

Zeytin Yağı İşleme Yan Ürünlerinden Zeytin Yaprağı ile Zeytin Karasuyunun Antimikrobiyal ve Antioksidan Etkileri

Hatice Basmacıoğlu-Malayoğlu*, Burcu Aktaş

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Bornova, İzmir

*e-posta: hatice.basmacioglu@ege.edu.tr; Tel: +90 (232) 3112702; Fax: +90 (232) 388 1867

Özet

Zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ve zeytin karasuyu başta antimikrobiyal ve antioksidan olmak üzere çok yönlü biyolojik etkilere sahip fenolik bileşiklerce zengindir. Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajanlar olarak farklı alanlarda (ilaç, gıda, kozmetik, hayvan besleme gibi...) değerlendirilmesi çevresel, sosyal, ekonomik ve sağlık açısından oldukça önem taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Zeytin yaprağı, zeytin karasuyu, antioksidan, antimikrobiyal

Antioxidant and Antimicrobial Activities of Olive leaf and Olive Mill Wastewater from Olive Oil Processing By-products

Abstract

Olive leaf and olive mill wastewater from olive oil processing by-products are rich of phenolic compounds which have multi biological effects mainly like antimicrobial and antioxidant. It is important to considerate using olive leaf and olive mill wastewater as a natural agents in different fields (medicine, food, cosmetic, animal feeding etc...) in terms of environmental, social, economy and health.

Key words: Olive leaf, olive mill wastewater, antioxidant, antimicrobial

Giriş

Akdeniz ülkelerinde çok eski çağlardan beri süregelen zeytin (*Olea europaea* L.) yetiştiriciliği günümüzde önemli ve geleneksel bir agro-endüstriyel faaliyet durumundadır. Dünya yıllık toplam zeytin üretiminin 13 milyon ton olduğu, toplam üretimin en büyük payının (%75.3) başta İspanya (%52.2), İtalya (%27.9), Yunanistan (%17.3), Portekiz (%2.1) olmak üzere Avrupa ülkelerinde gerçekleştirildiği, Tunus (%5.9), Suriye (%4.8), Türkiye (%4.6), Fas (%3.2) ve Cezayir'in (%1.2) ise diğer önlü yağ üreten ülkeler arasında yer aldığı bildirilmektedir (Anonim, 2009). Türkiye'de Ege, Marmara, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölgelerinde oldukça geniş bir alanda zeytin yetiştiriciliği yapılmaktadır (Ünsal, 2000).

Son yıllarda Akdeniz diyeti ile sağlıklı yaşam arasındaki ilişkiler detaylı olarak araştırılmaktadır. Bugüne kadar yapılan klinik çalışmalardan elde edilen epidemiyolojik veriler Akdeniz diyetlerinde önemli bir yere sahip zeytin yağı ve zeytin ürünlerinin koroner kalp hastalığı riskini azaltıcı, bazı kanser türlerini engelleyici, hipolipidemik, antidiyabetik ve antimikrobiyal etkilerini göstermektedir (Gonzalez ve ark., 1992; Hansen ve ark., 1996; Benavente-Garcia ve ark., 2000).

Dolayısıyla zeytin yağı ve zeytin ürünlerinin ağırlıklı olarak yer aldığı 'Akdeniz Beslenme Modeli' sağlıklı besleme açısından dikkate alınması gereken bir model durumundadır. Zeytin yağı ve zeytin ürünlerinin insan sağlığı üzerindeki olumlu etkileri yapılarında bulunan çok yönlü biyoaktif bileşiklere dayandırılır. Bu bileşikler tokoferoller, polifenoller, fosfolipidler, karotenoidler, klorofiller, steroller ve skualen olarak gruplandırılır (Visioli ve ark. 2002).

Zeytinin yağa işlenmesi ile elde edilen yan ürünlerden zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun polifenolik bileşiklerce zengin yapısı ve buna bağlı olarak antioksidan, antitrombotik, antiinflamasyon, hipokolesterolemik, antimikrobiyal ve antiviral gibi çok yönlü biyolojik aktiviteleri bilimsel çalışmalarla ortaya konmuştur.

Bu derlemede; zeytin yağı işleme yan ürünlerinden zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun fenolik bileşik içerikleri ile bu bileşiklerin kimyasal yapıları, antioksidan ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalar ele alınacaktır.

Zeytin Yağı İşleme Yan Ürünleri

Zeytinin toplanması ve yağının çıkarılmasından önceki temizleme-harmanlama işlemleri sırasında zeytin

yaprakları ile zeytinden yağ çıkarılması sonucunda zeytin karasuyu ve zeytin çekirdeği+posasından oluşan pirina olmak üzere üç farklı yan ürün elde edilir. İşlenen zeytinin toplam ağırlığının % 20, 30 ve 50'si oranında sırasıyla zeytinyağı, küspesi (pirina) ve bitkisel özsu elde edilir (Niaounakis ve Halvadakis, 2006).

Zeytin Yapağı ve Zeytin Karasuyu

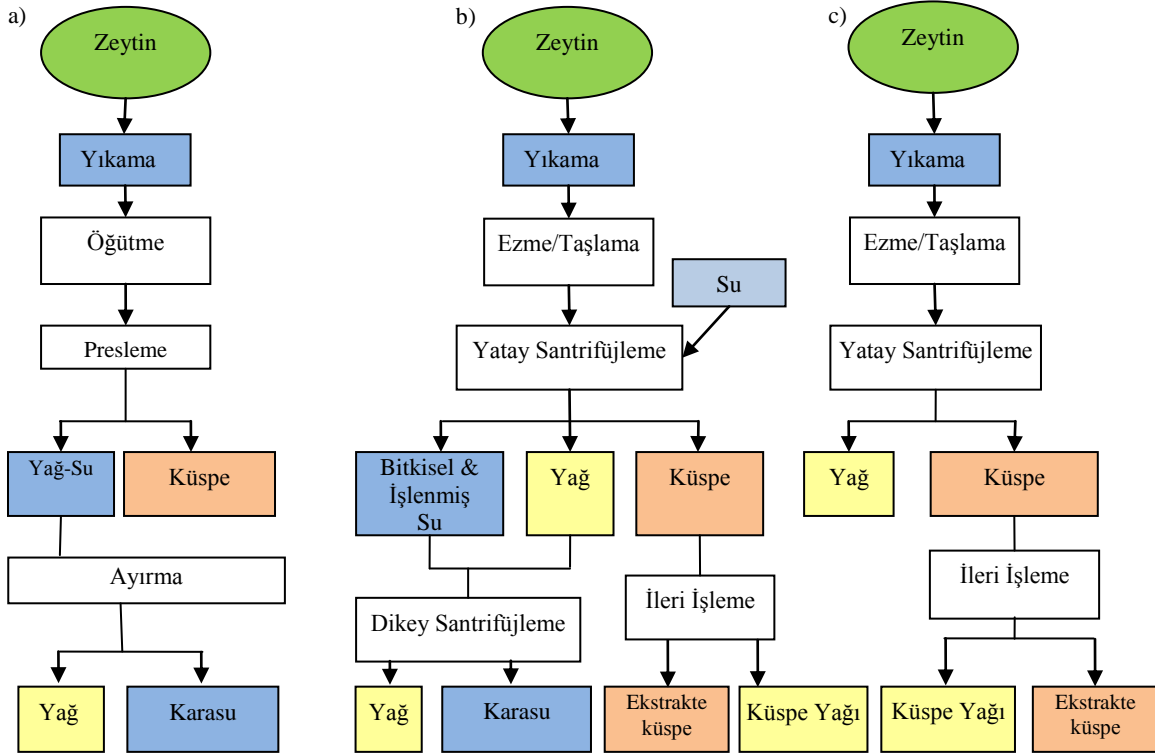
Zeytin yaprakları zeytin ağaçlarının budanması, zeytin toplama ve zeytinlerin yağının çıkarılmasından önceki temizleme-harmanlama işlemleri sırasında açığa çıkar. Elde edilen zeytin yapraklarının miktarı ağacın yaşı ve budama tipine göre 12-30 kg/ağaç arasındadır. (Nefzaoui, 1983). Zeytin yetiştiriciliğinin yaygın olduğu bazı bölgelerde zeytin yaprağının çiftlik hayvanların beslenmesinde veya zeytin dalları ile toplanan yaprakların yakacak olarak kullanımı söz konusudur. Birçok doğal üründe olduğu gibi zeytin yapağı ekstraktının kimyasal kompozisyonu zeytinin yetiştiği bölge, toprağın yapısı, varyete ve kullanılan yöntemle bağlı olarak değişir (Sudjana ve ark., 2009). Zeytin yapağı ekstraktı pres, biotransformasyon, sıvı/sıvı, solvent, superkritik-CO₂ ekstraksiyonu gibi farklı yöntemlerle elde edilir. Son yıllarda ticari olarak

üretilen zeytin yapağı ekstraktı sağlık üzerindeki olumlu etkilerinden dolayı birçok kişi tarafından 'besinsel destekler' olarak kullanılmaktadır.

Zeytinin klasik pres ve üç fazlı sürekli proseslerle yağa işlenmesi sırasında elde edilen zeytin karasuyu zeytinin bünyesindeki özsu, zeytin yıkama suları, proses sırasında katılan su ve pirinadan sızan suların toplamıdır (Ben Sassi ve ark., 2006). Ülkemizde zeytin yağı üretimi klasik pres ve üç fazlı sürekli proseslerle elde edilir. Ancak zeytinyağı üretiminin iki fazlı sürekli olarak gerçekleştirildiği Avustralya, İspanya gibi ülkelerde tek başına karasu çok az veya hiç elde edilmez. Bu ülkelerde elde edilen ürün zeytin küspesi+karasuyu şeklindedir. Üç farklı işleme prosesi Şekil 1'de verilmiştir.

Zeytin karasuyunun miktarı işletme koşulları ve prosese (klasik veya üç fazlı sürekli) bağlı olarak değişmekle birlikte 0.5-1.68 m³/ton_{zeytin} arasındadır. Ülkemizde her yıl yaklaşık olarak 880.000 m³ zeytin karasuyu oluşur.

Zeytin karasuyunun bu özelliklerinden dolayı 1 m³'ü yaklaşık olarak 200 m³ evsel nitelikli atıksuya ve 200 m³ evsel nitelikli atıksuyun ise yaklaşık 1 333 kişilik bir nüfusun atıksuyuna eşdeğer (Oktav ve ark., 2003)



Şekil 1. Klasik (a), üç fazlı sürekli (b), iki fazlı sürekli (c) zeytin işleme prosesleri (Anonim, 2008)

olduğu dikkate alındığında yıllık üretilen 880.000 ton karasuyun eşdeğer evsel nitelikli atıksu miktarını yaklaşık 3.5 milyon nüfus eşdeğeri olarak hesaplamak mümkündür. Zeytinin yağa işlenmesi sonucunda elde edilen karasuyu; koyu mor-koyu kahverengiden siyaha kadar değişen renkte, zeytin yağına özgü koku, yüksek derecede organik kirlilik gösteren (kimyasal oksijen ihtiyacı;40-220g/L ve biyolojik oksijen ihtiyacı; 35-110 g/L), pH'ı 3-6, 25-45g/L düzeyinde toplam organik madde (şeker, tanin ve polifenol, polialkol, pektin ve lipit gibi fenolik bileşikler), 0.5-24g/L düzeyinde polifenolik içeriği, kuru maddenin %60'ı kadar şeker, yüksek katı madde içeriği (20g/L), ağırlıklı potasyum olmak (~4g/L) üzere yüksek inorganik madde içeriği ile karakterize edilir (Niaounakis ve Halvadakis, 2006). Dünya'da karasuyunun arıtımında biyolojik, kimyasal fiziksel ve bunların kombine edildiği teknolojik prosesler kullanılmaktadır. Ancak karasuyun arıtımı için düşünülen çözümde sadece toksik maddelerin giderimi değil aynı zamanda üretim zincirindeki polifenolik bazı değerli hammaddelerin de geri kazanımı göz önüne alınmalıdır (Allouche ve ark., 2004; Obied ve ark., 2005). Söz konusu yan ürünlerinde bulunan polifenolik bileşiklerin saf formlarının kimyasal ve enzimatik yollarda üretilmesi mümkün olmasına rağmen üretim maliyeti oldukça yüksektir. Oysa zeytin yağı işleme yan ürünlerinden polifenolik bileşiklerin kazanımı ekonomik antioksidan eldesi açısından önemlidir Zeytin karasuyundan polifenolik bileşiklerin kazanımı solventlerle ekstraksiyon, reçine kromatografisi, ultra-filtrasyonla seçici konsantrasyon, ters osmos, katı-sıvı veya sıvı-sıvı ekstraksiyon, superkritik sıvı ekstraksiyonu gibi belli başlı sistemlerle gerçekleştirilir (De Leonardis ve ark., 2007). Bu kazanım yöntemleri içerisinde yüksek verimde ve saflıkta antioksidan eldesini sağlayan basit, etkili, pahalı olmayan sistemler üzerinde önemle durulur (Agalias ve ark., 2007). Son yıllarda araştırmacılar (Russo, 2007) membran teknolojileri üzerine yoğunlaşmakla birlikte enzimatik ve hidrotermal işlemlerinde antioksidan kazanımında daha yüksek saflıkta ürün eldesi açısından önem taşıdığı da bildirilmektedir (Takaç ve Karakaya, 2009). Dünya'da zeytin karasuyunun lipaz, tek hücre proteini ve biyodisel üretimlerinde değerlendirilmesi, gübre olarak kullanılması, doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajanlar olarak gıda, kozmetik, ilaç ve hayvan besleme alanlarında değerlendirilmesi üzerinde durulmaktadır.

Zeytin Yaprağı ve Zeytin Karasuyunun Yapısında Bulunan Fenolik Bileşikler

Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun 30'dan fazla

fenolik bileşik içerdiği bildirilmekle birlikte bu bileşikler genel olarak fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler, sekoiridoidler ve lignanlar olarak gruplandırılır (Artajo ve ark., 2006). Zeytinin yağa işleme sırasında kullanılan prosese bağlı olarak meyve etinde bulunan polifenol bileşiklerin % 1-2'si, %53'ü ve %45'i sırasıyla yağa, karasuya ve pirinaya geçer (Niaounakis ve Halvadakis, 2006). Zeytin karasuyu (ham veya ekstrakt) ve yaprağı ekstraktının belli başlı fenolik bileşik içerikleri Çizelge 1 ve 2'de verilmiştir.

Çizelge 1. Zeytin karasuyu ve ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve oranları (%)

	Ham	Ekstrakt (Etil-asetat)
Hidroksitirozol	1433	1225
Tirosol	851	345
3,4-Dihidroksifenil asetik asit	87	70
p-hidroksifenil asetik asit	274	198
Kaffeik asit	321	256
p-Kumarik asit	298	169
Ferulik asit	94	70

(Bouaziz ve ark., 2008)

Çizelge 2. Zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşikler ve oranları (%)

Oleuropeosidler	Oleuropein	24.54
	Verbaskosid	1.11
Flavonlar	Luteolin-7-glukosid	1.38
	Apigenin-7-glukosid	1.37
	Diosmetin-7-glukosid	0.54
	Luteolin	0.21
Flavanol	Diosmetin	0.05
	Rutin	0.05
Flavan-3-ol	Kateşin	0.04
	Tirosol	0.71
Fenoller	Hidroksitirozol	1.46
	Vanilin	0.05
	Vanilik asit	0.63
	Kaffeik asit	0.34

(Benavente-Garcia ve ark., 2000)

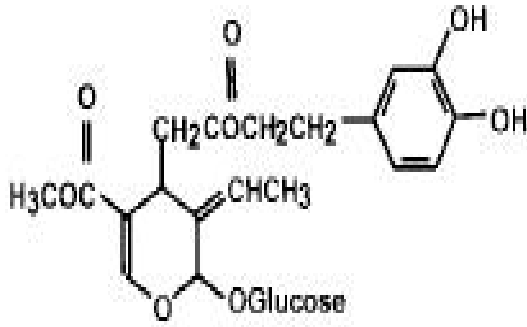
Şekil 2'de zeytin yaprağı ve karasuyu ekstraktında bulunan bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları gösterilmiştir (Benavente-Garcia ve ark., 2000; De Marco ve ark., 2007; Tafesh ve ark., 2011).

Zeytin karasuyunun temel bileşeni hidroksitirozol iken zeytin yaprağının ise oleuropein'dir. Olgunlaşmamış zeytine acı tadı veren oleuropein sekoiridoid grubun doğal bir ürünü olup hidrolizi ile 3,4-dihidroksi-

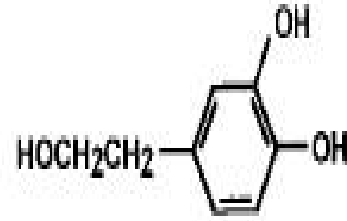
feniletanol (hidroksitirosol) ve elenik asit üretilir (Şekil-3) (Benavente-Garcia ve ark., 2000).

Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun toplam fenol bileşik içeriği zeytinin toplanma zamanı, olgunluk derecesi, varyetesine, yetiştiği toprak, iklim koşulları, zeytinyağı üretim prosesleri ve depolanma koşulları gibi değişik etkenlere bağlı olarak farklılık gösterir (Ranalli ve ark., 2006). Nitekim zeytin olgunlaştıkça elde edilen karasuyun toplam polifenol içeriğinde azalma olduğu saptanmıştır. Ancak zeytinin olgunlaşması ve işlenmesi

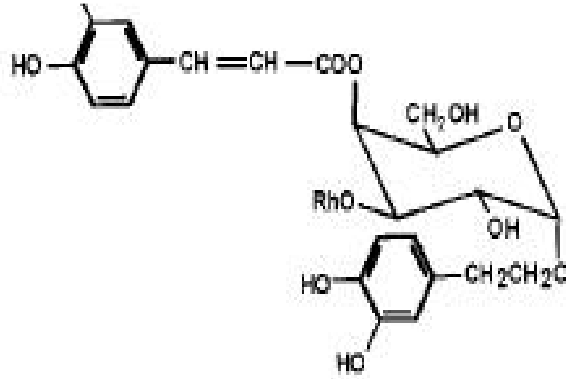
sırasında oleuropein azalırken onun serbest komponenti olan hidrositirosol düzeyinde artış olduğu bildirilmektedir (De Leonardi ve ark., 2007). Diğer polifenolik bileşiklerce zengin bitkisel ürünlerde olduğu gibi zeytin işleme yan ürünlerinden elde edilen ekstraktların toplam fenol içeriği ile antioksidan aktiviteleri arasında yüksek bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Le Tutour ve Guedon, 1992; Silva ve ark., 2006).



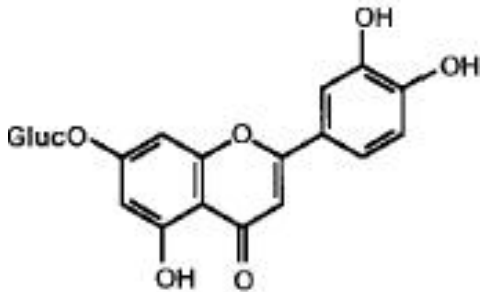
Oleuropein



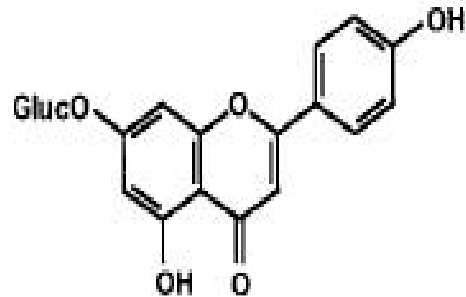
Hidroksitirosol



Verbaskosid

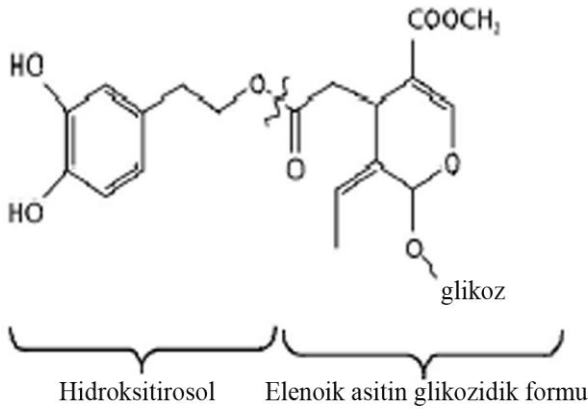


Luteolin-7-glukosid



Apigenin-7-glukosid

Şekil 2. Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyu ekstraktında bulunan bazı fenolik bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 3. Oleuropeinin kimyasal yapısı

Antimikrobiyal Etkileri

Gerek insan ve gerekse hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin rezistans oluşturması gerekçesiyle yeni antimikrobiyal ajanların geliştirilmesi veya bulunmasına yönelik yapılan çalışmalar gündemdedir. Bununla birlikte uzun yıllar antibiyotikler hayvan beslemede büyümeyi teşvik edici yem katkı maddesi olarak kullanılmış ancak bakteriyel direnç ve hayvansal organizmada kalıntı riski nedeniyle 2006 yılı başından itibaren AB ülkelerinde ve ülkemizde kullanımlarına yasaklama getirilmiştir. Bu durum antibiyotiklere alternatif doğal ve güvenli yem katkı maddeleri konusundaki çalışmaları hızlandırmıştır. Bu kapsamda bitkilerin yapısında bulunan doğal biyoaktif bileşenler veya bitkisel yan ürünlerden elde edilen antimikrobiyal etkili fenolik bileşenlere olan ilgi artmıştır.

Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun yapısında bulunan fenolik bileşenlerin antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri yapılan *in vitro* çalışmalarla ortaya konmuştur (Capasso ve ark., 1995; Soler-Rivas ve ark., 2000; Sousa ve ark., 2006). Birçok araştırmacı tarafından antimikrobiyal aktivite gösteren bileşikler hidroksitirozol, oleuropein, 4-hidroksibenzoik asit, vanilik asit ve *p*-kumarik asit olarak bildirilmiştir. Nitekim hidroksitirozol'un solunum ve bağırsak enfeksiyonlarına neden olan gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu (Ibarra ve Sniderman, 2008); zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin *Esherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhi* ve *Vibrio parahaemolyticu* gibi birçok mikroorganizmaya karşı antimikrobiyal etki gösterdiği (Markin ve Duek, 2003) yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Zeytin yaprağı ekstraktının farklı

konsantrasyonları ile yürütülen bir başka *in vitro* çalışmada (Pereira ve ark., 2007) ekstraktın mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal kapasitesi *B. cereus* ~ *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus* > *C. neoformans* ~ *K. pneumoniae* ~ *P. aeruginosa* > *B. subtilis* şeklinde saptanmıştır. Zeytin yaprağı ekstraktının ana fenolik bileşeni oleuropeinin glikozidik yapısından dolayı hücre zarından geçiş yeteneği zeytin karasuyu ekstraktının ana fenolik bileşeni olan hidroksitirosole göre daha düşük olduğu bildirilmektedir (Saija ve Uccella, 2001). Zaher (2007) Mısır'da kanatlı endüstrisini ciddi olarak etkileyen solunum yolu hastalıklarından 'larengotrakeit' enfeksiyonuna karşı ticari zeytin yaprağı ekstraktının (Lext) etkilerini araştırmış ve elde ettiği bulgular sonucunda zeytin yaprağı ekstraktının potansiyel antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini bildirmiştir.

Antioksidan Etkileri

Lipid oksidasyonu gıdaların hazırlanması ve tüketilmesi sırasında ortaya çıkan en önemli değişikliklerden biridir. Lipid oksidasyonu gıdalarda arzulanmayan tad, koku, renk oluşumuna neden olabildiği gibi toksik etkili karsinojik bileşiklerin oluşumuna neden olarak insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Antioksidanlar gıdanın temel maddesi olan lipidlerin oksidasyonunu önleyerek ürün kalitesini korumaya yardımcı olurlar. Gıda sektörü yanında yem sektörü ve hayvan besleme alanında da antioksidan kullanımı söz konusudur. Yem sektöründe yağların oksidasyonunu engellemek veya geciktirmek amacıyla kullanılan antioksidanlar hayvan beslemede de canlı organizmada oksidatif stres koşullarına bağlı oluşan oksidatif stresin olumsuz etkilerini azaltmak, hayvansal üretim sonucunda elde edilen et ve yumurta gibi hayvansal ürünlerin lipid stabilitesini artırarak raf ömrünü uzatmak ve özellikle de son yıllarda 'fonksiyonel gıda' üretmek amacıyla yeme ilave edilirler. Uzun yıllar gıda ve yem sektöründe BHA (butilat hidroksianisol), BHT (butilat hidroksitoluen), propil gallat (PG), tersiyer hidroksiquinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanlar ile α -tokoferol asetat, β -karoten ve Vitamin C gibi doğal antioksidanlar yaygın olarak kullanılmıştır. Ancak sentetik antioksidanlarının insan sağlığı üzerinde toksik etkilerinin olabileceğinin bildirilmesi ve bu nedenle kullanımlarına sınırlama veya yasaklama getirilmesi; sağlık otoritelerinin bitkisel antioksidanları güvenilir ürünler olarak açıklamaları ve bilinçli tüketicilerin doğal ürünleri tercih etmeleri bitkisel ürünlerin kullanımını gündeme getirmiştir (Basmacıoğlu-Malayoğlu ve ark., 2008).

Bitkisel ürünler kapsamında zeytin yaprağı ve karasuyunun antioksidan etkilerini araştıran çok sayıda *in vitro* çalışma yapılmıştır. Bouaziz ve ark. (2005) tarafından Tunus bölgesinde yetişen zeytin türlerinde bulunan saf flavonoidler ve düşük molekül ağırlıklı fenoller serbest radikal süpürme aktiviteleri bakımından kendi aralarında ve bütüldihidroksitoluen (BHT) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, BHT'e göre en yüksek antioksidan aktiviteyi hidroksitirozol'un daha sonra kafeik asitin ve kuersetinin gösterdiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada (Aruoma ve ark., 1998) hidroksitirozol'un ve oleuropein'in oksidasyona karşı BHT ve Vitamin E'den çok daha etkili olduğu saptanmıştır. Bir grup araştırmacı tarafından da (Fki ve ark., 2005) hidroksitirozol ve kafeik asitin *ortho* grubunda iki hidroksil grubunun bulunması yüksek antioksidan aktivite göstermelerine, tirozol, *p*-kumarik asit ve *p*-hidroksifenilasetikasidin ise tek hidroksil grubu içermeleri ise düşük antioksidan aktivite göstermelerine neden olduğu şeklinde bir açıklama yapılmıştır. Bu bildirişle uyumlu olarak Benavente-Garcia ve ark. (2000) tarafından zeytin yaprağı ekstraktında bulunan flavanoidlerin sırasıyla rutin>kateşin>luteolin>oleuropein>hidroksitirozol>diosmetin>kafeik asit>verbaskosid>oleuropein>luteolin-7-glukosid>vanilik asit>diosmetin-7-glukosid>apigenin-7-glukosid>tirozol>vanilin şeklinde antioksidan aktivite gösterdikleri saptanmıştır. Zeytin karasuyu ile yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak ana etken maddesi hidroksitirozol üzerinde durulmakla birlikte Cardinali ve ark. (2011) tarafından zeytin karasuyunun antioksidan etkiye sahip bir diğer önemli bileşenin verbaskosid ve onun izomeri isoverbaskosid' nin olduğu bildirilmektedir. Obied ve ark. (2007) tarafından da hidroksitirozol asilohidroelenolat ve *p*-kumarol-6'-sekologanosid (komselogosid) olmak üzere iki yeni biofenolik bileşik tanımlanmış ve bu bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin hidroksitirozol ve oleuropeine göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur.

Literatürde, söz konusu ürünlerin antioksidan etki

mekanizmalarına bazı açıklıklar getirilmiştir. Nitekim zeytin yaprağının aktif bileşenlerinden olan oleuropeinin antioksidan etkisi serbest radikallerin etkisini hem engelleme hem de dönüşüm seviyelerinde gösterdiği; oleuropeinin serbest radikallerin oluşumunu engellemesi, demir ve bakır gibi metal iyonlarıyla bağ oluşturmak suretiyle ve bu oluşan bağ sayesinde lipoksigenaz gibi birçok inflamatuvar enzimlerin aktivitelerini baskılamasıyla gerçekleştiği; oleuropeinin dönüşüm etkisinin hidroksil gruplarında bulunan serbest radikalleri nötürlemesi ve bunların olumsuz etkilerini engellemesi şeklinde açıklanmalar söz konusudur. Bunun yanında bir başka bildiriş (Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006) göre de oleuropein ve onun metabolitlerinden olan hidroksitirozolün antioksidan veya zincir kırma aktivitesini gösterebilmesi için yapısal olarak kateşol grubuna gereksinim duyulmaktadır. Söz konusu ürünlerin antioksidan etkilerini araştıran *in vitro* çalışmaların bir bölümü post-mortem (ete doğrudan uygulama) uygulamalarıdır. Nitekim kuzu etine (De Leonardis ve ark. (2007); pişmiş sığır ve domuz etine (Dejong ve Lanari, 2009) uygulanan zeytin karasuyu ekstraktının etin oksidatif stabilitesini artırdığı ve antioksidan etkinin kullanılan doz ile artış gösterdiği saptanmıştır. Aynı zamanda son araştırmacılar çalışmalarında şarap yan ürünü ve çaydan elde edilen ticari ekstraktlarla karasuyu ekstraktını karşılaştırmışlar ve söz konusu ekstraktların antioksidan etkilerini çay>zeytin karasuyu>şarap yan ürünü şeklinde bildirmişlerdir. Zeytin yaprağı ve karasuyu ekstraktında bulunan fenolik bileşiklerin saf formlarının antimikrobiyal ve antioksidan etkileri ortaya konmuş olsa da fenolik bileşiklerin birlikte çok daha yüksek antimikrobiyal ve antioksidan etki göstermeleri nedeniyle ekstrakt kullanımının bu anlamda daha etkili olduğunu bildiren bildirişlerde bulunmaktadır (Pereira ve ark., 2007; Lee ve Lee., 2010; Tafesh ve ark., 2011).

Zeytin yaprağı ve karasuyunun antioksidan ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan *in-vivo* çalışmalar Çizelge 3'de özetlenmiştir.

Çizelge 3. Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun antioksidan ve antimikrobiyal etkileri üzerine yapılan *in vivo* çalışmalar

Hayvan türü	Araştırma materyali	Sonuç	Kaynak
Rat	Zeytin karasuyu (1, 5, 10 mg/kg yem)	10 mg/kg zeytin karasuyu ekstraktı ratların plazma antioksidan kapasitesini artırmıştır.	Visioli ve ark., 2001
Tavşan	Zeytin yaprağı ekstraktından elde edilen oleuropein (20 mg/kg CA, günlük ağzdan alınan doz)	Normal ve alloxan indüklenmiş diyabetik tavşanlarda oleuropeinin oksidatif stresi ve hiperglisemiye azalttığı bulunmuştur. Diyabetik tavşanların kan ve eritrosit MDA seviyeleri oleuropeinle muamele edilmiş gruplarda önemli düzeyde azalmıştır. Diyabetik	Al-Azzawie ve Alhamdani, 2006

		tavşanlar normal kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında plazma SOD aktivitesi haricinde GSH-Px, glutasyon redüktaz, katalaz glutasyon enzim aktivitelerinin azaldığı, fakat 16 hafta boyunca diyabetik gruba oleuropein muamelesi ile bu değerlerin normal kontrol grubu ile farklılık göstermediği bulunmuştur.	
Etlik piliç	Sıvı zeytin yaprağı ekstraktı (75, 150, 300, 600 mg oleuropein/kg yem)	Yeme zeytin yaprağı ekstraktı ilavesi kör bağırsak <i>Escherichia coli</i> sayısını düşürmüştür.	Erener ve ark., 2009
Rat	Zeytin karasuyundan elde edilen saf hidroksitirosol ve ekstrakt (zeytin karasuyu polifenolleri), 20 mg/kg CA, intraperitoneal enjeksiyon	Zeytin karasuyu polifenolleri (ekstrakt) ve özellikle saf hidroksitirosol bileşiğinin ratlarda diabetikle indüklenen oksidatif stresi ve hiperglisemiyi önledikleri saptanmıştır.	Hamden ve ark., 2009
Hindi	Zeytin yaprağı (5 ve 10 g/kg yem), α - tokoferol asetat (150 ve 300 mg/kg yem)	Hindi göğüs eti fletoları 12 gün boyunca +4 C'de saklanmıştır. Bu dönem boyunca katkıların lipid oksidasyonunu önleme bakımından etkileri sırasıyla 300 mg/kg α - tokoferol asetat >10 g/kg zeytin yaprağı > 5 g/kg zeytin yaprağı \approx 150 mg/kg α - tokoferol-asetat şeklindedir. Katkıların et mikroorganizma içeriği üzerine etkisinde ise α - tokoferol asetatın etkisi görülmemekle birlikte zeytin yaprağının 10 g/kg dozunun 5 g/kg dozuna göre etkisi daha yüksek saptanmıştır.	Botsoglou ve ark., 2010a
Hindi	Zeytin yaprağı (10g/kg yem), kekik (10g/kg yem), α - tokoferol asetat (150 ve 300 mg/kg yem)	Hindi göğüs eti fletoları 12 gün boyunca +4 C'de saklanmıştır. Bu dönem boyunca katkıların lipid oksidasyonunu önleme bakımından etkileri sırasıyla 300 mg/kg α - tokoferol asetat >10 g/kg zeytin yaprağı >10 g/kg kekik >150 mg/kg α - tokoferol-asetat şeklindedir. Katkıların et mikroorganizma içeriği üzerine etkisinde ise α - tokoferol asetatın etkisi görülmemekle birlikte kekiğin antimikrobiyal etkisi zeytin yaprağına göre daha yüksek saptanmıştır.	Botsoglou ve ark., 2010b
Hindi	Zeytin yaprağı (10g/kg yem), biberiye (10g/kg), α - tokoferol asetat (150 ve 300 mg/kg yem)	Hindi göğüs eti fletoları 12 gün boyunca +4 C'de saklanmıştır. Bu dönem boyunca katkıların lipid oksidasyonunu önleme bakımından etkileri sırasıyla 300 mg/kg α - tokoferol asetat >10 g/kg zeytin yaprağı >10 g/kg biberiye >150 mg/kg α - tokoferol-asetat şeklindedir. Katkıların et mikroorganizma içeriği üzerine etkisinde ise α - tokoferol asetatın etkisi görülmemekle birlikte zeytin yaprağının antimikrobiyal etkisi biberiyeye göre daha yüksek saptanmıştır.	Govaris ve ark. 2010

Sonuç

Zeytin yaprağı ve zeytin karasuyunun içerdikleri fenolik bileşikler ile doğal antioksidan ve antimikrobiyal kaynağı olarak farklı alanlarda değerlendirmeleri çevresel, sosyal, ekonomik ve sağlık açısından oldukça önemlidir. Zeytin yaprağı ve karasuyunun antioksidan ve antimikrobiyal etkileri üzerine yeterli sayıda *in vitro* çalışma yapılmış olmasına rağmen *in-vivo* çalışmalar, özellikle zeytin karasuyu ekstraktı ile yapılan hayvan denemeleri, sınırlı sayıdadır. Söz konusu ürünlerin yem sektörü ile hayvan beslemede yaygın olarak kullanılan antioksidanlara alternatif doğal antioksidanlar ve 2006 yılında hayvan beslemede büyütme faktörü olarak kullanımına yasaklama getirilen antibiyotiklere alternatif antimikrobiyaller olarak kullanımlarına yönelik çalışmaların sayısı artırılmalıdır.

Kaynaklar

- Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsouni, A., Mikros, E., Tsarbopoulos, A., Gikas, E., Spanos, I., Manios, T. 2007. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of natural antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2671-2676
- Al-Azzawie, H.F., Alhamdani, M.S. 2006. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sciences* 78: 1371-1377.
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. 2004. Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 267-273.
- Anonim, 2008. Natural products from olive tree (*Olea europaea*) byproducts. InsolEx project, Bi annual meeting, 4th December 2008, London, UK. <http://workspace.imperial.ac.uk>. (26 April 2011).
- Anonim, 2010. <http://www.internationaloliveoil.org> (08 June 2011).
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Morelloä, J.R., Motilva, M.J. 2006. Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. *J. Agric. Food Chem.* 54: 6079-6088.
- Aruoma, O.I., Deiana, M., Jenner, A., Halliwell, B., Kaur, H., Banni, S., Corogiu, F. P., Dessi, M. A., Aeschbach, R. 1998. Effect of hydroxytyrosol found in extra virgin olive oil on oxidative DNA damage and on low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 5181-5187.
- Basmacıoğlu-Malayoğlu, H., Altan, Ö., Tüzmen, M.N., Yeşil-Çelikle, Ö. 2008. Yumurta Tavuklarında n-3 çoklu doymamış yağ asitlerince zenginleştirilmiş karma yemlere ilave edilen kekik esansiyel yağı ve biberiye ekstraktının oksidatif stabilize, lipid metabolizması, performans ve bazı yumurta kalite kalite kriterleri üzerine etkisi. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormancılık ve Veterinerlik Araştırma Grubu, TOVAG-1060090 nolu proje kesin raporu. 125s.
- Ben Sassi, A., Boularbah, A., Jaouad, A., Walker, G., Boussaid, A. 2006. A comparison of olive oil mill wastewaters (OMW) from three different processes in Morocco. *Process Biochemistry* 41: 74-78.
- Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., Del Rio, J.A. 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chemistry* 68: 457-462.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Christaki, E., Botsoglou, N. 2010a. Effect of dietary olive leaves and/or α -tocopheryl acetate supplementation on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during refrigerated storage. *Food Chemistry* 121(1): 17-22.
- Botsoglou, E., Govaris, A., Moulas, A., Botsoglou, N. 2010b. Oxidative stability and microbial growth of turkey breast fillets during refrigerated storage as influenced by feed supplementation with olive leaves, oregano and/or α -tocopheryl acetate. *British Poultry Science* 51(6): 760-768.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., Sayadi, S. 2008. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry* 108: 253-262.
- Bouaziz, M., Grayer, R.J., Simmonds, M.S.J., Damak, M., Sayadi, S. 2005. Identification and antioxidant potential of flavonoids and low molecular weight phenols in olive cultivar chemlali growing in Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* 53: 236-241.
- Capasso, R., Evidente, A., Schivo, L., Orru, G., Marcialis, M.A., Cristinzio, G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill wastewaters. *J. Appl. Bacteriol.* 79: 393-398.
- Cardinali, A., Linsalata, V., Lattanzio, V., Feruzzi, M.G. 2011. Verbascosides from olive mill waste water: Assessment of their bioaccessibility and intestinal uptake using an *in vitro* digestion/Caco-2 model system. *Journal of Food Science* 76(2): 48-54.
- Dejong, S., Lanari, M.C. 2009. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. *Food Chemistry* 116: 892-897.
- De Leonardis, A., Macciola, V., Lembo, G., Aretini, A., Nag, A. 2007. Studies on oxidative stabilisation of lard by natural antioxidants recovered from olive-oil mill wastewater. *Food Chemistry* 100: 998-1004.

- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., Sacchi, R. 2007. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive mill wastewaters. *Food Chemistry* 104: 858-867.
- Erener, G., Ocak, N., Öztürk, E., Cankaya, S., Özkanca, R. 2009. Zeytin yaprağı ekstraktının etlik piliçlerde performans, bazı kan parametreleri ve kör bağırsak mikroflorası üzerine etkileri. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Tarım ve Ormanlık ve Veterinerlik Araştırma Grubu, TOVAG-1070820 nolu proje kesin raporu.
- Fki, I., Allouche, N., Sayadi, S. 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid from olive mill wastewater for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants, *Food Chemistry* 93: 197-204.
- Gonzalez, M., Zarzuelo, A., Gamez, M.J., Utrilla, M.P., Jimenez, J., Osuna, I. 1992. Hypoglycemic activity of olive leaf. *Planta Med.* 58: 513-515.
- Govaris, A., Botsoglou, E., Moulas, A., Botsoglou, N. 2010. Effect of dietary olive leaves and rosemary on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast during refrigerated storage. *South African Journal of Animal Science* 40(2): 145-155.
- Hamden, K., Allouche, N., Damak, M., Elfeki, A. 2009. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions* 180: 421-432.
- Hansen, K., Adsersen, A., Christensen, B. S., Broeogger, S., Rosendal, J. S., Nyman, U., Wagner Smitt, U. 1996. Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from *Olea europaea* and *Olea lancea*. *Phytomedicine* 2: 319-324.
- Ibarra, A., Sniderman, Z. 2008. Olive polyphenol concentrate. US patent application 20080014322 A1. January 17th.
- US patent application 20080014322 A1. Olive polyphenol concentrate. January 17th.
- Le Tutour, B., Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochemistry* 31: 1173-1178.
- Lee, OH., Lee, BY. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europea* leaf extract. *Bio. Tech.* 101: 3751-3754.
- Markin, D., Duek, L. 2003. Berdicevsky, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses* 46: 132-136.
- Nefzaoui, A. 1983. Etude de l'utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale en Tunisie. Div. de la production et de la Sante Animales. FAO. Rome. 92p
- Niaounakis, M., Halvadakis, C.P. 2006. Olive processing waste management literature review and patent survey. 2nd ed. Elsevier: Waste Management Series 5:23-64.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K. 2005. Investigation of Australian olive mill waste for recovery of biophenols. *J. Agric. Food Chem.* 53: 9911-9920.
- Obied, H.K., Karuso, P., Robards, K. 2007. Novel secoiridoids with antioxidant activity from Australian olive mill waste. *J. Agric Food Chem.* 55(8): 2848-2853.
- Oktav, E., Çatalkaya, Ç.E., Şengül, F. 2003. Zeytinyağı endüstrisi atık sularının kimyasal yöntemlerle arıtımı. DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi 5(3): 11-21.
- Pereira, A.P., Ferreira, ICFR., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P.B., Seabra R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europea* L. Cv. Corbançosa) leaves. *Molecules* 12: 1153-1162.
- Ranalli, A., Contento, S., Lurera, L., Di Febo, M., Marchegiani, D., Di Fanzo, V. 2006. Factors affecting of the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (*Olea europaea* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54(2): 434-440.
- Russo, C.A. 2007. New membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *Journal of Membrane Science* 288: 239-246.
- Saija, A. and Uccella, N. 2001. Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Science & Technology* 11: 357-363.
- Silva, S., Gomes, L., Leitao, F., Coelho, A.V., Boas, L.V. 2006. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. fruits and leaves. *Food Science and Technology International* 12(5): 385-396.
- Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J. 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 80: 1013-1023.
- Sousa, A., Ferreira, ICFR., Calhelha, R., Andrade P.B., Valentão, P., Seabra, R. 2006. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives "alcaparra". *Bioorg. Med. Chem.* 14: 8533-8538.
- Sudjana, A.N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Riley, V.T., Hammer, K.A. 2009. Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International Journal of Antimicrobial Agents* 33: 461-463.

- Tafesh, A., Najami, N., Jadoun, J., Halahlih, F., Riepl, H., Azaizeh, H. 2011. Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 431021, pp:1-9.
- Takaç, S., Karakaya, A. 2009. Recovery of phenolic antioxidants from olive mill wastewater. Recent Patents on Chemical Engineering 2: 230-237.
- Ünsal, A. 2000. Ölmez ağacın peşinde Türkiye’de zeytin ve zeytinyağı. Yapı Kredi Yayınları 1343: 294.
- Visioli, F., Caruso, D., Plasmati, E., Patelli, R., Mulinacci, N., Romani, A., Galli, G., Galli, C. 2001. Hydroxytyrosol, as a component of olive mill waste water, is dose-dependently absorbed and increases the antioxidant capacity of rat plasma. Free Radic. Res. 34:301-305.
- Visioli, F., Poli, A., Galli, C. 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. Medicinal Research Reviews 22: 65-75.
- Zaher, KS. 2007. In vitro studies on the antiviral effect of olive leaf against infectious laryngotracheitis virus. Global Veterinaria 1(1): 24-30.