

## Zeytin Yapraklarından Fenolik Bileşenlerin Mikrodalga Destekli Ekstraksiyonu ve Kinetiği ile Ekstraktların Antioksidan Özellikleri

Elif Meltem İşçimen , Mehmet Hayta  

Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

Geliş Tarihi (Received): 20.04.2023, Kabul Tarihi (Accepted): 15.10.2023

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): [mhayta@erciyes.edu.tr](mailto:mhayta@erciyes.edu.tr) (M. Hayta)

☎ 0352 437 5755 📠 0352 437 5784

### ÖZ

Son zamanlarda, çeşitli gıda üretim yan ürünlerinden antioksidan aktivite gibi sağlık yararları nedeniyle fenolik bileşen ekstraksiyonuna artan bir ilgi olduğu dikkat çekmektedir. Mevcut çalışmada, zeytin yapraklarından (ZY) fenoliklerin ekstraksiyonu için verimli bir alternatif ve yeşil teknik olarak nitelendirilen mikrodalga destekli ekstraksiyon (MDE) tekniği çalışılmıştır. Değişen mikrodalga gücünün toplam fenoliklerin salınım kinetiği üzerindeki etkisi  $K_1$ ,  $B_0$ ,  $C_{eq}$ ,  $k$ , ve  $SEE$  parametreleri belirlenerek mikrodalga gücünün etkisini ekstraksiyon süresi açısından açıklamak için kinetik modeller oluşturulmuştur. Üç farklı güçte (100, 300 ve 500W) artan süre ile birlikte ekstraksiyon verimi ve ekstraktların antioksidan özellikleri değerlendirilmiştir. 100 W uygulama için artan süre ile birlikte 15. dakikaya kadar ekstraktların antioksidan özelliklerinin arttığı görülmüştür. 300 W güç uygulamasında ekstraktların fenolik bileşen içeriği ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikali süpürücü aktivite değerleri 10. dakikaya kadar artış göstermiştir. 500 W güç uygulaması için ekstraktların hem fenolik içeriğinin hem de antioksidan özelliklerinin 4. dakikaya kadar arttığı ve daha sonra ilerleyen uygulama süresiyle doğru orantılı olarak azaldığı görülmüştür. Tüm ekstraktlar arasında en yüksek toplam fenolik bileşen içeriği ve antioksidan kapasite değerleri 500 W güçte ve 4 dakika süre ile ekstrakte edilen örnekte gözlemlenmiştir. Aynı örnek için toplam fenolik bileşen içeriği, DPPH radikali süpürücü aktivite ve metal şelatlama aktivite değeri sırasıyla  $9.52 \pm 0.21$  mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/mL,  $15.22 \pm 0.45$  mg Trolox eşdeğeri (TE)/g ZY ve  $98.13 \pm 0.04$   $\mu$ mol etilenediaminetetraasetik asit (EDTA)/g zeytin yaprağı (ZY) olarak elde edilmiştir. Ekstraksiyon kinetiğine ait sonuçlara göre MDE için Peleg modelinin daha uygun olduğu görülmüştür. Sonuçlar göz önüne alındığında zeytin yapraklarından MDE için artan güç, ekstraksiyon süresinin kısalmasını sağlamıştır. Ayrıca yüksek güçlerde uzun uygulama sürelerinin ekstraksiyon verimini azalttığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin yaprağı, Mikrodalga, Kinetik, Fenolik bileşen, Antioksidan

### Microwave-Assisted Extraction of Phenolic Components in Olive Leaves and its Kinetics, and Antioxidant Properties of Extracts

#### ABSTRACT

Recently, there has been an increasing interest in phenolic component extraction from various by-products of food production due to the health benefits of phenolics like antioxidant activity. In the present study, microwave-assisted extraction (MAE), which is characterized as an efficient alternative and green technique for extraction, was used for the extraction of phenolic compounds from olive leaves. In addition, the effect of different microwave powers on the release kinetics of total phenolic contents in extracts was determined. Extraction efficiency and antioxidant properties of extracts were evaluated with increasing time in three different microwave powers of 100, 300 and 500W. It was observed that the antioxidant activities of extracts increased up to the 15<sup>th</sup> minute for the microwave power of 100W. Phenolic compound content and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity values increased up to 10 minutes for the microwave power of 300W. It was found that both phenolic contents and antioxidant properties

of extracts increased up to 4 minutes and then decreased with time for extracts with the microwave power of 500W. Among all extracts, the highest total phenolic content, DPPH radical scavenging activity, and metal chelating activity value were found for the extracts treated with 500W for 4 minutes as 9.52±0.21 mg gallic acid equivalent (GAE)/mL, 15.22±0.45 mg Trolox equivalent (TE)/g, and 98.13±0.04 µmol ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/g olive leaves, respectively. According to the results of extraction kinetics, the Peleg model was found to be more suitable for MAE. Results indicated that the increased potency for MAE from olive leaves resulted in shorter extraction time. In addition, it was observed that longer time at high microwave powers might reduce the extraction efficiency of MAE.

**Keywords:** Olive leaf, Microwave, Kinetic, Phenolic component, Antioxidant

## GİRİŞ

Doğal gıdalar ve gıda kaynaklı antioksidanlar özellikle fenolik fitokimyasallar, oksidatif hasarlara karşı kanser önleyici ajanlar olarak işlev gördüklerinden büyük ilgi görmektedir [1]. Zeytin yaprağı ekstraktları, güçlü biyolojik aktivitelerle ilişkili olduğu bilinen fenolik bileşimi nedeniyle ilgi çekmektedir [2]. İçerdiği sekoiridoidler (oleuropein, ligstroside, dimethyloleuropein ve oleoside), flavonoidler (apigenin, kaempferol, luteolin) ve fenolik bileşikler gibi değerli fitokimyasallar sayesinde sağlık üzerine önemli etkilere sahiptir [3, 4]. Zeytin yaprağı ekstraktı içerdiği fenolik bileşenler sayesinde doğal antioksidan olarak kullanılabilir önemli bir yan üründür. Gıdalarda oksidasyonu önlemek için kullanılan BHT, BHA ve TBHQ gibi sentetik antioksidanların güvenlik sorunları nedeniyle son zamanlarda doğal antioksidanlara olan ilgi artmıştır [5]. Yağların oksidasyonunu önlemek için zeytin yaprağı, zeytin yaprağı ekstresi ve yapraktaki sekoiridoid bileşik (oleuropein) ile zenginleştirilmesi ile ilgili çalışmalar [3, 6, 7] ile birlikte zeytin yapraklarının antimikrobiyal aktivitesinde yapılan bir çalışmada kanıtlanmıştır [8].

Son yıllarda zeytin yapraklarından oleuropein ve diğer fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu için farklı ekstraksiyon teknikleri geliştirilmiştir. MDE, süper kritik sıvı ekstraksiyonu ve basınçlı sıvı ekstraksiyonu gibi geleneksel olmayan ekstraksiyon teknikleri zeytin yaprağından fenolik bileşenlerin ekstraksiyonu için kullanılmıştır [9-12]. MDE, düşük çözücü ve enerji tüketimi sunabilen, otomasyona uygun, verimli ekstraksiyon sağlayan yeni ve yeşil bir ekstraksiyon tekniğidir. Yapılan çalışmalar da MDE ile elde edilen verimin geleneksel yöntemlere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir [10, 13]. MDE, narenciye kabukları [14], fıstık kabukları [15], yaban mersini [16], ve ceviz yaprakları [17] gibi farklı birçok bitki materyalinden fenolik bileşen ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Hasat zamanının ve ekstraksiyon koşullarının zeytin yapraklarından fenolik bileşenin ekstraksiyonuna etkisinin belirlemek amacıyla MDE çalışması yapılmıştır [18]. Zeytin yapraklarından fenolik bileşenlerin farklı yöntemlerle ekstraksiyonunun karşılaştırıldığı bir başka çalışmada MDE ultrason destekli ve geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle karşılaştırılmıştır [19]. Yapılan literatür taramasına göre MDE, zeytin yapraklarından fenoliklerin ekstraksiyonu için potansiyel bir yöntem olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmada MDE ile fenolik bileşen ekstraksiyonunun matematiksel modellenmesi yapılmıştır.

Matematiksel modelleme süreçlerin tasarımını, optimizasyonunu ve kontrolünü kolaylaştıran bir araçtır ayrıca ekipmanın büyütülmesi için faydalı bilgiler sağlayabilir. Matematiksel model, süreçleri anlamaya yardımcı olmak için de kullanılabilir. Tipik kinetik ekstraksiyon modelleri, kararsız difüzyon, Fick'in difüzyon yasası, film teorisi ve ampirik modelleri içerir [20, 21]. Nar kabukları [22], vanilya [23], zerdeçal [24], kerkede [25] gibi bitkilerden MDE kinetik çalışmaları literatürde mevcuttur. Zeytin yapraklarından fenoliklerin MDE'nun kinetik modellenmesi için mevcut bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, mikrodalga uygulama süresinin ve gücünün zeytin yaprağı fenolik bileşenleri ekstraksiyonuna ve antioksidan özelliklere etkisini gözlemlemek. Zeytin yaprağından fenolik bileşiklerin kütle transferinin kinetiğini matematiksel modeller ile incelemektir.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Folin-Ciocalteu reaktifi, ferrozin (160601), DPPH (D913-2) Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. Demir klorür (3260) Carlo-Erba (Chau. du Vexin, Fransa)'dan alınmıştır. Tüm analizler için analitik saflıkta kimyasallar kullanılmıştır. Zeytin yaprakları yerel bir marketten temin edilmiştir.

### Metot

#### Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon

Kurutulmuş formda alınan zeytin yaprakları öncelikle öğütülmüş ve 0.500 µm gözenek çaplı elek yardımıyla elenmiştir. Mikrodalga destekli ekstraksiyon kapalı mikrodalga ekstraksiyon sisteminde (Mars 6, CEM, ABD) yürütülmüştür. 1.25 g toz örnek 10 mL saf su içerisine eklendikten sonra mikrodalga ekstraksiyon sistemi haznelere (CEM) yerleştirilmiştir [9]. Fenolik ve antioksidan bileşenlerin ekstraksiyon verimi farklı süre (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10 ve 15 dk.) ve farklı güç (100, 300 ve 500W) uygulama noktalarında belirlenmiştir. Uygulanan mikrodalga gücü yapılan ön denemeler ve literatür göz önünde bulundurularak belirlenmiştir [18]. Mikrodalga ekstraksiyon işlemi sonrasında örnekler 5000xg'de 10 dakika 20°C'de santrifüj edilmiş ve analiz süresine kadar -20°C'de saklanmıştır.

## Toplam Fenolik Bileşen İçeriğinin Belirlenmesi

Toplam fenolik bileşen analizi Folin-Ciocalteu metoduna göre yapılmıştır [26]. Öncelikle örnek (30 µL) üzerine Folin-Ciocalteu reaktifi (150 µL) ve ardından %7.5'lük sodyum karbonat (120 µL) eklenmiştir. Örnekler mikro okuyucuda (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) oda sıcaklığında ve karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin ardından örneklerin absorbansı 750 nm'de belirlenmiştir. Yukarıda bahsedilen prosedür kalibrasyon eğrisi hazırlamak için kullanılan farklı konsantrasyonlardaki galik asit (GA) çözeltileri için de uygulanmış ve GA standart grafiği oluşturulmuştur. Sonuçlar mg GAE/g olarak verilmiştir.

## DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

DPPH radikal süpürücü aktivite analizi [27]'ne göre küçük değişikliklerle yürütülmüştür. Örnek (30 µL) üzerine DPPH çözeltisi (270 µL) eklenmiş ve 1 saat inkübasyon süresince oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Inkübasyon sonunda 520 nm'de mikro okuyucuda (Multiscan FC, Thermo, İstanbul) absorbans belirlenmiştir. Sonuçlar Eşitlik 1'e göre hesaplanmıştır:

$$\% = \frac{A_k - A_0}{A_k} \times 100 \quad (1)$$

Ak: kontrol absorbansını, A0: örnek absorbansını göstermektedir.

Sonuçlar Trolox kalibrasyon eğrisi kullanılarak mg TE/ g ZY olarak verilmiştir.

## Metal Şelatlama Aktivitesi

Zeytin yaprağı ekstraktı (400 µL) ve FeCl<sub>2</sub> (50 µL, 2 mM) deney tüplerine eklenip 30 dakika 25°C'de inkübasyona bırakılmış ve sürenin ardından ortama ferrozin (200 µL, 5 mM) ve etanol (3.350 mL) eklenmiştir. 10 dakika inkübasyon süresinin ardından örneklerin absorbansı spektrofotometrede (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu, Japonya) 542 nm'de belirlenmiştir. Aşağıdaki eşitlik kullanılarak % şelatlama belirlenmiştir [28]:

$$\% = \frac{A_k - A_0}{A_k} \times 100 \quad (2)$$

Burada Ak: kontrol absorbansını, A0: örnek absorbansını göstermektedir.

Şelatlayıcı bir ajan olarak bilinen EDTA ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak sonuçlar µmol EDTA/g ZY olarak verilmiştir.

## Kinetik Model

Bu çalışmada, Peleg modeli ve ikinci dereceden kinetik model olmak üzere iki farklı matematiksel yaklaşım kullanılmıştır. Fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunun kinetik modellenmesi elde edilen deneysel veriler ile her bir modele uydurularak karşılaştırılmıştır [22].

## Peleg Modeli

Peleg eşitliği (Eşitlik 3) üstel olmayan ampirik bir eşitliktir [29, 30]:

$$Ct = \frac{1}{K_1 + K_2 t} \quad (3)$$

Burada Ct, t (dk) zamanında ekstrakttaki (mg/mL) fenolik bileşen konsantrasyonunu, K<sub>1</sub>, hız sabiti (dk. mL/mg) ve K<sub>2</sub>, kapasite sabitidir (mL/mg). Peleg modeli kullanılarak ekstraksiyon hızı B<sub>0</sub> (mg/mL dk.) Eşitlik 4'e göre belirlenmiştir.

$$B_0 = \frac{1}{K_1} \quad (4)$$

## İkinci Derece Kinetik Model

Katı-sıvı ekstraksiyon işlemi, bir adsorpsiyon işleminin tersi olarak düşünülebilir, bu nedenle adsorpsiyon kinetik eşitliklerinin temelleri katı-sıvı ekstraksiyonuna uygulanabilir [31]. [33]'e göre kullanılan ikinci derece ekstraksiyon kinetik modeli Eşitlik 5'te verilmiştir:

$$\frac{dCt}{dt} = k_b (C_{eq} - Ct)^2 \quad (5)$$

Burada k<sub>b</sub> (mL/mg dk), ikinci dereceden ekstraksiyon hızı sabitidir. C<sub>eq</sub> (mg GAE/g) ise ekstrakt içindeki fenolik bileşen denge konsantrasyonudur.

t=0 ile t ve Ct=0 ile Ct sınır koşulları altında ikinci dereceden bir ekstraksiyon için entegre hız yasası Eşitlik 6'ya göre yazılabilir [32]:

$$Ct = \frac{k_1 \cdot t \cdot C_{eq}^2}{1 + k_1 \cdot t \cdot C_{eq}} \quad (6)$$

## İstatistiksel Analiz

Örnekler arasında istatistiksel farklılıklar Minitab 17 (Minitab Ltd., Coventry, Birleşik Krallık) kullanılarak %95,0 güven düzeyinde ANOVA ve TUKEY testleri ile incelenmiştir. Kinetik modellerin parametreleri, doğrusal olmayan regresyon ile tahmin edilmiştir. Parametrelerin değerlendirilmesinde Statistica (Tibco Software Inc. ABD) kullanılmıştır. Ayrıca tahmini standart hata (SEE) (Eşitlik 7) her bir modelin uyumluluğunu değerlendirmek için belirlenmiştir.

$$SEE = \sqrt{\sum \frac{(C_{t\text{tahmini}} - C_{t\text{deneysel}})^2}{N}} \quad (7)$$

C<sub>t<sub>deneysel</sub></sub>, t zamanındaki ekstraktın fenolik bileşen konsantrasyonunun deneysel değeri, C<sub>t<sub>tahmini</sub></sub> tahmin edilen fenolik bileşen değeri ve N, gözlem sayısıdır.

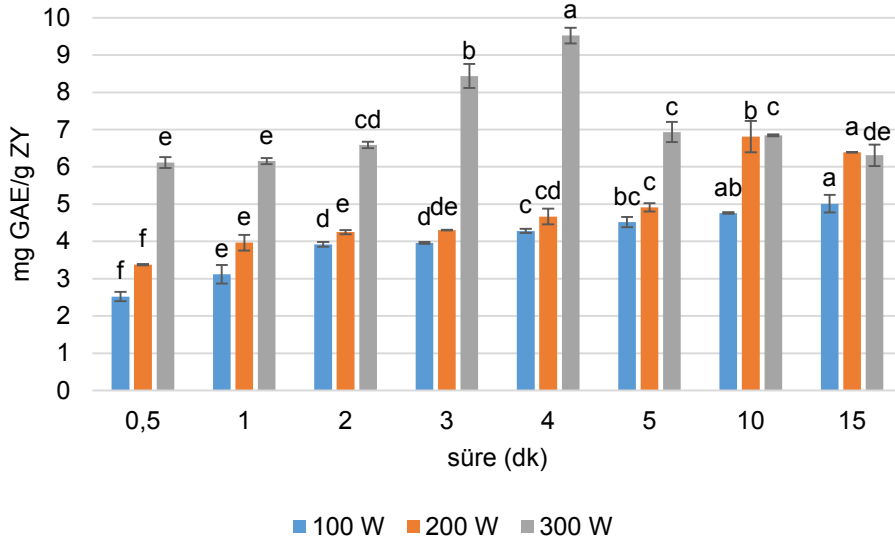
## BULGULAR ve TARTIŞMA

### Toplam Fenolik Bileşen

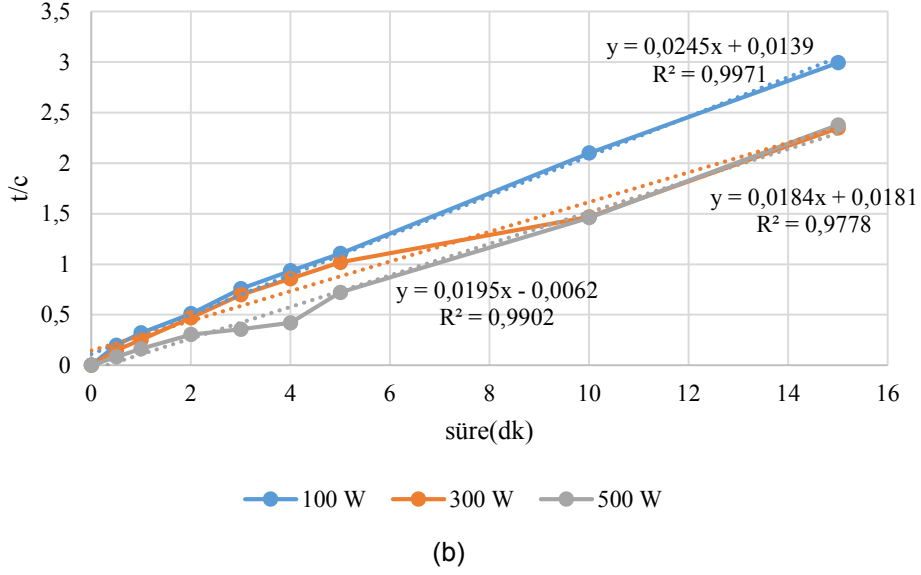
MDE ile farklı güç ve sürelerde elde edilen TPC verileri Şekil 1a'da verilmiştir. Mikrodalg gücünün ve sürenin ekstraksiyon verimi üzerine önemli etkilerinin olduğu görülmektedir. Ekstraksiyon prosesi üç farklı adımda

gerçekleşir: substratın partikülün dış yüzeyinden yaklaşık olarak sabit bir hızla çıkarıldığı bir denge fazı gerçekleşir. Daha sonra, bu aşamayı, konveksiyon ve difüzyon yoluyla kütle transferinin hakim olduğu difüzyona ara geçiş aşaması izler. Son aşamada, ekstraksiyon hızı düşüktür ve çözünen kendisini matrikse bağlayan ve ekstraksiyon çözücüsüne yayılan etkileşimlerin üstesinden gelmelidir [34]. 100W güç uygulanan örneklerde TPC değerinin süre ile doğru orantılı olarak arttığı görülmektedir. 300W güç uygulanan örneklerde 10. dakikaya kadar bir artış gözlenirken bu noktadan sonra TPC değerinin düştüğü görülmüştür. 500W uygulamada ise en yüksek TPC verimi 4. dakikada elde edilmiş ve bu noktadan sonra verim düşüş göstermiştir. [22] yaptıkları çalışmada 0.5 ile 4. dakika arasındaki mikrodalga uygulamalarında verim artarken ilerleyen sürelerde verimin azaldığını bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada *Vernonia amygdalina* (Afrika'da yetişen küçük bir çalı) yapraklarından fenoliklerin ekstraksiyonu sırasında, artan uygulama süresi ile ekstraksiyon veriminde başlangıçta bir artış daha sonra düşüş bildirilmiştir [35]. MDE'da uygulama süresiyle birlikte başlangıçta artış meydana gelse de, uzun süreli uygulamalarda fenolik bileşiklerin olası bozunması nedeniyle ekstraksiyon verimini azaldığı bildirilmiştir [25]. En yüksek TPC verimi 500W uygulamada 4. dakikada  $9.52 \pm 0.21$  mg GAE/mL olarak elde edilmiştir. 100W güç uygulanmış örneklerde en yüksek verim 15. dakikada  $5.01 \pm 0.23$  mg GAE/mL ve 300W uygulamada 10. dakikada  $6.81 \pm 0.43$  mg GAE/ mL olarak bulunmuştur. 500W uygulamada 4 dakika gibi kısa bir sürede yüksek verimin elde edildiği görülmektedir. *Hibiscus sabdariffa* bitkisinin yapraklarından fenolik bileşenlerin eldesinde MDE'nun incelendiği bir çalışmada 10:1 mL/g sabit

çözücü/numune oranı, 40°C sıcaklık ve 30 ila 180 s arasında değişen sürelerde mikrodalga güçleri uygulanmış mikrodalga gücü arttıkça verimin arttığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, mikrodalga gücü 300'den 500W'a artırıldığında verimin arttığı ve 3 dakikalık ekstraksiyon süresinde *Hibiscus sabdariffa*'den en yüksek verimi elde etmek için 500W mikrodalga gücünün uygun olduğu bildirilmiştir [25]. Nar kabuklarından MD fenolik bileşen ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada uygulanan gücün 173W'tan 600W'a artmasıyla verimin arttığı gözlemlenirken, 100W'dan 173W'a yükseldiğinde ters bir eğilim olduğu bildirilmiştir [22]. Bu durum artan mikrodalga gücü ile moleküller üzerinde iyonik iletim ve dipol rotasyonları sayesinde daha fazla elektromanyetik enerjinin transfer edilmesi ve bunun sonucunda ekstraksiyon sisteminin hızla ısınmasına atfedilebilir [36]. Ayrıca mevcut çalışmada kullanılan mikrodalga sisteminde artan güç ile artan ekstraksiyon sıcaklığı kontrol edilemediğinden ekstraksiyon verimine güç ile birlikte artan sıcaklığın etkisi de söz konusudur. Mikrodalga gücündeki artış sıcaklığı arttırdığı için ekstraksiyon veriminin artmasına neden olduğu görülmüştür. Ancak artan güç ve uygulama süresi ile meydana gelen sıcaklıkta ki aşırı artışlar fenolik bileşiklerin bozunmasına ve belli bir süreden sonra verimde azalmaya neden olur [35, 37]. Mevcut çalışmada ekstraktların TPC değerleri  $20.17 \pm 1.01$  ile  $76.16 \pm 1.69$  mg GAE/g ZY olarak bulunmuştur. Aseton, su, metanol ve etanol gibi farklı çözücüler ve çözücü oranları kullanılarak zeytin yaprağından ultrason destekli fenolik bileşenlerin ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada TPC değerleri 106.50 mg GAE /g ile 2.94 mg GAE/g olarak bildirilmiştir [38].



(a)



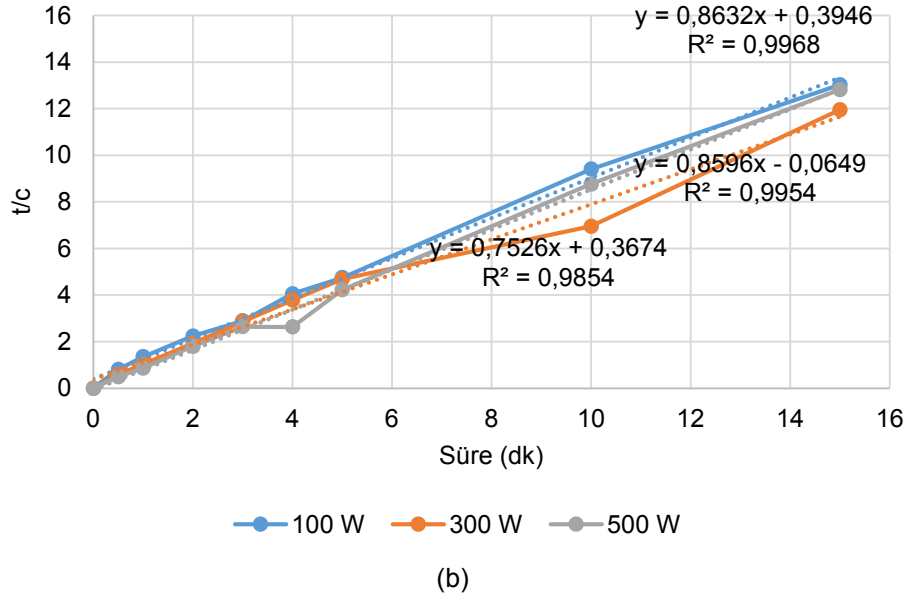
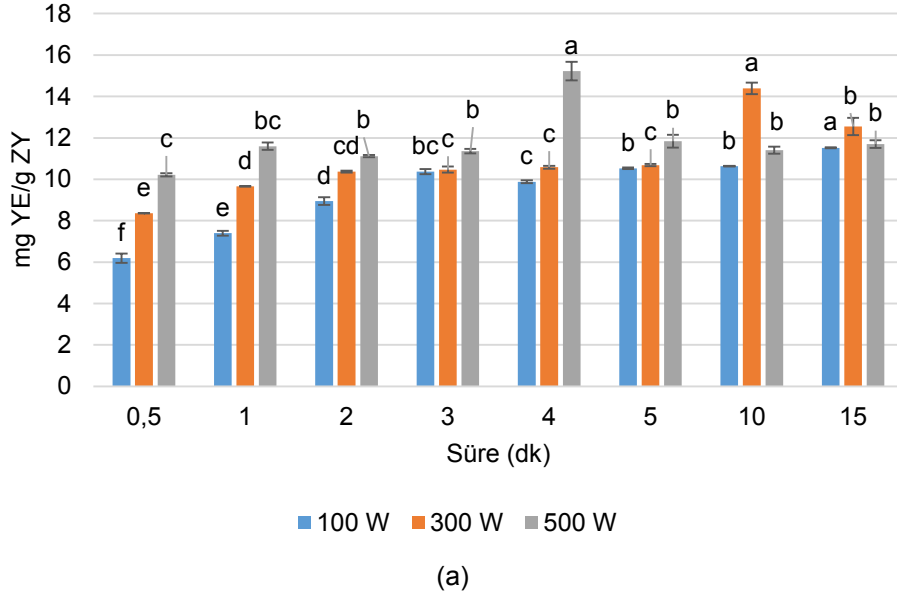
Şekil 1. Toplam fenolik bileşen ekstraksiyonu (Şekil 1a; Uygulanan farklı güçlerde zamana karşı elde edilen toplam fenolik bileşen miktarı; Şekil 1b; t/c ve fenolik bileşen arasındaki korelasyon. <sup>a-f</sup>: aynı güç uygulamasında farklı sürelerin arasındaki istatistiksel farkı Tukey testine göre göstermektedir (p<0.05) \*ZY; zeytin yaprağı

*Figure 1. Total phenolic component extraction (Figure 1a; Total phenolic contents against time at different microwave powers; Figure 1b; correlation between t/c and phenolic content. a-f shows the statistical difference between different times at the same power application according to the Tukey test (p<0.05) \*ZY; olive leaf*

### DPPH Radikal Süpürücü Aktivite

Fenolik bileşikler içeren bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, hidrojen atomları veya elektronları verici olma ve serbest radikalleri yakalama kapasitelerinden kaynaklanmaktadır. DPPH analizi, bitki ekstraktlarının bileşenlerinin hidrojen atomları vericisi olarak hareket etme kabiliyetini kanıtlamak için kullanılan testlerden biridir [39]. Farklı güç ve sürede gerçekleştirilen MDE'dan elde edilen ekstraktlara ait DPPH süpürücü aktivite değerleri Şekil 2a'da verilmiştir. Elde edilen sonuçların TPC verileri ile paralellik gösterdiği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada zeytin yaprağı etil asetat ekstraktına ait DPPH radikal süpürücü aktivitenin, fenolik içeriği ile iyi bir korelasyon gösterdiği bildirilmiştir [40]. 100W'lık uygulama için süreyle birlikte doğrusal bir artış meydana geldiği görülmektedir. 3., 4., 5. ve 10. dakika örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değilken 15. dakika örneğinin DPPH süpürücü aktivite değeri diğer örneklerden yüksek ve istatistiksel olarak farklı bulunmuştur (p<0.05). 300W mikrodalga gücü uygulanarak elde edilen ekstraktlarda en yüksek DPPH süpürücü aktivite değeri 10.63±0.02 mg TE/ g ZY olarak 10. dakika ekstraktından elde edilmiştir. 15. dakikada ise antioksidan aktivitenin azaldığı görülmektedir. 500W güç uygulanmış örneklerde ise en

yüksek DPPH süpürücü aktivite değeri 4. dakikada (15.22±0.45 mg TE/ g ZY) elde edilmiştir. 5.dakika örneğinde antioksidan aktivitenin azaldığı ve 5., 10. ve 15. dakika örnekleri DPPH süpürücü aktivite değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmektedir (p>0.05). Çözücüsüz MDE'nun incelendiği bir çalışmada zeytin yapraklarından elde edilen en yüksek DPPH süpürücü aktivite değeri 20 mg TE/g kuru yaprak olarak bildirilmiştir [41]. Rus zeytin yapraklarından MD fenolik bileşen ekstraksiyonunun incelendiği bir çalışmada çözücü olarak farklı konsantrasyonlarda etanol- su karışımı kullanılmış ve DPPH süpürücü aktivite 4.86-17.25 mg TE/g olarak bildirilmiştir. Ekstraksiyonda kullanılan çözücü farklılıkları ekstraksiyon verimini etkilemektedir [13]. DPPH süpürücü aktivite değerleri hegzan kullanılarak elde edilen zeytin yaprağı ekstraktı için %55.5 olarak bildirilmiştir [40]. Ultrason destekli ekstraksiyonun incelendiği bir çalışmada farklı etanol konsantrasyonları ile hazırlanan çözücülerden elde edilen ekstraktların DPPH süpürücü aktivite değerleri %86.31 ile 97.97 arasında değiştiği bildirilmiştir [42]. Çözücü olarak suyun kullanıldığı mevcut çalışmada konsantrasyonu 1.25 mg/mL (ZY/su) olan örneklerin DPPH süpürücü aktivite değerleri %39.01 ile %94.74 arasında bulunmuştur.



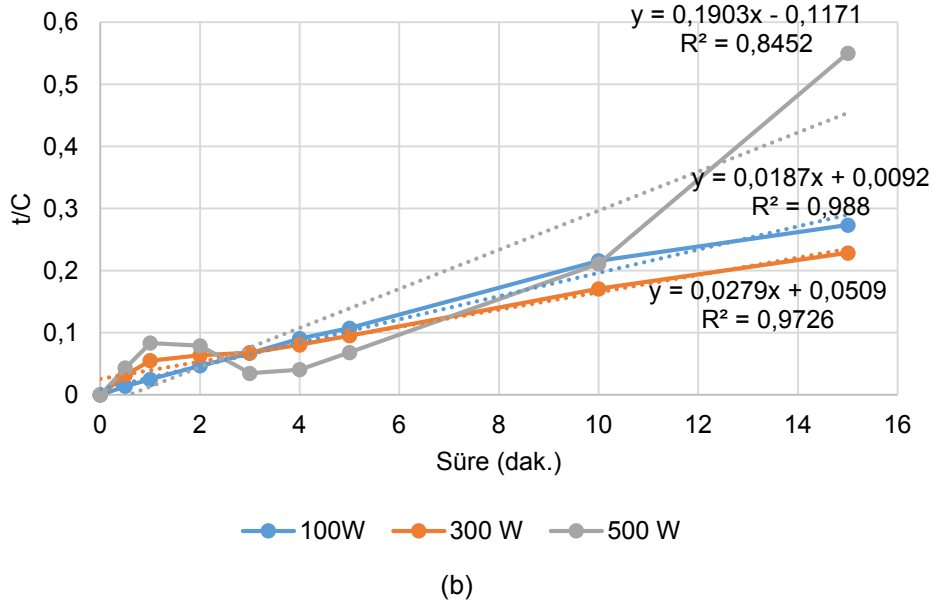
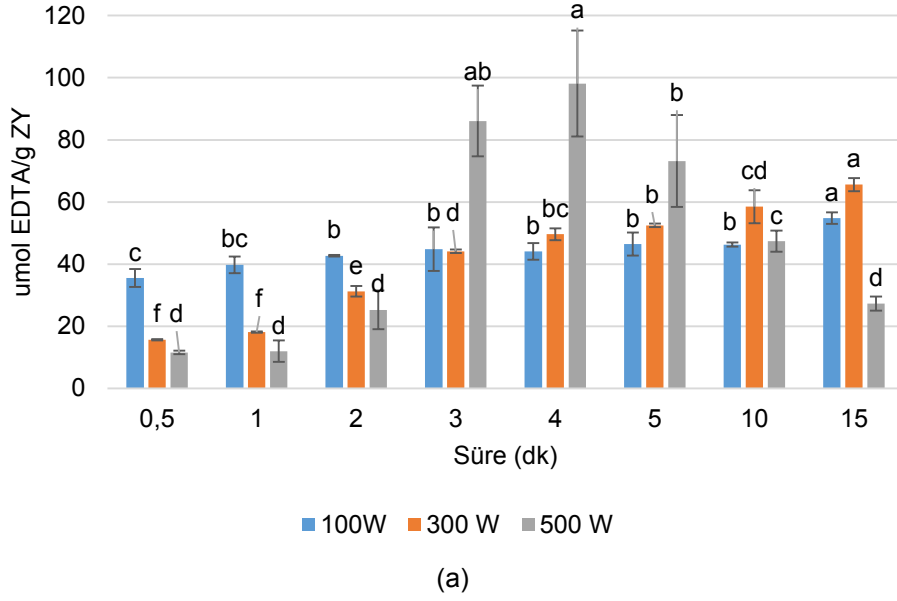
Şekil 2. DPPH radikal süpürücü aktivite (Şekil 2a; Uygulanan farklı güçlerde zamana karşı elde edilen DPPH radikal süpürücü aktivite, Şekil 2b; t/c ve DPPH radikal süpürücü aktivite arasındaki korelasyon). a-f: aynı güç uygulamasında farklı sürelerin arasındaki istatistiksel farkı Tukey testine göre göstermektedir ( $p < 0.05$ ) \*ZY; zeytin yaprağı

Figure 2. DPPH radical scavenging activity (Figure 2a; DPPH radical scavenging activity against time at different microwave powers, Figure 2b; correlation between t/c and DPPH radical scavenging activity). a-f shows the statistical difference between different times at the same power application according to the Tukey test ( $p < 0.05$ ) \*ZY; olive leaf

### Metal Şelatlama Aktivitesi

Ekstraktların metal şelatlama aktiviteleri incelendiğinde TPC ve DPPH süpürücü aktivite analizlerinde aynı güç uygulamalarında elde edilen değerler ile benzer bir ilişkinin olduğu görülmektedir (Şekil 3a). [43] yaptıkları çalışmada DPPH ve metal şelatlama aktivitesi için Pearson korelasyon katsayısının 0.996 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca DPPH ve metal şelatlama aktivitesinin mikrodalga gücü, ekstraksiyon süresi ve çözücü konsantrasyonunun ve bunların birbiriyle etkileşimin önemli bir rol oynadığını bildirmişlerdir. Diğer

analizlerde olduğu gibi en yüksek değer 500W güç uygulanmış 4. dakika örneğinde  $98.13 \pm 0.04$   $\mu\text{mol}$  EDTA/g ZY olarak gözlenmiştir. 500W için 4. dakikadan sonra artan süre ile birlikte metal şelatlama aktivitesi değerinin düştüğü görülmektedir. Bu durum ekstraksiyon süresinin uzamasıyla daha yüksek bir sıcaklığa ulaşılması ve fenoliklerin termal bozunması ile açıklanabilir [44]. 100 ve 300W güç uygulanmış örneklerde en yüksek metal şelatlama aktiviteleri 15 dakika mikrodalga uygulanmış örneklerde sırasıyla  $57.84 \pm 0.27$  ve  $65.59 \pm 0.23$   $\mu\text{mol}$  EDTA/g ZY olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Metal şelatlama aktivitesi (Şekil 3a; Uygulanan farklı güçlerde zamana karşı elde edilen metal şelatlama aktivitesi, Şekil 3b; t/c ve metal şelatlama aktivite arasındaki korelasyon. a-f: aynı güç uygulamasında farklı sürelerin arasındaki istatistiksel farkı Tukey testine göre göstermektedir (p<0.05). \*ZY; zeytin yaprağı

Figure 3. Metal chelating activity (Figure 3a; Metal chelating activity against time at different microwave powers, Figure 3b; correlation between t/c and metal chelating activity. a-f shows the statistical difference between different times at the same power application according to the Tukey test (p < 0.05). \*ZY; olive leaf

### Kinetik Model

DeneySEL verilere uyması için mevcut çalışmada Peleg modeli ve ikinci dereceden kinetik model olmak üzere iki farklı kinetik model kullanılmıştır. [45]'e göre ekstraktların zaman/konsantrasyon (t/C) oranı için lineer eğrileri elde edilmiş, TPC, DPPH süpürücü aktivite ve metal şelatlayıcı aktivite için sırasıyla Şekil 1b, Şekil 2b ve Şekil 3b'de sunulmuştur Verilerin değerlendirilmesi için Statistica (Tibco Software Inc., ABD) programı kullanılmıştır. DeneySEL veriler doğrultusunda lineer

olmayan regrasyon ile programdan elde edilen R değerleri ve ayrıca hesaplanan SEE değerleri Tablo 1'de verilmiştir. SEE değerleri 100, 300 ve 500W güç uygulanmış örnekler için Peleg modelinde sırasıyla 0.64, 0.76 ve 1.51 ve ikinci dereceden model için ise sırasıyla 0.78, 1.39 ve 3.32 olarak bulunmuştur. SEE değerinin düşük oluşu deneySEL verilerin modele uygun olduğunu göstermektedir [22]. Değerler incelendiğinde Peleg modeli uygulandığında SEE değerlerinin düşük olduğu ve dolayısıyla verilerin Peleg modeline daha uygun olduğu görülmektedir. Daha önceki çalışmalarda da Peleg modelinin gıda maddelerine uygulanabilirliği

kapsamlı bir şekilde kanıtlanmıştır [22, 29, 46]. Peleg modelinde  $K_1$  değerinin düşük olması işlemin ne kadar hızlı olduğunu göstermektedir [47].  $K_1$  değeri uygulanan mikrodalga gücüyle ters orantılı bir şekilde azalmaktadır (Tablo 1) artan güç ile daha yüksek bir reaksiyon hızına ulaşıldığı görülmektedir. Mikrodalga gücü numunede merkezi bir ısınma sağlar, oluşan bu sıcaklık artışı bitki matrisinin zarar görmesi için bir itici güç görevi görür,

böylece çözünen madde difüze olur ve çözücü içinde çözülür ve buna bağlı olarak hız sabiti artar [22]. Ancak daha yüksek güç kullanıldığında veya uygulama süresi uzatıldığında daha yüksek bir sıcaklık meydana gelir ve hücre duvarının hızlı yırtılması gerçekleşebilir. Sonuç olarak safsızlıklar da istenen çözünen ile birlikte çözücüye sızabilir [34].

Tablo 1. Zeytin yapraklarından fenolik bileşiklerin mikrodalga destekli ekstraksiyonu için uygulanan kinetik modellerin istatistiksel parametreleri\*

**Table 1. Statistical parameters of kinetic models for microwave assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves\***

Güç (W)	Peleg Modeli				İkinci Derece Model		
	$K_1$	$B_0$	SEE	R	Ceq	SEE	R
100	0.33	3.03	0.64	0.98	4	0.78	0.86
300	0.29	3.45	0.76	0.68	5	1.39	0.82
500	0.17	5.88	1.51	0.22	7	3.32	0.90

\*:  $K_1$ , hız sabiti (min mL/mg);  $B_0$ , ekstraksiyon hızı (mg/dk mL); Ceq,  $t_{\infty}$ daki konsantrasyon (mg GAE/g)

\*:  $K_1$ , rate constant (min mL/mg);  $B_0$ , extraction rate (mg/min mL); Ceq, concentration at  $t_{\infty}$  (mg GAE/g)

## SONUÇ

Ekonomik ve doğal antioksidanların araştırılmasına artan ilgi ve sentetik antioksidanların güvenliği konusundaki endişe doğal kaynaklardan çevre dostu tekniklerle antioksidan eldesine olan ilgiyi arttırmıştır. Zeytin yaprağı farklı ekstraksiyon işlemleriyle elde edilebilen ve konsantre edilebilen iyi bir ticari fenolik bileşik kaynağı olabilir. Zeytin yaprağı fenolik bileşen ekstraktları, gıda ürünleri için sentetik antioksidanların yerine kullanılabilir. Mevcut çalışmada, fenolik bileşiklerin MDE ile zeytin yaprağından fenolik bileşen eldesi için güç ve sürenin etkisi incelenmiştir. Fenolik bileşenleri zeytin yaprağından en yüksek verimle ( $9.52 \pm 0.21$  mg GAE/mL) geri kazanmak için çözücü olarak su kullanıldığında 500W güç uygulamasında 4 dakikanın yeterli olduğu görülmüştür. Ayrıca farklı güç ve sürelerde elde edilen ekstraktların antioksidan özellikleri DPPH radikal süpürücü aktivite ve metal şelatlama aktivitesi analizleri ile değerlendirilmiştir. 500W 4 dakika uygulama süresinde elde edilen ekstraktların DPPH süpürücü aktivite ve metal şelatlayıcı aktivite değerleri sırasıyla  $15.22 \pm 0.45$  mg TE/g ZY ve  $98.13 \pm 0.04$   $\mu$ mol EDTA/g ZY olarak bulunmuştur. Mikrodalga uygulamanın kütle transfer mekanizmasını daha iyi anlamak için, toplam fenoliklerin zeytin yaprağından farklı güç uygulamalarında ekstraksiyonu ve salınma kinetiği deneysel olarak incelenmiştir. SEE değerleri incelendiğinde verilerin diğer modellere göre Peleg modelinde daha düşük olduğu ve bu nedenle verilerin Peleg modeline daha uygun olduğu söylenebilir. Artan mikrodalga gücü ile daha yüksek bir reaksiyon hızına ulaşıldığı görülmektedir. Mikrodalga enerjisi işlem süresini azalttığı, alternatif çözücülerin (sulu etanol) ve yenilenebilir doğal ürünlerin kullanımına izin verdiği ve güvenli ve yüksek kaliteli bir ekstrakt/ürün sağladığı için yeşil süreç tanımının şartlarını karşılamaktadır. Bu düşük maliyetli teknolojinin uygulanmasından daha fazla fayda sağlamak için, gelecekteki çalışmalar da farklı

çözücü veya çözücü karışımlarının ve örnek/çözücü oranı etkilerinin ayrıntılı incelemeleri yapılabilir.

## KAYNAKLAR

- [1] Pérez-Bonilla, M., Salido, S., van Beek, T.A., Linares-Palomino, P.J., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A. (2006). Isolation and identification of radical scavengers in olive tree (*Olea europaea*) wood. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 311-318.
- [2] Goulas, V., Exarchou, V., Trognanis, A.N., Psomiadou, E., Fotsis, T., Briasoulis, E., Gerothanassis, I. P. (2009). Phytochemicals in olive-leaf extracts and their antiproliferative activity against cancer and endothelial cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(5), 600-608.
- [3] Mohammadi, A., Jafari, S.M., Esfanjani, A.F., Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food Chemistry*, 190, 513-519.
- [4] Ranalli, A., Marchegiani, D., Contento, S., Girardi, F., Nicolosi, M.P., Brullo, M.D. (2009). Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(7), 678-687.
- [5] Park, Y.K., Lee, W.Y., Park, S.Y., Ahn, J.K., Han, M.S. (2005). Antioxidant activity and total phenolic content of *Callistemon citrinus* extracts. *Food Science and Biotechnology*, 14(2), 212-215.
- [6] Talhaoui, N., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2015). Phenolic compounds in olive leaves: Analytical determination, biotic and abiotic influence, and health benefits. *Food Research International*, 77, 92-108.
- [7] Erbay, Z., Icier, F. (2010). Thin-layer drying behaviors of olive leaves (*Olea europaea* L.).



- Journal of Food Process Engineering*, 33(2), 287-308.
- [8] Gömen, M., Akkaya, L., Kara, R., Gök, V., Önen, A., Ektik, N. (2016). Zeytin yaprağı ekstraktı ilavesinin köftelerde *S. typhimurium*, *E. coli* o157 ve *S. aureus* gelişimi üzerine etkisi. *Akademik Gıda*, 14(1), 28-32.
- [9] Taamalli, A., Arráez-Román, D., Ibañez, 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(3), 791-798.
- [10] Chanioti, S., Siamandoura, P., Tzia, C. (2016). Evaluation of extracts prepared from olive oil by-products using microwave-assisted enzymatic extraction: effect of encapsulation on the stability of final products. *Waste and Biomass Valorization*, 7(4), 831-842.
- [11] Şahin, S., Bilgin, M., Dramur, M.U. (2011). Investigation of oleuropein content in olive leaf extract obtained by supercritical fluid extraction and soxhlet methods. *Separation Science and Technology*, 46(11), 1829-1837.
- [12] Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltsounis, A.L. (2014). Design optimization study of the extraction of olive leaves performed with pressurized liquid extraction using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 122, 323-330.
- [13] Darvishzadeh, P., Orsat, V. (2022). Microwave-assisted extraction of antioxidant compounds from Russian olive leaves and flowers: Optimization, HPLC characterization and comparison with other methods. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 27, 100368.
- [14] Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity in vitro. *Separation and Purification Technology*, 70(1), 63-70.
- [15] Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S. (2010). Microwave-assisted extraction of phenolic antioxidant compounds from peanut skins. *Food Chemistry*, 120(4), 1185-1192.
- [16] Zheng, X., Xu, X., Liu, C., Sun, Y., Lin, Z., Liu, H. (2013). Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions. *Separation and Purification Technology*, 104, 17-25.
- [17] Vieira, A., Abar, L., Chan, D., Vingeliene, S., Polemiti, E., Stevens, C., Norat, T. (2017). Foods and beverages and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies, an update of the evidence of the WCRF-AICR Continuous Update Project. *Annals of Oncology*, 28(8), 1788-1802.
- [18] Di Meo, M.C., De Cristofaro, G.A., Imperatore, R., Rocco, M., Giaquinto, D., Palladino, A., Zotti, T., Vito, P., Paolucci, M., Varricchio, E. (2021). Microwave-assisted extraction of olive leaf from five Italian cultivars: Effects of harvest-time and extraction conditions on phenolic compounds and in vitro antioxidant properties. *ACS Food Science & Technology*, 2(1), 31-40.
- [19] da Rosa, G.S., Vanga, S.K., Garipey, Y., Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102234.
- [20] Da-Wen, S., Song-Jiu, D. (1989). Study of the heat and mass transfer characteristics of metal hydride beds: a two-dimensional model. *Journal of the Less Common Metals*, 155(2), 271-279.
- [21] Sun, D.W., Deng, S.J. (1990). A theoretical model predicting the effective thermal conductivity in powdered metal hydride beds. *International Journal of Hydrogen Energy*, 15(5), 331-336.
- [22] Kaderides, K., Papaoikonomou, L., Serafim, M., Goula, A.M. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from pomegranate peels: Optimization, kinetics, and comparison with ultrasounds extraction. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 137, 1-11.
- [23] Dong, Z., Gu, F., Xu, F., Wang, Q. (2014). Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. *Food Chemistry*, 149, 54-61.
- [24] Li, M., Ngadi, M. O., Ma, Y. (2014). Optimisation of pulsed ultrasonic and microwave-assisted extraction for curcuminoids by response surface methodology and kinetic study. *Food Chemistry*, 165, 29-34.
- [25] Alara, O.R., Abdurahman, N.H. (2019). Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa calyces*: Kinetic modelling and process intensification. *Industrial Crops and Products*, 137, 528-535.
- [26] Singleton, V. (1985). Citation classic-colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Current Contents/Agriculture Biology & Environmental Sciences*, 48, 18-18.
- [27] Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., Choudhary, M.I. (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 103(4), 1247-1254.
- [28] Dinis, T.C., Madeira, V.M., Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 315(1), 161-169.
- [29] Poojary, M.M., Passamonti, P. (2015). Extraction of lycopene from tomato processing waste: kinetics and modelling. *Food Chemistry*, 173, 943-950.
- [30] Peleg, M. (1988). An empirical model for the description of moisture sorption curves. *Journal of Food Science*, 53(4), 1216-1217.
- [31] Goula, A.M. (2013). Ultrasound-assisted extraction of pomegranate seed oil—Kinetic modeling. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 492-498.

- [32] Pan, Z., Qu, W., Ma, H., Atungulu, G.G., McHugh, T.H. (2012). Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidants from pomegranate peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 19(2), 365-372.
- [33] Chan, C.H., Yusoff, R., Ngho, G.C. (2014). Modeling and kinetics study of conventional and assisted batch solvent extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(6), 1169-1186.
- [34] Chemat, F., Cravotto, G. (2012). Microwave-assisted extraction for bioactive compounds: theory and practice (Vol. 4): Springer Science & Business Media.
- [35] Alara, O.R., Abdurahman, N.H., Olalere, O.A. (2018). Optimization of microwave-assisted extraction of flavonoids and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology*, 107, 36-48.
- [36] Gfrerer, M., Lankmayr, E. (2005). Screening, optimization and validation of microwave-assisted extraction for the determination of persistent organochlorine pesticides. *Analytica Chimica Acta*, 533(2), 203-211.
- [37] Patil, D.M., Akamanchi, K.G. (2017). Microwave assisted process intensification and kinetic modelling: Extraction of camptothecin from *Nothapodytes nimmoniana* plant. *Industrial Crops and Products*, 98, 60-67.
- [38] Irakli, M., Chatzopoulou, P., Ekateriniadou, L. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds: Oleuropein, phenolic acids, phenolic alcohols and flavonoids from olive leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 124, 382-388.
- [39] Ardestani, A., Yazdanparast, R. (2007). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry*, 104(1), 21-29.
- [40] Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., Hammami, M. (2012). The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38, 146-152.
- [41] Şahin, S., Samli, R., Tan, A.S.B., Barba, F.J., Chemat, F., Cravotto, G., Lorenzo, J.M. (2017). Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, 22(7), 1056.
- [42] Şahin, S., Şamli, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.
- [43] Krishnaswamy, K., Orsat, V., Gariépy, Y., Thangavel, K. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 441-455.
- [44] Chen, Y., Xie, M.Y., Gong, X.F. (2007). Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 162-170.
- [45] Kadiri, O., Gbadamosi, S.O., Akanbi, C.T. (2019). Extraction kinetics, modelling and optimization of phenolic antioxidants from sweet potato peel vis-a-vis RSM, ANN-GA and application in functional noodles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4), 3267-3284.
- [46] Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Añó, V., Martín-Belloso, O. (2008). Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 210-216.
- [47] Ghafoor, M., Misra, N., Mahadevan, K., Tiwari, B. (2014). Ultrasound assisted hydration of navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(1), 409-414.
-