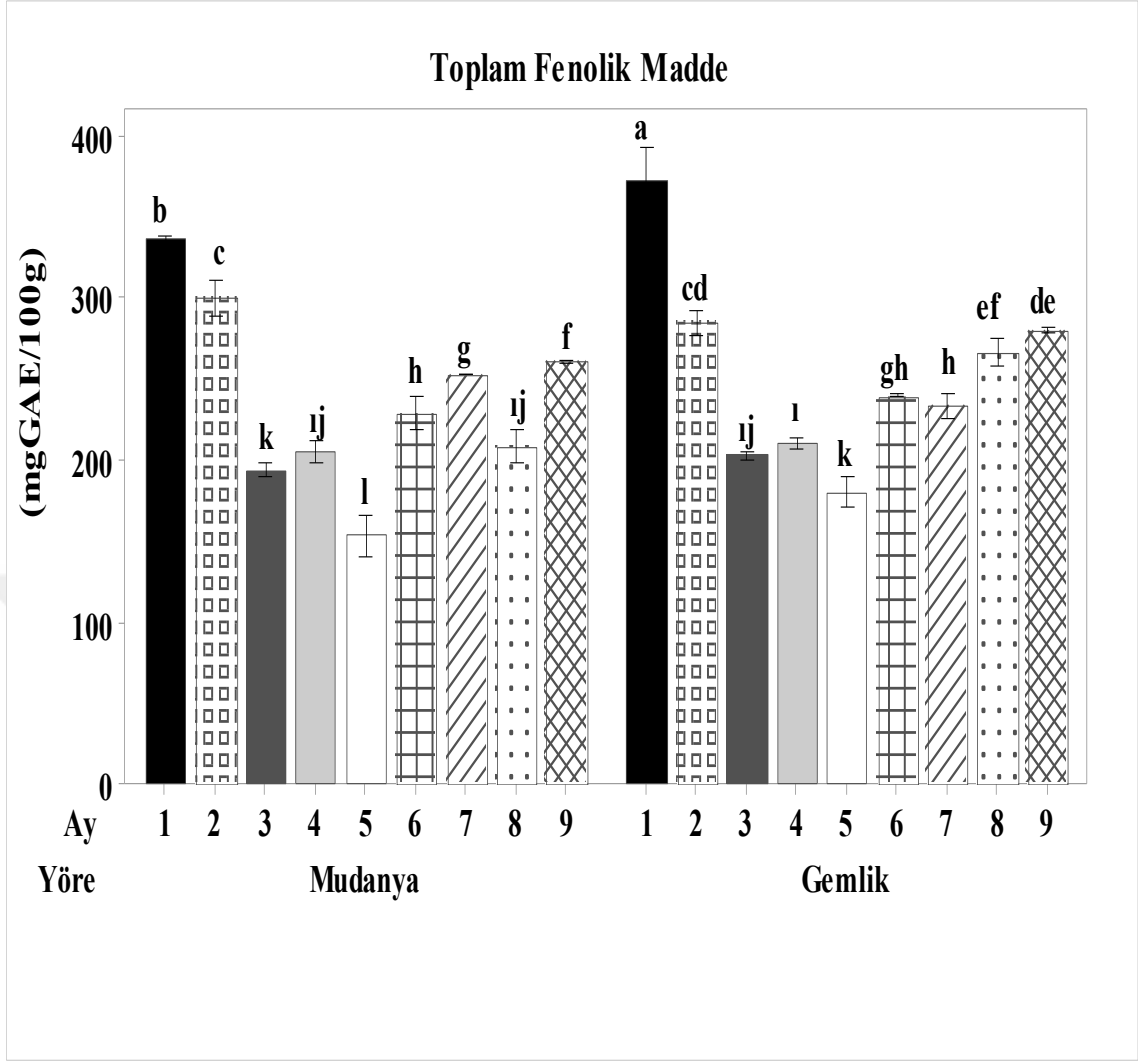
Zaman (Ay)	L*		a*		b*	
	Mudanya	Gemlik	Mudanya	Gemlik	Mudanya	Gemlik
(1) Nisan	29,96 ± 1,56	30,80 ± 1,01	-1,05 ± 0,23	-0,68 ± 0,15	10,60 ± 1,07	10,14 ± 1,37
(2) Mayıs	31,93 ± 1,83	30,35 ± 1,84	-1,06 ± 0,52	-0,72 ± 0,26	9,33 ± 3,39	11,27 ± 1,09
(3) Haziran	31,56 ± 2,88	31,56 ± 2,88	-1,59 ± 0,24	-1,33 ± 0,34	9,77 ± 0,80	6,66 ± 0,57
(4) Temmuz	33,74 ± 1,90	32,60 ± 1,81	-1,42 ± 0,28	-1,64 ± 0,19	8,08 ± 1,85	7,10 ± 0,44
(5) Ağustos	30,44 ± 1,02	34,34 ± 1,10	-1,56 ± 0,23	-1,37 ± 0,23	8,46 ± 1,50	9,08 ± 1,76
(6) Eylül	32,16 ± 1,70	34,60 ± 1,80	-1,19 ± 0,28	-1,45 ± 0,17	8,39 ± 1,08	9,04 ± 0,74
(7) Ekim	35,01 ± 2,20	35,71 ± 1,88	-1,52 ± 0,18	-1,08 ± 0,17	8,03 ± 1,99	10,31 ± 1,13
(8) Kasım	33,05 ± 1,35	31,58 ± 0,86	-1,20 ± 0,18	-0,93 ± 0,22	8,92 ± 1,71	9,41 ± 0,83
(9) Aralık	31,81 ± 1,46	33,45 ± 2,06	-0,75 ± 0,02	-0,94 ± 0,24	8,89 ± 0,78	8,67 ± 0,35
Ortalama	32,51 ^a	32,75 ^a	-1,26 ^a	-1,13 ^b	8,94 ^a	9,10 ^a

4.3. Toplam Fenolik Madde Miktarlarına Ait Analiz Sonuçları ve Tartışma

Zeytin yaprakları örnekleri ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları GAE (Gallik Asit Eşdeğeri) cinsinden hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelgeden de görülebileceği gibi Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarları 154,11-373,36 mg GAE/100 g arasında değişmiştir. En yüksek fenolik madde içeriğinin her iki yöre için de Nisan ayı, en düşük fenolik madde miktarının ise Ağustos ayı örneklerinde olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların toplam fenolik madde miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.2'de görülmektedir. Yaprakların toplam fenolik madde miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre farklılıklar istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örnekleri ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/100 g)

Zaman (Ay)	Yöre		Ortalama \pm Sd
	Mudanya	Gemlik	
(1) Nisan	336,70 \pm 2,55	373,36 \pm 18,90	355,03 \pm 23,06
(2) Mayıs	300,97 \pm 10,11	285,28 \pm 7,08	293,13 \pm 11,68
(3) Haziran	194,53 \pm 4,38	203,50 \pm 3,03	199,01 \pm 5,90
(4) Temmuz	206,57 \pm 6,56	211,43 \pm 3,22	209,00 \pm 5,54
(5) Ağustos	154,11 \pm 12,57	180,22 \pm 8,95	167,16 \pm 17,15
(6) Eylül	229,83 \pm 10,20	240,12 \pm 0,89	234,98 \pm 8,75
(7) Ekim	253,59 \pm 0,09	234,44 \pm 7,27	244,01 \pm 11,14
(8) Kasım	209,82 \pm 9,99	267,69 \pm 8,01	238,76 \pm 31,43
(9) Aralık	261,44 \pm 0,46	281,36 \pm 1,88	271,40 \pm 10,49
Ortalama \pm Sd	238,62 \pm 53,96	253,04 \pm 55,35	



Şekil 4.2. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarları (mg GAE/100 g). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).

Harp (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Akdeniz bölgesinde yetişen Gemlik çeşidi kurutulmuş zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarlarının Eylül-Aralık ayları arasında kafeik asit eşdeğeri olarak 362,5-505,7 mg/100g aralığında değiştiği ve en yüksek değer Aralık ayına ait olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda Eylül-Aralık ayları arasında hasat edilen yapraklarda en yüksek toplam fenolik madde içeriğinin her iki yöre için de Aralık ayına ait olması bu çalışma ile benzerlik göstermektedir. Kocatürk (2014) tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise Marmara bölgesinden hasat edilip kurutulmuş ve farklı dozlarda gama ışını uygulanmış

Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının toplam fenolik madde miktarının 21,65-23,7 mg GAE/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Khaliq ve ark. (2015), Pakistan’da yetiştirilen Gemlik çeşidi zeytin ağacı kurutulmuş yapraklarının fenolik madde miktarının 161 ± 2 mg GAE/g olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen bulgular ve konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda elde edilen, zeytin yapraklarının fenolik madde miktarlarına ait bulgular arasında önemli farklılıklar görülmektedir. Bilindiği üzere yaprakların kimyasal bileşimini orijin, depolama koşulları, iklim koşulları, nem gibi faktörler etkileyebilmektedir (Ozcan ve Matthaus 2017). Ayrıca ekstraksiyon yöntemi ve koşullarındaki farklılıklar da fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimi üzerine etkili olabilmektedir (Abaza ve ark. 2011). Çalışmamız ve diğer çalışmalar arasındaki bu farklılığın, ekstraksiyon sırasında çözücüye geçebilen fenolik madde miktarı ile ilişkili olduğu söylenebilir. Ayrıca bu durum üzerine iklimsel farklılıkların da önemli etkisinin olduğu düşünülmektedir.

Çetinkaya ve Kulak (2016), Şubat-Aralık ayları arasında hasat edilen zeytin yaprakları ile yaptıkları çalışmalarında en yüksek toplam fenolik madde miktarının sırasıyla Şubat ve Nisan ayında olduğunu saptamışlardır. Mitsopoulos ve ark. (2016), farklı çeşitlere ait zeytin yapraklarının çoğunda en yüksek toplam fenolik madde miktarının Nisan ayında olduğunu tespit etmişlerdir. Abdeljelil ve ark. (2017) da, Chemlali çeşidi zeytin yapraklarının polifenol miktarının Nisan ayında maksimum seviyeye ulaştığını, Ağustos ayında en düşük seviyeye düştüğünü ve ardından Kasım ayına kadar tekrar yükseldiğini saptamışlardır. Doğançay (2013) tarafından gerçekleştirilen çalışmada ise Kilis’te yetiştirilen sulanan ve sulanmayan Gemlik çeşidi zeytin ağacı yapraklarının her iki durum içinde en düşük toplam fenolik madde içeriğine Ağustos ayında sahip olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.2 incelendiğinde çalışmamızda kullanılan Gemlik çeşidi zeytin yapraklarında bulunan toplam fenolik madde miktarının Nisan ayından yaz dönemine kadar önce azaldığı, Ağustos ayından sonra Aralık ayına kadar tekrar arttığı görülmektedir. Çalışmamızda fenolik madde miktarının en yüksek (Nisan) ve en düşük (Ağustos) miktarlara sahip olduğu periyodların konu ile ilgili yapılan diğer çalışmalar ile aynı olması, iklimsel koşullar arasında da belirgin bir farklılığın olmadığını düşündürmektedir.

4.4. Fenolik Bileşiklerin LC-MS/MS ile Belirlenmesine Ait Sonuçlar ve Tartışma

Zeytin yaprakları ekstraktlarının fenolik madde miktarlarının belirlenmesi için 3.2.5' de belirtilen şekilde hazırlanan standart çözeltiler LC/MS/MS cihazında 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir. Analizler sonucu her bir fenolik bileşik için konsantrasyonlara karşılık gelen alanlar yardımıyla kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve eğri denklemleri Chemstation yazılımı tarafından otomatik olarak hesaplatılmıştır. Çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı kontrol edilmiş ve korelasyon katsayısının her bileşik için $r^2 > 0,99$ olduğu görülmüştür. Yöntemin doğru sonuç verdiği çalışma aralığının tespiti için Tayin Limiti (LOD) ve Tespit Limiti (LOQ) hesaplanmıştır. Her bir fenolik bileşen için en düşük konsantrasyondaki kalibrasyon standardı 10 kez okutulmuş ve okumaların standart sapmaları hesaplanmıştır. Tayin limiti (LOD), standart sapmanın 3 katı ile, Tespit limiti (LOQ) ise 10 katı ile çarpılarak bulunmuştur.

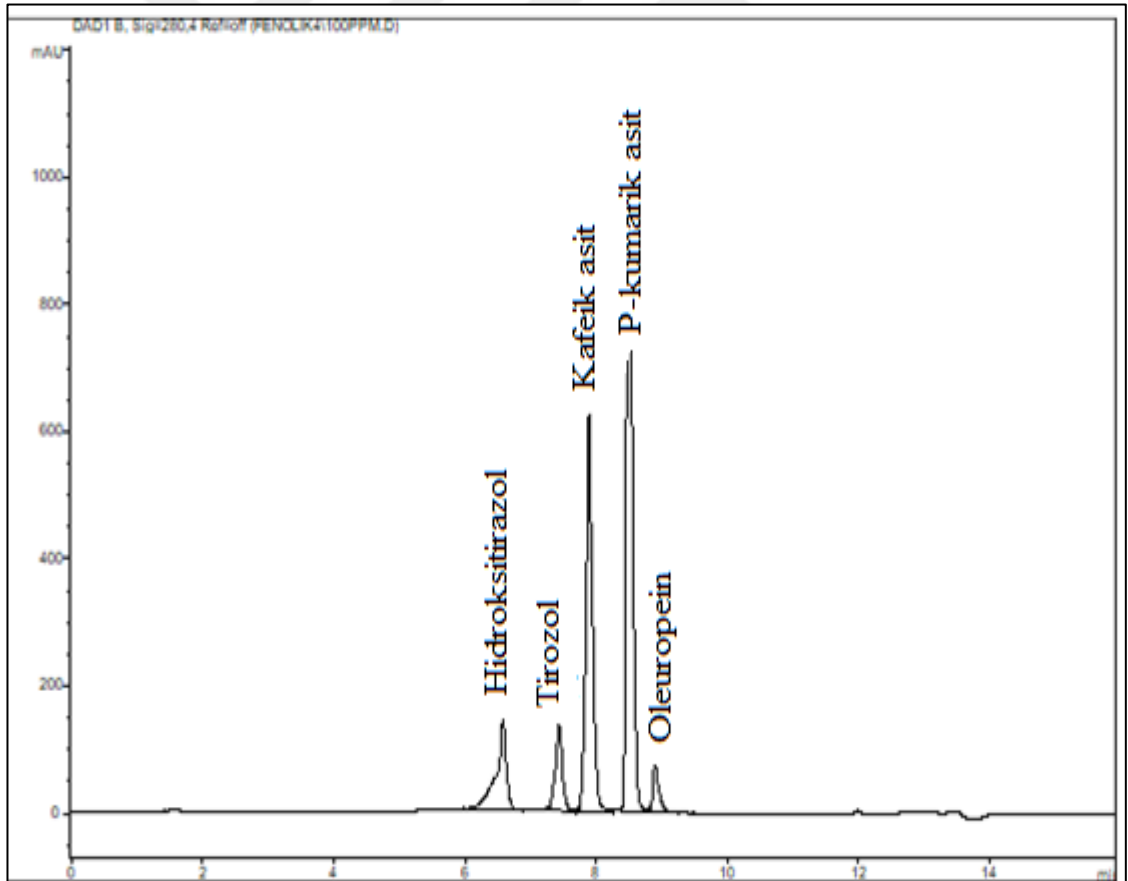
Fenolik bileşenlerin tayini için oluşturulan HPLC yönteminin analitik parametrelerine ilişkin veriler Çizelge 4.4'te, MS/MS yönteminin analitik parametrelerine ilişkin veriler ise Çizelge 4.5'te görülmektedir. 5 fenolik madde standart karışımının HPLC analiz sonucuna ait kromatogram Şekil 4.3 te, MS sistemi analiz sonucuna ait kromatogram Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4. HPLC yönteminin analitik parametreleri

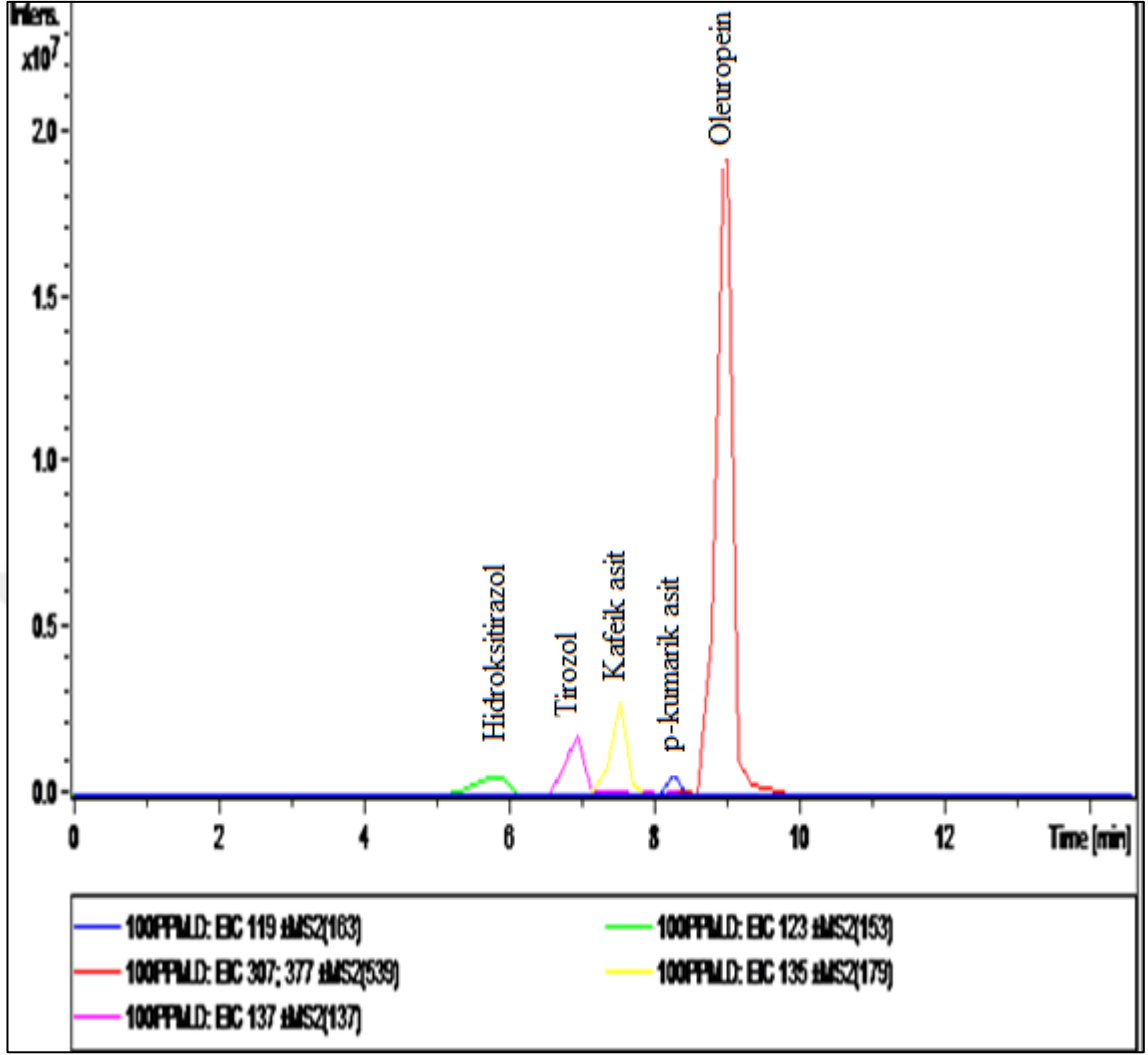
Fenolik Madde	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Çalışma Aralığı (mg/L)	Kalibrasyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (r^2)
Hidroksitirazol	0,10	0,34	LOQ-100	$Y = 17.39 * x - 61.86$	0.9980
Tirozol	0,31	1,04	LOQ-100	$Y = 10.88 * x - 12.07$	0.9997
Kafeik asit	0,22	0,75	LOQ-100	$Y = 32.25 * x - 32.28$	0.9995
p-kumarik asit	0,30	0,99	LOQ-100	$Y = 86.11 * x - 66.88$	0.9995
Oleuropein	0,31	1,04	LOQ-100	$Y = 22.90 * x - 27.27$	0.9993

Çizelge 4.5. MS/MS yönteminin analitik parametreleri

Fenolik Madde	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Çalışma Aralığı (mg/L)	Kalibrasyon Denklemi	Korelasyon Katsayısı (r ²)
Hidroksitirazol	0,27	0,90	LOQ-100	$Y = 2,99E^{+05}x + 2,57E^{+05}$	0.9954
Tirozol	0,15	0,50	LOQ-100	$Y = 2,13E^{+05}x + 8,03E^{+05}$	0.9969
Kafeik asit	0,18	0,59	LOQ-100	$Y = 9,19E^{+05}x + 3,80E^{+06}$	0.9926
p-kumarik asit	0,16	0,55	LOQ-100	$Y = 2,16E^{+05}x + 1,83E^{+05}$	0.9986
Oleuropein	0,30	0,99	LOQ-100	$Y = 1,72E^{+07}x + 2,36E^{+07}$	0.9979



Şekil 4.3. Fenolik madde standart karışımına ait kromatogram (HPLC-DAD)



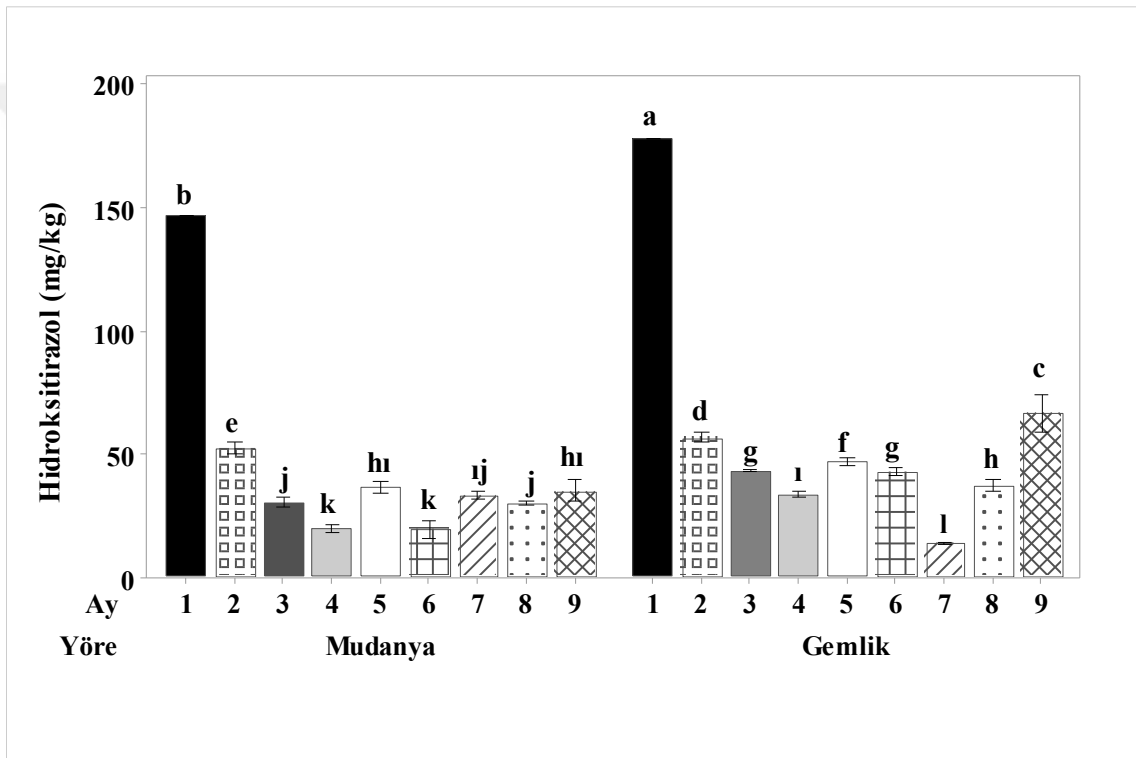
Şekil 4.4. Fenolik madde standart karışımına ait kromatogram (MS/MS sistemi)

Gemlik çeşidi zeytin yaprakları örnekleri ekstraktlarının fenolik bileşiklerine ait sonuçlar mg/kg olarak hesaplanmış ve Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örneklerine ait ekstraktların fenolik bileşikleri (mg/kg)

Yöre	Zaman (Ay)	Hidroksitirazol	Tirozol	Kafeik asit	p-kumarik asit	Oleuropein
Mudanya	(1) Nisan	147,21 ± 0,02	6,97 ± 0,32	4,79 ± 0,21	5,04 ± 0,11	837,63 ± 6,98
	(2) Mayıs	52,20 ± 0,99	19,40 ± 0,80	T.E	8,34 ± 0,06	194,03 ± 4,10
	(3) Haziran	30,13 ± 0,80	17,27 ± 1,00	T.E	3,92 ± 0,06	114,26 ± 4,27
	(4) Temmuz	20,01 ± 0,64	7,61 ± 0,43	10,29 ± 0,22	T.E	208,32 ± 0,39
	(5) Ağustos	36,35 ± 1,00	T.E	T.E	T.E	213,16 ± 2,19
	(6) Eylül	19,38 ± 1,42	T.E	T.E	3,78 ± 0,04	193,58 ± 1,93
	(7) Ekim	33,11 ± 0,61	T.E	14,20 ± 0,63	4,80 ± 0,29	188,00 ± 1,06
	(8) Kasım	30,06 ± 0,40	T.E	14,94 ± 0,80	3,21 ± 0,15	341,61 ± 17,01
	(9) Aralık	35,13 ± 1,79	12,47 ± 0,86	14,59 ± 0,29	8,47 ± 0,40	338,20 ± 5,67
Gemlik	(1) Nisan	178,37 ± 0,05	14,30 ± 0,19	11,30 ± 0,99	5,38 ± 0,33	860,21 ± 29,01
	(2) Mayıs	56,80 ± 0,92	9,43 ± 0,35	10,53 ± 0,10	4,59 ± 0,07	229,47 ± 4,39
	(3) Haziran	43,00 ± 0,20	21,18 ± 0,17	T.E	3,33 ± 0,12	94,21 ± 5,41
	(4) Temmuz	33,58 ± 0,53	22,27 ± 0,22	13,00 ± 0,12	T.E	208,32 ± 0,39
	(5) Ağustos	46,84 ± 0,75	T.E	T.E	T.E	315,69 ± 13,80
	(6) Eylül	42,92 ± 0,64	T.E	T.E	3,56 ± 0,08	198,19 ± 13,03
	(7) Ekim	13,65 ± 0,30	T.E	11,86 ± 0,46	3,97 ± 0,08	174,03 ± 6,38
	(8) Kasım	37,25 ± 0,87	T.E	12,35 ± 0,63	3,66 ± 0,51	375,98 ± 4,52
	(9) Aralık	66,84 ± 3,07	11,62 ± 0,32	14,07 ± 0,40	11,98 ± 0,21	358,15 ± 9,38

Çizelge 4.6 incelendiğinde zeytin yaprağı ekstraktlarının hidroksitirazol miktarları 13,65-178,37 mg/kg arasında değiştiği görülmektedir. Ekstraktlardaki en yüksek hidroksitirazol miktarının her iki yöre için de Nisan ayında olduğu tespit edilmiştir. En düşük miktarın ise Mudanya yöresi için Eylül, Gemlik yöresi için Ekim ayında olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların hidroksitirazol miktarlarının yöre x zaman interaksyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.5’de görülmektedir. Şekilden de görüleceği üzere yaprakların hidroksitirazol miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre ortaya çıkan farklılıklar istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

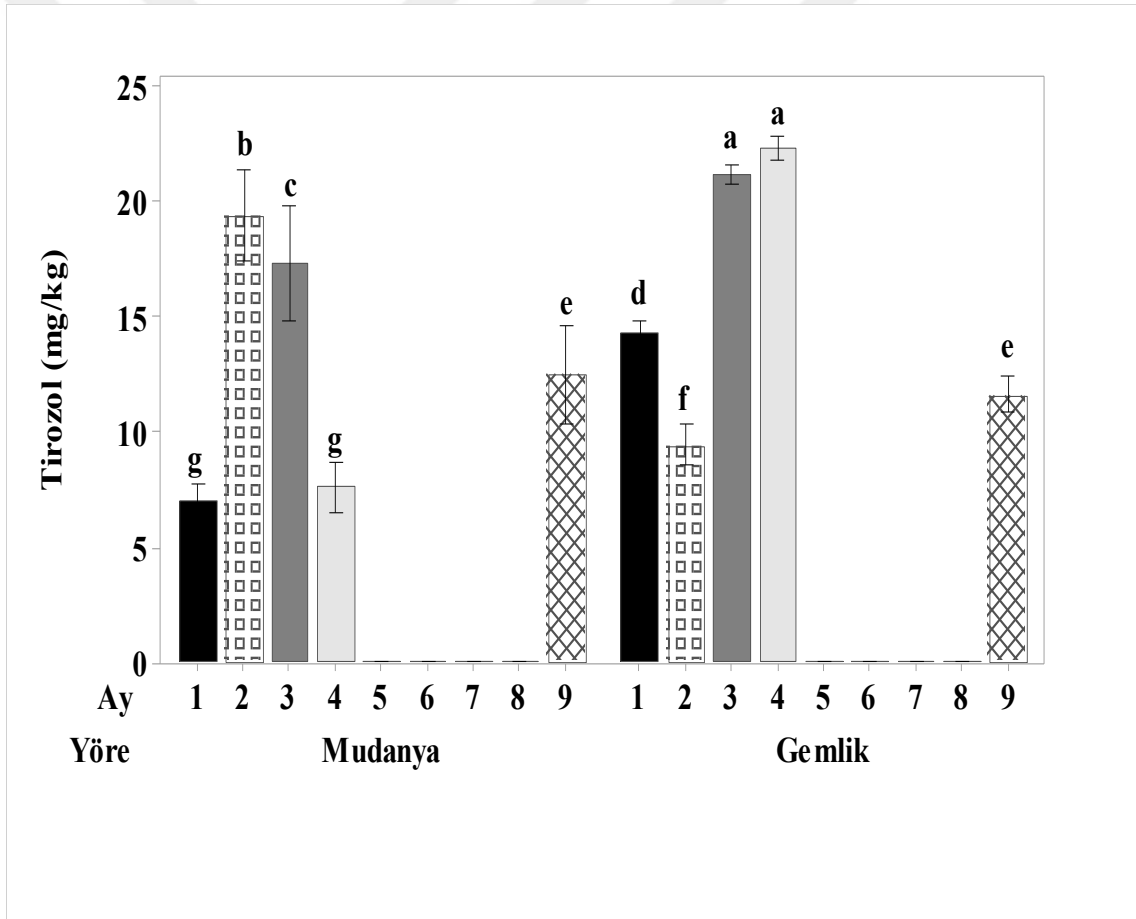


Şekil 4.5. Yöre x zaman interaksyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının hidroksitirazol miktarları (mg/kg). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, zeytin yapraklarında hidroksitirazolün sadece Nisan ayında bulunduğu, Eylül ve Aralık ayında bulunmadığı belirtilmiş (Mitsopoulos ve ark. 2016) olmasına rağmen çalışmamızda tüm aylarda hidroksitirazole rastlanılmıştır (Çizelge 4.6). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre Nisan ayındaki hidroksitirazol miktarı diğer aylardan oldukça yüksek bulunmuştur.

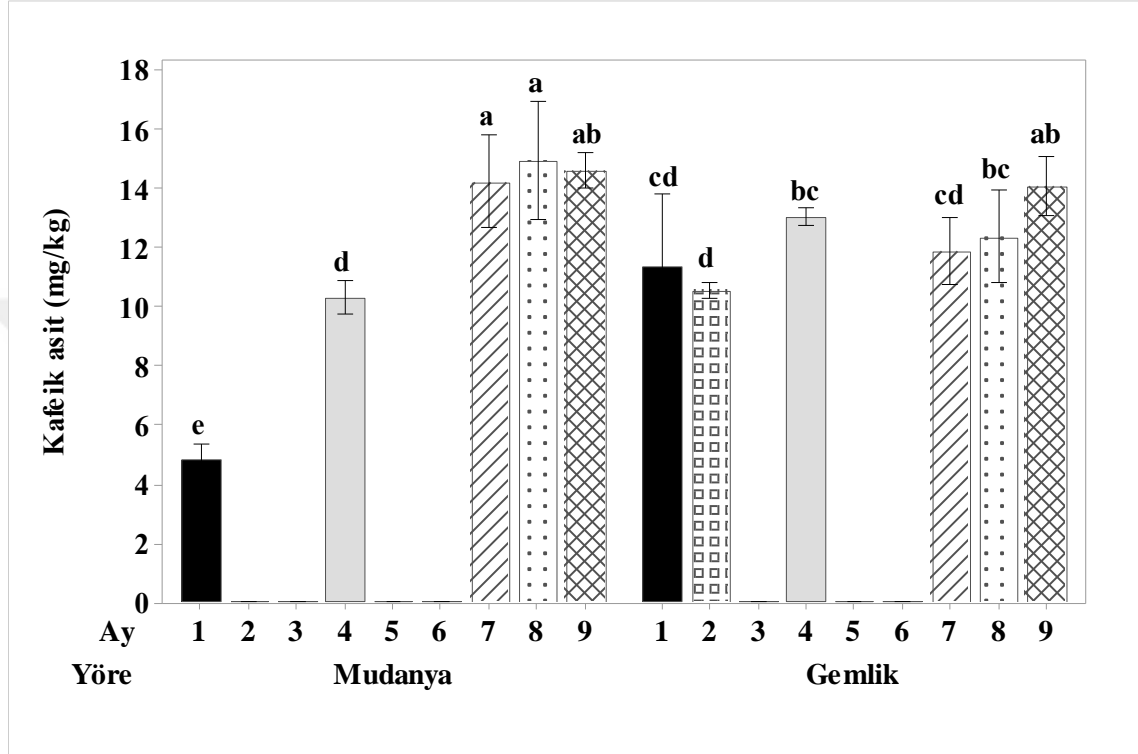
Benevante Garcia ve ark. (2000) gerçekleştirdikleri çalışmada zeytin yaprağı ekstraktlarında oleuropeinden sonra en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşimin hidrokstitirazol olduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda da ekstraktlarda oleuropeinden sonra en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşimin hidrokstitirazol olduğu tespit edilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktlarında en yüksek tirozol miktarının Mudanya yöresinde ve Aralık ayında olduğu tespit edilmiştir Mudanya ve Gemlik yöresinde Ağustos, Eylül, Ekim, Kasım aylarında tirozol tespit edilememiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.6). Ekstraktların tirozol miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının tirozol miktarları (mg/kg). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Kafeik asit miktarlarına bakıldığında en yüksek değerin Mudanya yöresi için Kasım, Gemlik yöresi için Aralık ayında olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların kafeik asit miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.7’de görülmektedir. Yaprakların kafeik asit miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre farklılıklar istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

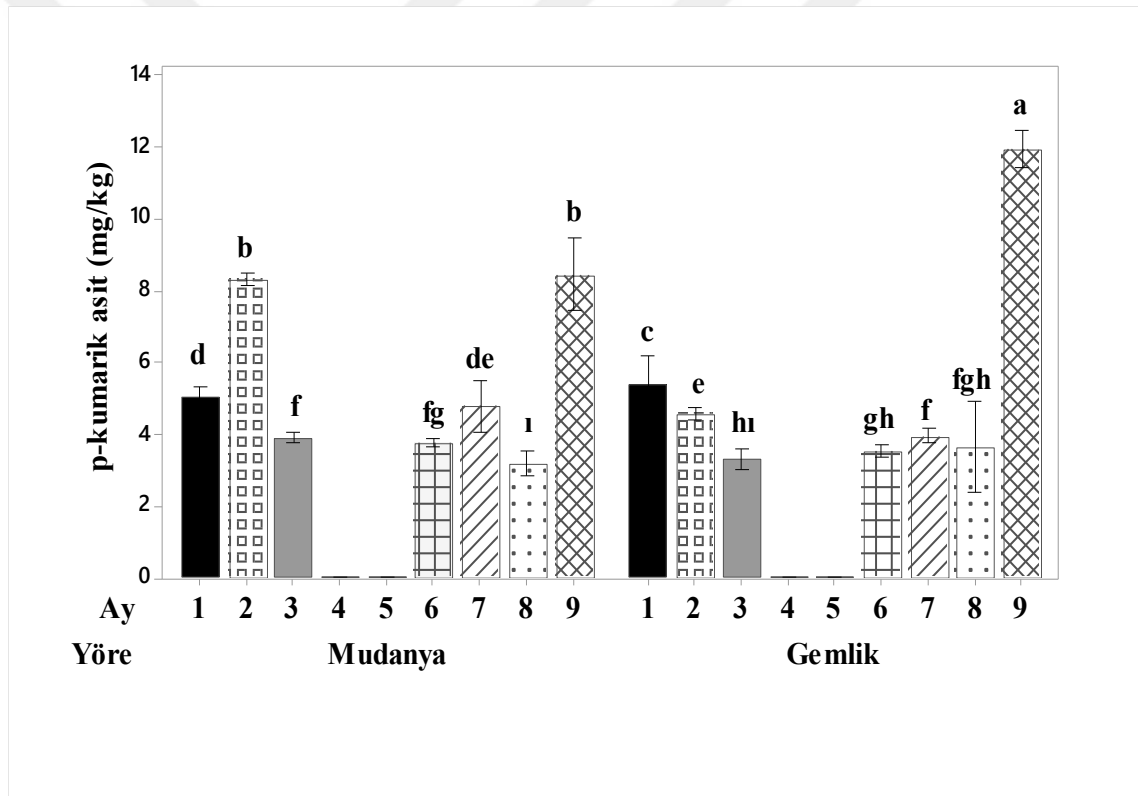


Şekil 4.7. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının kafeik asit miktarları (mg/kg). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Durak (2016) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Ayvalık çeşidi kurutulmuş zeytin yapraklarında Eylül , Kasım ve Ocak aylarında, Memecik çeşidi zeytin yapraklarında Eylül ayında kafeik asit tespit edilememiştir. Domat çeşidinde ise 55,39-58,21 mg/kg olarak arasında değişmekle birlikte tüm aylarda tespit edilmiştir. Çalışmamızda Mudanya yöresinde Mayıs, Haziran, Ağustos ve Eylül aylarında, Gemlik yöresinde ise Haziran, Ağustos, Eylül aylarında kafeik asit tespit edilememiştir. Tespit edilen aylar için kafeik asit miktarlarının 4,79-14,94 mg/kg arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.6). Çalışmamızda Gemlik çeşidi zeytin yapraklarında tespit edilen kafeik asit

miktarları bu çalışmaya göre düşük bulunmuştur. Ancak her iki yöre için kafeik asit miktarlarının hasat zamanına göre düzensizlik göstermesi bakımından aynı bölgede gerçekleştirilen bu çalışma ile benzerlik göstermektedir.

Analiz edilen zeytin yaprağı örneklerinde en yüksek p-kumarik asit miktarının Mudanya yöresi için Mayıs, Gemlik yöresi için Aralık ayında olduğu tespit edilmiştir. Ekstraktların p-kumarik asit miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.8’de görülmektedir. Yaprakların p-kumarik asit miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre farklılıklar istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

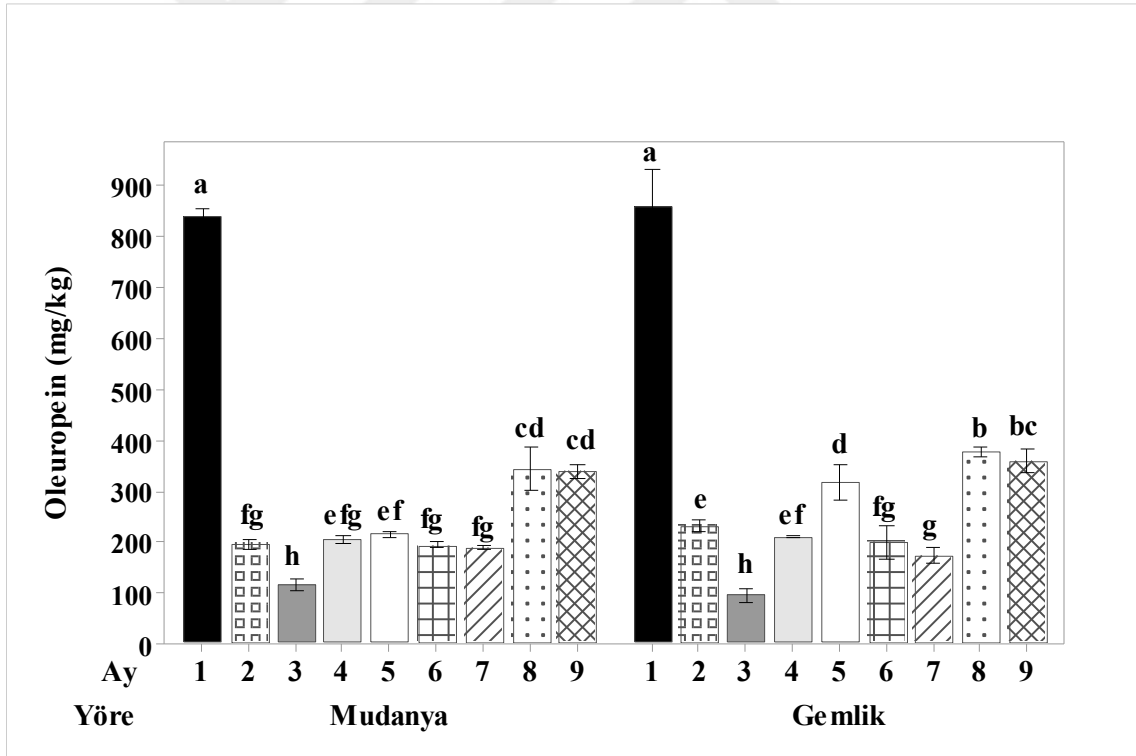


Şekil 4.8. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının p-kumarik asit miktarları (mg/kg). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Yapılan bir çalışmada farklı yükseltideki ağaçlardan toplanan Ayvalık çeşidi zeytin yapraklarında p-kumarik asit miktarları incelendiğinde bazı yükseltelerde tespit edilememesi ile birlikte miktarının 9,98-12,54 mg/kg arasında değiştiği bildirilmektedir

(Kurtulmuş 2016). Çalışmamızda Mudanya ve Gemlik yöresinde Temmuz ve Ağustos aylarında p-kumarik asit tespit edilememiştir. Tespit edilen aylar için p-kumarik asit miktarlarının 3,21-11,98 mg/kg arasında değiştiği görülmektedir (Çizelge 4.6). Çalışmamızda elde edilen en yüksek değerler aynı bölgede gerçekleştirilen bu çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Gemlik çeşidi zeytin yaprağı ekstratlarının oleuropein miktarlarının 94,21-860,21 mg/kg arasında değiştiği tespit edilmiştir. Örneklerdeki en yüksek oleuropein miktarının her iki yöre için de Nisan ayında olduğu ve diğer aylara göre önemli farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,05$). En düşük oleuropein miktarının ise her iki yöre için de Haziran ayında olduğu görülmüştür. Ekstratların oleuropein miktarlarının yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4.9’ da görülmektedir. Yaprakların oleuropein miktarlarındaki yöre ve zaman faktörlerine göre farklılıklar istatistiksel olarak $p<0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.



Şekil 4.9. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstratlarının oleuropein miktarları (mg/kg). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$).

Kurutulmuş Ayvalık çeşidi zeytin yapraklarının etanollü ekstraktlarının oleuropein miktarının 175,83-688,47 mg/kg arasında değiştiği bildirilmektedir (Kurtulmuş 2016). Tayoub ve ark. (2014) Suriye’de yetiştirilen zeytin yapraklarının genel olarak ilkbahar döneminde sonbahar dönemine göre daha yüksek oleuropein miktarına sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Çetinkaya ve Kulak (2016) Kilis çeşidi zeytin yapraklarının en yüksek oleuropein miktarının Şubat ve Nisan aylarında olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Abdeljelil ve ark. (2017) da zeytin yapraklarında oleuropein miktarının Nisan ayında maksimum seviyeye ulaştığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda en yüksek oleuropein miktarının Nisan ayında tespit edilmiş olması bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Morsy ve Abdel Aziz (2014) tarafından Mısır’da yetiştirilen zeytin ağaçlarından hasat edilen yapraklar ile yaptıkları bir çalışmada ise çalışmamızda kullanılan yöntemle benzer bir şekilde elde ettikleri ekstraktlardaki oleuropein miktarını 540 mg/kg kurutulmuş zeytin yaprağı olarak tespit etmişlerdir.

Afenah ve ark. (2015) Filistinde yetiştirilen zeytinlerin yapraklarındaki oleuropein miktarına kurutmanın etkisini araştırdıkları çalışmalarında, ağaçlardan toplanan taze (yeşil) zeytin yapraklarını oda sıcaklığında (25 °C) ve 50 °C’de kurutmuşlar ve elde ettikleri sonuçları ağaç üzerinde doğal olarak kurumuş (kahverengi) yapraklarla karşılaştırmışlardır. Çalışmada en yüksek oleuropein miktarının oda sıcaklığında kurutulan yaprak ekstraktlarında olduğunu, doğal taze yaprak ekstraktlarında bulunan oleuropein miktarının çok düşük (1 mg/g dan daha düşük) olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, yapraklardan yüksek miktarda oleuropein geri kazanımı için ekstraksiyon öncesi kurutma işleminin gerekli olduğunu dile getirmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen oleuropein miktarlarının birçok araştırmada elde edilen miktarlardan düşük olmasının temel nedenlerinden birinin ekstraksiyon öncesi kurutma işleminin yapılmamış olmasının olabileceği düşünülmektedir. Ayvalık çeşidi kurutulmuş zeytin yapraklarında gerçekleştirilen bir çalışmada oleuropein miktarlarının aylara ve yükselti durumuna göre farklılık göstermekle birlikte en yüksek değerlerin çalışmamızdan düşük olduğu bulunmuştur (Kurtulmuş 2016). Söz konusu bu durum zeytin yapraklarının oleuropein içeriğindeki farklılığa kurutma işlemi uygulanmasının dışında diğer faktörlerin de etkili olduğunu düşündürmektedir.

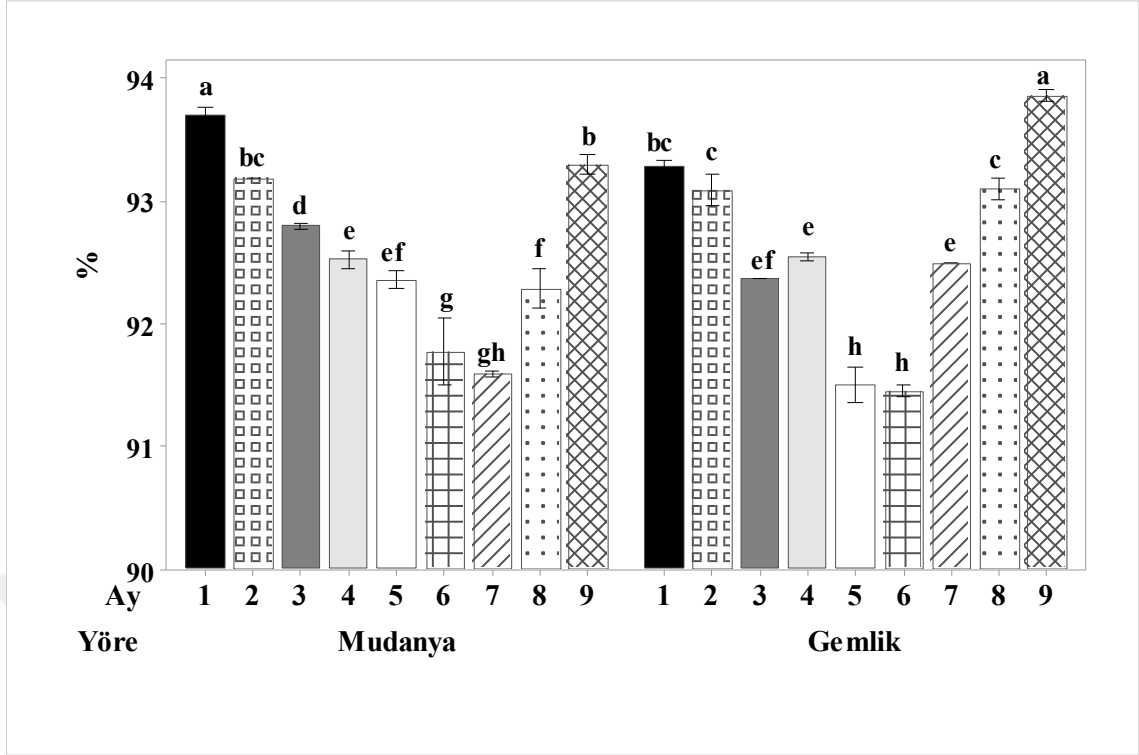
4.5. Antioksidan Aktivite Sonuçları ve Tartışma

Zeytin yaprakları örnekleri ekstraktlarının DPPH radikali kullanılarak yapılan analizlerinde gerçekleşen reaksiyonlar sonucu, ortaya çıkan radikal süpürücü antioksidan aktivite değerleri % olarak hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelde 4.10'da görüldüğü üzere Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite değerlerinin % 91,45- 93,86 arasında değiştiği saptanmıştır. En yüksek antioksidan aktivite değerinin, Mudanya yöresi için Nisan ayı, Gemlik yöresi için Aralık ayına ait örneklerde; en düşük antioksidan aktivite değerinin ise Mudanya yöresinde Ekim, Gemlik yöresinde Eylül ayına ait örneklerde olduğu tespit edilmiştir.

Ekstraktların Çizelge 4.10'da verilen DPPH radikali süpürücü antioksidan aktivite değerlerinin yöre x zaman interaksiyonuna göre Tukey testi sonuçları Şekil 4. 10'da görülmektedir. Yaprakların antioksidan aktivite değerleri üzerine yöre faktörünün etkisi önemli bulunmazken, zaman faktörüne göre farklılıklar istatistiksel olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 4.10. Gemlik çeşidi zeytin yaprağı örnekleri ekstraktlarının DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçları (%)

Zaman (Ay)	Yöre		
	Mudanya	Gemlik	Ortalama \pm Sd
(1) Nisan	93,69 \pm 0,07	93,28 \pm 0,04	93,49 \pm 0,22
(2) Mayıs	93,19 \pm 0,01	93,09 \pm 0,12	93,14 \pm 0,10
(3) Haziran	92,80 \pm 0,02	92,36 \pm 0,02	92,58 \pm 0,23
(4) Temmuz	92,53 \pm 0,07	92,54 \pm 0,04	92,54 \pm 0,05
(5) Ağustos	92,36 \pm 0,07	91,50 \pm 0,13	91,93 \pm 0,46
(6) Eylül	91,78 \pm 0,25	91,45 \pm 0,05	91,61 \pm 0,24
(7) Ekim	91,59 \pm 0,03	92,50 \pm 0,01	92,04 \pm 0,48
(8) Kasım	92,30 \pm 0,15	93,10 \pm 0,09	92,70 \pm 0,44
(9) Aralık	93,29 \pm 0,08	93,86 \pm 0,05	93,58 \pm 0,30
Ortalama \pm Sd	92,61 \pm 0,67	92,63 \pm 0,76	



Şekil 4.10. Yöre x zaman interaksiyonuna göre zeytin yaprakları ekstraktlarının DPPH radikali süpürücü aktivite sonuçları (%). Ortak harfi olmayan ortalamalar arasında farklılık istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$)

Saygın (2009) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Ege bölgesinde yetişen Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite değerinin % 73,86-90,45 arasında değiştiği ve en düşük değer Eylül ayında olduğu tespit edilmiştir. Harp (2011) Akdeniz bölgesinde yetişen Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının EC_{50} değerlerinin 0,99-1,51 $\mu\text{g/mL}$ arasında olduğunu ve Eylül-Aralık ayları arasındaki en yüksek antioksidan aktivite değerinin Aralık ayında görüldüğünü bildirmiştir. Çalışmamızda en düşük antioksidan aktivite değerinin Gemlik yöresinde Eylül ayında tespit edilmiş olması ve Eylül-Aralık ayları arasında hasat edilen yapraklarda en yüksek toplam fenolik madde içeriğinin her iki yöre için de Aralık ayına ait olması bu çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. Sekiz zeytin çeşidine ait zeytin yapraklarının incelendiği bir diğer çalışmada en yüksek antioksidan aktivite gösteren çeşidin Gemlik olduğu saptanmıştır (Khaliq ve ark. 2015). Çalışmamızda Gemlik çeşidi zeytin yaprak örneklerinin % inhisyon değerlerinin oldukça yüksek olduğu görülmekte olup (Şekil 4.10)

araştırcıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Kocatürk (2014) Gemlik çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite değerlerinin % 94,55-94,58 arasında değiştiğini ifade ederken, Kurtulmuş (2016) da Ayvalık çeşidi zeytin yapraklarının antioksidan aktivite değerlerinin % 93,80-95,43 arasında değiştiğini ifade etmektedir. Çalışmamızda genel olarak yüksek fenolik madde içeriğine sahip olunan aylarda antioksidan aktivite değerlerinin de yüksek olduğu bulunmuştur. Antioksidan aktivite değerlerinin dar aralıkta (% 91,45- 93,86) değişiklik göstermesinden dolayı toplam fenolik madde ile antioksidan aktivite arasındaki aylar arası ilişkide bazı farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Sevim ve Tuncay (2012) Ege bölgesinde yetişen zeytin yapraklarının antioksidan aktivite miktarını troloks eşdeğeri cinsinden 1214,5-2027,7 µmol/100 g arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Antioksidan aktivite tayininde farklı yöntemler ile elde edilen ekstraktlar çeşitli radikal indirgeyici (DPPH, ABTS, CUPRAC, FRAP) yöntemler kullanılarak analiz gerçekteşirilmektedir. Aynı ekstraksiyon ve antioksidan aktivite yöntemi kullanıldığında ise sonuçları % inhibisyon, EC₅₀ değeri, troloks eşdeğeri cinsinden verilebilmektedir. Bu durum örneklerin antioksidan aktivite değerleri sonuçlarının sayısal olarak karşılaştırılmasını güçleştirmektedir.

5. SONUÇ

Çalışmamızda Bursa ilinde yetiştirilen farklı yöre ve hasat zamanlarında toplanan Gemlik çeşidine ait zeytin yapraklarının nem, renk değerleri, toplam fenolik madde miktarı, fenolik bileşenleri (LC/MS/MS) ve antioksidan aktivite miktarı (DPPH) incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlara varılmıştır.

- 1) Yöre ve hasat zamanı farklılıkları zeytin yapraklarının nem, renk değerlerini toplam fenolik madde miktarını ve fenolik bileşenlerini önemli derecede etkilemektedir.
- 2) Antioksidan özelliği sayesinde gıdaların raf ömrünü arttırmak için doğal koruyucu olarak kullanılma potansiyeli olan zeytin yaprağının antioksidan aktivite değerleri Gemlik çeşidinde oldukça yüksektir. Yaprakların DPPH radikali süpürücü aktivite değerleri arasındaki farklar oldukça az olup yöreler arası farklılıklar önemli değil iken hasat zamanı farklılıkları önemli bulunmuştur ($p < 0,05$).
- 3) Ticari ekstrakt üretimi ve geleneksel olarak hastalıkların tedavisi için, her iki yörede de en yüksek toplam fenolik madde, antioksidan aktivite ve oleuropein miktarına ulaşılan Nisan ayındaki zeytin yapraklarının kullanılması daha uygun olacaktır.
- 4) Gıda takviyesi olarak ticari zeytin yaprağı ekstraktının kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte taze zeytin yaprakları günümüzde çay olarak da tüketilmektedir. Zeytin yapraklarının sağlık üzerine sayısız olumlu etkilerinin nedeni olan oleuropeinden daha fazla yararlanabilmek için zeytin yaprakları hasat edildikten sonra kurutularak nem miktarı azaltılmalıdır. Bu işlem aynı zamanda mikrobiyolojik fermentasyon ve sonrasında oluşabilecek degradasyonu da önleyecektir. Ayrıca bitki çayı olarak tüketimi için ilaçlama yapılmayan bahçelerdeki zeytin ağaçlarından toplanan yaprakların kullanılması daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abaza, L., Youssef, N.B., Manai, H., Haddada, F.M., Methenni, K., Zarrouk, M., 2011.** Chétoui olive leaf extracts: influence of the solvent type on phenolics and antioxidant activities. *Grasas y Aceites*, 62: 96-104.
- Abaza, L., Taamalli, A., Nsir, H., Zarrouk, M. 2015.** Olive tree (*Olea europaea* L.) leaves: importance and advances in the analysis of phenolic compounds. *Antioxidants*, 4(4): 682-698.
- Abaza, L., Taamalli, A., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Zarrouk, M., Youssef, N. B. 2016.** Changes in phenolic composition in olive tree parts according to development stage. *Food Research International*, 100(3): 454-461.
- Abdeljelil, Z. B., Tekaya, M., Elmsellem, H., Mechri, B., Hammami, M. 2017.** Impact of season and foliar fertilisers on phenolics of leaves of Chemlali olive cultivar. *Moroccan Journal of Chemistry*, 5(1): 96-104.
- Afaneh, I., Yateem, H., Al-Rimawi, F. 2015.** Effect of olive leaves drying on the content of oleuropein. *American Journal of Analytical Chemistry*, 6(03): 246-252.
- Ahmad-Qasem, M. H., Canovas, J., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Carcel, J. A., Garcia-Perez, J. V. 2013.** Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 17: 120-129.
- Ahmad-Qasem, M. H., Ahmad-Qasem, B. H., Barrajon-Catalan, E., Micol, V., Carcel, J. A., Garcia-Perez, J. V. 2016 .** Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Industrial Crops and Products*, 79: 232-239.
- Aktan, N., Kalkan, H. 1999.** Sofralık Zeytin Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornava, İzmir, 122s.
- Al-Quraishy, S., Othman, M. S., Dkhil, M. A., Moneim, A. E. A. 2017.** Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 91: 338-349.
- Alhaoui, N., Gomez-Caravaca, A., Leon, L., Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2014.** Determination of phenolic compounds of ‘Sikitita’ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves. *Food Science and Technology*, 58: 28-34.
- Ardestani, A., Yazdanparast, R. 2007.** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food chemistry*, 104(1): 21-29.
- Armutçu, F., Akyol, S., Hasgöl, R., Yiğitoğlu, R. 2011.** Biologically effects and the medical usage of olive leaves. *SPATULA DD*, 1(3): 159-165..
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., Savvari, P., Gorgoulis, V., Papalabros, E., 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, 2011.** European Medicines Agency. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC). Assessment report on *Olea europaea* L., folium. 22 November 2011.
- Anonim, 2015.** Ulusal Zeytin ve Zeytinyağı Konseyi. Zeytinyağı Üretim Tesisleri İçin Hijyen Esasları Ve İyi Uygulama Kılavuzu, No:10. Aralık, 2015.
- Anonim, 2017a.** T.C. Gümrük Ve Ticaret Bakanlığı Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü 2016 Yılı Zeytin ve Zeytinyağı Raporu. Mart, 2017.

- Anonim, 2017b.** TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu.
<https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi : 29.08.2017)
- Anonim, 2017c.** IOOC, International Olive Oil Council
<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/132-world-table-olive-figures>.
(Erişim Tarihi : 29.08.2017)
- Bahloul, N., Boudhrioua, N., Kouhila, M., Kechaou, N. 2009.** Effect of convective solar drying on colour, total phenols and radical scavenging activity of olive leaves (*Olea europaea* L.). *International journal of food science & technology*, 44(12): 2561-2567.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A.2000.** Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* 68: 457–462.
- Bilek, S. E. 2010.** The effects of time, temperature, solvent: solid ratio and solvent composition on extraction of total phenolic compound from dried olive (*Olea europaea* L.) leaves. *GIDA J. Food*, 35(6): 411-416.
- Blasi, F., Urbani, E., Simonetti, M. S., Chiesi, C., 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: 202-207.
- Blois, M.S. 1958.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Brahmi, F., Mechri, B., Dhibi, M., Hammami, M. 2013.** Variations in phenolic compounds and nitradical scavenging activity of *Olea europaea* leaves and fruits extracts collected in two different seasons. *Industrial Crops and Products*, 49:256–264.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, 28: 25-30.
- Salta, F.N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. 2007.** Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, 13(6): 413-421.
- Bouallagui, Z., Han, J., Isoda, H., Sayadi, S. 2011.** Hydroxytyrosol rich extract from olive leaves modulates cell cycle progression in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 179-184.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S. 2008.** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: stabilization by addition of natural antioxidants from ‘chemlali’ olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253–262.
- Boudhrioua, N., Bahloul, N., Slimen, I. B., Kechaou, N. 2009.** Comparison on the total phenol contents and the color of fresh and infrared dried olive leaves. *Industrial crops and products*, 29(2): 412-419.
- Cetinkaya, M., Kulak., H. 2016.** Relationship Between Total Phenolic, Total Flavonoid And Oleuropein In Different Aged Olive (*Olea Europaea* L.) Cultivar Leaves *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 13(2): 81-85
- Diraman , H., Özdemir, D., Hışıl, Y. 2011.** Characterization of Virgin Olive Oils Produced From Ayvalik and Gemlik Cultivars Based On Their Fatty acid Profiles By Chemometrics .World Conference on Oilseed Processing, Fats & Oils Processing, Biofuels & Applications, 21-23 June, 2011, Izmir, Turkey.
- Diraman, H. 2007.** Gemlik Zeytin Çeşidinden Üretilen Natürel Zeytinyağlarının Oksidatif Stabilitelerinin Diğer Önemli Yerli Çeşitler ile Karşılaştırılması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3: 53-59.

- Doğançay, G. 2013.** Sulanan ve Sulanmayan Koşullarda Bazı Zeytin Çeşitlerinin Yapraklarındaki Biyoaktif Bileşiklerin Mevsimsel Değişimi. *Yüksek Lisans Tezi*. Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kilis.
- Durak, G. 2016.** Farklı Çeşit Ve Hasat Zamanının Çay Olarak Değerlendirmek Amacıyla Toplanan Zeytin Yapraklarının Fonksiyonel Bileşenlerine Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Ebada, S. S., Edrada, R. A., Lin, W., Proksch, P. 2008.** Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature protocols*, 3(12): 1820-1831.
- Ekanayake, P., Lee, Y. D., Lee, J. 2004.** Antioxidant activity of flesh and skin of *Eptatretus burgeri* (Hag Fish) and *Enedrias nebulosus* (White Spotted Eel). *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*, 10(3): 171-177.
- El, S. N., Karakaya, S. 2009.** Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutrition reviews*, 67(11): 632-638.
- Erarslan, Z. 2017.** Zeytin Yaprağı Ekstrakt Kullanımının Biber Salçalarında Kalite Değişimi Üzerine Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*. Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Osmaniye.
- Erbay, Z., Icier, F. 2010.** The importance and potential uses of olive leaves. *Food Reviews International*, 26(4): 319-334.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K. M., Gilani, A. H., Saari, N. 2012.** Valuable nutrients and functional bioactives in different parts of olive (*Olea europaea* L.)- a review. *International journal of molecular sciences*, 13(3): 3291-3340.
- Gutfinger, 1981.** Polphenols in Olive Oils. *JAOCS*, 58(11): 966-968.
- Hamad, I. 2015.** Antioxidant Activity and Potential HepatoProtective Effect of Saudi Olive Leaf Extract. 2nd International Conference on Advances in Environment, Agriculture & Medical Sciences (ICAEAM'15), 11-12 June , 2015, Antalya, Turkey.
- Harp, F. 2011.** Gemlik, Domat, Adana Topağı Ve Adana Yerli Zeytin Yapraklarının Antioksidan Etkilerinin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Herrero, M., Temirzoda, T.N., Segura-Carretero, A., Quirantes, R., Plaza, M., Ibanez, E. 2011.** New possibilities for the valorization of olive oil by-products. *Journal of Chromatography. A*, 1218(42): 7511-7520.
- Jemai, H., El Feki, A., 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.
- Khaliq, A., Sabir, S. M., Ahmed, S. D., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Jabbar, A. J., Khan, A. 2015.** Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88(1): 16-21.
- Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., Kiritsakis, A. 2010.** Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(4): 369-376.
- Kiritsakis, K., Rodriguez-Perez, C., Gerasopoulos, D., Segura-Carretero, A. 2017.** Olive oil enrichment in phenolic compounds during malaxation in the presence of olive leaves or olive mill wastewater extracts. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9): 1-13.

- Kocatürk , B. 2014.** Gama Işını Uygulanan Kuru Zeytin Yapraklarındaki Fenolik Madde İçeriğinin Ve Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., Karakas, R. 2006.** Antifungal activity of olive leaf (*Olea europaea* L.) extracts from the trilye region of Turkey. *Annals of Microbiology*, 56(4): 359-362.
- Kurtulmuş., H. 2016.** Edremit Körfezi Zeytin Yapraklarının Antioksidan Özellikleri ile Fenolik Ve Mineral Bileşimleri Üzerine Mevsim Ve Yükselti Faktörlerinin Etkileri. *Yüksek Lisans Tezi*. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir.
- Lee, O.H. Lee, B.Y. 2010.** Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Biosource technology*, 101: 3751-3754.
- Lee-Huang, S., Zhang, L., Huang, P. L., Chang, Y. T., Huang, P. L. 2003.** Anti-HIV activity of olive leaf extract (OLE) and modulation of host cell gene expression by HIV-1 infection and OLE treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(4): 1029-1037.
- Le Floch, F., Tena, M. T., Rios, A., Valcarcel, M. 1998.** Supercritical fluid extraction of phenol compounds from olive leaves. *Talanta*, 46(5): 1123-1130.
- Liu, Y., McKeever, L. C., Malik, N. S. 2017.** Assessment of the Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract Against Foodborne Bacterial Pathogens. *Frontiers in microbiology*, 8(113):1-8.
- Losada-Echeberria, M., Taamalli, A., Micol, V., Herranz-Lopez, M., Arraez-Roman, D., Barrajon-Catalan, E. 2017.** Antioxidant enriched olive leaf extracts show antiproliferative activity in cellular models of breast cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 108: S92.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., 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.
- Mert, C., Barut, E., İpek, A. 2013.** Quantitative seasonal changes in the leaf phenolic content related to the alternate-bearing patterns of olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 15(5): 995-1006.
- Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., Hagidimitriou, M. 2016a.** Phenolic Profile of Leaves and Drupes of Ten Olive Varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1): 162-166.
- Mitsopoulos, G., Papageorgiou, V., Komaitis, M., Hagidimitriou, M. 2016b.** Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in Leaves and Drupes of Ten Olive Varieties. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1): 155-161.
- Molyneux, P. 2004.** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın J. Sci. Technol*, 26(2): 211-219.
- Moudache, M., Colon, M., Nerin, C., Zaidi, F. 2016.** Phenolic content and antioxidant activity of olive by-products and antioxidant film containing olive leaf extract. *Food Chemistry*, 212: 521-527.
- Mourtzinis, I., Salta, F., Yannakopoulou, K., Chiou, A., Karathanos, V. T. 2007.** Encapsulation of olive leaf extract in β -cyclodextrin. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 55(20): 8088-8094.

- Nashwa, M. F., Abdel-Aziz, M. E. 2014.** Efficiency of olive (*Olea europaea* L.) leaf extract as antioxidant and anticancer agents. *J. Agroalim. Process. Technol.*,20:46-53.
- Nasrollahi, Z., Abolhasannezhad, M. 2015.** Evaluation of the antifungal activity of olive leaf aqueous extracts against *Candida albicans* PTCC-5027. *Current Medical Mycology*, 1(4): 37.
- Ötleş, Ş., Özyurt, V.H. 2012.** Oleuropein ve Önemi . *Zeytin Bilimi*. 3(1):59-71
- Özcan, M. M., Matthaus, B. 2017.** A review: benefit and bioactive properties of olive (*Olea europaea* L.) leaves. *European Food Research and Technology*. 243(1): 89-99.
- Qabaha, K., AL-Rimawi, F., Qasem, A., Naser, S. A. 2017.** Oleuropein Is Responsible for the Major Anti-Inflammatory Effects of Olive Leaf Extract. *Journal of Medicinal Food*. 21(2): 302-305.
- Quirantes-Pine, R., Lozano-Sanchez, J., Herrero, M., Ibanez, E., Segura Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2013.** HPLC–ESI–QTOF–MS as a Powerful Analytical Tool for Characterising Phenolic Compounds in Olive-leaf Extracts. *Phytochemical Analysis*, 24(3): 213-223.
- Palmeri, R., Monteleone, J. I., Barbera, A. C., Maucieri, C., Todaro, A., Giannone, V., Spagna, G. 2016.** Production of Functional Crackers Enriched with Olive (*Olea europaea* L.) Leaf Extract. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 3(7).
- Peralbo-Molina, A., Luque de Castro, M.D. 2013.** Potential of residues from the Mediterranean agriculture and Agri food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 32:16–24.
- Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Pereira, J. A. 2007.** Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5): 1153-1162.
- Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. 2011.** Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 21(4): 738-745.
- Romero, C., Medina, E., Mateo, M., Brenes, M. 2016.** Quantification of bioactive compounds in Picual and Arbequina olive leaves and fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(6): 1725-1732.
- Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. 2003.** Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9): 2532-2538.
- Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., Andrikopoulos, N. K. 2007.** Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Revista de Agaroquimica y Tecnologia de Alimentos*, 13(6): 413-421.
- Sarbishegi, M., Gorgich, E. A. C., Khajavi, O., Komeili, G., Salimi, S. 2017.** The neuroprotective effects of hydro-alcoholic extract of olive (*Olea europaea* L.) leaf on rotenone-induced Parkinson's disease in rat. *Metabolic Brain Disease*, pp:1-10.
- Saygın, B. 2009.** Zeytin yaprağındaki başlıca fenolik bileşikler ve bunların antioksidan kapasiteleri üzerine araştırmalar. *Yüksek Lisans Tezi*. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, İzmir.
- Sevim, D., Tuncay, Ö. 2012.** Ayvalık Ve Memecik Zeytin Çeşitlerinin Yaprığı Ve Meyvelerinin Toplam Fenolik Madde Miktarı Ve Antioksidan Aktiviteleri. *GIDA(2012)*. 37: 219-226.

- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A.V. , Vilas Boas, L. 2006.** Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. *Food Science and Technology International*, 12: 385–396.
- Singh, I., Mok, M., Christensen, A. M., Turner, A. H., Hawley, J. A. 2008.** The effects of polyphenols in olive leaves on platelet function. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 18(2): 127-132.
- Susalit, E., Agus, N., Effendi, I., Tjandrawinata, R. R., Nofiarny, D., Perrinjaquet-Mocchetti, T., 2010.** Olive (*Olea europaea*) leaf extract effective in patients with stage-1 hypertension: Comparison with Captopril. *Phytomedicine*, 18(4): 251-258.
- Taamalli, A., Arraez-Roman, D., Ibanez, E., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2012.** Optimization of microwave-assisted extraction for the characterization of olive leaf phenolic compounds by using HPLC-ESI-TOF-MS/IT-MS². *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 791–798.
- Talhaoui, N., Gomez-Caravaca, A. M., Leon, L., De la Rosa, R., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. 2014.** Determination of phenolic compounds of ‘Sikitita’ olive leaves by HPLC-DAD-TOF-MS. Comparison with its parents ‘Arbequina’ and ‘Picual’ olive leaves. *Food Science and Technology*, 58(1): 28-34.
- Talhaoui, N., Taamalli, A., Gomez-Caravaca, A. M., Fernandez-Gutierrez, A., Segura-Carretero, A. 2015.** Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77: 92-108.
- Tayoub, G., Sulaiman, H., Hassan, A.H., 2012.** Determination of oleuropein in leaves and fruits of some Syrian olive varieties. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2(3): 428-433.
- Temiz, M. A., Temur, A. 2017.** Effect of Solvent Variation on Polyphenolic Profile and Total Phenolic Content of Olive Leaf Extract. *YYU J AGR SCI*. 27(1): 43-50.
- Toth, G., Alberti A., Solyomvary, A. Barabas, C., Boldizsarc, I. Noszala, B. 2015.** Phenolic profiling of various olive bark-types and leaves: HPLC–ESI/MS study. *Industrial Crops and Products*, 67:432-438.
- Tsimidou, M.Z., Papoti, V.T. 2010.** Bioactive ingredients in olive leaves. In V.R. Preedy, R.R. Watson (Eds.), *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 349–356). Elsevier Inc.
- Uylaşer, V. , Başoğlu , F. 2011.** Temel Gıda Analizleri. Dora Yayıncılık, Bursa, 125s.
- Wissam, Z., Ali, A., Rama, H. 2016.** Optimization of extraction conditions for the recovery of phenolic compounds and antioxidants from Syrian olive leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(5): 390-394.
- Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., Zhang, Y. L. 2015.** Phenolic compositions, and antioxidant performance of olive leaf and fruit (*Olea europaea* L.) extracts and their structure–activity relationships. *Journal of Functional Foods*, 16: 460-471.
- Yancheva, S., Mavromatis, P., Georgieva, L. 2016.** Polyphenol profile and antioxidant activity of extracts from olive leaves. *Journal of Central European Agriculture*, 17(1): 154-163.
- Yateem, H., Afaneh, I., Al-Rimawi, F. 2014.** Optimum conditions for oleuropein extraction from olive leaves. *International Journal of Applied Science ve Technology*, 4(5): 153-157.
- Yıldız, G., Uylaşer, V. 2011.** Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25(1):131-142.
- Zoidou, E., Melliou, E., Moatsou, G., Magiatis, P. 2017 .** Preparation of Functional Yogurt Enriched With Olive-Derived Products. *Yogurt in Health and Disease Prevention* pp: 203-220.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Esra DOĞANGÜN
Doğum Yeri ve Tarihi : Gerede- 25.07.1991
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu
Lise : Kanuni Anadolu Lisesi, 2005-2009
Lisans : Uludağ Üniversitesi, 2009-2014
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi, 2014-2018

Çalıştığı Kurumlar : TÜBİTAK BUTAL / 2015-halen

İletişim : esra.dogangun@tubitak.gov.tr
Yayınlar :

Çelik, G., Doğangün, E., Taşkesen, S., Şahan, Y. 2016. Tavuk Yumurtalarının Vitamini İçeriklerinin UPLC ile Belirlenmesi. 12. Gıda Kongresi, 5-7 Ekim 2016, Edirne.

Sahan, Y., Celik, G., Dogangun, E. 2017. Comparison Of Some Phenolic Compounds of Organic And Conventional Extra-Virgin Olive Oil. *Uludağ University Journal of The Faculty of Engineering*, 22(3) :179-186.

Taskesen, S., Celik, G., Dogangun, E., Sahan, Y. 2016. Determination of Caffeine in Different Brands of Coffee by Ultra High Performance Liquid Chromatography. 28th National Chemistry Congress , 15-21 August 2016, Mersin.

Uylaşer, V., Doğangün, E. 2016. *Cronobacter sakazakii*'nin Gıda Güvenliği Açısından Önemi. *Uludağ Üni. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 30(2): 91-100.