

ULTRASONİK DESTEKLİ EKSTRAKSİYON YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLEN ZEYTİN YAPRAĞI EKSTRAKTININ İYONİK JELASYON YÖNTEMİ İLE ENKAPSÜLASYONU VE KEFİR İÇECEĞİNDE KULLANILMASI

**Rabia Akçay-Salık, Ezgi Bitim, Özgün Köprüalan-Aydın,
Esin Selçuk, Özgül Altay, Figen Kaymak-Ertekin***
Ege Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye

Geliş / *Received*: 22.09.2022; Kabul / *Accepted*: 30.12.2022; Online baskı / *Published online*: 18.01.2023

Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. (2023). Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen zeytin yaprağı ekstraktının iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve kefir içeceğinde kullanılması. *GIDA* (2023) 48 (1) 73-93 doi: 10.15237/gida.GD22092

Akçay-Salık, R., Bitim, E., Köprüalan-Aydın, Ö., Selçuk, E., Altay, Ö., Kaymak-Ertekin, F. (2023). Encapsulation of olive leaf extract obtained by ultrasonic-assisted extraction method and use in kefir beverage. GIDA (2023) 48 (1) 73-93 doi: 10.15237/gida.GD22092

ÖZ

Bu çalışmada zeytin yaprağından fenolik bileşenler ultrasonik destekli yöntem ile ekstrakte edilerek çözgen tipi (etanol ve etil asetat); katı/çözgen oranı (1:10, 1:15 ve 1:20 (a/h)); çözgen:su konsantrasyonu (90:10 (h/h), 80:20 (h/h), 70:30 (h/h)) belirlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite değerleri; 1:20 (a/h) katı/çözgen oranı ve %90:10 (h/h) etanol-su karışımı koşullarında belirlenmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yönteminde; sıcaklık, süre ve ultrasonik genliğinin ekstraksiyon verimi, Box Behnken deney tasarımı kullanılarak, toplam fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerine etkisi incelenerek, optimum süre 5.31 dak, sıcaklık 39.27°C ve genlik %40.51 olarak belirlenmiştir. Daha sonra ekstraktlar iyonik jelasyon yöntemiyle enkapsüle edilmiş, ekstrakt konsantrasyonu, kitosan konsantrasyonu ve bekleme süresi CCRD deney tasarımı kullanılarak enkapsülasyon etkinliği ve toplam fenolik madde üzerine etkisi optimize edilmiştir. Enkapsülasyon işleminde optimum ekstrakt konsantrasyonu %1.04, kitosan konsantrasyonu %0.5 ve bekleme süresi ise 11.24 dak olarak saptanmıştır. Enkapsülasyon işleminin ekstraktın acı tat ve aromasını baskıladığı ve fonksiyonel gıda amacıyla üretilen kefir içerisine eklenen kapsüllerin laktik asit bakterilerini (LAB) inhibe edici etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Zeytin yaprağı, fenolik bileşenler, ultrasonik destekli ekstraksiyon, iyonik jelasyon, kefir

ENCAPSULATION OF OLIVE LEAF EXTRACT OBTAINED BY ULTRASONIC-ASSISTED EXTRACTION METHOD AND USE IN KEFIR BEVERAGE

ABSTRACT

In this study, the extraction of phenolic compounds from olive leaves by ultrasonic assisted method and the solvent type (ethanol and ethyl acetate); solvent: water concentration (90:10 (v/v), 80:20

*Yazışmalardan sorumlu yazar / *Corresponding author*:

✉: figen.ertekin@ege.edu.tr

☎: (+90) 232 311 3006

☎: (+90) 232 342 7592

Rabia Akçay Salık; ORCID no: 0000-0002-9031-3160

Ezgi Bitim; ORCID no: 0000-0001-6454-6545

Özgün Köprüalan Aydın; ORCID no: 0000-0001-8800-7714

Esin Selçuk; ORCID no: 0000-0002-3745-1791

Özgül Altay; ORCID no: 0000-0003-0067-9319

Figen Kaymak Ertekin; ORCID no: 0000-0001-5042-3659

(v/v), 70:30 (v/v)) and solid/solvent ratio (1:10, 1:15 and 1:20 (w/v)) were determined. The highest extraction yield (%), total phenolic content and antioxidant capacity values were determined for 1:20 (w/v) solids/solvent ratio and 90:10% (v/v) ethanol-water mixture. In the ultrasonic assisted extraction method; The effects of temperature, time and ultrasonic amplitude on extraction efficiency, total phenolic substance and antioxidant capacity were investigated using Box Behnken experimental design, and optimum time was determined as 5.31 min, temperature 39.27°C and amplitude 40.51%. Then, the oleuropein-rich extract was encapsulated using the ionic gelation method, and the effects of extract concentration, chitosan concentration and waiting time on the encapsulation efficiency and total phenolic content were optimized using CCRD experimental design. In the encapsulation process, the optimum conditions were determined as 1.04%, the extract concentration; 0.5%, the chitosan concentration and 11.24 min, the waiting time. In addition, it was determined that microcapsules added to kefir produced for functional food did not show an inhibitory effect on LAB bacteria and suppressed the bitter taste and aroma of the extract.

Keywords: Olive leaf, phenolic compounds, ultrasonic assisted extraction, ionic gelation, kefir

GİRİŞ

Akdeniz bölgesinin en önemli bitkilerinden birisi olan zeytin, içerdiği biyoaktif bileşenler sayesinde sağlığın korunmasında ve kronik hastalıkların önlenmesinde büyük rol oynamaktadır (Vural vd., 2021). Zeytin ağırlığının %10'unu oluşturan zeytin yaprağı, zeytinin toplanması, budanması ve zeytinyağına işlenmesi sırasında yan ürün/atık ürün olarak oluşmakta, hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra son yıllarda, içerdiği yüksek miktarda biyoaktif bileşenler sebebiyle dikkat çekmektedir (Kılıç, 2020; Arslan vd., 2021). Zeytin yaprağı, fenolik bileşikler, flavonoidler ve sekoiridoitler açısından zengin olup, katma değeri yüksek, ucuz biyoaktif hammadde kaynağı olarak kabul edilmekte (Şahin vd., 2018; Tarchoune vd., 2019; Gür vd., 2020), bu özelliği ile gıda ve ilaç endüstrisinde büyük ilgi görmektedir. Ayrıca, zeytin yaprağı ekstraktları, doğal antioksidan olarak gıdaların muhafazası ve biyoaktif gıdaların üretimi için büyük bir potansiyel sunmaktadır (Lama-Muñoz vd., 2019; Borjan vd., 2020). Zengin bir polifenol kaynağı olarak dikkat çeken zeytin yaprağı, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiviral, antikanser ve ayrıca kardiyovasküler, nöroprotektif ve hepatoprotektif etkiler ile sağlık üzerine önemli faydalar göstermektedir (Temur ve Temiz, 2018; Danahaliloğlu vd., 2018; Gürbüz ve Ögüt, 2018; Medina vd., 2019; Yin vd., 2019; Bayram vd., 2020; Kaya ve Demir 2020, Salık ve Çakmakçı 2021). Zeytin yaprağında en yüksek oranda bulunan fenolik bileşik olan oleuropein sekoiridoit adı verilen gruba ait olup, bu biyoaktif özelliklerden sorumlu ana bileşiktir (Lama-Muñoz vd., 2019; Markhali vd., 2020). Oleuropein zeytin

ve zeytinyağının acılığında sorumlu bileşik olup, olgunlaşmamış zeytinde meyve ağırlığının yaklaşık %2'si oranında bulunmakta ve olgunlaşmayla birlikte azalmaktadır (Acar-Tek ve Ağagündüz, 2020; Kaya ve Demir, 2020). Aynı zamanda zeytinyağında %0.005-0.12 ve zeytin yapraklarında ise %1-14 oranında bulunmaktadır (Irakli vd., 2018; Arı, 2022).

Son yıllarda, zeytin yaprağında bulunan biyoaktif moleküllerin özellikle ana bileşen olan oleuropein ekstraksiyonu üzerine çalışmalar artmıştır. Bitkilerden biyoaktif bileşenlerin ekstraksiyonu genellikle geleneksel çözügen ekstraksiyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Ancak bu yöntem, bazı değerli bileşiklerin kaybına, düşük ekstraksiyon verimlerine, uzun ekstraksiyon sürelerine ve yüksek enerji tüketimine neden olabilmektedir (Cifá vd., 2018; Albero vd., 2019). Son yıllarda, ekstraksiyon süresini kısaltmak, verimi artırmak ve daha az çözügen kullanmak amacıyla yeni ve yeşil ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesine ilgi artmıştır (Chemat vd., 2019). Mikrodalga destekli ekstraksiyon, basınçlı sıvı ekstraksiyonu ve süperkritik sıvı ekstraksiyon teknikleri zeytin yaprağından oleuropein ekstraksiyonu için kullanılan gelişmiş yeşil yöntemlerdir. Ancak bu yöntemlerin çoğu yüksek basınç altında çalışılan ve yüksek enerji maliyeti gerektiren yöntemlerdir. Bu nedenle etkin ve düşük maliyetli bir ekstraksiyon yöntemi olarak ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi, ekstraksiyon süresini ve çözügen miktarını azaltma ve ayrıca biyoaktif bileşiklerin geri kazanımlarını artırma potansiyeline sahip bir teknik olarak

karşımıza çıkmaktadır (Irakli vd., 2018). Ultrasonik destekli ekstraksiyon sistemlerinde, örneğe uygulanan frekanslarla akustik titreşimler oluşmakta ve bu titreşimler içinden geçtiği sıvıda kavitasyon meydana getirerek sıvı ortamda çok sayıda küçük kabarcıklar üretilmesine ve bu sayede örneğin mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlamaktadır (Kumar vd., 2021). Oluşan bu kavitasyonlar sayesinde kütle transferi ve hücre içi maddelerin ekstraksiyon ortamına salınımı artmaktadır. Zeytin yaprağından oleuropein ekstraksiyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada ultrasonik destekli ekstraksiyonun geleneksel çözügen ekstraksiyonuna göre daha hızlı, basit ve verimli olduğu bulgulanmıştır (Cifá vd., 2018). Bununla birlikte, ekstraksiyon maliyetlerini azaltarak ve fonksiyonel aktivitelerini koruyarak biyoaktif bileşiklerin verimini artırmak için ekstraksiyon koşullarının optimize edilmesi önem arz etmektedir.

Gıda, ilaç ve kozmetik sektörlerinde bitkilerden elde edilen doğal ekstraktlara olan ilgi son yıllarda artmış olup, bu ekstraktlar fonksiyonel gıda üretiminde kullanılabilir (Cifá vd., 2018). Oleuropeinin yanı sıra biyofenollerce zengin zeytin yaprağı ekstraktları, besinsel özellikleri artırılmış, antimikrobiyal ve antioksidan özellikleriyle raf ömrü uzatılmış fonksiyonel gıda formülasyonlarında dikkat çekmektedir. Bununla birlikte çözünürlüklerinin düşük olması, ısı, ışık ve pH gibi çevresel koşullara duyarlı olması, aynı zamanda kötü tat ve aromaya sahip olmaları kullanımlarını kısıtlamaktadır (Güngör vd., 2022). Bu maddelerin çözünürlüklerini ve biyoerişilebilirliklerini arttırmak amacıyla farklı enkapsülasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Tavakoli vd., 2018; González-Ortega vd., 2021). Püskürtmeli kurutma/soğutma, dondurarak kurutma, koaservasyon ve iyonik jelasyon gıda bileşenlerinin kaplanması için yaygın kullanılan yöntemlerdir (Aydın ve Ünlüel, 2021). Nanokapsülleme-mikrokapsülleme tekniklerinden biri olan iyonik jelasyon yöntemi, polimer çözeltisi ile aktif madde homojenize edilerek şırınga yardımıyla küresel jel partikülleri elde etmek amacıyla dağıtıcı faza (CaCl₂ gibi) damlatılarak gerçekleştirilmektedir. Damlatma

metodu kalsiyum-aljinat taneciklerinin elde edilmesinde kullanılan bir metot olup, çapraz bağlanma CaCl₂ molekülündeki kalsiyum ile sodyum aljinat molekülündeki sodyumun bağlanması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntem uygulanabilirliği kolay, maliyeti düşük ve yumuşak formülasyon koşullarına sahip olması nedeniyle popüler bir yöntemdir (Doderó vd., 2019; de Moura vd., 2019). Literatür incelendiğinde iyonik jelasyon yönteminin aronia üzümü ekstraktlarının (Tzatsi vd., 2021), hibiskus ekstraktlarının (de Moura vd., 2019) ve keten tohumu yağı ekstraktlarının (Wissam and Samer, 2019) enkapsülasyonunda kullanıldığı görülmektedir.

Bu çalışmada, yan/atık ürün olan zeytin yaprağından oleuropeince zengin ekstraktların ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilerek ekstraksiyon işleminin optimize edilmesi, optimum koşullarda üretilen ekstraktın acı tat ve keskin aromasının baskılanması ve stabilitesinin artırılması amacıyla iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsüle edilerek işlemin optimize edilmesi hedeflenmiştir. Ayrıca sağlık üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinen oleuropeince zengin enkapsüle ekstraktın kefir içine eklenerek fonksiyonel özelliğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal

Çalışmada hammadde olarak kullanılan zeytin yaprakları (*Olea europaea* L.), Aydın Memecik tipi zeytinlerin toplanması sırasında atık olarak oluşan yapraklardan toplanmış, yapraklar oda sıcaklığında (25°C) kurutulmuş ve öğütüldükten (Fakir, HAUSGERATE aromatic) sonra -18°C'de muhafaza edilmiştir.

Ekstraksiyon yöntemi

Katı/çözgen oranının, çözgen tipinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi, ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu

Yaklaşık 1 gram kurutulmuş ve öğütülmüş zeytin yaprağı kullanılarak gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen ekstraktlar, filtre kağıdından süzülerek analiz işlemine kadar -18°C'de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyon işlemleri ultrasonik su banyosu (37 kHz frekans,

Isolab, 621.06.006) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemlerinde öncelikle en uygun katı/çözgen oranı belirlenmiştir. Bu amaçla en uygun katı/çözgen oranının belirlenmesinde, 3 farklı katı/çözgen oranı (1:10, 1:15 ve 1:20 (a/h)) denenmiş ve sabit koşullarda (10 dak, 40°C, %70 genlik), çözgen olarak %80-20 (h/h) etanol-su çözeltisi kullanılarak ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. En yüksek toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon verimini veren katı/çözgen oranı belirlenmiştir. Katı/çözgen oranı belirlendikten sonra, çalışma kapsamında kullanılacak çözgen tipi ve çözgen konsantrasyonunun belirlenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde en uygun çözgen tipi ve konsantrasyonunun belirlenmesi için, iki farklı çözgen (etanol ve etil asetat) ve üç farklı çözgen/su konsantrasyonu (90:10 (h/h), 80:20 (h/h), 70:30 (h/h)) denemeleri diğer ekstraksiyon koşulları (10 dak, 40°C, 70% genlik) ve katı/çözgen oranı sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. En yüksek toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon veriminin elde edildiği çözgen tipi ve çözgen/su konsantrasyonu belirlenmiştir. Ekstraksiyon denemeleri aynı anda iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminin optimizasyonu aşamasında, yöntemle özgü bağımsız işlem değişkenleri olarak süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%) optimize edilmiş ve Box Behnken deney tasarımına göre oluşturulan deneme deseni Çizelge 1'de verilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon denemeleri, birinci aşamada belirlenen sabit katı-çözgen oranı, çözgen tipi ve çözgen/su konsantrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Deneme desenin de belirtilen (Çizelge 1) farklı işlem koşullarında gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemleri sonrasında elde edilen oleuropeince zengin ekstraktlara, toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM), antioksidan kapasite (mg TE/gKM) ve ekstraksiyon verimi analizleri gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon maksimum toplam fenolik madde miktarı, maksimum antioksidan kapasite ve maksimum ekstraksiyon

verimi hedef alınarak gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyon denemeleri aynı anda iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Optimum ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarında elde edilen ekstraktlardaki çözgen, enkapsülasyon işlemi öncesinde rotary evaporatörde (50°C) vakum altında uzaklaştırılmıştır.

İyonik jelyasyon ile enkapsülasyon ve işlem koşullarının optimizasyonu

Enkapsülasyon işlemi, kaplama materyali olarak kitosan ve pektin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek enkapsülasyon etkinliğini sağlayan kaplama materyali belirlenerek işleme devam edilmiştir.

Optimum ekstraksiyon koşulunda elde edilen oleuropeince zengin ekstrakt, sabit konsantrasyondaki sodyum aljinat çözeltisi içerisine damla damla olacak şekilde ilave edilerek damlatma çözeltisi hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki kitosan veya pektin çözeltisi ise kalsiyum klorür (CaCl₂) çözeltisi (%2 a/h) içerisine eklenmiş ve oda sıcaklığında homojenize edilerek jelleşme ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra damlatma çözeltisi jelleşme ortamı içerisine şırınga ile 1:9 (h/h) oranında damlatılmıştır. Elde edilen kapsüller jelleşme ortamından süzülerek ayrılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Enkapsülasyon işlemleri iki tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

Enkapsülasyon işleminde, sodyum aljinat çözeltisi içindeki oleuropeince zengin ekstrakt konsantrasyonu, kitosan veya pektin çözeltisi konsantrasyonu ve bekleme süresi bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve Merkezi Kompozit Dizayn (CCRD) kullanılarak optimizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İyonik jelyasyon yöntemine özgü olarak seçilen bağımsız işlem değişkenleri ve CCRD 'ye göre belirlenen deneme deseni Çizelge 4'de verilmiştir. İyonik jelyasyon ile enkapsülasyon işleminde optimum nokta; maksimum EE ve maksimum toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM) hedef alınarak belirlenmiştir. Optimum enkapsüle örneklerde ise toplam fenolik madde miktarı (mg GAE/gKM),

antioksidan kapasite (mg TE/gKM), nem içeriği, su aktivitesi, çözünübilirlik (%) ve enkapsülasyon verimi (%) analizleri gerçekleştirilmiştir.

Optimizasyon

Optimizasyon çalışmalarında; ultrasonik destekli ekstraksiyon işlemi değişkenleri olarak süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%), mikroenkapsülasyon işlemi ise, sodyum aljinat çözeltisi içindeki oleuropeince zengin ekstrakt konsantrasyonu, kitosan veya pektin çözeltisi konsantrasyonu ve bekleme süresi bağımsız işlem değişkenleri olarak seçilmiş ve optimize edilmiştir. Regresyon analizi, izohips ve yanıt yüzey grafikleri ve optimizasyon Design Expert Version 7.0 (StateaseInc.) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve iyonik jelyasyon ile mikroenkapsülasyon işlemleri sonrasında elde edilen ürünlerin işleme özgülü belirlenen yanıtla ilişkin verilerinin regresyon analizi sonucu, yanıt için ikinci dereceden polinomiyal denklem (Eş. 1) elde edilmiştir.

$$\text{Yanıt} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} x_{ij} \quad (k = 1,2,3) \quad (1)$$

Model Gıda Denemesi

Kefir üretimi için %3 yağ içeren pastörize süt (Tire Süt Kooperatifi, İzmir) kullanılmıştır. Süt 40°C'ye ısıtılmış ve içerisine kefir mayası (VIVO Gıda San. Ltd. Şti., İstanbul) eklenerek 16 saat oda sıcaklığında fermantasyon işlemine bırakılmıştır. Fermantasyon sonunda elde edilen kefir 4°C'de soğumaya bırakılmıştır. Elde edilen kefir içerisine ham ekstrakt (%0.5, g/g) ve mikroenkapsül (%1, g/g) eklenmiş, kontrol grubu olarak ise ekstrakt ve mikroenkapsül eklenmemiş kefir kullanılmıştır. Elde edilen kefir örnekleri analiz işlemlerine kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir. Kefir örneklerinde LAB sayımı ve duyu analizi gerçekleştirilmiştir.

Analiz Yöntemleri

Nem ve su aktivitesi

Nem tayini, termogravimetrik prensibe göre çalışan etüv yöntemine göre gerçekleştirilmiştir (AOAC, 1990). Su aktivitesi, ±0.001 hassasiyete sahip dijital göstergeli su aktivitesi ölçüm probu (Testo-AG 400) kullanılarak belirlenmiştir.

Toplam fenolik madde miktarı (TFM)

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve enkapsülasyon işlemi sonrası örneklerin toplam fenolik madde miktarı, Jasicka-Misiak vd. (2018) belirttiği spektrofotometrik (Shimadzu, UV-1800) yöntem ile Folin-Ciocalteu metoduna göre 90 dak bekletilerek 725 nm dalga boyunda ölçülmüş ve sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri GAE/gKM olarak ifade edilmiştir.

Mikrokapsül örneklerinin yüzey fenolik madde miktarı, sodyum sitrat eklenerek 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek, toplam fenolik madde miktarı bölümünde verilen aynı yöntem ile hesaplanmıştır.

Antioksidan kapasite

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve enkapsülasyon işlemi sonrası örneklerin antioksidan kapasitesi, Şahin'in (2019) belirttiği DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi yöntemi) yöntemine göre 30 dak bekleme işleminin ardından 515 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak belirlenmiş ve sonuçlar mg troloks eşdeğeri mg TE/gKM olarak verilmiştir.

C vitamini miktarı

Taze zeytin yaprağı ve optimum koşullarda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktında C vitamini miktarı spektrofotometrik yöntem kullanılarak, 518 nm'de ölçülmüş ve sonuçlar mg askorbik asit eşdeğeri mg AA/gKM cinsinden verilmiştir (Hışıl, 2007).

Ekstraksiyon verimi

Ekstraksiyon verimi, ekstraksiyon işleminden sonra elde edilen ekstraktların kurutulduktan sonraki miktar (g), başlangıçta işleme alınan örnek miktarına (g) oranlanması ile yüzde (%) olarak hesaplanmıştır.

Enkapsülasyon etkinliği (EE)

Enkapsülasyon etkinliği, mikrokapsül örneklerinin yüzey fenolik madde miktarı ve toplam fenolik madde miktarı belirlenerek Eşitlik 2'de verilen denkleme göre hesaplanmıştır (Çilek vd., 2012).

$$EE(\%) = \frac{P_{\text{toplam}} - P_{\text{yüzey}}}{P_{\text{toplam}}} * 100 \quad (2)$$

Enkapsülasyon verimi

Enkapsülasyon verimi, enkapsülasyon sonrası elde edilen mikrokapsüllerin kütlesinin, oleuropeince zengin ekstrakt ve kaplama materyalinin başlangıç toplam kütlesine oranlanması (%) şeklinde Eşitlik 3'te verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$EV (\%) = \frac{\text{enkapsülasyon sonrası mikrokapsüllerin kütlesi}}{\text{ekstrakt ve kaplama materyalinin başlangıçtaki toplam kütlesi}} * 100 \quad (3)$$

Çözünübilirlik

Kapsüllerin suda çözünübilirlik analizi için Türker vd. (2018)'nin belirttiği yöntem kullanılmıştır.

Duyusal Değerlendirme

Model gıda olan kefirin duyusal analizi; enkapsüle edilmiş ve edilmemiş fenolik maddece zengin ekstraktın, kefir içerisine katılarak hedonik test ile 5 puan üzerinden, 10 yarı eğitilmiş panelist tarafından değerlendirilmesine dayanmaktadır. Değerlendirme kriterleri olarak görünüş, renk, kıvam ve lezzet (tat ve koku) ve tüm izlenim özellikleri dikkate alınmıştır (Bennion ve Bamford, 1973; Chauhan ve Sharma, 2003; Altuğ ve Elmacı, 2005).

Laktik asit bakterisi (LAB) sayımı

Kefir örneklerinde LAB sayısını belirlemek üzere MRS agar, pH 6.2 'de dökme plak yöntemine göre

çift katlı ekim yapılmış 30°C'de 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır (ISO 15214, 1998).

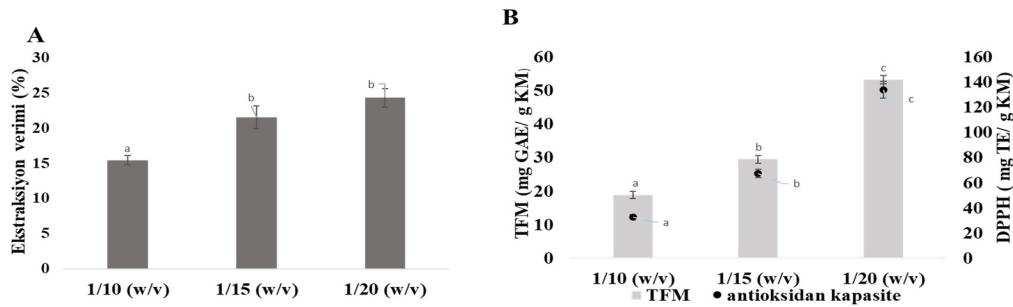
İstatiksel analizler

Zeytin yaprağının ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının ve iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyon işlem koşullarının optimizasyonunda istatistiksel analizler Design Expert Version 7.0 (StateaseInc.) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Optimum işlem koşullarının doğrulama denemeleri için gerçekleştirilen t-testi ve model gıda denemelerinde gerçekleştirilen varyans analizi (ANOVA) Post-Hoc (Duncan) için SPSS paket programı (Versiyon 22) kullanılmıştır. Ortalama değerler \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Ekstraksiyon katı/çözgen oranı, çözgen tipi ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Ekstraksiyona alınan kurutulmuş zeytin yapraklarının nem içeriği %4.98 (yaş temelinde), su aktivitesi (a_w) değeri 0.33 ve toplam C vitamini miktarı 16.53 mg AA/gKM olarak bulunmuştur. Örneklerin farklı katı/çözgen oranı, çözgen tipi ve konsantrasyonu kullanılarak gerçekleştirilen denemeler sonucunda elde edilen % ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi sonuçları Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Ultrason destekli ekstraksiyonda etanol ile farklı katı/çözgen oranlarında elde edilen ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerleri.

Figure 1. Extraction yield, total phenolic content and antioxidant capacity values obtained with ethanol at different solid/ solvent ratios in ultrasound assisted extraction.

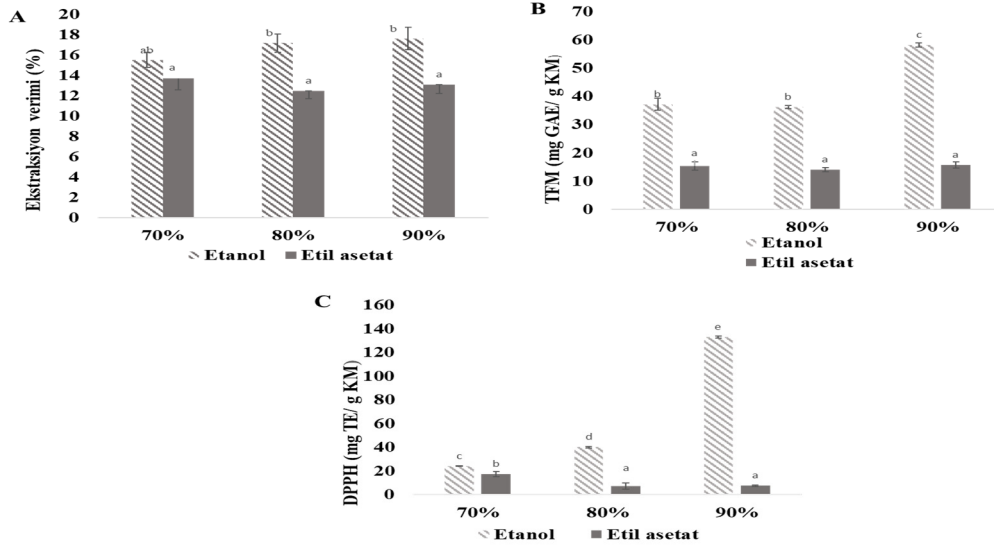
* A Katı/ çözgen oranlarında ekstraksiyon verimi, B Katı/ çözgen oranlarında fenolik madde miktarı ve antioksidan kapasite, TFM Toplam fenolik madde, GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer \pm SD (n=2) olarak ifade edildi. Farklı üst simge küçük harf, $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir.

*A Extraction efficiency at solid/ solvent ratios, B Phenolic content and antioxidant capacity at solid/ solvent ratios, TFM Total phenolic substance, GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value \pm SD (n=2). Different superscript lower cases indicated significant differences at $P < 0.05$.

Sabit ultrasonik destekli ekstraksiyon koşullarında (40°C, 10 dak, %70 genlik), %80:20 (h/h) etanol-su kullanılarak farklı katı/çözgen (1:10, 1:15 ve 1:20 a/h) oranlarında gerçekleştirilen denemelerde, en yüksek ekstraksiyon verimi (%24.33), TFM (53.31 mg GAE/gKM) ve antioksidan kapasitesi (134.025 mg TE/gKM; 1:20 a/h) katı/çözgen oranı için belirlenmiştir (Şekil 1). Katı/çözgen oranının artmasıyla birlikte polifenollerin daha yüksek miktarda elde edildiği görülmektedir (Şekil 1). Xie vd. (2015), katı/çözgen oranının 1:30'a (a/h) kadar artmasıyla ekstraksiyon veriminin hızla arttığını daha sonrasında ise önemli ölçüde değişmediğini belirtmişlerdir. Ekstraksiyon verimini artırmasını ise çözgen/katı oranındaki artışın, hücrelere çözücü difüzyonunun artmasını sağlamasına bağlamışlardır.

Çözgen tipinin seçilmesi, zeytin yaprağından oleuropein elde edilmesinde büyük önem

taşımaktadır (Şahin vd., 2011). Çalışma kapsamında kullanılacak çözgen tipi ve konsantrasyonu, ekstraksiyon koşulları ve katı/çözgen oranı sabit tutularak belirlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimi (%17.60), TFM (58.16 mg GAE/gKM) ve antioksidan kapasitesi (132.78 mg TE/gKM) %90:10 (h:h) etanol-su ile gerçekleştirilen denemede elde edilmiştir (Şekil 2). Çözgen olarak etil asetat ile etanol kıyaslandığında etanolün ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerlerinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 2). Zeytin yaprağının polar bir fenolik bileşiği olan oleuropeini ekstrakte edebilmek için polar bir çözücü gerekmektedir. Çözgen tipi olarak etanol ile etil asetatın kullanıldığı bir çalışmada etanol ile gerçekleştirilen ekstraksiyonun daha yüksek verim (%6.38) sağladığı, ayrıca karışımda etanol konsantrasyonunun artışıyla birlikte de verimin belli bir dereceye kadar arttığı bildirilmiştir (Xie vd., 2015).



Şekil 2. Ultrason destekli ekstraksiyonda farklı çözgen tipi ve konsantrasyonunda elde edilen ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasitesi değerleri.

Figure 2. Extraction efficiency, total phenolic content and antioxidant capacity values obtained in ultrasound assisted extraction at different solvent types and concentrations.

* A Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda ekstraksiyon verimi, B Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda TFM toplam fenolik madde miktarı, C Çözgen tipi ve farklı konsantrasyonlarda antioksidan kapasite, TFM Toplam fenolik madde, GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer \pm SD (n=2) olarak ifade edildi. Farklı üst simge küçük harf, $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir.

* A Extraction efficiency at different solvent types and concentrations, B amount of total phenolic substance at different solvent types and concentrations, C Antioxidant capacity at different solvent types and concentrations, TFM Total phenolic substance, GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value \pm SD (n=2). Different superscript lower cases indicated significant differences at $P < 0.05$.

En yüksek ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite değerleri; 1:20 (a/h) katı/çözgen oranı ve %90:10 (h/h) etanol-su karışımı koşulları için belirlenmiş ve ekstraksiyon işlem koşullarının optimizasyonu bu koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve işlem koşullarının etkisi

Bu çalışmanın ikinci basamağında yeşil teknik olarak bilinen ultrasonik destekli ekstraksiyon işlem koşullarının (süre (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%)) ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite üzerine etkileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile Box Behnken deneme desenine göre elde edilen sonuçlar.

Table 1. Experimental results obtained by ultrasound assisted extraction method according to Box-Behnken experimental design.

Deneme No (Experimental No)	Süre (Time) (dak) (min) (A)	Sıcaklık (Temperature) (°C) (B)	Genlik (Amplitude) (%) (C)	Ekstraksiyon Verim (Extraction Yield) (%)	TFM (mg GAE/gKM)	Antioksidan Kapasite (Antioxidant Capacity) (mg TE/gKM)
1	5	30	70	16.59±0.60	52.70±0.31	174.59±4.99
2	15	30	70	15.27±0.80	65.36±0.45	155.33±1.07
3	5	40	70	17.80±0.55	68.98±0.80	162.35±4.62
4	15	40	70	16.95±0.43	58.98±3.18	149.29±0.64
5	5	35	40	16.38±0.24	67.07±0.18	172.01±1.49
6	15	35	40	15.63±0.97	66.53±3.46	153.16±0.41
7	5	35	100	15.89±1.10	62.61±2.89	155.84±1.19
8	15	35	100	16.94±0.64	60.95±2.62	153.57±0.55
9	10	30	40	15.40±0.59	61.85±1.94	175.69±2.18
10	10	40	40	16.75±0.89	67.10±0.82	155.62±0.50
11	10	30	100	16.64±1.75	60.27±1.31	170.29±0.66
12	10	40	100	18.48±0.22	58.95±0.85	143.33±16.47
13	10	35	70	16.86±1.45	62.24±0.20	131.81±11.49
14	10	35	70	16.11±1.33	62.02±1.27	132.63±1.28
15	10	35	70	16.12±1.12	65.10±3.74	126.23±5.15
16	10	35	70	17.02±0.86	59.83±6.40	124.32±3.48
17	10	35	70	17.37±0.34	65.17±3.44	130.73±7.13

GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Trolox eşdeğeri. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer \pm SD (n=2) olarak ifade edildi. GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent. Data were expressed as dry basis and mean value \pm SD (n=2).

Optimizasyon çalışmasında yer alan işlem değişkenleri ile her bir yanıt arasında ilişkiyi ifade eden kuadratik matematiksel model, regresyon analizi yapılarak oluşturulmuştur. Bunun için modelin uygunsuzluğu testi (lack of fit) değerleri analiz edilmiş ve kuadratik matematiksel modelin uygun olduğu belirlenmiştir. Bu modellerin ANOVA sonuçları ve regresyon katsayıları Çizelge 2'de verilmiştir.

Ekstraksiyon verimi

İşlem değişkenlerinin ekstraksiyon verimi üzerindeki etkilerini veren yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri Şekil 3'de gösterilmiştir.

Ekstraksiyon verimi üzerine ekstraksiyon işlem koşullarının (sıcaklık, süre ve genlik) tümünün etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2)($P < 0.05$). Ekstraksiyon veriminin 15.27 ± 0.80 ile 18.48 ± 0.22 arasında değiştiği ve en yüksek ekstraksiyon veriminin 10 dakika süre, 35°C sıcaklık ve %70 genlik koşullarında elde edildiği görülmektedir (Çizelge 1). Ekstraksiyon sıcaklığının artmasına bağlı olarak ekstraksiyon veriminin arttığı görülmektedir. Ekstraksiyon işleminde yüksek sıcaklık değerleri, bitki matriksinden bileşiklerin desorpsiyonunun artmasını sağlayarak kütle transferini ve ekstraksiyon performansını artırmaktadır (Şahin

vd., 2015). Ekstraksiyon süresinin azalmasıyla birlikte ekstraksiyon veriminde artış olduğu gözlenmiş (Şekil 3) ve ekstraksiyon süresindeki kısalmanın ise ekonomik açıdan avantaj sağlayarak enerji maliyetlerinin en aza indirilmesinde etkili olduğu bildirilmiştir (Şahin ve Şamlı, 2013; Chemat vd., 2017). Aynı zamanda ekstraksiyon süresi çözücünün ürüne nüfuz etme ve çözme işleminde etkili bir parametre olup ekstraksiyon verimini etkilemektedir (Guler vd., 2020). Flórez-Fernández vd. (2019), ultrasonik destekli

ekstraksiyon ile uyguladıkları kısa sonikasyon sürelerinin aljinat veriminde artış sağladığını belirtmişlerdir. Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesi ile yapılan bir çalışmada, ultrasonik destekli ekstraksiyon ile işlem süresinde yaklaşık %90 oranında tasarruf sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca geleneksel yöntemle göre daha yüksek antioksidan aktivite belirlenmiş ve ultrasonik destekli ekstraksiyon ile fenolik bileşiklerde daha az bozulma olduğu bildirilmiştir (Alifakı vd., 2018).

Çizelge 2. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların ve iyonik jelasyon ile elde edilen kapsüllenen ANOVA sonuçları

Table 2. ANOVA results of the extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method and encapsulated obtained by ionic gelation

Ultrasonik destekli ekstraksiyon (<i>Ultrasonic assisted extraction</i>)							
Varyasyon Kaynağı (<i>Variation Source</i>)	SD	Ekstraksiyon Verimi (<i>Extraction Yield</i>) (%)		TFM (mg GAE/gKM)		Antioksidan Kapasitesi (<i>Antioxidant Capacity</i>) (mg TE/gKM)	
		HKT	P-değeri (<i>P-value</i>)	HKT	P-değeri (<i>P-value</i>)	HKT	P-değeri (<i>P-value</i>)
Model	9	11.9106	0.0090	233.218	0.0100	4514.03	0.0003
A	1	1.4328	0.0286	0.025	0.9373	357.425	0.0067
B	1	4.9320	0.0014	26.937	0.0332	533.99	0.0023
C	1	3.8191	0.0028	44.741	0.0113	139.88	0.0489
AB	1	0.0170	0.7732	128.474	0.0007	9.494	0.5549
AC	1	0.8055	0.0783	0.306	0.7862	68.799	0.1390
BC	1	0.0581	0.5972	13.788	0.1004	11.870	0.5105
A ²	1	0.5224	0.1409	1.267	0.5842	863.684	0.0006
B ²	1	0.2795	0.2641	15.424	0.0855	1204.08	0.0002
C ²	1	0.0758	0.5475	3.189	0.3931	969.874	0.0004
Kalıntı (<i>Residue</i>)	7	1.3275		26.967		172.876	
Model Uygunsuzluğu Testi (<i>Lack of Fit</i>)	3	0.0593	0.9770	6.380	0.7531	119.347	0.1600
Saf Hata (<i>Pure Error</i>)	4	1.2683		20.586		53.529	
Toplam (<i>Cor Total</i>)	16	13.238		260.185		4686.9	
R ²		0.8997		0.8963		0.9631	
R ² _{adj}		0.7707		0.7630		0.9156	
C.V. *%		2.6245		3.1332		3.2913	
PRESS		2.9300		134.2584		1993.195	
Yeterli Tahminleme (<i>Adeq Precision</i>)		11.2855		9.9673		12.4958	

Çizelge 2. devam

İyonik jelyasyon (<i>Ionic gelation</i>)					
			EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)	
Varyasyon Kaynağı (<i>Variation Source</i>)	SD	HKT	P-değeri (<i>P-value</i>)	HKT	P-değeri (<i>P-value</i>)
Model	9	2925.403	0.0013	431.594	0.0003
X ₁	1	115.032	0.1010	222.545	< 0.0001
X ₂	1	1135.109	0.0003	99.948	0.0005
X ₃	1	1.613	0.8336	1.607	0.5168
X ₁ X ₂	1	417.800	0.0069	4.563	0.2849
X ₁ X ₃	1	259.038	0.0228	49.853	0.0045
X ₂ X ₃	1	433.711	0.0062	24.136	0.0281
X ₁ ²	1	223.821	0.0313	16.807	0.0570
X ₂ ²	1	123.178	0.0913	2.564	0.4162
X ₃ ²	1	346.424	0.0114	6.392	0.2113
Kalıntı (<i>Residue</i>)	7	310.185		31.773	
Model Uygunsuzluğu Testi (<i>Lack of Fit</i>)	3	212.741	0.3045	10.146	0.8443
Saf Hata (<i>Pure Error</i>)	4	97.444		21.627	
Toplam (<i>Cor Total</i>)	16	3235.587		463.366	
R ²		0.9041		0.9314	
R ² _{adj}		0.8082		0.8629	
C.V. *%		17.0250		18.8348	
PRESS		2231.966		126.87	
Yeterli Tahminleme (<i>Adeq Precision</i>)		11.8542		12.674	

A: Süre (dak), B: Sıcaklık (°C), C: Genlik (%), X₁: Ekstrakt Konsantrasyonu (%), X₂: Kitosan Konsantrasyonu (%), X₃: Bekleme Süresi (dak)

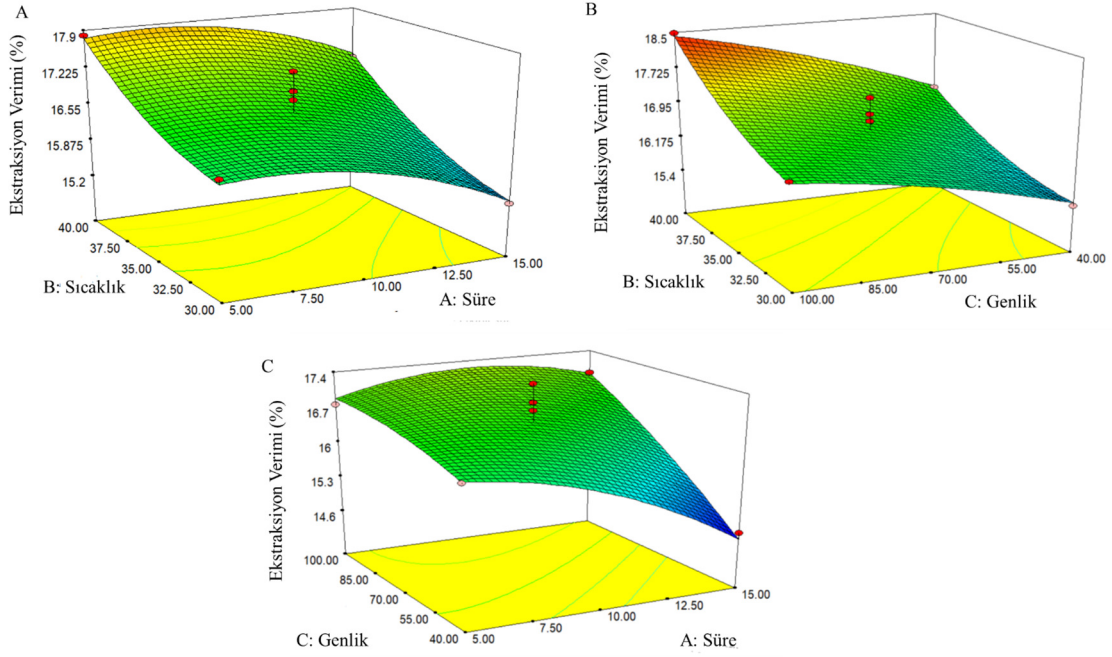
A: *Time (min)*, B: *Temperature (°C)*, C: *Amplitude (%)*, X₁: *Extract Concentration (%)*, X₂: *Chitosan Concentration (%)*, X₃: *Waiting Time (min)*

Toplam fenolik madde (TFM)

İşlem değişkenlerinin TFM üzerindeki etkileri, yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri ile Şekil 4'te gösterilmiştir.

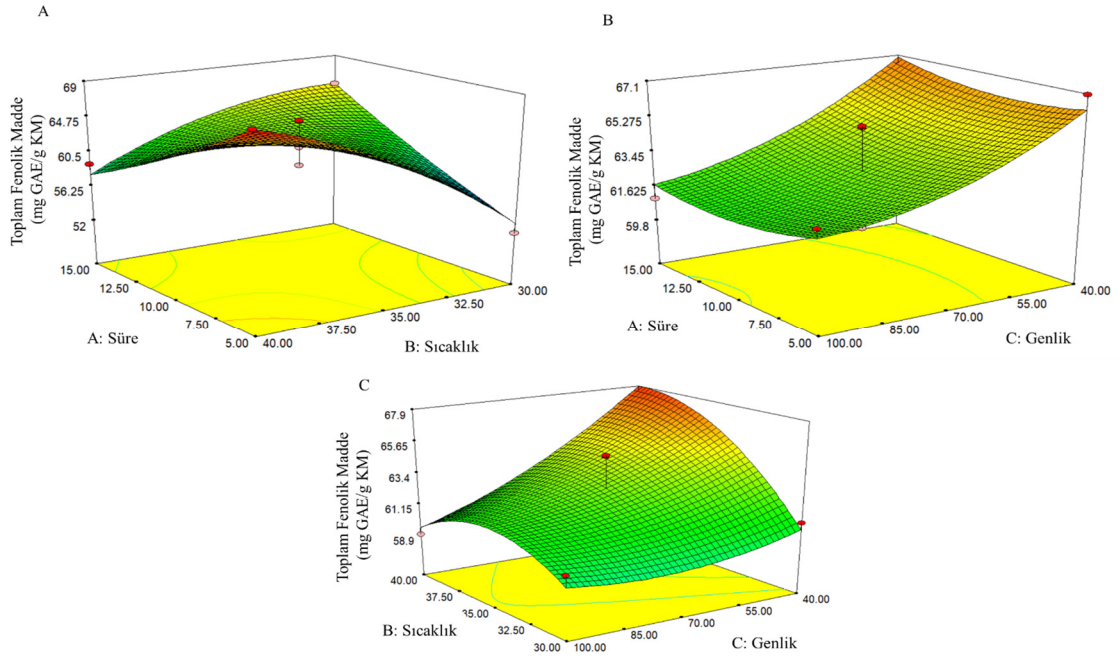
Zeytin yaprağı ekstraktlarının TFM'si 52.70 ± 0.31 ile 68.98 ± 0.80 mg GAE/g ürün arasında bulunmuştur (Çizelge 1). TFM yanıtı için regresyon analizi sonucunda elde edilen ikinci dereceden polinomiyal modelde sıcaklığın, genliğin, süre ve genliğin etkileşimlerinden anlamlı seviyede etkilendiği bulunmuştur ($P < 0.05$). İşlem değişkenlerinden sıcaklığın artmasıyla TFM önemli düzeyde arttığı, ancak ekstraksiyon sıcaklığında artışın devam etmesi ile TFM azalmanın gözlemlendiği belirlenmiştir (Şekil 4). TFM'deki bu artış, sıcaklığın yükselmesiyle birlikte çözücü viskozitesinin ve yüzey geriliminin azalarak fenolik bileşiklerin çözünürlüğünü

arttırmasına, dolayısıyla bu bileşiklerin difüzyon ve ekstraksiyon hızını artırma kabiliyetine bağlanabilmektedir. Aynı zamanda sıcaklık artışına bağlı olarak meydana gelen kimyasal ve enzimatik bozulmalar TFM etkilemektedir (Ünver ve Çelik, 2022). Bu çalışmada işlem süresinin TFM üzerinde çok fazla bir değişime neden olmadığı görülmüştür (Şekil 4). Uzun ekstraksiyon süreleri, daha fazla kimyasal reaksiyona ve fenolik bileşiklerin oksidasyonuna neden olabilmektedir (Şahin vd., 2015). Şekil 4 incelendiğinde genliğin azalmasıyla ise TFM'de artış olduğu görülmektedir. Yüksek genlik uygulanması güç sarfiyatını artıracak ve örneğin ısınmasına neden olacaktır. Ultrasonik genliğinin artırılması, ultrasonik gücünün artmasına neden olarak kavitasyon gerçekleşmekte ve kavitasyon lokal ısınmaya neden olarak bitki hücre duvarının yıkımını sağlamaktadır (Poyraz vd., 2021).



Şekil 3. Ultrason destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların ekstraksiyon verimi için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

Figure 3. The response surface plots and isohips curves for the extraction efficiency of the extracts obtained by the ultrasound assisted extraction method.



Şekil 4. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların TFM için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

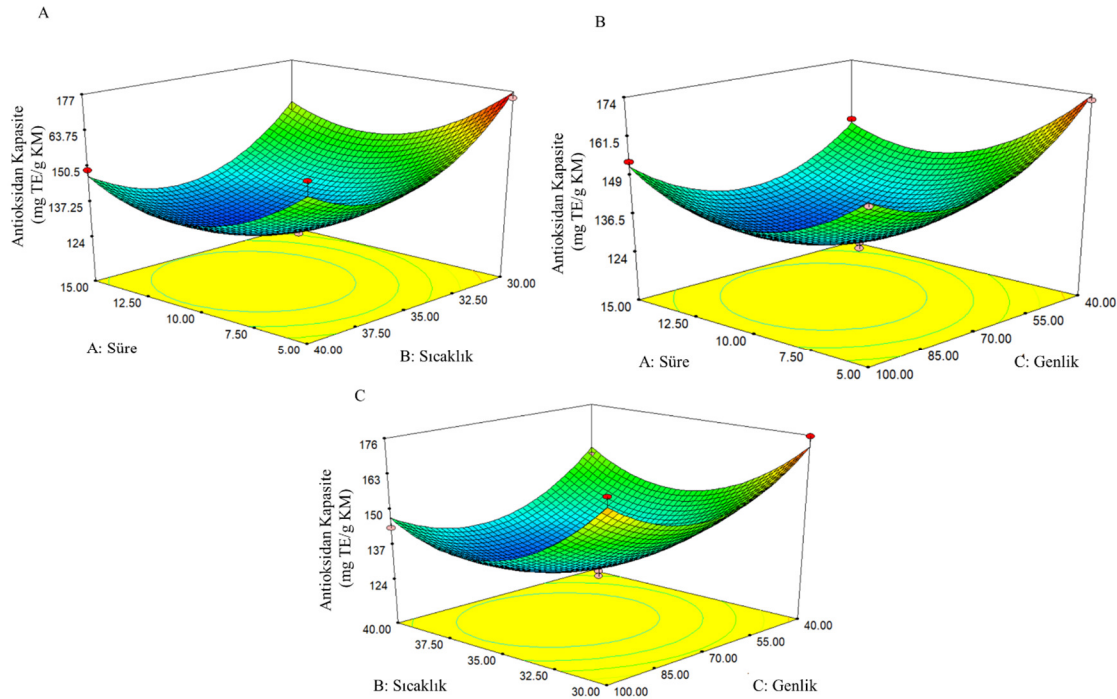
Figure 4. Response surface plots and isohips curves for the total amount of phenolic substances in the extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method.

Antioksidan kapasite

İşlem değişkenlerinin antioksidan kapasite üzerindeki etkileri yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrileri olarak Şekil 5'te gösterilmiştir.

Zeytin yaprağı ekstraktlarının antioksidan kapasitesi üzerine ekstraksiyon sıcaklık, süre ve genlik değişkenlerinin etkili olduğu saptanmıştır (Çizelge 2) ($P < 0.05$). Maksimum antioksidan kapasite değeri 5 dakika süre, 30°C sıcaklık ve %70 genlik koşullarında elde edilmiştir. Şekil 5'te görüldüğü üzere sürenin 5 dak'dan 10 dak'a, sıcaklığın 30°C'den 35°C'e ve ultrasonik genliğin %40'tan %70'e artmasıyla antioksidan kapasite

önce azalmış sonrasında ise parametrelerdeki artışla birlikte artış göstermiştir. Ekstraksiyon süresi ve sıcaklığının, birlikte olan etkisi de antioksidan kapasitesi üzerine anlamlı bulunmuştur (Çizelge 2) ($P < 0.05$). Ünver ve Çelik (2022), zeytin yaprağı üzerine yaptıkları çalışmada benzer sonuçları elde etmişlerdir. Ekstraksiyon süresinin artmasıyla antioksidan kapasitede düşüşün gözlenmesi, daha uzun ekstraksiyon sürelerinin ultrasonik işleme aşırı maruz kalma nedeniyle sıcaklıktaki artışa ve ısıl bozunmaya bağlanmıştır (Prommuak vd., 2008; Şahin ve Şamlı, 2013).



Şekil 5. Ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilen ekstraktların antioksidan kapasitesi için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi.

Figure 5. Response surface plots and isohips curves for antioxidant capacity of extracts obtained by ultrasonic assisted extraction method.

Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon Yöntemi İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Optimum ekstraksiyon koşulları (ekstraksiyon süresi (dak), sıcaklık (°C) ve genlik (%)); maksimum TFM, maksimum ekstraksiyon verimi ve maksimum antioksidan kapasite hedef alınarak belirlenmiştir. Deneysel veriler üzerinde regresyon analizi yapılmış ve modelin katsayıları,

ANOVA analizi kullanılarak istatistiksel anlamlılık açısından değerlendirilmiştir. Tahmin edilen ikinci dereceden polinomiyal modellerinin regresyon katsayıları Çizelge 2'de özetlenmiştir. R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin birbirlerine yakın olması modellerin istatistiksel olarak önemsiz terimleri içermediğini göstermektedir. Varyasyon katsayısı deneysel verilerdeki kalıntı varyasyonun ortalamaya bağlı

bir ölçüsüdür. Büyük varyasyon katsayısı değerleri, verilerin ortalamadan çok fazla saptıklarını, küçük varyasyon katsayısı değerleri ise verilerin hemen hemen ortalamayla aynı değere sahip olduğunu göstermektedir

Desirability (arzu edilebilirlik) fonksiyonu yaklaşımı uygulandığında, desirability değeri 1 olarak bulunmuş ve optimum ekstraksiyon koşulları; 5.31 dak süre, 39.27°C sıcaklık ve %40.51 genlik olarak belirlenmiştir. Optimum

noktada, ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasite sırasıyla %17.097, 72.479 mg GAE/gKM ve 176.15 mg TE/gKM olarak tahmin edilmiştir. Optimum ekstraksiyon işlem koşullarında üç doğrulama denemesi yapılmış ve modelden tahminlenen nokta deneysel olarak doğrulanmıştır. Örneklerin deneysel ekstraksiyon verimi, TFM ve antioksidan kapasiteleri ortalama olarak modelden elde edilen değerlerden farklı bulunmamıştır ($P > 0.05$) (Çizelge 3).

Çizelge 3. Ultrasonik destekli ekstraksiyon ve iyonik jelasyon için optimum nokta doğrulama ve t-testi sonuçları

Table 3. Verification and t-test results for ultrasound assisted extraction and ionic gelation at optimum condition

	Ultrasonik destekli ekstraksiyon (Ultrasonic assisted extraction)			İyonik jelasyon (Ionic gelation)	
	Ekstraksiyon Verimi (Extraction Yield) (%)	TFM (mg GAE/gKM)	Antioksidan Kapasitesi (Antioxidant Capacity) (mg TE/gKM)	EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)
1	14.499	72.996	171.235	61.18	12.36
2	19.440	72.471	176.950	60.91	12.74
3	14.760	72.395	173.900	62.94	12.44
Ortalama (Average)	17.100	72.621	174.028	61.68	12.51
Modelden Tahminlenen (Estimated from the Model)	17.097	72.479	176.146	63.8	12.34
P- değeri (P- value)	0.645	0.530	0.328	0.079	0.273

İyonik jelasyon yöntemi ile mikroenkapsülasyon ve işlem koşullarının etkisi

Optimum koşullarda elde edilen zeytin yaprağı ekstraktlarının iyonik jelasyon ile enkapsülasyonu işleminde iki farklı kaplama materyali kombinasyonu ile ön denemeler gerçekleştirilmiştir. Sodyum aljinat-kitosan ve sodyum aljinat-pektin kombinasyonları kullanılan ön denemelerde, ekstrakt konsantrasyonu %1, pektin veya kitosan konsantrasyonu %0.1 ve bekleme süresi 15 dakika olarak belirlenmiş olup damlatma çözeltisinin jelleşme çözeltisine oranı 1:9 olarak seçilmiştir.

Sodyum aljinat ile beraber pektin ve kitosan kullanımında EE sırasıyla %15.2 ve %17.5 olarak

belirlenmiştir. Ayrıca pektin kullanılarak oluşturulmuş kapsüllerin kitosan kullanılarak oluşturulanlara göre daha yumuşak, küçük ve heterojen bir yapıda olduğu görülmüştür. Bu nedenle mikroenkapsülasyon işlemi için uygun kombinasyon olarak sodyum aljinat-kitosan seçilmiştir.

Sodyum aljinat-kitosan ile yapılan enkapsülasyon işleminin optimizasyonunda Çizelge 4'de görülen CCRD deneme deseni kullanılmıştır. Bağımsız işlem değişkenleri olarak ekstrakt konsantrasyonu (%1-5), kitosan konsantrasyonu (%0.1-0.5) ve bekleme süresi (5-15 dak.) seçilirken, TFM ve EE ise yanıt değişkenleri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. CCRD deneme desenine göre iyonik jelasyon enkapsülasyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar
 Table 4. Experimental results obtained by ionic gelation encapsulation method according to CCRD experimental design

Deneme No (Experimental No)	Ekstrakt Konsantrasyonu (Extract Concentration) (%) (X ₁)	Kitosan Konsantrasyonu (Chitosan Concentration) (%) (X ₂)	Bekleme Süresi (Waiting Time) (dak) (min) (X ₃)	EE (%)	TFM (mg GAE/gKM)
1	1	0.1	5	18.61±0.55	2.28±0.50
2	5	0.1	5	51.88±0.67	18.64±0.80
3	1	0.5	5	40.47±0.96	6.83±1.12
4	5	0.5	5	37.34±1.10	18.47±1.15
5	1	0.1	15	17.87±1.15	3.48±1.16
6	5	0.1	15	20.88±1.54	8.15±1.28
7	1	0.5	15	61.68±1.13	13.27±1.75
8	5	0.5	15	43.28±1.67	16.63±1.52
9	1	0.3	10	32.02±1.32	5.53±1.34
10	5	0.3	10	51.18±1.78	16.67±1.16
11	3	0.1	10	22.75±1.74	5.11±1.42
12	3	0.5	10	55.77±1.23	14.08±1.32
13	3	0.3	5	21.00±1.62	6.75±1.45
14	3	0.3	15	21.58±1.55	7.43±2.10
15	3	0.3	10	25.67±1.89	6.71±1.88
16	3	0.3	10	31.82±1.66	9.45±2.05
17	3	0.3	10	29.65±0.88	7.26±2.13
18	3	0.3	10	32.41±0.78	10.39±1.90
19	3	0.3	10	39.21±1.18	12.39±1.34

GAE Gallik asit eşdeğeri, EE Enkapsülasyon etkinliği. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer ± SD (n=2) olarak ifade edilmiştir. GAE Gallic acid equivalent, EE Encapsulation efficiency. Data were expressed as dry basis and mean value ± SD (n=2).

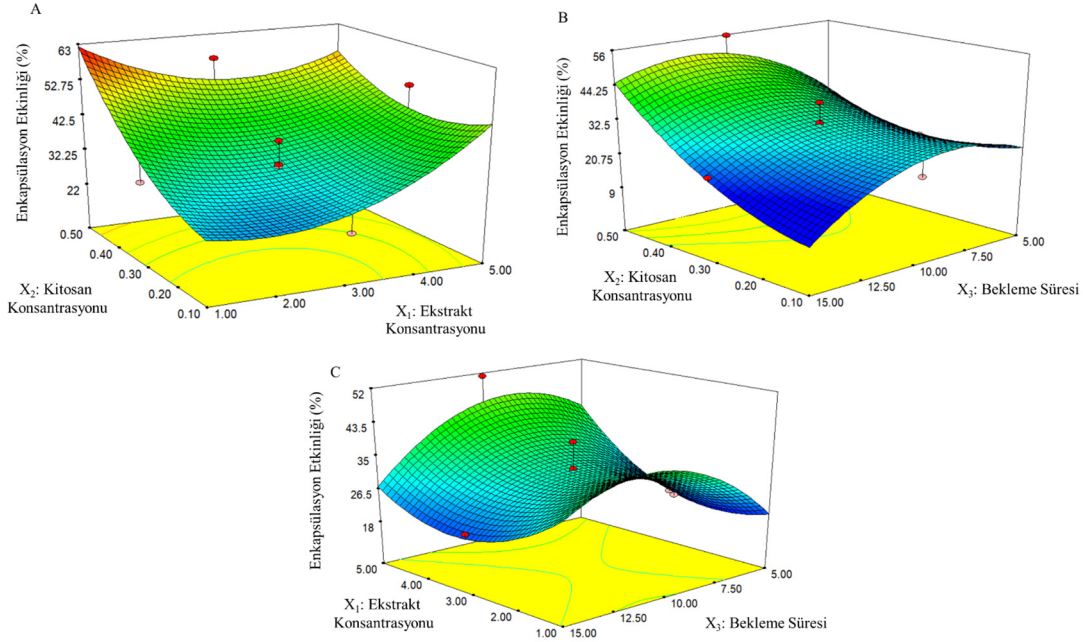
Elde edilen veriler ile kuadratik matematiksel modelin uygun olduğu belirlenmiş ve bağımsız değişkenlerin model üzerine etkisi ANOVA ile incelenmiştir (Çizelge 2). Buna göre iki yanıt değişkeni için de model istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($P < 0.05$), model uygunsuzluğu testi istatistiksel olarak önemsizdir ($P > 0.05$). Ayrıca her iki yanıt değişkeni için R² değeri 0.9'dan büyük olarak bulunmuştur. Yanıtlar için varyasyon katsayısı değeri TFM için 18.83 EE için 17.02 olarak bulunmuştur.

Enkapsülasyon etkinliği (EE)

EE üzerine kitosan konsantrasyonunun doğrudan anlamlı bir etkisi bulunurken, diğer bağımsız işlem değişkenlerinin birbiri ile interaksiyon halinde bulunması durumunda anlamlı bir etkiye sahip olduğu ($P < 0.05$) Çizelge 2'de görülmektedir.

Kitosan ve ekstrakt konsantrasyonundaki azalma sonucunda EE azalmıştır. Bekleme süresindeki artış ise EE 'yi bir noktaya kadar arttırmış, ardından artan bekleme süresine göre EE 'de azalma başlamıştır (Şekil 6).

İyonik jelasyon işleminde kalsiyum iyonları, sodyum aljinat ile birlikte çapraz bağ oluşturmada ve yumurta kutusu şekli almaktadır. Aynı zamanda düşük molekül ağırlığına sahip kitosan aynı şekilde sodyum aljinat ile elektrostatik interaksiyonlar ile bağ oluşturmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı aljinat ve kitosandan oluşan boncuklar daha gözenekli bir yapı oluşturmaktadır (Bajpai ve Tankhiwale, 2006). Bu da EE'deki düşüşü açıklamaktadır. Zira kitosan-kalsiyum klorür çözeltisi içerisinde oluşan boncuklardan aktif bileşen dışarıya doğru difüze olmaktadır (Najafi-Soulari vd., 2016).



Şekil 6. İyonik jelasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin EE için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi
 Figure 6. Response surface plots and isohips curves for encapsulation efficiency of capsules obtained by ionic gelation method

Toplam fenolik madde (TFM)

Mikroenkapsülasyon işleminde yanıt değişkeni olarak TFM incelendiğinde, Çizelge 2'den de anlaşılacağı üzere ekstrakt ve kitosan konsantrasyonunun model üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Bununla beraber, bekleme süresi ekstrakt konsantrasyonu ve ayrıca kitosan konsantrasyonu ile birlikte etki göstermiştir ($P < 0.05$).

Şekil 7 incelendiğinde kitosan ve ekstrakt konsantrasyonu azaldığında TFM'nin azaldığı görülmektedir. Bekleme süresindeki artışın bir noktaya kadar toplam TFM'yi arttırdığı, sonrasında ise azalmaya neden olduğu bulgulanmıştır.

Ekstrakt içerisindeki TFM'de ki azalmanın, fenolik bileşenlerin kalsiyum klorür çözeltisi içinde önemli ölçüde migrasyonu sonucu meydana geldiği ve oluşan boncukların alındığı jelleşme ortamında enkapsüle olmadan kaldığı belirtilmektedir (Arriola vd., 2019). Bunun yanı sıra aktif bileşen kaybının çoğunlukla kitosan

çözeltisinin içerisinde gerçekleştiği bulgulanmıştır (Deladino vd., 2008).

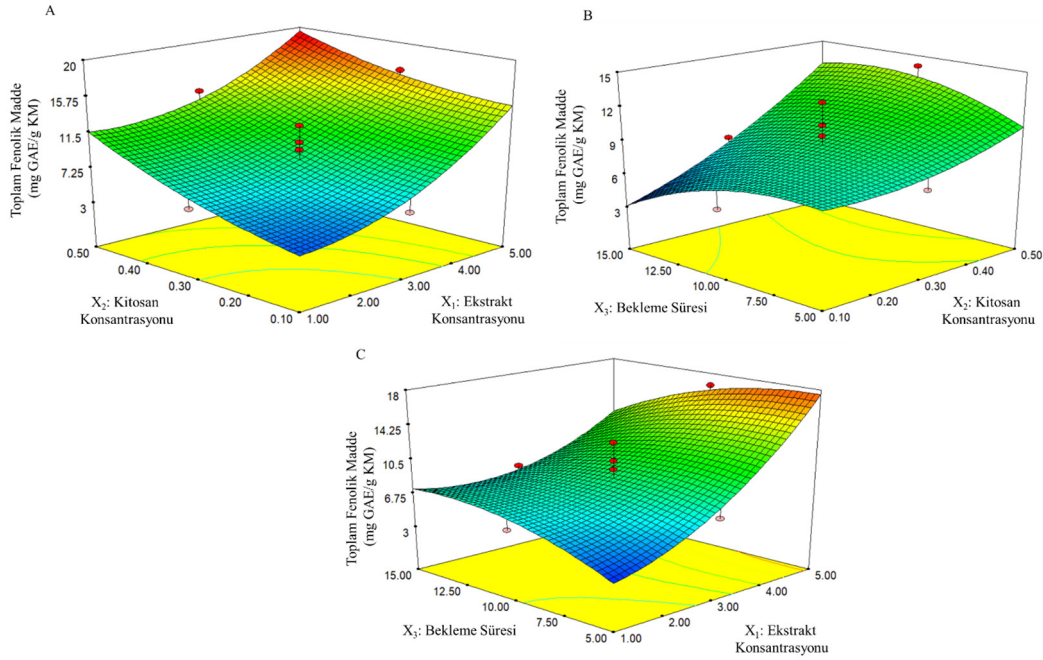
İyonik Jelasyon ile Enkapsülasyon İşlem Koşullarının Optimizasyonu

Zeytin yaprağı ekstraktının sodyum aljinat-kitosan kombinasyonu ile iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsülasyonunda bağımsız işlem değişkenleri olan %1-5 ekstrakt konsantrasyonu, %0.1-0.5 kitosan konsantrasyonu ve 5-15 dak bekleme süresi aralıklarında, desirability (arzu edilebilirlik) fonksiyonu yaklaşımıyla ve maksimum TFM ve maksimum EE hedeflenerek gerçekleştirilen optimizasyonda, desirability değeri 1 olarak bulunurken, ekstrakt konsantrasyonu %1.04, kitosan konsantrasyonu %0.5 ve bekleme süresi 11.24 dak olarak belirlenmiştir. Optimum noktada EE %63.8, TFM ise 12.34 mg GAE/gKM olarak tahminlenmiştir.

Çizelge 3'de belirtildiği üzere, doğrulama denemelerinde enkapsülasyon etkinliği TFM deneysel olarak sırasıyla ortalama %61.68 ve 12.51 mg GAE/gKM olarak bulunmuştur. Tek örnek t-testi sonucuna göre deneysel ve tahminlenen

değerler arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($P > 0.05$) (Çizelge 3). Optimum koşullarda elde edilen ekstraktta TFM 72.621 mg GAE/gKM olarak bulunmuşken,

enkapsüle örneklerde ise bu miktar oldukça düşük ve 12.51 mg GAE/gKM ürün olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7. İyonik jelyasyon yöntemi ile elde edilen kapsüllerin TFM için yanıt yüzey grafiği ve izohips eğrisi
Figure 7. The response surface plots and isohips curves for the total amount of phenolic substance in the capsules obtained by the ionic gelation method

Najafi-Soulari vd. (2016) tarafından limon otu ekstraktının iyonik jelyasyon yöntemi ile enkapsülasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, optimum noktada elde edilen EE %39.5 olarak bulunmuştur. Arriola vd. (2019) tarafından stevia ekstraktlarının farklı özellikte sodyum aljinat kullanılarak iyonik jelyasyon ile enkapsüle edildiği çalışmada ise EE'nin %60'ın üzerinde olduğu belirtilmiştir. Buna göre bu çalışmada elde edilen sonuç yapılan bu çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Çizelge 5'de ise optimum noktada elde edilen mikrokapsüllerde gerçekleştirilen analizlerin sonuçları verilmiştir.

Santagapita vd. (2011) tarafından invertaz enziminin iyonik jelyasyon ile enkapsüle edildiği çalışmada kurutulmuş haldeki mikrokapsüllerin nem içeriği kuru bazda %4.5-11.4 arasında

değişim gösterirken, su aktivitesi değerleri 0.181 ile 0.330 olarak bulunmuştur. *Bougainvillea glabra* bitki ekstraktlarının iyonik jelyasyon ile enkapsüle edildiği bir diğer çalışmada ise ekstraktta ve enkapsüle örneklerde TFM sırasıyla 22.97 ve 18.24 mg GAE/gKM olarak tespit edilmiştir (Silva de Azevedo ve Zapata Noreña, 2021). Elde edilen sonuçlar literatür ile uyum göstermektedir.

Model gıda denemesi

Zeytin yaprağı ekstraktı ve optimum koşullarda enkapsüle edilmiş ekstrakt model gıda olarak üretilen kefir içine ilave edilmiştir.

Oda sıcaklığında 2 gün boyunca inkübasyona bırakılan kefir, mikrobiyolojik olarak incelenmiş olup laktik asit bakteri sayım sonuçları log kob/g cinsinden Çizelge 6'de verilmiştir. Kefirin tanımlayıcı istatistikleri göz önüne alındığında, laktik asit bakteri sayısı 8.4-8.5 log kob/g

aralığında değişim göstermiştir. Örnekler arasında laktik asit bakteri sayımı açısından istatistiksel fark gözlenmemiştir ($P < 0.05$). Buna göre, kefir içinde kullanılan zeytin yaprağı ekstraktı ve

mikrokapsüllerin laktik asit bakterilerine karşı herhangi inhibe edici etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Çizelge 5. Optimum noktada elde edilen mikrokapsüllerin analiz sonuçları

Table 5. Analysis results of microcapsules obtained at the optimum point

Nem İçeriği (<i>Moisture Content</i>) (%)	12.41±1.76
TFM (mg GAE/gKM)	12.51±0.20
Antioksidan Kapasite (<i>Antioxidant Capacity</i>) (mg TE/gKM)	41.76±0.45
C Vitamini (<i>C vitamin</i>) (mg AA /gKM)	7.44±0.22
Enkapsülasyon Verimi (<i>Encapsulation Efficiency</i>) (%)	82.71±0.90
Su Aktivitesi (<i>Water Activity</i>) (a_w)	0.45±0.06
Çözünürlük (<i>Solubility</i>) (%)	70.88±3.74

GAE Gallik asit eşdeğeri, TE Troloks eşdeğeri, AA askorbik asit. Veriler kuru baz olarak ve ortalama değer \pm SD ($n=2$) olarak ifade edildi. *GAE Gallic acid equivalent, TE Trolox equivalent, AA ascorbic acid. Data were expressed as dry basis and mean value \pm SD ($n=2$).*

Çizelge 6. Kefir için LAB (laktik asit bakteri) sayım sonuçları

Table 6. LAB (*lactic acid bacteria*) counts for kefir

Örnek Grubu (<i>Sample Group</i>)	Laktik Asit Bakterileri (<i>Lactic Acid Bacteria</i>) (log kob/g)
Kontrol (<i>Control</i>)	8.51±0.13 ^a
Mikrokapsül eklenmiş (<i>Microcapsule added</i>)	8.50±0.13 ^a
Ekstrakt eklenmiş (<i>Extract added</i>)	8.50±0.12 ^a

Veriler ortalama değer \pm SD ($n=2$) olarak ifade edildi. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük harf, $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir. *Data were expressed as mean value \pm SD ($n=2$). Different superscript lowercase in the same column indicated significant differences at $P < 0.05$.*

Mikroenkapsülasyon işleminin amaçlarından biri acı/kötü tat ve aromanın ürünleri olumsuz etkilemesinin önüne geçmek/engellemektir. Çizelge 7'de kefire uygulanan duyuşal değerlendirme sonuçları verilmiştir. Renk, görünüş ve kıvam açısından enkapsüle edilmiş ve edilmemiş ekstrakt içeren kefir örneklerinin farklı olmadığı ($P < 0.05$), ancak kontrol örneğinden daha düşük puan aldığı gözlemlenmiştir. Lezzet puanı açısından ham ekstrakt eklenmiş örnek en

düşük puanı alırken, kontrol grubu ile mikrokapsül eklenmiş örneğin daha yüksek puan aldığı gözlenmiştir. Tüm izlenim olarak değerlendirildiğinde en yüksek puan kontrol grubunda ve en düşük puan ham ekstrakt içeren örnekte saptanmıştır. Duyusal değerlendirme sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının enkapsüle edilmesi ile acı tadının bastırıldığı, kontrol grubu kefir örneği ile lezzet farkının olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çizelge 7. Model gıda kefir için duyuşal analiz sonuçları

Table 7. Sensory analysis results for kefir as model food

Örnek Grubu (<i>Sample Group</i>)	Renk (<i>Colour</i>)	Görünüş (<i>Appearance</i>)	Kıvam (<i>Consistency</i>)	Lezzet (<i>Flavor</i>)	Tüm İzlenim (<i>All Impression</i>)
Kontrol (<i>Control</i>)	4.8±0.4 ^a	4.5±0.5 ^a	4.4±0.7 ^a	4.0±0.9 ^b	4.5±0.7 ^b
Mikrokapsül eklenmiş (<i>Microcapsule added</i>)	3.7±0.6 ^a	4.1±0.8 ^a	4.0±0.8 ^a	3.4±0.7 ^b	3.6±0.7 ^{ab}
Ekstrakt eklenmiş (<i>Extract added</i>)	4.1±0.7 ^a	4.2±0.7 ^a	4.0±0.6 ^a	1.5±0.5 ^a	2.4±0.7 ^a

Veriler ortalama değer \pm SD ($n=2$) olarak ifade edildi. Aynı sütundaki farklı üst simge küçük harf, $P < 0.05$ 'te önemli farklılıklar göstermektedir. *Data were expressed as mean value \pm SD ($n=2$). Different superscript lowercase in the same column indicated significant differences at $P < 0.05$.*

SONUÇ

Bu çalışmada, yan ürün/atık zeytin yaprağından maksimum fenolik madde ve antioksidan madde içeren zeytin yaprağı ekstraktı, ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile elde edilmiş ve iyonik jelasyon yöntemi ile enkapsüle edilmiştir. Ultrasonik destekli ekstraksiyon işleminde optimum işlem koşulları, 5.31 dak süre, 39.27°C sıcaklık ve %40.51 genlik olarak bulgulanmıştır. İyonik jelasyon ile enkapsülasyon işleminde ise optimum enkapsülasyon koşulları; %1.04 ekstrakt konsantrasyonu, %0.5 kitosan konsantrasyonu ve 11.24 dak bekleme süresi olarak belirlenmiştir. Elde edilen enkapsüller fonksiyonel gıda üretiminde model gıda olarak seçilen kefire ilave edilmiş ve kefirin laktik asit bakteri sayısı ve duyuşal özellikleri üzerine etkisi incelenmiştir. Zeytin yaprağı ekstraktının acı tadının mikroenkapsülasyon işlemi ile giderildiği ve enkapsüle veya ham ekstrakt ilavesinin laktik asit bakterileri üzerine herhangi bir inhibe edici etkisi olmadığı bulgulanmıştır. Sonuç olarak yeşil ekstraksiyon yöntemi olan ultrasonik destekli ekstraksiyon ile antioksidan ve TFM açısından zengin ekstrakt elde edilmiş olup, iyonik jelasyon yöntemi ile ekstrakt biyoaktif bileşenlerini en iyi şekilde koruyabilecek şekilde enkapsüle edilmesi bu çalışmanın önemini arz etmektedir. Zeytin yaprağı ekstraktının ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemini de içerecek şekilde hibrit bir ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmesi, enkapsülasyon aşamasında ekstraktın emülsiyon yapı oluşturularak jelleşme çözeltisine damlatılması ve elde edilen kapsüllerin kefir üretiminde fermentasyon aşamasında eklenerek mikroorganizmanın çoğalması üzerine sinerjistik bir etkisi olup olmadığının incelenmesi bir sonraki çalışmamızın hedefi olarak planlanmaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların makale ile ilgili herhangi bir kişi veya kurum ile çıkar çatışması bulunmamaktadır.

YAZARLARIN KATKISI

Ezgi BİTİM, çalışmada gerçekleştirilen üretim ve analizlerde görev almıştır. Rabia AKÇAY-SALIK, Özgün KÖPRÜALAN-AYDIN, Özgül ALTAY ve Esin SELÇUK üretim, analizler, sonuçların yorumlanması ile makalenin yazımına katkı

sağlamıştır. Figen KAYMAK-ERTEKİN, çalışmanın planlanması ve yürütülmesi süreci ile sonuçların değerlendirilmesi ve makalenin yazımına katkıda bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (proje numarası FLP-2021-22560). Çalışmanın gerçekleştirilmesinde katkı sağlayan Melike ATALAY'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

Acar-Tek, N., Ağagündüz, D. (2020). Olive leaf (*Olea europaea* L. folium): potential effects on Glycemia and Lipidemia. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 76(1), 10-15.

Albero, B., Tadeo, J. L., Pérez, R. A. (2019). Ultrasound-assisted extraction of organic contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 739-750.

Alifakı, Y. Ö., Şakıyan, Ö., İşçi, A. (2018). Gilaburu (*Viburnum opulus* L.) meyvesinden fenolik bileşiklerin ultrason destekli ekstraksiyonu. *GIDA/The Journal of FOOD*, 43(5).

Altuğ, T., Elmacı, Y. (2005). Gıdalarda duyuşal değerlendirme, İzmir: Meta Basım.

AOAC (1990). Official Methods of Analysis AOAC INTERNATIONAL. 15th Edition, Washington DC, the USA.

Arı, M. (2022). Oleuropein ve Farmakolojik Etkileri. *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 6(2), 369-382.

Arriola, N. D. A., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., Pearson, P. J., Amboni, R. D. D. M. C. (2019). Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation—Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food chemistry*, 275, 123-134.

Arslan, E. E., Karademir, G., Berктаş, S., Çam, M. (2021). Zeytin yaprağı ekstraktı içeren soğuk çay üretimi. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 9(3), 843-849.

- Aydın, Ö., Ünlüel, İ., (2021). Enkapsülasyon teknikleri ve kontrollü salım. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (32), 640-648.
- Bajpai, S. K., Tankhiwale, R. (2006). Investigation of dynamic release of vitamin B2 from calcium alginate/chitosan multilayered beads: Part II. *Reactive and Functional Polymers*, 66(12), 1565-1574.
- Bayram, M., Topuz, S., Kaya, C. (2020). Antioxidant, Antimicrobial Activity of Olive Leaf Extract and Oleuropein, Their Possibilities Usage in Foods. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 8(2), 337-347.
- Borjan, D., Leitgeb, M., Knez, Ž., Hrnčič, M. K. (2020). Microbiological and antioxidant activity of phenolic compounds in olive leaf extract. *Molecules*, 25(24), 5946.
- Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Strube, J., Uhlenbrock, L., Gunjevic, V., Cravotto, G. (2019). Green extraction of natural products. Origins, current status, and future challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 248-263.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cifá, D., Skrt, M., Pittia, P., Di Mattia, C., Poklar Ulrih, N. (2018). Enhanced yield of oleuropein from olive leaves using ultrasound-assisted extraction. *Food science & nutrition*, 6(4), 1128-1137.
- Çilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235(4), 587-596.
- Danahaliloğlu, H., Tekeli, Y., Göycüncik, S., Yıldırım, F. (2018). Hatay'da farklı bölgelerde yetiştirilen zeytin yapraklarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 8(1), 77-86.
- de Moura, S. C., Schettini, G. N., Garcia, A. O., Gallina, D. A., Alvim, I. D., Hubinger, M. D. (2019). Stability of hibiscus extract encapsulated by ionic gelation incorporated in yogurt. *Food and Bioprocess Technology*, 12(9), 1500-1515.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M. N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate polymers*, 71(1), 126-134.
- Dodero, A., Pianella, L., Vicini, S., Alloisio, M., Ottonelli, M., Castellano, M. (2019). İyonik jelasyon yoluyla hazırlanan aljinat bazlı hidrojeller: Çapraz bağlanma derecesini tahmin etmek için deneysel bir tasarım yaklaşımı. *Avrupa Polimer Dergisi*, 118, 586-594.
- Flórez-Fernández, N., Domínguez, H., Torres, M. D. (2019). A green approach for alginate extraction from *Sargassum muticum* brown seaweed using ultrasound-assisted technique. *International journal of biological macromolecules*, 124, 451-459.
- González-Ortega, R., Šturm, L., Skrt, M., Di Mattia, C. D., Pittia, P., Ulrih, N. P. (2021). Liposomal encapsulation of oleuropein and an olive leaf extract: Molecular interactions, antioxidant effects and applications in model food systems. *Food Biophysics*, 16(1), 84-97.
- Guler, B. A., Deniz, I., Demirel, Z., Yesil-Celiktas, O., Imamoglu, E. (2020). A novel subcritical fucoxanthin extraction with a biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal*, 153, 107403.
- Güngör, KK, Coşgun, G., Özdemir, M., Torun, M. (2022). Zerdeçalın su ile ekstraksiyonunda ultrases işleminin etkisi ve elde edilen ekstraktın püskürterek kurutma yöntemiyle enkapsülasyon koşullarının optimizasyonu. *Gıda*, 47 (1), 107-120.
- Gür, F, Ağgöl, A. G., Gülaboğlu, M. (2020). Su ile hazırlanan zeytin yaprağı özütünün ratlarda streptozotosin kaynaklı oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu üzerine etkileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 10(4), 2406-2415.
- Gürbüz, M., Ögüt, S. (2018). Zeytin yaprağının potansiyel sağlık yararları. *Türkiye Klinikleri Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(3), 242-253.

- Hışıl, Y. (2007). Enstrümental gıda analizleri laboratuvar deneyleri, Ege Üniversitesi, Yayın No: 45, İzmir.
- 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.
- ISO (1998), ISO 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria.--Colony-count technique at 30 degrees C, <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15214:ed-1:v1:en> (Erişim Tarihi: 4 Aralık 2020).
- Jasicka-Misiak, I., Poliwoda, A., Petecka, M., Buslovych, O., Shlyapnikov, V. A., Wiczorek, P. P. (2018). Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. *Ecological Chemistry and Engineering*, 25(1), 133.
- Kaya, S., Demir, N. (2020). Zeytin (*Olea europaea*) yaprağı ekstraktının model organizma *Galleria mellonella* hemosit aracılı bağışıklık tepkileri üzerine etkileri. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(3), 646-653.
- Kılıç, S. (2020). Kazdağları bölgesine ait zeytin, zeytin yaprağı ve zeytinyağlarının element tayini ve metot validasyonu. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 3(1), 48-54.
- Kumar, K., Srivastav, S., Sharanagat, V. S. (2021). Ultrasound assisted extraction (UAE) of bioactive compounds from fruit and vegetable processing by-products: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 70, 105325.
- Lama-Muñoz, A., del Mar Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., de Torres, A., Romero, I., Castro, E. (2019). Extraction of oleuropein and luteolin-7-O-glucoside from olive leaves: Optimization of technique and operating conditions. *Food chemistry*, 293, 161-168.
- Markhali, F.S., Teixeira, J.A., Rocha, C.M.R. (2020). Olive tree leaves-a source of valuable active compounds. *Processes*, 8: 1177, 1-18. doi:10.3390/pr8091177.
- Medina, E., Romero, C., García, P., Brenes, M. (2019). Characterization of bioactive compounds in commercial olive leaf extracts, and olive leaves and their infusions. *Food & function*, 10(8), 4716-4724.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., Kadivar, M. (2016). Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 27(16), 1631-1644.
- Poyraz, Ç., Küçükıldız, G., Kırbaşlar, Ş. İ., Çigeroğlu, Z., Şahin, S. (2021). Valorization of Citrus unshiu biowastes to value-added products: an optimization of ultrasound-assisted extraction method using response surface methodology and particle swarm optimization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11.
- Prommuak, C., De-Eknamkul, W., Shotipruk, A. (2008). Extraction of flavonoids and carotenoids from Thai silk waste and antioxidant activity of extracts. *Separation and Purification Technology*, 62(2), 444-448.
- Salık, M. A., Çakmakçı, S. (2021). Zeytin (*Olea Europaea* L.) yaprağının fonksiyonel özellikleri ve gıdalarda kullanım potansiyeli. *Gıda*, 46(6), 1481-1493.
- Santagapita, P. R., Mazzobre, M. F., Buera, M. P. (2011). Formulation and drying of alginate beads for controlled release and stabilization of invertase. *Biomacromolecules*, 12(9), 3147-3155.
- Silva de Azevedo, E., Zapata Noreña, CP. (2021). External ionic gelation as a tool for the encapsulation and stability of betacyanins from *Bougainvillea glabra* bracts extract in a food model. *J Food Process Preserv.*, 45:e15637.
- Şahin, S. (2019). Farklı İllerden Temin Edilen Fındık Zarının Bileşimi ve Antioksidan Etkinliğinin Araştırılması. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 9(1), 27-35.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 595-602.

- Şahin, S., Elhussein, E., Bilgin, M., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S. (2018). Effect of drying method on oleuropein, total phenolic content, flavonoid content, and antioxidant activity of olive (*Olea europaea*) leaf. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(5), e13604.
- Şahin, S., İlbay, Z., Kırbaşlar, Ş. İ. (2015). Study on optimum extraction conditions for olive leaf extracts rich in polyphenol and flavonoid. *Separation Science and Technology*, 50(8), 1181-1189.
- Tarchoune, I., Sgherri, C., Eddouzi, J., Zinnai, A., Quartacci, M. F., Zarrouk, M. (2019). Olive leaf addition increases olive oil nutraceutical properties. *Molecules*, 24(3), 545.
- Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S. M., Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 66(35), 9231-9240.
- Temur, A., Temiz, M. A. (2018). Zeytin yaprağının (*Olea europaea* L.) diyabetik sıçanlarda bazı biyokimyasal ve hematolojik parametreler üzerine etkisi. *Alinteri Journal Of Agriculture Science*, 33(1), 13-19.
- Türker, İ., Koç, B., İşleroglu, H. (2018). Püskürtmeli-dondurarak kurutma işleminin maltodekstrinin fiziksel özellikleri üzerine etkisi. *GIDA/The Journal of FOOD*, 43(2).
- Tzatsi, P., Goula, A. M. (2021). Encapsulation of extract from unused chokeberries by spray drying, co-crystallization, and ionic gelation. *Waste and Biomass Valorization*, 12(8), 4567-4585.
- Ünver, N., Çelik, Ş. (2022). Optimization of ultrasound-assisted extraction of olive leaf (var. halhah) extracts. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 50(2), 173-184.
- Vural, N., Cavuldak, Ö. A., Akay, M. A. (2021). D-Optimal design and multi-objective optimization for green extraction conditions developed with ultrasonic probe for oleuropein. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 20, 100279.
- Xie, P. J., Huang, L. X., Zhang, C. H., You, F., Zhang, Y. L. (2015). Reduced pressure extraction of oleuropein from olive leaves (*Olea europaea* L.) with ultrasound assistance. *Food and Bioproducts processing*, 93, 29-38.
- Yin, M., Jiang, N., Guo, L., Ni, Z., Al-Brakati, A. Y., Othman, M. S., Kassab, R. B. (2019). Oleuropein suppresses oxidative, inflammatory, and apoptotic responses following glycerol induced acute kidney injury in rats. *Life sciences*, 232, 116634.
- Wissam, Z., Samer, H. (2019). Encapsulation of flaxseed oil extract in alginate-salep system by ionic gelation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55.