



T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN  
ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ZEYTİNYAĞI ELDESİNDE ÜRETİM  
KOŞULLARI VE BAZI KATKILARIN YAĞIN  
KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Ayşenur ACAR**

**DOKTORA TEZİ**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Mayıs-2023  
KONYA  
Her Hakkı Saklıdır**

## TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşenur ACAR tarafından hazırlanan “Zeytinyağı Eldesinde Üretim Koşulları ve Bazı Katkıların Yağın Kalite Özellikleri Üzerine Etkileri” adlı tez çalışması 04/05/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
<b>Başkan</b> Doç. Dr. İsmail TONTUL	.....
<b>Danışman</b> Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU	.....
<b>Üye</b> Doç. Dr. Hasan Hüseyin KARA	.....
<b>Üye</b> Doç. Dr. Hakan ERİNÇ	.....
<b>Üye</b> Doç. Dr. Fatma Nur ARSLAN	.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun ....../.../20.. gün ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim KALAYCI  
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü tarafından 201419003 nolu proje ile desteklenmiştir.

## TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

## DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Ayşenur ACAR

Tarih:

# ÖZET

## DOKTORA TEZİ

### ZEYTİNYAĞI ELDESİNDE ÜRETİM KOŞULLARI VE BAZI KATKILARIN YAĞIN KALİTE ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşenur ACAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

2023, 230 Sayfa

#### Jüri

Danışman Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

Doç. Dr. Hakan ERİNÇ

Doç. Dr. Hasan Hüseyin KARA

Doç. Dr. Fatma Nur ARSLAN

Doç. Dr. İsmail TONTUL

Zeytinyağı endüstrisinde, üretim tesisinin teknolojik tercihleri, proses boyunca işlenmekte olan zeytinlerde gerçekleşen biyokimyasal faaliyetleri dolayısıyla son ürünün kalitesini etkilemektedir.

Fenolik bileşiklerin, sızma zeytinyağının besinsel faydaları ve organoleptik özellikleri ile doğrudan ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Sızma zeytinyağma hidrofilik fenollerin geçişi, zeytin meyvesinin başlangıçtaki fenolik glikozit içeriği ve yağ ekstraksiyon işlemi sırasında bu glikozitler üzerindeki hidrolitik ve oksidatif enzimlerin aktivitesi ile ilgilidir. Fenolik glikozitleri hidrolize eden endojen  $\beta$ -glukozidaz enzimi ile polifenol oksidaz (PPO) ve peroksidaz (POD) gibi oksidoredüktazlar sızma zeytinyağının fenolik içeriğini etkileyen ana biyokimyasal faktörlerdendir.

Söz konusu çalışmada zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında PPO ve POD enzimlerinin aktivitesi inhibe edilerek, üretilen yağın fenolik profili değerlendirilmiştir. Çalışmada öncelikle optimum kırma hızı tespit edilmiş ve yanıt yüzey metodoloji (YYM, response surface methodology RSM) yöntemi ile belirlenen oranlarda oksalik asit (OA), L-sistein (L-sis), askorbik asit (AA) ve magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ) malaksasyon sırasında eklenmiştir. Zeytin hamuruna ilave edilen bu maddeler sonucunda elde edilen zeytinyağının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerindeki etkileri geleneksel uygulama ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Bunun yanında, zeytinyağının besinsel ve duyu kalitesi de araştırılmıştır.

Optimum kırma hızında (1000 rpm) kırılan zeytinlere malaksasyon aşamasında belirlenen oranlarda inhibitör nitelikli katkı maddeleri ilave edilerek 20 adet örnek elde edilmiştir. Bu maddelerin ilavesi ile örneklerin yağ veriminde ve serbest yağ asiti (%1 L-sis + %1  $MgCl_2$  ve %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5  $MgCl_2$  hariç) değerlerinde artış görülmüştür. Peroksit sayısı,  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerlerinde çoğunlukla düşüş görülürken, oksidatif stabilite genelde artmıştır. Peroksit sayısı ve  $K_{232}$  değerlerindeki artış ile oksidatif stabilitedeki düşüş %2  $MgCl_2$  kullanılan örnekte belirgin olarak görülmüştür. Zeytinyağlarının toplam fenolik madde ve DPPH değerlerinde artış tespit edilmiştir.  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerinde de artışlar görülürken, %2  $MgCl_2$  ve %2 AA kullanıldığında, diğer katkı maddelerinin tek başına kullanımlarına göre artışlar belirlenmiştir. Zeytin hamurlarının toplam fenolik madde değerleri açısından en yüksek değerler %2 AA ilave edilen örnekte, en düşük sonuç ise kontrol örneğinde bulunmuştur. Zeytin hamurlarında inhibitör katkıları DPPH değerlerinde artışa neden olurken,  $\beta$ -karoten ağartma değerinde azalma tespit edilmiştir. Uygulamalar arasında POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi sırasıyla 5.26-100 U/gr, 33.08-100 U/gr ve 138.78-218.11 U/gr aralığında değişmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Enzim aktivitesi, katkı maddesi, PPO enzim aktivitesi, POD enzim aktivitesi, zeytinyağı

## **ABSTRACT**

### **Ph.D THESIS**

## **EFFECTS OF PRODUCTION CONDITIONS AND SOME ADDITIVES IN OLIVE OIL EXTRACTION ON QUALITY CHARACTERISTICS OF THE OIL**

**Ayşenur ACAR**

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF  
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY  
DOCTOR OF PHILOSOPHY  
IN FOOD ENGINEERING**

**Advisor: Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU**

**2023, 230 Pages**

### **Jury**

**Advisor Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU**

**Doç. Dr. Hakan ERİNÇ**

**Doç. Dr. Hasan Hüseyin KARA**

**Doç. Dr. Fatma Nur ARSLAN**

**Doç. Dr. İsmail TONTUL**

In the olive oil industry, the technological preferences of the production facility affect the quality of the final product due to the biochemical activities that take place in the olives being processed during the process.

It is well known that phenolic compounds are directly related to the nutritional benefits and organoleptic properties of extra virgin olive oil. The transition of hydrophilic phenols to extra virgin olive oil is related to the initial phenolic glycoside content of the olive fruit and the activity of hydrolytic and oxidative enzymes on these glycosides during the oil extraction process. The endogenous  $\beta$ -glucosidase enzyme that hydrolyzes phenolic glycosides and oxidoreductases such as polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) are the main biochemical factors affecting the phenolic content of extra virgin olive oil.

In the study in question, the phenolic profile of the oil produced was evaluated by inhibiting the activity of PPO and POD enzymes during olive oil extraction. In the study, firstly, the optimum crushing rate was determined and oxalic acid (OA), L-cysteine (L-cys), ascorbic acid (AA) and magnesium chloride ( $MgCl_2$ ) were added during the malaxation stage at the rates determined by the response surface methodology (YYM, response surface methodology RSM) method. The effects on some physical and chemical properties of the olive oil obtained as a result of these substances added to the olive paste were examined by comparing them with the traditional application. In addition, the nutritional and sensory quality of olive oil was also investigated.

20 samples were obtained by adding inhibitory additives at the rates determined during the malaxation stage to the olives crushed at the optimum crushing rate (1000 rpm). With the addition of these substances, an increase was observed in the oil yield and free fatty acid values (excluding 1% L-cys + 1%  $MgCl_2$  and 0.5% OA + 0.5% L-cis + 0.5% AA + 0.5%  $MgCl_2$ ) of the samples. While peroxide values,  $K_{232}$  and  $K_{270}$  values were mostly decreased, oxidative stability values were mostly increased. The decrease in oxidative stability with the increase in the peroxide and  $K_{232}$  values was evident in the sample using 2%  $MgCl_2$ . It was determined that the total phenolic substance and DPPH values of olive oils increased. While increases were observed in the antioxidant activity value determined by the  $\beta$ -carotene bleaching method, when 2%  $MgCl_2$  and 2% AA were used, increases were determined compared to the use of other additives used only. In terms of the total phenolic content of olive pastes, the highest values were found in the sample to which 2% AA was added, and the lowest result was found in the control sample. While inhibitory additives caused an increase in DPPH values in olive pastes, a decrease in  $\beta$ -

carotene bleaching value was detected. Among treatments, POD, PPO and  $\beta$ -glucosidase enzyme activity ranged between 5.26-100 U/gr, 33.08-100 U/gr and 138.78-218.11 U/gr, respectively.

**Keywords:** Enzyme activity, additive, PPO enzyme activity, POD enzyme activity, olive oil



## ÖNSÖZ

Bu araştırmanın gerçekleştirilmesi sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamın planlanması, gerçekleştirilmesi ve yazımına kadar her aşamasında yol göstericim olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU'na teşekkür eder ve saygılarımı sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını ve dostluklarını esirgemeyen Dr. Mine ASLAN'a ve beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Vildan EYİZ, Öğr. Gör. Sıddıka Yüstra ÖZKILIÇ ve Arş. Gör. Dr. Tekmile CANKURTARAN KÖMÜRCÜ'ye teşekkür ederim. Çalışmalarımda yardımcı olup manevi desteğininide sürdüren Doç. Dr. İsmail TONTUL Hocam'a hürmetlerimi arz ederim.

Doktora eğitimim boyunca YÖK 100/2000 Doktora Projesi ile 100/2000 YÖK Doktora Bursu almamı sağlayan Yükseköğretim Kurulu'na (YÖK) teşekkür ederim. Ayrıca, TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programının desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım olan, maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan, anlayışlarını ve sabırlarını eksik etmeyen çok kıymetli babam Bünyamin ACAR ve annem Safire ACAR'a hürmet eder ellerinden öperim. Kardeşlerim (Emine GÜNAY, Saliha ACAR ve Esra ACAR) ve canım yeğenim Selim GÜNAY'a da şükranlarımı sunarım.

Ayşenur ACAR  
KONYA-2023

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	7
ABSTRACT.....	8
ÖNSÖZ .....	10
İÇİNDEKİLER .....	11
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	13
ÇİZELGELER.....	14
ŞEKİLLER.....	16
1. GİRİŞ.....	20
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	23
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	41
3.1. Materyal .....	41
3.2. Kullanılan Kimyasallar .....	41
3.3. Deneysel Tasarım .....	41
3.4. Tez Çalışmasının Kapsamı .....	42
3.5. Kırma Hızlarının Belirlenmesi.....	42
3.6. İnhibitör Miktarının Tespiti .....	44
3.7. Zeytinyağı Üretimi.....	44
3.8. Zeytinyağında Yapılan Analizler.....	47
3.8.1. Zeytinyağı veriminin belirlenmesi.....	47
3.8.2. Renk analizi (L*, a*, b*) .....	48
3.8.3. Serbest yağ asitliği tayini.....	48
3.8.4. Peroksit değeri tayini .....	48
3.8.5. UV özgül soğurma değeri tayini .....	49
3.8.6. Toplam klorofil ve karotenoid analizi .....	49
3.8.7. Zeytinyağından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu.....	50
3.8.8. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	50
3.8.9. Fenolik bileşenlerin HPLC yöntemi ile belirlenmesi .....	50
3.8.10. DPPH Serbest Radikal Tutucu Etkinin Belirlenmesi .....	51
3.8.11. β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	51
3.8.12. Oksidatif stabilitenin ransimat metoduyla belirlenmesi .....	52
3.8.13. Toplam tokoferol ve tokotrienolün belirlenmesi .....	52
3.8.14. Duyusal analiz.....	53
3.9. Zeytin Hamurunda Yapılan Analizler.....	53
3.9.1. Nem içeriği .....	53
3.9.2. Zeytin hamurundan fenolik ekstraktı hazırlama .....	53
3.9.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi.....	54
3.9.4. Fenolik bileşenlerin HPLC’de belirlenmesi .....	54
3.9.5. DPPH Serbest Radikal Tutucu Etkinin Belirlenmesi .....	54
3.9.6. β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi.....	54

3.9.7. POD enzim aktivitesi .....	54
3.9.8. PPO enzim aktivitesi.....	55
3.9.9. $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi .....	55
3.9.10. İstatistiksel analiz.....	56
<b>4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>57</b>
4.1.Kırma Hızlarının Belirlenmesi.....	57
4.2. İnhibitör Miktarının Tespiti .....	59
4.3. Enzim İnhibitörlerinin Zeytinyağının Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri .....	65
4.4. Zeytinyağı ve Zeytin Hamuru Örneklerinde Yapılan Analizler .....	72
4.4.1. Verim ve serbest yağ asiti .....	72
4.4.2. Toplam klorofil ve karotenoid analizi .....	78
4.4.3. Peroksit, özgül soğurma ve oksidatif stabilite analizi.....	84
4.4.4. Renk analizi ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ ) .....	94
4.4.5. Toplam fenolik madde, DPPH , $\beta$ -karoten yöntemi ile antioksidan aktivite ve nem analizleri.....	101
4.4.6. Zeytinyağı ve zeytin hamuru örneklerinin fenolik bileşen dağılımına ilişkin veriler .....	124
4.4.7. Enzim analiz sonuçlarının değerlendirilmesi.....	174
4.4.8. Zeytinyağı örneklerinin tokoferol ve tokotrienol içerikleri .....	184
4.4.9. Zeytinyağı örneklerinde duyu analizi sonuçları .....	205
4.5. Yanıt Yüzey Metodu ile Belirlenen Optimum Proses Koşulları .....	208
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>209</b>
5.1. Sonuçlar .....	209
5.2. Öneriler .....	211
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>214</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>1</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

<b>Santigrad derece</b>	°C
<b>Alfa</b>	$\alpha$
<b>Beta</b>	B
<b>Gama</b>	$\gamma$
<b>Delta</b>	$\delta$
<b>Kilogram</b>	Kg
<b>Gram</b>	gr
<b>Dakika</b>	dk
<b>Mililitre</b>	mL
<b>Mikrometre</b>	$\mu\text{m}$

### Kısaltmalar

<b>Peroksidaz</b>	POD, (EC 1.11.1.7)
<b>Polifenol oksidaz</b>	PPO, (EC 1.14.18.1)
<b>Magnezyum klorür</b>	MgCl <sub>2</sub>
<b>Yanıt yüzey metodu</b>	YYM
<b>Response Surface Method</b>	RSM
<b>Potasyum hidroksit</b>	KOH
<b>Potasyum iyodür</b>	KI
<b>Sodyum karbonat</b>	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Zeytinyağında bulunan başlıca fenolik bileşenler .....	25
Çizelge 3.1. Tez çalışmasının iki aşamalı deneme planı .....	42
Çizelge 3.2. Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri .....	44
Çizelge 3.3. RSM’de belirlenen kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı değerlerine göre ekstraksiyon koşulları .....	45
Çizelge 4.1. Zeytinyağı ve hamurlarında yapılan analiz sonuçlarının RSM’de gösterimi .....	57
Çizelge 4.2. RSM’de belirlenen kırma hızı ve yoğurma sıcaklığının cevap olarak gösterimi .....	58
Çizelge 4.3. Zeytin hamurlarındaki PPO ve POD enzim aktivite analizi sonuçları .....	64
Çizelge 4.4. RSM’de belirlenen ve kullanılan katkıların miktarları (%).....	65
Çizelge 4.5. Karışım desenine göre katkı maddesi ilavesiyle üretilen zeytinyağlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	66
Çizelge 4.6. Karışım desenine göre katkı maddesi ilavesiyle üretilen zeytin hamurlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	67
Çizelge 4.7. Karışım deseni ile analiz edilen cevaplar için seçilen modeller ve istatistiksel analiz sonuçları .....	68
Çizelge 4.8. Zeytinyağlarının istatistiksel açıdan herhangi bir modelle ifade edilen parametrelerin model katsayıları .....	70
Çizelge 4.9. Zeytin hamurlarının istatistiksel açıdan herhangi bir modelle ifade edilen parametrelerin model katsayıları .....	71
Çizelge 4.10. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının verimi ve serbest yağ asitliği üzerine etkisi .....	73
Çizelge 4.11. Zeytinyağının verim ve serbest yağ asitliği değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	74
Çizelge 4.12. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının renk pigmentleri (toplam klorofil ve toplam karotenoid) üzerine etkisi.....	79
Çizelge 4.13. Zeytinyağının renk pigmentlerini (toplam klorofil, toplam karotenoid) etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	80
Çizelge 4.14. Zeytin hamuruna katkı maddelerinin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının oksidasyon analizleri üzerine etkisi .....	86
Çizelge 4.15. Zeytinyağının oksidasyon analizlerini (peroksit değeri, K232, K270 ve oksidatif stabilite) etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	88
Çizelge 4.16. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının renk değerleri üzerine etkisi.....	95
Çizelge 4.17. Zeytinyağının renk değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	97
Çizelge 4.18. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve $\beta$ -karoten üzerine etkisi.....	104
Çizelge 4.19. Zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve $\beta$ -karoten değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	107
Çizelge 4.20. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytin hamurlarının nem içerikleri, toplam fenolik madde, DPPH ve $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi.....	114

Çizelge 4.21. Zeytin hamurlarının nem içeriği, toplam fenolik madde, DPPH ve $\beta$ -karoten değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	117
Çizelge 4.22. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg) .....	127
Çizelge 4.23. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg) (devamı).....	128
Çizelge 4.24. Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	130
Çizelge 4.25. Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı) .....	132
Çizelge 4.26. Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı) .....	134
Çizelge 4.27. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg).....	154
Çizelge 4.28. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg) (devamı) .....	155
Çizelge 4.29. Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	157
Çizelge 4.30. Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı) .....	159
Çizelge 4.31. Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı) .....	161
Çizelge 4.32. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytin hamurunun enzim aktiviteleri .....	177
Çizelge 4.33. Zeytin hamurlarının POD, PPO ve $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	179
Çizelge 4.34. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen tokoferol içerikleri (mg/kg yağ) .....	188
Çizelge 4.35. Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen tokotrienol içerikleri (mg/kg yağ) .....	189
Çizelge 4.36. Zeytin hamurlarının $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	191
Çizelge 4.37. Zeytinyağlarının $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ - tokotrienol içeriklerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi .....	199
Çizelge 4.38. Zeytinyağları katkı maddelerinin optimum miktarları .....	208

## ŞEKİLLER

Şekil 3.1. Kırma hızı, sıcaklık ve katkı madde oranlarının belirlenmesinde kullanılan zeytinler .....	41
Şekil 3.2. Kırma işleminde kullanılan kırma makinası.....	42
Şekil 3.3. RSM’de belirlenen yanıtlara göre zeytinyağı ekstraksiyonu.....	43
Şekil 3.4. Sırasıyla 2200, 2900, 3600 rpm hızlarında kırma sonucunda elde edilen hamurlar .....	43
Şekil 3.5. Sırasıyla 1000, 1500, 2000 rpm hızlarında kırma sonucunda elde edilen hamurlar .....	43
Şekil 3.6. RSM’de belirtilen kırma hızları ve malaksiyon sıcaklığı değerlerinde ekstrakte edilen zeytinyağları .....	45
Şekil 3.7. 1000 rpm, 26.6 °C’de PPO ve POD enzim katkılarının tek tek ve kombinasyon halinde zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılması.....	46
Şekil 3.8. Enzim analizleri için ayrılan zeytin hamurları .....	46
Şekil 3.9. Analizler için kullanılan, şişelenmiş zeytinyağları.....	47
Şekil 3.10. Kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından en uygun parametreler belirlendikten sonra katkı maddelerin ilave edilmesiyle zeytinyağı ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi .....	47
Şekil 4.1. RSM sonucunda kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından elde edilen cevap .....	58
Şekil 4.2. Farklı oranlarda OA ilave edilen zeytin hamuru .....	60
Şekil 4.3. Farklı oranlarda L-sistein ilave edilen zeytin hamuru .....	61
Şekil 4.4. Farklı oranlarda AA ilave edilen zeytin hamuru .....	62
Şekil 4.5. Farklı oranlarda MgCl <sub>2</sub> ilave edilen zeytin hamuru .....	63
Şekil 4.6. Katkı maddelerinin verim üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ) .....	76
Şekil 4.7. Katkı maddelerinin serbest yağ asitliği üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ).....	77
Şekil 4.8. Katkı maddelerinin klorofil pigmenti üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ).....	82
Şekil 4.9. Katkı maddelerinin toplam karotenoid pigmenti üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ) .....	83
Şekil 4.10. Katkı maddelerinin peroksit değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ).....	90
Şekil 4.11. Katkı maddelerinin K <sub>232</sub> değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ).....	91
Şekil 4.12. Katkı maddelerinin K <sub>270</sub> değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b <sub>1</sub> – b <sub>2</sub> , c <sub>1</sub> – c <sub>2</sub> . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl <sub>2</sub> ).....	92

Şekil 4.13. Katkı maddelerinin oksidatif stabilite üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	93
Şekil 4.14. Katkı maddelerinin $a^*$ (kırmızılık) değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	99
Şekil 4.15. Katkı maddelerinin $b^*$ (mavilik) değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	100
Şekil 4.16. Katkı maddelerinin zeytinyağının toplam fenolik madde değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	109
Şekil 4.17. Katkı maddelerinin zeytinyağının DPPH değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	110
Şekil 4.18. Katkı maddelerinin zeytinyağının $\beta$ -karoten değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	111
Şekil 4.19. Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının nem değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	120
Şekil 4.20. Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının toplam fenolik madde değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	121
Şekil 4.21. Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının DPPH değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	122
Şekil 4.22. Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının $\beta$ -karoten değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	123
Şekil 4.23. Katkı maddelerinin hidroksitirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	137
Şekil 4.24. Katkı maddelerinin tirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	138
Şekil 4.25. Katkı maddelerinin kafeik asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	139
Şekil 4.26. Katkı maddelerinin homovanillik asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	140
Şekil 4.27. Katkı maddelerinin vanillin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	143

Şekil 4.28. Katkı maddelerinin 3,4-DHPEA-AC içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	144
Şekil 4.29. Katkı maddelerinin oleacein içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	145
Şekil 4.30. Katkı maddelerinin oleokantal içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	146
Şekil 4.31. Katkı maddelerinin ligstrosit aglikon içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	148
Şekil 4.32. Katkı maddelerinin oleuropein aglikon içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	149
Şekil 4.33. Katkı maddelerinin apigenin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	150
Şekil 4.34. Katkı maddelerinin luteolin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	151
Şekil 4.35. Katkı maddelerinin hidroksitirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	163
Şekil 4.36. Katkı maddelerinin tirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	164
Şekil 4.37. Katkı maddelerinin vanillik asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	165
Şekil 4.38. Katkı maddelerinin vanillin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	166
Şekil 4.39. Katkı maddelerinin verbaskozit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	169
Şekil 4.40. Katkı maddelerinin rutin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	170
Şekil 4.41. Katkı maddelerinin oleuropein içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	171
Şekil 4.42. Katkı maddelerinin luteolin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ).....	172

Şekil 4.43. Katkı maddelerinin apigenin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	173
Şekil 4.44. Katkı maddelerinin POD enzim aktivite değişimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	181
Şekil 4.45. Katkı maddelerinin PPO enzim aktivite değişimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	182
Şekil 4.46. Katkı maddelerinin $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	183
Şekil 4.47. Tokoferollerin kimyasal yapıları .....	184
Şekil 4.48. Tokotrienollerin kimyasal yapıları .....	186
Şekil 4.49. Katkı maddelerinin $\alpha$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	194
Şekil 4.50. Katkı maddelerinin $\beta$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	195
Şekil 4.51. Katkı maddelerinin $\gamma$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	196
Şekil 4.52. Katkı maddelerinin toplam tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	197
Şekil 4.53. Katkı maddelerinin $\alpha$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	201
Şekil 4.54. Katkı maddelerinin $\beta$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	202
Şekil 4.55. Katkı maddelerinin $\gamma$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	203
Şekil 4.56. Katkı maddelerinin $\delta$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, $b_1 - b_2$ , $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: $MgCl_2$ ) .....	204
Şekil 4.57. Katkı maddelerin eklenmesi sonucu elde edilen zeytinyağlarının duyu analizi sonuçları .....	207

## 1. GİRİŞ

Zeytinyağı, yüksek besleyici değeri nedeniyle ayrıca raf ömrünü de etkileyen hidrofilik fenollerin biyolojik aktivitelerinden dolayı en popüler fonksiyonel gıdalardan birisidir. Sızma zeytinyağı üretimi, zeytinleri yıkama, kırma, malaksiyon, dekantasyon veya santrifüj ve filtreleme aşamalarından oluşmaktadır. Ayrıca, zeytinyağında değişikliğe yol açmayacak koşullar altında sadece mekanik veya diğer fiziksel yollarla elde edilmekte olup geçmişten günümüze çok önemli bir farklılık göstermemektedir. Fakat teknolojinin gelişmesiyle birlikte kullanılan cihazlardaki farklılıklar nedeniyle zeytinyağı üretim metoduyla zeytinyağına geçen fenolik bileşenlerin miktarında değişiklikler görülmüştür. Zeytinyağı ekstraksiyonundaki mekanik işlemler, ekstraksiyon öncesi ve sonrası prosesler ve zeytin meyvesinin özellikleri, zeytinyağının fenolik bileşiklerinin miktarını, türlerini, besinsel ve duyuşsal özelliklerini etkiler (Clodoveo, 2012; Clodoveo ve ark., 2014).

Kırma işlemi; mezokarp kısmında yer alan hücre çeperinin fiziksel yolla hasara uğratılmasıdır. Böylelikle mikromoleküler yapıdaki yağ zerrecikleri birleşerek; katı-sıvı faz ayırımına daha uygun ve akışkan bir form kazanmaları sağlanmaktadır. Kırma sırasında polar fenolik ve uçucu bileşiklerin oluşumunda ve dönüşümünde yer alan birçok enzim harekete geçmektedir. Kırma koşullarına ve teknolojik işlemlerin uygulanmasına bağlı olarak, sızma zeytinyağının tadı, aroması ve stabilitesi ile yakından ilgili olan minör bileşenlerin konsantrasyonu değişir (Inarejos-García ve ark., 2011). Bu amaçla kullanılan metal kırıcılar yağın toplam fenolik madde içeriğini yükseltmekte, buna bağlı olarak yağın oksidatif stabilitesini de arttırmaktadır. Zeytinlerin kırılması sırasında zeytin meyvelerinin yeterince parçalanmasını sağlamayan kırma yöntemleri ile peroksidaz (POD, (EC 1.11.1.7)) enzim salınımı sınırlanmakta ve malaksiyon sırasında hidrofilik fenollerin oksidasyonu önlemekte, böylece sızma zeytinyağındaki fenolik konsantrasyonu artmaktadır (Servili ve ark., 2007a). Günümüzde, zeytinyağı ekstraksiyonu için kullanılan mekanik kırıcılar, elde edilen sızma zeytinyağının içerdiği hidrofilik fenol konsantrasyonunu, uçucu bileşikleri ve fenolik antioksidanların salınımını önemli ölçüde etkiler.

Fenolik bileşikler, zeytinyağının rengi, lezzeti, nutrasötik ve organoleptik özelliklerinin yanında antioksidan özelliklerinden dolayı, özellikle oksidatif stabiliteye büyük ölçüde katkı sağlayan bileşiklerdir. Fenolik bileşikler ayrıca sızma zeytinyağına acı ve keskin bir lezzet de vermektedir. Genel olarak zeytinyağının düşük ya da orta yoğunlukta fenolik bileşenleri içermesi durumunda, yaygın ve arzu edilen özellikleri

oluşmaktadır (Mateos ve ark., 2004; Inarejos-García ve ark., 2009). Ayrıca, çok yüksek fenol yükünün aşırı ve hoş olmayan acı bir tada yol açabileceği belirtilmektedir. Buna karşılık, yüksek fenol miktarına sahip sızma zeytinyağları, yüksek stabilite ve güçlü meyvemsi bir lezzet göstermektedir (Visioli ve Galli, 2002).

Sızma zeytinyağında hidrofilik fenollerin miktarı, zeytin meyvesinin fenolik glikozit içeriği ve yağ ekstraksiyonu sırasında hidrolitik ve oksidatif enzimlerin bu glikozitler üzerindeki aktivitesi ile ilişkilidir (Romero-Segura ve ark., 2009; García-Rodríguez ve ark., 2011).  $\beta$ -glukozidaz gibi endojen enzimler ile polifenol oksidaz (PPO, (EC 1.14.18.1)) ve POD gibi oksidoredüktazlar sızma zeytinyağı üretiminde fenolik bileşikler oksitleyerek, fenolik profilin şekillenmesine katkıda bulunur (García-Rodríguez ve ark., 2015). PPO enzim aktivitesi, zeytin meyvelerinin olgunlaşması ve işlenmesiyle ilişkili fenollerin oksidasyonunda rol oynamaktadır (Ortega-García ve ark., 2008; Segovia-Bravo ve ark., 2009). Zeytin çekirdeğinin, sızma zeytinyağının fenolik bileşimi üzerindeki etkisi ise zeytin çekirdeğinde yüksek seviyede bulunan POD enzim aktivitesi ile ilişkilidir (Luaces ve ark., 2007). PPO ve POD enzimleri, sızma zeytinyağının tadı ve besin değerlerinde önemli rol oynayabilecek oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize etmektedir (García-Rodríguez ve ark., 2015). PPO enzimleri, meyvelerin olgunlaşması sırasında yaralanmalara tepki olarak meydana gelen redoks reaksiyonları üzerinde etkilidir. Ayrıca, farklı gıda ürünlerinde acı tadı azaltan birkaç fenolik bileşiği oksitleyebilmektedir (Brenes-Balbuena ve ark., 1992).

Çalışmalar, PPO ve POD gibi enzimlerin sızma zeytinyağının fenolik içeriğini etkileyen ana biyokimyasal faktörler olabileceğini göstermektedir (Romero-Segura ve ark., 2011; Romero-Segura ve ark., 2012). Bu nedenle, zeytinyağının besinsel ve duyu kalitesini tüketici beklentilerine göre düzenlemek için bu enzimatik faaliyetleri kontrol altında tutmak önemlidir. Enzimlerin substratlarına olan ilgilerini azaltarak, enzim yapısını bozarak veya enzim ile substratın bağlanmasını engelleyerek reaksiyon hızını düşüren ya da tamamen durduran maddelere inhibitör denilmektedir. PPO ve POD enzim aktivite katkı maddeleri kullanılarak inhibe edilebilmektedir. Zeytin meyvesinin işlenmesi sırasında kullanılan uygun katkı maddeleri ile bu aktivitelerin bozulmasını azaltarak sızma zeytinyağının besinsel ve organoleptik kalitesini iyileştirmek mümkündür (García-Rodríguez ve ark., 2015).  $\beta$ -glukozidaz enzimi (EC 3.2.1.21), oleuropeinin degradasyonunda rol oynamaktadır. Ayrıca, sızma zeytinyağının fenolik profilini şekillendirmede kritik bir öneme sahiptir (García-Rodríguez ve ark., 2015). Hem  $\beta$ -glukozidaz enzimi hem de esteraz enzimi, zeytin hamurunda doğal olarak

bulunur (Fernández-Bolaños ve ark., 1995). Her iki enzim reaksiyonunda da son bileşik olarak hidroksitirozol, glikoz ve elenolik asit açığa çıkar (Segovia-Bravo ve ark., 2009). Lipazlar (gliserol ester hidrolaz veya triaçilgliserol açilhidrolaz; EC 3.1.1.3), sulu ve susuz faz arasındaki arayüzde ester bağlarının hidrolizini katalize eder. Triaçilgliserollerin bozunma reaksiyonundan sorumlu enzimlerdir. Triaçilgliserollerin lipazla hidrolizi, di- ve monoaçilgliserol, gliserol ve serbest yağ asitleri açığa çıkarır. Lipaz enzim aktivitesi ile artan serbest yağ asitleri, lipoksijenaz aktivitesine bir substrat görevi görerek hidroperoksitleri oluşturur (Peres ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  enzim inaktivasyonu amacıyla kullanılmıştır. AA (askorbik asit), o-kinonları renksiz difenollere indirgeyerek PPO enzimini dolaylı olarak inhibe eder. L-sis, renksiz bileşikler oluşturmak için o-kinonlarla geri dönüşümsüz reaksiyona giren, indirgeyici bir maddedir (Kuijpers ve ark., 2012; Kuijpers ve ark., 2013). OA, PPO enziminin aktif maddesindeki bakır iyonunu hapsederek enzim reaksiyonunu inaktive eder. Birçok enzim aktif merkezinde bakır, demir, magnezyum gibi metallerin komplekslerini içermektedir. Bu çalışmada enzimlerin inaktif hale getirilmesi hedeflendiğinden magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ) de katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, PPO ve POD enzimlerinin aktivitesini farklı katkı maddelerle inhibe ederek bu enzimlerinin etkisini azaltmak dolayısıyla fenolik bileşenlerin oksidasyonunu minimize etmektir. Bu, inhibitör etkili katkı maddelerinin zeytinyağının duyuşal özellikleri, antioksidan aktivite ve raf ömrü üzerine etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, iki aşamada gerçekleştirilen bu tez çalışmasının; birinci aşamasında, zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında Yanıt Yüzey Metodu (Response Surface Method, (RSM)) ile farklı kırma hızları (1000, 1500, 2000 rpm) ve farklı malaksiyon sıcaklık değerlerinin (12, 24, 36 °C) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Ekstrakte edilen zeytinyağlarında serbest yağ asitliği, peroksit değeri ve toplam fenolik madde içeriği, zeytin hamurlarında ise PPO ve POD enzim aktiviteleri analizleri yapıldıktan sonra zeytinyağlarının genel kalite parametreleri üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. İkinci aşamada ise, birinci aşamada belirlenen koşullarda işlenmiş olan zeytin hamuruna %2 oranında katkı maddeleri (OA, AA, L-sis ve  $MgCl_2$ ) kullanılmıştır. Bu katkı maddeleri tek başına ve çeşitli kombinasyonlar halinde toplamları %2 olacak şekilde uygulanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Zeytinyağı, Akdeniz Havzasının geleneksel bir ürünü olan zeytinden (*Olea europaea*'nin meyvesi) elde edilen, rafinasyon işlemine tabi tutulmayan, oda sıcaklığında sıvı olan bir yağdır. Tüketiciler tarafından tercih edilmesinin sebebi yağ asiti bileşimi ve yapısında bulunan fenolik maddeler, tokoferoller ve uçucu bileşenler gibi minör bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Çünkü bu bileşikler güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir ve sızma zeytinyağlarının oksidasyona karşı stabilitesine önemli ölçüde katkıda bulunur (Tura ve ark., 2007). Zeytin ve zeytinyağı üretimi Akdeniz ülkeleri için ekonomik öneme sahiptir. Uluslararası Zeytin Konseyi istatistiklerine göre (2019), zeytinyağı üreten ülkeler İspanya (%55) ile İtalya (%8), Yunanistan (%8), Türkiye (%8), Tunus (%4) ve diğer üreticiler (%17) olarak sıralanmaktadır (Hocaoglu ve ark., 2018). Küresel zeytinyağı üretimi, 1990'ların başında yılda 1.8 milyon tondan 2017'de yılda 3 milyon tona kadar istikrarlı bir şekilde artmaktadır (International Olive Council, 2019). Dünyada İspanya, hacim itibarıyla en büyük zeytinyağı üreticisidir ve onu İtalya ve Yunanistan takip etmektedir. Kişi başı tüketim açısından ise Yunanistan ilk sırada olup bunu İspanya, İtalya ve Tunus izlemektedir. Zeytinyağı tüketimi Güney Asya, Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da genel olarak çok daha az olmakla birlikte istikrarlı bir şekilde artmaktadır. 2019-2020 hasat yılında dünya zeytinyağı üretiminin 3.144.000 ton civarında olduğu ve Avrupa Birliği'nin tahmini %63.97 ile ilk üretici ve aynı zamanda ilk ihracatçı ve tüketici olduğu tahmin edilmektedir (International Olive Council, 2019). Dünyada zeytin yetiştirme bölgesinin yaklaşık %95'i Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde bulunmaktadır (Almeida ve ark., 2019). Zeytin ve zeytinyağı üretimi Türkiye'de iki önemli gelir kaynağıdır. Türkiye, iklim koşullarının uygun olduğu yıllarda 220.000 tona kadar çıkabilen yıllık yaklaşık 200.000 tonluk üretimiyle dünyanın ilk on zeytinyağı üreticisinden birisidir (Duman ve ark., 2020). Türkiye, küresel zeytinyağı üretiminin %5'ini oluşturmaktadır ve yağ üretiminin çoğu Türkiye'deki Ege ve Marmara bölgelerinden gelmektedir (Tunalıoğlu ve Durdu, 2012). Türkiye, zeytinyağı ihracatında ilk dört ülke arasında olmasına rağmen, zeytinyağı ihracatında öncü ülke olan İspanya'nın yaklaşık beşte biri kadar ihracat gerçekleştirmektedir. Türkiye'nin zeytinyağı ithalatı dünya ithalatı göz önüne alındığında yok denecek kadar azdır. International Olive Council (2019) verilerine göre sızma zeytinyağında 2019/20 sezonunda toplam 1.21 milyon ton ihracat yapılmıştır. İspanya 429.000 ton ile ilk sırada yer alırken onu 211.000 ton ile İtalya, 300.000 ton ile

Tunus, 80.000 ton ile Portekiz ve 45.000 ton ile Türkiye izlemektedir. Türkiye'nin sızma zeytinyağı ihracatı 2020 yılında 20.350 ton olarak gerçekleşmiştir.

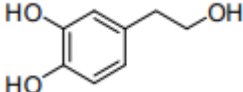
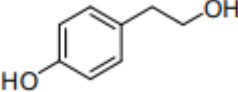
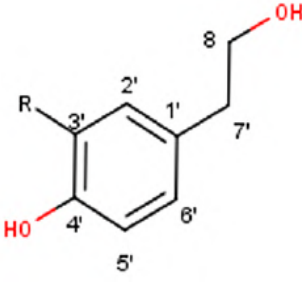
Zeytin meyvesi sert çekirdekli bir meyvedir ve mezokarpı oleuropein, dimetil oleuropein, oleurosit, ligstrosit ve nüzhenide gibi sekoiridoitleri içermektedir. Suda daha fazla çözünmekte olan glikozidik formların mekanik ekstraksiyon işleminden sonra bir kısmı yağda kalmaktadır. Zeytin meyvelerinin kırılması, yoğurulması ve ekstraksiyonu sırasında, sızma zeytinyağı,  $\beta$ -glukozidaz enzim endojenleriyle aldehidik aglikon formuna hidrolize olarak oleuropein glikoziti, dimetil oleuropein ve ligstrosit oluşmaktadır. Aglikonlar, polaritelerindeki değişiklikten dolayı yağ fazında çözünebilir hale gelir (Clodoveo ve ark., 2015). Zeytin meyvesi, pektinaz, lipaz, lipoksijenaz, glikozidaz, PPO ve POD gibi meyvenin çeşitli kısımlarına farklı şekilde dağılmış çeşitli enzim komplekslerini içerir (García-Rodríguez ve ark., 2011; Sánchez-Ortiz ve ark., 2011; Romero-Segura ve ark., 2012; Taticchi ve ark., 2013). Zeytinin çeşiti ve olgunlaşma derecesi, iklim ve sulama yöntemleri gibi özelliklere ve zeytinyağı ekstraksiyon işlemlerine bağlı olarak zeytin hamurunda ve çekirdeklerinde bulunan enzimlerin davranışları etkilenebilmektedir (Berenguer ve ark., 2006; Peres ve ark., 2014). Bu etkilerle, zeytinyağında bulunan fenolik bileşenlerin miktarı da değişmektedir. Zeytin meyvesinde bulunan, oleuropeinden türetilmiş sekoiridoitler PPO ve POD enzim aktiviteleri ile okside olmaktadır. Bu nedenle, zeytin meyvesinde bulunan endojen PPO ve POD enzimlerinin aktivitesi sızma zeytinyağının fenolik profilinde önemli bir rol oynar (Romero-Segura ve ark., 2012; García-Rodríguez ve ark., 2015). Üç farklı çeşit İspanyol zeytininde yapılan çalışmaya göre, zeytinde bulunan toplam POD enzim aktivitesinin %98'inden fazlasını oluşturması nedeniyle zeytin çekirdeği yüksek bir POD enzim aktivitesine sahiptir (García-Rodríguez ve ark., 2011).

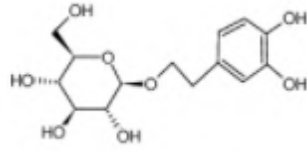
Sızma zeytinyağının kimyasal bileşimi majör ve minör bileşenlerden oluşur. Gliseroller dahil olmak üzere ana bileşenleri oluşturan majör bileşenler toplam yağın %98'inden fazlasını oluşturur. Toplam yağ ağırlığının %2'sini oluşturan minör bileşenler ise fitosteroller, skualen, terpenik asitler, flavonoidler ve genellikle fenolik bileşiklerden oluşmaktadır (Boskou, 2000). Sızma zeytinyağında bulunan farklı fenolik bileşenler ise fenolik asitler, fenolik alkoller, hidroksi izokromanlar, sekoiridoitler ve lignanlardır. Fenolik asitler ve hidroksi izokromanlar sızma zeytinyağında düşük miktarda bulunmaktadır (Servili ve ark., 2004). Fenolik bileşenler, potansiyel farmasötik etkileri sayesinde (Yue ve ark., 2016) önemli biyolojik aktiviteler gösterir

(Villano ve ark., 2016; Zhou ve ark., 2017). Yüksek fenolik içeriğe sahip olan zeytinin antioksidan, antienflamatuvar, karaciğer ve kalp damar sağlığı üzerine koruyucu etkileri, fenolik bileşiklerce zengin sızma zeytinyağına olan ilgiyi artırmaktadır (Casamenti ve ark., 2015; Leri ve ark., 2016; Pantano ve ark., 2016; Reddy ve Naidu, 2016; Segade ve ark., 2016; Reboredo-Rodríguez ve ark., 2017). Fenolik bileşikler, bitkiler âleminde selülozdan sonra ikinci en bol bulunan organik bileşik grubunu temsil etmekte ve bitkilerde yapısal destek, biyotik veya abiyotik stres, patojenler ve otoburlara karşı koruma gibi farklı aktiviteler göstermektedir. Fenolik bileşikler bulaşıcı olmayan kronik hastalıklara karşı sadece antioksidan aktiviteleriyle değil, aynı zamanda enzim inhibisyonu, gen ekspresyonunun modifikasyonu, protein fosforilasyonu gibi farklı seviyelerde birçok hücresel süreci düzenleyerek koruma sağlamaktadır. Ayrıca, meyve ve sebzelerin acılık, renk ve lezzet gibi yaygın kabul gören kalite özellikleri üzerine de etkisi bulunmaktadır (De la Rosa ve ark., 2019).

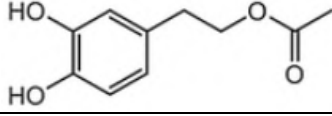
Zeytin meyvesi, hamur ağırlığının %1-3'ü arasında fenolik bileşik konsantrasyonu içermektedir (Restuccia ve ark., 2018). Acı ve keskin lezzete sahip olan sızma zeytinyağı, diğer yağlara göre daha az işleme tabi tutulduklarından dolayı daha fazla fenolik madde içermektedir. Zeytinyağındaki ana fenolik bileşikler Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Zeytinyağında en yüksek konsantrasyonda bulunan üç fenolik bileşik, glikozit oleuropein, hidroksitirozol (3,4-dihidroksifenil etanol) ve tirozoldür. Oleuropein, kurutulmuş meyvelerde %14'e kadar bulunabilen başlıca fenolik bileşiktir. Hidroksitirozol ise zeytinyağında bulunan başlıca fenolik bileşendir (Amiot ve ark., 1996). Zeytin meyvesi olgunlaştıkça oleuropein konsantrasyonu azalmakta ve oleuropeinin hidroliz ürünü olan hidroksitirozol miktarı artmaktadır (Cimato ve ark., 1990; Ryan ve ark., 1999).

**Çizelge 2.1.** Zeytinyağında bulunan başlıca fenolik bileşenler

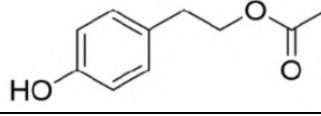
1. Fenolik alkoller			
	Hidroksitirozol (3,4-DHPEA) (3,4-dihidroksifenil) etanol)	Tirozol (p-HPEA) (p-hidroksifenil) etanol)	R=OH, Hidroksitirozol R=H, Tirozol



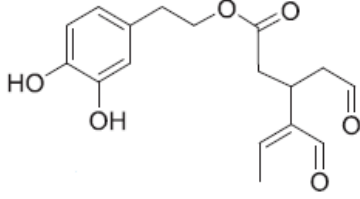
Hidroksitirozol glikozit



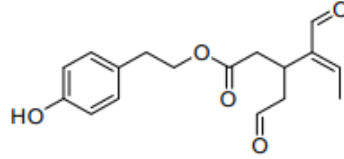
Hidroksitirozol asetat



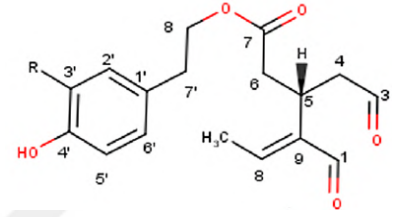
Tirozol asetat



3,4-DHPEA-EDA (Oleacein)  
(Oleuropein aglikon dialdehit)  
(3,4-DHPEA'ya bağlı elenolik  
asidin dialdehidik formu)  
(dekarboksimetillenmiş  
türevlerinin dialdehidik  
formları, oleacein)

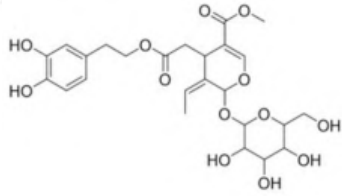


*p*-HPEA-EDA (Oleokantal)  
(Ligstroside aglikon dialdehit)  
(*p*-HPEA'ya bağlı elenolik  
asidin dialdehidik formu)  
(Deasetoksi-ligstroside-aglikon)  
(dekarboksimetillenmiş  
türevlerinin dialdehidik  
formları, oleokantal)

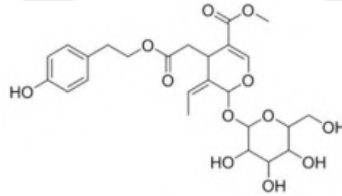


R=OH, Oleacein  
R=H, Oleokantal

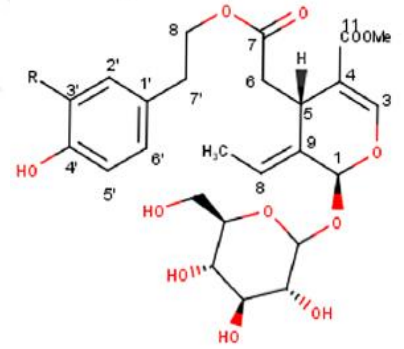
## 2.Sekoiridoitler



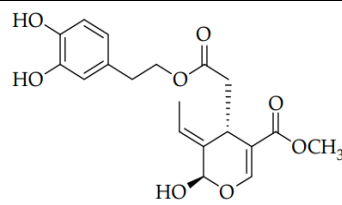
Oleuropein



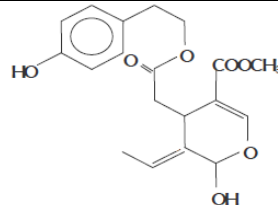
Ligstroside



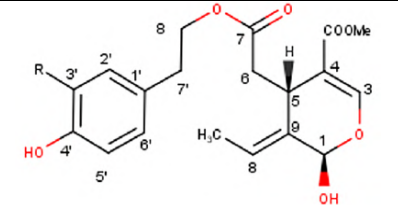
R=OH Oleuropein  
R=H, Ligstroside



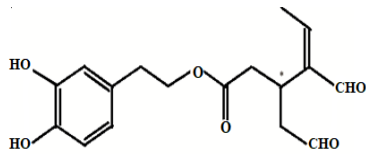
3,4-DHPEA-EA  
(Oleuropein aglikon)  
(Oleuropein-aglikon  
monoaldehit)  
(oleuropein aglikonun izomeri)  
(oleuropein aglikonun  
monoaldehidik formu)



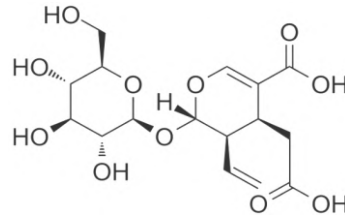
*p*-HPEA-EA  
(Ligstroside aglikon)



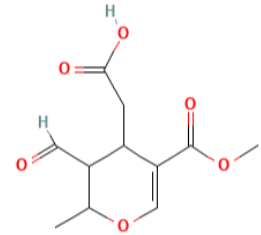
R=OH, Oleuropein aglikon  
R=H, Ligstroside aglikon



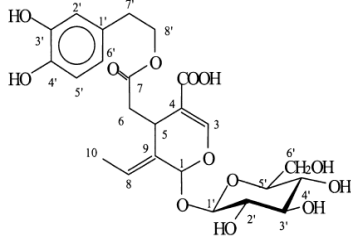
Deasetoksi oleuropein aglikon



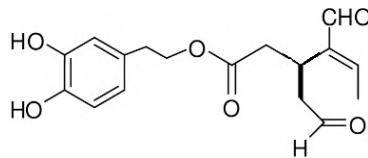
Sekologanosit



Elenolik asit

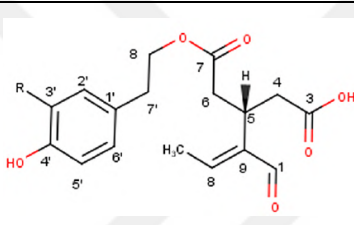


Demetiloleuropein

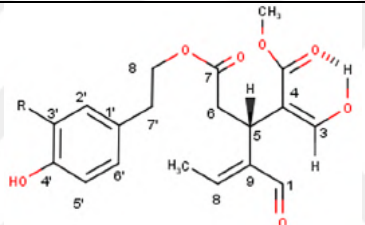


Hidroksioleokant

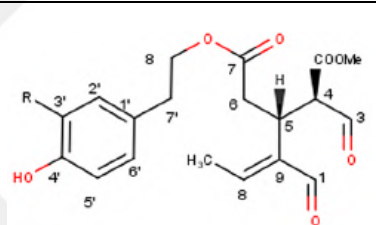
2. Sekoiridoitler



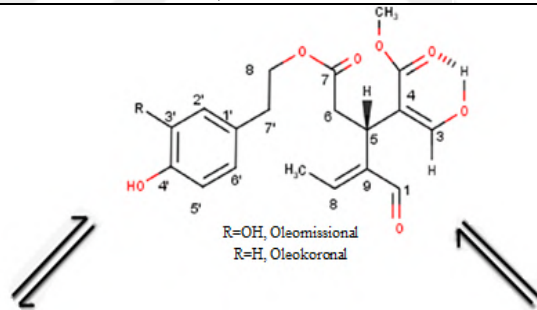
R=OH, Oleaseinik asit  
R=H, Oleokantalik asit



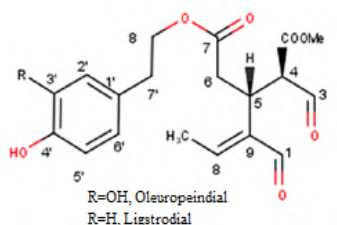
R=OH, Oleomissional  
R=H, Oleokoronal



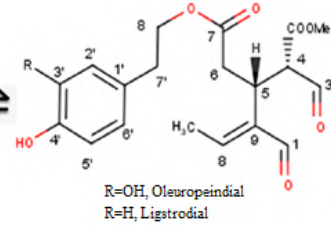
R=OH, Oleuropeindial  
R=H, Ligstrodiol



R=OH, Oleomissional  
R=H, Oleokoronal

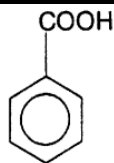


R=OH, Oleuropeindial  
R=H, Ligstrodiol



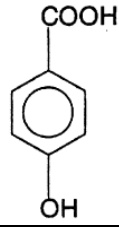
R=OH, Oleuropeindial  
R=H, Ligstrodiol

3. Fenolik asitler

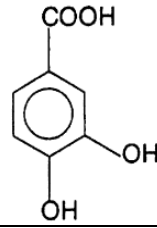


Benzoik asit

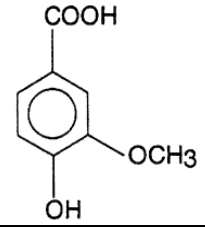
3.1. Hidroksi-  
benzoik asit  
türevleri



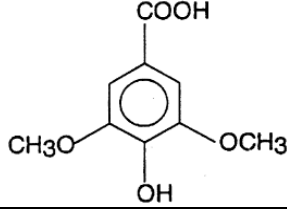
*P*-hidroksibenzoik asit



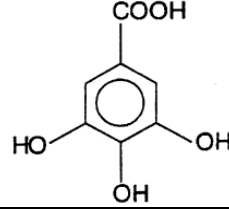
Protokateşik asit  
(3,4-dihidroksibenzoik asit)



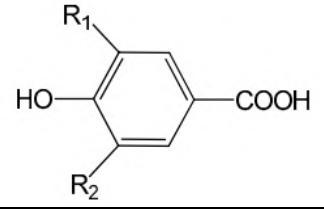
Vanillik asit



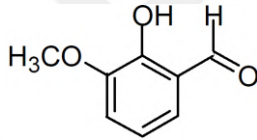
Sirinjik asit



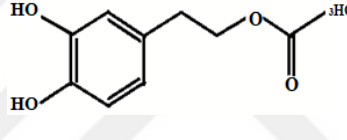
Gallik asit



*P*-hidroksibenzoik asit ( $R_1=H$ ,  
 $R_2=H$ )  
Protokateşik asit (3,4-  
dihidroksibenzoik asit) ( $R_1=OH$ ,  
 $R_2=H$ )  
Vanillik asit ( $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ )  
Sirinjik asit ( $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OCH_3$ )  
Gallik asit ( $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ )

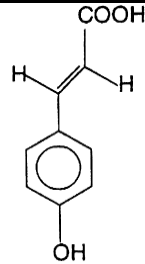


*O*-vanillin

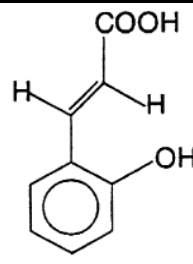


4-(asetoksi etil)-1,2-  
Dihidroksibenzen

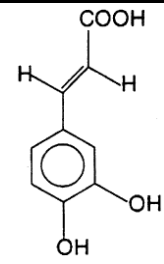
3.2. Hidroksi-  
isinnamik asit  
türevleri



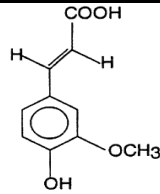
*P*-kumarik asit



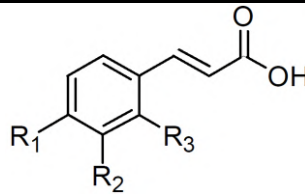
*O*-kumarik asit



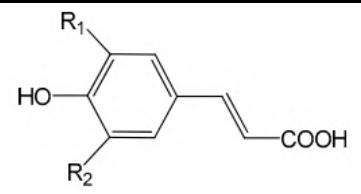
Kafeik asit



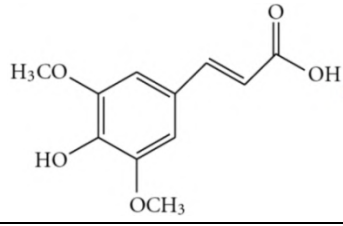
Ferulik asit



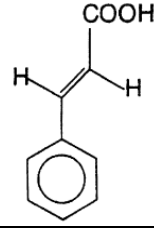
*P*- kumarik asit ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  
 $R_3=H$ )  
*O*- kumarik asit ( $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  
 $R_3=OH$ )  
Kafeik asit ( $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  
 $R_3=H$ )  
Ferulik asit ( $R_1=OH$ ,  $R_2=$   
 $OCH_3$ ,  $R_3=H$ )



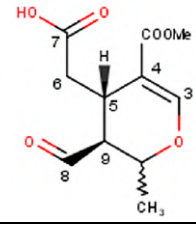
*P*- kumarik asit ( $R_1=H$ ,  $R_2=H$ )  
Ferulik asit ( $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=H$ )  
Kafeik asit ( $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ )  
Sinapik asit ( $R_1=OCH_3$ ,  $R_2=OCH_3$ )



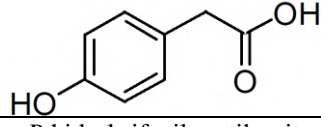
Sinapik asit



Sınnamik asit

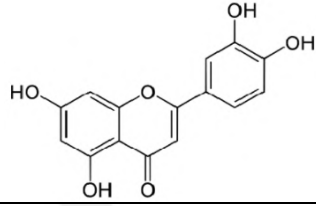


Elenolik asit

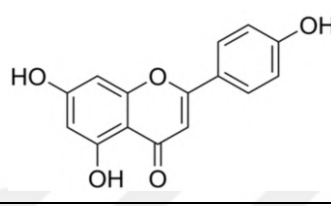


P-hidroksifenil asetik asit

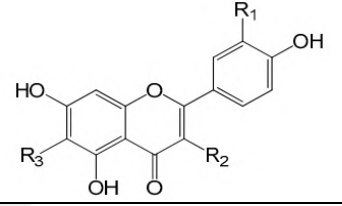
#### 4.Flavonoitler



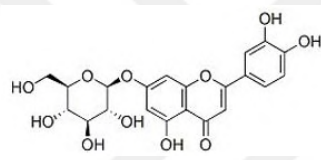
Luteolin



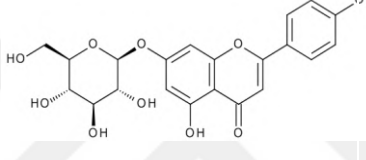
Apigenin



Luteolin (R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H)  
Apigenin (R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H)

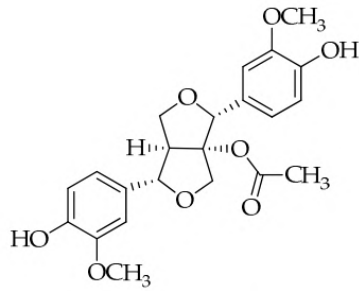


Luteolin-7-O-glukozit

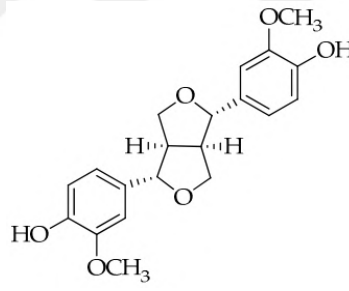


Apigenin-7-O-glukozit

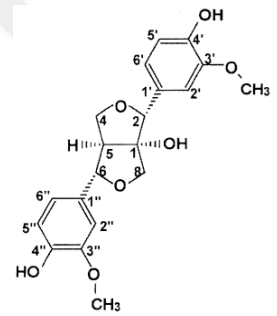
#### 5.Lignanlar



(+)-1-Asetoksipinoresinol

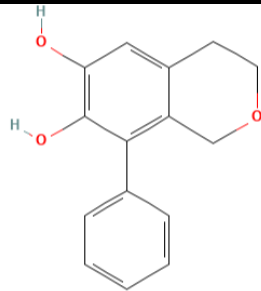


(+)-Pinoresinol

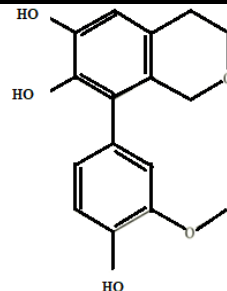


(+)-1-hidroksipinoresinol

#### 6.Hidroksi-izokromanlar



1-fenil-6,7-dihidroksi-izokroman



1-(3'-metoksi-4'hidroksi)-6,7-dihidroksi-izokroman

Uzun yıllardır, natürel sızma zeytinyağının fenolik içeriği, sekoiridoitlerin insan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinden dolayı araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Polifenollerin biyolojik süreçlere katıldığı, insan sağlığı açısından çok önemli olduğu

belirtilmektedir (Vasto ve ark., 2014). Fenolik içeriğinin yararlı olduğuna yönelik dünyada hem natürel sızma zeytinyağı ile hem de saflaştırılmış polifenollerle hayvan çalışmaları ve insanda klinik düzeyde birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Zeytinyağı tüketiminin faydaları basit fenollerden olan fenolik alkoller (tirozol, hidroksitirozol) ve bunların sekoiridoit türevlerinden (özellikle oleokantal, oleacein, ligstrosit aglikon ve oleuropein aglikon) kaynaklanmaktadır. Bu bileşiklerin faydalı besinsel etkilerinden dolayı nutrasötikler olarak adlandırılmasının yanı sıra natürel sızma zeytinyağı ve bunları içeren zeytinler fonksiyonel gıdalar olarak adlandırılmaktadır (Rigacci ve Stefani, 2016). Minör bileşenler ayrıca natürel sızma zeytinyağının duyuşal özelliklerinden ve muhafaza edilebilirliğinden de sorumludur (García-Vico ve ark., 2017; Perestrello ve ark., 2017).

Zeytine uygulanan bazı işlemler ile zeytinyağı fenolik içeriği artırılmaktadır. Son yıllarda yeni trend yüksek kalite natürel sızma zeytinyağı elde etmek için ekstraksiyon öncesi zeytin ve zeytin hamurunun soğutulmasıdır. Birçok zeytin yetiştirme alanında işlenmiş zeytinlerin sıcaklığı, küresel ısınma ve erken hasat dönemi nedeniyle 30 °C civarındadır. Bu yüksek sıcaklık nedeniyle, ekstraksiyon sürecindeki yeni uygulamalar, yüksek kaliteli zeytinyağı elde etmek için zeytinleri veya zeytin hamurunu soğutma prosesini içermektedir. Zeytinler, hasattan sonraki 48 saat içinde, ortalama 27 °C sıcaklıkta işlendiğinde zeytinyağlarının fenolik bileşik içeriğinde önemli bir artış belirlenmiştir. Malaksiyon sıcaklıkları 21, 24, 27, 30, 33 ve 36 °C olan laboratuvar ölçekli bir çalışmada, 27 °C'de toplam fenolik madde konsantrasyonunda anlamlı bir artış bulunurken, 30-36 °C gibi daha yüksek sıcaklıklarda aşamalı bir azalma tespit edilmiştir (Parenti ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda soğutma işlemiyle yağ veriminde önemli bir farklılık veya yasal parametrelerde bir değişiklik bulunmamış fakat fenolik bileşiklerde kayda değer bir artış görülmüştür. Ayrıca, soğutma işlemi ile natürel sızma zeytinyağlarının duyuşal özellikleri üzerinde olumlu bir etkisi olan aldehitlerde de genel bir artış görülmüştür. Bu önemli kalite parametrelerindeki artışların zeytin çeşitine ve PPO enzim aktivitesine bağlı olduğu belirtilmektedir (Veneziani ve ark., 2017, 2018). Malaksiyon aşamasında zeytin hamuru 28–30 °C sıcaklıklarda yaklaşık 30-60 dk yavaş yavaş karıştırılır. Malaksiyon ile küçük yağ damlacıklarının daha büyük boyutlarda damlacıklar halinde birleşmesi sağlanır. Yağ damlacıklarının genişletilmesi yağlı fazın santrifüj ile ayrılmasını kolaylaştırır. Zeytin hamurunun malaksiyonu yağ ayrımını sağlamasının yanı sıra elde edilen yağın kalitesi ve bileşimini de etkiler. Malaksiyon aşamasında proses süresi, sıcaklık, zeytin hamuru

ile temas eden O<sub>2</sub> (atmosfer oksijeni) ve ılık su ilavesi gibi parametreler ile ilgili daha derin bilgi gerekmektedir. Malaksiyon sıcaklığının yüksek olması santrifüjde yağ/su ayrılmasını sağlar (Clodoveo ve ark., 2014, 2014c). Sıcaklık ayrıca yağın fenolik madde içeriğini de etkiler. Literatür verileri sıcaklık ve fenolik içerik arasında ters bir ilişki olduğu gösterirken (Angerosa ve ark., 2001) bazı literatür verileri ise sıcaklık artışıyla birlikte fenolik fraksiyonda bir artış olduğunu göstermektedir (Kalua ve ark., 2006; Boselli ve ark., 2009). Sonuçlardaki bu farklılık çalışma koşullarının değişkenliğinden ve malaksör makinelerinin zaman içerisindeki değişiminden kaynaklanmaktadır. Malaksiyon sıcaklığı 27 °C ve 30 °C olduğunda toplam fenolik konsantrasyonu artmıştır (Parenti ve ark., 2008). Malaksiyon esnasında uygulanan düşük sıcaklık ile zeytin hamurunda fenolikler az çözünmektedir. Sıcaklıktaki artış ile zeytin hamuru içerisindeki fenoller daha fazla çözünmekte dolayısıyla elde edilen zeytinyağının toplam fenol içeriğinde artışa neden olmaktadır. Zeytin hamurunun malaksiyon sıcaklığı optimize edilerek biyoaktif bileşikler açısından zengin zeytinyağı ekstrakte edilebilmektedir.

Zeytinyağı ekstraksiyonundaki temel amaç triaçilgliseroller ve minör bileşikleri mümkün olan en uygun biçimde ekstrakte etmek olduğundan (Clodoveo ve ark., 2014, 2014c; Dugo ve ark., 2015), mekanik işlemin her bir aşamasının dikkatle yapılması, oksijen, ışık, ısı, metaller ve enzimler gibi oksidasyonu tetikleyici faktörlerden mümkün olduğunca kaçınılması, oksidasyon reaksiyonlarına duyarlı moleküllerin (antioksidan ve fenollerin) okside olmalarının engellenmesi gerekmektedir. Zeytinyağı ekstraksiyon teknolojisi ile ekstraksiyon işleminde yer alan farklı parametreleri inceleyerek ve optimize ederek yüksek konsantrasyonda fenolik bileşik içeren zeytinyağı üretimi amaçlanmaktadır. Kırma işlemi ile zeytinin hücre yapısı bozulur ve hücreler içinde hapsolmuş kompleks trigliseritler, minör bileşikler ve çeşitli enzim karışımını içeren yağlı ve sulu faz serbest hale geçer (Clodoveo, 2012; Clodoveo ve ark., 2014). Kırmanın amacı, yağın elaioplastlardan (lökoplastın bir formu) salınmasını kolaylaştırmak için zeytin meyve dokularının boyutunun küçültülmesi ve hücrelerin parçalanmasıdır. Bunun yanı sıra, biyoaktif bileşiklerin salınarak yağlı fazda çözünmeleri ve sonraki işlem aşamalarında zararlı etkileri sınırlandırarak ürünün korunmasına katkı sağlamalarıdır (emülsiyon oluşumu, enzim inaktivasyonu, yağ damlalarının azaltılması, zeytin hamurunun aşırı ısıtılması) (Clodoveo ve ark., 2015). Farklı kırma işlemlerinin yağın kalitesi üzerine farklı etkileri bulunmaktadır. Kırma sistemi, zeytinin çeşitine, olgunlaşma aşamasına, su içeriğine ve zeytinyağında istenen

renk, acı ve keskin tat, fenolik madde içeriğine bağı olarak seçilmektedir. Kırma işlemi için geleneksel taş değirmeni (kesikli makine), çekiç kırıcı ve disk kırıcılar (sürekli makineler) kullanılmaktadır (Amirante ve ark., 2010a). Bu kırıcılar farklı boyutlarda parçacıklar üretmekte ve sızma zeytinyağı kalitesi üzerine çeşitli etkiler yaratmaktadır (Clodoveo, 2012; Clodoveo ve ark., 2014). Zeytinyağı üretiminde kullanılan mekanik kırıcıda hızlı kırma işlemi ile kırıcıya giren zeytinlerin sıcaklığı ile çıkan hamurun sıcaklığı arasında 4-10 °C'lik bir fark görülmektedir (Amirante ve ark., 1993). Bu, sıcaklık farkı hem çekirdekleri kırmak için harcanan enerjinin hem de hamurun kırıcı yüzeylere sürtünmesinin bir sonucudur. Kırma işleminde zeytinlerin ulaştığı sıcaklığın, zeytin dokularının partikül büyüklüğü, polar fenollerin oluşması ve dönüştürülmesinde rol oynayan enzimlerin faaliyetine bağı olarak hem biyoaktif bileşik konsantrasyonunu hem de yağ verimini etkileyebileceği belirtilmiştir (Inarejos-García ve ark., 2009, 2011). Çekiç kırıcı ve disk kırıcı kullanılarak elde edilen zeytinyağlarının kalitesi değerlendirildiğinde, çekiç kırıcı kullanımı, hamur dokusunu daha hızlı bir şekilde kırılmasından ötürü hamur sıcaklığında artışa neden olur. Dolayısıyla, çekiç kırıcı disk kırıcıya göre daha yüksek bir oksidatif bozulma göstermiş ve kırma yöntemlerinin zeytinyağının kalitesi ve raf ömrü üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Caponio ve ark., 2003). Ayrıca çekiç kırıcılar ile elde edilen hamurların parçacık boyutu daha küçük olduğu için sızma zeytinyağının kalitesi ve raf ömrü üzerine olumsuz etkide bulunmaktadır (Servili ve ark., 2007a). Çekiç kırıcı kullanılarak elde edilen zeytinyağlarının fenolik madde içeriğinin, disk kırıcı kullanılarak elde edilen zeytinyağlarının fenolik madde içeriğinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Clodoveo ve ark., 2015). Farklı kırma sıcaklıkları (8, 10, 15 °C) ve farklı kırıcılar (çekiç ve disk) kullanılarak sızma zeytinyağının kalitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada çekiç kırıcı ile kırma sonucunda, hamurun çıkış sıcaklığında önemli oranda artış görülmüştür. Ayrıca, her iki kırma sisteminden elde edilen zeytinyağının sahip olduğu toplam fenol içeriğinin uygulanan sıcaklık normlarından etkilenmediği de belirtilmektedir (Caponio ve Catalano, 2001). Zeytinyağ kalitesi üzerine, çekiç kırıcı hızı etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada kırma hızının 2400 rpm'den 3600 rpm'ye çıkarılması ile kalite parametrelerinin korunduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, toplam fenol içeriği ve triterpenoid seviyeleri motor hızının artmasıyla artmıştır (Polari ve ark., 2018). Taş değirmen ile ekstrakte edilen zeytinyağlarının toplam fenolik madde içeriği düşük iken, çekiç kırıcı kullanılarak ekstrakte edilen zeytinyağlarının toplam fenolik madde içeriği ise yüksektir. Metal kırıcıların kırma kapasitesi çok daha yüksektir,

sürekli çalışan sistemdir, az yer kaplar ve taş değirmene göre düşük maliyetlidir. Ancak, kırma işlemi hızlı ve kaba olduğundan hücreler yeterince parçalanamaz, emülsiyon oluşma riski vardır ve hamur gerektiği gibi hazırlanmaz. Kırma koşullarından en çok sızma zeytinyağındaki hidroksitirozol türevleri etkilenmiştir. Kırma hızı ne kadar yüksek olursa hem zeytin hamurunda hem de yağda fenolik içerik o kadar yüksek olmaktadır (Inarejos-García ve ark., 2011). Kırma derecesinin iyi ayarlanamaması pirina ve kara sudaki yağ miktarını arttırmaktadır. Kırma işlemi sırasında emülsiyon oluşmasını önlemek ve hamurun hava ile temasını azaltmak ayrıca dikkat edilmesi gereken hususlardandır (Boskou, 1996). Ayrıca, kırma işlemi malaksiyon işlemiyle beraber zeytin hamurundaki ve yağdaki fenolik bileşiklerin bileşiminde büyük bir değişikliğe neden olmaktadır. Bunun yanı sıra, kırma işlemi zeytin meyvesinin pulp ve çekirdek kısımlarındaki endojen enzimlerle de ilişkilidir. PPO ve POD enzimleri proses sırasında fenolik bileşiklerin oksidasyonundan sorumlu ana enzimlerdir (Servili ve ark., 2007a).

Yapılan çalışmalar kırıcı hızındaki artış ile zeytinyağı kalite parametrelerinin korunduğunu (Guerrini ve ark., 2017; Polari ve ark., 2018), toplam fenolik madde miktarının (Inarejos-García ve ark., 2011), özellikle 3,4-DHPEA-EDA ve p-HPEA-EDA bileşiklerinin arttığını göstermiştir (Guerrini ve ark., 2017; Polari ve ark., 2018). Kırma hızının artması yağa daha keskin bir tat verirken meyvemsi ve acı tatta belirgin bir fark yaratmamıştır (Polari ve ark., 2018). Kırma işlemi, zeytin meyvesinin pulp ve çekirdek kısımlarındaki endojen enzimleriyle ilişkilidir. Çekirdek-doku bozulmasının azaltılmasını sağlayan kırma yöntemleri veya kırıcılar hamura POD enzim salınımını sınırlamakta ve malaksiyon sırasında hidrofilik fenollerin (sızma zeytinyağında bulunan doğal antioksidanlar) oksidasyonunu önlemektedir, böylece sızma zeytinyağındaki fenolik konsantrasyonlarını arttırmaktadır (Servili ve ark., 2007a).

Zeytin meyvesinin farklı kısmındaki enzimlerin dağılımı ile ilgili olarak, PPO enzim aktivitesi meyve mezokarbında yüksek oranda bulunurken çekirdekte PPO enzim aktivitesi tespit edilmemiştir. POD ve PPO enzimleri proses sırasında kombinasyon halinde fenolik oksidasyondan sorumlu ana endojen oksidoredüktazlardır (zeytin PPO enzimleri verbaskosit ile birlikte hidroksitirozolu oksitlemektedir) (García-Rodríguez ve ark., 2011, 2015). Ayrıca, PPO enzimi meyve olgunlaşmasının başlangıcından sonra nispeten sabit değerler göstermiştir (García-Rodríguez ve ark., 2011). Cobran, Cosa ve Galega Vulgar Portekiz çeşitleri ile yapılan araştırmalar, olgunlaşma indeksi arttıkça meyvede bulunan PPO enzim aktivitesinin maksimum aktivite gösterdiği belirlenmiştir

(Peres ve ark., 2013b). Malaksiyon süresi, sıcaklık, oksijen konsantrasyonu ve kırıcılar sızma zeytinyağındaki fenolik ve uçucu bileşikler üzerine oksidoredüktazların aktivitesini etkilemiştir (Amirante ve ark., 2007; Servili ve ark., 2007a). Doku hasarını azaltan kırma yöntemleri ile POD enzim salınımı sınırlanmakta ve malaksiyon sırasında hidrofilik fenollerin oksidasyonu önlenmekte, böylece sızma zeytinyağındaki fenolik konsantrasyonu artmaktadır (Servili ve ark., 2007a). PPO ve POD enzim reaksiyonları oksidatif reaksiyonlar olup elde edilen sızma zeytinyağının toplam fenolik madde içeriği üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. Bunun önemli bir oranı malaksiyon işlemi sırasında gerçekleşir. Malaksiyon işlemi sırasında hamurda çözünen oksijen, fenolik bileşikleri oksitleyen POD ve PPO enzimlerini aktive eder. Yüksek sıcaklıklarda yoğurma zeytinyağındaki fenoliklerin konsantrasyonlarını azaltmaktadır (Clodoveo ve ark., 2014).

PPO ve POD enzimleri, fenolik bileşiklerin kinonlara dönüşmesini oksijen ve su varlığında katalizleyen enzimlerdir (Zanoni, 2014). Bu olaylar hem fenolik bileşiklerin bozulmasına neden olmakta hem de antioksidan gücünde değişikliklere yol açabilmektedir. Bu da raf ömrünün ve yağın besin değerinin azalmasına neden olmaktadır. Aşağıda PPO enzim inhibitörü olarak kullanılan koruyucular, amaçları ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmıştır:

-orto-kinonları renksiz difenollere indirgeyerek PPO enzimini dolaylı olarak inhibe eden, AA (Kuijpers ve ark., 2012, 2013),

-renksiz bileşikler oluşturmak için orto-kinonlarla geri dönüşümsüz reaksiyona giren, indirgeyici bir madde olan L-sis (Kuijpers ve ark., 2012, 2013),

-pH'yı PPO enzim aktivitesi için optimum değer altına düşürerek spesifik olmayan enzim inaktivatörleri olan sitrik asit gibi asitlendiriciler (Liu ve ark., 2013),

-kompleks oluşturan bileşikler, kinonları ve dolayısıyla kahverengi pigmentlerin oluşumunu önleyen, çeşitli moleküller ile kompleksler oluşturabilen siklodekstrinler (Lante ve Zocca, 2010)

-enzimin aktif maddesindeki bakır iyonunu hapsederek PPO enzimini inaktive eden etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ve OA gibi kenetleme maddeleri

Bu maddeler, PPO enzim aktivitesini inhibe etmek için sinerjik olarak karıştırılabilmekte (Guerrero-Beltrán ve ark., 2005) veya termal işlemler (Chow ve ark., 2011) ile birleştirilebilmektedir. Ancak, bu maddelerin oksijen ve suya karşı düşük stabilitesi, biyoaktif bileşiklerdeki içeriğin azalması, organoleptik değişiklikler ve insan sağlığı açısından tehlikeli olması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Loizzo ve

ark., 2012; Carochó ve ark., 2014). Günümüzde, PPO enzimini inhibisyonunun doğal maddelerle yapılmasına odaklanılmıştır. Çünkü, doğal katkı maddeleri çevre dostu, ucuz, insan sağlığı için güvenli ve ürünlerin duyuusal, beslenme ve sağlık özelliklerini iyileştirmektedir (Loizzo ve ark., 2012; Misra ve ark., 2017). Doğal ekstraktların esmerleşmeyi önleyici etkisi biyoaktif bileşiklerin tipine, konsantrasyonuna (Klimczak ve Gliszczynska-Świgło, 2017), ekstraksiyon yöntemine (Wessels ve ark., 2014) bağlıdır.

Oksidoredüktazlardan PPO ve POD enzimleri, sızma zeytinyağının tadı ve besinsel değerinde önemli rol oynayabilecek oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarını katalize etmektedir. Hidrojen veya oksijen atomlarının veya elektronların moleküller arasında aktarıldığı ve etki ettikleri substrata bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Ramírez ve ark., 2003). Substrat özgünlüğü ile ilgili olarak, POD enzimi, başlıca zeytin meyvesi polifenollerinden biri olan oleuropein ile kumarik, ferulik, askorbik ve p-hidroksibenzoik asitleri oksitleyemediği, gallik asit ve protokatekuik asit gibi diğer fenolik bileşikler oksitlediği tespit edilmiştir (Tzika ve ark., 2009). Bitki POD enzimleri, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) gibi peroksit türleri varlığında fenollerini okside etmektedir. Dolayısıyla, malaksiyon sürecinde  $H_2O_2$  içeriği yükseldiğinde (500 mL/kg), olgunlaşmış meyvelerde (sekoiridoitler) fenollerin oksidatif bozulması %50 artmıştır (García-Rodríguez ve ark., 2015). POD enzimleri bir hidrojen vericisi varlığında  $H_2O_2$  indirgenmesini katalizleyen enzimlerdir. POD enzimi, fenoller, aromatik aminler, aminofenoller, diaminler, indofenoller, askorbat gibi çeşitli organik ve inorganik hidrojen vericilerinin oksidasyonunu ve ayrıca oksidasyon ve hidroksilasyon reaksiyon türlerini de katalize edebilmektedir (Laane ve ark., 2003). POD enzim içeriği; bitki türlerine, mevsime ve büyüme koşullarına bağlıdır. POD enzimi, bitki hücrelerinde sitoplazmada çözünür formda, hücre duvarında ise bağlı formda bulunmaktadır (Yuan ve Jiang, 2003). POD enzimi, hücre duvarındaki ligninin parçalanması ve sentezlenmesi,  $H_2O_2$  fazlasının uzaklaştırılmasını sağlama, abiyotik ve biyotik strese karşı savunma mekanizmasına katılma (patojen saldırısına karşı koruma) gibi fizyolojik proseslerde önemli rollere sahiptir (Mourato ve ark., 2012; Martins ve ark., 2013; Vergara-Domínguez ve ark., 2013). Zeytin sineği (*Bactrocera oleae* (Gmelin)) saldırısına uğramış zeytinlerde POD enzim aktivitesi daha yüksektir. Bu durum POD enziminin böcek hasarları ya da biyotik strese karşı savunma tepkisinde kilit rol oynadığını göstermektedir (Spadafora ve ark., 2008). POD enzimleri, oksitleyici olarak  $H_2O_2$  varlığında birçok aromatik bileşiği okside etmekte ve polimerik ürünler oluşturur

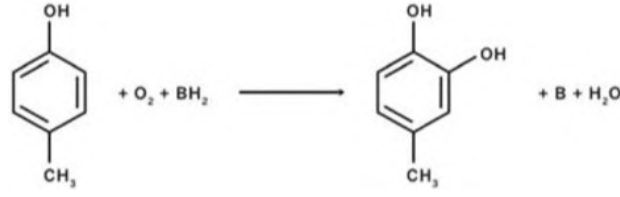
(Galarraga ve ark., 2013; Gholami-Borujeni ve ark., 2011). POD enzim aktivitesi ile fenolik madde oksidasyonu  $H_2O_2$  konsantrasyonu ile sınırlıdır. Fenolik bileşiklerin hasarlı dokulardaki otoksidasyonu sonucunda  $H_2O_2$  miktarı artar (Takahama ve Oniki, 2000).

PPO enzim aktivitesinin inhibisyonunda geleneksel ısıtma ve yeni termal işlemler etkilidir (Zhou ve ark., 2016; Makroo ve ark., 2017; Saxena ve ark., 2017; Abedelmaksoud ve ark., 2018). Isıl işlem, fenolik bileşik içeriğini önemli ölçüde azaltarak oluşan son ürünlerin organoleptik ve besinsel nitelikleri üzerinde olumsuz bir etki yaratmaktadır (Rawson ve ark., 2011). Yapılan çalışmalara göre 40 °C'de 5 dk kalan POD enzim aktivitesinin %60'ı, 10 dk kaldığında ise %85'i kaybolmaktadır. Ayrıca, 50 ve 60 °C sıcaklıklarda 5 dk sonunda ise ölçülebilir bir POD enzim aktivitesi tespit edilememiştir (Clodoveo ve ark., 2014). 30 °C'de 45 dk'lık bir maruziyette yüksek POD enzim stabilitesi bulunurken, 40 °C 'de ise termal stabilitede %34.5'lik bir azalma görülmüştür (Tzika ve ark., 2009). PPO enzim aktivitesi ise 8-25 °C sıcaklıklarda artarken (Segovia-Bravo ve ark., 2009), yine zeytin çeşitine göre 40 °C'de yüksek bir inaktivasyon sağlanmıştır (Taticchi ve ark., 2013).

Malaksiyon sırasında zeytin hamurunun karıştırılması ve ısıtılması (25-35 °C) su-yağ emülsiyonunun parçalanmasına neden olur. Yağ damlacıklarının katı-sıvı ve sıvı-sıvı ayrımı sırasında sulu fazdan kolayca ayrılan daha büyük damlacıklar oluşur. Ayrıca bu işlem, zeytinlerin kırılarak parçalanmasından sonra birçok doğal enzimatik reaksiyonu kolaylaştırır (Clodoveo ve ark., 2014). Malaksiyon süresi, yoğurma hızı, sıcaklık ve atmosfer bileşimi malaksiyon prosesinde kontrol edilmesi gereken parametrelerdir (Clodoveo, 2012; Pastore ve ark., 2014; Reboredo-Rodríguez ve ark., 2014). Sızma zeytinyağındaki fenollerin ve uçucu bileşiklerin korunması bu parametrelere bağlıdır. Yoğurma sırasında, sıcaklığın 35 °C'ye çıkarılması, zeytin meyvesinde bulunan PPO ve POD gibi enzimlerin aktivitesini kolaylaştırmaktadır (Taticchi ve ark., 2013). Biyoaktif bileşikler açısından malaksiyon sıcaklığı optimize edilerek zeytinyağı ekstrakte edilebilmektedir. Malaksiyon sıcaklığının 27, 37 ve 47 °C olarak belirlenen bir çalışmada 27 ve 47 °C malaksiyon sıcaklıklarında hidrositirozol, tirozol, pinosinol, p-kumarik asit içeriklerinin azaldığı bulunmuştur (Jolayemi ve ark., 2016). Parenti ve ark., (2008) yüksek fenolik içerikli sızma zeytinyağı elde etmek için optimum sıcaklığı 27 °C olarak tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, sürekli endüstriyel tesislerde 27 °C'nin altındaki proses sıcaklıklarında elde edilen sızma zeytinyağı ile aynı tesislerde 35 °C'de elde edilen sızma zeytinyağı benzer özelliktedir (Boselli ve ark.,

2009). Zeytinyağının fiziksel, kimyasal ve duyuşal özellikleri üzerinde etkili olan, kimyasal bileşimi ekstraksiyondan önemli seviyede etkilenir. Bu nedenle, zeytinyağı ekstraksiyon prosesi, kalitenin analitik belirteçleridir. Sızma zeytinyağındaki hidrofilik fenolik bileşikler, çeşitli endojen zeytin enzimlerinin aktiviteleri ile ilişkilidir. Yağıdaki konsantrasyonları yağ ekstraksiyonun koşullarından önemli ölçüde etkilenmektedir (Servili ve ark., 2000, 2004). Sızma zeytinyağının kalitesi ve fenolik profili çok sayıda hasat öncesi ve sonrası faktörlerden etkilenebilmektedir. Sızma zeytinyağında bulunan ana hidrofilik fenolik bileşen içeriğı, fenolik glikozitleri hidrolize eden enzimlerin aktivitesiyle yakından ilişkilidir. PPO ve POD enzimleri fenolik bozunma ile ilişkili başlıca enzimlerdir. PPO enzimi, koyu pigmentlere polimerize edilen oksijen ve polifenolik substratların ve çok sayıda fenolik ve fenolik olmayan bileşiğın dönüşümünü katalize eden, bakır içeren bir oksidoredüktazdır.

PPO enziminin termal stabilitesi POD enziminden daha düşüktür. Zeytin POD enzimi en yüksek aktiviteyi 37 °C'de gösterirken, PPO enzimi yaklaşık 50 °C'de optimum aktivite sergilemiştir. Bu, kullanılan sıcaklığa bağılı olarak proses sırasında hamurdaki fenol konsantrasyonlarındaki değışimi kısmen açıklayabilmektedir. Genel olarak, sıcaklıktaki artış (25 °C'den 35 °C'ye) enzimatik oksidatif reaksiyonu (PPO) azaltarak hem toplam fenollerde hem de oleokantalda artışa neden olabilmektedir (Taticchi ve ark., 2014). POD enzimi fenoller, aromatik aminler, aminofenoller, diaminler, indofenoller, askorbat ve hatta birkaç amino asit gibi çeşitli organik ve inorganik hidrojen vericilerin oksidasyonunu katalize etmekte ve ayrıca oksidasyon ve hidroksilasyon gibi diğere reaksiyon türlerini katalize edebilmektedir (Laane ve ark., 2003). PPO enzimi moleküler oksijen varlığında iki farklı reaksiyonu katalize etmektedir. Bunlardan ilki monohidroksifenollerin (*p*-kresol gibi) monofenol oksidaz ile katalizlenen orto-difenollere hidroksilasyon reaksiyonu (EC 1.14.18.1; monofenolaz veya kresolaz aktivitesi) (I), ikincisi orto-difenol oksidaz (EC 1.10.3.1; difenolaz veya katekolaz aktivitesi) ile katalizlenen benzokinonların hidroksil gruplarındaki hidrojenlerin uzaklaştırılması ile meydana gelen orto-dihidroksifenollerin oksidasyonudur (II).



*p*-kresol

4-metil katekol

(I)



katekol

o-benzokinon

(II)

PPO enziminin moleküler oksijen varlığındaki farklı reaksiyonları

Orto-difenol oksidaz tarafından oluşturulan benzokinonlar, sülfhidril bileşikleri, aminler, amino asitler ve proteinlerle O<sub>2</sub> varlığında enzimatik olarak çok reaktif oldukları için diğer birçok bileşiğin öncüsüdür. Bu reaksiyonlarla bazı renkli bileşikler (sarı, kırmızı, kahverengi veya siyah) oluşabilmektedir (Ramírez ve ark., 2003). Meyvelerin olgunlaşması sırasında biyotik faktörler ve abiyotik stres koşullarının neden olduğu hasarlara tepki olarak meydana gelen redoks reaksiyonları üzerinde etkilidir (Mayer, 1986). Kahverengi pigmentler halinde polimerize olan kinonları PPO enzimi katalize eder. Böylece, enzimatik esmerleşme renk değişiminin yanı sıra proteinler, fenoller ve şekerlerin kinon kümeleşmesinden dolayı bir çok olumsuz etki gösterebilmektedir (Queiroz ve ark., 2008). Çeşitli çalışmalarda, olgunlaşma aşamasındaki esmerleşme oranı orto-difenol içeriği ve PPO enzim aktivitesi ile ilişkili bulunmuştur (Ebrahimzadeh ve ark., 2003; Ortega-García ve ark., 2008). β-glukozidaz ve esteraz enzimlerinin etkisinden dolayı zeytin meyvesinde yer alan sekoiridoitinden hidroksitirozol salınımı ile zeytinde esmerleşme meydana gelmektedir (Segovia-Bravo ve ark., 2009).

Enzimatik esmerleşme sistemleri reaksiyon için temel olan oksijen, bakir iyonu, substrat, son ürün veya enzim gibi bileşenleri hedef alarak PPO enzim aktivitesini inhibe edecek birçok kimyasal ve fiziksel metotları içermektedir (Queiroz ve ark., 2008). Ayrıca, polifenol sınıfı sadece ana antioksidanları değil, aynı zamanda doğal PPO enzim inhibitörlerini de içermektedir (Loizzo ve ark., 2012). Organik asitler, ortamdaki pH'yı düşürerek ve/veya enzimi doğrudan inaktive ederek PPO enzimini inhibe eder. Zeytin PPO ve POD enzim aktiviteleri inhibe edilerek, sızma zeytinyağının besinsel ve organoleptik kalitesinin artırılması mümkündür. Kırma ve malaksiyon

sırasında PPO enzim inhibitörü olarak tropolan ve POD enzim inhibitörü olarak sodyum azid ilave edilerek, zeytinyağındaki fenolik bileşikler üzerindeki etkileri incelenmiştir. PPO enzimi kırma aşamasında fenolik oksidasyona, POD enzimi malaksiyon aşamasında fenolik oksidasyona neden olmuştur (García-Rodríguez ve ark., 2015). Elde edilen veriler, zeytinyağının ekstraksiyonu sırasında bu enzimler inhibe edilerek zeytinyağının besinsel ve organoleptik kalitesinin artırılmasının mümkün olduğunu göstermektedir. Ayrıca, malaksiyon sırasında fenolik oksidasyon hızında önemli bir azalma olduğu dolayısıyla fenolik içeriğinin arttığı belirlenmiştir (García-Rodríguez ve ark., 2015). Geleneksel ısıtma, mikrodalga (Palma-Orozco ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2016) ve ohmik ısıtma (Makroo ve ark., 2017; Saxena ve ark., 2017; Abedelmaksoud ve ark., 2018) gibi termal işlemlerin PPO enzim aktivitesinin kontrolünde etkili olduğu belirtilmiştir. PPO enzimi termal inaktivasyonu sıcaklık ve zaman gibi koşullardan etkilenir (Chow ve ark., 2011; Cheng ve ark., 2013; Lante ve ark., 2016). Ancak, ısıl işlemin fenolikler gibi biyoaktif bileşikleri önemli ölçüde azalttığı, son üründe organoleptik ve besinsel özellikler üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bulunmuştur (Rawson ve ark., 2011). PPO enziminin aktivitesi 8-25 °C sıcaklık aralığında artarken sıcaklıktan bağımsız olarak 3.0'ın altındaki pH değerlerinde tamamen inhibe edilmiştir (Segovia-Bravo ve ark., 2009). 15 °C'de 7 gün depolanan zeytinlerde, PPO enzim aktivitesi ilk 2 gün büyük oranda ve daha sonra kademeli olarak azalırken, POD enzim aktivitesi tüm depolama süresi boyunca kademeli bir azalma göstermiştir (Zullo ve ark., 2014). Bir ay boyunca 4 °C'de depolanan zeytinlerin PPO enzim aktivitesindeki değişim taze zeytinlerle aynı eğilimi gösterirken, 20 °C'de depolanan zeytinlerin PPO enzim aktivitesi önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (Hbaieb ve ark., 2015). PPO enziminin 20 °C'de stabilitesi yüksektir. Zeytin çeşitine bağlı olarak 40 °C'de büyük oranda inaktive edilir (Taticchi ve ark., 2013).

Yapılan bir çalışmada, zeytin meyveleri hasattan hemen sonra dondurarak kurutulup kırılmış ve yağdaki fenolik bileşikler artan nem içeriğine göre artıp belli bir seviyeden sonra az miktarda düşüş göstermiştir. Su yağ oranının 3'den büyük olmasının fenoliklerin yağa geçişinde azalmaya neden olduğu vurgulanmıştır (Cecchi ve ark., 2019). Altı farklı İtalyan çeşiti zeytin kullanılarak (Frantoio, Ogliarola, Gentile, Leccino, Moraiolo, San Felice) soğutma işleminin zeytin hamuru üzerine etkileri değerlendirilmiş ve Frantoio, Gentile, Leccino ve San Felice çeşitlerinden ekstrakte edilen natürel sızma zeytinyağlarının fenolik bileşiminde önemli artış tespit edilmiştir (Veneziani ve ark., 2018). Zeytinin olgunlaşması sırasında  $\beta$ -glukozidaz ve POD enzim

aktivitelerinde artış görülürken, ileri olgunlaşma aşamalarında küçük bir azalma gözlenmiştir (Hbaieb ve ark., 2017). Picual ve Arbequina çeşiti zeytinlerin -18 °C'de dondurulmasıyla indüklenen biyokimyasal değişiklikler ve elde edilen yağların fenolik profilleri incelenmiştir. Ana fenolik glikozit, oleuropein ve dimetil oleuropein içeriğinin dondurma işlemi ile önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, dondurma işleminin hasara sebep olduğu meyvelerde yüksek miktarda hidrolitik sekoiridoit türevleri belirlenmiştir (García-Vico ve ark., 2017). Kırma işleminden sonra zeytin hamuruna hızlı bir soğutma işlemi uygulanarak elde edilen zeytinyağlarında yasal parametrelerde herhangi bir değişiklik görülmezken, fenolik bileşiklerin önemli oranda arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, soğutma işlemi ile natürel sızma zeytinyağının duyuşal özellikleri üzerinde olumlu bir etkisi olan aldehitlerde de artış görülmüştür (Veneziani ve ark., 2017).

Zeytin POD'u ve PPO enzimleri zeytin meyvesinde bulunan ana fenolik glikozitleri *in vitro* olarak ve ayrıca yağda bulunan sekoiridoit türevlerini oksitleyebileceği bilinmektedir. Bununla birlikte, zeytin hamurunun malaksiyonu sırasında katkı maddelerinin inhibitör olarak kullanılarak POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzimleri üzerine etkisi ile ilgili yeterli bilgiye rastlanmamıştır. Bu enzimlerin etkisinin daha iyi anlaşılması, sızma zeytinyağının kalitesini iyileştirmek için yeni yaklaşımların tasarlanmasına sebep olabilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, OA, L-sis, askorbik ve  $MgCl_2$  katkılarının ilavesi ile zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerinin yanı sıra sızma zeytinyağının fenolik bileşimi üzerine etkisini değerlendirmektir. Katkı maddelerinin etkileri tek başına ve kombinasyon halinde incelenmiştir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada 2020-2021 yılları Aralık ayı hasat dönemine ait, olgunlaşma indeksi 6 olan, Gemlik çeşiti zeytin örnekleri Manisa ili Akhisar ilçesinde bulunan bir zeytinlikten temin edilmiştir. Çalışmada, kullanılan zeytinler Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Kırma hızı, sıcaklık ve katkı madde oranlarının belirlenmesinde kullanılan zeytinler

#### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Analizlerde analitik saflıkta kloroform, aseton, hekzan, potasyum hidroksit (KOH), sodyum tiyosülfat, potasyum iyodür (KI) ve sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (Tekkim, Türkiye), glasiyel asetik asit, Folin Ciocalteu reaktifi, etanol, metanol, dietil eter (Merck, Almanya), sikloheksan, fenolftalein, nişasta kullanılmıştır. İnhibitör madde olan OA (Merck, Almanya), askorbik asit (Mbhav, Malezya), L-sistein (Akcan kimya, Türkiye) ve  $\text{MgCl}_2$  (Carlo Erba, Fransa) yerel bir firmadan temin edilmiştir. DL- $\alpha$ - tokoferol asetat, *rac*- $\beta$ -tokoferol, (+)- $\gamma$ - tokoferol, (+)- $\delta$ - tokoferol,  $\alpha$ -tokotrienol,  $\beta$ -tokotrienol,  $\gamma$ - tokotrienol and  $\delta$ - tokotrienol (HPLC saflık derecesi  $\geq 95.0\%$ ) Sigma Chemical Co. (St. Louis, ABD)’den satın alınmıştır.

#### 3.3. Deneysel Tasarım

Yüzey Yanıt Metodolojisi (Response surface methodology, RSM), zeytin kırma makinası hızı, yoğurma sıcaklığı ve katkı madde oranlarının PPO ve POD enzim aktivitelerinin inhibisyonu üzerindeki etkisini ortaya koymak için kullanılmıştır.

### 3.4. Tez Çalışmasının Kapsamı

Tez çalışması 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Tez çalışmasının iki aşamalı deneme planı

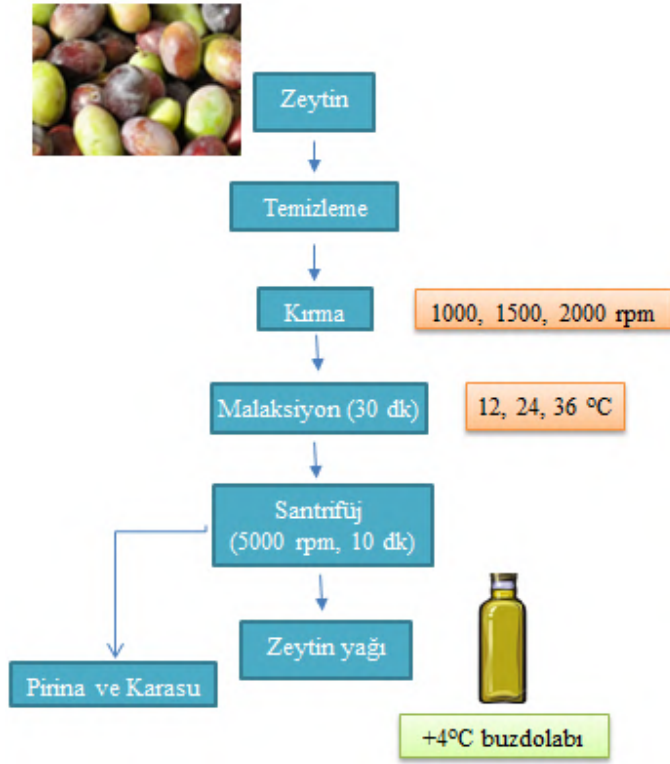
Aşama	Yapılan işlemler	Denemeler
1.Aşama	Kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından en uygun parametrelerin belirlenmesi	Kırma hızı: 1000, 1500 ve 2000 rpm Malaksiyon sıcaklığı: 12, 24 ve 36 °C
2.Aşama	Belirlenen optimum kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığında katkı maddelerinin ilavesi	Katkı oranları: %0.5, 1, 2, 3, 4, 5

### 3.5. Kırma Hızlarının Belirlenmesi

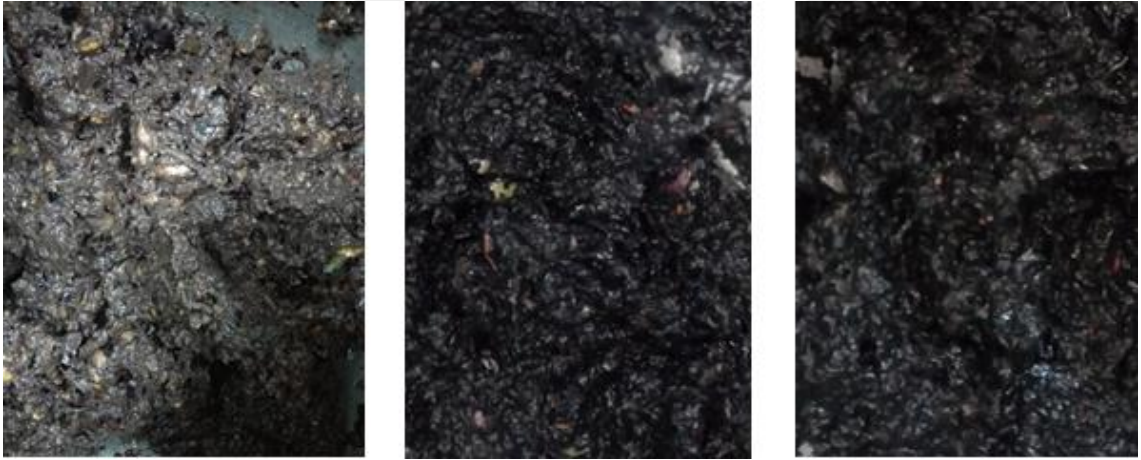
Kırma makinesine (Kocamaz, KT 17, Türkiye) konulan zeytinler hamur haline getirilmiştir. Kırma işleminde kullanılan kırma makinası Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Bu aşamada literatür verilerinden yararlanılarak 2200, 2900, 3600 rpm kırma hızları ayrı ayrı kullanılmıştır (Guerrini ve ark., 2017; Polari ve ark., 2018; Tamborrino ve ark., 2020). Kırılan zeytinler çok ezilmiş bir formda olduğu için deneme desenindeki kırma hızları 1000, 1500, 2000 rpm olarak değiştirilmiştir (Şekil 3.3). 2200, 2900, 3600 rpm ve 1000, 1500, 2000 rpm hızlarında kırma sonucunda elde edilen hamurlar sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5’te verilmiştir.



**Şekil 3.2.** Kırma işleminde kullanılan kırma makinası



Şekil 3.3. RSM’de belirlenen yanıtla göre zeytinyağı ekstraksiyonu



Şekil 3.4. Sırasıyla 2200, 2900, 3600 rpm hızlarında kırma sonucunda elde edilen hamurlar



Şekil 3.5. Sırasıyla 1000, 1500, 2000 rpm hızlarında kırma sonucunda elde edilen hamurlar

Zeytinyağı ekstraksiyonu için kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından optimum koşulların belirlenmesi için kullanılan RSM’de, deneysel tasarım olarak Merkezi Kompozit Tasarım seçilmiştir. Bağımsız değişkenler sıcaklık ve süredir. Bağımlı değişkenler ise serbest yağ asitliği, peroksit değeri, toplam fenolik madde içeriği, PPO ve POD enzim aktivitesi değerleridir. Bağımsız değişkenlerin değerleri Simplex Lattice’de en düşük, merkez ve en yüksek olarak Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Bağımsız değişkenlerin kodlanmış ve kodlanmamış değerleri

Bağımsız değişkenler	Faktör seviyeleri		
	En düşük (-1)	Merkez (0)	En yüksek (1)
Kırma hızı (Faktör 1)	1000	1500	2000
Sıcaklık (Faktör 2)	12	24	36

### 3.6. İnhibitör Miktarının Tespiti

OA, AA, L-sis ve  $MgCl_2$  katkı maddeleri zeytin hamuruna %0.5, 1, 2, 3, 4, 5 oranlarında eklenerek denemeler yapılmıştır.

Zeytinler 1500 rpm’de kırılarak belirtilen oranlarda katkı maddelerin her biri sırayla eklenilerek laboratuvar koşullarında (15-18 °C) hamur yoğurma makinesinde (Hobart, Corporation, Troy, OH, ABD) 30 dk yoğurulmuştur. Yoğurma işleminden sonra zeytin hamurundan bir miktar örnek alınmıştır. Elde edilen zeytin hamurunda PPO ve POD enzim analizleri yapılmıştır.

Bu denemeden yola çıkarak kullanılacak katkı miktarları belirlenerek çalışmada bu miktarlar kullanılmıştır. Kullanılacak katkı oranı %0 – 2 aralığında RSM’de Simplex Lattice deneysel tasarım kullanılarak belirlenmiştir.

Zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında kullanılan katkı maddeleri ile PPO ve POD enzim aktivitelerinin optimum inhibisyonu için kullanılan katkı madde miktarlarının belirlenmesi için de RSM kullanılmıştır. Deneysel tasarımda değişkenler OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$ ’dür. Düşük değer “0” yüksek değer “2” olarak verilmiştir.

### 3.7. Zeytinyağı Üretimi

Zeytinler örnek alma yöntemine uygun olarak (ağacın her tarafından olacak şekilde) yaklaşık 40-50 kg olacak şekilde elle toplanmıştır. Temin edilen zeytinler hasattan sonra 1-2 gün içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Zeytinler, dal, yaprak gibi yabancı maddelerden ayıklanarak temizlenmiştir. Yaklaşık 10-12 °C’deki şebeke suyu ile yıkandıktan sonra 1’er kg’lık numune partileri hazırlanmıştır. Zeytinler kırma makinasında ayrı ayrı 1000, 1500, 2000 rpm hızlarında kırma işlemine tabi tutulmuştur. Zeytin hamur sıcaklığının 12 °C’ye gelmesi için 200 gr buz, 24 °C’ye gelmesi için 200

mL 35-36 °C'de su ve 36 °C'ye gelmesi için 200 mL 90 °C'de su kullanılmıştır. Sıcaklık değişimleri dijital termometre ile takip edilmiştir. Çizelge 3.3'te RSM'de belirlenen kırma hızı (1000, 1500, 2000 rpm) ve malaksiyon sıcaklık (12, 24, 36 °C) değerlerine göre zeytinyağı ekstraksiyon koşulları verilmiştir. Malaksiyon aşamasında örnek hamurun herbiri hamur yoğurma makinesi ile 30 dk boyunca 12, 24, 36 °C sıcaklıklarda yoğurulmuştur. Zeytinyağ laboratuvar tipi santrifüj cihazında (Awel Industries, Centrifuge MF 20, Fransa) 6000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek elde edilmiştir. Elde edilen zeytinyağları renkli cam şişelere konulup, kapakları azot gazı altında kapatılarak analize kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Üretilen zeytinyağları Şekil 3.6'da gösterilmiştir. Analizler 3 tekerrür halinde yürütülmüştür.

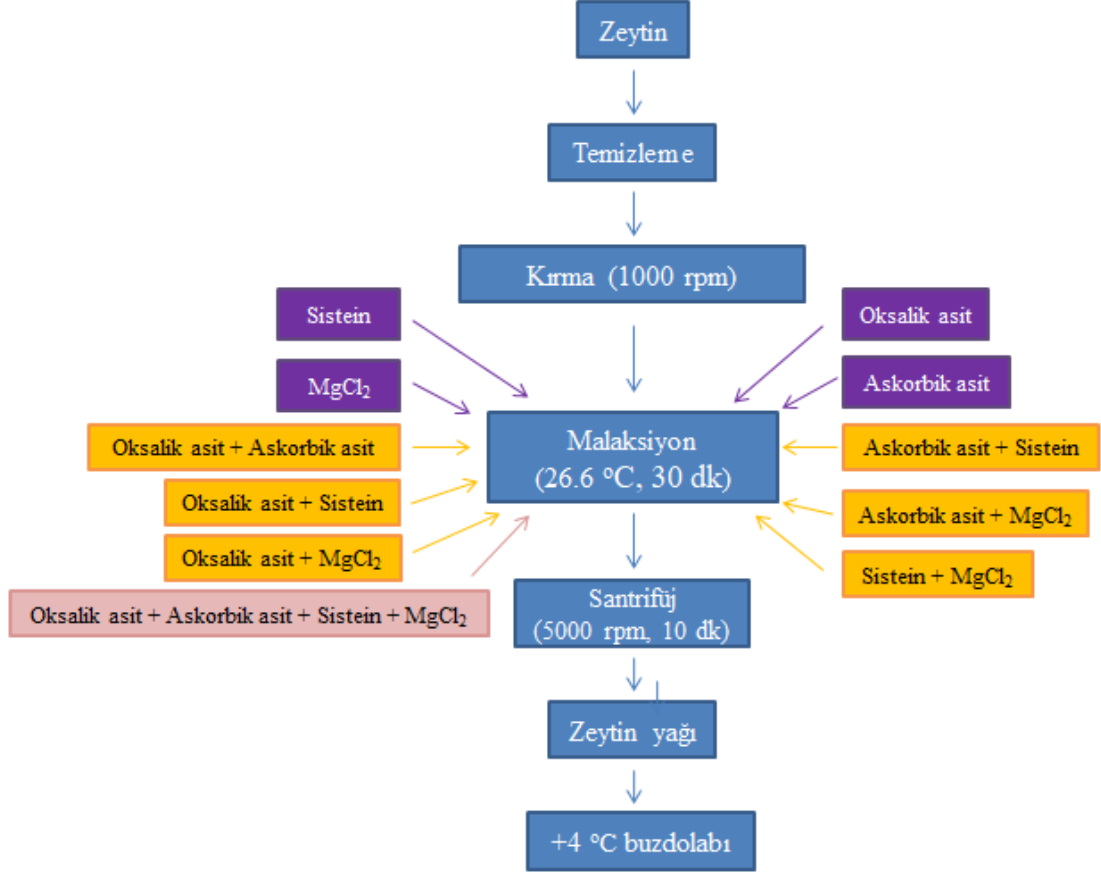
**Çizelge 3.3.** RSM'de belirlenen kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı değerlerine göre ekstraksiyon koşulları

Desen no	Kırma hızı	Sıcaklık
1	1500	12
2	1000	24
3	1000	24
4	1000	36
5	1000	12
6	2000	24
7	2000	12
8	1500	36
9	2000	36
10	1000	12
11	1500	24
12	1500	24
13	2000	12



**Şekil 3.6.** RSM'de belirtilen kırma hızları ve malaksiyon sıcaklığı değerlerinde ekstrakte edilen zeytinyağları

İnhibitörlerin farklı oran ve kombinasyonlarda kullanımı verilmiştir (Şekil 3.7). Analizler için ayrılan zeytin hamuru örnekleri Şekil 3.8’de, zeytinyağı örnekleri ise Şekil 3.9’da verilmiştir. Şekil 3.10’da örneklerin elde edilişi gösterilmiştir.



Şekil 3.7. 1000 rpm, 26.6 °C’de PPO ve POD enzim katkılarının tek tek ve kombinasyon halinde zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılması

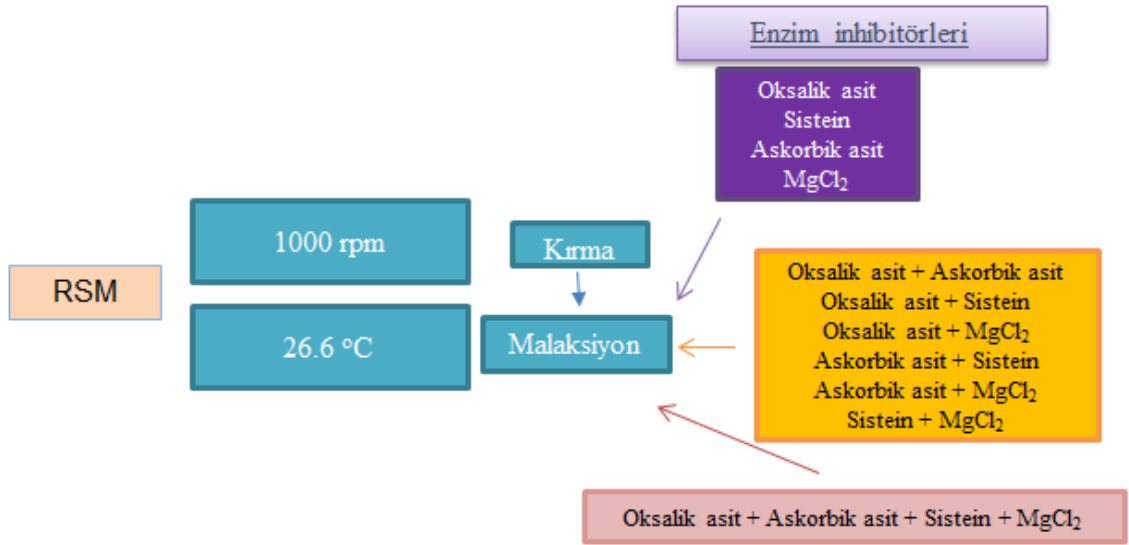


Şekil 3.8. Enzim analizleri için ayrılan zeytin hamurları

Santrifüj işleminden sonra elde edilen zeytinyağı azot gazı altında, koyu renkli cam şişelere konularak analizlere kadar +4 °C’de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.9). Şekil 3.10’da deneme deseni verilmiştir.



Şekil 3.9. Analizler için kullanılan, şişelenmiş zeytinyağları



Şekil 3.10. Kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından en uygun parametreler belirlendikten sonra katkı maddelerin ilave edilmesiyle zeytinyağı ekstraksiyonunun gerçekleştirilmesi

RSM sonuçları ayrıntılı olarak Araştırma Sonuçları ve Tartışma (başlık 4) kısmında verilmiştir.

### 3.8. Zeytinyağında Yapılan Analizler

#### 3.8.1. Zeytinyağı veriminin belirlenmesi

Zeytinyağı verimi, deneme deseninde yer alan her bir numune için santrifüj sonunda elde edilen zeytinyağı ağırlığı ( $A_{\text{yağ}}$ ) ile başlangıçta proste kullanılan zeytin ağırlığı ( $A_{\text{zeytin}}$ ) arasındaki kg cinsinden oran olarak hesaplanmıştır (Tamborrino ve ark.

2017). Zeytinyağı verimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Verim} = (A_{\text{yağ}} / A_{\text{zeytin}}) \cdot 100$$

$A_{\text{yağ}}$  elde edilen yağın kütlesi (kg) ve  $A_{\text{zeytin}}$  proseste kullanılan zeytinin kütlesi (kg).

### 3.8.2. Renk analizi ( $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ )

Zeytinyağlarının renk bir Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta, Osaka, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Cihaz standart beyaz yüzeyli bir kalibrasyon levhasına karşı kalibre edilmiş ve CIE Standard Illuminant C'ye göre ayarlanmıştır. Zeytinyağı örnekleri, 20 mL'lik cam beherlere alınarak, ortamdaki ışıktan etkilenmemesi için etrafı aliminyum folyo ile kaplanmıştır. Renk değerleri cihazın uygun başlığının behere dokundurulması ile her örnek için en az üç ölçüm olacak şekilde kaydedilmiştir.  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri belirlenmiştir (Morello ve ark., 2004).  $L^*$  0 (siyah) ile 100 (beyaz) arasında değişmektedir.  $a^*$  koordinatı pozitif iken kırmızılık, negatif iken yeşillik derecesini ve  $b^*$  koordinatı pozitif iken sarılık, negatif iken mavilik derecesini göstermektedir.

### 3.8.3. Serbest yağ asitliği tayini

Yüzde serbest yağ asitliği, Anonymous 1989 (AOCS Official Method Ca 5a-40)'a göre yapılmıştır. Yağ örnekleri 250 mL'lik bir erlene yaklaşık 2 gr tartılarak 25 mL %95'lik etil alkol-dietil eter karışımında (1:2 v/v) çözündürülerek çözücü ortamına geçen serbest yağ asitlerinin geçişi sağlanmıştır. Çözücü karışımı içerisine indikatör olarak 3-4 damla fenolftalein damlatılarak 0.01 N etanollü KOH çözeltisi ile renk pembe oluncaya kadar (30 s bu renk kalmalı) titre edilmiştir. % serbest yağ asitliği oleik asit ( $M_a=282$  gr/mol) cinsinden aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Serbest yağ asitliği (\%, oleik asit cinsinden)} = (V \times N \times 28.2) / M$$

N: KOH çözeltisinin normalitesi

V: Titrasyonda harcanan KOH çözeltisinin mL'si

M: Örnek miktarı, gr 28.2: 282 (Oleik asidin molekül ağırlığı)  $\times$  100/1000

### 3.8.4. Peroksit değeri tayini

Peroksit değeri, Anonymous 1989 (AOCS Official Method Cd8-53)'a göre yapılmıştır. Örneklerden yaklaşık 1 gr 250 mL'lik erlenlere tartılmıştır, üzerine 30 mL asetik asit:kloroform (3:2 v/v) ilave edilerek kloroform ile yağın çözünmesi asetik asit ile reaksiyon ortamının uygun hale getirilmesi sağlanmıştır. Sonra 1 mL doymuş potasyum iyodür (KI) çözeltisi ilave edilerek, sürekli ve hızlı bir şekilde 1 dk boyunca

karıştırılmış ve 5 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra üzerine 75 mL destile su ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. İndikatör olarak nişasta çözeltisinden 3-4 damla ilave edilerek, 0.01 N sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. Peroksit değeri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Peroksit değeri (meq O}_2\text{/kg yağ)} = [(V-B) \times N \times 1000] / M$$

V: Titrasyonda harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL'si

B: Kör (şahit) için harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL'si

N: Sodyum tiyosülfat çözeltisinin normalitesi

M: Örnek miktarı, gr

### 3.8.5. UV özgül soğurma değeri tayini

Özgül soğurma değerleri analizi, AOCS Ch5-91'e göre yapılmıştır (Anonymous, 1989). Konjuge dien ( $K_{232}$ ) değerinin hesaplanması için yağ örneğinden yaklaşık 1 gr tartılarak hekzan ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 232 nm dalga boyunda okumalar yapılmış ve absorbans değerlerinin 0.2 ile 0.8 arasında olmasına dikkat edilmiştir. 0.2 absorbans değerinden düşük bir absorbans gözlenmişse daha fazla örnek alınması, 0.8 absorbans değerinden fazla bir okuma yapılmışsa örneğin seyreltilmesi gerekmektedir.  $K_{232}$  değerinin hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$K_{232} = E_{232} / c \cdot s$$

Burada;  $K_{232}$  = 232 nm'de özgül soğurma değeri,

$E_{232}$  = 232 nm'de okunan absorbans değeri,

c = Çözeltinin konsantrasyonu (g/100 mL),

s = Küvetin kalınlığı (cm) dir.

Konjuge trien ( $K_{270}$ ) değeri için yağ örneğinden yaklaşık 1 gr tartılarak hekzan ile çözülerek 10 mL'ye tamamlanmış ve 270 nm dalga boyunda absorbans değeri okunmuştur. 270 nm dalga boyu için K değeri hesaplanmıştır.  $K_{270}$  değeri aşağıdaki genel formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$K\lambda = E\lambda / c \cdot s$$

Burada;  $K\lambda$  =  $\lambda$  dalga boyunda özgül soğurma değeri,

$E\lambda$  =  $\lambda$  dalga boyunda okunan absorbans değeri,

c = Çözeltinin konsantrasyonu (gr/100 mL),

s = Küvetin kalınlığı (cm) dir.

### 3.8.6. Toplam klorofil ve karotenoid analizi

7.5 gr yağ örneğinin 25 mL siklohekzan içinde çözündürülüp cam spektrofotometre küvetlerine konularak absorpsiyon spektrumları spektrofotometrede

(Biochrom, LibraS22, Cambridge-İngiltere) klorofil için 670 nm ve karotenoid için 470 nm'de ölçülmüştür. Klorofil ve karotenoid içerikleri kg yağda sırasıyla mg feofitin a ve lutein cinsinden ifade edilmiştir (Minguez-Mosquera ve ark., 1991). Toplam klorofil ve karotenoid pigmentinin miktarı aşağıdaki formüllere göre ifade edilmiştir.

$$\text{Klorofil (mg/kg)} = \frac{A_{670} \times 10^6}{613 \times 100 \times d}$$

$$\text{Karotenoid (mg/kg)} = \frac{A_{470} \times 10^6}{2000 \times 100 \times d}$$

(A: Absorbans ve d: Küvet kalınlığı)

### **3.8.7. Zeytinyağından fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu**

Zeytinyağından fenolik madde ekstraksiyonunda, zeytinyağından 10 gr alınıp üzerine 5 mL n-hekzan ve 10 mL metanol:su (h:h/70:30) ilave edilmiştir. 2 dk vorteks ile karıştırıldıktan sonra 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra hidroalkolik faz (metanollü kısım) ayrılıp kalan yağ kısmına tekrar 5 mL n-hekzan ve 10 mL metanol:su ilave edilmiştir. Daha sonra karışım tekrar 10 dk 3000 rpm'de santrifüjlenmiştir (Pirisi ve ark., 2000; Bonoli ve ark., 2003). Son olarak, PTFE membran filtrelerden (gözenek boyutu 0.45 µm, Sigma-Aldrich, Milan, İtalya) geçirilmiştir.

Bu hazırlanan ekstrakt toplam fenolik madde miktarının belirlenmesinde, antioksidan aktivite analizlerinde ve yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) analizlerinde kullanılmıştır.

### **3.8.8. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi**

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak belirlenmiştir (Yoo ve ark., 2004). 0.2 mL fenolik ekstraktları üzerine, 4.8 mL saf su ve 0.5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (1:3 seyreltilmiş) ilave edildikten sonra 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. 1 mL %35'lik (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 3.5 mL saf su ilave edildikten sonra 2 saat karanlıkta bekletilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği spektrofotometre (Biochrom, LibraS22, Cambridge-İngiltere) ile 725 nm'de belirlenmiştir (Caponio ve ark. 2016; Difonzo ve ark., 2017). Toplam fenolik madde içeriği, gallik asit eşdeğerleri (mg/kg) olarak ifade edilmiştir.

### **3.8.9. Fenolik bileşenlerin HPLC yöntemi ile belirlenmesi**

Agilent HPLC 1100, Software: PC running ChemStation (Agilent, ABD) cihazı kullanılmıştır. Cihazın çalışma koşulları şöyledir:

Enjeksiyon hacmi: 40 µL, Kolon: Inertsil ODS3 analitik kolon (GL Sciences, Tokyo, Japonya) (5µm, 25cm×4.6mm i.ç), Hareketli faz: solvent A (%2 formik asit içeren ultra saf su), solvent B (metanol), Akış hızı: 0.50 mL/dk., Dedektör: DAD G1315A Diode Array Dedektör (280 nm: fenolik asitler ve sekoiridoitler, 320 nm: flavonoitler), Sıcaklık: 40 °C.

Hareketli faz sistemi ile oluşturulan gradient çalışma programı: süre (t):0.01 dk A= %95 B=%5, t:3.00 dk A=%85 B=%15, t:13.00 dk A=%80 B=%20, t:25.00 dk A=%75 B=%25, t:35.00 dk A=%70 B=%30, t:40.00 dk A=%65 B=%35, t:45.00 dk A=%60 B=%40, t:47.00 dk A=%55 B=%45, t:50.00 dk A=%53 B=%47, t:60.00 dk A=%52 B=%48, t:64.00 dk A=%50 B=%50, t:70.00 dk A=%50 B=%50, t:76.00 dk A=%95 B=%5 şeklindedir. Fenolik maddelerin tanısı, uygun konsantrasyon aralıklarında analiz edilen standart maddelerin alıkonma zamanları ve spektrumlarıyla kıyaslanarak yapılmıştır. Standardı olmayan bileşenlerin tanısında ise literatür verilerindeki alıkonma zamanları ve spektrumlardan yararlanılmıştır. Ayrıca ekstraktların içerisine standartlar ilave edilerek tanımlama işlemi desteklenmiştir (Vinha ve ark., 2005).

### **3.8.10. DPPH Serbest Radikal Tutucu Etkinin Belirlenmesi**

DPPH radikal tutucu etki analizinde stabil serbest radikallere karşı zeytin hamuru ve yağı antioksidanlarının zamana ve doza bağlı reaksiyon kinetikleri ölçülmüştür (Roginsky ve Lissi, 2005). Yağ ekstraktlarının farklı konsantrasyonları, metanol:su (80:20, v/v) karışımıyla hazırlanmış, üzerlerine 0.1mM metanollü DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ilave edilmiş ve 27°C'da 20dk beklenmiştir. Örneklerin absorbanslarındaki değişim 517nm'de spektrofotometrede okunmuştur. Sonuçlar DPPH radikalinin başlangıç konsantrasyonunun % azalması üzerinden bildirilmiştir.

### **3.8.11. β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

Yağ fenolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, bir bileşiğin, yüksek sıcaklıklarda (50 °C) oksijen varlığında emülsiyon haline getirilmiş bir sulu sistemdeki β-karoten kaybını en aza indirme kabiliyeti ile ölçüldüğü β-karoten ağartma yöntemine göre değerlendirilmiştir. Bu analiz, linoleik asitin termal otoksidasyonuna ve bunun sonucu olarak, ağartmalarını belirleyen β-karoten molekülünden hidrojen atomlarını temizleyebilen peroksil radikalinin oluşumuna dayanmaktadır. β-karoten ağartma, absorbans azalması ile tespit edilmektedir ve ekstraktın antioksidan içeriği düşük olduğunda absorbans daha yüksektir.

0.5 mg  $\beta$ -karoten tip II (Sigma, St. Louis, MO) 1 mL kloroformda (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Milano, İtalya) çözülmüştür. 25  $\mu$ l linoleik asit (Sigma, St. Louis, MO) ve 200  $\mu$ L Tween 40 (Sigma, St. Louis, MO) içeren yuvarlak tabanlı küçük bir şişeye pipetlenmiştir. Kloroform kuruyana kadar 40 °C'de bir vakum altında buharlaştırılmasından sonra, şişeye, oksijen ile zenginleştirilmiş 50 mL damıtılmış su ilave edilmiş ve karışım, bir lipozom çözeltisi oluşturmak üzere çalkalanmıştır. Bu çözeltinin 1.6 mL'si ve 40 mL fenolik ekstrakt alınarak absorbans hemen 470 nm'de ölçülmüştür. Karışım, 50 °C'de bir su banyosunda 120 dk boyunca inkübe edilmiştir. 120 dakika sonra absorbans tekrar ölçülmüştür.  $\beta$ -karoten çözeltisi (1.6 mL) ve metanol çözeltisi (40 mL) (%70, v/v) içeren kontrol örneğinde absorbans spektrofotometrede (Biochrom, LibraS22, Cambridge-İngiltere) 470 nm'de 0. ve 120. dk'larda okunmuştur (Ben Taârit ve ark., 2012). Antioksidan aktivite (%) olarak ifade edilmiştir.

$$\text{Antioksidan aktivite (\%)} = \left(1 - \frac{A_S^0 - A_S^{120}}{A_C^0 - A_C^{120}}\right) \times 100$$

$A_S^{120}$  ve  $A_C^{120}$ , 120 dk inkübasyondan sonra sırasıyla numune ve kontrolün absorbans değerleridir.  $A_S^0$  ve  $A_C^0$ , sıfır zamanda ölçülen sırasıyla numune ve kontrolün absorbans değerleridir.

### **3.8.12. Oksidatif stabilitenin ransimat metoduyla belirlenmesi**

Cihaz kontrolü, sonuç değerlendirme ve veri yönetimi için StabNet 1.0 adlı yazılım kullanılmıştır. Ölçümler için belirlenen sıcaklık 120 °C, 20 L/h gaz akış hızında 3 gr zeytinyağı numunesi ve 60 mL ultra saf su ile ölçüm yapılmıştır. Ölçümler 3 paralel olarak tamamlanmıştır (Gorjanović ve ark., 2011; Anwar ve ark., 2013).

### **3.8.13. Toplam tokoferol ve tokotrienolün belirlenmesi**

Zeytinyağı numuneleri (0.5  $\pm$ 0.01 gr) santrifüj tüplerine tartılarak 0.5 mL hekzan içerisinde çözdürülmüştür. Tüpler 3 dk çalkalanıp ve numuneler enjeksiyondan önce 0.45  $\mu$ m PTFE membran filtrelerinden süzölmüştür. Standart malzemelerin uygun konsantrasyonlardaki stok çözeltileri de hekzan içerisinde hazırlanmıştır.

Analizler, Infinity II Floresan Detektörüne (FLD) bağlı bir Agilent 1260 Serisi HPLC sistemi (Agilent Technologies Inc, Wilmington, ABD) üzerinde gerçekleştirilmiştir. FLD,  $\lambda_{ex}$ =296 nm ve  $\lambda_{em}$ =330 nm dalga boyuna ayarlanmıştır. Ayırmalar, Develosil C30 paslanmaz çelik kolon (250 $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Phenomenex Inc., Torrance, ABD) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Gradyan programında solvent A (metanol:su, 91:9, v/v) ve solvent B (metil tert-butil eter:metanol:su, 80:18:2, v/v/v) karışımı, farklı akış hızları ve sıcaklıklar optimum ayırmaları gerçekleştirmek için

kullanılmıştır. Knecht ve ark., (2015) ve Arslan ve Janssen, (2018) tarafından bildirilen mobil faz çözücülerini A ve B modifiye edilmiş bir gradyan programı ile kullanılmıştır. Elüsyon, aşağıdaki solvent A ve B gradyan programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir: 0–20.5 dk %0 B, 20.5–25 dk %0–40 B, 25–36 dk %40 B, 36–46 dk %40–55 B, 46–48 dk %55–80 B, 48–51 dk %80 B, 51–53 dk %80–0 B, 53–63 dk %0 B. Akış hızı 0.5 mL/dk ve sıcaklık 10 °C olarak ayarlanmış ve sisteme 20 µL numune enjekte edilmiştir. Sonuçlar; alfa- (α-), beta- (β-), gama- (γ-) ve sigma- (δ-) tokoferol (T) ve tokotrienol (TT) türlerinin tayini şeklinde sunulmuştur.

#### **3.8.14. Duyusal analiz**

Duyusal analiz için renk, koku, tat, yeşil yaprak, kesilmiş çimen, baharat, meyvemsi, acılık, yakıcılık, bütün hoşluk, ağızda bıraktığı tat, temel kusur, zeytin meyvesi, elma, badem, meyvemsi, yeşil zeytin, yeşil muz ve kuru meyve parametreleri seçilmiştir. Bu parametrelerin seçiminde Dias ve ark., (2016), Gargouri ve ark., (2015), Puértolas ve de Marañón, (2015), Fernandes-Silva ve ark., (2013), Bubola ve ark., (2012), Stefanoudaki ve ark., (2011), Marx ve ark., (2021), Di Vaio ve ark., (2013), Zago ve ark., (2019) ve Sanmartin ve ark., (2018) çalışmalarından yararlanılmıştır. Zeytinyağı numunelerinin her birinden 15 gr alınmış ve yağlar oda sıcaklığında renklerinin görünebileceği, şeffaf kaplara tartılmıştır. Numuneler üç haneli rakamlar ile kodlandırılarak etiketlenmiş ve servis edilmiştir. Tadımcılar numuneleri duyusal özelliklerine göre profil kağıdı kullanarak değerlendirmişlerdir. Sonuçlar profil kağıdındaki verilere göre 1: çok kötü ve 9: çok iyi olacak şekilde 9 puanlık bir puanlama skalası kullanılarak sayısal verilere dönüştürülmüştür. Her örneği 10 panelist tatmış ve baskın özellikler için ortalama değer alınmıştır.

### **3.9. Zeytin Hamurunda Yapılan Analizler**

#### **3.9.1. Nem içeriği**

Zeytin hamuru numunelerinden darası alınmış bir tartım kabına yaklaşık 5 gr ( $m_1$ ) tartılmış,  $105 \pm 1$  °C'deki etüvde sabit ağırlığa gelene kadar (4 saat) bekletilmiştir. Desikatörde soğutulduktan sonra son tartım alınmış ( $m_2$ ) ve aşağıdaki formül kullanılarak nem miktarı hesaplanmıştır (Nergiz ve Engez, 2000).

$$\% \text{ nem} = ((m_1 - m_2) / m_1) \times 100$$

#### **3.9.2. Zeytin hamurundan fenolik ekstraktı hazırlama**

Dondurularak kurutulmuş zeytin hamuru (10 gr) bir behere tartılmıştır. Metanol:su (50:50, v/v; 50 mL) ilave edilerek ve 2 dk homojenize edilmiştir. Karışım süzülerek yağı uzaklaştırmak için hekzan (3 × 50 mL) ile yıkanmıştır. Ekstrakt daha

sonra 0.45 µm'lik şırınga ucu filtreden geçirilmiştir (McDonald ve ark., 2001; Vinha ve ark., 2005).

### **3.9.3. Toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi**

Yağda fenolik madde miktarının belirlenmesi metodu (başlık 3.7.8) ile aynı metot kullanılmıştır.

### **3.9.4. Fenolik bileşenlerin HPLC'de belirlenmesi**

Yağda fenolik bileşenlerin HPLC'de belirlenmesi metodu (başlık 3.7.9) ile aynı metot kullanılmıştır.

### **3.9.5. DPPH Serbest Radikal Tutucu Etkinin Belirlenmesi**

Yağda DPPH serbest radikal tutucu etkilerinin belirlenmesi metodu (başlık 3.7.10) ile aynı metot kullanılmıştır.

### **3.9.6. β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi**

Yağda β-karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivitenin belirlenmesi metodu (başlık 3.7.11) ile aynı metot kullanılmıştır.

### **3.9.7. POD enzim aktivitesi**

POD enziminin aktivitesinin belirlenmesinde Arogba ve ark., (1998)'in çalışmasında kullandığı metot modifiye edilerek kullanılmıştır. 10 g zeytin hamuru 15 mL fosfat tamponu (0.1 M, pH 6) içerisinde homojenizatör (WiseTis, HG-15D, Korea) kullanılarak 3 dk homojenize edilmiştir. Homojenat fosfat tamponu ile 25 mL'ye tamamlandıktan sonra filtre kağıdı ile süzülerek 10 dk 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant ham enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Daha sonra küvete 1.5 mL ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) 1 mM), 0.02 mL Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (1:60), 1.3 mL fosfat tamponu ve 0.1 mL örnek ekstraktı eklenmiştir. 420 nm'de 5 dk boyunca 15 s'de bir olmak üzere absorbans değerleri kaydedilmiştir. Enzim aktivitesi POD enzim aktivitesi olarak hesaplanmıştır (Shindler ve Bardsley, 1975).

$$A = E \times b \times c \quad c = A/E \times b \quad V = c \times D_f$$

A=Absorbans (5 dk sonunda okunan değer)

b=Işığın geçtiği mesafe (1 cm)

c=Konsantrasyon (µm/mL)

E=Ekstinksiyon katsayısı (5000 M<sup>-1</sup>×cm<sup>-1</sup>)

D<sub>f</sub>=Seyreltme katsayısı

V=Reaksiyon hızı (µm×dk/mL)

### 3.9.8. PPO enzim aktivitesi

PPO enziminin aktivitesi Ponting ve Joslyn (1948) metoduna göre spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Zeytin hamuru enzimatik ekstraktlarından PPO enzim aktivitesini belirlemek için substrat olarak kateşol kullanılmıştır. Aktivite ölçümü için bir küvette 1 mL 0.05 M fosfat tamponu, 1.5 mL 0.02 M substrat çözeltisi ve son olarak 0.1 mL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Sonra 420 nm’de absorbanstaki değişiklikler 3 dk boyunca okunmuştur. Enzim aktivitesi, 1 Enzim Ünitesi (EU) reaksiyonun olduğu küvette 3 dk sonunda meydana gelen 0,001’lik artış olarak tanımlanmıştır. Aktivite birimi olarak “0.1 mL enzim çözeltisi başına 3 dk’da absorbansta meydana gelen 0,001 birimlik değişme” kullanılmıştır.

$$\text{Aktivite} \frac{U}{\text{mL}} = \frac{E}{0.001} \times \frac{1}{\text{He}} \times \text{Herk} \times \text{Sf}$$

E=Reaksiyon karışımındaki aktiviteden kaynaklanan absorban değişiminin süreye karşı işlenmesiyle elde edilmiş olan absorban süre eğrisinin başlangıcındaki doğrusal kısmının eğimi ( $\Delta\text{abs}/\text{dk}$ )

0.001=Abs/dk değerinin üniteye çevrilmesi için kullanılan sabit bir değer

He=Enzim ekstraktının, reaksiyon karışımı içerisindeki hacmi (mL)

Hrk=Reaksiyon karışımının toplam hacmi (mL)

Sf=Seyreltme faktörü

### 3.9.9. $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi

Zeytin hamuru  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi spektrofotometrik yöntemle tayin edilmiştir (Li ve ark., 2005). 100 mg zeytin hamuru üzerine 0.05 M 1.5 mL sitrat tamponu konularak 5000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrik aktivite tayini 4-Nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (pNPG) substratı varlığında 420 nm’de gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometrik aktivite tayini için 200  $\mu$ l substrat çözeltisi üzerine 200  $\mu$ L enzim ekstraktı ilave edilmiştir. Karışım 40°C’de 2.5 saat inkübe edildikten sonra reaksiyonu durdurmak için reaksiyon karışımına 2 mL 0.25 M’lık  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisi ilave edilmiştir. Kontrol tüpü ise aynı şekilde hazırlanan çözeltiliye, enzim ekstraktı yerine aynı miktarda tampon çözelti ilave edilmesiyle hazırlanmıştır. Bir birim  $\beta$ -glukozidaz enzimi, pH 7.0’de dakikada 1.0  $\mu$ mol substratın hidrolizini katalize eden enzim miktarıdır.

$$\beta - \text{glukozidaz aktivitesi}(\text{ünite}/\text{gr}) = \frac{(A420)_{\text{son}} - (A420)_{\text{ilk}}}{(A420)_{\text{kalibrasyon}} - (A420)_{\text{su}}} \times 250$$

$(A405)_{\text{kalibrasyon}} \text{ çözeltilisi} = 2.5 \text{ saatteki kalibrasyon çözeltilisinin absorbans değeri}$

$(A405)_{\text{su}} = 2.5 \text{ saaatteki suyun absorbans değeri}$

### **3.9.10. İstatistiksel analiz**

Deneme deseninin oluşturulması, optimizasyon işlemleri, istatistiksel analizler ve RSM grafiklerinin oluşturulması istenen optimum koşula dayalı istatistiksel yazılım (Design Expert 10.0.1.0, deneme sürümü, StatEase, Inc., ABD) tarafından belirlenmiştir. Oluşturulan modellerin analizler sonucu elde edilen verileri ne derecede karşıladığını tespit etmek için, varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. Önerilen modele ait regresyon katsayısı ( $R^2$ ), uyarlanan regresyon katsayısı (Adjusted  $R^2$ ) değerleri hesaplanmıştır. Önerilen modele ait  $P < 0.05$  ve model uyumsuzluğu (Lack of fit)  $P > 0.05$  olduğu durumlarda model yeterli bulunmuştur.

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1.Kırma Hızlarının Belirlenmesi

İlk olarak, zeytinyağı üretiminde kırma hızı (1000, 1500, 2000 rpm) ve malaksiyon sıcaklığı (12, 24, 36 °C) parametrelerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

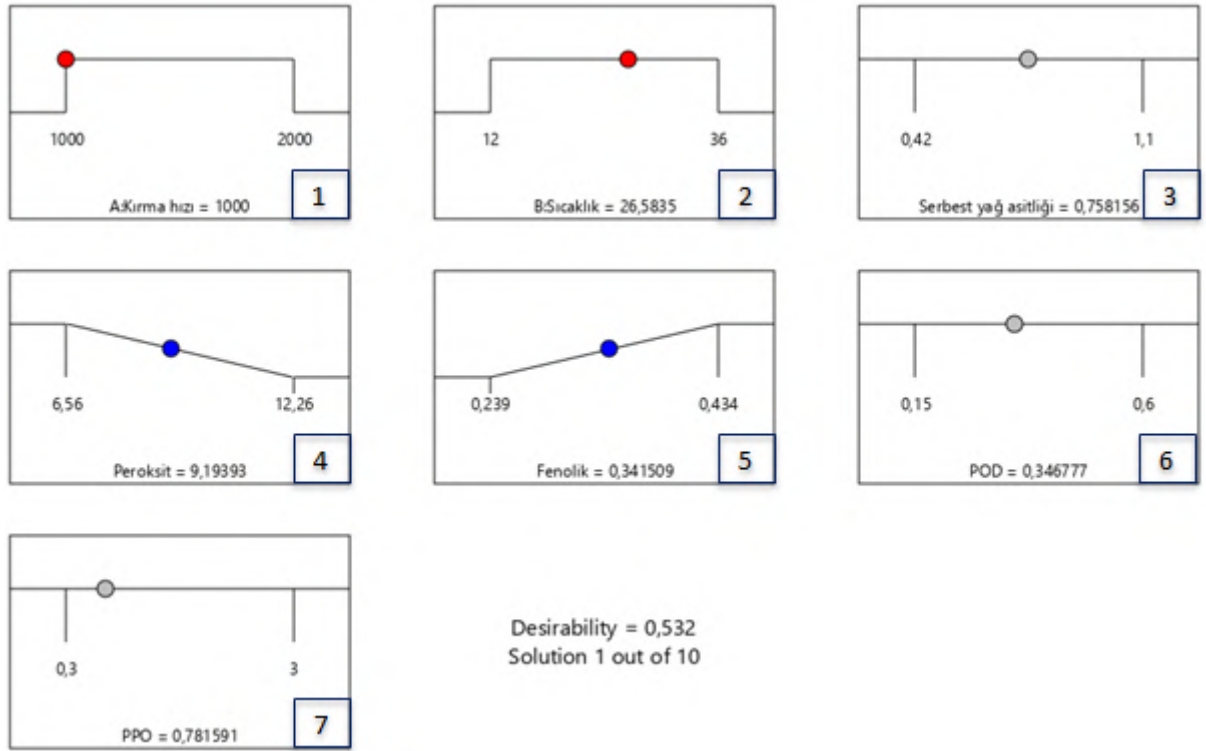
Kırma hızı ve sıcaklık parametrelerinin optimum düzeylerini belirlemek üzere RSM kullanılarak bir deneme deseni oluşturulmuştur. Zeytinyağlarında serbest yağ asitliği (% oleik asit), peroksit değeri (meq O<sub>2</sub>/kg yağ) ve toplam fenolik madde (mg GEA/kg) analizi, zeytin hamurlarında ise PPO (U/mg) ve POD (U/mg) enzim aktivite analizleri yapıldıktan sonra optimizasyon gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.1’de elde edilen zeytinyağları ve hamurlarında yapılan analiz sonuçları verilmiştir. Elde edilen verilere göre peroksit değeri ve toplam fenolik madde açısından modelleme sonucunda en uygun kırma hızı 1000 rpm ve sıcaklık 26.6 °C olarak belirlenmiştir. Çizelge 4.2’de ise RSM’de tespit edilen kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığının cevap olarak gösterimi verilmiştir.

Çizelge 4.1. Zeytinyağı ve hamurlarında yapılan analiz sonuçlarının RSM’de gösterimi

Desen	A:Kırma hızı (rpm)	B:Sıcaklık (°C)	Cevap değerleri				
			Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	Peroksit değeri (meq O <sub>2</sub> /kg)	Toplam fenolik madde (mg GEA/gr)	POD enzim aktivitesi (U/mg)	PPO enzim aktivitesi (U/mg)
1	1500	12	1.04	10.37	0.320	0.60	3.0
2	1000	24	0.85	10.71	0.313	0.30	0.9
3	1000	24	0.62	9.95	0.330	0.60	1.2
4	1000	36	1.00	6.56	0.255	0.21	0.3
5	1000	12	1.05	9.93	0.361	0.30	0.6
6	2000	24	1.10	12.07	0.434	0.21	0.6
7	2000	12	0.73	10.32	0.421	0.30	0.9
8	1500	36	1.06	9.93	0.239	0.24	0.3
9	2000	36	0.67	10.69	0.269	0.15	0.6
10	1000	12	0.42	12.26	0.367	0.18	0.6
11	1500	24	0.50	11.95	0.332	0.30	0.9
12	1500	24	0.67	10.36	0.358	0.30	0.6
13	2000	12	0.62	9.16	0.452	0.21	1.2

**Çizelge 4.2.** RSM’de belirlenen kırma hızı ve yoğurma sıcaklığının cevap olarak gösterimi

Desen	Kırma hızı (rpm)	Sıcaklık (°C)	Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	Peroksit değeri (meq O <sub>2</sub> /kg)	Toplam fenolik madde (mg GEA/gr)	POD enzim aktivitesi (U/mg)	PPO enzim aktivitesi (U/mg)	Desirability	
1	1000.000	26.583	0.758	9.194	0.342	0.347	0.782	0.532	Selected
2	1000.001	26.571	0.758	9.197	0.342	0.347	0.782	0.532	
3	1000.001	26.855	0.764	9.138	0.340	0.345	0.769	0.532	
4	1000.002	27.128	0.770	9.081	0.338	0.343	0.757	0.531	
5	1000.001	25.921	0.744	9.331	0.346	0.351	0.812	0.531	
6	2000.000	12.146	0.927	10.615	0.413	0.333	1.443	0.508	
7	1999.998	12.059	0.927	10.611	0.413	0.334	1.447	0.508	
8	1999.999	12.292	0.926	10.622	0.414	0.332	1.437	0.508	
9	2000.000	12.423	0.925	10.628	0.415	0.331	1.431	0.508	
10	2000.000	16.800	0.900	10.831	0.427	0.302	1.230	0.492	



**Şekil 4.1.** RSM sonucunda kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından elde edilen cevap

Şekil 4.1’de RSM sonucunda kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından elde edilen cevaplar verilmiştir. Şekil 4.1-1 ve Şekil 4.1-2’de kırmızı ile gösterilen veriler RSM’deki faktörlerdir. Şekil 4.1-3, Şekil 4.1-6 ve Şekil 4.1-7’de düz çizgi (gri renkli) şeklinde gösterilen tablolar yapılan analizlerin kırma hızı ve malaksiyon sıcaklığı açısından bir etki göstermediğini belirtmektedir. Şekil 4.1-4 ve Şekil 4.1-5’te eğimli (mavi renkli) olarak gösterilen tablolar ise bu verilere göre modelleme yapılabildiğini göstermektedir.

## 4.2. İnhibitör Miktarının Tespiti

Zeytinyağı üretiminde malaksiyon sırasında kullanılan katkı madde (OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub>) ve oranlarının (%0.5, 1, 2, 3, 4, 5) optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

OA, AA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> katkı maddeleri zeytin hamuruna %0.5, 1, 2, 3, 4, 5 oranlarında eklendiğinde OA ve L-sis zeytin hamuruna gözle görülür derecede renk verirken diğer katkı maddelerin eklenmesiyle fark edilir bir renk değişimi olmamıştır. Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te farklı oranlarda katkı maddesi ilavesi sonucunda zeytin hamurunda meydana gelen renk değişimleri gösterilmiştir.

Zeytinler kırılıp malakse edildikten sonra hamurda PPO ve POD enzim analizleri yapılmış ve enzimlerin düşük aktivite gösterdikleri oranlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

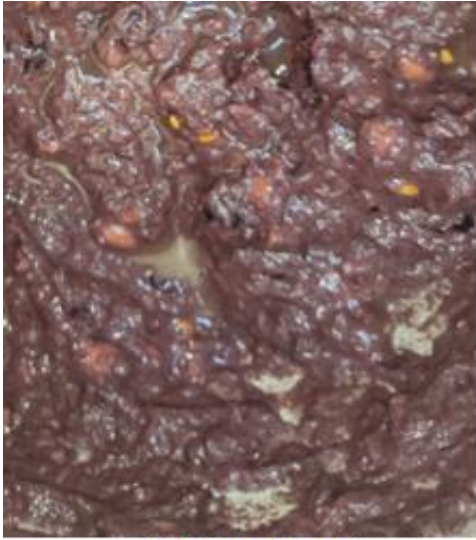
Tespit edilen bu optimum ekstraksiyon koşullarına göre zeytinyağı ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. 1000 rpm ve 26.6 °C'de ekstrakte edilen zeytinyağlarına malaksiyon aşamasında OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkı maddeleri ilave edilmiştir. İnhibitörler konsantrasyonları Çizelge 4.3'te belirtilen oranlarda ilave edilerek hamur yoğurma makinesinde 30 dk yoğurulmuştur. Malaksiyon sonrasında enzim analizlerinde kullanılmak üzere bir miktar zeytin hamuru ayrılmış ve analize kadar -18 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kullanılan inhibitör oranı %2'dir. Bu inhibitör etkili maddeler tek tek ve kombinasyon halinde malaksiyon aşamasında ilave edilmiştir. İnhibitörler kombinasyon halinde kullanıldıklarında ise inhibitör miktarları toplamı %2 olacak şekilde ayarlanmıştır (Çizelge 4.4).



% 0.5 Oksalik asit



% 1 Oksalik asit



% 2 Oksalik asit



% 3 Oksalik asit



% 4 Oksalik asit



% 5 Oksalik asit

Şekil 4.2. Farklı oranlarda OA ilave edilen zeytin hamuru



% 0.5 L-sistein



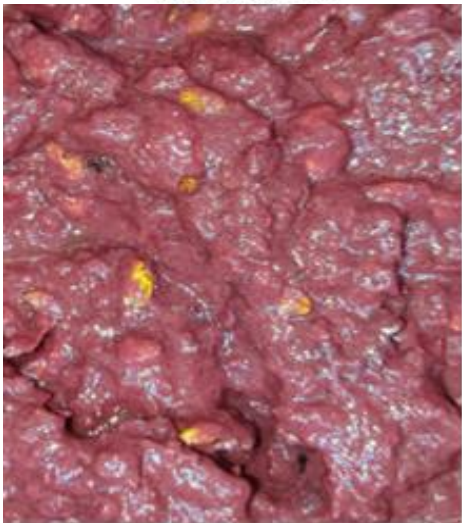
% 1 L-sistein



% 2 L-sistein



% 3 L-sistein

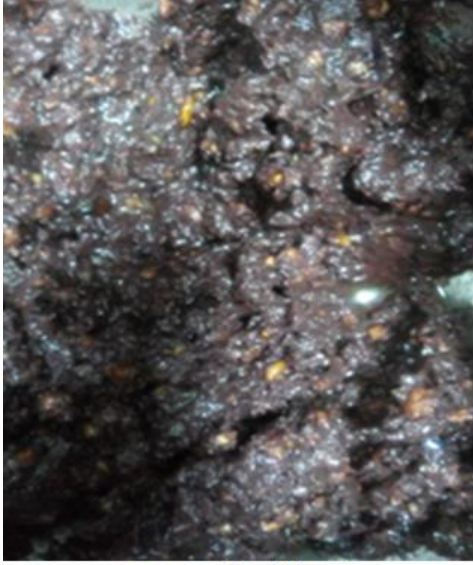


% 4 L-sistein

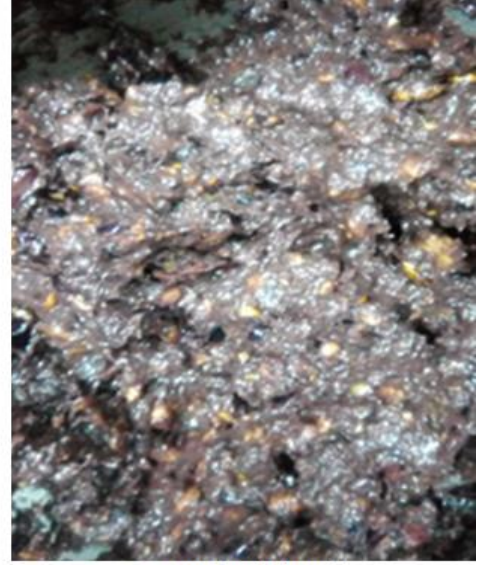


% 5 L-sistein

Şekil 4.3. Farklı oranlarda L-sistein ilave edilen zeytin hamuru



% 0.5 Askorbik asit



% 1 Askorbik asit



% 2 Askorbik asit



% 3 Askorbik asit

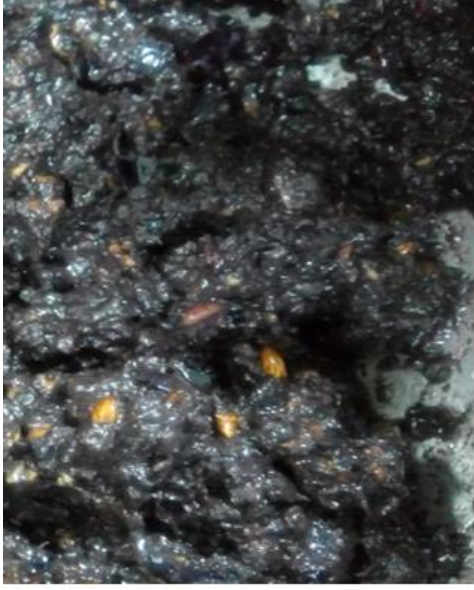


% 4 Askorbik asit



% 5 Askorbik asit

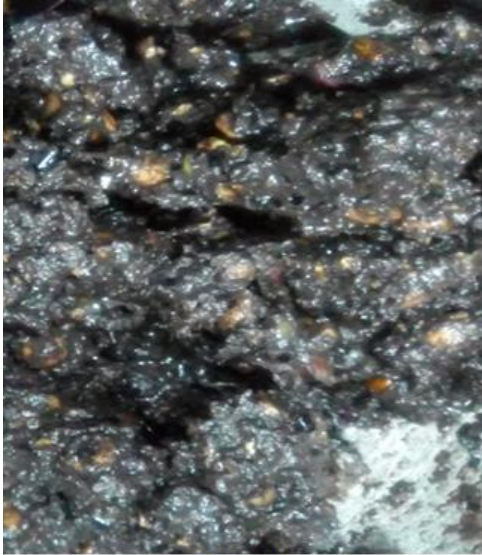
Şekil 4.4. Farklı oranlarda AA ilave edilen zeytin hamuru



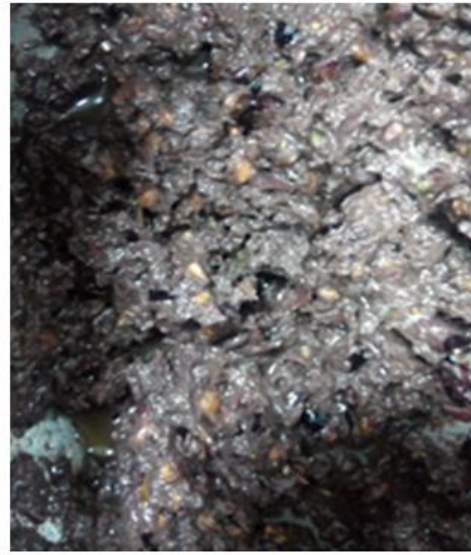
% 0.5 MgCl<sub>2</sub>



% 1 MgCl<sub>2</sub>



% 2 MgCl<sub>2</sub>



% 3 MgCl<sub>2</sub>



% 4 MgCl<sub>2</sub>



% 5 MgCl<sub>2</sub>

Şekil 4.5. Farklı oranlarda MgCl<sub>2</sub> ilave edilen zeytin hamuru

Çizelge 4.3. Zeytin hamurlarındaki PPO ve POD enzim aktivite analizi sonuçları

İnhibitörler	İnhibitör oranları (%)	PPO enzim aktivitesi (U/mg)	POD enzim aktivitesi (U/mg)
Oksalik asit	0.5	0.90	0.43
	<b>1</b>	<b>0.10</b>	0.63
	2	0.20	0.63
	<b>3</b>	0.20	<b>0.31</b>
	4	0.20	0.69
L-sistein	5	<b>0.10</b>	0.81
	0.5	0.10	0.63
	1	0.40	0.71
	<b>2</b>	<b>0.07</b>	<b>0.51</b>
	3	0.08	0.69
Askorbik asit	4	0.40	0.70
	5	0.50	0.63
	0.5	0.60	2.04
	<b>1</b>	0.80	<b>0.35</b>
	2	0.60	0.52
MgCl <sub>2</sub>	<b>3</b>	<b>0.20</b>	0.52
	4	0.42	0.68
	5	0.70	0.54
	0.5	1.00	0.41
	<b>1</b>	<b>0.80</b>	<b>0.26</b>
	2	5.00	0.54
	<b>3</b>	0.90	<b>0.29</b>
	4	0.90	0.42
	5	0.90	0.42

Çizelge 4.3'deki verilerden yola çıkarak zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılan katkı madde miktarları belirlenmiştir. Kullanılan katkı oranı %0 – 2 aralığında RSM'de belirlenerek Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi tespit edilmiştir.

RSM programında deneysel tasarım olarak Simplex Lattice seçilmiştir. Değişkenler, OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub>'dir. Düşük değer "0" yüksek değer "2" olarak verilmiştir. Belirlenen kırma hızı ve sıcaklık değerlerine göre zeytinyağı üretiminden önce deneme deseni oluşturulmuştur. Design-Expert 10.0.1.0 yazılımı kullanılarak hazırlanan deneme desenindeki katkı maddeler zeytin hamuruna eklenerek üretim gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 4.4.** RSM’de belirlenen ve kullanılan katkıların miktarları (%)

Desen no	Oksalik asit	L-sistein	Askorbik asit	MgCl <sub>2</sub>
1	1.25	0.25	0.25	0.25
2	1	1	0	0
3	0	0	0	2
4	0	2	0	0
5	1	0	0	1
6	0.25	0.25	1.25	0.25
7	0	0	2	0
8	0.25	1.25	0.25	0.25
9	2	0	0	0
10	0	0	2	0
11	0.25	0.25	0.25	1.25
12	2	0	0	0
13	0	1	0	1
14	0	0	1	1
15	0	0	0	2
16	0.5	0.5	0.5	0.5
17	0	1	1	0
18	1	0	1	0
19	0	2	0	0
20	1	1	0	0

### 4.3. Enzim İnhibitörlerinin Zeytinyağının Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Etkileri

Zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında PPO ve POD enzimlerinin inhibisyonunda kullanılan katkı maddeler ile RSM’de 20 örnek belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında her bir formülasyon için analiz edilen tüm parametrelerin sonuçları Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6’da sunulmuştur.

İnhibitör madde ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarının  $\beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC...$  şeklinde bir eşitliği bulunmaktadır.

Bu eşitlikte;

A: Oksalik asit (OA), B: L-sistein (L-sis), C: Askorbik asit (AA), D: MgCl<sub>2</sub>’dir.

**Çizelge 4.5.** Karışım desenine göre katkı maddesi ilavesiyle üretilen zeytinyağlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri

Formülasyonlar	Analiz edilen parametreler													
	Verim (%)	Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	Toplam klorofil (mg/kg)	Toplam karotenoid (mg/kg)	Peroksit değeri (meq O <sub>2</sub> /kg yağ)	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	Oksidatif stabilite (saat)	L*	a*	b*	Toplam fenolik madde (mg GAE/kg)	DPPH (% inhibisyon)	β-karoten ağartma (% inhibisyon)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	17.76*	0.73	7.71	4.20	3.12	1.37	0.017	10.95	61.97	-7.97	41.82	1332.93	43.48	9.85
%1 OA + %1 L-sis	19.46	0.85	14.48	6.22	3.64	1.85	0.022	7.28	65.49	-7.44	36.25	803.47	27.11	8.92
%2 MgCl <sub>2</sub>	18.15	0.79	10.13	5.94	6.47	2.19	0.019	3.10	64.41	-6.55	26.31	535.51	24.04	11.47
%2 L-sis	17.37	0.79	11.06	5.39	4.36	2.05	0.024	5.88	66.01	-6.27	35.89	1903.55	84.93	9.22
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	19.12	0.83	14.10	6.54	4.88	1.28	0.016	11.12	70.26	-8.50	36.25	1701.78	32.74	10.23
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	20.07	0.83	14.64	6.53	5.05	1.85	0.022	10.02	67.80	-7.13	32.32	1778.45	36.59	14.58
%2 AA	17.17	0.86	11.44	5.87	4.05	1.47	0.026	13.83	65.06	-6.51	24.42	1042.37	38.00	13.69
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	20.05	0.72	6.76	4.73	6.56	1.95	0.023	5.48	66.71	-6.84	32.14	748.59	29.93	12.18
%2 OA	19.77	0.89	12.66	5.69	4.83	1.61	0.020	12.08	64.41	-7.34	34.70	1877.72	65.15	9.39
%2 AA	16.13	0.88	10.16	5.94	3.91	1.51	0.026	13.55	66.43	-6.27	25.91	1072.24	39.33	13.59
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	19.66	0.64	11.00	6.49	3.04	1.60	0.019	4.16	67.18	-6.46	28.32	1320.82	35.26	8.41
%2 OA	20.13	0.91	14.26	6.37	4.37	1.65	0.020	13.23	66.28	-7.36	35.50	1809.93	61.89	9.19
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	17.46	0.59	13.66	6.95	4.45	1.80	0.022	3.20	64.81	-6.71	33.20	759.89	33.30	10.62
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	18.95	0.79	9.26	5.85	3.55	1.60	0.021	9.73	59.77	-6.75	38.61	1918.89	90.19	11.95
%2 MgCl <sub>2</sub>	17.49	0.77	9.78	5.63	6.85	2.15	0.020	2.78	62.52	-7.55	24.65	537.13	25.33	11.69
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	21.07	0.56	9.75	5.92	4.49	1.76	0.021	6.82	68.72	-7.84	34.68	1215.90	35.15	7.70
%1 L-sis + %1 AA	21.94	0.79	14.53	6.56	3.61	1.98	0.024	6.53	67.15	-7.97	39.07	901.13	30.93	11.64
%1 OA + %1 AA	16.74	0.80	10.30	3.96	3.40	1.73	0.020	12.82	64.31	-7.99	39.85	1886.60	64.30	11.16
%2 L-sis	17.28	0.76	10.05	5.55	4.49	2.04	0.024	4.86	64.09	-6.19	36.43	1894.67	80.48	8.31
%1 OA + %1 L-sis	20.59	0.88	14.91	6.34	3.90	1.86	0.022	8.22	66.76	-7.05	31.48	801.86	29.78	8.98

İnhibitörlerin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA şeklindedir.

\*Değerler ortalama olarak verildi.

**Çizelge 4.6.** Karışım desenine göre katkı maddesi ilavesiyle üretilen zeytin hamurlarının fiziksel ve kimyasal özellikleri

Formülasyonlar	Analiz Edilen Parametreler						
	Nem içeriği (%)	Toplam fenolik madde (mg GAE/kg)	DPPH (% inhibisyon)	$\beta$ -karoten ağartma (% inbisyon)	POD enzim aktivite değişimi (U/g)	PPO enzim aktivite değişimi (U/g)	$\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi (U/g)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	43.51*	1153.75	72.85	33.14	24.36	46.92	205.22
%1 OA + %1 L-sis	40.46	1286.12	68.70	32.94	5.26	47.69	189.11
%2 MgCl <sub>2</sub>	50.11	975.38	58.41	41.74	70.51	76.92	154.00
%2 L-sis	39.47	1424.13	78.00	38.38	7.69	53.85	181.00
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	42.04	788.14	34.33	37.02	19.23	38.46	203.56
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	42.73	1545.20	75.59	37.59	12.82	39.23	200.11
%2 AA	44.52	2039.95	83.63	42.61	33.33	36.15	165.00
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	45.49	1633.98	76.63	41.77	7.69	61.54	218.11
%2 OA	40.14	1380.55	63.30	37.20	19.23	33.08	210.22
%2 AA	44.21	2064.16	80.15	42.48	32.05	33.85	166.67
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	44.36	1168.28	70.37	44.15	15.38	46.15	214.00
%2 OA	41.37	1341.81	68.22	38.18	17.95	37.69	210.33
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	51.87	1224.78	64.85	41.10	20.51	38.46	201.78
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	39.40	1423.33	57.78	42.55	14.10	46.15	190.56
%2 MgCl <sub>2</sub>	50.06	976.19	60.85	40.52	69.23	77.69	154.33
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	44.66	1671.11	71.19	36.87	11.54	38.46	184.00
%1 L-sis + %1 AA	44.82	1914.04	78.81	39.84	8.97	53.85	173.44
%1 OA + %1 AA	41.71	1911.62	76.37	35.51	19.23	46.15	171.22
%2 L-sis	41.23	1494.35	80.04	39.33	7.82	54.62	177.00
%1 OA + %1 L-sis	41.83	1244.15	70.22	30.58	5.90	46.15	192.33

İnhibitörlerin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA şeklindedir.

\*Değerler ortalama olarak verildi.

Analiz edilen modeller kuadratik, özel kübik ve doğrusal olarak modellenirken modellenemeyen analizler de bulunmaktadır. Analiz edilen parametreler, uygun olarak seçilen modeller, istatistiksel açıdan önemli P-değeri, istatistiksel açıdan önemsiz uyum eksikliği (*lack of fit*), regresyon eşitliğinin deneysel verilere uyumluluk düzeyini gösteren regresyon katsayıları ( $R^2$ ) ve düzeltilmiş regresyon katsayıları Çizelge 4.7’de ve bu modellerin regresyon eşitliğine ait katsayıları Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9’da verilmiştir.

**Çizelge 4.7.** Karışım deseni ile analiz edilen cevaplar için seçilen modeller ve istatistiksel analiz sonuçları

Analiz edilen parametreler	Uygun model	P-değeri	Uyum eksikliği	$R^2$	Uyarlanan $R^2$
Verim	Kuadratik	0.0004	0.1058	0.8144	0.7288
Serbest yağ asitliği	Özel kübik	<0.0001	0.0445	0.9221	0.8862
Toplam klorofil	Özel kübik	<0.0042	0.1135	0.9585	0.8686
Toplam karotenoid	Özel kübik	0.0036	0.1220	0.9399	0.8369
Peroksit değeri	Özel kübik	<0.0001	0.5316	0.9890	0.9651
$K_{232}$	Kuadratik	0.0002	0.3012	0.8975	0.8230
$K_{270}$	Kuadratik	<0.0001	0.0265	0.9573	0.9376
Oksidatif stabilite	Özel kübik	<0.0001	0.9332	0.9936	0.9799
$L^*$		Hiçbir modelle ifade edilemedi			
$a^*$	Kuadratik	0.0013	0.3632	0.7748	0.6709
$b^*$	Özel kübik	0.0001	0.2242	0.9022	0.8312
Zeytinyağında toplam fenolik madde	Özel kübik	<0.0001	0.2486	0.9992	0.9976
Zeytinyağında DPPH	Özel kübik	<0.0001	0.0152	0.9912	0.9720
Zeytinyağında $\beta$ -karoten ağartma	Doğrusal	0.0014	0.0010	0.6124	0.5397
Nem içeriği	Kuadratik	<0.0001	0.1834	0.9534	0.9115
Zeytin hamurunda toplam fenolik madde	Doğrusal	<0.0001	0.0004	0.8367	0.8061
Zeytin hamurunda DPPH	Özel kübik	<0.0001	0.1169	0.9513	0.9159
Zeytin hamurunda $\beta$ -karoten ağartma	Özel kübik	<0.0001	0.1615	0.9371	0.8805
POD enzim aktivite değişimi	Özel kübik	<0.0001	0.8738	0.9996	0.9988
PPO enzim aktivite değişimi	Kuadratik	0.0002	0.0015	0.7898	0.7147
$\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi	Kuadratik	0.0029	<0.0001	0.6922	0.5823
$\alpha$ - tokoferol	Özel kübik	0.0017	0.0781	0.8066	0.6937
$\beta$ - tokoferol	Özel kübik	0.0033	0.6668	0.7365	0.6149
$\gamma$ - tokoferol	Özel kübik	0.0017	0.7541	0.8768	0.7660
$\delta$ - tokoferol		Hiçbir modelle ifade edilemedi			

<b>Toplam tokoferol</b>	Özel kübik	0.0003	0.1850	0.9366	0.8663
<b><math>\alpha</math>- tokotrienol</b>	Kuadratik	0.0047	0.0009	0.6111	0.5074
<b><math>\beta</math>- tokotrienol</b>	Özel kübik	<0.0001	0.0017	0.9558	0.9068
<b><math>\gamma</math>- tokotrienol</b>	Özel kübik	0.0001	0.7638	0.9030	0.8324
<b><math>\delta</math>- t tokotrienol</b>	Kuadratik	0.0348	0.0003	0.5424	0.3790
<b>Hidroksitirozol ((3,4-DHPEA) zeytinyağı)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.3090	0.9212	0.8638
<b>Tirozol ((p-HPEA) zeytinyağı)</b>	Kuadratik	<0.0001	0.0896	0.9084	0.8662
<b>Kafeik asit (zeytinyağı)</b>	Kuadratik	0.0030	0.0054	0.7410	0.6214
<b>Homovanillik asit (zeytinyağı)</b>	Özel kübik	0.0002	0.0608	0.8338	0.7570
<b>Vanillin (zeytinyağı)</b>	Özel kübik	0.0004	0.6889	0.8795	0.7919
<b>3,4-DHPEA-AC (zeytinyağı)</b>	Doğrusal	0.0689	0.0014	0.3511	0.2282
<b>Oleacein (3,4-DHPEA-EDA) zeytinyağı)</b>	Özel kübik	0.0016	0.0429	0.9706	0.9069
<b>Oleokantal ((p-HPEA-EDA) zeytinyağı)</b>	Özel kübik	0.0187	0.1715	0.5870	0.4395
<b>Ligstrosit aglikon ((p-HPEA-EA) zeytinyağı)</b>	Kuadratik	0.0341	0.0021	0.4801	0.3415
<b>Oleuropein aglikon ((3,4-DHPEA-EA) zeytinyağı)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.7893	0.9946	0.9830
<b>Apigenin (zeytinyağı)</b>	Doğrusal	0.0033	0.2728	0.5655	0.4841
<b>Luteolin (zeytinyağı)</b>	Kuadratik	0.0002	0.0035	0.9189	0.8477
<b>Hidroksitirozol ((3,4-DHPEA) zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.3075	0.9882	0.9751
<b>Tirozol ((p-HPEA) zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.5971	0.9973	0.9936
<b>Vanillik asit (zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.0892	0.9855	0.9656
<b>Vanillin (zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.0890	0.9939	0.9806
<b>Verbaskozit (zeytin hamuru)</b>	Kuadratik	0.0175	0.0033	0.6995	0.5242
<b>Rutin (zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	0.0001	0.0631	0.9942	0.9877
<b>Oleuropein (zeytin hamuru)</b>	Özel kübik	<0.0001	0.0638	0.9784	0.9586
<b>Luteolin (zeytin hamuru)</b>	Kuadratik	0.0053	0.0001	0.6625	0.5420
<b>Apigennin (zeytin hamuru)</b>	Kuadratik	0.0012	0.0510	0.6795	0.5941

**Çizelge 4.8.** Zeytinyağlarının istatistiksel açıdan herhangi bir modelle ifade edilen parametrelerin model katsayıları

Analiz edilen parametreler	A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD
Verim (%)	19.45	17.36	16.36	17.99	6.08*			21.82**		9.07*				
Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	0.9059	0.7896	0.8636	0.7692		-0.3235*			-0.7082**			-10.27**		
Toplam klorofil (mg/kg)	13.43	10.52	10.77	9.92	10.63*	-7.69	9.20	15.04**	13.25*	-4.84	-279.07*	-811.71**	472.49**	322.57*
Toplam karotenoid (mg/kg)	6.02	5.46	5.88	5.76	2.07	-8.18**	2.38	3.34*	5.14**		-97.67*	-193.99**	132.11**	121.55*
Peroksit değeri (meq O <sub>2</sub> /kg yağ)	4.60	4.43	3.98	6.66	-2.96**	-3.52**	-2.96*	-2.33*	-4.33**	-7.04**	286.89**	-130.39**	-268.99**	183.97**
K <sub>232</sub>	1.61	2.05	1.33	2.16		1.09	-2.63**	1.44*	-1.20*	-0.4088				
K <sub>270</sub>	0.0198	0.0240	0.0258	0.0196		-0.0127**	-0.0161**			-0.0066*				
Oksidatif stabilite (saat)	12.65	5.37	13.69	2.94	-5.05*	-1.42	13.28**	-12.01**	-3.83	5.65	188.39*	-56.73*	-112.98	
L*														
a*	-7.54	-6.32	-6.36	-6.89		-3.84*	-4.22*	-5.82**						
b*	34.90	35.98	24.93	25.63		43.87**	26.93*	34.50**		51.93**				-493.49**
Toplam fenolik madde (mg GAE/kg)	1844.49	1899.78	1057.97	536.99	-	4272.55**	1752.13**	2084.82**	-	-	4496.30**	17614.77**	49085.97**	37857.35**
DPPH (% inhibisyon)	63.36	82.55	38.51	24.53	-179.30**	50.93*	-47.35*	-120.92**	-83.48*	232.16**	-442.28	768.92	72.97	-1225.43*
β-karoten ağartma (% inhibisyon)	8.99	9.19	13.84	10.86										

\* P<0.05, \*\* P<0.01

**Çizelge 4.9.** Zeytin hamurlarının istatistiksel açıdan herhangi bir modelle ifade edilen parametrelerin model katsayıları

Analiz edilen parametreler	A	B	C	D	AB	AC	AD	BC	BD	CD	ABC	ABD	ACD	BCD
Nem içeriği (%)	40.87	40.34	44.26	49.82	3.90	-0.6964	-11.92*	11.81*	27.77**	-31.03**				
Toplam fenolik madde (mg GAE/kg)	1257.87	1496.33	2085.32	904.46										
DPPH (% inhibisyon)	65.97	77.30	82.53	58.99			-109.33**			-50.69**	-795.21*	917.94*	855.36*	
β-karoten ağartma (% inhibisyon)	37.23	39.00	42.60	41.18	-25.07**	-16.93*					-381.18*	414.22*	416.49*	439.59*
POD enzim aktivite değişimi (U/g)	18.58	7.78	32.68	69.86	-30.39**	-25.86**	-100.22**	-45.03**	-73.23**	-148.94**	1564.93**	33.57**		-1539.04**
PPO enzim aktivite değişimi (U/g)	38.94	58.55	36.51	73.67			-65.97*		-98.35**					
β-glukozidaz enzim aktivite değişimi (U/g)	433.99	257.92	159.76	133.79					987.12**	867.82*				

\* P<0.05, \*\* P<0.01

#### 4.4. Zeytinyağı ve Zeytin Hamuru Örneklerinde Yapılan Analizler

##### 4.4.1. Verim ve serbest yağ asiti

Zeytin hamuruna katkı maddeler ilave edildikten sonra elde edilen zeytinyağlarının verimleri Çizelge 4.10'da sunulmuştur. İnhibitör çeşiti ve miktarının verim üzerinde önemli bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. Zeytinyağları verim açısından değerlendirildiğinde kontrol örneğinden sonra en düşük yağ verimi %1 OA + %1 AA kullanılan örnekte görülmüştür. En yüksek yağ verimi ise sırasıyla %1 L-sis + %1 AA (%21.94), %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> (%21.07), %1 OA + %1 L-sis (%20.59), %2 OA (%20.13), %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> (%20.07) ve %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> (%20.05) kullanılan örneklerde belirlenmiştir. Verim %14.55-21.94 arasında değişirken, en yüksek yağ verimi %1 oranında L-sis ve %1 oranında AA içeren örnekte bulunmuştur. Zeytinyağı ekstraksiyonunda L-sis (%2) ve AA (%2) tek başına kullanıldığında ortak kullanımlarına (%1 L-sis + %1 AA) kıyasla yağ verimlerinin düşük olduğu görülmüştür. OA (%2) ve AA (%2) tek başına kullanıldığında ise ortak kullanımlarına (%1 OA + %1 AA) kıyasla yağ verimlerinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine de bu ortak kullanımlar kontrole göre yüksek bulunmuştur. MgCl<sub>2</sub> (%2) tek başına kullanıldığında ortak kullanımlarına göre yakın değerler bulunmuştur.

Çizelge 4.10'da zeytinyağlarının serbest asitlik değerleri yer almaktadır. Kontrol örneğinin serbest asitlik değeri %0.70 bulunurken, katkı madde ilaveli zeytin hamurlarından elde edilen zeytinyağlarının asitlik değerleri %0.56-0.91 arasında değişim göstermiştir. İnhibitör çeşiti ve miktarı zeytinyağlarının serbest asitlik sonuçları üzerine etkili bulunmuştur. Kontrole kıyasla %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> ve %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> örneklerin serbest yağ asiti değerlerinde azalma olurken diğer örneklerde önemli ölçüde artış görülmüştür. Serbest yağ asitliğindeki artış zeytinyağında hidrolizden kaynaklanır. Yağların serbest yağ asitliğindeki azalma, katkı maddesi olarak kullanılan maddelerin lipaz enzimi üzerindeki inhibitör etkisine bağlanabilir. Lipaz aktivitesi, arayüzey bileşiminin bir fonksiyonudur: enzim arayüzeyde aktif hale getirilebilir. Aynı zamanda enzim denatüre veya etkisiz hale getirilebilir ve arayüz, lipolizi modüle etmek için uygun bir bölgedir. Lipaz inhibitörü, enzimle doğrudan etkileşime girerek lipaz etkisini inhibe eder (Bialecka-Florjanczyk ve ark., 2018). İnhibitörler çeşit ve miktara bağlı olarak lipaz enzimini etkilemiş ve yağların asitliklerinde artış veya azalışa sebep olmuştur. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'ne göre (Tebliğ No: 2017/26), ham, naturel sızma ve naturel birinci zeytinyağlarının serbest asitlik değerleri % oleik asit cinsinden sırasıyla >2.0, ≤0.8 ve ≤2.0 olarak belirlenmiştir. İnhibitör ilaveli zeytinyağlarının serbest asitlik değerleri standartlar dahilinde bulunmuştur. Ayrıca, genel

olarak %1 veya %2 oranında katkı maddesi içeren zeytinyağları dışındaki tüm yağların serbest yağ asitliği değerleri  $\leq 0.8$  olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu yağlar naturel sızma zeytinyağı olarak değerlendirilebilmektedir. Çizelge 4.10'a göre, en yüksek asitlik değeri sırasıyla %2 OA (%0.91, %0.89), %1 OA + %1 L-sis (%0.88) ve %2 AA (%0.88) ilave edilen örneklerde tespit edilmiştir. En düşük serbest asitlik değeri ise sırasıyla %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> (%0.56), %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> (%0.59) ve %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> (%0.64) katkı maddeleri ilave edilen örneklere aittir.

**Çizelge 4.10.** Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının verimi ve serbest yağ asitliği üzerine etkisi

Numune no	Verim (%)	Serbest yağ asitliği (% oleik asit)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	17.76 ±0.76*	0.73 ±0.03
%1 OA + %1 L-sis	19.46 ±0.69	0.85 ±0.05
%2 MgCl <sub>2</sub>	18.15 ±0.30	0.79 ±0.01
%2 L-sis	17.37 ±0.62	0.79 ±0.04
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	19.12 ±0.30	0.83 ±0.02
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	20.07 ±0.42	0.83 ±0.04
%2 AA	17.17 ±0.35	0.86 ±0.04
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	20.05 ±0.40	0.72 ±0.07
%2 OA	19.77 ±0.67	0.89 ±0.04
%2 AA	16.13 ±0.48	0.88 ±0.03
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	19.66 ±0.71	0.64 ±0.11
%2 OA	20.13 ±0.31	0.91 ±0.03
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	17.46 ±0.61	0.59 ±0.05
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	18.95 ±0.70	0.79 ±0.03
%2 MgCl <sub>2</sub>	17.49 ±0.76	0.77 ±0.02
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	21.07 ±0.40	0.56 ±0.03
%1 L-sis + %1 AA	21.94 ±0.69	0.79 ±0.10
%1 OA + %1 AA	16.74 ±0.67	0.80 ±0.06
%2 L-sis	17.28 ±0.35	0.76 ±0.01
%1 OA + %1 L-sis	20.59 ±0.74	0.88 ±0.04
<b>K</b>	14.55 ±0.70	0.70 ±0.03

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama ± standart sapma

CCD deseninde toplanan verilere göre elde edilen varyans analiz (ANOVA) sonuçları Çizelge 4.11'de sunulmuştur. İnhibitörlerin verim ve serbest yağ asitliği üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında sırasıyla kuadratik ve özel kübik modelleri belirlenmiştir. Zeytinyağlarının verim ve serbest yağ asitliği değerlerine ait varyans analizinde modellerinin P değerleri sırasıyla 0.0004 ve <0.0001 olarak belirlenmiş olup katkı maddelerinden en az birinin zeytinyağlarının verim ve serbest yağ asitliği üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (P<0.05). İnhibitörlerin interaksyonu incelendiğinde zeytinyağı verimi üzerine OA × L-sis ve AA × MgCl<sub>2</sub>, serbest yağ asitliği üzerine ise OA × AA interaksyonları önemli etkiye sahip olmuştur (P<0.05). L-sis × AA interaksyonu verim; L-sis × MgCl<sub>2</sub> ve OA × L-sis × MgCl<sub>2</sub> interaksyonu ise serbest yağ asitliği üzerine önemli düzeyde etkilidir (P<0.01). Verim için geliştirilen modeller uyumsuzluk testini geçerken (P>0.05), serbest yağ asitliği

için geliştirilen modeller uyumsuzluk testini geçmemiştir ( $P < 0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.1058 ve 0.0445 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun verim için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P > 0.05$ ). Belirleme katsayıları sırasıyla  $R^2$ : 0.8144 ve 0.9221 ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla  $R^2$ : 0.7288 ve 0.8862 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, verim ve serbest yağ asitliğindeki değişkenlik sırasıyla %81.44 ve %92.21'i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan tespit edilen verim ve serbest yağ asitliği değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Varyans analizine göre uygun bulunan bu modeller tahminleme açısından yeterli bulunmuştur (Çizelge 4.11). Verim ve serbest yağ asitliği değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.11'de verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA  $\times$  L-sis, L-sis  $\times$  AA ve AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> etkileşimlerinin pozitif interaksiyon etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının verimini artırdığı belirlenmiştir. Regresyon eşitliğine göre, katkıların hem verim hem de serbest yağ asitliği açısından doğrusal etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.11.** Zeytinyağının verim ve serbest yağ asitliği değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Verim			Serbest yağ asitliği		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	6	9.51	0.0004	6	25.65	<0.0001
A*B	1	4.46	0.0481	-	-	-
A*C	-	-	-	1	5.39	0.0371
B*C	1	39.23	<0.0001	-	-	-
B*D	-	-	-	1	25.09	0.0002
C*D	1	6.70	0.0225	-	-	-
A*B*D	-	-	-	1	36.80	<0.0001
Hata	13	-	-	13	-	-
Model uyumsuzluğu	8	3.24	0.1058	8	5.11	0.0445
Saf hata	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-
	$R^2=0.8144$	Uyarlanan $R^2=0.7288$		$R^2=0.9221$	Uyarlanan $R^2=0.8862$	

Verim =  $19.45 \times A + 17.36 \times B + 16.36 \times C + 17.99 \times D + 6.08 \times (A \times B) + 21.82 \times (B \times C) + 9.07 \times (C \times D)$   
Serbest yağ asitliği =  $0.9059 \times A + 0.7896 \times B + 0.8636 \times C + 0.7692 \times D - 0.3235 \times (A \times C) - 0.7082 \times (B \times D) - 10.27 \times (A \times B \times D)$

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

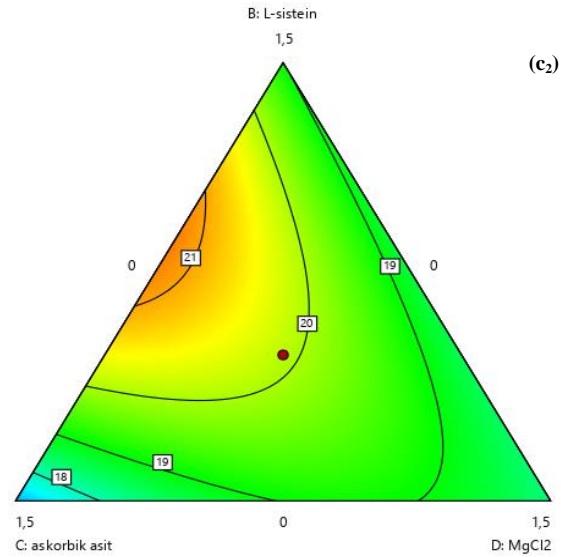
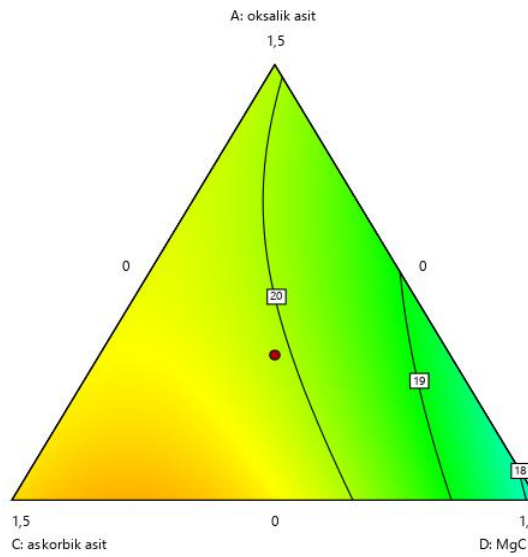
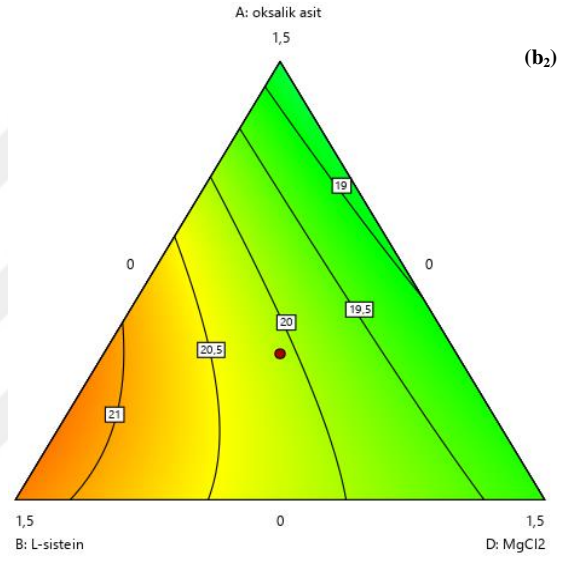
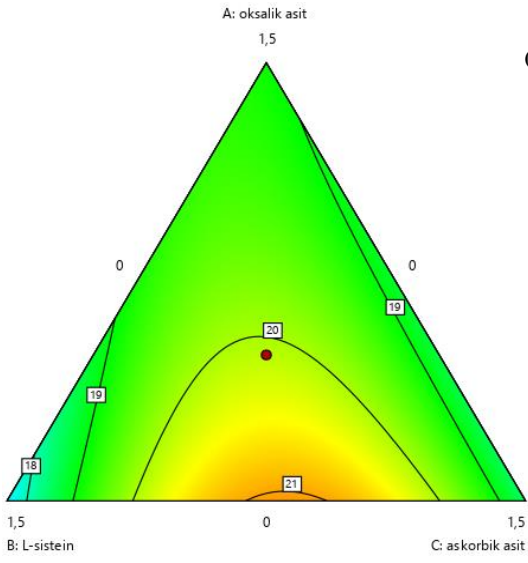
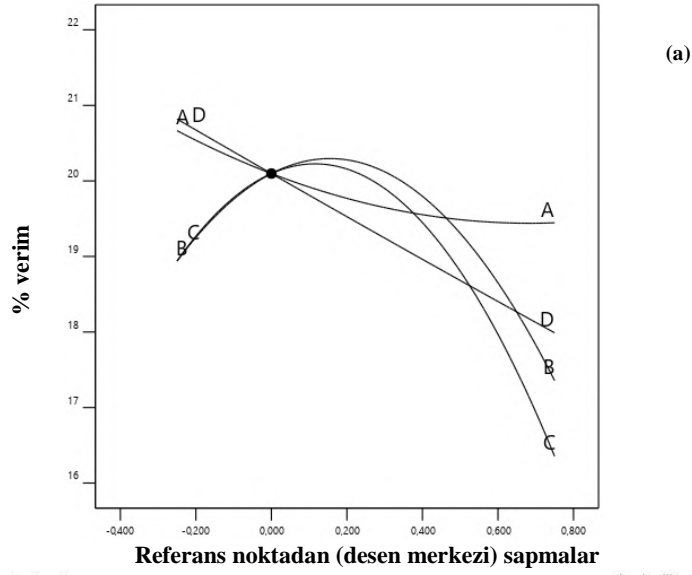
CCD'de katkı maddelerin verim ve serbest yağ asitliği üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı maddesi için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

Orta seviyeye kadar L-sis ve AA kullanımı verimi artırmış daha sonra olumsuz etki göstermiştir (Şekil 4.6a). İnhibitör maddelerle oluşturulan iz eğim incelendiğinde, tüm katkı maddelerinin kullanımındaki artış verim üzerine çoğunlukla negatif etkide bulunmuştur. OA

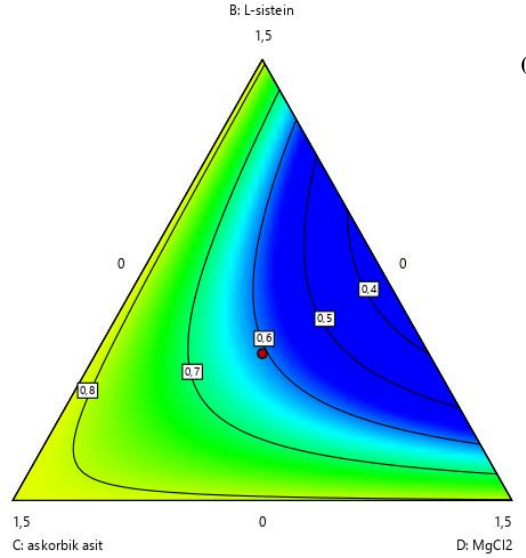
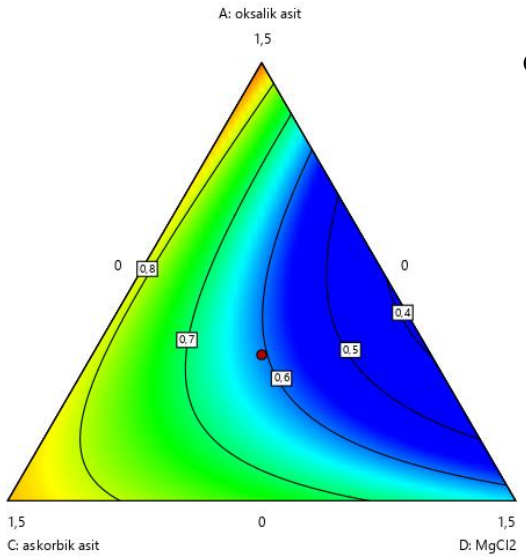
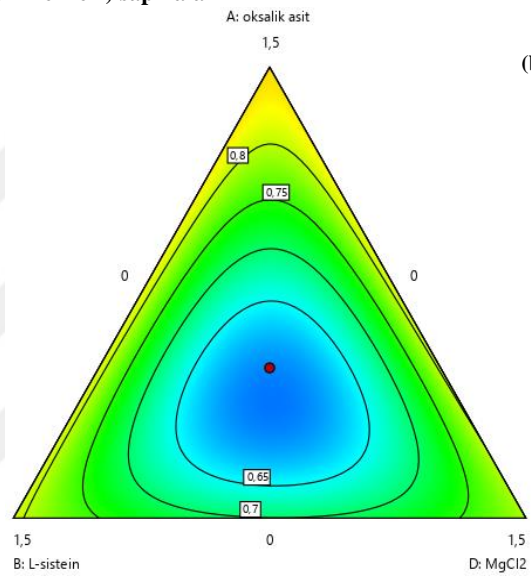
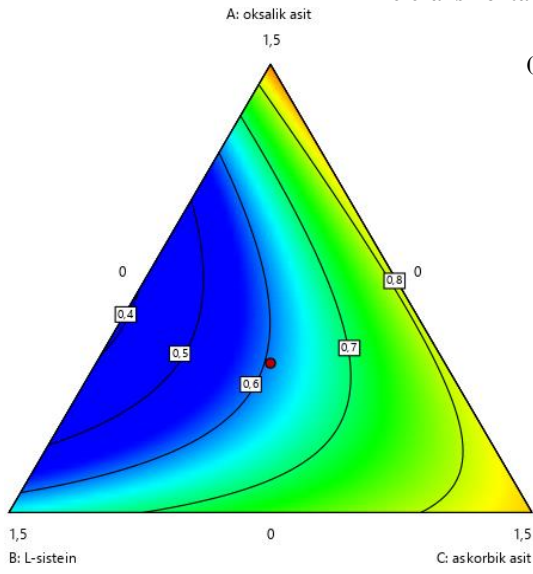
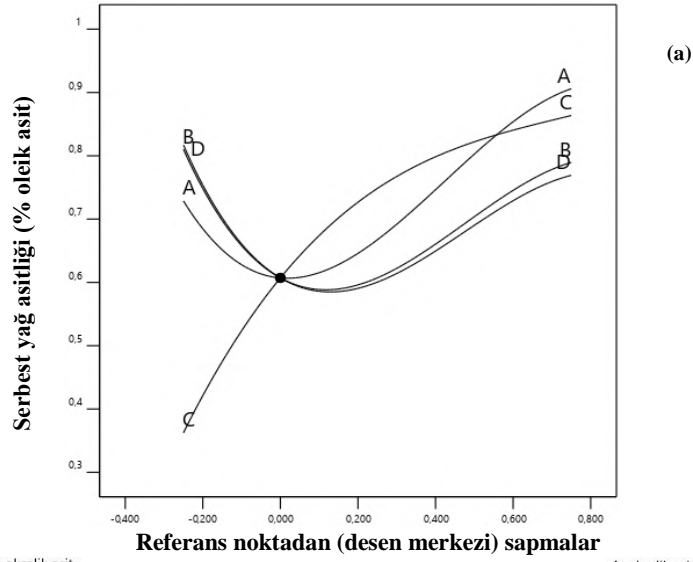
ve  $MgCl_2$  neredeyse doğrusal olarak verimin azalmasına sebep olmuştur. Kontur grafiği, formülasyondaki OA ve  $MgCl_2$  oranlarının artması ile verimin azaldığını göstermiştir (Şekil 4.6.b<sub>2</sub>).

OA ve L-sis katkı maddelerinin kullanımı ile serbest yağ asitliği orta seviyeye kadar azalmış daha sonra serbest yağ asitliğinde artış gözlenmiştir. Sırasıyla, Şekil 4.7c<sub>1</sub> ve Şekil 4.7c<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki OA ve L-sis konsantrasyonunun artırılması zeytinyağında daha yüksek serbest yağ asitliği ile sonuçlanmıştır. AA kullanımının artması ile neredeyse doğrusal olarak serbest yağ asitliği üzerinde olumsuz bir etki yaptığı belirlenmiştir (Şekil 4.7a).





**Şekil 4.6.** Katkı maddelerinin verim üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.7.** Katkı maddelerinin serbest yağ asitliği üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

#### 4.4.2. Toplam klorofil ve karotenoid analizi

Zeytinyağlarında toplam klorofil ve karotenoid pigment içeriklerine ait değerlerin uygulanan katkılara göre değişimi Çizelge 4.12’de verilmiştir. Toplam klorofil miktarı minimum %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> kullanımı ile 6.76 mg/kg, maksimum klorofil miktarı ise %1 OA + %1 L-sis, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 AA, %2 OA ilaveli örneklerde sırasıyla 14.48-14.91, 14.64, 14.53, 14.26 mg/kg olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, tek başına katkı kullanımı kıyaslandığında zeytinyağlarının klorofil içerikleri üzerine en etkili katkı maddesinin MgCl<sub>2</sub> ve AA olduğu görülmüştür. Klorofil, hem yağlarda antioksidan olarak görev yaptığından hem de yağların görünümünde estetik bir görüntü sağladığından dolayı AA kullanımı zeytinyağları üzerine olumlu etki göstermiştir denilebilir. Toplam klorofil miktarı için %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> katkıları uygulanan örnekte kontrol grubuna göre daha fazla düşüş görülmüştür. Zeytinyağlarındaki klorofil içeriği katkı miktarı ve çeşitlerine bağlı olarak çoğunlukla düşüş belirlenmiştir. Kanola alt türlerinin incelendiği bir çalışmada oksalik asit uygulanan bitkinin klorofil içeriğinde de azalma tespit edilmiştir (Li ve ark., 2020).

Zeytin hamuruna katkı maddeleri tek başına uygulandığında elde edilen yağın toplam karotenoid içerikleri düşük çıkmıştır. İnhibitörlerin tekli ve kombinasyon halinde uygulanmasıyla toplam karotenoid miktarlarında düşüş görülmüştür (Çizelge 4.12). En düşük karotenoid miktarı 3.96 mg/kg değeri ile %1 OA + %1 AA örneğinde görülürken, en yüksek karotenoid miktarı 8.43 mg/kg değeri ile kontrol örneğinde görülmektedir. Pigmentlerin meyveden yağa geçişi, tek başına ilave edilen katkı maddeleri ile olumsuz olarak etkilenmiştir. AA karotenoidlerin sentezini bloke etme kabiliyetine sahip olduğundan zeytinyağındaki karotenoid içeriğindeki düşüş buna bağlanabilir (Zhao ve ark., 2022). Ayrıca, zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında kullanılan diğer katkıların da zeytinyağının doğal renk bileşimlerini etkilediği belirlenmiştir.

**Çizelge 4.12.** Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının renk pigmentleri (toplam klorofil ve toplam karotenoid) üzerine etkisi

Numune no	Toplam klorofil (mg/kg)	Toplam karotenoid (mg/kg)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	7.71 ±0.05*	4.20 ±0.02
%1 OA + %1 L-sis	14.48 ±0.54	6.22 ±0.32
%2 MgCl <sub>2</sub>	10.13 ±0.45	5.94 ±0.13
%2 L-sis	11.06 ±0.39	5.39 ±0.08
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	14.10 ±1.20	6.54 ±0.24
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	14.64 ±1.73	6.53 ±0.36
%2 AA	11.44 ±0.29	5.87 ±0.02
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	6.76 ±0.22	4.73 ±0.08
%2 OA	12.66 ±0.24	5.69 ±0.03
%2 AA	10.16 ±1.16	5.94 ±0.57
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	11.00 ±0.28	6.49 ±0.17
%2 OA	14.26 ±1.18	6.37 ±0.25
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	13.66 ±0.97	6.95 ±0.36
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	9.26 ±0.12	5.85 ±0.06
%2 MgCl <sub>2</sub>	9.78 ±0.08	5.63 ±0.06
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	9.75 ±1.44	5.92 ±0.28
%1 L-sis + %1 AA	14.53 ±2.02	6.56 ±0.96
%1 OA + %1 AA	10.30 ±1.27	3.96 ±0.97
%2 L-sis	10.05 ±0.37	5.55 ±0.05
%1 OA + %1 L-sis	14.91 ±0.08	6.34 ±0.09
<b>K</b>	20.94 ±1.25	8.43 ±0.26

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama ± standart sapma

Çizelge 4.13'te toplam klorofil ve karotenoid miktarlarına ait ANOVA sonuçları verilmiştir. İnhibitör maddelerin toplam klorofil ve karotenoid miktarları üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında özel kübik modeli belirlenmiştir. Zeytinyağlarının toplam klorofil ve karotenoid değerlerine ait varyans analiz modellerinin P değerleri sırasıyla <0.0001 ve 0.0001 olarak belirlenmiştir. Bu da, katkı maddelerden en az birinin zeytinyağlarının toplam klorofil ve karotenoid miktarları üzerinde istatistiksel olarak önemli olması ile açıklanabilmektedir (P<0.05). Varyans analiz sonuçlarına göre, OA × L-sis, OA × AA, OA × MgCl<sub>2</sub> ve L-sis × AA × MgCl<sub>2</sub> katkılarının toplam klorofil miktarı (P<0.01) ve toplam karotenoid miktarları üzerine (P<0.05) önemli düzeyde etkili olduğu belirlenmiştir. L-sis × AA, AA × MgCl<sub>2</sub>, OA × L-sis × MgCl<sub>2</sub> ve OA × AA × MgCl<sub>2</sub> katkılarının ise sadece toplam klorofil miktarı üzerine doğusal etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (P<0.05). Toplam klorofil miktarı için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken (P>0.05), toplam karotenoid miktarı için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçememiştir (P<0.01). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.7686 ve 0.0042 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun toplam klorofil miktarı için önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>:0.9911 ve 0.8808 olarak bulunmuş olup elde edilen verilerdeki değişkenliğin sırasıyla %99.11'inin ve %88.08'inin bu model (özel kübik) ile açıklanabileceği gösterilmiştir. Uyarlanan belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.9788 ve 0.8112 olarak bulunmuştur. Bu değerler, öngörülen değerler arasındaki uyumluluk

oranının yüksek olduğunu belirtmektedir. Toplam klorofil ve karotenoid miktarı için oluşturulan regresyon eşitliğide Çizelge 4.13'te verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının pozitif etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, OA × L-sis, OA × AA ve OA × MgCl<sub>2</sub> katkı interaksiyonlarının negatif etkilerinden dolayı bu etkileşimler zeytinyağının toplam klorofil ve karotenoid miktarlarını azaltırken toplam klorofil miktarını daha fazla azaltma eğilimindedirler.

**Çizelge 4.13.** Zeytinyağının renk pigmentlerini (toplam klorofil, toplam karotenoid) etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Toplam klorofil			Toplam karotenoid		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	13	10.66	<0.0042	12	9.13	0.0036
AB	1	11.79	0.0139	1	3.56	0.1012
AC	1	3.71	0.1023	1	33.89	0.0006
AD	1	5.32	0.0606	1	-2.87	0.1340
BC	1	14.21	0.0093	1	5.65	0.0491
BD	1	11.03	0.0160	1	13.39	0.0081
CD	1	1.47	0.2708	-	-	-
ABC	1	6.83	0.0399	1	6.70	0.0360
ABD	1	57.82	0.0003	1	26.44	0.0013
ACD	1	19.38	0.0046	1	12.32	0.0099
BCD	1	9.03	0.0238	1	10.43	0.0145
Hata	6	-	-	7	-	-
Model uyumsuzluğu	1	3.67	0.1135	2	3.30	0.1220
Saf hata	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9585	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8686		R <sup>2</sup> =0.9399	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8369	
Toplam klorofil = 13.43 × A + 10.52 × B + 10.77 × C + 9.92 × D + 10.63 × (A×B) – 7.69 × (A×C) + 9.20 × (A×D) + 15.04 × (B×C) + 13.25 × (B×D) – 4.84 × (C×D) – 279.07 × (A×B×C) – 811.71 × (A×B×D) + 472.49 × (A×C×D) + 322.57 × (B×C×D)						
Toplam karotenoid = 6.02 × A + 5.46 × B + 5.88 × C + 5.76 × D + 2.07 × (A×B) – 8.18 × (A×C) + 2.38 × (A×D) + 3.34 × (B×C) + 5.14 × (B×D) – 97.67 × (A×B×C) -193.99 × (A×B×D) + 132.11 × (A×C×D) + 121.55 × (B×C×D)						

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

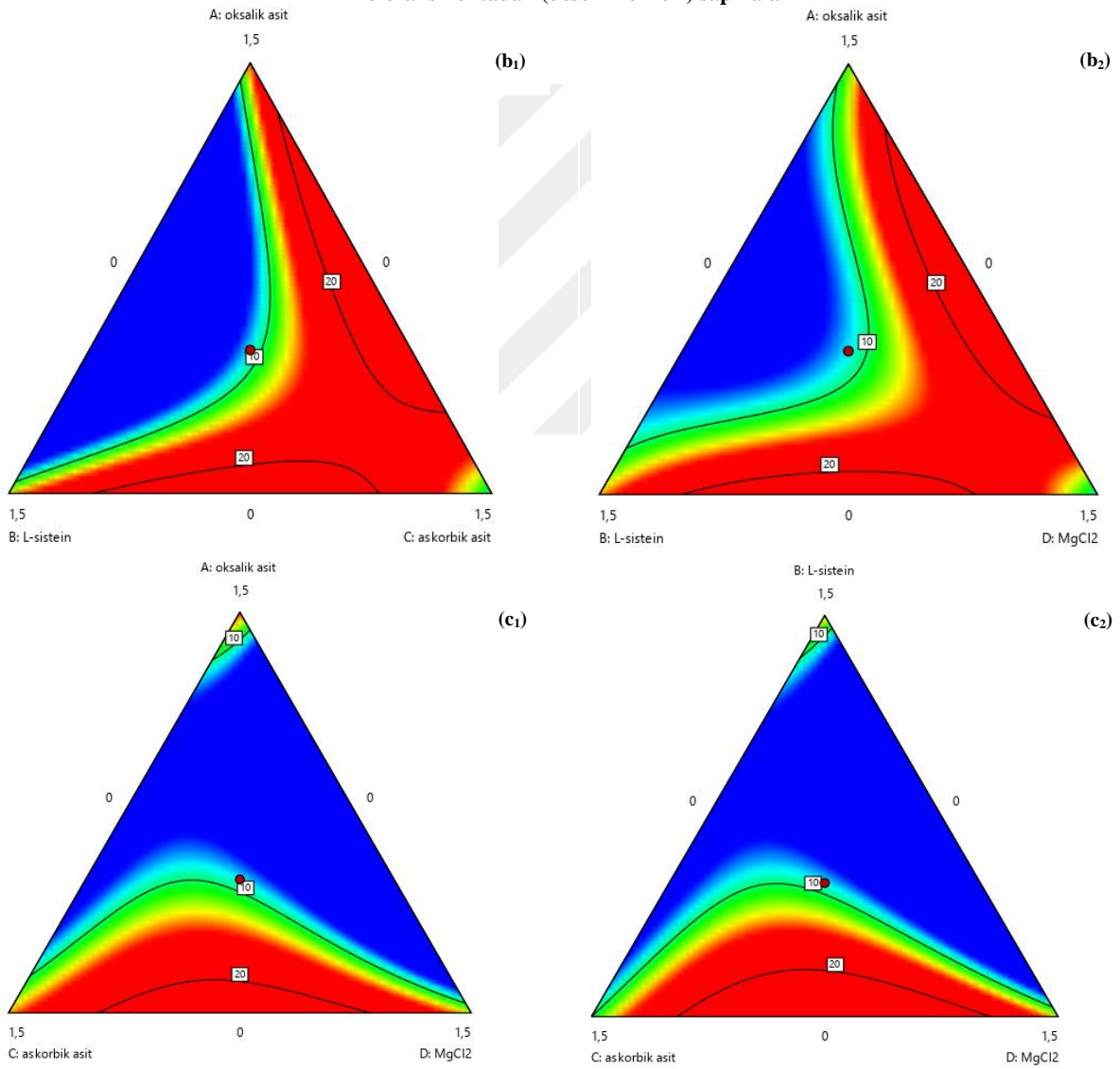
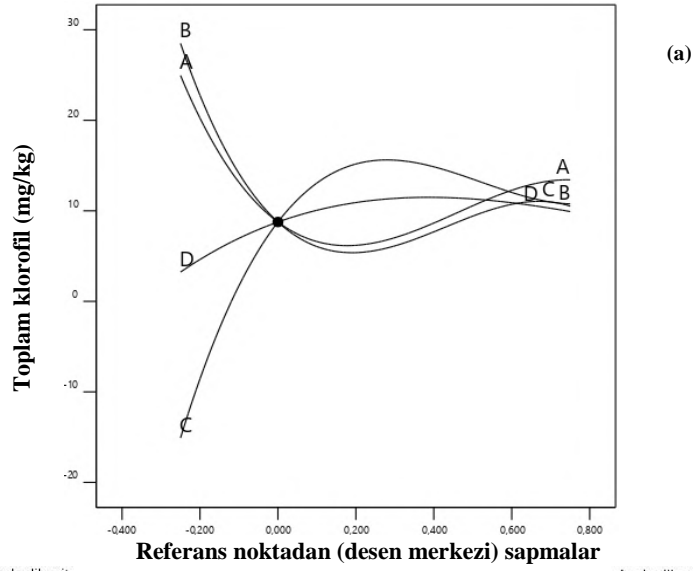
CCD'de katkı maddelerin toplam klorofil ve karotenoid miktarı üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı maddesi için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.8 ve Şekil 4.9).

Toplam klorofil miktarı için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması toplam klorofil miktarında önemli bir değişim göstermemiştir. OA ve AA kullanımı orta seviyeye kadar toplam klorofil miktarını azaltmış daha sonra belli bir seviyeye kadar artırmıştır (Şekil 4.8a). Şekil 4.8b<sub>1</sub> ve Şekil 4.8b<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki OA konsantrasyonunun artırılması, zeytinyağlarında daha yüksek toplam klorofil içeriği ile sonuçlanmıştır. Bunun yanısıra, kontur grafiği, formülasyondaki L-sis ve

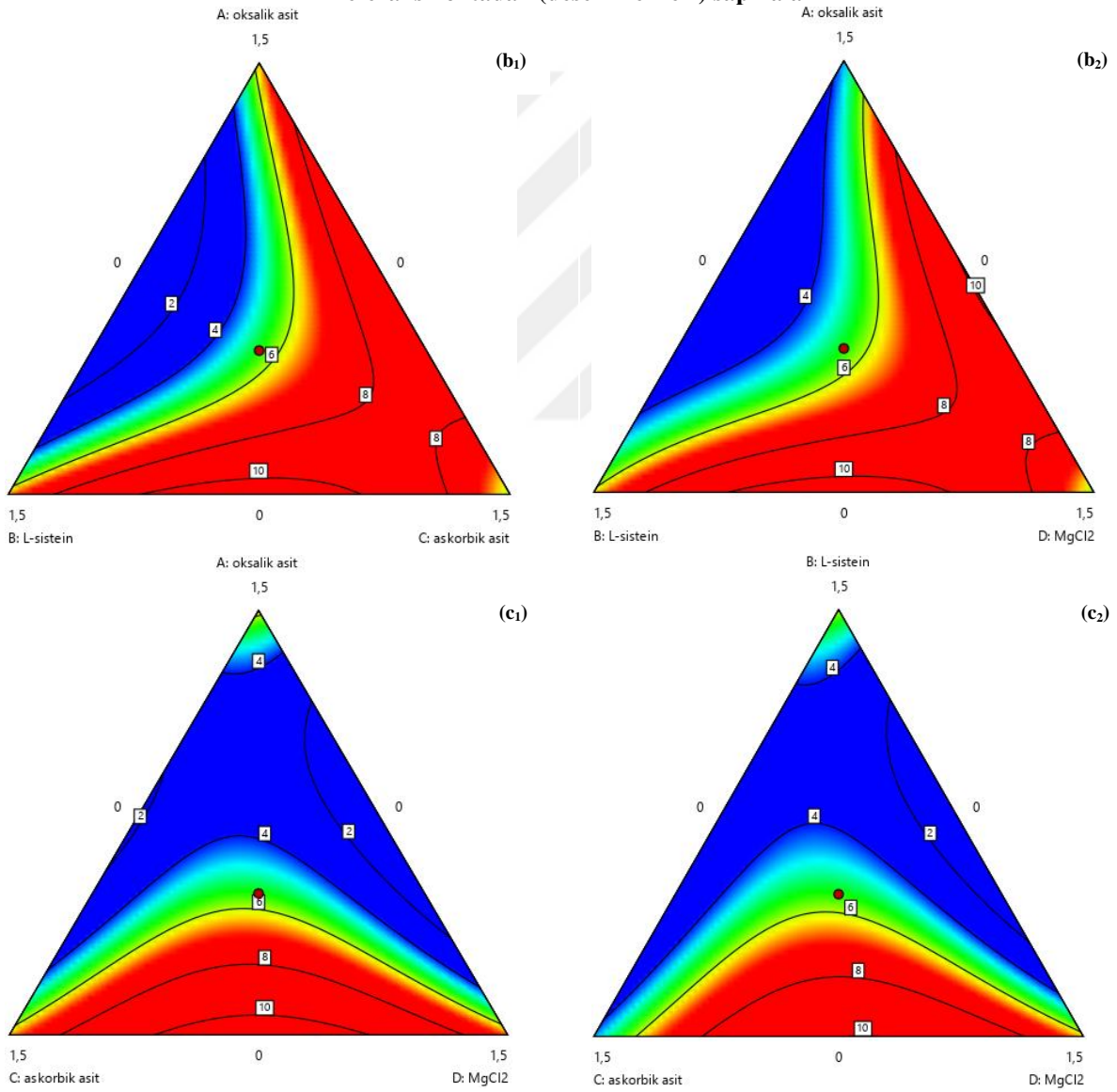
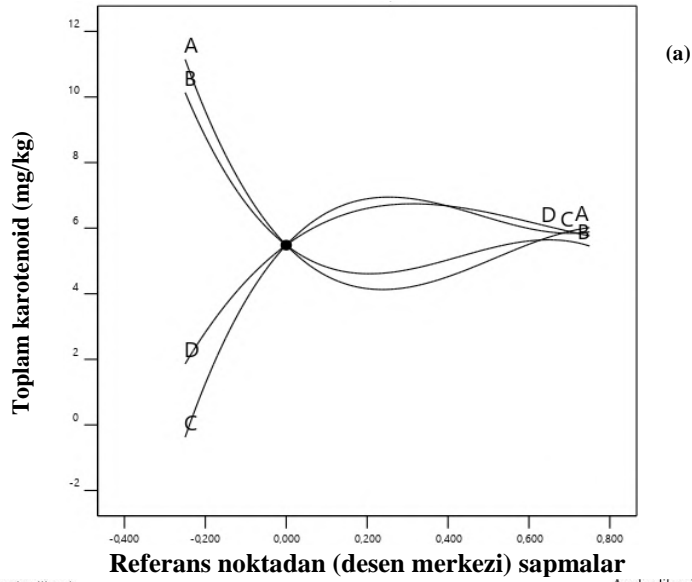
AA oranlarının artması ile toplam klorofil miktarını azalttığını göstermiştir (Şekil 4.8b<sub>1</sub> ve Şekil 4.8c<sub>1</sub>).

Şekil 4.9a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre, OA kullanımı toplam karotenoid miktarında daha fazla düşüşe sebep olmuştur. L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun artması ile zeytinyağının toplam karotenoid miktarlarında azalma görülmektedir (Şekil 4.9b<sub>1</sub>, Şekil 4.9b<sub>2</sub>). Orta seviyeye kadar L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı toplam karotenoid miktarını artırmış daha sonra L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ters etki göstermiştir.





**Şekil 4.8.** Katkı maddelerinin klorofil pigmenti üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.9.** Katkı maddelerinin toplam karotenoid pigmenti üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

#### 4.4.3. Peroksit, özgül soğurma ve oksidatif stabilite analizi

Peroksit ve özgül soğurma ( $K_{232}$  ve  $K_{270}$ ) değerleri yağlarda meydana gelen oksidasyon ürünlerinin bir göstergesi olup önemli kalite kriterlerindedir. Peroksit ve  $K_{232}$  değerleri oksidasyon sonucu oluşan birincil oksidasyon ürünlerinin miktarını belirlemek için kullanılmaktadır.  $K_{270}$  değeri ise oksidasyonun ileri aşamasında oluşan aldehit ve ketonlar gibi ikincil oksidasyon ürünlerinin seviyelerinin belirlenmesini sağlamaktadır (Marmesat ve ark., 2009). 232 nm'de belirlenen özgül soğurma değeri, oksidasyonun birinci basamağı olan hidroperoksitlerin ve konjuge dienlerin tespitinde; 270 nm'de belirlenen özgül soğurma değeri ise oksidasyonun ikinci basamağı olan karbonilik bileşikler ile konjuge trienlerin tespitinde kullanılmaktadır (Goğuş ve ark., 2009). İnhibitör ilaveli zeytin hamurlarından elde edilen yağlarının peroksit değerleri Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'ne göre (Tebliğ No: 2017/26), naturel sızma veya naturel birinci zeytinyağlarında peroksit değeri  $\leq 20$  meq  $O_2/kg$  olmalıdır. Bütün örneklerin sonuçları tebliğde belirtilen değerlerin altında bulunmuştur. Elde edilen zeytinyağlarına ait peroksit değerleri (meq  $O_2/kg$ ) sırasıyla 3.04-6.85 arasında bulunurken, kontrol örneğinin peroksit değeri 5.87 olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.14'e göre en yüksek peroksit değeri %2  $MgCl_2$  katkı maddesi ilave edilen örnekte  $6.85 \pm 0.08$  olarak belirlenmiş, bunu %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25  $MgCl_2$  karışımı ilave edilen örneğe ait zeytinyağları takip etmiştir. Peroksit sonuçları incelendiğinde %2  $MgCl_2$  ve %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25  $MgCl_2$  örnekleri dışındaki tekli ve kombinasyonlu uygulamalarda kontrol grubuna göre düşüş tespit edilmiştir. En düşük peroksit değeri %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25  $MgCl_2$  uygulamasında görülmüştür.

İnhibitör madde ilaveli zeytinlerden ekstrakte edilen zeytinyağlarının  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerleri ise Çizelge 4.14'te sunulmuştur. Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'ne göre (Tebliğ No: 2017/26), naturel sızma ve naturel birinci zeytinyağlarının  $K_{232}$  değerlerinin sırasıyla  $\leq 2.50$  ve  $\leq 2.60$ ;  $K_{270}$  değerlerinin  $\leq 0.22$  ve  $\leq 0.25$  olması gerektiği ifade edilmiştir. Zeytinyağlarının en yüksek  $K_{232}$  değerleri, %2  $MgCl_2$  eklenerek elde edilen yağlarda sırasıyla 2.19 ve 2.15 olarak belirlenmiştir. Elde edilen zeytinyağlarının  $K_{232}$  değerleri 1.28-2.19 arasında bulunmuş ve bu verilerin tebliğde belirtilen sınır değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir.  $MgCl_2$  ve L-sis'in tek başına ve %2 oranında kullanıldığı örneklerde en yüksek  $K_{232}$  değerini vermiştir. Diğer katkı maddelerin kullanımlarında ise  $K_{232}$  değerleri kontrole göre daha düşük elde edilmiştir.  $MgCl_2$  ve L-sis beraber kullanıldığında  $K_{232}$  değerini yükseltmemiştir. Zeytinyağlarının  $K_{270}$  özgül soğurma değerleri ise 0.016-0.026 arasında değişmektedir (Çizelge 4.14). En yüksek  $K_{270}$  değerinin %2 AA ilaveli örneklere ait

yağlarda ve 0.026 değerinde olduğu gözlenmiştir. Sadece %2 AA içeren zeytinyağı örneklerinin  $K_{270}$  değerleri tebliğde belirtilen sınır değerlerinden yüksek bulunmuştur.

Lipit oksidasyonunun birincil ürünleri olan hidroperoksitler, çoğunlukla ekşi tattan sorumludur (Choe ve Min, 2007). Zeytinyağı numunelerinin oksidasyona karşı dayanıklılığı hakkında bilgi edinebilmek amacıyla Ransimat cihazında test edilmiştir (Çizelge 4.14). İndüksiyon periyodu oksidasyonun başlaması için gerekli olan süre (saat) olarak tanımlanmaktadır. Bir örneğin indüksiyon periyodunun uzunluğu ise örneğin o ölçüde kararlı olduğunu göstermektedir. Örneklerin indüksiyon periyotları 2.78-13.83 saat aralığında değişmektedir. İnhibitör ilaveli zeytinyağı örnekleri arasında en yüksek stabilitenin %2 AA ilaveli zeytinyağı örneklerinde sırasıyla 13.83 ve 13.55 saat olduğu belirlenmiştir. %2  $MgCl_2$  ilaveli örnekler hariç diğer örneklerde oksidatif stabilitenin arttığı tespit edilmiştir. %2 oranında  $MgCl_2$  içeren örnekler hariç diğer örneklerin oksidatif stabiliteleri artmıştır. Dolayısıyla, AA'in oksidatif stabilite üzerine olumlu etkisini destekler nitelikte bir sonuç elde edilirken  $MgCl_2$ 'ün oksidatif stabilite üzerine olumsuz etki gösterdiği görülmüştür. OA, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve  $Cu^{2+}$  varlığında AA'nın oksidasyon hızını azaltmıştır. Bu sonuç, OA'in doğal bir antioksidan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, tek başına %2 OA katkısının kullanıldığı örneklerde peroksit ve  $K_{232}$  değerlerinde kontrole göre azalma görülürken, oksidatif stabilite değerlerinde ise fark edilir derecede artış görülmüştür. OA'in farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı bir çalışmada, OA'in *in vitro* lipid peroksidasyonunu konsantrasyona bağlı olarak baskıladığını göstermiştir (Kayashima ve Katayama, 2002). Dolayısıyla, OA'in lipit peroksidasyonunu baskıladığı bu çalışma ile desteklenmektedir.

**Çizelge 4.14.** Zeytin hamuruna katkı maddelerinin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının oksidasyon analizleri üzerine etkisi

Numune no	Peroksit değeri (meq O <sub>2</sub> /kg)	K <sub>232</sub>	K <sub>270</sub>	Oksidatif stabilite (saat)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	3.12 ±0.35*	1.37 ±0.24	0.017 ±0.004	10.95 ±0.11
%1 OA + %1 L-sis	3.64 ±0.73	1.85 ±0.04	0.022 ±0.000	7.28 ±0.30
%2 MgCl <sub>2</sub>	6.47 ±0.40	2.19 ±0.05	0.019 ±0.002	3.10 ±0.11
%2 L-sis	4.36 ±0.44	2.05 ±0.14	0.024 ±0.001	5.88 ±0.58
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	4.88 ±0.42	1.28 ±0.04	0.016 ±0.001	11.12 ±0.26
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	5.05 ±0.43	1.85 ±0.18	0.022 ±0.001	10.02 ±0.06
%2 AA	4.05 ±0.20	1.47 ±0.03	0.026 ±0.001	13.83 ±0.30
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	6.56 ±0.17	1.95 ±0.15	0.023 ±0.001	5.48 ±0.96
%2 OA	4.83 ±0.16	1.61 ±0.07	0.020 ±0.001	12.08 ±0.83
%2 AA	3.91 ±0.20	1.51 ±0.05	0.026 ±0.001	13.55 ±0.67
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	3.04 ±0.13	1.60 ±0.18	0.019 ±0.002	4.16 ±0.59
%2 OA	4.37 ±0.11	1.65 ±0.03	0.020 ±0.000	13.23 ±0.33
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	4.45 ±0.26	1.80 ±0.08	0.022 ±0.001	3.20 ±0.86
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	3.55 ±0.30	1.60 ±0.27	0.021 ±0.001	9.73 ±0.03
%2 MgCl <sub>2</sub>	6.85 ±0.08	2.15 ±0.03	0.020 ±0.001	2.78 ±0.13
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	4.49 ±0.09	1.76 ±0.09	0.021 ±0.001	6.82 ±0.10
%1 L-sis + %1 AA	3.61 ±0.14	1.98 ±0.05	0.024 ±0.001	6.53 ±0.71
%1 OA + %1 AA	3.40 ±0.19	1.73 ±0.21	0.020 ±0.001	12.82 ±0.83
%2 L-sis	4.49 ±0.18	2.04 ±0.09	0.024 ±0.000	4.86 ±0.16
%1 OA + %1 L-sis	3.90 ±0.18	1.86 ±0.05	0.022 ±0.000	8.22 ±0.54
<b>K</b>	5.87 ±0.28	2.09 ±0.02	0.024 ±0.003	3.49 ±0.28

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama ± standart sapma

Peroksit,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerlerinin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.15'te verilmiştir. İnhibitör maddelerin peroksit,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerleri üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında sırasıyla özel kübik, kuadratik, kuadratik ve özel kübik modelleri belirlenmiştir. Zeytinyağlarının peroksit değeri,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerlerine ait modellerde sırasıyla P değerleri  $<0.0001$ ,  $0.0002$ ,  $<0.0001$ ,  $<0.0001$  olarak hesaplanmış olup modellerin anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.15). ANOVA sonuçlarına göre,  $AA \times MgCl_2$ ,  $OA \times L\text{-sis} \times AA$ ,  $OA \times AA \times MgCl_2$  ve  $L\text{-sis} \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları zeytinyağının peroksit değerini,  $OA \times MgCl_2$  interaksiyonu ise  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerlerini önemli ölçüde etkilemiştir ( $P<0.01$ ).  $L\text{-sis} \times AA$  ve  $L\text{-sis} \times MgCl_2$  oranlarının ise hem peroksit değeri hem de  $K_{232}$  üzerine doğrusal etkisi önemli ( $P<0.05$ ) bulunmuştur.  $OA \times AA$  oranının etkisi ( $P<0.01$ ) ve  $AA \times MgCl_2$  oranının etkisi ( $P<0.05$ ) ise  $K_{270}$  değeri üzerine önemli bulunmuştur. Oksidatif stabilite için ise  $L\text{-sis} \times AA$  oranı  $P<0.01$ ,  $OA \times L\text{-sis}$  ve  $OA \times L\text{-sis} \times AA$  oranları ise  $P<0.05$  düzeylerinde önemli olarak tespit edilmiştir. Oksidasyon analizlerinin tamamı için geliştirilen modeller uyumsuzluk testini geçmiştir ( $P>0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.5316, 0.3012, 0.0265 ve 0.9332 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, model uyumsuzluğunun peroksit,  $K_{232}$  ve oksidatif stabilite değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Belirleme katsayıları sırasıyla sırasıyla  $R^2$ : 0.9890, 0.8975, 0.9573 ve 0.9936 ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla  $R^2$ :0.9651, 0.8230, 0.9376 ve 0.9799 olarak bulunmuş olup belirleme kat sayıları ile arasında yüksek bir uyumluluk oranı bulunmuştur. Buradan, peroksit,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %98.90, %89.75, %95.73 ve %99.36'sı belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan tespit edilen peroksit,  $K_{232}$ ,  $K_{270}$  ve oksidatif stabilite değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Oksidasyon analizlerinin modellerine ait denklemler Çizelge 4.15'te verilmiştir. Belirlenen değişken katsayıları incelendiğinde, pozitif lineer etkilerinden dolayı OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  oranlarının artması örneklerin oksidasyon değerlerini artırdığı görülmektedir.  $OA \times L\text{-sis} \times AA$  interaksiyonu peroksit ve oksidatif stabilite değerleri için pozitif lineer etki gösterirken,  $OA \times MgCl_2$  ve  $AA \times MgCl_2$  interaksiyonları ise hem  $K_{232}$  hem de  $K_{270}$  değerleri için negatif lineer etki göstermektedir. Regresyon eşitliğine göre oksidasyon analizleri için kullanılan katkı maddelerin doğrusal etkilerinin önemli olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.15.** Zeytinyağının oksidasyon analizlerini (peroksit değeri, K<sub>232</sub>, K<sub>270</sub> ve oksidatif stabilite) etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Peroksit değeri			K <sub>232</sub>			K <sub>270</sub>			Oksidatif stabilite		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	13	41.47	<0.0001	8	12.04	0.0002	6	48.58	<0.0001	13	72.09	<0.0001
AB	1	17.45	0.0058	-	-	-	-	-	-	1	7.45	0.0342
AC	1	14.89	0.0084	1	4.43	0.0523	1	20.99	0.0005	1	0.3553	0.5729
AD	1	10.53	0.0176	1	27.75	0.0003	1	33.56	<0.0001	1	30.91	0.0014
BC	1	6.53	0.0432	1	8.31	0.0149	-	-	-	1	25.31	0.0024
BD	1	22.53	0.0032	1	5.75	0.0353	-	-	-	1	2.58	0.1595
CD	1	59.53	0.0002	1	0.6671	0.4314	1	5.65	0.0336	1	5.59	0.0559
ABC	1	138.01	<0.0001	-	-	-	-	-	-	1	8.70	0.0256
ABD	1	28.51	0.0018	-	-	-	-	-	-	1	0.7885	0.4087
ACD	1	120.03	<0.0001	-	-	-	-	-	-	1	3.09	0.1291
BCD	1	56.15	0.0003	-	-	-	-	-	-	1	3.81	0.0990
Hata	6	-	-	11	-	-	13	-	-	6	-	-
Model uyumsuzluğu	1	0.4510	0.5316	6	1.64	0.3012	8	6.57	0.0265	1	0.0078	0.9332
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9890	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9651		R <sup>2</sup> =0.8975	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8230		R <sup>2</sup> =0.9573	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9376		R <sup>2</sup> =0.9936	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9799	
Peroksit değeri = 4.60 × A + 4.43 × B + 3.98 × C + 6.66 × D - 2.96 × (A×B) - 3.52 × (A×C) - 2.96 × (A×D) - 2.33 × (B×C) - 4.33 × (B×D) - 7.04 × (C×D) + 286.89 × (A×B×C) - 130.39 × (A×B×D) - 268.99 × (A×C×D) + 183.97 × (B×C×D)												
K <sub>232</sub> = 1.61 × A + 2.05 × B + 1.33 × C + 2.16 × D + 1.09 × (A×C) - 2.63 × (A×D) + 1.44 × (B×C) - 1.20 × (B×D) - 0.4088 × (C×D)												
K <sub>270</sub> = 0.0198 × A + 0.0240 × B + 0.0258 × C + 0.0196 × D - 0.0127 × (A×C) - 0.0161 × (A×D) - 0.0066 × (C×D)												
Oksidatif stabilite = 12.65 × A + 5.37 × B + 13.69 × C + 2.94 × D - 5.05 × (A×B) - 1.42 × (A×C) + 13.28 × (A×D) - 12.01 × (B×C) - 3.83 × (B×D) + 5.65 × (C×D) + 188.39 × (A×B×C) - 56.73 × (A×B×D) - 112.98 × (A×C×D)												

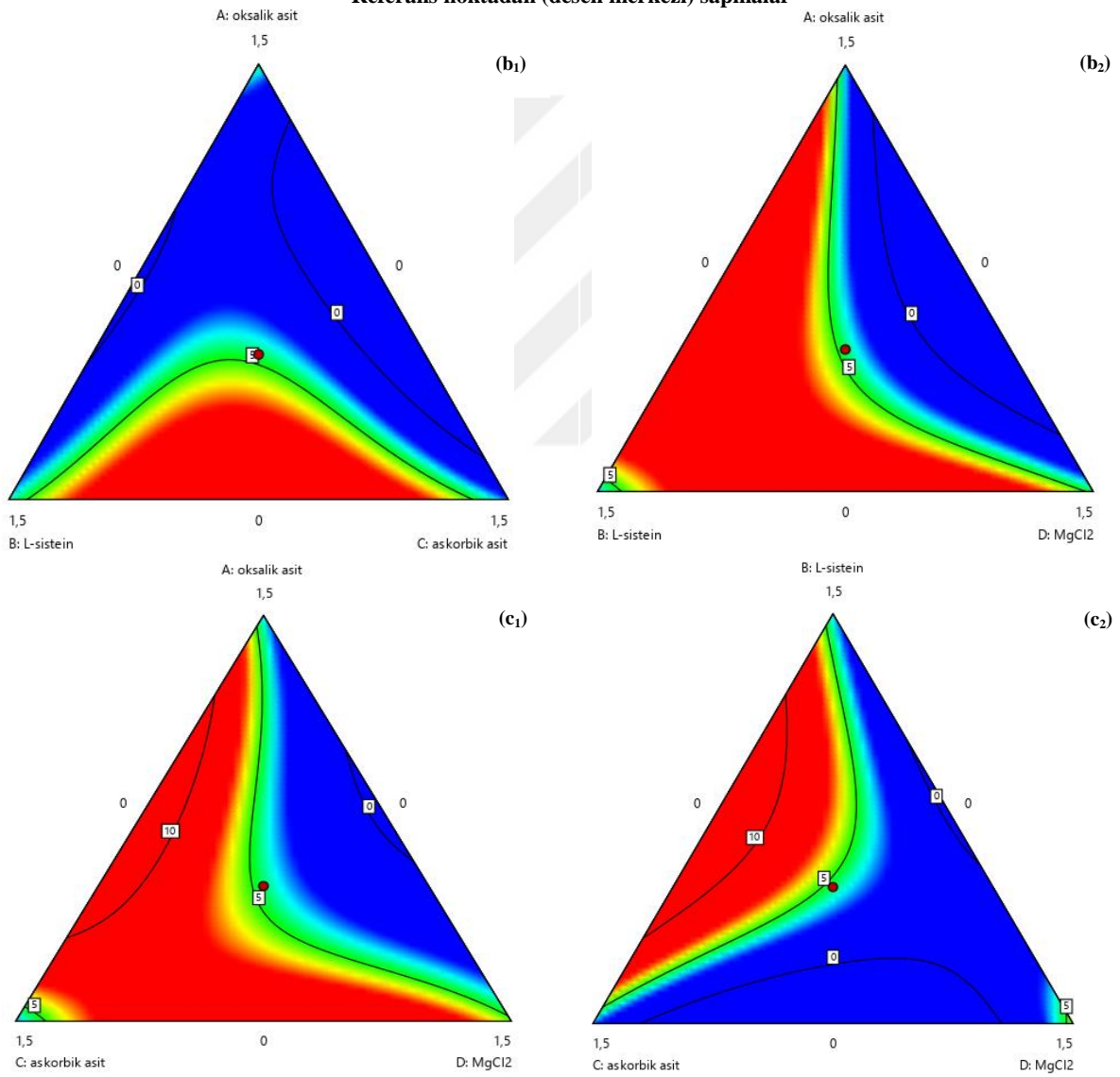
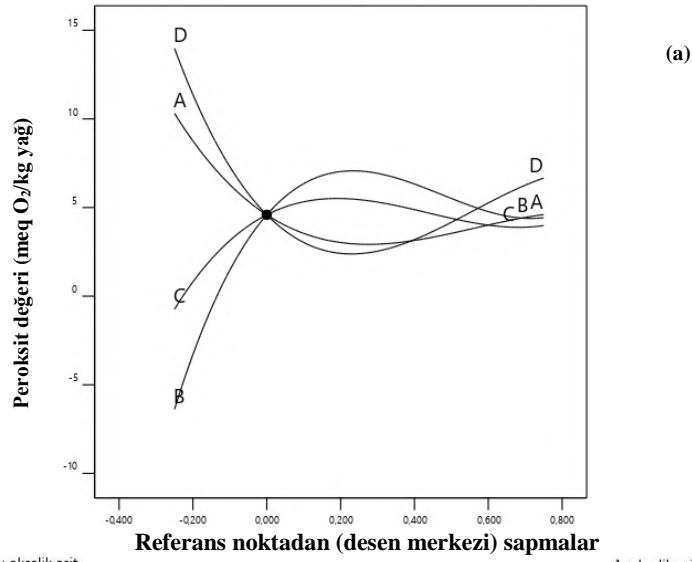
A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

Şekil 4.10a'daki iz eğim grafiği incelendiğinde, orta seviyeye kadar OA ve MgCl<sub>2</sub> peroksit değerini azaltırken, L-sis ve AA ise artırmıştır. Böylece, orta seviyeye kadar OA ve MgCl<sub>2</sub>'nin peroksit değeri üzerine olumlu etki yaptığı, diğer katkı maddelerinin ise olumsuz etki yaptığı söylenebilmektedir. En düşük peroksit değeri üretiminde OA'nın denendiği zeytinyağlarında (Şekil 4.10.b<sub>1</sub>) ve hem OA hem de MgCl<sub>2</sub> ile üretilen zeytinyağlarında (Şekil 4.10.b<sub>2</sub>) görülmüştür. İnhibitörlerin miktarının artması ile örneklerin peroksit değerleri yakın aynı seviyelerde tespit edilmiştir.

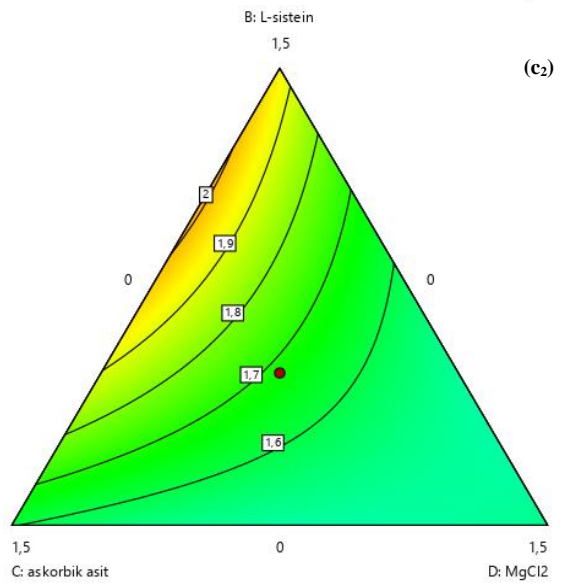
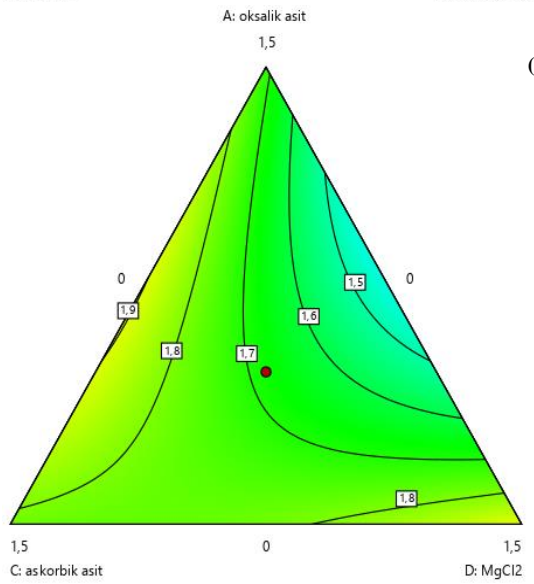
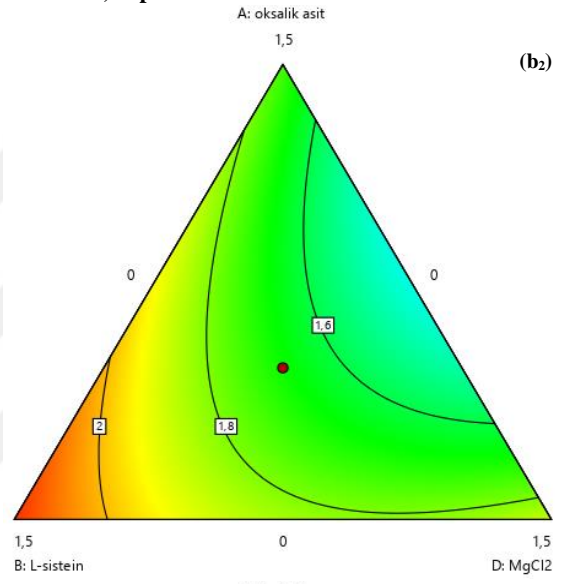
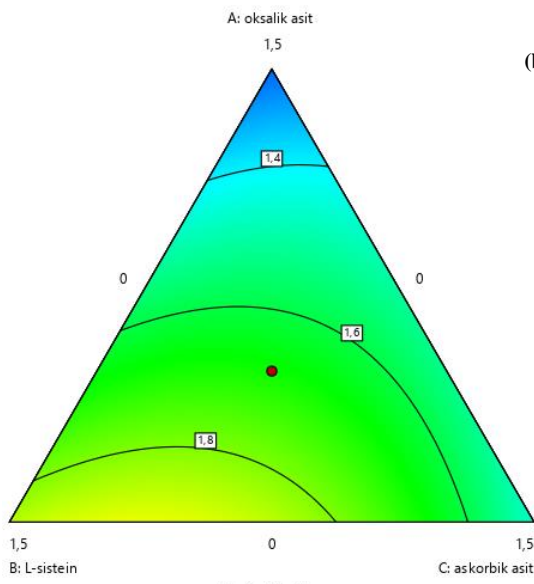
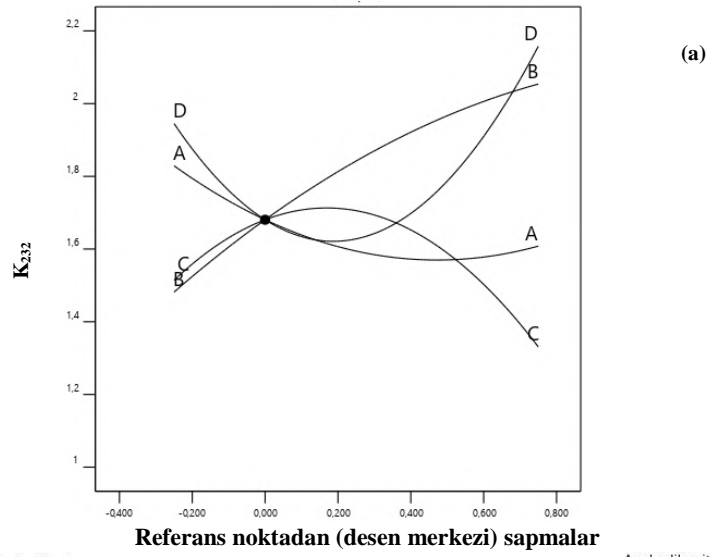
Şekil 4.11'de, K<sub>232</sub> değerleri için oluşturulan iz eğim grafiği verilmiştir. Orta seviyeye kadar OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı K<sub>232</sub> değerini azaltırken L-sis ve AA kullanımı ise K<sub>232</sub> değerini artırmıştır. İnhibitör maddelerde tespit edilen artış azalışlar peroksit değerlerinde de görülmektedir (Şekil 4.10a). L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımındaki artışın ise K<sub>232</sub> değeri üzerine negatif etkide bulunduğu görülmüştür. En yüksek K<sub>232</sub> yüksek oranda kullanılan L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ile üretilen zeytinyağı örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 4.10.b<sub>2</sub>). L-sis içeriğinin artmasıyla K<sub>232</sub> değerindeki artış Şekil 4.11c<sub>2</sub>'de görülmektedir.

L-sis ve AA miktarlarının artması K<sub>270</sub> değeri üzerine olumsuz etki göstermiştir (Şekil 4.12a). Şekil 4.12b<sub>1</sub>, Şekil 4.12b<sub>2</sub> ve Şekil 4.12c<sub>1</sub>'de de görülebileceği gibi, yüksek oranda L-sis ve AA kullanılarak üretilen zeytinyağının en yüksek K<sub>270</sub> değerine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, OA ve MgCl<sub>2</sub> miktarlarının artması K<sub>270</sub> değerini belli bir seviyeye kadar azaltmış daha sonra bu etki çok hafif artmıştır. Bütün katkı maddelerin kullanım miktarının K<sub>270</sub> üzerine etkilerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. L-sis ve AA kullanımının artması K<sub>270</sub> değeri üzerine negatif etkide bulunmuştur.

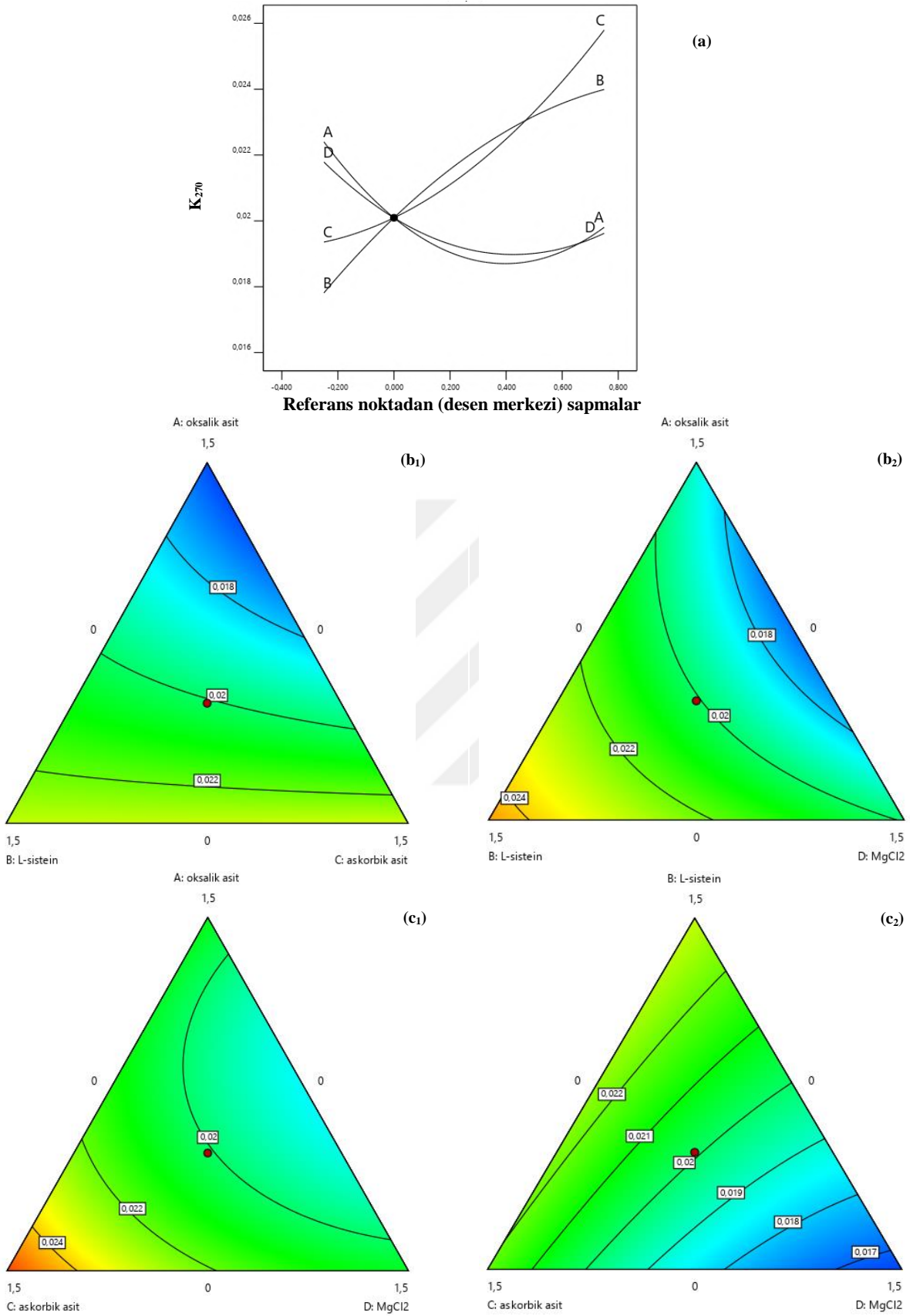
Oksidatif stabilite için oluşturulan iz eğim grafiğindeki verilere göre MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması oksidatif stabiliteyi en fazla seviyede azaltmıştır (Şekil 4.13a). OA, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı ise oksidatif stabiliteyi en fazla etkilemiştir. L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması oksidatif stabilite üzerine olumsuz etki göstermiştir. OA ve AA konsantrasyonunun artırılması, zeytinyağının oksidatif stabilitesini artırmıştır (Şekil 4.13.b<sub>1</sub>). Orta seviyeye kadar OA ve AA kullanımı oksidatif stabiliteyi artırmış, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ise ters etki göstermiştir. L-sis büyük bir fark yaratmazken MgCl<sub>2</sub> belirgin bir etki göstermiştir. Şekil 4.13.c<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki L-sis konsantrasyonunun artırılması zeytinyağının oksidatif stabilitesinin azalması ile sonuçlanmıştır.



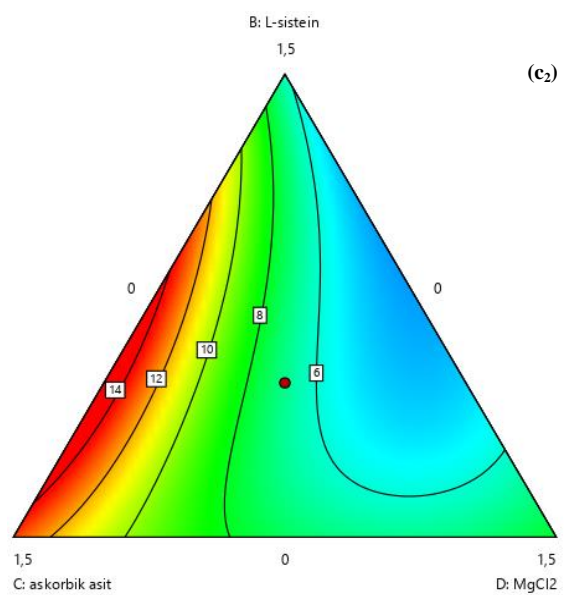
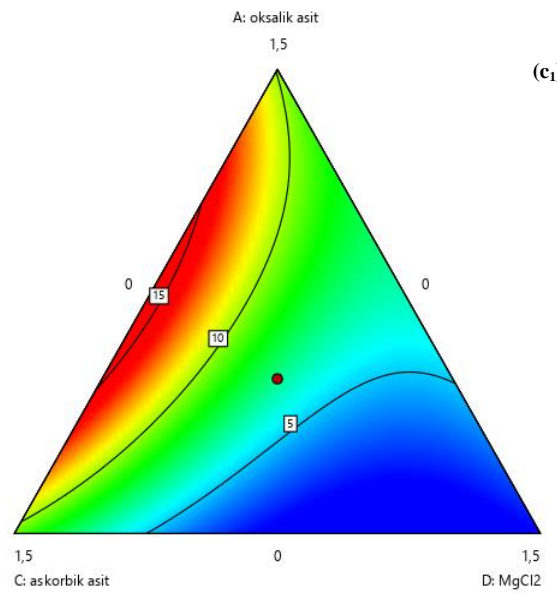
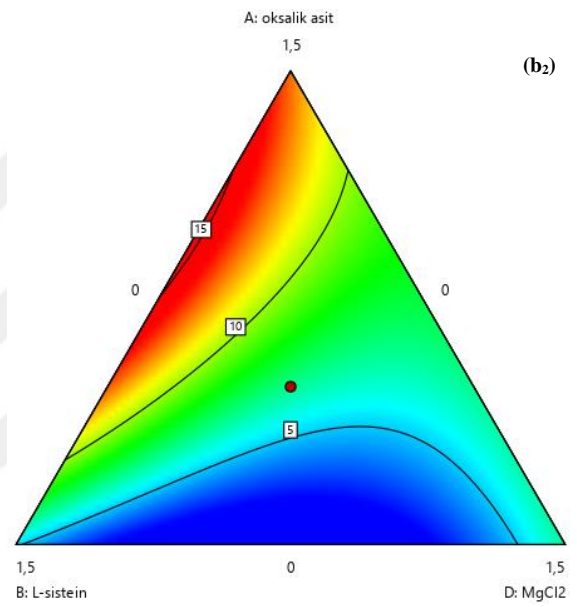
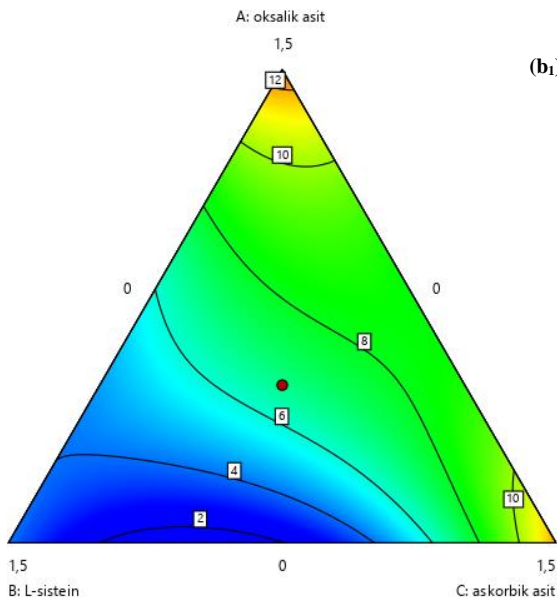
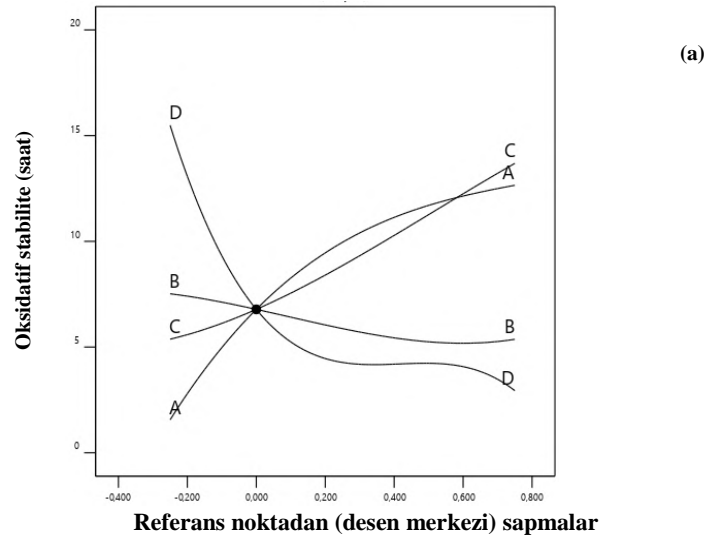
**Şekil 4.10.** Katkı maddelerinin peroksit değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.11.** Katkı maddelerinin  $K_{232}$  değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.12.** Katkı maddelerinin  $K_{270}$  değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.13.** Katkı maddelerinin oksidatif stabilite üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

#### 4.4.4. Renk analizi (L\*, a\*, b\*)

Zeytin örneklerine katkı ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarında tespit edilen L\*, a\* ve b\* renk değerleri Çizelge 4.16'da verilmiştir. İnhibitör madde eklenmesi ile zeytinyağı örneklerinin L\* değerleri birbirine yakın bulunmuş, yağların parlaklığı çok fazla değişmemiştir. Zeytinyağlarının parlaklık (L\*) değerleri 59.77-70.26 arasında değişmiştir. Elde edilen yağlar içerisinde en yüksek L\* değeri %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilaveli örnekte en düşük L\* değeri ise %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> katkıları ilaveli örnekte görülmüştür. Ayrıca, L\* değerleri arasında önemli farklılıklar görülmemektedir.

a\* değeri için (+) işareti kırmızılığ, (-) işareti yeşilliği ifade etmektedir. İnhibitör maddeler eklenerek elde edilen tüm zeytinyağlarının (-) a\* değerleri, kontrole göre yüksek bulunmuştur, yeşil renk yoğunluğunda artış meydana gelmiştir. Çizelge 4.12'de de görüldüğü gibi zeytinyağı örneklerinin toplam klorofil miktarlarında da artışlar görülmüştür. Zeytinyağlarının a\* değerleri (-8.50)-(-6.19) arasında değişmektedir. En düşük a\* değeri %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilaveli örnekte, en yüksek a\* değeri ise %2 L-sis ilaveli örnekte tespit edilmiştir. Ayrıca, a\* değerinde olduğu gibi toplam klorofil miktarında da %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilaveli örneğin minimum olduğu görülmüştür. İnhibitör maddelerin ilavesi zeytinyağlarının a\* değerleri üzerinde önemli etkide bulunmuştur.

b\* değeri için (+) değerler sarılığ, (-) değerler mavi rengi göstermektedir. Zeytinyağı örneklerinin tamamında b\* değerleri sarı renk bölgesinde belirlenmiştir. %2 MgCl<sub>2</sub> kullanılan örnekler ile %2 AA kullanılan örneklerinin b\* değerleri kontrol zeytinyağının b\* değerinden daha düşüktür. Maksimum b\* değeri 41.82 ile %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> örneğinde, minimum b\* değerleri sırasıyla 24.42 ve 24.65 ile %2 AA ve %2 MgCl<sub>2</sub> örneklerinde belirlenmiştir. Sadece %2 oranında kullanılan MgCl<sub>2</sub> ve AA katkıları ile elde edilen zeytinyağları hariç diğer tüm yağların b\* değerleri artmıştır. Elde edilen zeytinyağlarının b\* değerleri 24.42-41.82 aralığında değişmiştir.

Çizelge 4.16. Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağının renk değerleri üzerine etkisi

Numune no	L*	a*	b*
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	61.97 ±2.05*	-7.97 ±0.11	41.82 ±2.16
%1 OA + %1 L-sis	65.49 ±4.30	-7.44 ±0.32	36.25 ±2.45
%2 MgCl <sub>2</sub>	64.41 ±2.92	-6.55 ±0.62	26.31 ±4.16
%2 L-sis	66.01 ±2.76	-6.27 ±0.09	35.89 ±2.78
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	70.26 ±2.59	-8.50 ±0.48	36.25 ±4.14
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	67.80 ±1.99	-7.13 ±0.28	32.32 ±2.97
%2 AA	65.06 ±3.14	-6.51 ±0.19	24.42 ±2.96
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	66.71 ±3.20	-6.84 ±0.38	32.14 ±4.31
%2 OA	64.41 ±3.13	-7.34 ±0.31	34.70 ±2.79
%2 AA	66.43 ±2.99	-6.27 ±0.26	25.91 ±2.79
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	67.18 ±1.12	-6.46 ±0.20	28.32 ±1.75
%2 OA	66.28 ±3.42	-7.36 ±0.32	35.50 ±3.46
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	64.81 ±3.95	-6.71 ±0.19	33.20 ±3.12
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	59.77 ±4.31	-6.75 ±0.34	38.61 ±2.83
%2 MgCl <sub>2</sub>	62.52 ±2.41	-7.55 ±0.22	24.65 ±3.89
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	68.72 ±3.45	-7.84 ±0.28	34.68 ±3.90
%1 L-sis + %1 AA	67.15 ±3.00	-7.97 ±0.21	39.07 ±3.85
%1 OA + %1 AA	64.31 ±2.29	-7.99 ±0.05	39.85 ±2.47
%2 L-sis	64.09 ±2.75	-6.19 ±0.27	36.43 ±2.83
%1 OA + %1 L-sis	66.76 ±2.26	-7.05 ±0.28	31.48 ±2.22
<b>K</b>	66.21 ±5.38	-5.16 ±0.34	27.32 ±4.75

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama ± standart sapma

Zeytinyağlarının L\*, a\*, b\* olarak belirlenen renk özellikleri için verilen varyans analiz sonuçları Çizelge 4.17'de sunulmuştur. İnhibitör maddelerin a\* ve b\* yanıtları üzerindeki etkisini belirlemek için sırasıyla kuadratik ve özel kübik modelleri belirlenmiştir. L\* değeri ise herhangi bir modele uymamıştır. Bu nedenle, ekstraksiyon sırasında katkı maddelerinin kullanılmamı zeytinyağlarının L\* değerlerini, anlamlı bir şekilde etkilememiştir. a\* ve b\* değerlerinin modellerine ait P değerleri sırasıyla 0.0013 ve 0.0001 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.17). Varyans analizinde %95 güven aralığındaki (P<0.05) modellerle çalışmak tercih edildiğinden elde edilen a\* ve b\* sonuçları P<0.05 olduğundan, istatistiksel olarak önemli bir model oluşturulmuştur. Bazı katkı maddelerin interaksyonu, yağların a\* ve b\* değerleri üzerine önemli seviyede etkiler (P<0.05 ve P<0.01). Buna göre, örneklerin a\* ve b\* değerleri üzerine L-sis × AA interaksyonu önemli etki göstermiştir (P<0.01). Ayrıca, örneklerin a\* ve b\* değerleri OA × AA, OA × MgCl<sub>2</sub> ve L-sis × AA interaksyonu etkisi ile önemli ölçüde değişmiştir (P<0.05, P<0.01). AA × MgCl<sub>2</sub> ve L-sis × AA × MgCl<sub>2</sub> interaksyonlarının ise a\* değeri üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunurken, b\* değeri üzerine doğrusal etkileşimi ve birinci dereceden etkisi önemli düzeyde etkili (P<0.01) bulunmuştur. a\* ve b\* değerleri için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçirmiştir (P>0.05). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.3632 ve 0.2242 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun a\* ve b\* değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). a\* ve b\* değerlerinin belirleme katsayıları R<sup>2</sup>: 0.7748 ve 0.9022 ve

uyarlanan belirleme katsayıları  $R^2$ : 0.6709 ve 0.8312 olarak bulunmuştur. Oldukça yüksek belirleme katsayıları ve uyarlanan belirleme katsayılarından da anlaşılacağı gibi elde edilen  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri ile bağımsız değişkenler arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Dolayısıyla,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %77.48 ve %90.22'i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan tespit edilen  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir.  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.17'de verilmiştir. Model katsayıları incelendiğinde  $a^*$  değeri üzerine en etkili katkının OA olduğu ve formülasyonda OA miktarının artmasının zeytinyağlarının yeşillik değerini artırdığı tespit edilmiştir.  $b^*$  değerleri için oluşturulan regresyon eşitliğine bakıldığında,  $b^*$  değeri üzerine en etkili karışım L-sis  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub>'den oluşan karışımdır.



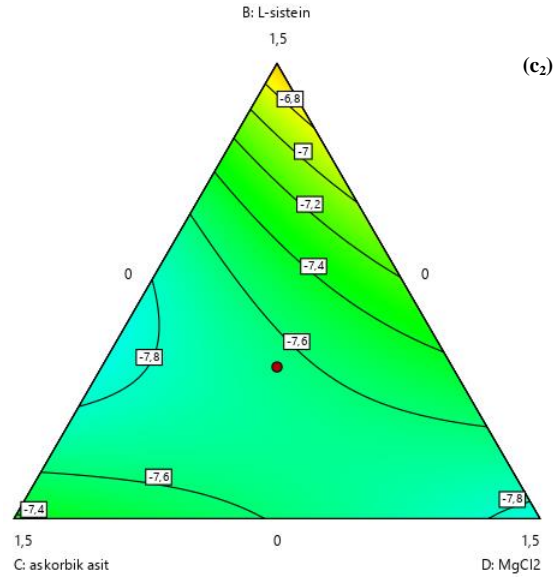
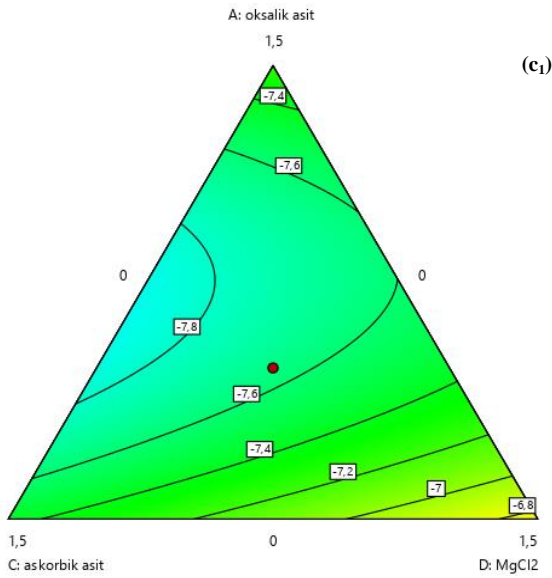
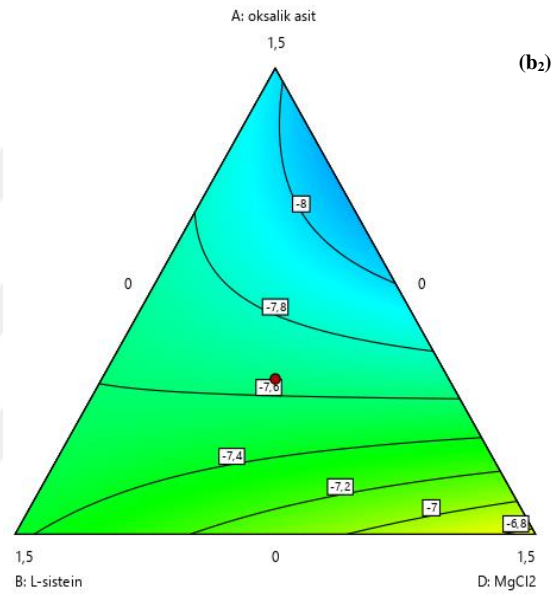
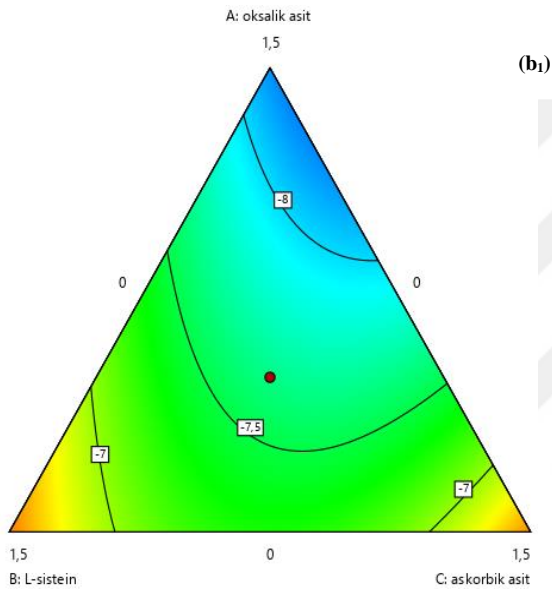
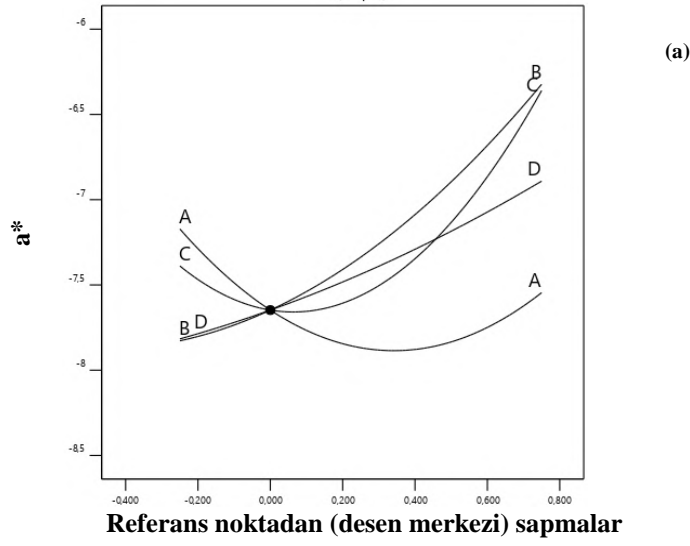
**Çizelge 4.17.** Zeytinyağının renk değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	L*			a*			b*		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	Hiçbir modelle ifade edilemedi			6	7.45	0.0013	8	12.69	0.0001
AC	-	-	-	1	5.55	0.0349	1	23.00	0.0006
AD	-	-	-	1	6.65	0.0229	1	8.71	0.0132
BC	-	-	-	1	12.66	0.0035	1	13.81	0.0034
CD	-	-	-	-	-	-	1	30.91	0.0002
BCD	-	-	-	-	-	-	1	16.90	0.0017
Hata	-	-	-	13	-	-	11	-	-
Model uyumsuzluğu	-	-	-	8	1.42	0.3632	6	2.05	0.2242
Saf hata	-	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	-	-	-	19	-	-	19	-	-
	-	-		R <sup>2</sup> =0.7748		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.6709	R <sup>2</sup> =0.9022		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8312
L*= Modellenemediği için eşitliği yok									
$a^* = - 7.54 \times A - 6.32 \times B - 6.36 \times C - 6.89 \times D - 3.84 \times (A \times C) - 4.22 \times (A \times D) - 5.82 \times (B \times C)$									
$b^* = 34.90 \times A + 35.98 \times B + 24.93 \times C + 25.63 \times D + 43.87 \times (A \times C) + 26.93 \times (A \times D) + 34.50 \times (B \times C) + 51.93 \times (C \times D) - 493.49 \times (B \times C \times D)$									

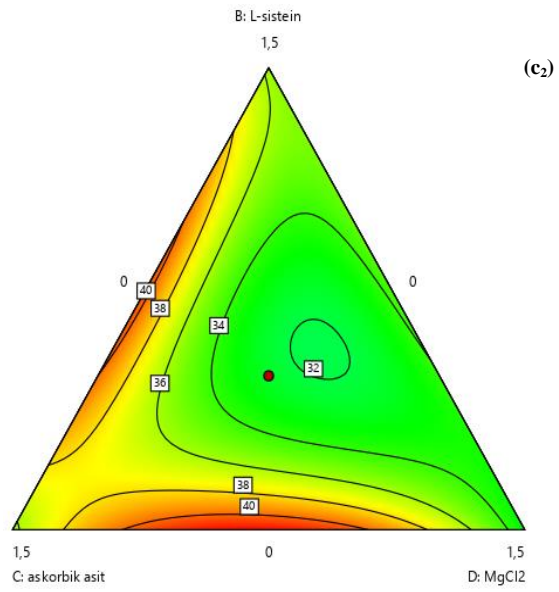
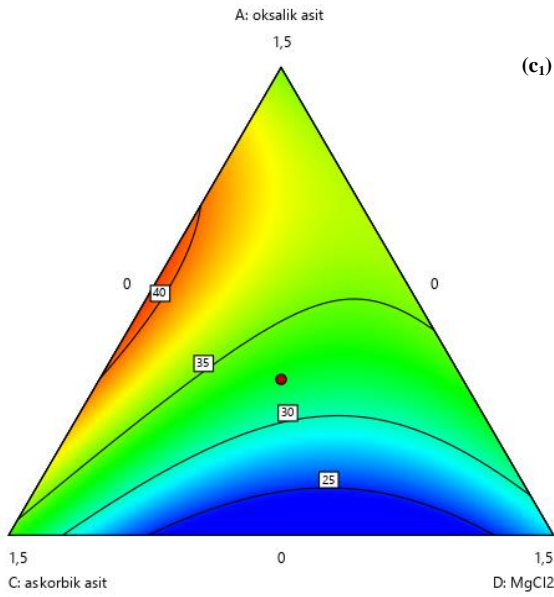
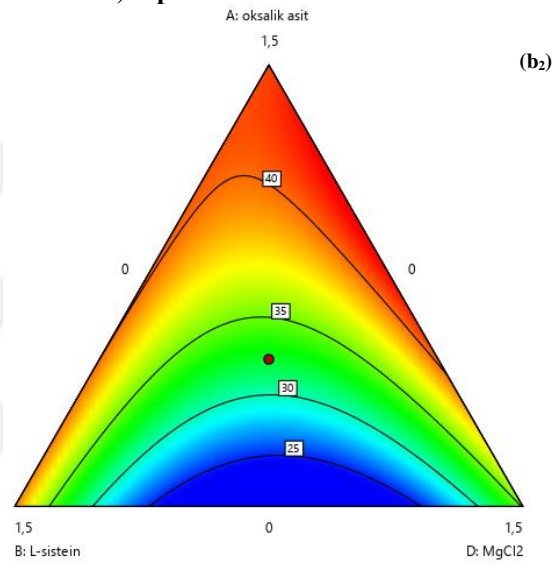
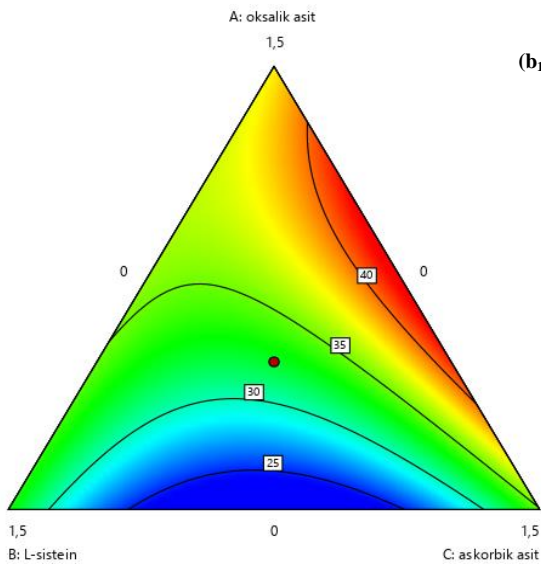
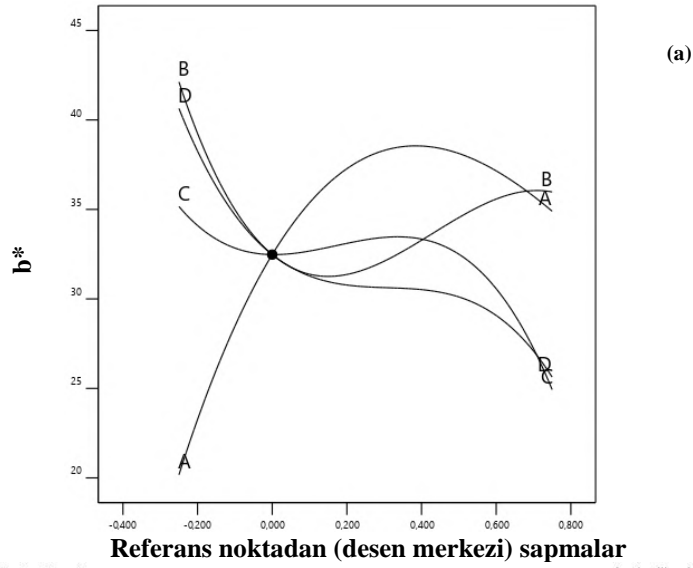
A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

L-sis ve  $MgCl_2$  miktarlarının artması  $a^*$  değerini sürekli artırdığı, OA ve AA'teki artışın ise azalttığı görülmüştür (Şekil 4.14a).  $a^*$  değeri için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde  $MgCl_2$  kullanımının artması neredeyse doğrusal olarak kırmızılık değeri üzerine olumlu etki yaptığı, L-sis ve AA kullanımı ise yüksek değerlerde yeşillik değeri sağladığı gözlenmiştir. Bu veriden hareketle, en düşük  $a^*$  değeri yüksek oranda kullanılan L-sis ve AA ile üretilen zeytinyağı örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 4.14b<sub>1</sub>, Şekil 4.14b<sub>2</sub>). Böylece, L-sis ve AA miktarının  $a^*$  değeri üzerine etkisinin yüksek olduğu söylenebilmektedir. OA kullanımının artması  $a^*$  değerini azaltmış bir miktar yeşillik bölgesinden kırmızılık bölgesine kayma tespit edilmiştir.

İnhibitör maddelerden AA ve  $MgCl_2$  miktarlarının artması  $b^*$  değeri üzerine olumsuz etki göstermiştir (Şekil 4.15a). Ayrıca L-sis miktarının artması  $b^*$  değerini belli bir düzeye kadar artırmıştır.  $b^*$  değeri için oluşturulan iz eğim incelendiğinde orta seviyeye kadar OA kullanımı  $b^*$  değerini artırırken, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  kullanımı azaltmıştır. En düşük  $b^*$  L-sis ve AA ile karışımları ile üretilen zeytinyağlarında görülmüştür (Şekil 4.15.b<sub>1</sub>).



**Şekil 4.14.** Katkı maddelerinin  $a^*$  (kırmızılık) değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.15.** Katkı maddelerinin  $b^*$  (mavilik) değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

#### 4.4.5. Toplam fenolik madde, DPPH , $\beta$ -karoten yöntemi ile antioksidan aktivite ve nem analizleri

Zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler, yağın besinsel önemi ve raf ömrünün temellerinden birisini oluşturmaktadır (Haddada ve ark., 2008). Zeytinyağı eldesi sırasında katkı madde eklenerek elde edilen zeytinyağlarının toplam fenol içerikleri Çizelge 4.18'de verilmiştir. Toplam fenolik madde değerleri 511.30-1918.89 mg GEA/kg arasında değişmiştir. Toplam fenol içeriği bakımından en zengin zeytinyağı (1918.89 mg GEA/kg) %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> kullanımı ile elde edilmiştir. %2 MgCl<sub>2</sub> içeren örneklerin toplam fenol içerikleri daha düşük bulunmuş, bunları sırasıyla %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub>, %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %1 OA + %1 L-sis ve %1 L-sis + %1 AA örnekleri takip etmiştir. Zeytinyağı örneklerinin toplam fenol içeriklerinin katkı çeşitlerinden etkilendiği görülmektedir. Özellikle %2 MgCl<sub>2</sub>, %2 L-sis, %2 AA ve %2 OA örneklerine bakıldığında L-sis, AA ve OA'in toplam fenolik madde içeriğini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. %2 AA kullanılan örneklerde görülen fenolik maddedeki artış, indirgeyici bir inhibitör madde olan AA'in o-kinonların birikmesini önleyerek veya o-kinonlardan stabil renksiz ürünler oluşturarak melanin oluşumunu engelleyip enzimatik esmerleşmeyi önlemesinden kaynaklanabilmektedir (Landi ve ark., 2013; Soares ve Fonseca, 2008). Toplam fenol içeriği, PPO gibi oksidatif enzimler ile hücre parçalanmasından sonra meydana gelen fenoller arasındaki reaksiyonun bir sonucu olduğu için her zaman enzimatik esmerleşme ile bağlantılıdır (Marangoni ve ark., 1996; Degl'Innocenti ve ark., 2005). Ayrıca, esmerleşme reaksiyonları, toplam fenoliklerde bir azalma ve PPO enziminde bir artış ile ilişkilendirilmiştir (Toivonen, 1992). Fenolik bileşiklerin PPO enzimi için substrat görevi görebileceği iyi bilinmektedir, toplam fenolik bileşiklerin azalması büyük olasılıkla PPO enzimi tarafından oksidasyona bağlıdır (Altunkaya ve Gökmen, 2008). Katkı maddelerinin ilavesi, kontrol grubuna göre, toplam fenolik madde üzerindeki değişimleri farklı derecede etkilemiştir. Zeytinyağı örneklerinin toplam fenol içerikleri kontrol örneğine göre daha yüksek bulunmuştur. Hasar görmüş ve hasar görmemiş zeytinlerden elde edilen zeytinyağlarına ekstraksiyon sırasında inhibitör madde olarak AA ilave edildiğinde toplam fenolik madde içeriğinin kontrol örneğine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Migliorini ve ark., 2012). Hiçbir katkı maddesi uygulanmadan elde edilen kontrol grubu zeytinyağlarının toplam fenolik madde değerleri 511.30 mg GEA/kg iken katkı maddelerin uygulanmasıyla artmıştır. Toplam fenolik madde içeriğinde %2 MgCl<sub>2</sub> içeren örneklerde küçük bir artış görülürken, %2 L-sis içeren örneklerde ise daha fazla artış görülmüştür. Zeytinyağları %2 L-sis (1903.55-1894.67 mg GEA/kg) örneğine göre kıyaslandığında %1 OA + %1 L-sis (803.47-801.86 mg GEA/kg), %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> (759.89 mg GEA/kg), %1 L-sis + %1 AA (901.13 mg

GEA/kg) ve %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> (748.59 mg GEA/kg) örneklerinin toplam fenolik madde içeriklerinin düşük oluşu içeriğindeki L-sis katkı maddesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, katkı maddelerinin tek tek ve kombinasyon halinde kullanımının toplam fenolik madde içeriğini artırdığı belirlenmiştir. Zeytinyağının farklı katkı maddeleriyle elde edilmesi sonucunda toplam fenolik madde miktarındaki değişim, DPPH yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivitesindeki değişim ile benzerlik göstermektedir.

DPPH radikal tutucu aktivite analizinde, antioksidanlar DPPH ile reaksiyona girmekte ve DPPH çözeltisini sarı renkli a, a-difenil-β-pikril hidrazine dönüştürmektedir. Renk bozulmasının derecesi numunenin radikal tutma potansiyelini göstermektedir (Blois, 1958). Zeytinyağı örneklerinin antioksidan aktiviteleri DPPH ve β-karoten ağartma yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.18’de verilmiştir. DPPH radikal tutucu aktivitede bütün uygulamalar ile kontrol grubuna göre artış görülmüştür. Bu yöntemle elde edilen en yüksek antioksidan aktivite %90.19 inhibisyon değeriyle %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örneğinde, en düşük antioksidan aktivite %23.52 inhibisyon değeriyle kontrol örneğinde belirlenmiştir. %2 oranında OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> içeren örnekler ise sırasıyla %65.15-61.89, %84.93-80.48, %38.00-39.33 ve %24.04-25.33 değerlerinde DPPH radikal tutucu aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. OA bazı sistemlerde etkili bir antioksidan olarak görev yapmaktadır (Kayashima ve Katayama, 2002). Bu çalışmada, %2 OA kullanıldığında da DPPH antioksidan aktivite değerlerinin arttığı görülmüştür. Katkı maddesi uygulamaları kontrol örneği ile karşılaştırıldığında zeytinyağının antioksidan özellikleri daha iyi korunmuştur denilebilmektedir. Zeytinyağlarında kullanılan katkı miktarı ve çeşitine göre DPPH değerlerinde farklılıklar oluşmuş ve kontrol örneğine göre artışlar tespit edilmiştir.

β-karoten ağartma yöntemi, bir emülsiyonda linoleik asit oksidasyonu ile oluşan radikallerle reaksiyona girerek β-karotenin sarı rengini kaybetmesine dayanmaktadır. β-karoten ağartma hızı, antioksidanların varlığında yavaşlatılabilmektedir (Lu ve ark., 2014). Çizelge 4.18 β-karoten ağartma yöntemiyle katkı ilaveli hamurdan elde edilen zeytinyağlarının antioksidan aktivitesini göstermektedir. Genel olarak, örneklerin antioksidan aktivitesi %7.70-14.58 arasında değişim göstermiştir. İnhibitör maddeler %2 oranlarında tek başlarına kullanıldıklarında AA (%13.59-13.69), MgCl<sub>2</sub> (%11.47-11.69), OA (%9.19-9.39) ve L-sis (%8.31-9.22) sırasıyla en yüksek değerleri vermiştir. β-karoten ağartma yöntemine göre AA zeytinyağlarının antioksidan aktivitesini etkileyen önemli bir katkı olarak görünmektedir. İkili kombinasyon halinde kullanılan katkı maddelerle elde edilen zeytinyağları, %1 oranlarında kullanıldıklarında, %2 oranında kullanılan katkılarla elde edilen zeytinyağlarından daha düşük antioksidan aktivite gösterdikleri bulunmuştur. β-karoten ağartma yöntemi,

lipofilik antioksidanların araştırılmasında yardımcı yöntemlerden birisidir (Kulisic ve ark., 2004). Çizelge 4.18'e göre lipofilik antioksidanların tespitinde sırasıyla %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %2 AA, %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %2 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 AA ve %1 OA + %1 AA karışımlarının ilavesiyle elde edilen zeytinyağı örnekleri maksimum aktivite göstermişlerdir.



**Çizelge 4.18.** Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten üzerine etkisi

Numune no	Toplam fenolik madde (mg GEA/kg)	DPPH (%)	$\beta$ -karoten ağartma (%)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	1332.93 $\pm$ 26.96*	43.48 $\pm$ 2.45	9.85 $\pm$ 0.62
%1 OA + %1 L-sis	803.47 $\pm$ 26.67	27.11 $\pm$ 0.11	8.92 $\pm$ 0.69
%2 MgCl <sub>2</sub>	535.51 $\pm$ 20.59	24.04 $\pm$ 0.36	11.47 $\pm$ 1.28
%2 L-sis	1903.55 $\pm$ 16.12	84.93 $\pm$ 1.70	9.22 $\pm$ 0.90
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	1701.78 $\pm$ 20.59	32.74 $\pm$ 1.12	10.23 $\pm$ 0.78
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	1778.45 $\pm$ 25.62	36.59 $\pm$ 0.51	14.58 $\pm$ 2.05
%2 AA	1042.37 $\pm$ 25.51	38.00 $\pm$ 1.95	13.69 $\pm$ 1.82
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	748.59 $\pm$ 18.81	29.93 $\pm$ 2.25	12.18 $\pm$ 1.03
%2 OA	1877.72 $\pm$ 24.57	65.15 $\pm$ 0.32	9.39 $\pm$ 0.34
%2 AA	1072.24 $\pm$ 22.50	39.33 $\pm$ 2.26	13.59 $\pm$ 0.77
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	1320.82 $\pm$ 25.28	35.26 $\pm$ 4.67	8.41 $\pm$ 0.63
%2 OA	1809.93 $\pm$ 26.63	61.89 $\pm$ 0.95	9.19 $\pm$ 0.74
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	759.89 $\pm$ 7.40	33.30 $\pm$ 0.61	10.62 $\pm$ 1.44
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	1918.89 $\pm$ 23.85	90.19 $\pm$ 0.74	11.95 $\pm$ 0.76
%2 MgCl <sub>2</sub>	537.13 $\pm$ 26.67	25.33 $\pm$ 1.44	11.69 $\pm$ 0.98
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	1215.90 $\pm$ 24.73	35.15 $\pm$ 5.52	7.70 $\pm$ 1.21
%1 L-sis + %1 AA	901.13 $\pm$ 23.52	30.93 $\pm$ 1.48	11.64 $\pm$ 0.62
%1 OA + %1 AA	1886.60 $\pm$ 28.27	64.30 $\pm$ 2.12	11.16 $\pm$ 0.56
%2 L-sis	1894.67 $\pm$ 19.22	80.48 $\pm$ 0.39	8.31 $\pm$ 0.28
%1 OA + %1 L-sis	801.86 $\pm$ 15.75	29.78 $\pm$ 1.35	8.98 $\pm$ 0.82
<b>K</b>	511.30 $\pm$ 20.16	23.52 $\pm$ 0.97	10.82 $\pm$ 0.40

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama  $\pm$  standart sapma

Farklı katkı maddeler kullanılarak elde edilen zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Formülasyona bağlı olarak toplam fenolik madde, DPPH antioksidan aktivite değerleri ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değişimleri için en iyi tahminlenen modeller sırasıyla özel kübik, özel kübik ve doğrusal olarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde ve DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri için incelenen modellerin P değerleri  $<0.0001$  iken  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri için incelenen modele ait P değerinin 0.0014 olarak hesaplanmış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.19). Zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri için %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli modeller oluşturulmuştur. İnhibitör maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytinyağlarının Folin Ciocalteu testi ile belirlenen toplam fenolik madde içeriği üzerine istatistiksel olarak önemli seviyede etkili bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Ayrıca,  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken DPPH antioksidan aktivite değerleri üzerine de istatistiksel olarak anlamlı etkiler tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Buna göre, formülasyona bağlı olarak toplam fenolik madde ve DPPH değerleri üzerine istatistiki açıdan, doğrusal ve birinci dereceden etkisi önemli olan terimler OA  $\times$  L-sis, L-sis  $\times$  AA, L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonlarıdır ( $P<0.01$ ). Toplam fenolik madde değerleri için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken ( $P>0.05$ ), DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri için geliştirilen tüm modeller ise uyumsuzluk testini geçememiştir ( $P<0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.2486, 0.0152 ve 0.0010 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun toplam fenolik madde için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri için belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.9992, 0.9912 ve 0.6124 ve uyarlanan belirleme katsayıları R<sup>2</sup>: 0.9976, 0.9720 ve 0.5397 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %99.92, %99.12 ve %61.24'ü belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri ise belirlenen R<sup>2</sup> değerlerine yakın olduğundan belirlenen toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri için Çizelge 4.19'da oluşturulan regresyon eşitlikleri verilmiştir. Regresyon eşitliklerine göre, toplam fenolik madde ve DPPH değerleri için en az MgCl<sub>2</sub> katkısının etki ettiği görülmektedir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA  $\times$  AA, AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve OA  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> etkileşimlerinin pozitif interaksiyon etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının toplam fenolik madde ve DPPH

antioksidan aktivite değerlerini artırdığı belirlenmiştir. Ancak, herhangi bir katkı maddenin interaksiyonunun ise  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri üzerine önemli bir etki göstermediği tespit edilmiştir.



**Çizelge 4.19.** Zeytinyağlarının toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

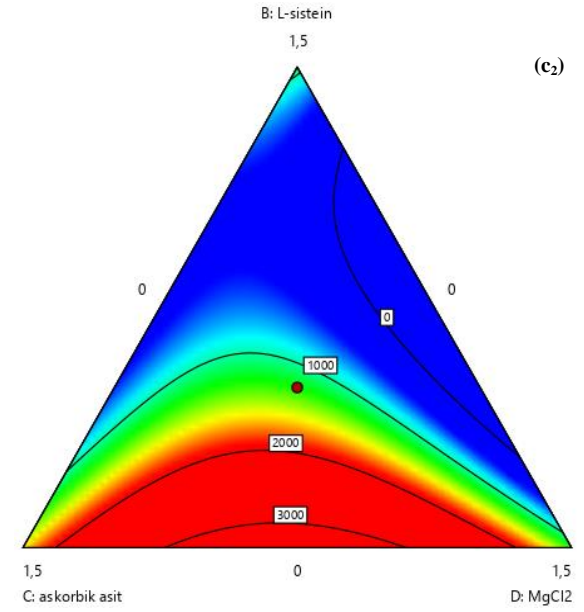
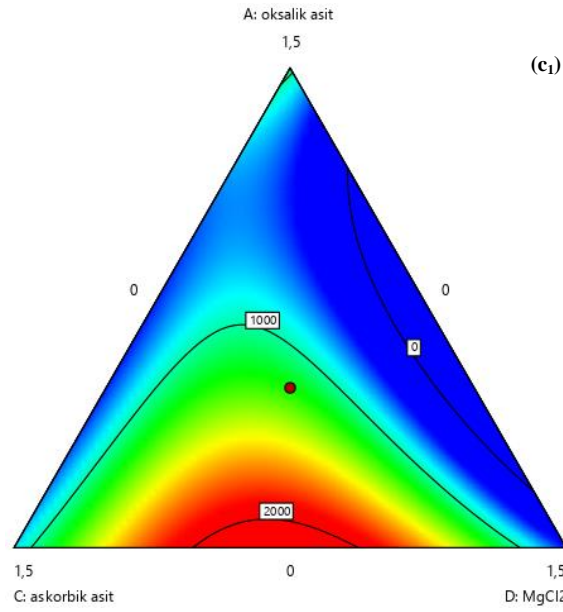
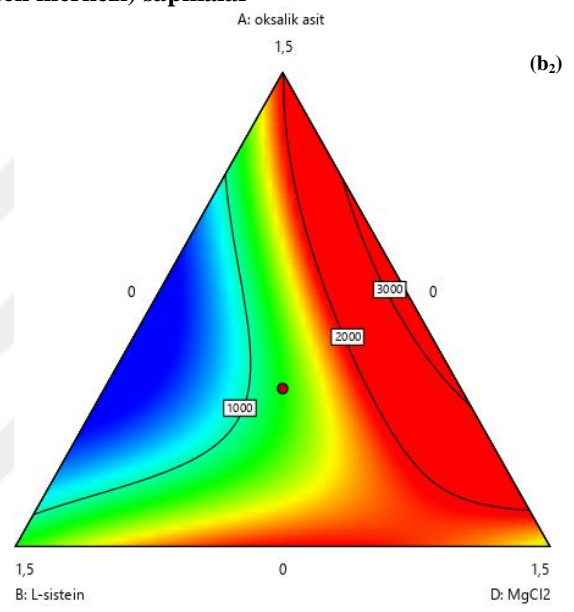
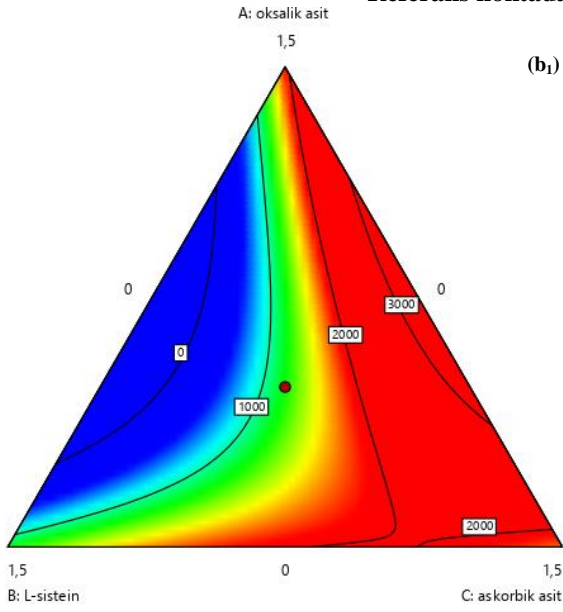
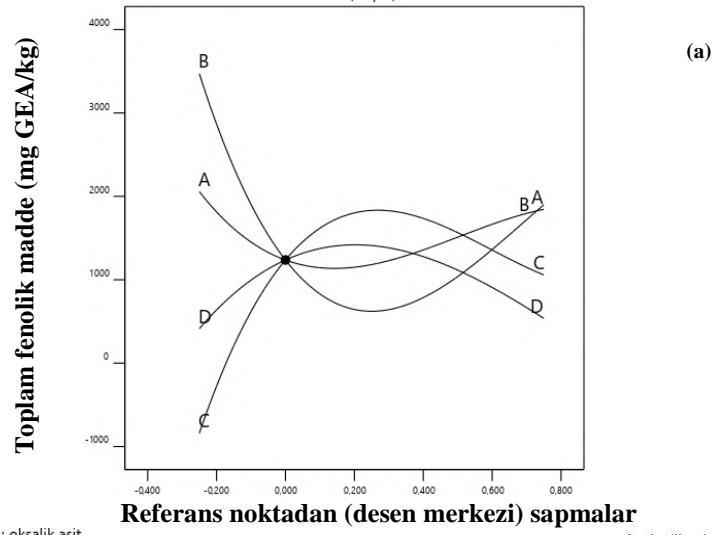
Kaynak	Toplam fenolik madde			DPPH			$\beta$ -karoten ağartma		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	13	613.69	<0.0001	13	51.72	<0.0001	3	8.43	0.0014
AB	1	2444.90	<0.0001	1	216.70	<0.0001	-	-	-
AC	1	247.38	<0.0001	1	10.52	0.0176	-	-	-
AD	1	340.23	<0.0001	1	9.09	0.0235	-	-	-
BC	1	426.39	<0.0001	1	59.29	0.0003	-	-	-
BD	1	267.89	<0.0001	1	28.26	0.0018	-	-	-
CD	1	1629.07	<0.0001	1	218.57	<0.0001	-	-	-
ABC	1	34.93	0.0010	1	1.11	0.3330	-	-	-
ABD	1	271.25	<0.0001	1	3.35	0.1170	-	-	-
ACD	1	159.62	<0.0001	1	0.0298	0.8685	-	-	-
BCD	1	58.76	0.0003	1	8.42	0.0273	-	-	-
Hata	6	-	-	6	-	-	16	-	-
Model uyumsuzluğu	1	1.70	0.2486	1	13.11	0.0152	11	26.79	0.0010
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9992	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9976		R <sup>2</sup> =0.9912	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9720		R <sup>2</sup> =0.6124	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5397	
Toplam fenolik madde = $1844.49 \times A + 1899.78 \times B + 1057.97 \times C + 536.99 \times D - 4272.55 \times (A \times B) + 1752.13 \times (A \times C) + 2054.82 \times (A \times D) - 2300.32 \times (B \times C) - 1823.31 \times (B \times D) + 4496.30 \times (C \times D) - 17614.77 \times (A \times B \times C) - 49085.97 \times (A \times B \times D) + 37857.35 \times (A \times C \times D) + 22968.23 \times (B \times C \times D)$									
DPPH = $63.36 \times A + 82.55 \times B + 38.51 \times C + 24.53 \times D - 179.30 \times (A \times B) + 50.93 \times (A \times C) - 47.35 \times (A \times D) - 120.92 \times (B \times C) - 83.48 \times (B \times D) + 232.16 \times (C \times D) - 442.28 \times (A \times B \times C) + 768.92 \times (A \times B \times D) + 72.97 \times (A \times C \times D) - 1225.43 \times (B \times C \times D)$									
$\beta$ -karoten ağartma = $8.99 \times A + 9.19 \times B + 13.84 \times C + 10.86 \times D$									

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

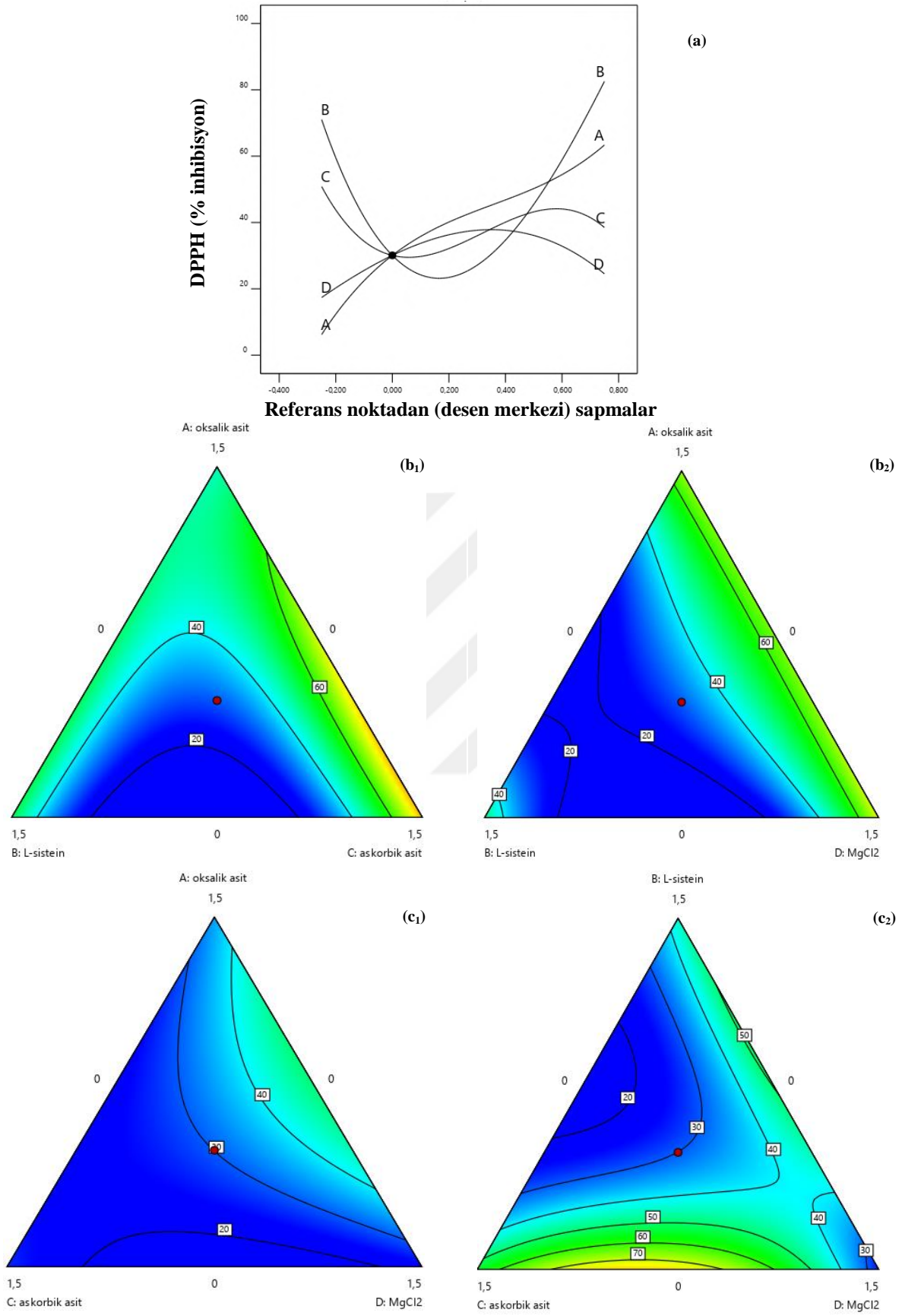
İnhibitör maddelerle oluşturulan iz eğim incelendiğinde katkı kullanımının artması toplam fenolik madde üzerine pozitif etkide bulunmuştur (Şekil 4.16). Orta seviyeye kadar OA ve L-sis kullanımı toplam fenolik madde miktarını azaltmış daha sonra ters yönde bir etki göstermiştir. L-sis ve AA miktarının toplam fenolik madde miktarı üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.16b<sub>1</sub> ve Şekil 4.16b<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki L-sis konsantrasyonunun artırılması, zeytinyağlarının toplam fenolik madde içeriği üzerine daha fazla etki etmiştir. AA, fenolik bileşikler yerine PPO enzimi için substrat oluşturan bir antioksidan gibi davranarak PPO enzim aktivitesini inhibe etmektedir. Böylece daha yüksek toplam fenolik madde içeriğine sebep olmaktadır (Segovia-Bravo ve ark., 2007; Ortega-Garcia ve Peragon, 2009). OA ve MgCl<sub>2</sub> toplam fenolik madde miktarını önemli düzeyde değiştirmemiştir (Şekil 4.16a).

DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan aktivite değeri için oluşturulan iz eğim incelendiğinde OA kullanımının artması neredeyse doğrusal olarak artarak DPPH değeri üzerine olumlu etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.17a). Ayrıca, OA miktarının DPPH değeri üzerine etkisinin yüksek olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 4.17b<sub>2</sub>). AA miktarının artması DPPH değeri üzerine olumsuz etki göstermiştir. MgCl<sub>2</sub> miktarının artması da DPPH değerini belli bir düzeye kadar artırmış daha sonra azaltmıştır. Orta seviyeye kadar MgCl<sub>2</sub> kullanımı DPPH değerini artırmış daha sonra ters etki göstermiştir.

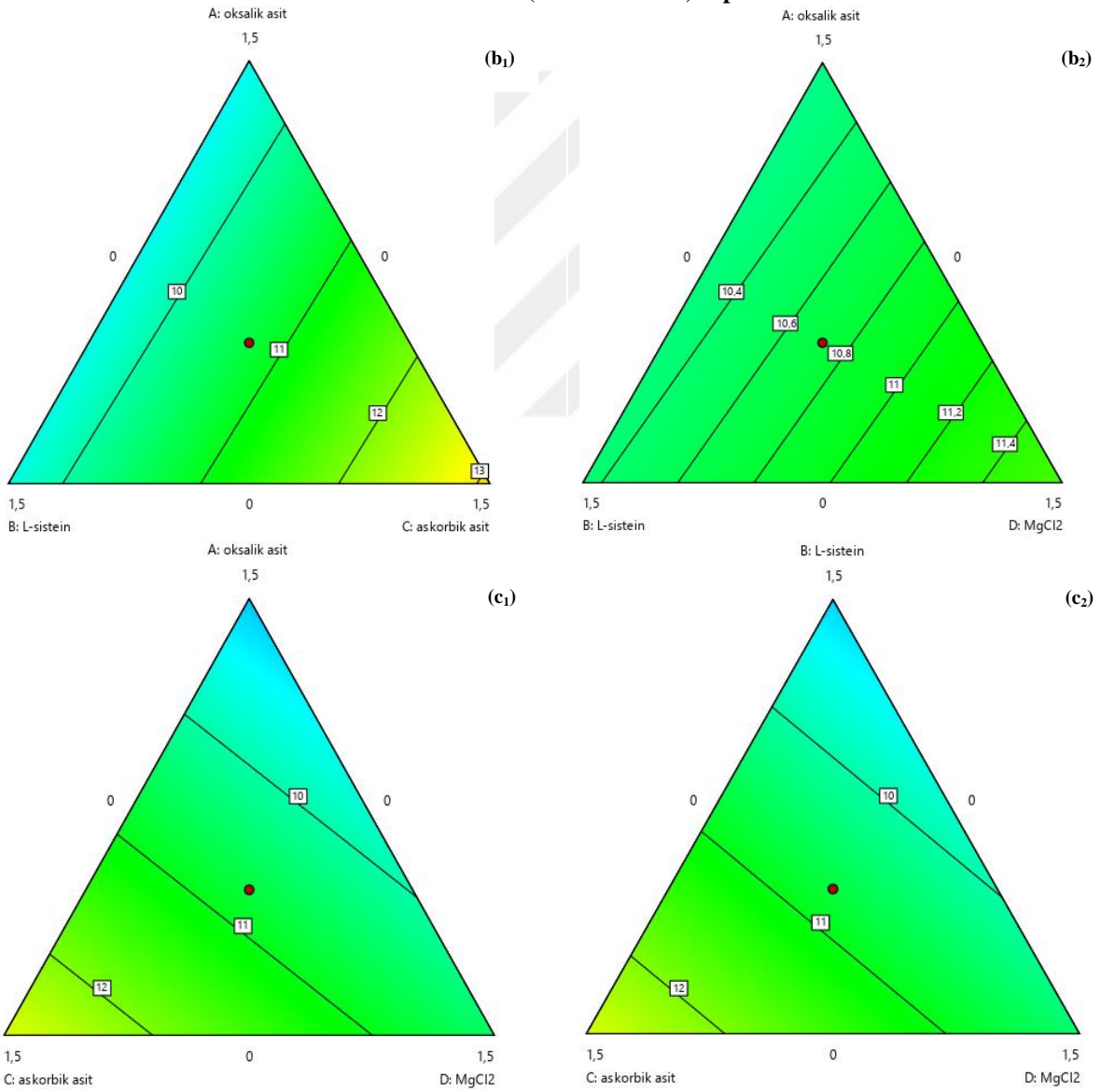
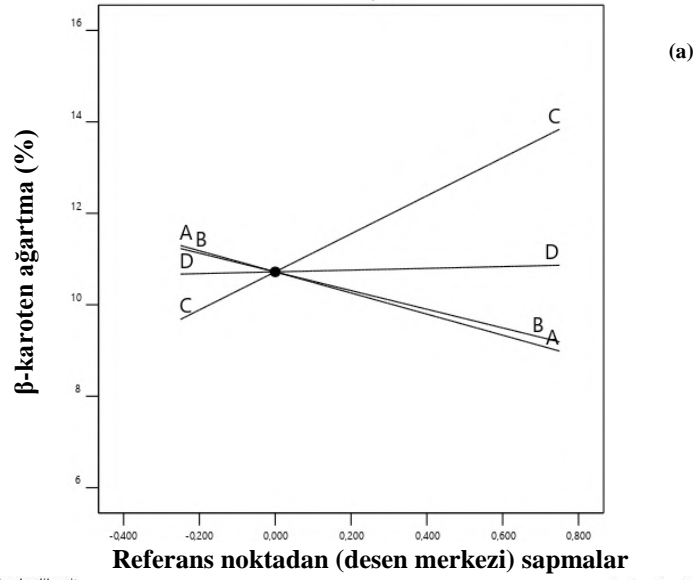
β-karoten ağartma yöntemiyle antioksidan aktivitenin belirlenmesi için oluşturulan iz eğim grafiğine göre MgCl<sub>2</sub> katkısının kullanım miktarlarının artmasıyla lipofilik antioksidan aktivitenin tespitinde rol oynayan β-karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivitede önemli bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.18a, Şekil 4.18b<sub>2</sub>). Çizelge 4.20'de tespit edildiği gibi yüksek antioksidan aktivite için bir inhibitör madde olarak AA söylenebilmektedir. Şekil 4.18.b<sub>1</sub>'deki kontur grafiği, formülasyondaki AA oranının artmasının β-karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerini artırdığını göstermiştir. Orta seviyeye kadar OA ve L-sis kullanımı antioksidan aktiviteyi azaltmış, AA kullanımı ise sürekli artırmıştır. Kullanılan tüm katkı maddeleri β-karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite üzerine doğrusal olarak etki etmiştir. OA ve L-sis miktarının ise β-karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite üzerine benzer etki gösterdiği tespit edilmiştir.



**Şekil 4.16.** Katkı maddelerinin zeytinyağının toplam fenolik madde değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.17.** Katkı maddelerinin zeytinyağının DPPH değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.18.** Katkı maddelerinin zeytinyağının  $\beta$ -karoten değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri  
a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

İnhibitör ilaveli zeytin hamurlarının nem içerikleri Çizelge 4.20’de verilmiştir. Zeytin hamurlarının nem içerikleri %39.40-51.87 aralığında değişmektedir. En yüksek nem değerleri sırasıyla %51.87 nem içeriğiyle %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> ve %50.06-50.11 nem içeriğiyle %2 MgCl<sub>2</sub> örneklerinde belirlenmiştir. %50’den fazla nem içeriğinin yağ ekstraksiyonu için "zor" zeytin hamuruna neden olduğu kabul edilmiştir (Di Giovacchino, 1991) . Bu sebeple, genel olarak zeytinyağına geçen fenolik madde miktarı az olmaktadır. Çizelge 4.20’de de görüldüğü gibi %2 MgCl<sub>2</sub> (535.51-537.13 mg GEA/kg) ve %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> (759.89 mg GEA/kg) örneklerinin toplam fenolik madde içerikleri nem oranı düşük olan diğer örneklerden daha düşüktür. Nem miktarları, kullanılan katkı çeşitine göre değişiklik göstermiştir. İnhibitörlerin ikili kombinasyon şeklinde kullanılması ile %1 L-sis + %1 AA, %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 OA + %1 AA, %1 OA + %1 L-sis ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örneklerin nem değerleri sırasıyla yüksek bulunmuştur. Bu örneklerde kullanılan katkıları kıyaslandığında, nem miktarındaki artışı en fazla L-sis katkısı etkilemiştir denilebilmektedir. Bunun yanı sıra, katkı miktar ve çeşitine göre zeytin hamurlarının nem miktarlarında farklılıklar gözlenmiş, ancak düzenli bir artış veya azalış belirlenmemiştir.

Çizelge 4.20’de katkı maddesi ilave edilmiş zeytin hamurlarındaki toplam fenolik madde değerleri gösterilmiştir. Zeytin meyvesi, hamur ağırlığının %1-3’ü arasında değişen çok önemli bir fenolik bileşik konsantrasyonu içermektedir (Restuccia ve ark., 2018). Analiz edilen numuneler, toplam fenolik madde konsantrasyonlarında geniş bir yelpazede (772.80-2064.16 mg GEA/kg) değişkenlik göstermiştir. Toplam fenolik madde konsantrasyonlarında gözlenen farklılıklar, katkı ilavesinin etkisini doğrulamaktadır. Veriler, katkı ilavesinin zeytin hamurlarından fenolik bileşiklerin ekstraksiyon verimliliğini arttırmaya uygun olduğunu göstermektedir. Toplam fenol içeriği en yüksek zeytin hamurları %2 AA ilaveli örnekleredir. Bunu 1914.04 mg GEA/kg değeriyle %1 L-sis + %1 AA örneği ve 1911.62 mg GEA/kg değeriyle %1 OA + %1 AA örneğinin takip ettiği gözlenmiştir. İnhibitör oranları göz önüne alındığında %2 oranında OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarını içeren zeytin hamurlarının toplam fenolik madde içerikleri sırasıyla 1380.55-1341.81 mg GEA/kg, 1424.13-1494.35 mg GEA/kg, 2039.95-2064.16 mg GEA/kg ve 975.38-976.19 mg GEA/kg olarak belirlenmiştir. Zeytin hamurlarındaki toplam fenol miktarları katkı çeşiti ve miktarlarına bağlı olarak değişiklik göstermiştir. %2 oranında AA içeren örnekler en yüksek toplam fenolik madde içeriğine sahiptir. Buradan hareketle, %1 oranlarında katkı ilave edilen örnekler (%1 OA + %1 L-sis, %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 AA, %1 OA + %1 AA örnekleri) incelendiğinde, AA içeren zeytin hamurlarının (%1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 AA, %1 OA + %1 AA) diğer örnekler (%1 OA + %1 L-sis, %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub>) göre daha yüksek toplam fenolik madde miktarına

sahip olduğu tespit edilmiştir. L-sis katkı maddesini %1 oranında içeren örnekler (%1 OA + %1 L-sis, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub>) AA'lı örneklerden sonra ikinci en yüksek toplam fenolik madde içeriği olan örnekler olarak belirlenmişlerdir.

Zeytin hamuru ekstraktlarının DPPH ve  $\beta$ -karoten ağartma analizleri ile belirlenen antioksidan aktivite değerleri Çizelge 4.20'de gösterilmiştir. %2 oranında AA, L-sis, OA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarını içeren örnekler sırasıyla en yüksek DPPH radikal tutma aktivitesi göstermişlerdir. AA, L-sis, OA ve MgCl<sub>2</sub> içeren örneklerin % inhibisyon değerleri sırasıyla %80.15-83.63, %78.00-80.04, %63.30-68.22 ve %58.41-60.85 olarak belirlenmiştir. DPPH yöntemine benzer şekilde,  $\beta$ -karoten ağartma yöntemine göre antioksidan kapasite incelendiğinde, %2 oranında katkı maddesi içeren örnekler arasında AA içeren örnekler en yüksek değeri (%42.48-42.61) göstermiştir. Katkı maddeler %1 oranında kullanıldığında zeytin hamurlarının DPPH radikal tutma aktivitesini olumsuz yönde en fazla etkileyen katkı madde MgCl<sub>2</sub>'dir. %2 oranında kullanıldığında en yüksek DPPH değerini gösteren AA ilaveli örneklerle göre kıyaslandığında, %1 oranında AA içeren %1 L-sis + %1 AA ve %1 OA + %1 AA örnekleri yüksek DPPH değeri gösterirken, %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örneğinin DPPH değeri daha düşük olarak belirlenmiştir. MgCl<sub>2</sub> katkısı içeren %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örnekleri incelendiğinde ise MgCl<sub>2</sub>'nin antioksidan kapasiteyi düşürdüğü söylenebilmektedir.  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi, farklı ekstraktların  $\beta$ -karoten/linoleik asit emülsiyonunda  $\beta$ -karotenin oksidatif ağartmasını azaltma kabiliyetine dayanan bir yöntemdir (Perez ve ark., 2003). %2 oranında AA içeren örneklerin  $\beta$ -karoten ağartma yöntemine göre elde edilen antioksidan aktiviteleri (%42.61 ve %42.48) diğer örneklerden yüksektir. Bu sebeple, AA'nın  $\beta$ -karotenin oksidatif ağartmasını azaltma kabiliyeti daha yüksektir denilebilmektedir. İnhibitör miktarı ve oranına bağlı olarak zeytin hamurlarının  $\beta$ -karoten ağartma yöntemine göre antioksidan aktiviteleri değişiklik göstermiş, ancak düzenli artış veya azalış belirlenmemiştir.  $\beta$ -karoten ağartma yöntemine göre antioksidan aktivite belirlendiğinde en yüksek değer (%55.87) katkı maddesi kullanılmayan kontrol örneğinde tespit edilmiştir. Kontrol örneğini %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> örneği takip ederek katkı ilaveli zeytin hamurları içerisinde en yüksek antioksidan aktivite değerine (%44.15) sahip olduğu bulunmuştur. Zeytin hamurlarında  $\beta$ -karoten ağartma yöntemine göre antioksidan aktivite belirlendiğinde, zeytin hamurlarının antioksidan aktivitelerinde azalma tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.20.** Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytin hamurlarının nem içerikleri, toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisi

Numune no	Nem içeriği (%)	Toplam fenolik madde (mg GEA/kg)	DPPH (% inhibition)	$\beta$ -karoten ağartma (%)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	43.51 $\pm$ 1.44*	1153.75 $\pm$ 11.10	72.85 $\pm$ 2.04	33.14 $\pm$ 1.92
%1 OA + %1 L-sis	40.46 $\pm$ 1.59	1286.12 $\pm$ 20.59	68.70 $\pm$ 1.95	32.94 $\pm$ 1.77
%2 MgCl <sub>2</sub>	50.11 $\pm$ 1.51	975.38 $\pm$ 19.42	58.41 $\pm$ 3.73	41.74 $\pm$ 0.94
%2 L-sis	39.47 $\pm$ 1.65	1424.13 $\pm$ 26.67	78.00 $\pm$ 4.81	38.38 $\pm$ 1.79
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	42.04 $\pm$ 0.78	788.14 $\pm$ 24.21	34.33 $\pm$ 1.28	37.02 $\pm$ 3.12
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	42.73 $\pm$ 1.15	1545.20 $\pm$ 24.85	75.59 $\pm$ 3.99	37.59 $\pm$ 0.58
%2 AA	44.52 $\pm$ 0.59	2039.95 $\pm$ 15.12	83.63 $\pm$ 4.35	42.61 $\pm$ 2.40
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	45.49 $\pm$ 1.03	1633.98 $\pm$ 25.43	76.63 $\pm$ 2.00	41.77 $\pm$ 1.81
%2 OA	40.14 $\pm$ 1.37	1380.55 $\pm$ 27.54	63.30 $\pm$ 1.77	37.20 $\pm$ 1.85
%2 AA	44.21 $\pm$ 1.34	2064.16 $\pm$ 19.82	80.15 $\pm$ 3.40	42.48 $\pm$ 1.65
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	44.36 $\pm$ 4.19	1168.28 $\pm$ 19.82	70.37 $\pm$ 2.21	44.15 $\pm$ 2.91
%2 OA	41.37 $\pm$ 0.10	1341.81 $\pm$ 23.01	68.22 $\pm$ 1.06	38.18 $\pm$ 2.26
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	51.87 $\pm$ 2.79	1224.78 $\pm$ 24.49	64.85 $\pm$ 2.68	41.10 $\pm$ 2.31
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	39.40 $\pm$ 1.36	1423.33 $\pm$ 19.57	57.78 $\pm$ 4.30	42.55 $\pm$ 2.46
%2 MgCl <sub>2</sub>	50.06 $\pm$ 3.62	976.19 $\pm$ 23.27	60.85 $\pm$ 0.89	40.52 $\pm$ 1.07
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	44.66 $\pm$ 0.95	1671.11 $\pm$ 20.88	71.19 $\pm$ 0.42	36.87 $\pm$ 3.23
%1 L-sis + %1 AA	44.82 $\pm$ 2.47	1914.04 $\pm$ 19.22	78.81 $\pm$ 3.55	39.84 $\pm$ 3.36
%1 OA + %1 AA	41.71 $\pm$ 2.85	1911.62 $\pm$ 26.19	76.37 $\pm$ 3.72	35.51 $\pm$ 1.70
%2 L-sis	41.23 $\pm$ 0.58	1494.35 $\pm$ 21.70	80.04 $\pm$ 3.17	39.33 $\pm$ 3.77
%1 OA + %1 L-sis	41.83 $\pm$ 1.06	1244.15 $\pm$ 24.37	70.22 $\pm$ 2.38	30.58 $\pm$ 2.17
<b>K</b>	48.29 $\pm$ 0.94	772.80 $\pm$ 17.18	39.78 $\pm$ 0.40	55.87 $\pm$ 2.45

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verildi.

Farklı katkı maddelerle elde edilen zeytin hamurlarının nem miktarları, toplam fenolik madde değerleri, DPPH ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.21’de sunulmuştur. Nem miktarı için belirlenen model kuadratik, toplam fenolik madde miktarları için belirlenen model doğrusal iken antioksidan aktivite analizlerinin modeli ise özel kübik olarak belirlenmiştir. Zeytin hamurlarının nem miktarı, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitenin değerlerine ait varyans analizinde  $P < 0.0001$  olup katkı maddelerden en az birisinin zeytin hamurlarının nem miktarı, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitenin değerleri üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ). Varyans analiz sonuçları, nem değerlerini ve DPPH yöntemiyle elde edilen antioksidan miktarlarını sadece AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun etkilediğini göstermektedir ( $P < 0.01$ ). L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksyonu sadece nem miktarı için ( $P < 0.01$ ), OA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksyonu sadece DPPH miktarı için ( $P < 0.01$ ), OA  $\times$  L-sis  $\times$  AA, OA  $\times$  L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve OA  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksyonları ise DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi ile elde edilen antioksidan aktivite değerleri için ( $P < 0.05$ ) belirlenen doğrusal etkileşimlerin istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Nem, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle antioksidan aktivitesi için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken ( $P > 0.05$ ), zeytin hamurundaki toplam fenolik madde değerleri için geliştirilen model uyumsuzluk testini geçmemiştir ( $P < 0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.1834, 0.1169 ve 0.1615 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun nem değeri, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P > 0.05$ ). Zeytin hamurlarının toplam fenolik madde değerleri için ise istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmemiştir. Zeytin hamurlarının nem miktarı, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitenin belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.9534, 0.8367, 0.9513 ve 0.9371 ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.9115, 0.8061, 0.9159 ve 0.8805 olarak bulunmuştur. R<sup>2</sup>, modele değişken eklenip eklenmemesine ve değişkenlerin istatistiksel olarak önemli olup olmamasına bakılmaksızın her zaman artarken, uyarlanan R<sup>2</sup> ise eklenen değişkenlerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu durumlarda azalmaktadır. Bu sebeple, R<sup>2</sup> ve uyarlanan R<sup>2</sup> değerlerinin birbirine yakın olması istenilmektedir. Çizelge 4.21’e göre zeytin hamurlarının nem içeriği, toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin R<sup>2</sup> ve uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri birbirlerine oldukça yakın olduğundan katkı

maddelerin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, nem miktarı, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitesindeki değişkenliğin sırasıyla %95.34, %83.67, %95.13 ve %93.71'i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan belirlenen nem miktarı, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivitenin değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Nem değerleri, toplam fenolik madde miktarı, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.21'de verilmiştir. Farklı katkı maddeler ve farklı oranlar kullanılarak elde edilen zeytin hamurlarının nem miktarlarındaki değişim incelendiğinde OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  katkı miktarı ile OA  $\times$  L-sis, L-sis  $\times$  AA ve L-sis  $\times$   $MgCl_2$  interaksiyonlarının artması ile nem miktarının arttığı görülmektedir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre toplam fenolik madde içeriğini herhangi bir interaksiyon etkilememektedir. DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerlerini ise OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  katkılarının yanı sıra OA  $\times$  L-sis  $\times$   $MgCl_2$  etkileşimleri pozitif interaksiyon etkilerinden dolayı zeytinyağının antioksidan içeriğini artırdığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.21.** Zeytin hamurlarının nem içeriği, toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Nem içeriği			Toplam fenolik madde			DPPH			$\beta$ -karoten ağartma		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	9	22.74	<0.0001	3	27.33	<0.0001	8	26.86	<0.0001	9	16.55	<0.0001
AB	1	1.21	0.2962	-	-	-	-	-	-	1	34.38	0.0002
AC	1	0.0250	0.8776	-	-	-	-	-	-	1	9.25	0.0124
AD	1	7.31	0.0222	-	-	-	1	59.18	<0.0001	-	-	-
BC	1	7.17	0.0232	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BD	1	38.82	<0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD	1	49.38	<0.0001	-	-	-	1	12.80	0.0043	-	-	-
ABC	-	-	-	-	-	-	1	4.88	0.0493	1	6.55	0.0284
ABD	-	-	-	-	-	-	1	6.47	0.0273	1	7.85	0.0188
ACD	-	-	-	-	-	-	1	5.45	0.0395	1	7.84	0.0188
BCD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	8.82	0.0141
Hata	10	-	-	16	-	-	11	-	-	10	-	-
Model uyumsuzluğu	5	2.36	0.1834	11	40.70	0.0004	6	3.11	0.1169	5	2.57	0.1615
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9534	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9115		R <sup>2</sup> =0.8367	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8061		R <sup>2</sup> =0.9513	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9159		R <sup>2</sup> =0.9371	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8805	
Nem içeriği = $40.87 \times A + 40.34 \times B + 44.26 \times C + 49.82 \times D + 3.90 \times (A \times B) - 0.6964 \times (A \times C) - 11.92 \times (A \times D) + 11.81 \times (B \times C) + 27.77 \times (B \times D) - 31.03 \times (C \times D)$												
Toplam fenolik madde = $1257.87 \times A + 1496.33 \times B + 2085.32 \times C + 904.46 \times D$												
DPPH = $65.97 \times A + 77.30 \times B + 82.53 \times C + 58.99 \times D - 109.33 \times (A \times D) - 50.69 \times (C \times D) - 795.21 \times (A \times B \times C) + 917.94 \times (A \times B \times D) + 855.36 \times (A \times C \times D)$												
$\beta$ -karoten ağartma = $37.23 \times A + 39.00 \times B + 42.60 \times C + 41.18 \times D - 25.07 \times (A \times B) - 16.93 \times (A \times C) - 381.18 \times (A \times B \times C) + 414.22 \times (A \times B \times D) - 416.49 \times (A \times C \times D) + 439.59 \times (B \times C \times D)$												

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

İnhibitör maddelerin zeytin hamurlarının nem, toplam fenolik madde, DPPH radikal tutma aktivitesi ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle belirlenen antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuş ve sırasıyla Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22’de verilmiştir. OA ve AA katkılarının miktarlarının artması nem miktarını ilk duruma göre azaltmıştır (Şekil 4.19a). Ayrıca,  $MgCl_2$  miktarının artması nem içeriğini neredeyse sürekli artırmıştır.  $MgCl_2$  konsantrasyonunun artırılması, zeytin hamurunun nem içeriğini sürekli artırmıştır (Şekil 4.19.c<sub>1</sub>). Zeytin hamurunun nem içeriği, natürel sızma zeytinyağının fenolik içeriğini olumsuz etkilemektedir. Zeytinyağına fenolik geçiş oranı daha düşük olan zeytin çeşitlerinde yüksek oranda nem miktarı sergilenmiştir (Talhoui ve ark., 2016). Bu sebeple  $MgCl_2$  katkısının miktarındaki artış fenolik madde içeriğini olumsuz etkileyeceği düşünülmektedir. Dolayısıyla,  $MgCl_2$  kullanımının artması nem miktarı üzerine negatif etkiye bulunmuştur. Nem miktarı için oluşturulan iz eğim grafiğine göre, OA ve  $MgCl_2$  miktarının nem miktarı üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Orta seviyeye kadar L-sis ve  $MgCl_2$  kullanımı nem içeriğini artırırken, OA ve askorbik kullanımı ise azaltmaktadır.

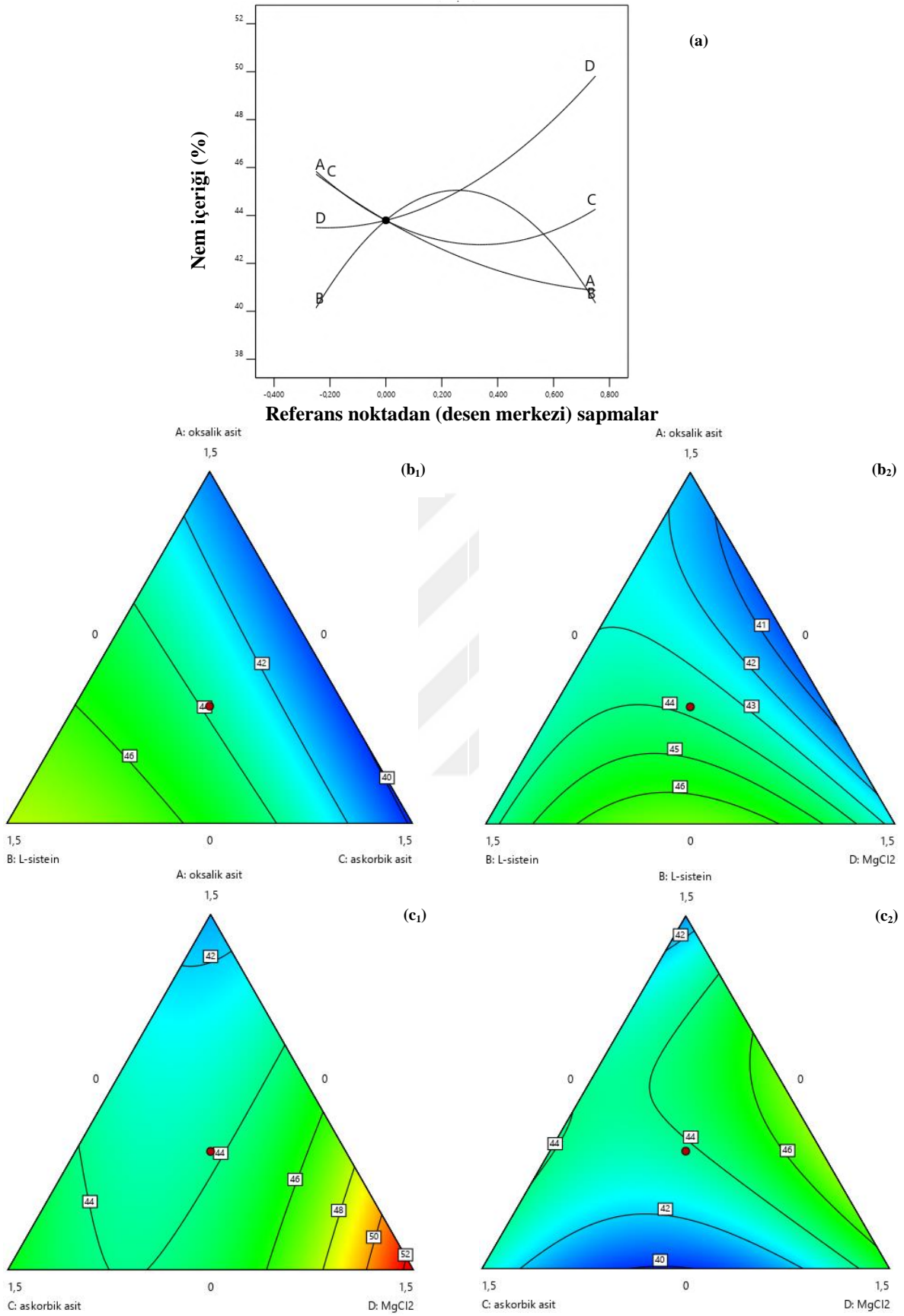
Şekil 4.20a’da görüldüğü gibi zeytin hamurunda kullanılan tüm katkı maddeleri toplam fenolik madde miktarını doğrusal olarak etkilemiştir. OA ve  $MgCl_2$  kullanımı toplam fenolik madde içeriğini azaltırken (Şekil 4.20.b<sub>1</sub> ve Şekil 4.20.b<sub>2</sub>) L-sis ve AA kullanımı ise toplam fenolik madde içeriğini artırmıştır (Şekil 4.20.b<sub>2</sub> ve Şekil 4.20.b<sub>1</sub>). Bunun yanısıra, OA ve  $MgCl_2$  kullanımının artması hamurdaki toplam fenolik madde içeriği üzerine negatif etki gösterirken L-sis ve AA kullanımı pozitif etki göstermiştir (Şekil 4.20a). Yani, AA ve  $MgCl_2$  zeytin hamurundaki toplam fenolik madde içeriğini önemli ölçüde etkilemiştir.

Zeytin hamurunda yapılan DPPH yöntemi ile belirlenen antioksidan içeriği için oluşturulan iz eğim incelendiğinde  $MgCl_2$  katkılarının kullanım miktarlarının artması ile DPPH değeri üzerine etkisinin fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.21a). Zeytin hamurlarındaki en yüksek DPPH inhibisyon değeri OA ve L-sis ile üretilen zeytinyağlarında (Şekil 4.21.b<sub>1</sub>), ayrıca OA ve  $MgCl_2$  ile üretilen zeytinyağlarında (Şekil 4.21.c<sub>1</sub>) belirlenmiştir. Buradan, OA, L-sis ve  $MgCl_2$  kullanımının artması DPPH radikal tutma aktivitesi üzerinde pozitif etkide bulunduğu söylenebilir. Orta seviyeye kadar OA ve  $MgCl_2$  kullanımı DPPH içeriğini artırmış, L-sis ve AA ise ters etki göstermiştir.

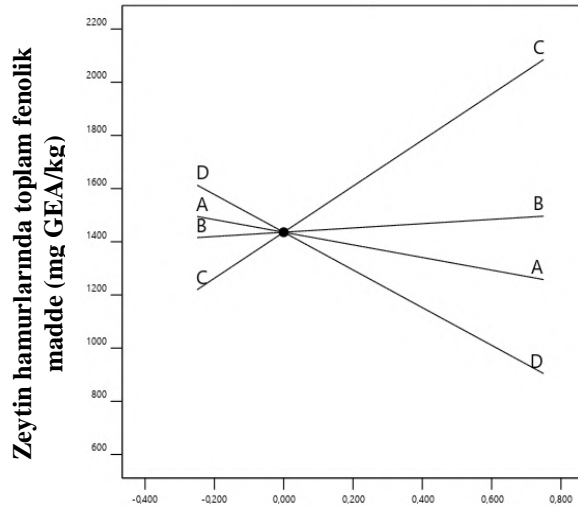
Şekil 4.22’de zeytin hamurunda  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle yapılan antioksidan aktivite değerleri üzerine kullanılan katkı maddelerin etkisi görülmektedir. Orta noktaya kadar OA ve AA kullanım miktarının artması  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerlerini azaltırken, L-sis ve  $MgCl_2$  kullanım miktarının artması ise  $\beta$ -karoten ağartma yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerlerini artırmaktadır. Orta noktadan

sonra ise katkıların tamamı ters etki göstermektedir. OA ve AA kullanımının artması antioksidan aktivite üzerine pozitif etkide bulunurken (Şekil 4.22.b<sub>1</sub> ve Şekil 4.22.c<sub>1</sub>), L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması ise negatif etkide bulunmuştur (Şekil 4.22.b<sub>2</sub>).



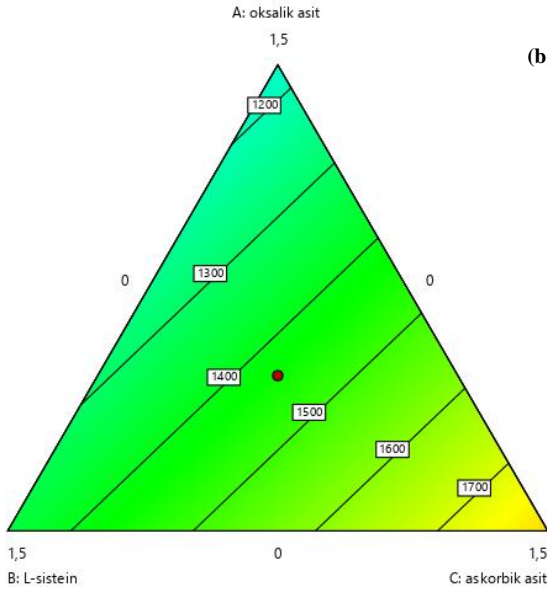


**Şekil 4.19.** Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının nem değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

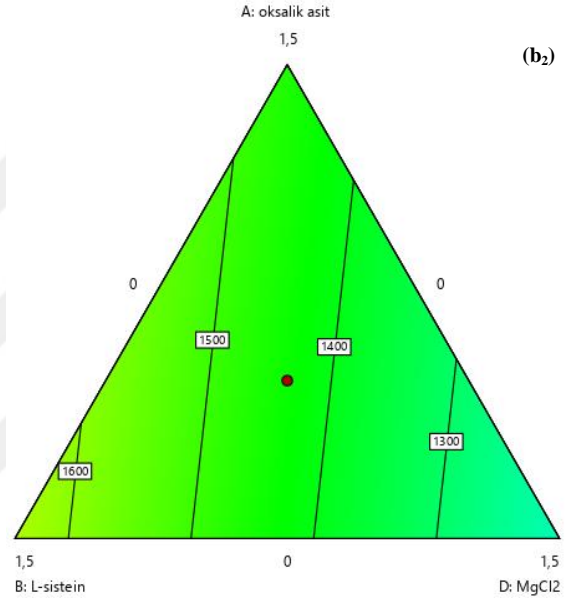


(a)

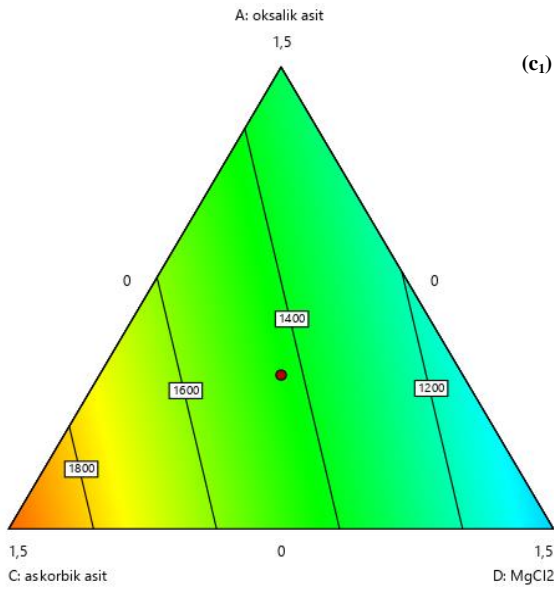
Referans noktadan (desen merkezi) sapmalar



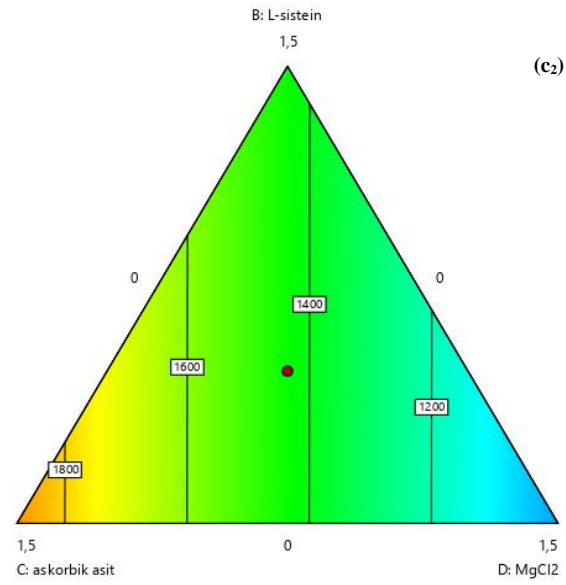
(b<sub>1</sub>)



(b<sub>2</sub>)

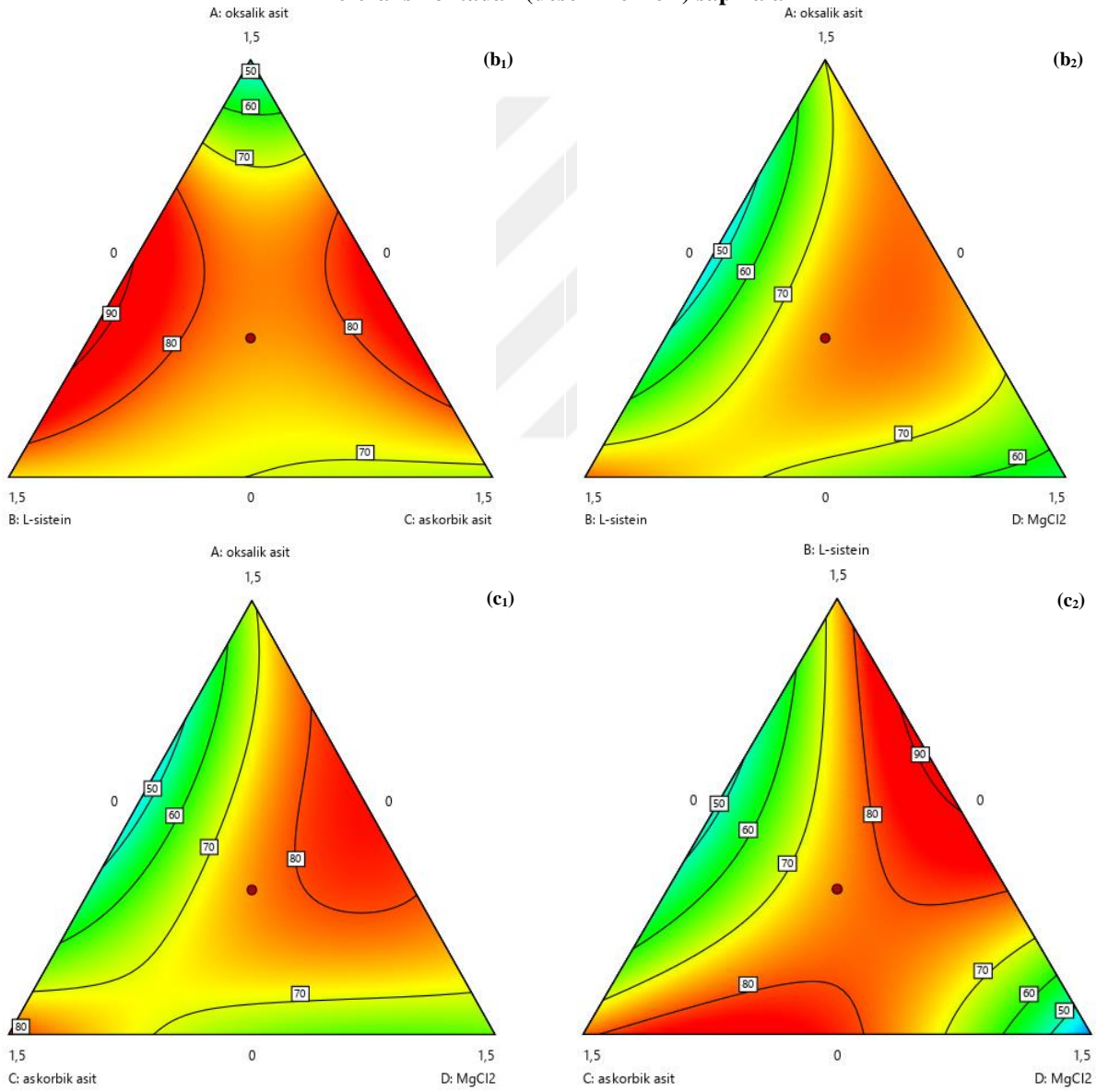
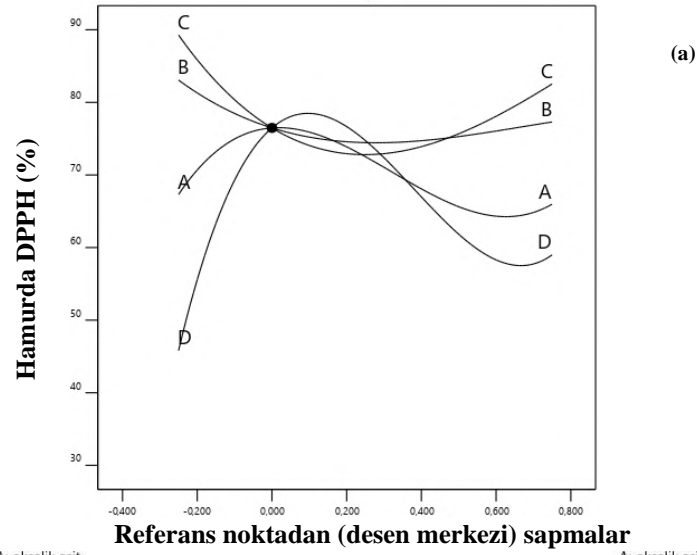


(c<sub>1</sub>)

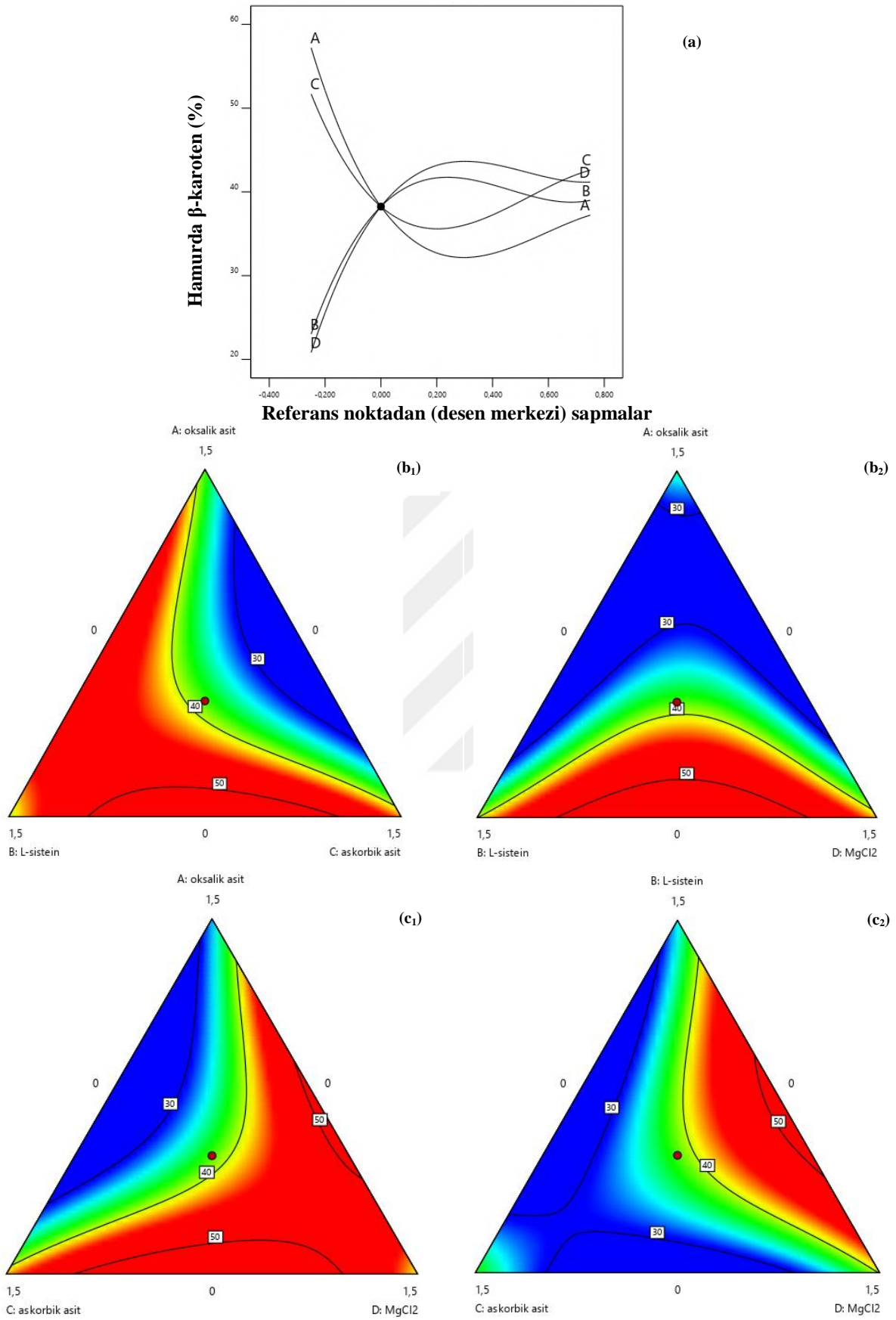


(c<sub>2</sub>)

**Şekil 4.20.** Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının toplam fenolik madde değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.21.** Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının DPPH değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.22.** Katkı maddelerinin zeytin hamurlarının  $\beta$ -karoten değeri üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

#### 4.4.6. Zeytinyağı ve zeytin hamuru örneklerinin fenolik bileşen dağılımına ilişkin veriler

##### 4.4.6.1. Zeytinyağlarının fenolik bileşen kompozisyonu

Fenoller, yağı hücresel düzeyde oto-oksidasyondan ve oksijen radikallerinden koruyan önemli antioksidan moleküllerdir. Ayrıca, fenolikler sadece sızma zeytinyağı stabilitesini etkilemekle kalmaz aynı zamanda yağın keskinliğine, lezzet ve aromasına, özellikle zeytinyağının tipik acı tadına katkıda bulunmaktadır (Serrano ve ark., 2021). Zeytinyağlarında tespit edilen ayrıntılı fenolik bileşenler HPLC metodu kullanılarak belirlenmiş ve elde edilen veriler Çizelge 4.22’de gösterilmiştir. Sızma zeytinyağındaki fenolik bileşik içeriğinin belirlenmesi, zeytinyağı fenollerini oksidasyon direncine katkıda bulunduğu ve zeytinyağının acılığında sorumlu olduğundan önemli bir kalite parametresidir (Bendini ve ark., 2007). Sızma zeytinyağlarında fenolik alkoller (hidroksitirozol ve tirozol), sekoiridoit türevleri, fenolik asitler (kafeik asit, kumarik asit, vanillik asit, ferulik asit ve sinamik asit), lignanlar ve flavonoidler (luteolin, apigenin, luteolin-7-*O*-glucoside ve apigenin-7-*O*-glucoside) dahil olmak üzere bazı fenolik bileşikler tanımlanmıştır (Bendini ve ark., 2007; Servili, 2014). Sızma zeytinyağının sağlığı koruyucu etkileri esas olarak oleuropeinin sekoiridoit türevlerine (hidroksitirozol (3,4-DHPEA), hidroksitirozole bağlı elenolik asidin dialdehid formlarına (3,4-DHPEA-EDA) ve oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)) ve ligstrosit (tirozol (p-HPEA) izomerine, Tipik Akdeniz diyetinde günlük fenolik bileşiklerin alınmasına önemli bir nicel ve nitel katkıyı garanti eden lignanlara ((+)-1-asetoksinopinesinol, (+)-pinosinol ve (+)-1-hidroksipinosinol) (Servili ve ark., 2004; Di Maio ve ark., 2013, 2011; Fregapane ve Salvador, 2013; Vitaglione ve ark., 2015; Aparicio-Ruiz ve ark., 2016) ek olarak tirozole bağlı elenolik asidin dialdehidik formlarına ((p-HPEA-EDA) ve ligstrosit aglikon) atfedilmektedir (Briante ve ark., 2003; Vasto ve ark., 2014). Katkı maddeleri ilaveleri sonucunda elde edilen yağlarda sekoiridoit grubuna dahil olan 3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA, p-HPEA-EA, 3,4-DHPEA-EA bileşikleri tespit edilmiştir. Kontrol ile karşılaştırıldığında %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> ve %1 L-sis + %1 AA örnekler dışındaki tüm uygulamalarda 3,4-DHPEA-EDA miktarlarında artış belirlenmiştir. p-HPEA-EA içeriği kontrole göre yaklaşık 2 kat artış göstererek 124.57 mg/kg değeri ile %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> uygulamasında en büyük değerini göstermiştir. Ayrıca, 3,4-DHPEA-EA içeriği kontrole göre yaklaşık 3 katlık artışla 73.66 mg/kg değeri ile %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> uygulamasında en büyük değerini göstermiştir. Hidrolitik bozunmada, β-glukozidaz enzim aktivitesindeki artış, şeker molekülünün kaybına neden olarak fenolik aglikonların (p-HPEA-EA, 3,4-DHPEA-EA) oluşumunu sağlar (Gutierrez-Rosales ve ark., 2010). Aglikon içeriklerinde belirlenen artış bu duruma dayandırılabilir. Aynı zamanda, %1 L-sis + %1 AA uygulaması sonucunda oleacein

(3,4-DHPEA-EDA) en fazla kaybın görüldüğü bileşik olarak (57.40 mg/kg) karşımıza çıkmaktadır. %2 katkı maddesi uygulanan örneklerden %2 OA uygulanan örneklere ait zeytinyağlarında 3,4-DHPEA-EDA diğer katkılara göre daha yüksek miktarlarda (118.96-126.07 mg/kg) bulunmuştur.

Fenolik alkoller grubuna giren hidroksitirozol (3,4-DHPEA) bileşiğinin en düşük konsantrasyonu (16.46-16.39 mg/kg) %1 OA + %1 L-sis uygulaması sonucu tespit edilmiştir. Mevcut çalışmada ekstraksiyon sırasında uygulanan katkılar ile hidroksitirozol ve tirozol (p-HPEA) bileşiğinde artış belirlenmiştir. Zeytin kırma ve malaksiyon sırasında, enzimatik bozunmanın yanı sıra hidrolitik bozunma hakimdir. Hidrolitik bozunma sonucunda ise dialdehidik dekarboksimetil aglikon formları oluşmaktadır (Servili ve Montedoro, 2002; Kalua ve ark., 2006). Yağ depolama sırasında hakim olan hidrolitik bozunmayı 3,4-DHPEA ve p-HPEA'nın yanı sıra enzimatik olmayan bozunma oluşturmaktadır (Migliorini ve ark., 2012). 3,4-DHPEA bileşiğindeki azalma ile hidrolitik bozunmanın daha yavaş olabileceği söylenebilir. Hidroksitirozol miktarı 3.93-58.22 mg/kg aralığında değişirken, tirozol miktarı 2.01-59.67 mg/kg aralığında değişmektedir. Tirozol miktarının % 2 OA kullanılan örneklerde en yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Bunu, %2 oranında AA kullanılan örnekler takip etmiştir.

Çizelge 4.22 incelendiğinde zeytinyağı örneklerinin kafeik asit miktarları 0.15-5.36 mg/kg değerleri arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir. Fenolik asitlerden kafeik asitte %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub>, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %2 AA ve %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> uygulamaları hariç diğer uygulamalarda artış görülmüştür. OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının tekli uygulamalarında ise homovanilik asit ve vanillin miktarlarında çoğunlukla belirgin artışlar bulunmuştur. Kontrol ile kıyaslandığında kafeik asitte %64.92 oranında artış görülürken, homovanillik asit ve vanillin miktarlarında sırasıyla %96.45 ve %79.38'e kadar artış görülmüştür.

Zeytinyağı örneklerinde bir hidroksitirozol türevi olan hidroksitirozol asetat (3,4-DHPEA-AC) bulunmuştur.

Oldukça yüksek konsantrasyonlarda tanımlanan başka bir fenol oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)'dır. Zeytinyağlarının oleuropein aglikon içeriği 11.90-73.66 mg/kg arasında değişmektedir.

Flavonoidlerle ilgili olarak, tekli uygulamalarda apigenin konsantrasyonunda artış görünürken, %2 L-sis örneğinde de luteolin konsantrasyonunda artış belirlenmiştir. Diğer örneklerde ise apigenin içeriği artarken, luteolin içeriğinde uygulamalara bağlı olarak farklılıklar görülmektedir. Apigenin miktarındaki maksimum artış (3.07 mg/kg) %2 OA

uygulamasında, luteolin miktarındaki maksimum artış ise (12.75 mg/kg) %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> uygulamasında bulunmuştur.

Çizelge 4.23'te zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında uygulanan farklı katkıları sonucunda elde edilen zeytinyağlarının luteolin içerikleri yer almaktadır. Çizelge incelendiğinde, zeytinyağı örneklerinin luteolin miktarları 1.52-12.72 mg/kg değerleri arasında değişiklik gösterdiği görülmektedir. %2 L-sis kullanılan örnekler en yüksek değeri gösterirken L-sis'in OA ve AA ile eşit oranlarda kullanıldığı %1 OA + %1 L-sis ve %1 L-sis + %1 AA örneklerinin en düşük değeri gösterdiği belirlenmiştir. Buradan, OA ve AA'nın luteolin değerini düşürücü etkisinin var olduğu görülmüştür.



**Çizelge 4.22.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg)

	Hidroksitirozol (3,4-DHPEA)	Tirozol (p-HPEA)	Kafeik asit	Homovanillik asit	Vanillin	Hidroksitirozol asetat (3,4-DHPEA-AC)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	19.55	19.27	2.54	5.65	0.61	7.59
%1 OA + %1 L-sis	16.46	4.38	2.99	0.91	0.16	5.77
%2 MgCl <sub>2</sub>	21.83	9.43	5.36	6.76	0.21	6.82
%2 L-sis	26.18	5.65	4.25	2.52	0.15	6.08
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	23.37	18.00	1.88	1.07	0.95	6.83
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	58.22	27.65	1.95	0.58	0.20	9.45
%2 AA	29.59	41.09	1.16	0.54	0.26	7.20
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	30.83	7.24	0.82	0.82	0.86	7.65
%2 OA	41.78	59.67	4.22	1.51	0.53	8.30
%2 AA	38.47	45.93	1.07	0.36	0.22	7.70
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	26.31	10.08	2.08	3.10	0.95	8.53
%2 OA	47.93	47.33	4.82	2.01	0.58	8.46
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	25.12	17.34	4.62	3.35	0.15	7.41
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	38.92	53.69	2.43	3.06	0.97	8.36
%2 MgCl <sub>2</sub>	21.46	9.83	5.73	5.80	0.09	7.13
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	27.24	12.06	3.50	0.00	0.71	6.29
%1 L-sis + %1 AA	26.11	22.37	4.09	0.00	0.10	6.88
%1 OA + %1 AA	38.50	42.77	0.15	1.82	0.26	7.32
%2 L-sis	27.82	4.77	4.77	2.24	0.64	5.92
%1 OA + %1 L-sis	16.39	4.16	2.37	2.23	0.18	6.04
<b>K</b>	3.93	2.01	2.01	0.24	0.20	6.82

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

**Çizelge 4.23.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg) (devamı)

	Oleacein (3,4-DHPEA-EDA)	Oleokantal (p-HPEA- EDA)	Ligstrosit aglikon (p-HPEA-EA)	Oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)	Apigenin	Luteolin
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	81.22	28.74	47.65	14.91	2.73	2.84
%1 OA + %1 L-sis	73.09	17.31	48.09	17.07	2.75	3.72
%2 MgCl <sub>2</sub>	92.67	29.91	45.01	26.63	2.61	3.62
%2 L-sis	80.81	25.03	33.59	24.31	1.34	10.97
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	124.03	16.99	37.81	37.81	2.89	2.75
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	109.74	15.08	73.61	73.66	2.96	5.72
%2 AA	81.02	22.45	51.38	25.17	2.65	7.91
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	83.05	18.85	81.15	55.32	2.52	8.58
%2 OA	118.96	17.47	34.49	18.81	2.86	6.35
%2 AA	89.91	20.92	66.82	28.58	2.43	8.76
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	78.24	22.45	124.57	49.10	2.75	9.72
%2 OA	126.07	14.66	32.46	16.20	3.07	7.36
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	109.44	20.10	44.45	28.51	2.83	10.85
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	75.30	16.45	101.26	44.33	2.27	12.72
%2 MgCl <sub>2</sub>	86.54	23.06	44.33	27.38	2.80	3.97
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	64.50	14.87	30.56	71.44	2.48	2.79
%1 L-sis + %1 AA	57.40	21.73	28.78	16.43	2.09	1.52
%1 OA + %1 AA	124.42	17.37	27.03	18.30	2.20	3.08
%2 L-sis	80.68	24.89	28.85	28.85	1.80	10.92
%1 OA + %1 L-sis	78.33	15.57	39.78	11.90	2.23	3.35
<b>K</b>	71.73	21.27	64.62	24.49	0.48	2.15

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

Çizelge 4.24, 4.25 ve 4.26'da zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşiklerin miktarları için belirlenen varyans analiz sonuçları verilmiştir. İnhibitör maddelerin hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında sırasıyla özel kübik, kuadratik, kuadratik ve özel kübik modelleri belirlenmiştir. Zeytinyağlarının hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit değerlerine ait varyans analizinde modellere ait P değerleri sırasıyla  $<0.0001$ ,  $<0.0001$ ,  $0.0030$  ve  $0.0002$  olarak belirlenmiş olup katkı maddelerden en az birinin zeytinyağlarının hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Katkı maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytinyağlarının hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit değerleri üzerine önemli seviyede etkilediği görülmektedir ( $P<0.05$ ). Buna göre, zeytinyağı hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit değerleri üzerine  $OA \times MgCl_2$ , hidroksitirozol, tirozol ve kafeik asit değerleri üzerine ise  $OA \times L$ -sis interaksiyonları önemli etkiye sahip olmuştur ( $P<0.05$ ).  $AA \times MgCl_2$  interaksiyonu hidroksitirozol ve tirozol içerikleri için  $L$ -sis  $\times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları ise hidroksitirozol ve homovanillik asit içeriklerini önemli seviyede etkilemiştir ( $P<0.05$ ).  $OA \times AA$ ,  $OA \times L$ -sis  $\times MgCl_2$  ve  $OA \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları sırasıyla kafeik asit, hidroksitirozol ve homovanillik asit üzerine etkileşiminin önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla  $0.3090$ ,  $0.0896$ ,  $0.0054$  ve  $0.0608$  olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun hidroksitirozol, tirozol ve homovanillik asit için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asitin belirlenme katsayıları sırasıyla  $R^2$ :  $0.9212$ ,  $0.9084$ ,  $0.7410$  ve  $0.8338$  iken uyarlanan belirlenme katsayıları sırasıyla  $R^2$ :  $0.8638$ ,  $0.8662$ ,  $0.6214$  ve  $0.7570$  şeklinde bulunmuştur. Dolayısıyla, hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asitliğindeki değişkenliğin sırasıyla %92.12, %90.84, %74.10 ve %83.38'i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan tespit edilen hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asitliği değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Varyans analizi çizelgesi verilerine göre uygun bulunan bu modeller tahminleme açısından yeterli bulunmuştur. Bahsedilen fenolik bileşiklerin regresyon eşitlikleri Çizelge 4.24'te verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre  $OA$ ,  $L$ -sis,  $AA$  ve  $MgCl_2$  katkılarının pozitif etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının hidroksitirozol, tirozol, kafeik asit ve homovanillik asit içeriğini artırdığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.24.** Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Hidroksitirozol (3,4-DHPEA)			Tirozol (p-HPEA)			Kafeik asit			Homovanillik asit		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	8	16.06	<0.0001	6	21.50	<0.0001	6	6.20	0.0030	10	14.70	0.0002
AB	1	31.15	0.0002	1	23.43	0.0003	1	5.14	0.0410	-	-	-
AC	-	-	-	-	-	-	1	4.97	0.0441	-	-	-
AD	1	5.13	0.0447	1	8.48	0.0121	1	7.68	0.0159	1	6.36	0.0255
CD	1	6.80	0.0243	1	8.44	0.0123	-	-	-	-	-	-
ABD	1	26.56	0.0003	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	11.63	0.0046
BCD	1	34.60	0.0001	-	-	-	-	-	-	1	15.99	0.0015
Hata Model uyumsuzluğu	11	-	-	13	-	-	13	-	-	13	-	-
Saf hata	6	1.61	0.3090	8	3.55	0.0896	8	13.52	0.0054	8	4.36	0.0608
Toplam	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9212	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8638		R <sup>2</sup> =0.9084	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8662		R <sup>2</sup> =0.7410	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.6214		R <sup>2</sup> =0.8338	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.7570	
Hidroksitirozol (3,4-DHPEA) = 45.38 × A + 26.93 × B + 33.93 × C + 21.36 × D – 75.35 × (A×B) – 39.64 × (A×D) + 45.48 × (C×D) – 2056.71 × (A×B×D) + 2342.60 × (B×C×D)												
Tirozol (p-HPEA) = 51.71 × A + 5.92 × B + 39.75 × C + 11.15 × D – 108.95 × (A×B) – 81.86 × (A×D) + 82.12 × (C×D)												
Kafeik asit = 4.62 × A + 4.32 × B + 1.27 × C + 5.06 × D – 7.61 × (A×B) – 9.35 × (A×C) – 11.62 × (A×D)												
Homovanillik asit = 2.05 × A + 2.11 × B + 0.2859 × C + 6.06 × D – 10.55 × (A×D) + 327.79 × (A×C×D) – 378.73 × (B×C×D)												

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

Çizelge 4.25'te vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein ve oleokantal içeriklerine ait ANOVA sonuçları verilmiştir. İnhibitör maddelerin vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein ve oleokantal üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında sırasıyla özel kübik, doğrusal, özel kübik ve özel kübik modelleri belirlenmiştir. Zeytinyağlarının vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein (3,4-DHPEA-EDA) ve oleokantal (p-HPEA-EDA) değerlerine ait varyans analizinde modellere ait P değerleri sırasıyla 0.0004, 0.0689, 0.0016 ve 0.0187 olarak belirlenmiş olup katkı maddelerden en az birinin zeytinyağlarının vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein ve oleokantal değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). ANOVA sonuçlarına göre,  $OA \times MgCl_2$ ,  $AA \times MgCl_2$  ve  $OA \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları ( $P < 0.01$ ) ve  $OA \times L\text{-sis}$  interaksiyonu ( $P < 0.05$ ) vanillin içeriği üzerine önemli etkisi bulunurken,  $OA \times L\text{-sis} \times MgCl_2$  interaksiyonu vanillin ve 3,4-DHPEA-EDA üzerine ( $P < 0.01$ ) önemli etkisi bulunmaktadır.  $L\text{-sis} \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonunun oleasein üzerine  $P < 0.05$ , oleokantal üzerine ise  $P < 0.01$  düzeylerinde etkisinin olduğu tespit edilmiştir.  $OA \times AA$ ,  $OA \times MgCl_2$ ,  $L\text{-sis} \times AA$  ve  $L\text{-sis} \times MgCl_2$  interaksiyonları oleasein içeriği,  $OA \times L\text{-sis} \times MgCl_2$  interaksiyonu ise oleokantal içeriği üzerindeki etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir.  $AA \times MgCl_2$ ,  $OA \times L\text{-sis} \times AA$  ve  $OA \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonlarının ise oleasein içeriği üzerine istatistiki olarak önemli bir etkisi görülmemiştir ( $P > 0.05$ ). Vanillin ve oleokantal miktarları için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken ( $P = 0.6898$  ve  $0.1715$ ) ( $P > 0.05$ ), 3,4-DHPEA-AC ve oleasein miktarları için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçememiştir ( $P < 0.01$ ). Belirleme katsayıları sırasıyla  $R^2$ : 0.8795, 0.3501, 0.9706 ve 0.5870 olarak bulunmuş olup elde edilen verilerdeki değişkenliğin sırasıyla %87.95, %35.01, %97.07 ve %58.70'inin belirlenen modeller ile açıklanabileceği gösterilmiştir. Uyarlanan belirleme katsayıları sırasıyla  $R^2$ : 0.7919, 0.2282, 0.9069 ve 0.4395 olarak bulunmuştur. Bu değerler, öngörülen değerler arasındaki uyumluluk oranının yüksek olduğunu göstermektedir. Vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein ve oleokantal miktarları için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.27'de verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  katkılarının pozitif etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının vanillin, 3,4-DHPEA-AC, oleasein ve oleokantal içeriğini artırdığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.25.** Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı)

Kaynak	Vanillin			3,4-DHPEA-AC			Olesein (3,4-DHPEA-EDA)			Oleokantal (p-HPEA-EDA)		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	8	10.04	0.0004	3	2.87	0.0689	13	15.24	0.0016	5	3.98	0.0187
AB	1	4.86	0.0497	-	-	-	1	22.07	0.0033	-	-	-
AC	-	-	-	-	-	-	1	9.06	0.0237	-	-	-
AD	1	15.38	0.0024	-	-	-	1	7.08	0.0375	-	-	-
BC	-	-	-	-	-	-	1	12.53	0.0122	-	-	-
BD	-	-	-	-	-	-	1	12.64	0.0120	-	-	-
CD	1	28.27	0.0002	-	-	-	1	2.65	0.1547	-	-	-
ABC	-	-	-	-	-	-	1	4.30	0.0836	-	-	-
ABD	1	18.04	0.0014	-	-	-	1	31.97	0.0013	1	8.64	0.0108
ACD	1	11.20	0.0065	-	-	-	1	3.78	0.1000	-	-	-
BCD	-	-	-	-	-	-	1	12.79	0.0117	1	11.93	0.0039
Hata	11	-	-	16	-	-	6	-	-	14	-	-
Model uyumsuzluğu	6	0.6577	0.6898	11	23.41	0.0014	1	7.27	0.0429	9	2.42	0.1715
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.8795	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.7919		R <sup>2</sup> =0.3501	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.2282		R <sup>2</sup> =0.9706	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9069		R <sup>2</sup> =0.5870	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.4395	
Vanillin = 0.5159 × A + 0.3437 × B + 0.1766 × C + 0.1534 × D – 1.08 × (A×B) + 2.51 × (A×D) + 3.38 × (C×D) + 60.81 × (A×B×D) – 48.65 × (A×C×D)												
3,4-DHPEA-AC = 7.71 × A + 6.02 × B + 8.00 × C + 7.50 × D												
Olesein (3,4-DHPEA-EDA) = 122.77 × A + 81.00 × B + 85.72 × C + 89.86 × D – 102.65 × (A×B) + 84.80 × (A×C) + 74.96 × (A×D) – 99.74 × (B×C) + 100.14 × (B×D) – 45.86 × (C×D) + 1562.13 × (A×B×C) – 4261.55 × (A×B×D) – 1472.55 × (A×C×D) + 2709.85 × (B×C×D)												
Oleokantal (p-HPEA-EDA) = 15.14 × A + 22.71 × B + 20.98 × C + 24.06 × D + 976.50 × (A×B×D) – 1151.71 × (B×C×D)												

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

CCD deseninde ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin fenolik bileşenlerine göre belirlenen varyans analiz sonuçları Çizelge 4.26'da sunulmuştur. İnhibitör maddelerin ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerleri üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında sırasıyla kuadratik, özel kübik, doğrusal ve kuadratik modelleri belirlenmiştir. Zeytinyağlarının ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerlerine ait modellerde sırasıyla P değerleri 0.0341, <0.0001, 0.0033 ve 0.0002 olarak hesaplanmış olup modellerin anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.26). ANOVA sonuçlarına göre, AA × MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu ligstrosit aglikon değerini (P<0.05), oleuropein aglikon ve luteolin değerlerini (P<0.01) önemli ölçüde etkilemiştir. L-sis × AA interaksiyonu oleuropein aglikon ve luteolin miktarlarını önemli düzeyde etkilemektedir (P<0.01). OA × AA × MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu sadece oleuropein aglikon miktarını etkilemektedir (P<0.05). Apigenin fenolik bileşeni için Çizelge 4.26'da verilen katkıların tamamı istatistiksel açıdan önemli düzeyde etkili bulunmamıştır (P>0.05 ve P>0.01). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.0021, 0.7893, 0.2728 ve 0.0035 olarak hesaplanmıştır. Bu nedenle, model uyumsuzluğunun oleuropein aglikon ve apigenin değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). Belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.4801, 0.9946, 0.5655 ve 0.9189 ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.3415, 0.9830, 0.4841 ve 0.8477 olarak bulunmuştur. Belirleme kat sayıları ile uyarlanan belirleme katsayıları arasında yüksek bir uyumluluk oranı bulunmuştur. Buradan, ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %48.10, %99.46, %56.55 ve %91.89'u belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri ise belirlenen R<sup>2</sup> değerlerine yakın olduğundan belirlenen ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.26'da verilmiştir. Belirlenen değişken katsayıları incelendiğinde, pozitif lineer etkilerinden dolayı OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> oranlarının artması örneklerin ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin değerlerini artırdığı görülmektedir. OA × MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu oleuropein aglikon değeri için pozitif lineer etki gösterirken, luteolin değeri için negatif lineer etki göstermektedir. AA × MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon ve luteolin değerleri için pozitif lineer etki göstermektedir. Apigenin içeriği için ise herhangi bir interaksiyon etki etmemektedir.

**Çizelge 4.26.** Zeytinyağlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı)

Kaynak	Ligstrosit aglikon (p-HPEA-EA)			Oleuropein aglikon (3,4-DHPEA-EA)			Apigenin			Luteolin		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	4	3.46	0.0341	13	85.47	<0.0001	3	6.94	0.0033	9	12.75	0.0002
AB	-	-	-	1	13.62	0.0102	-	-	-	1	22.20	0.0008
AC	-	-	-	1	2.22	0.1872	-	-	-	1	11.87	0.0063
AD	-	-	-	1	34.37	0.0011	-	-	-	1	3.07	0.1103
BC	-	-	-	1	15.29	0.0079	-	-	-	1	31.69	0.0002
BD	-	-	-	1	0.3988	0.5510	-	-	-	1	8.16	0.0171
CD	1	7.84	0.0135	1	42.99	0.0006	-	-	-	1	22.93	0.0007
ABC	-	-	-	1	33.83	0.0011	-	-	-	-	-	-
ABD	-	-	-	1	78.76	0.0001	-	-	-	-	-	-
ACD	-	-	-	1	7.93	0.0305	-	-	-	-	-	-
BCD	-	-	-	1	243.17	<0.0001	-	-	-	-	-	-
Hata	15	-	-	6	-	-	16	-	-	10	-	-
Model uyumsuzluğu	10	19.62	0.0021	1	0.0795	0.7893	11	1.78	0.2728	5	17.40	0.0035
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.4801	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.3415		R <sup>2</sup> =0.9946	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9830		R <sup>2</sup> =0.5655	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.4841		R <sup>2</sup> =0.9189	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8477	
Ligstrosit aglikon (p-HPEA-EA) = 34.45 × A + 40.43 × B + 51.30 × C + 54.88 × D + 248.31 × (C×D)												
Oleuropein aglycon (3,4-DHPEA-EA) = 17.49 × A + 26.56 × B + 26.86 × C + 26.99 × D - 30.29 × (A×B) - 15.75 × (A×C) + 62.03 × (A×D) - 41.38 × (B×C) + 6.68 × (B×D) + 69.37 × (C×D) + 1646.51 × (A×B×C) - 2512.21 × (A×B×D) - 801.44 × (A×C×D) + 4438.08 × (B×C×D)												
Apigenin = 2.94 × A + 1.86 × B + 2.47 × C + 2.81 × D												
Luteolin = 6.75 × A + 11.17 × B + 8.28 × C + 4.05 × D - 21.51 × (A×B) - 19.60 × (A×C) - 9.97 × (A×D) - 32.02 × (B×C) + 16.25 × (B×D) + 27.28 × (C×D)												

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

İnhibitör maddelerin zeytinyağındaki fenolik bileşenler üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur. Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'da sırasıyla hidroksitirozol ve tirozol, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'de ise sırasıyla kafeik asit ve homovanillik asit verilmiştir.

Şekil 4.23a'ya göre AA kullanım miktarlarındaki artış belli bir seviyeye kadar hidroksitirozol içeriğini artırırken daha sonra az miktarda azalma göstermiştir. OA kullanım miktarlarındaki artış hidroksitirozol miktarını orta seviyeye kadar azaltmıştır. OA kullanımındaki artış hidroksitirozol içeriği üzerine en fazla negatif etkide bulunmuştur. L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımındaki artış hidroksitirozol miktarında çok fazla değişime neden olmamıştır. En yüksek hidroksitirozol miktarı L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ile üretilen zeytinyağlarında görülmüştür (Şekil 4.23b<sub>2</sub>). Kontur grafiği, formülasyonda AA katkı maddesinin kullanılmasıyla hidroksitirozol miktarında daha yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 4.23c<sub>2</sub>).

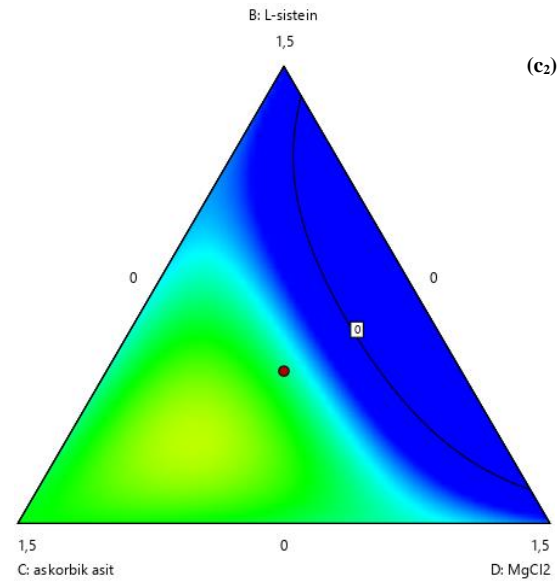
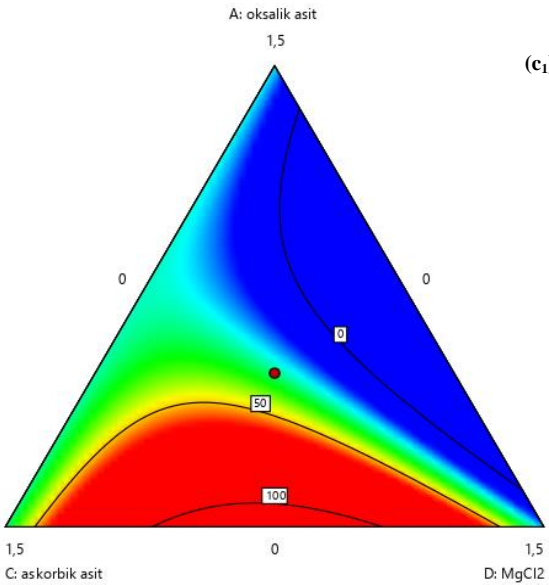
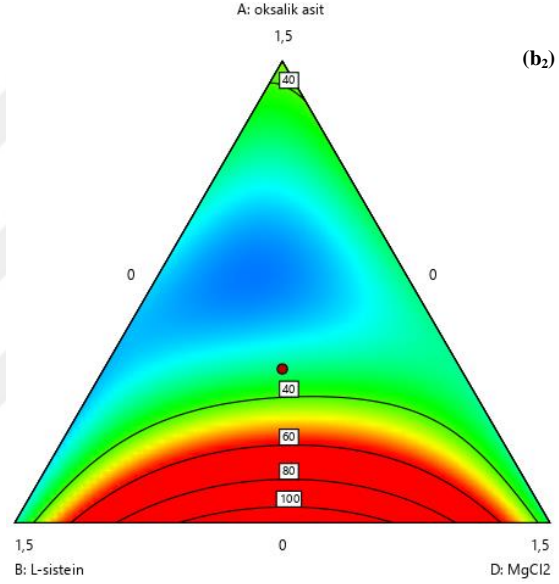
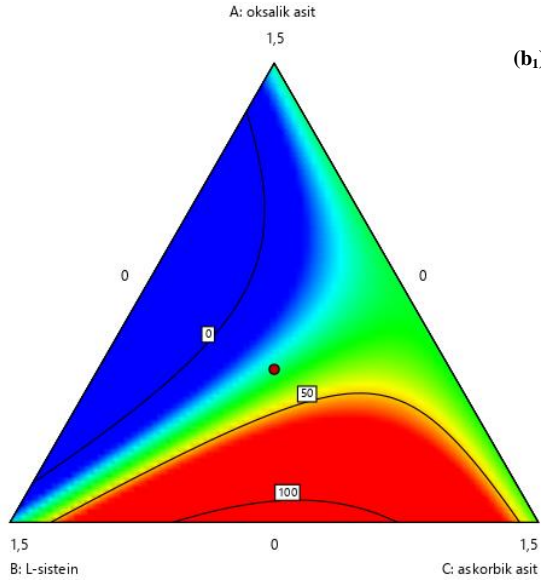
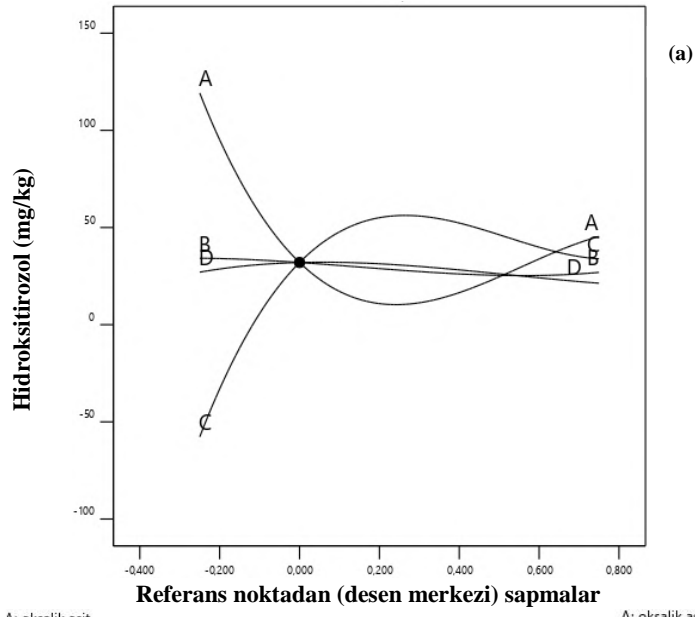
Tirozol içeriği için oluşturulan iz eğim incelendiğinde OA, L-sis ve AA katkılarının kullanım miktarlarının artması tirozol içeriği üzerine fazla miktarda etkili olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.24a). Yani, OA ve AA tirozol miktarını önemli ölçüde artırırken, L-sis ise önemli ölçüde azaltmıştır. Orta seviyeye kadar AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı tirozol içeriğini artırmış, OA ve L-sis ise ters etki göstermiştir. Şekil 4.24b<sub>1</sub>'ye göre, yüksek oranda AA kullanılarak üretilen zeytinyağının en yüksek tirozol içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. L-sis kullanımının artması tirozol içeriği üzerine negatif etkide bulunurken (Şekil 4.24b<sub>1</sub> ve Şekil 4.24c<sub>2</sub>), MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması tirozol içeriğini azaltmıştır (Şekil 4.24c<sub>2</sub>).

Şekil 4.25a'da görüldüğü gibi, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının kullanım miktarlarının artmasıyla kafeik asit içeriği artarken L-sis neredeyse doğrusal bir artış göstermiştir. OA kullanım miktarının artmasıyla orta seviyeye kadar kafeik asit içeriği azalmış orta seviyeden sonra bir miktar daha azalarak daha sonra artışa sebep olmuştur. Formülasyondaki L-sis ve MgCl<sub>2</sub> oranlarının artmasıyla kafeik asit içeriği artmaktadır (Şekil 4.25b<sub>2</sub>). Ayrıca, AA ve L-sis oranlarındaki artış ve AA ve MgCl<sub>2</sub> oranlarındaki artış ile kafeik asit içeriği artmıştır (Şekil 4.25c<sub>2</sub>).

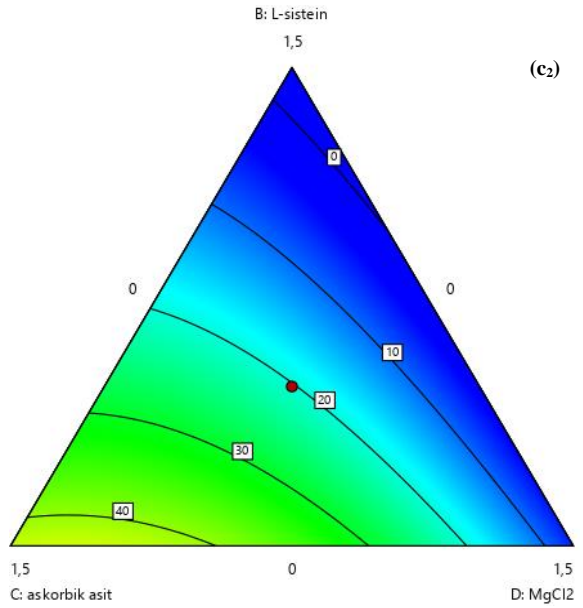
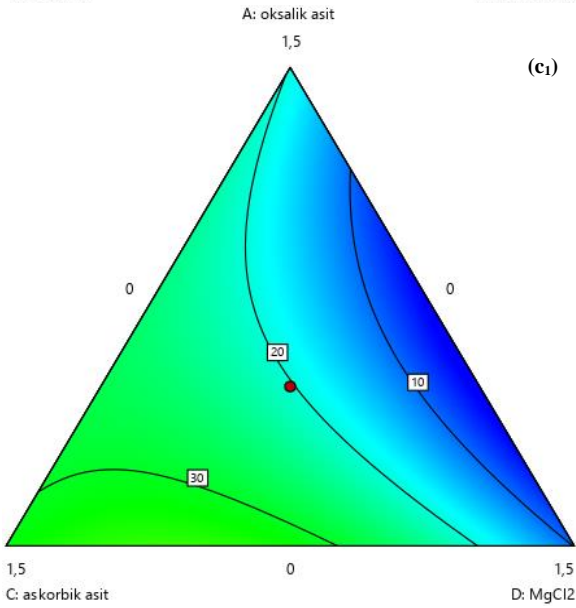
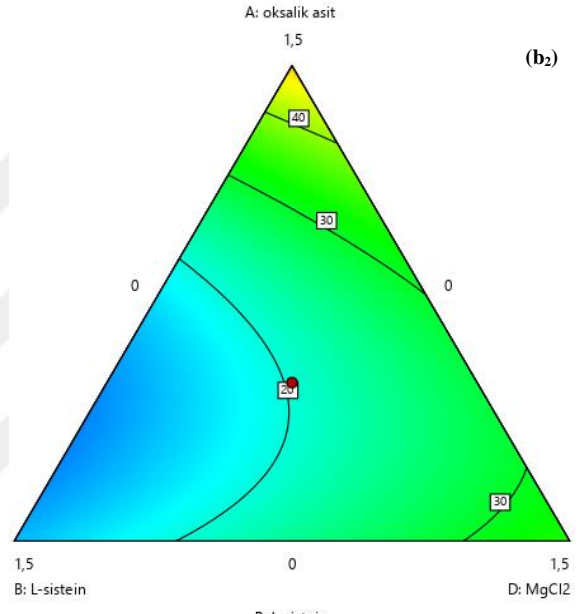
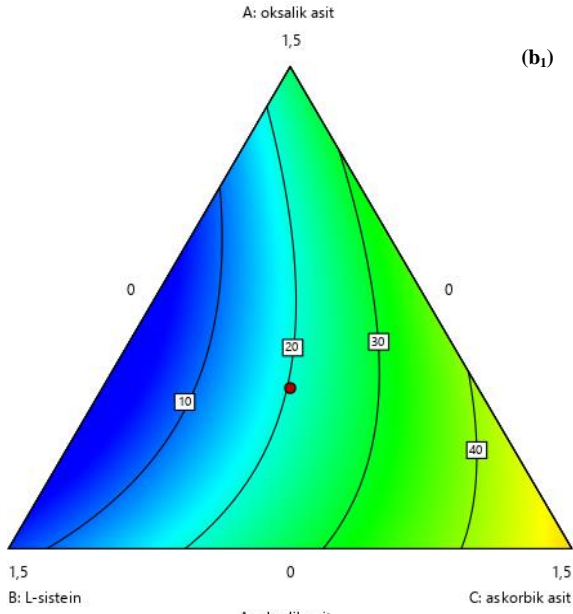
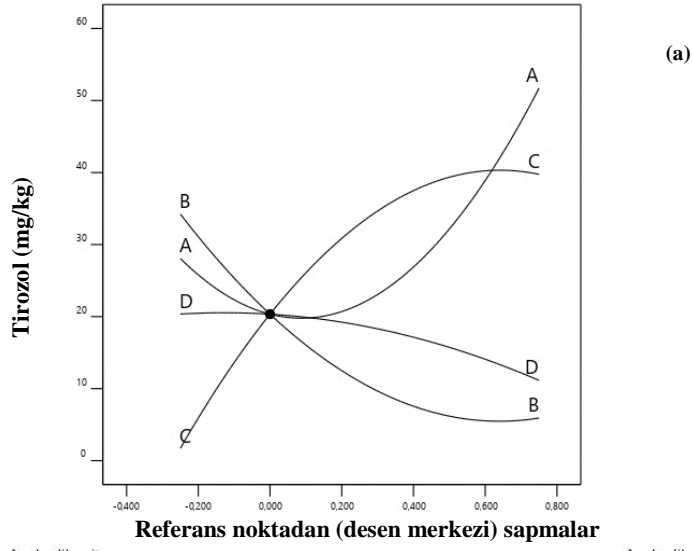
Homovanillik asit içeriği için oluşturulan iz eğim grafikleri incelendiğinde OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması homovanillik asit içeriği üzerine olumlu etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.26a). Orta seviyeye kadar OA kullanımı homovanillik asit içeriğini artırırken L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı ise azaltmıştır. Şekil 4.26a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre, OA kullanımı homovanillik asit miktarında daha fazla artışa, L-sis kullanımı ise daha fazla düşüşe sebep olmuştur. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının artması ile zeytinyağının homovanillik asit miktarlarında azalma görülmektedir (Şekil 4.26b<sub>2</sub> ve Şekil 4.26c<sub>2</sub>). Şekil 4.26c<sub>2</sub>'de

görüldüğü gibi, formülasyondaki AA ve  $MgCl_2$ 'nin ortak kullanımı ile elde edilen homovanillik asit değerlerinin L-sis kullanımı ile daha yüksek olduğu görülmektedir.

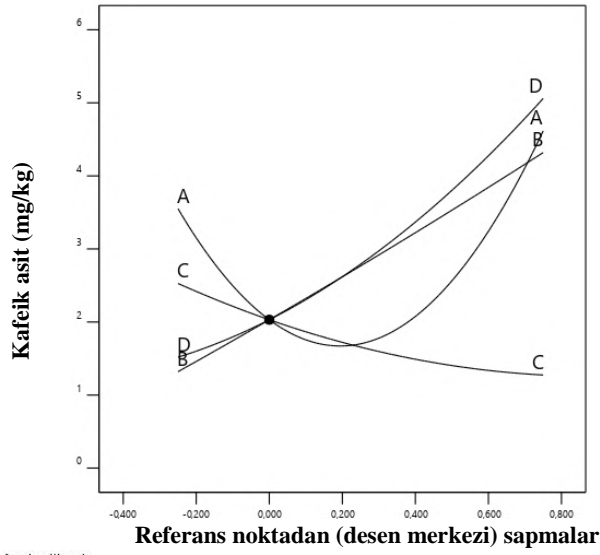




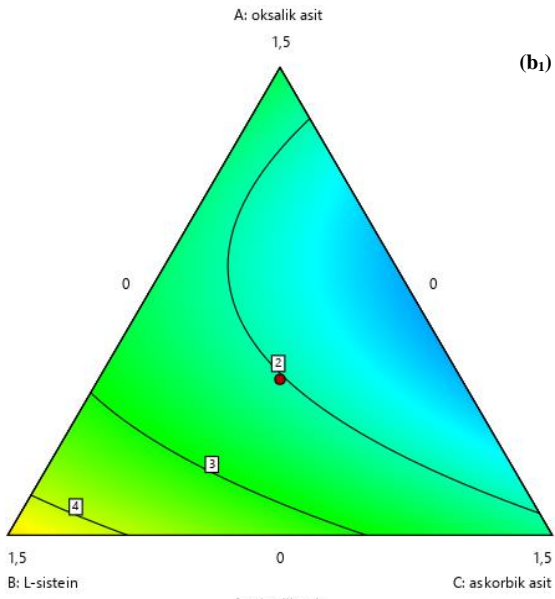
**Şekil 4.23.** Katkı maddelerinin hidroksitirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



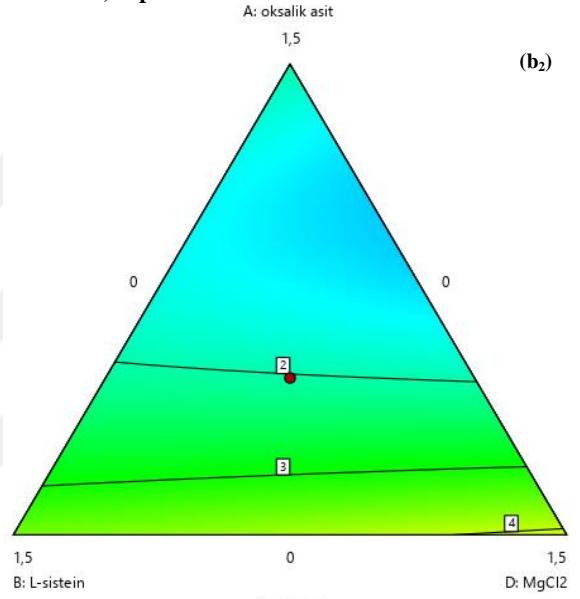
**Şekil 4.24.** Katkı maddelerinin tirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



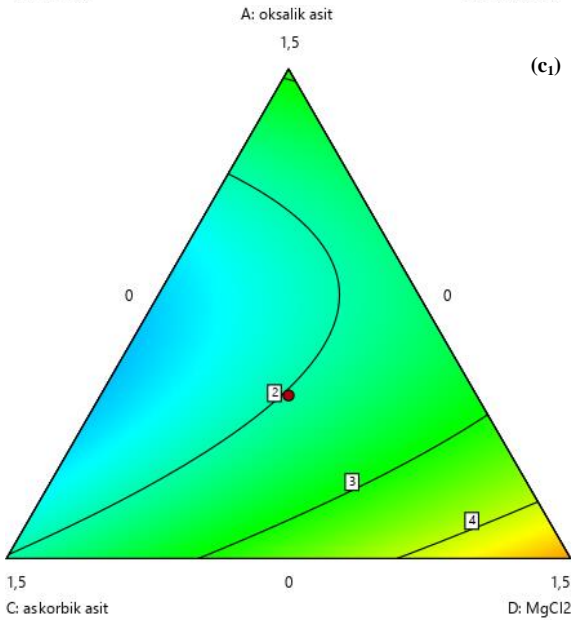
(a)



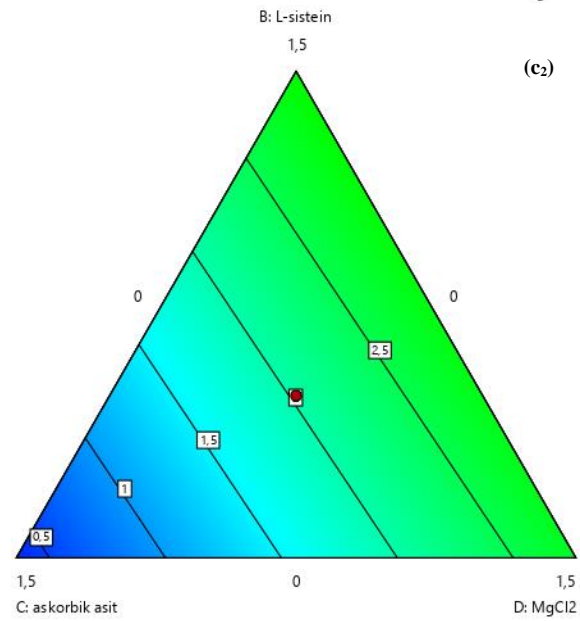
(b<sub>1</sub>)



(b<sub>2</sub>)

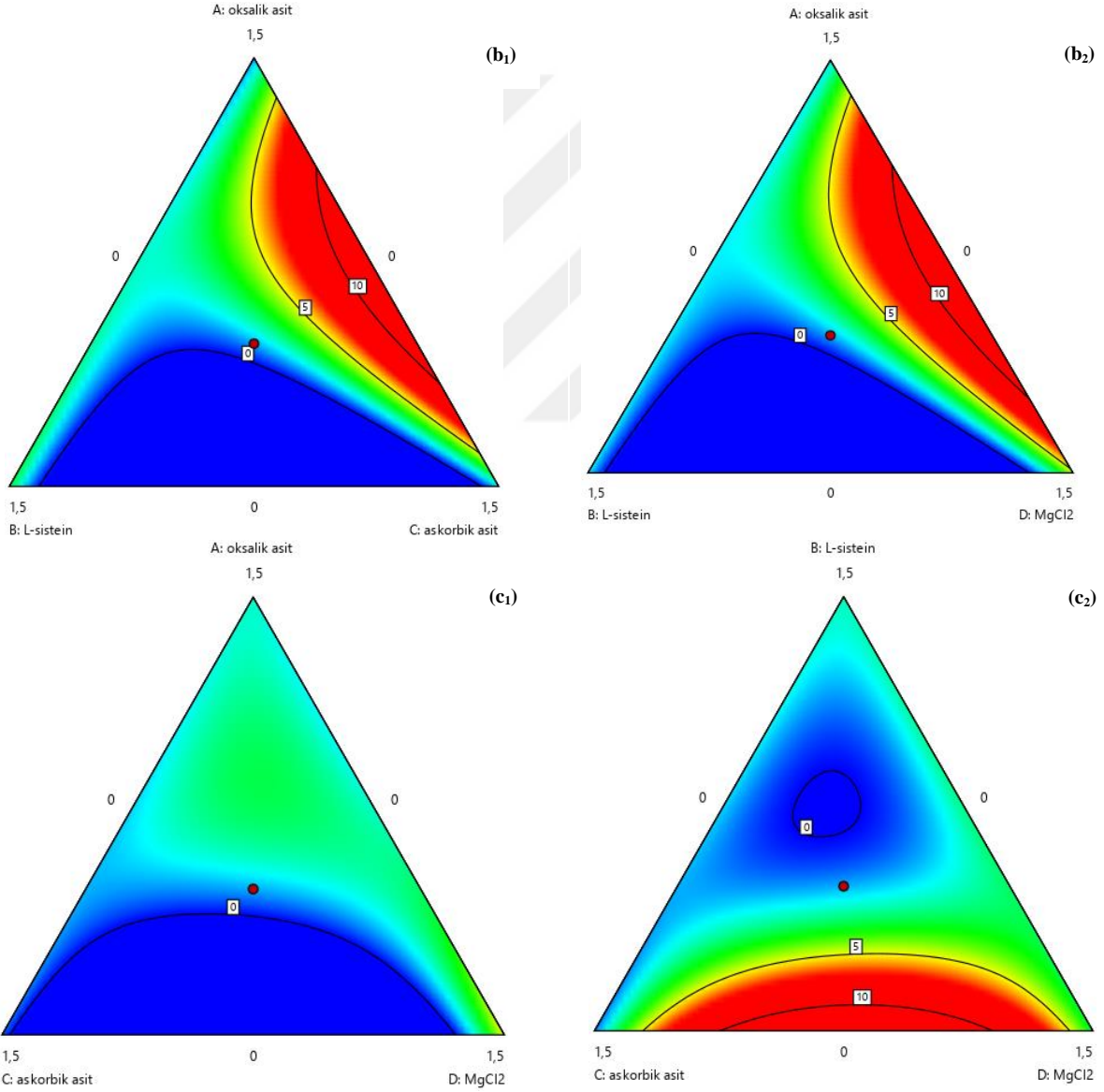
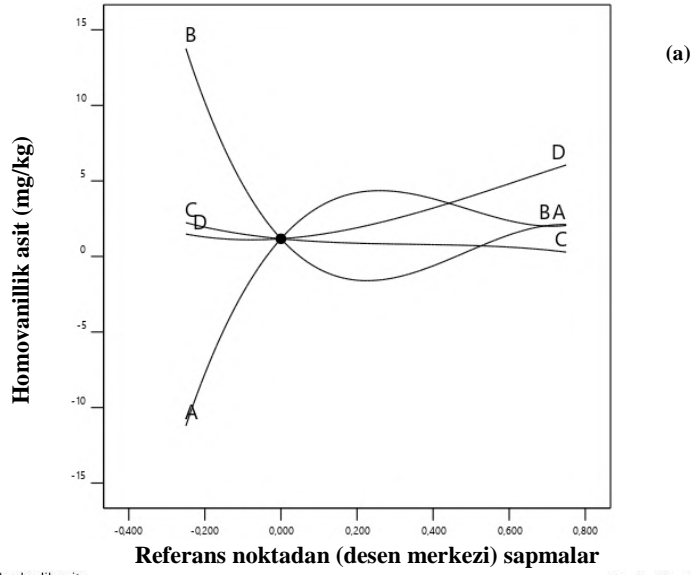


(c<sub>1</sub>)



(c<sub>2</sub>)

**Şekil 4.25.** Katkı maddelerinin kafeik asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.26.** Katkı maddelerinin homovanillic asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

İnhibitör maddelerin vanillin, 3,4-DHPEA-AC, olesein ve oleokantal içerikleri üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı maddesi için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30).

Şekil 4.27a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre orta seviyeye kadar OA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı vanillin miktarını artırırken AA kullanımı ile vanillin miktarında azalma tespit edilmiştir. OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımındaki artış vanillin miktarı üzerine negatif etkide bulunmaktadır (Şekil 4.27a, Şekil 4.27c<sub>1</sub>). OA ve L-sis konsantrasyonlarının artırılması, zeytinyağının vanillin miktarını azaltmıştır (Şekil 4.27.b<sub>1</sub>).

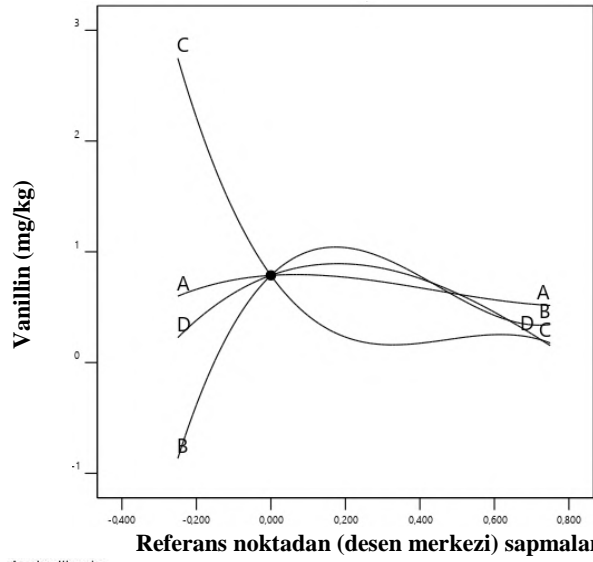
Şekil 4.28'da, 3,4-DHPEA-AC miktarı için oluşturulan iz eğim grafiği verilmiştir. Orta seviyeye kadar ve orta seviyeden sonra kullanılan tüm katkıları 3,4-DHPEA-AC miktarı üzerine doğrusal olarak etki göstermiştir (Şekil 4.28a). Ayrıca, OA, AA ve MgCl<sub>2</sub> miktarının artması 3,4-DHPEA-AC miktarını artırmıştır. En düşük 3,4-DHPEA-AC miktarı L-sis ile üretilen zeytinyağlarında görülmüştür (Şekil 4.28b<sub>1</sub>, Şekil 4.28b<sub>2</sub> ve Şekil 4.28c<sub>2</sub>). L-sis kullanımındaki artış 3,4-DHPEA-AC miktarı üzerine negatif etkide bulunurken MgCl<sub>2</sub> kullanımındaki artışın ise 3,4-DHPEA-AC miktarı üzerine pozitif etkide bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.28b<sub>2</sub>).

Şekil 4.29'de zeytinyağında belirlenen olesein içeriğine, kullanılan katkı maddelerin etkisi görülmektedir. OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı olesein miktarını orta noktaya kadar azaltıp daha sonra bir miktar artırmıştır. OA ve MgCl<sub>2</sub> miktarlarının artması olesein değeri için ters etki göstermiştir. L-sis kullanımı olesein içeriğini az miktarda artırırken AA kullanımı olesein içeriğini oldukça fazla miktarda artırmıştır. Yüksek oranda L-sis ve L-sis'den daha az oranda AA kullanılarak üretilen zeytinyağı (Şekil 4.29b<sub>1</sub>) ile yüksek oranda MgCl<sub>2</sub> ve MgCl<sub>2</sub>'den daha az oranda L-sis kullanılarak üretilen zeytinyağının (Şekil 4.29b<sub>2</sub>) en yüksek olesein içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.29c<sub>1</sub>'de de görülebileceği gibi, yüksek oranda OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanılarak üretilen zeytinyağının en yüksek olesein miktarına sahip olduğu görülmektedir.

Şekil 4.30a'da zeytinyağında tespit edilen oleokantal miktarına kullanılan katkı maddelerin etkisi görülmektedir. Orta seviyeye kadar AA kullanım miktarının artması oleokantal miktarını azaltırken OA kullanım miktarının artması oleokantal miktarını artırmıştır. Oleokantal miktarı için oluşturulan iz eğim grafiğindeki verilere göre L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması oleokantal miktarını neredeyse hiç değiştirmemiştir (Şekil 4.30a). OA ve AA kullanımı ise oleokantal miktarını fazla miktarda etkilerkenmiştir. OA kullanımının artması oleokantal miktarı üzerine olumlu etki gösterirken AA kullanımının artması oleokantal miktarı üzerine olumsuz etki göstermiştir. En yüksek oleokantal miktarı düşük oranda kullanılan L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ile üretilen zeytinyağı örneklerinde belirlenmiştir

(Şekil 4.30c<sub>2</sub>). L-sis ve MgCl<sub>2</sub>'nin ortak kullanımı ile elde edilen oleokantal değerlerinin AA kullanımını ile daha düşük olduğu görülmektedir (Şekil 4.30c<sub>2</sub>).

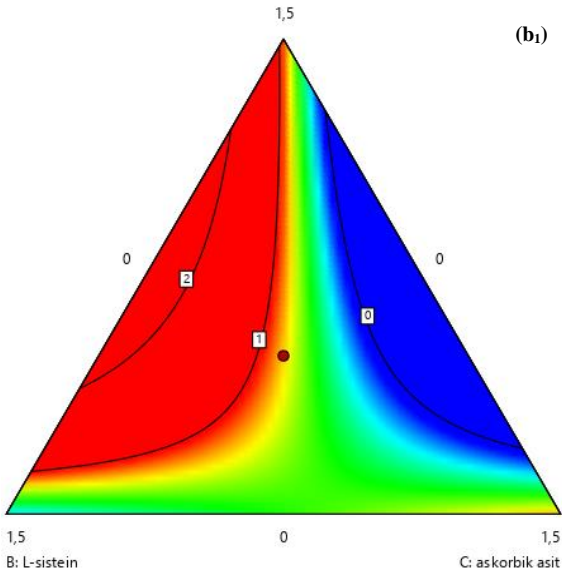




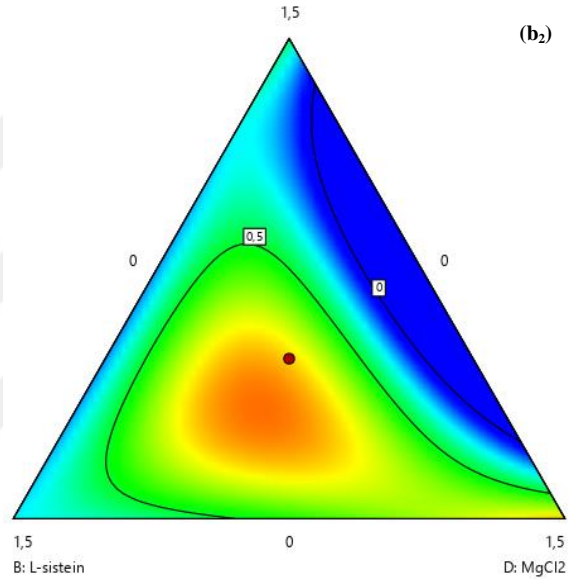
(a)

A: oksalik asit

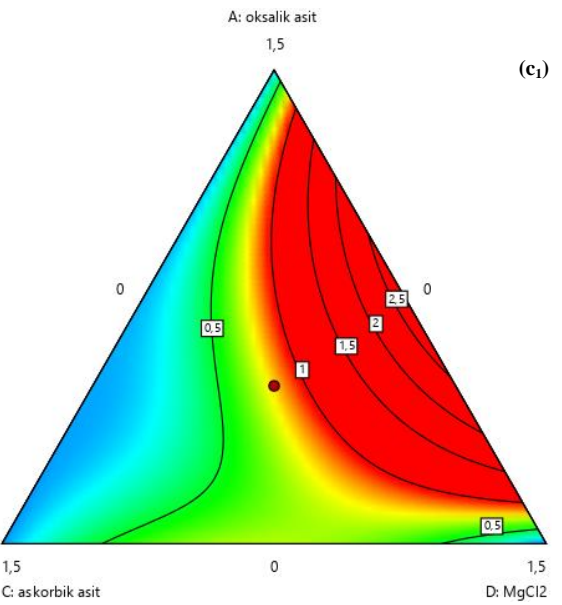
A: oksalik asit



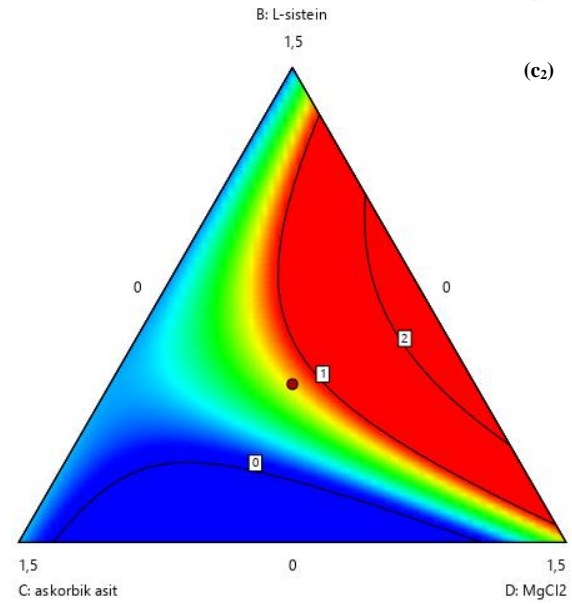
(b<sub>1</sub>)



(b<sub>2</sub>)

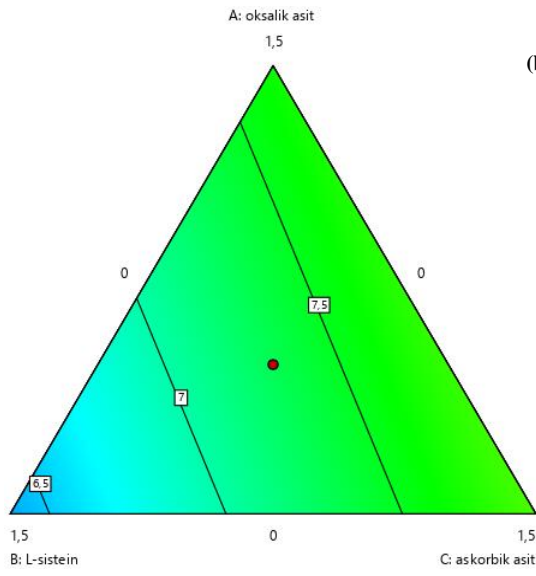
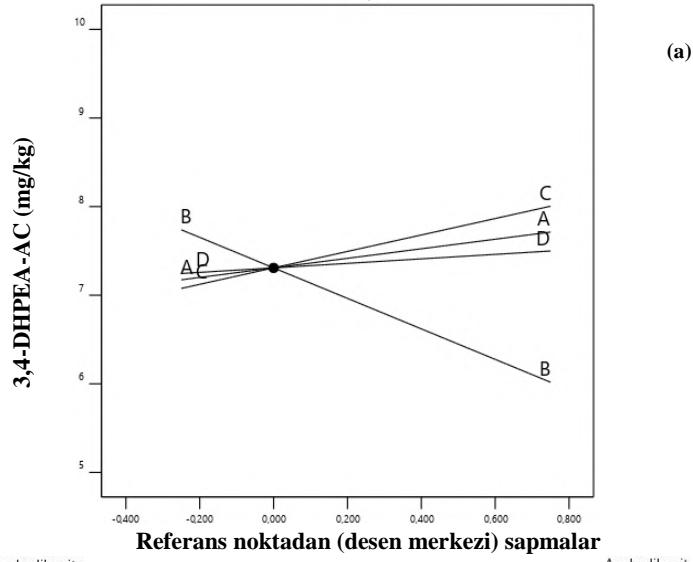


(c<sub>1</sub>)

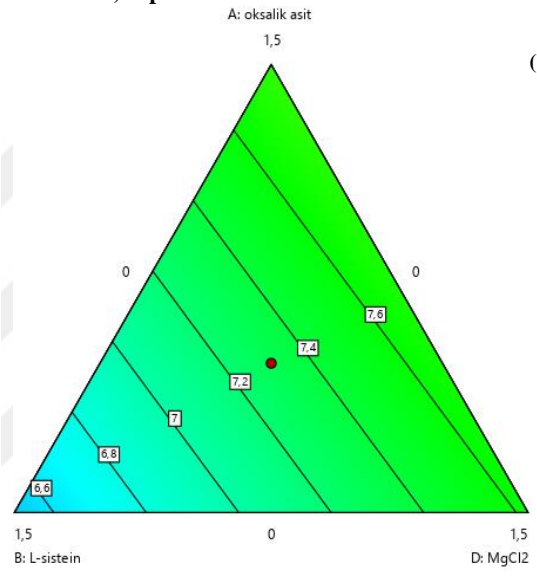


(c<sub>2</sub>)

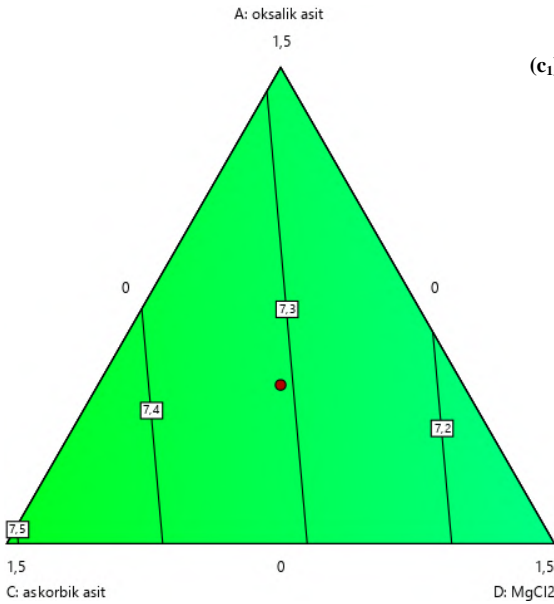
**Şekil 4.27.** Katkı maddelerinin vanillin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



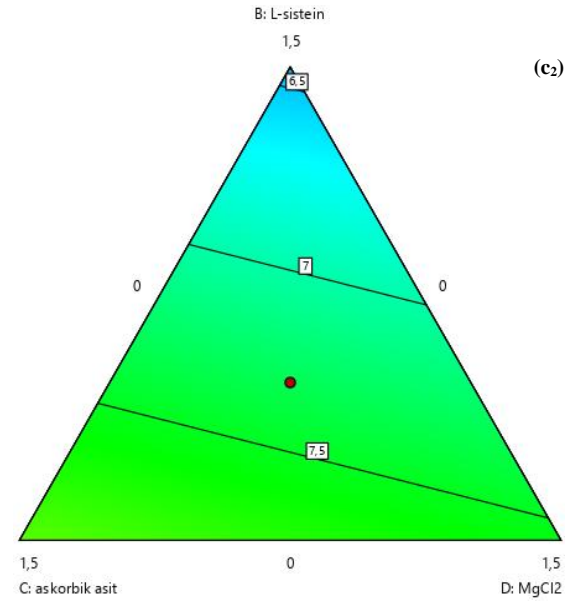
(b<sub>1</sub>)



(b<sub>2</sub>)

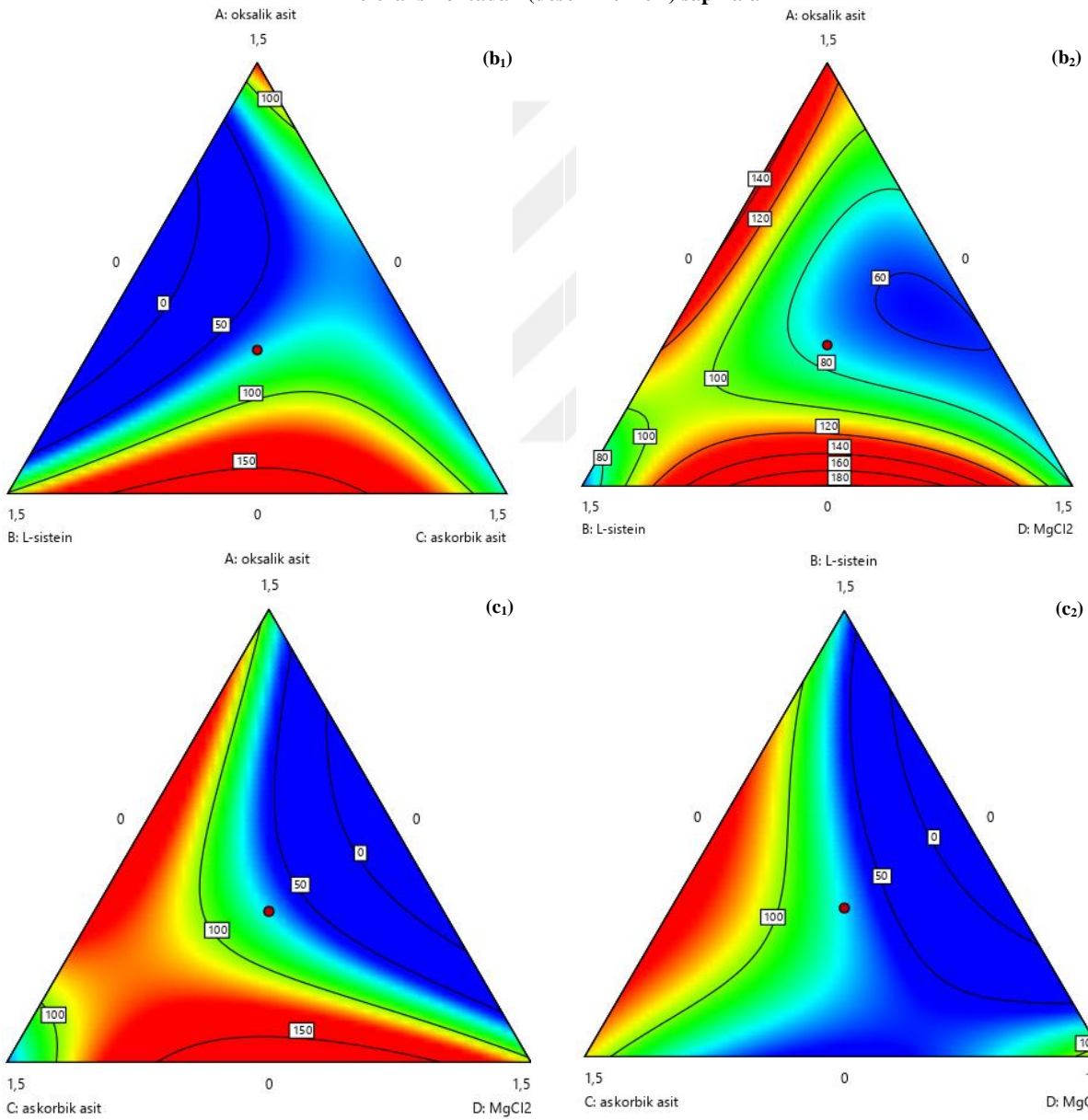
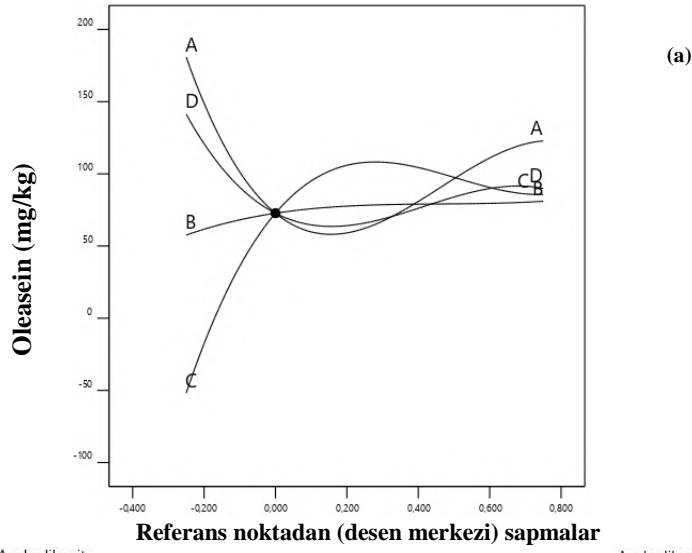


(c<sub>1</sub>)

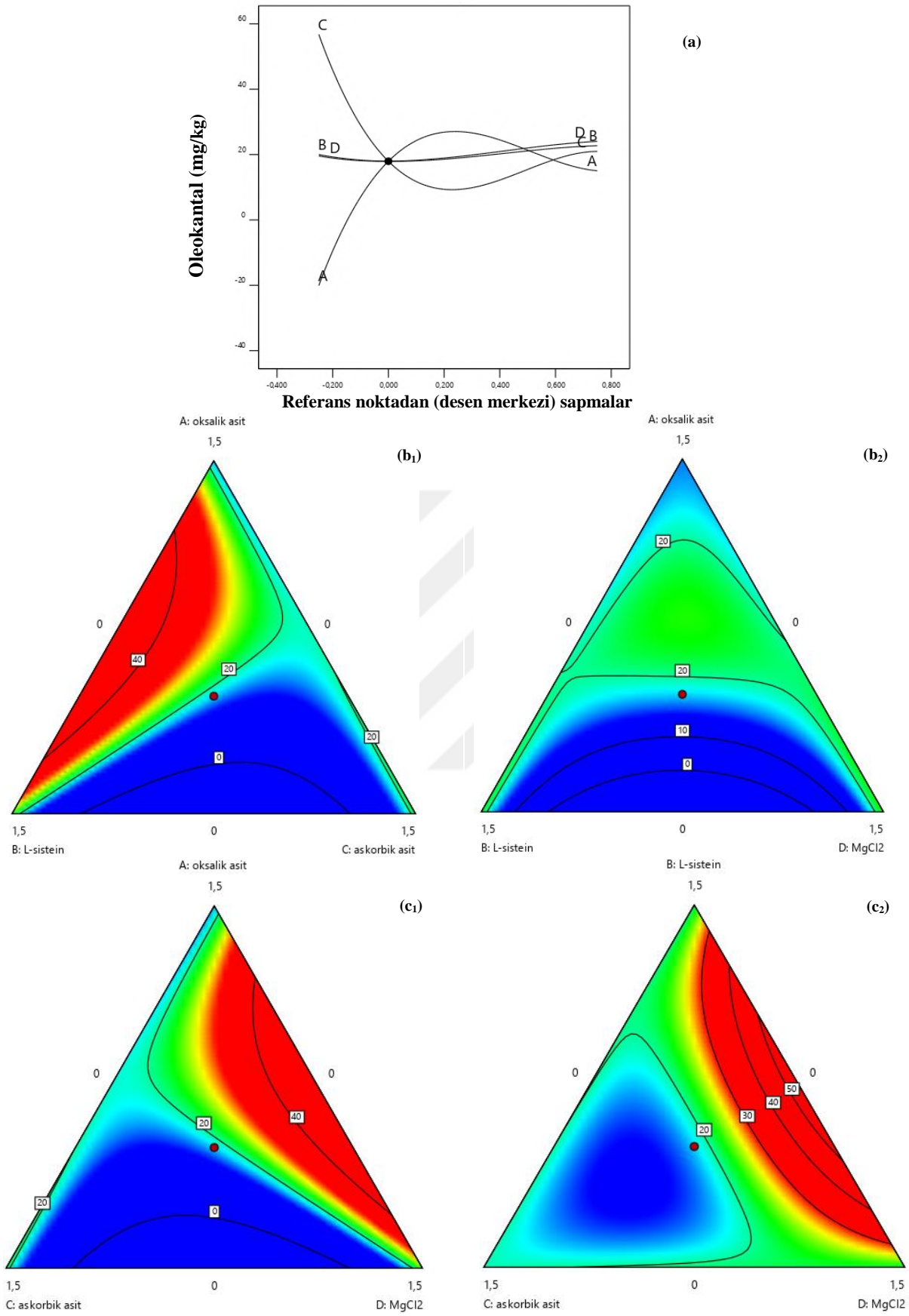


(c<sub>2</sub>)

**Şekil 4.28.** Katkı maddelerinin 3,4-DHPEA-AC içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.29.** Katkı maddelerinin oleacein içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b1 – b2, c1 – c2. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.30.** Katkı maddelerinin oleokantal içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

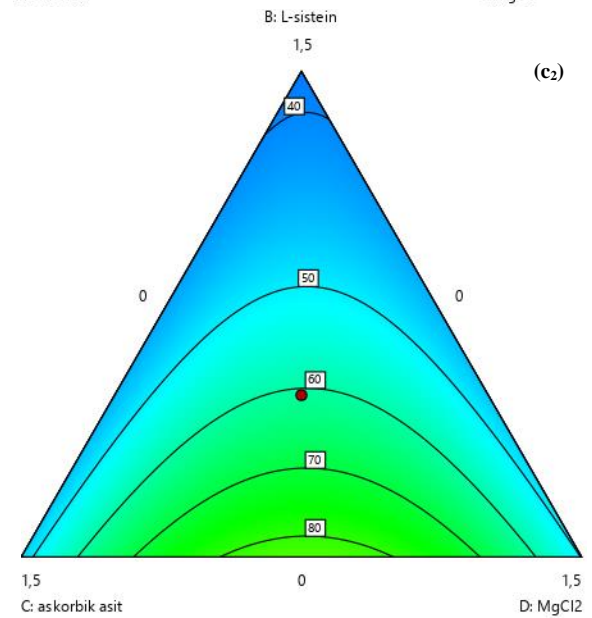
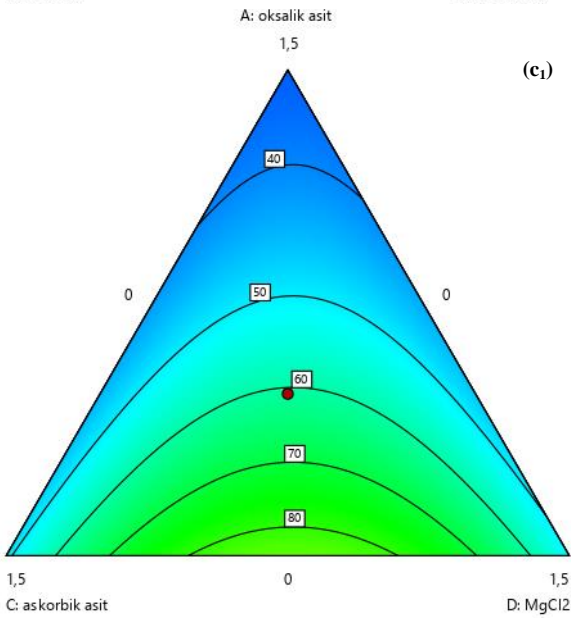
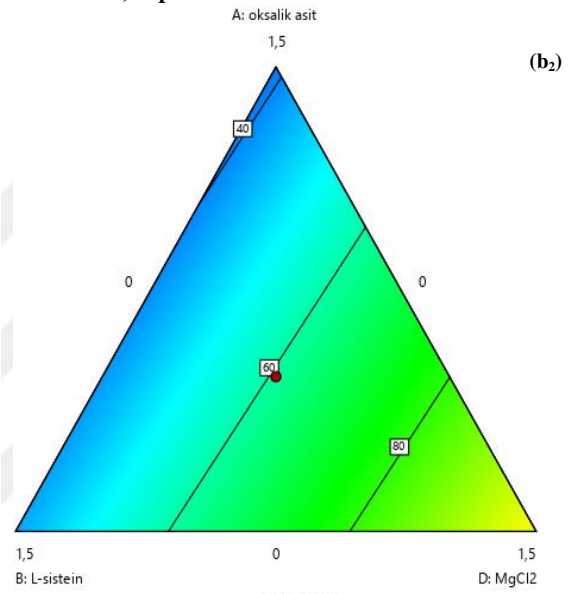
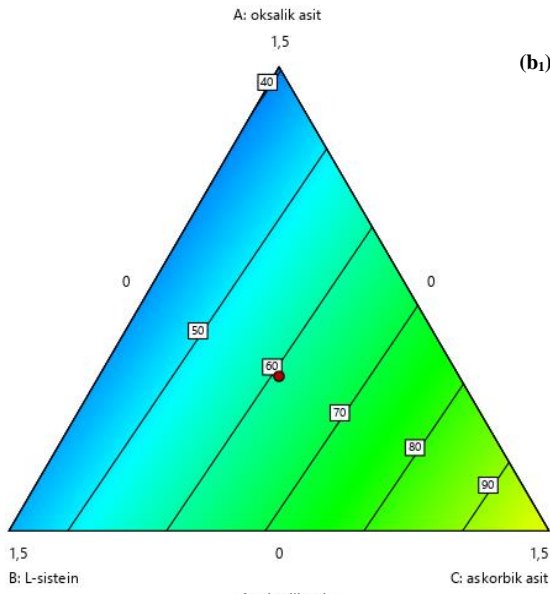
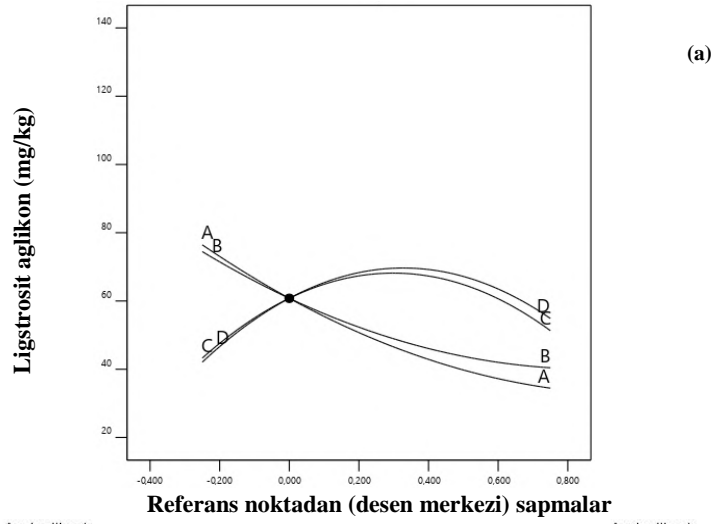
İnhibitör maddelerin ligstrosit aglikon, oleuropein aglikon, apigenin ve luteolin üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34).

Şekil 4.31a'daki iz eğim grafiği incelendiğinde, orta noktaya kadar OA ve L-sis ligstrosit aglikon miktarını azaltırken, AA ve MgCl<sub>2</sub> artırmıştır. Orta noktadan sonra, OA ve L-sis ligstrosit aglikon miktarını azaltmaya devam ederken AA ve MgCl<sub>2</sub>'de artırmaya devam etmiştir. Ligstrosit aglikon miktarı için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde katkı maddelerin kullanımındaki artış ligstrosit aglikon miktarı üzerine etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.31a). En yüksek ligstrosit aglikon miktarı AA miktarının fazla L-sis miktarının düşük olduğu ve AA miktarının fazla OA miktarının düşük olduğu zaman elde edilmiştir (Şekil 4.31b<sub>1</sub>). Böylece, AA miktarının ligstrosit aglikon miktarı üzerine etkisinin yüksek olduğu söylenebilmektedir. OA kullanımının artması ligstrosit aglikon üzerine negatif etkide bulunmuştur (Şekil 4.31b<sub>1</sub>, Şekil 4.31b<sub>2</sub> ve Şekil 4.31c<sub>1</sub>).

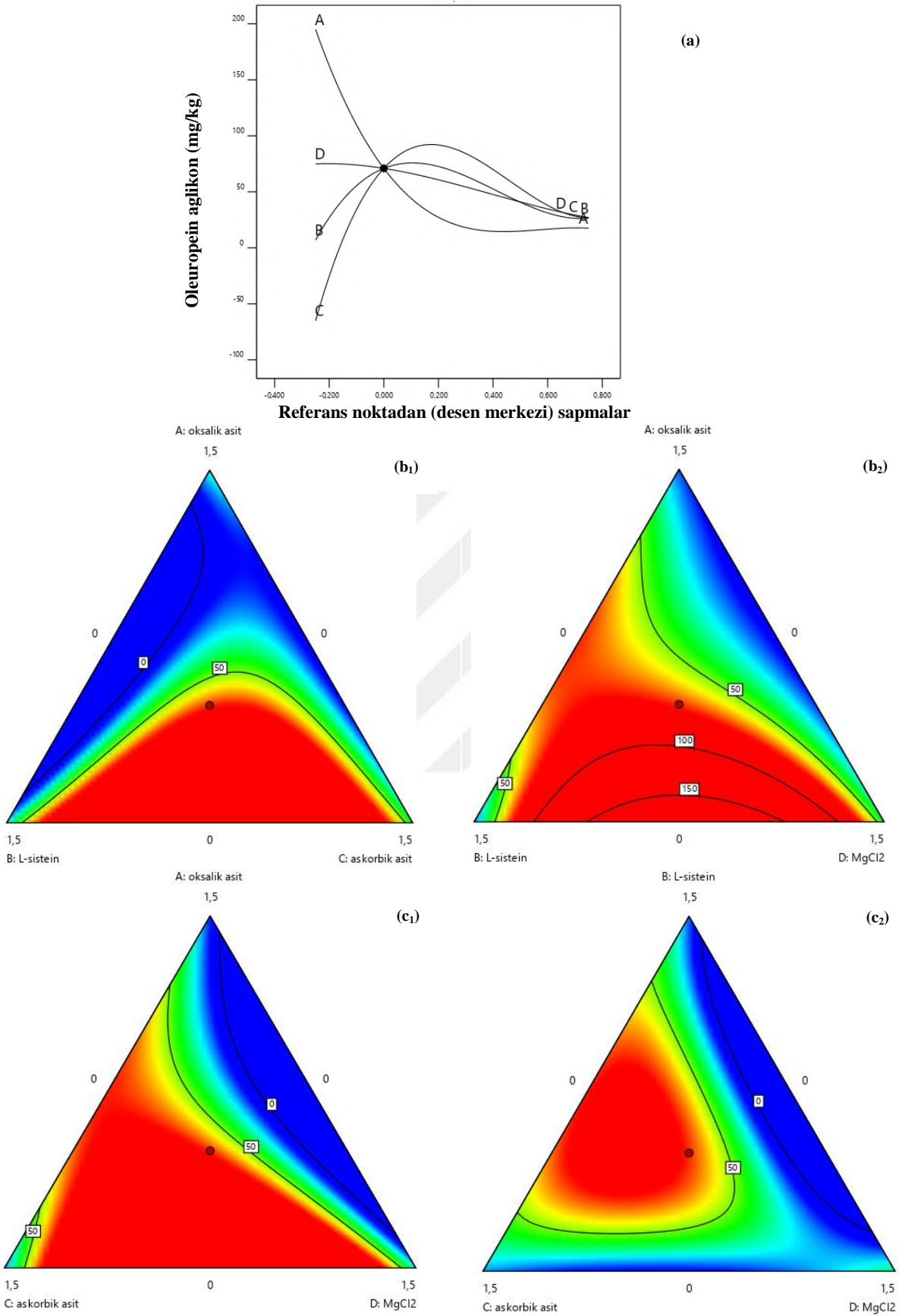
Oleuropein aglikon için verilen iz eğim grafiğindeki verilere göre OA ve AA kullanımının artması oleuropein aglikon miktarını en fazla miktarda etkilemiştir (Şekil 4.32a). L-sis kullanımı oleuropein aglikon miktarını en az miktarda etkileyen katkı olmuştur. Orta noktaya kadar OA kullanımı oleuropein aglikon miktarını azaltmış, L-sis ve AA kullanımı ise artırmıştır. İnhibitör maddelerden OA ve MgCl<sub>2</sub> miktarlarının artması oleuropein aglikon miktarı üzerine olumsuz etki göstermiştir (Şekil 4.32a). En yüksek oleuropein aglikon miktarı düşük miktarlarda L-sis, AA (Şekil 4.32b<sub>1</sub>), L-sis, MgCl<sub>2</sub> (Şekil 4.32b<sub>2</sub>) ve AA, MgCl<sub>2</sub> (Şekil 4.32c<sub>1</sub>) kullanılmasıyla, üretilen zeytinyağlarında görülmüştür.

Şekil 4.33a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre, OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı apigenin miktarında artışa sebep olurken L-sis ve AA kullanımı apigenin miktarında azalmaya sebep olmuştur. Tüm katkı maddeleri apigenin miktarı üzerine doğrusal bir etki göstermiştir. OA ve L-sis miktarının apigenin madde miktarı üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir. Şekil 4.33b<sub>1</sub> ve Şekil 4.33b<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki L-sis konsantrasyonunun artırılması, zeytinyağlarının apigenin içeriğini düşürmüştür. MgCl<sub>2</sub> apigenin miktarını önemli düzeyde değiştirmemiştir (Şekil 4.33c<sub>1</sub>, Şekil 4.33c<sub>2</sub>).

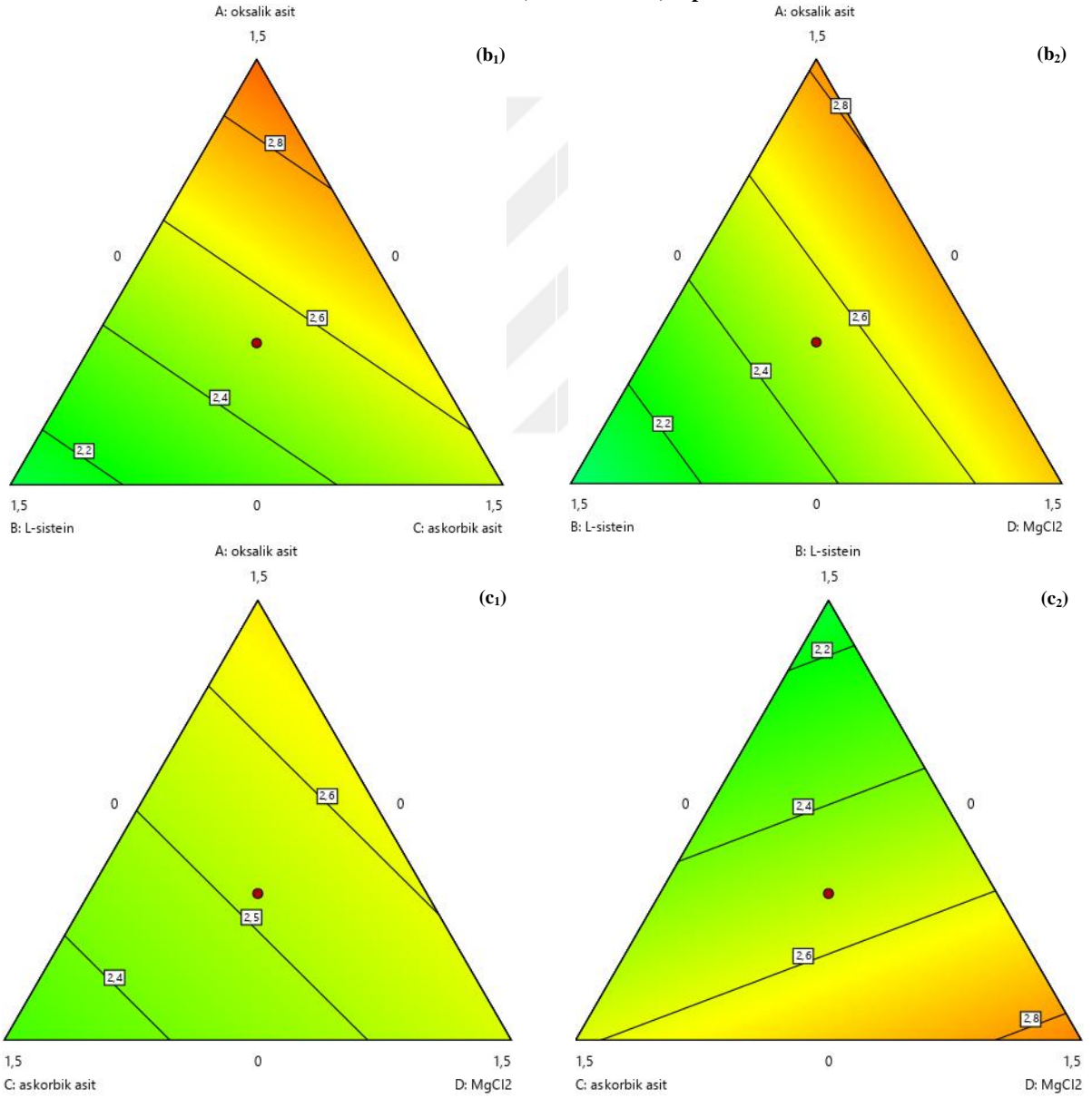
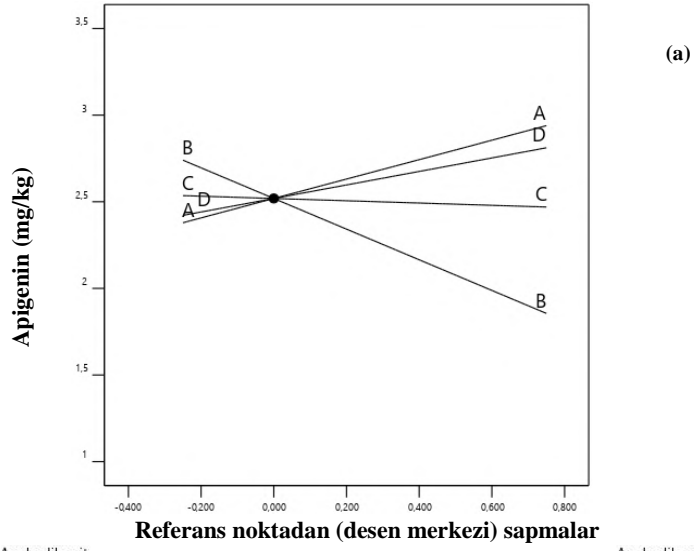
Luteolin değeri için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması luteolin değeri üzerine olumlu etki yaptığı gözlenmiştir (Şekil 4.34a). OA katkısının kullanımı ile luteolin miktarında azalma gözlenirken L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı ile luteolin miktarında bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.34a). L-sis ve AA katkılarının tekli kullanımlarında en yüksek luteolin değeri elde edilmiştir (Şekil 4.34b<sub>1</sub>). Şekil 4.34b<sub>1</sub> ve Şekil 4.34b<sub>2</sub>'deki kontur grafikleri, formülasyondaki L-sis oranının artmasının zeytinyağının luteolin değerini artırdığını göstermiştir.



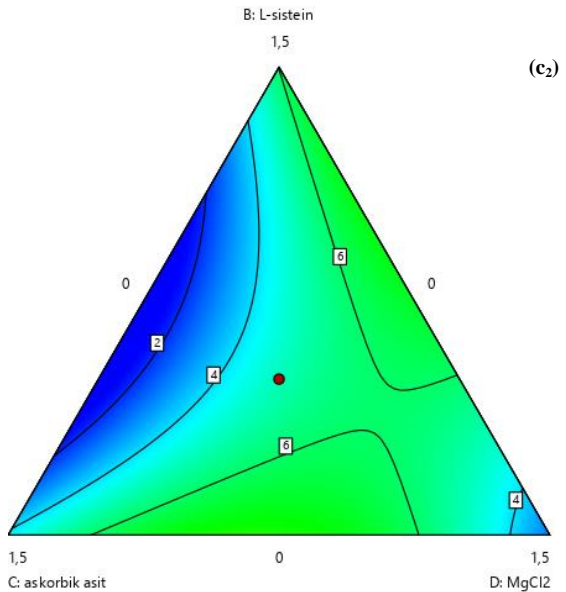
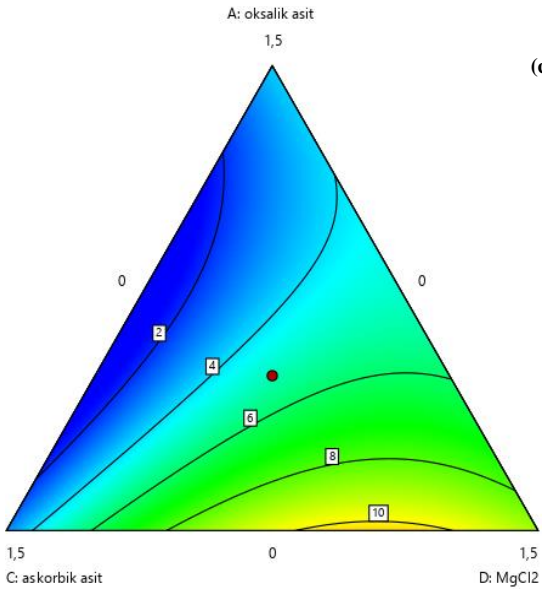
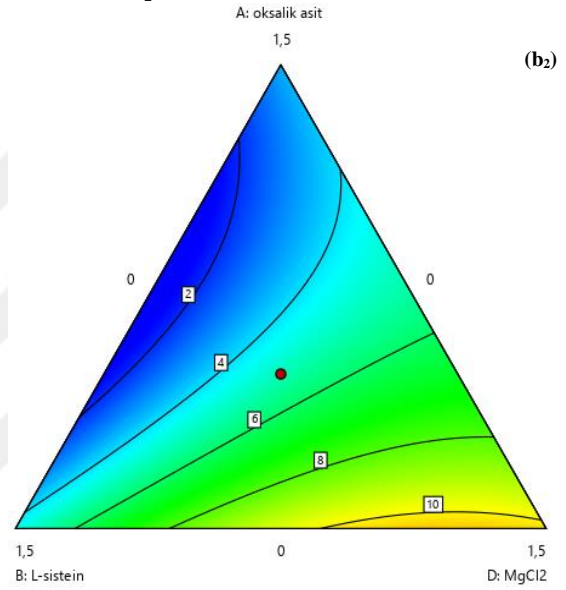
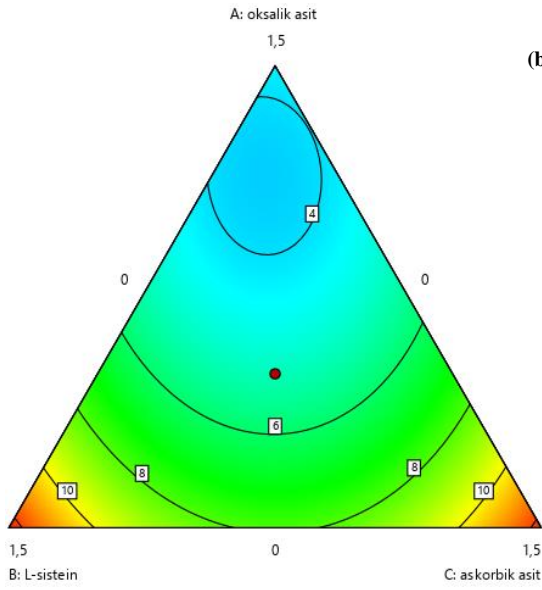
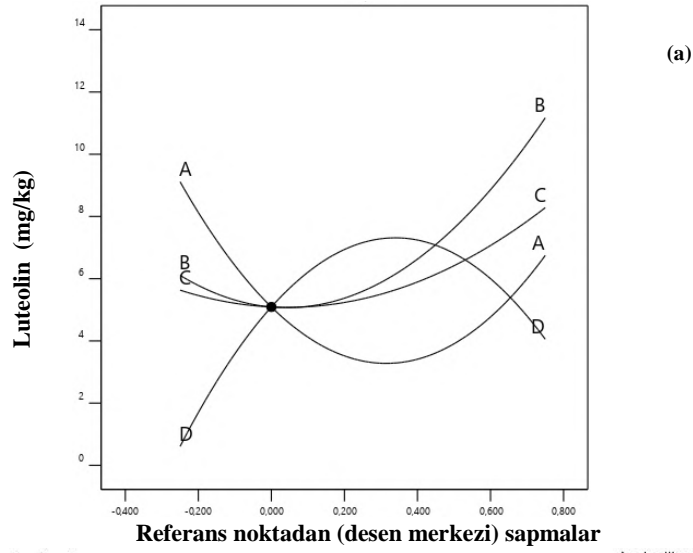
**Şekil 4.31.** Katkı maddelerinin ligstrosit aglikon içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.32.** Katkı maddelerinin oleuropein aglikon içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.33.** Katkı maddelerinin apigenin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.34.** Katkı maddelerinin luteolin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

#### 4.4.6.2. Zeytin hamurlarının fenolik bileşen kompozisyonu

Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28, zeytinyağı ekstraksiyonunda uygulanan farklı katkıların sonucunda elde edilen zeytin hamurlarındaki ana fenolik bileşikler göstermektedir. Veriler, katkı ilavesinin taze zeytinlerden elde edilen zeytin hamuru fenolik bileşiklerinin ekstraksiyon verimliliğini arttırmaya uygun olduğunu göstermektedir. Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28'de gösterildiği gibi, 9 fenolik bileşik farklı katkı maddesi çeşiti ve miktarına göre zeytin hamurunda HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. İncelenen zeytin hamurlarında bulunan başlıca fenolik alkoller hidroksitirozol (3,4-DHPEA) ve tirozol (p-HPEA)'dür. Bu bileşiklerin içerikleri, hidroksitirozol ve tirozolün glikozidik ve konjuge formlarının hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Farklı zeytin çeşitlerinden ve farklı olgunlaşma aşamalarındaki zeytin meyvelerinde tanımlanan başlıca fenolik glikozitler, oleuropein, ligstrosit, demetileuropein, verbaskozite, elenolik asit glukozit, luteolin-7-glukozit, apigenin-7-glukozit, rutin ve quersetin-3-rutinosit'tir (Gómez-Rico ve ark., 2008). Bu fenolik glikozitler, yağ ekstraksiyonu sırasında endojen  $\beta$ -glukozidaz enzimi tarafından hidrolize edilmiştir (Romero-Segura ve ark., 2012). Zeytin hamurlarının hidroksitirozol içerikleri 36.46-761.27 mg/kg arasında belirlenmiştir. En yüksek hidroksitirozol miktarı %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> içeren örnekte tespit edilmiştir. İnhibitör çeşiti ve oranının değişmesi ile hidroksitirozol konsantrasyonunda düzenli olmayan bir artış gözlenmiştir. İnhibitör maddelerin tekli uygulamalarının hidroksitirozol içeriğine etkisi incelendiğinde %2 MgCl<sub>2</sub> 73.79-96.60 mg/kg, %2 L-sis 126.45-105.86 mg/kg, %2 AA 434.72-375.71 mg/kg ve %2 OA 296.56-329.99 mg/kg bulunmuştur. %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> uygulaması 761.27 mg/kg konsantrasyonu ile en yüksek hidroksitirozol içeriğine sahipken, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> uygulaması 59.39 mg/kg konsantrasyonu ile en düşük hidroksitirozol değerine sahiptir. Zeytinlerin yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşik içermesinden dolayı (özellikle o-difenol oleuropein ve hidroksitirozol) acı tat meydana gelmektedir (Charoenprasert ve Mitchel, 2012; Ötleş ve Özyurt, 2012). Bu sebeple, hidroksitirozol içeriği tüm örneklerde kontrol örneğine göre yüksek olduğundan tüm örneklerde acı tatda artış görülmüştür. Zeytin hamurlarının en düşük tirozol içerikleri ise 15.73 mg/kg değeri ile kontrol uygulamasında görülürken, en yüksek tirozol içeriği 871.14 mg/kg değeri ile %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> görülmüştür. Elde edilen tüm örnekler tirozol içeriği bakımından kontrole göre daha zengindir. %2 oranında katkı madde ilave edilen örneklerin tirozol içerikleri diğer uygulamalara göre nispeten daha yüksek iken %2 MgCl<sub>2</sub> uygulanan örnekler en düşük (22.32-19.21 mg/kg) tirozol konsantrasyonuna sahiptirler. Tekli uygulamaların hidroksitirozol içeriklerine bakıldığında da %2 MgCl<sub>2</sub> uygulanan örnekler diğer tekli uygulamalara göre en düşük hidroksitirozol konsantrasyonu göstermektedir.

Zeytin meyve dokularında tanımlanan başlıca fenolik glikozitler oleuropein, ligstrosit, demetiloleuropein, verbascosid, elenolik asit glikozit, luteolin-7-glikozit, apigenin-7-glikozit, rutin ve kuersetin-3-rutinosid'dir (Gómez-Rico ve ark., 2008; Obied ve ark., 2008). Oleuropein, ligstrosit ve dimetiloleuropeinin enzimatik hidrolizinden kaynaklanan sekoiridoit türevleri, zeytinyağında en bol bulunan fenolik bileşenlerdir. Bu nedenle, sızma zeytinyağında hidrofilik fenollerin varlığı, zeytin meyve dokularında başlangıçta bulunan fenolik glikozitlerin içeriği ve bu glikozitler üzerinde etkili olan hidrolitik ve oksidatif enzimlerin aktivitesi ile doğrudan ilişkilidir. Zeytinyağı ekstraksiyon işlemi sırasında meyve fenolik glikozitlerinin hidrolizi, oleuropein ve ligstrositi hidrolize eden endojen  $\beta$ -glukozidaz enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir (Yahyaoui ve ark., 2019). İnhibitör ilaveli zeytin hamurlarının %2 OA ilavesinden sonra oleuropeinin ölçülen en önemli sekoiridoit olduğu (Çizelge 4.28), ancak %1 OA + %1 L-sis katkılarının beraber ilavesi ile elde edilen örneklerin daha yüksek bir oleuropein konsantrasyonu gösterdiği belirlenmiştir. Sadece %2  $MgCl_2$  ilaveli zeytin hamuru kontrol zeytin hamuruna göre daha düşük değerde bulunmuştur. %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25  $MgCl_2$  içeren örnek oleuropein açısından kontrol zeytin hamuruna göre önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Zeytindeki spesifik sekoiridoit olan oleuropein ve ligstrositin hem enzimatik hem de enzimatik olmayan yapıda hidrolitik ve oksidatif değişikliklerle sonuçlanan bozunmaya maruz kaldığı düşünülmektedir (Soler-Rivas ve ark., 2000; Rovellini ve Cortesi, 2002; Servili ve ark., 2004; Mugelli ve ark., 2005; Artajo ve ark., 2007). Bu değişiklikler hem acı ve keskin (Andrewes ve ark., 2003; Siliani ve ark., 2006) gibi duyuşsal tanımlayıcıların yoğunluğunun hem de yağın antioksidan gücünün derecesinin modifikasyonlarında yansıtılabilir, bu da ürünün raf ömrünün ve besin değerinin azalmasına neden olmaktadır (Visioli ve ark., 1998; Beauchamp ve ark., 2005).

Zeytin hamurunda bulunan luteolin ve apigenin gibi flavonoidler de katkı ilavesinden etkilenmiştir, ancak ilave edilen katkı miktarı ve çeşiti ile ilgili net bir korelasyon yoktur (Çizelge 4.28).

Zeytinlerin fenolik bileşimi meyve olgunlaşma aşaması, hasat zamanı, olgunluk derecesi, çeşiti, eti veya çekirdeği ve mevsim gibi faktörlere bağlı olarak değişim göstermektedir (Charoenprasert ve Mitchel, 2012; Ötleş ve Özyurt, 2012).

**Çizelge 4.27.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg)

	<b>Hidroksitirozol (3,4-DHPEA)</b>	<b>Tirozol (p-HPEA)</b>	<b>Vanillik asit</b>	<b>Vanillin</b>	<b>Verbaskozit</b>
<b>%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	195.40	90.09	12.11	10.19	43.34
<b>%1 OA + %1 L-sis</b>	321.94	359.76	56.88	35.60	87.43
<b>%2 MgCl<sub>2</sub></b>	73.79	22.32	24.94	27.59	76.77
<b>%2 L-sis</b>	126.45	790.06	73.41	47.29	48.89
<b>%1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	212.24	53.85	40.80	6.00	59.89
<b>%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	761.27	80.00	50.22	8.44	36.23
<b>%2 AA</b>	434.72	106.52	34.42	6.44	47.27
<b>%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	264.84	871.14	20.60	31.11	71.48
<b>%2 OA</b>	296.56	97.25	67.72	34.03	73.27
<b>%2 AA</b>	375.71	93.54	34.26	7.62	50.41
<b>%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub></b>	189.42	90.92	60.72	24.91	58.20
<b>%2 OA</b>	329.99	80.43	74.95	33.42	67.00
<b>%1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	59.39	832.19	45.06	13.97	82.86
<b>%1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	449.97	66.01	47.49	41.88	56.87
<b>%2 MgCl<sub>2</sub></b>	96.60	19.21	23.92	26.67	70.90
<b>%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub></b>	510.21	228.67	20.77	19.65	79.88
<b>%1 L-sis + %1 AA</b>	237.66	153.64	30.35	15.52	64.20
<b>%1 OA + %1 AA</b>	287.40	269.28	18.88	8.50	46.23
<b>%2 L-sis</b>	105.86	854.76	76.78	42.84	51.11
<b>%1 OA + %1 L-sis</b>	308.11	406.07	54.75	36.29	83.32
<b>K</b>	36.46	15.73	12.01	5.89	42.27

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

**Çizelge 4.28.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenler (mg/kg) (devamı)

	<b>Rutin</b>	<b>Oleuropein</b>	<b>Luteolin</b>	<b>Apigenin</b>
<b>%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	106.05	680.45	29.75	30.43
<b>%1 OA + %1 L-sis</b>	152.16	817.65	20.88	15.51
<b>%2 MgCl<sub>2</sub></b>	35.14	295.17	43.67	26.97
<b>%2 L-sis</b>	150.86	479.59	46.91	29.11
<b>%1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	59.16	450.78	37.75	26.89
<b>%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	90.37	315.71	34.20	31.04
<b>%2 AA</b>	77.17	366.35	43.85	26.65
<b>%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub></b>	153.96	544.14	40.65	30.40
<b>%2 OA</b>	107.96	575.83	38.61	29.50
<b>%2 AA</b>	70.62	371.28	41.85	30.10
<b>%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub></b>	58.05	310.19	50.40	31.43
<b>%2 OA</b>	101.25	622.62	36.35	29.92
<b>%1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	253.86	358.92	27.86	27.33
<b>%1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub></b>	40.38	332.97	48.77	30.10
<b>%2 MgCl<sub>2</sub></b>	33.85	299.42	43.94	29.92
<b>%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub></b>	76.61	346.50	23.97	20.38
<b>%1 L-sis + %1 AA</b>	108.49	333.44	21.94	25.10
<b>%1 OA + %1 AA</b>	112.78	519.87	45.62	29.50
<b>%2 L-sis</b>	147.36	473.78	45.69	31.80
<b>%1 OA + %1 L-sis</b>	146.48	776.97	21.10	14.80
<b>K</b>	40.41	310.57	38.56	19.45

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

Zeytin hamurlarının hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit için verilen varyans analiz sonuçları Çizelge 4.29'da sunulmuştur. İnhibitör maddelerin hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit yanıtları üzerindeki etkisini belirlemek için tüm fenolik bileşenlerde özel kübik modeli belirlenmiştir. Bu fenolik bileşenlerin değerlerinin modellerine ait P değerleri  $<0.0001$  olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.29). Varyans analizinde %95 güven aralığındaki ( $P<0.05$ ) modellerle çalışılmak tercih edildiğinden elde edilen hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit sonuçları  $P<0.05$  olduğundan, istatistiksel olarak önemli bir model oluşturulmuştur. İnhibitör maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytin hamurlarının hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri üzerine önemli seviyede etkilediği görülmektedir ( $P<0.05$  ve  $P<0.01$ ). Buna göre, örneklerin hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri üzerine  $OA \times L$ -sis,  $OA \times L$ -sis  $\times AA$  ve  $L$ -sis  $\times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları önemli etkilere sahip olmuştur ( $P<0.01$ ). Ayrıca, örneklerin tirozol ve vanillik asit değerleri  $OA \times AA$  ve  $L$ -sis  $\times AA$  ve interaksiyonlarının etkisi ile önemli ölçüde değişmiştir ( $P<0.01$ ).  $OA \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonu ise hidroksitirozol değeri üzerine istatistiksel olarak önemsiz bulunurken ( $P>0.05$ ), tirozol ve vanillik asit değerleri doğrusal etkileşimi ve birinci dereceden etkisi önemli düzeyde etkili bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.3075, 0.5971 ve 0.0892 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerlerinin belirleme katsayıları  $R^2$ : 0.9882, 0.9973 ve 0.9855 ve uyarlanan belirleme katsayıları  $R^2$ : 0.9751, 0.9936 ve 0.9656 olarak bulunmuştur. Oldukça yüksek belirleme katsayıları ve uyarlanan belirleme katsayılarından da anlaşılacağı gibi elde edilen hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri ile bağımsız değişkenler arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Dolayısıyla, hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %98.82, %99.73 ve %98.55'i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan tespit edilen hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.29'da verilmiştir. Model katsayıları incelendiğinde hidroksitirozol, tirozol ve vanillik asit değerleri üzerine OA, L-sis, AA,  $MgCl_2$  katkılarının pozitif etkileri bulunmaktadır.  $OA \times L$ -sis interaksiyonu ise hidroksitirozol için pozitif interaksiyon gösterirken, tirozol ve vanillik asit içerikleri için negatif interaksiyon göstermektedir.

**Çizelge 4.29.** Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	Hidroksitirozol			Tirozol			Vanillik asit		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	10	75.32	<0.0001	11	267.14	<0.0001	11	49.45	<0.0001
AB	1	20.98	0.0013	1	11.72	0.0090	1	25.27	0.0010
AC	1	6.17	0.0348	1	42.37	0.0002	1	61.15	<0.0001
BC	-	-	-	1	126.51	<0.0001	1	31.45	0.0005
BD	-	-	-	1	231.33	<0.0001	-	-	-
CD	1	48.68	<0.0001	-	-	-	1	21.44	0.0017
ABC	1	30.57	0.0004	1	39.54	0.0002	1	66.36	<0.0001
ABD	1	140.26	<0.0001	1	6.68	0.0324	1	57.79	<0.0001
ACD	1	3.71	0.0861	1	214.72	<0.0001	1	40.52	0.0002
BCD	1	68.62	<0.0001	1	19.56	0.0022	1	56.24	<0.0001
Hata	9	-	-	8	-	-	8	-	-
Model uyumsuzluğu	4	1.59	0.3075	3	0.6879	0.5971	3	3.88	0.0892
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9882	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9751		R <sup>2</sup> =0.9973	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9936		R <sup>2</sup> =0.9855	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9656	
Hidroksitirozol = $315.28 \times A + 102.29 \times B + 400.02 \times C + 78.53 \times D + 417.66 \times (A \times B) - 295.61 \times (A \times C) + 828.17 \times (C \times D) + 17577.66 \times (A \times B \times C) - 37409.13 \times (A \times B \times D) + 6160.07 \times (A \times C \times D) + 26315.16 \times (B \times C \times D)$									
Tirozol = $89.78 \times A + 823.21 \times B + 102.42 \times C + 23.29 \times D - 287.89 \times (A \times B) + 705.57 \times (A \times C) - 1223.86 \times (B \times C) + 1648.60 \times (B \times D) + 18354.29 \times (A \times B \times C) + 7481.39 \times (A \times B \times D) - 42412.94 \times (A \times C \times D) + 12868.12 \times (B \times C \times D)$									
Vanillik asit = $70.17 \times A + 74.46 \times B + 34.45 \times C + 22.53 \times D - 65.10 \times (A \times B) - 131.92 \times (A \times C) - 94.61 \times (B \times C) + 77.81 \times (C \times D) - 3686.76 \times (A \times B \times C) - 3392.08 \times (A \times B \times D) + 2871.91 \times (A \times C \times D) + 3398.52 \times (B \times C \times D)$									

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

Farklı katkı maddeler kullanılarak elde edilen zeytin hamurlarının vanillin, verbaskozit ve rutin değerlerine ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.30'da verilmiştir. Formülasyona bağlı olarak vanillin ve rutin miktarları için en iyi tahminlenen model özel kübik iken verbaskozit içeriği için en iyi tahminlenen model kuadratik olarak belirlenmiştir. Vanillin, verbaskozit ve rutin miktarları için incelenen modellerin P değerleri sırasıyla <math><0.0001</math>, 0.0175 ve 0.0001 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.30). Zeytin hamurlarının vanillin, verbaskozit ve rutin değerleri için %95 güven aralığında istatistiksel olarak önemli modeller oluşturulmuştur. İnhibitör maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytin hamurlarının vanillin, verbaskozit ve rutin içeriği üzerine istatistiksel olarak önemli seviyede etkili bulunmuştur ( $P<0.01$ ).  $OA \times AA$ ,  $L\text{-sis} \times MgCl_2$  ve  $L\text{-sis} \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonları verbaskozit fenolik içeriği üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken vanillin ve rutin fenolik içerikleri üzerine istatistiksel olarak anlamlı etkiler tespit edilmiştir ( $P<0.01$ ). Formülasyona bağlı olarak vanillin fenolliği üzerine istatistiksel açıdan, doğrusal ve birinci dereceden etkisi önemli olan terimler  $OA \times L\text{-sis} \times AA$ ,  $OA \times L\text{-sis} \times MgCl_2$  interaksiyonları ( $P<0.05$ ) ve  $L\text{-sis} \times AA \times MgCl_2$  interaksiyonudur ( $P<0.01$ ). Vanillin fenolik içeriği üzerine etkili olan interaksiyonlar ( $OA \times L\text{-sis} \times AA$ ,  $OA \times L\text{-sis} \times MgCl_2$  ve  $L\text{-sis} \times AA \times MgCl_2$ ) aynı zamanda rutin fenolik içeriği için de etkilidir ( $P<0.01$ ). Vanillin ve rutin miktarları içingeliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken ( $P>0.05$ ), verbaskozit miktarı için geliştirilen tüm modeller ise uyumsuzluk testini geçememiştir ( $P<0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.0890, 0.0033 ve 0.0631 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun vanillin ve rutin için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Vanillin, verbaskozit ve rutin fenolikleri için belirleme katsayıları sırasıyla  $R^2$ : 0.9939, 0.6995 ve 0.9942 ve uyarlanan belirleme katsayıları  $R^2$ : 0.9806, 0.5242 ve 0.9877 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, vanillin, verbaskozit ve rutin değerlerindeki değişkenliğin sırasıyla %99.39, %69.95 ve %99.42'si belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan  $R^2$  değerleri ise belirlenen  $R^2$  değerlerine yakın olduğundan belirlenen vanillin, verbaskozit ve rutin değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Zeytinyağlarının vanillin, verbaskozit ve rutin değerleri için Çizelge 4.30'da oluşturulan regresyon eşitlikleri verilmiştir. Regresyon eşitliklerine göre, vanillin ve verbaskozit değerleri için en az AA katkısının, rutin değeri için ise en az  $MgCl_2$  katkısının etki ettiği görülmektedir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre  $OA \times AA$  ve  $OA \times MgCl_2$  etkileşimlerinin negatif interaksiyon etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytin hamurlarının vanillin ve verbaskozit değerlerini azalttığı, pozitif interaksiyon etkilerinden dolayı ise zeytin hamurlarının rutin değerini artırdığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.30.** Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı)

Kaynak	Vanillin			Verbaskozit			Rutin		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	13	74.93	<0.0001	7	3.99	0.0175	10	13.20	0.0001
AB	1	4.59	0.0759	1	6.90	0.0221	1	22.90	0.0010
AC	1	32.56	0.0013	1	3.05	0.1061	1	14.06	0.0046
AD	1	135.30	<0.0001	1	2.05	0.1778	-	-	-
BC	1	25.69	0.0023	-	-	-	-	-	-
BD	1	111.22	<0.0001	1	3.39	0.0904	1	638.38	<0.0001
CD	1	134.86	<0.0001	-	-	-	1	4.11	0.0733
ABC	1	11.96	0.0135	-	-	-	1	13.64	0.0050
ABD	1	12.80	0.0117	-	-	-	1	28.68	0.0005
ACD	1	15.07	0.0082	-	-	-	-	-	-
BCD	1	17.41	0.0059	-	-	-	1	13.98	0.0046
Hata	6	-	-	12	-	-	9	-	-
Model uyumsuzluğu	1	4.44	0.0890	7	16.94	0.0033	4	4.58	0.0631
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9939	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9806		R <sup>2</sup> =0.6995	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5242		R <sup>2</sup> =0.9942	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9877	
Vanillin = 33.66 × A + 45.00 × B + 6.96 × C + 27.06 × D – 14.08 × (A×B) – 48.34 × (A×C) – 98.54 × (A×D) – 42.94 × (B×C) – 89.34 × (B×D) + 98.37 × (C×D) – 783.85 × (A×B×C) + 810.71 × (A×B×D) – 884.41 × (A×C×D) + 950.79 × (B×C×D)									
Verbaskozit = 68.58 × A + 54.06 × B + 48.87 × C + 71.55 × D + 91.63 × (A×B) – 76.26 × (A×C) – 62.26 × (A×D) + 80.38 × (B×D)									
Rutin = 102.40 × A + 149.78 × B + 73.49 × C + 32.29 × D + 96.05 × (A×B) + 96.96 × (A×C) + 657.57 × (B×D) – 52.42 × (C×D) + 2459.47 × (A×B×C) – 3525.54 × (A×B×D) – 2494.58 × (B×C×D)									

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

Farklı katkı maddelerle elde edilen zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.31’de sunulmuştur. Oleuropein miktarı için belirlenen model özel kübik, luteolin ve apigenin miktarları için belirlenen modeller ise kuadratik olarak belirlenmiştir. Zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarına ait varyans analizinde P değerleri sırasıyla  $<0.0001$ ,  $0.0053$  ve  $0.0012$  olup katkı maddelerden en az birisinin zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin miktarları üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). Varyans analiz sonuçları, oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarını sadece OA  $\times$  L-sis konsantrasyonunun etkilediğini göstermektedir ( $P<0.01$ ). L-sis  $\times$  AA interaksyonu sadece oleuropein miktarı için  $P<0.05$ , luteolin miktarı için ise  $P<0.01$  olarak istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir. L-sis  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksyonunun ise sadece oleuropein miktarı açısından istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla  $0.0638$  ve  $0.0510$  olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun oleuropein ve apigenin değerleri için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). Zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin miktarları için belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>:  $0.9784$ ,  $0.6625$  ve  $0.6795$  ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla R<sup>2</sup>:  $0.9586$ ,  $0.5420$  ve  $0.5941$  olarak bulunmuştur. R<sup>2</sup>, modele değişken eklenip eklenmemesine ve değişkenlerin istatistiksel olarak önemli olup olmamasına bakılmaksızın her zaman artarken, uyarlanan R<sup>2</sup> ise eklenen değişkenlerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu durumlarda azalmaktadır. Bu sebeple, R<sup>2</sup> ve uyarlanan R<sup>2</sup> değerlerinin birbirine yakın olması istenilmektedir. Çizelge 4.31’e göre zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin R<sup>2</sup> ve uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri birbirlerine oldukça yakın olduğundan katkı maddelerin istatistiksel olarak önemli olduğu görülmektedir. Dolayısıyla, oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarındaki değişkenliğin sırasıyla %97.84, %66.25 ve %67.95’i belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri ise belirlenen R<sup>2</sup> değerlerine yakın olduğundan belirlenen oleuropein, luteolin ve apigenin değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir. Oleuropein, luteolin ve apigenin değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.31’de verilmiştir. Farklı katkı ve farklı oranlar kullanılarak elde edilen zeytin hamurlarının oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarındaki değişim incelendiğinde OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkı miktarı ile OA  $\times$  L-sis interaksyonunun oleuropein, luteolin ve apigenin miktarlarını etkilediği görülmektedir. Oleuropein ve luteolin değerlerini ise L-sis  $\times$  AA etkileşimi negatif interaksiyon etkisinden dolayı zeytin hamurunun oleuropein ve luteolin içeriğini azalttığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.31.** Zeytin hamurlarında belirlenen fenolik bileşenleri etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi (devamı)

Kaynak	Oleuropein			Luteolin			Apigenin		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	9	50.22	<0.0001	5	5.50	0.0053	4	7.95	0.0012
AB	1	87.15	<0.0001	1	12.45	0.0033	1	27.97	<0.0001
BC	1	5.65	0.0388	1	9.70	0.0076	-	-	-
ABC	1	2.65	0.1343	-	-	-	-	-	-
ABD	1	4.53	0.0593	-	-	-	-	-	-
ACD	1	3.09	0.1093	-	-	-	-	-	-
BCD	1	10.85	0.0081	-	-	-	-	-	-
Hata	10	-	-	14	-	-	15	-	-
Model uyumsuzluğu	5	4.44	0.0638	9	62.38	0.0001	10	4.69	0.0510
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9784	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9586		R <sup>2</sup> =0.6625	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5420		R <sup>2</sup> =0.6795	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5941	
Oleuropein = 610.46 × A + 473.82 × B + 379.34 × C + 296.24 × D + 1035.32 × (A×B) – 343.27 × (B×C) + 6294.44 × (A×B×C) + 8160.20 × (A×B×D) – 6749.85 × (A×C×D) – 12705.97 × (B×C×D)									
Luteolin = 37.20 × A + 44.36 × B + 44.63 × C + 43.05 × D – 77.46 × (A×B) – 85.59 × (B×C)									
Apigenin = 30.12 × A + 29.94 × B + 28.71 × C + 28.76 × D – 55.24 × (A×B)									

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

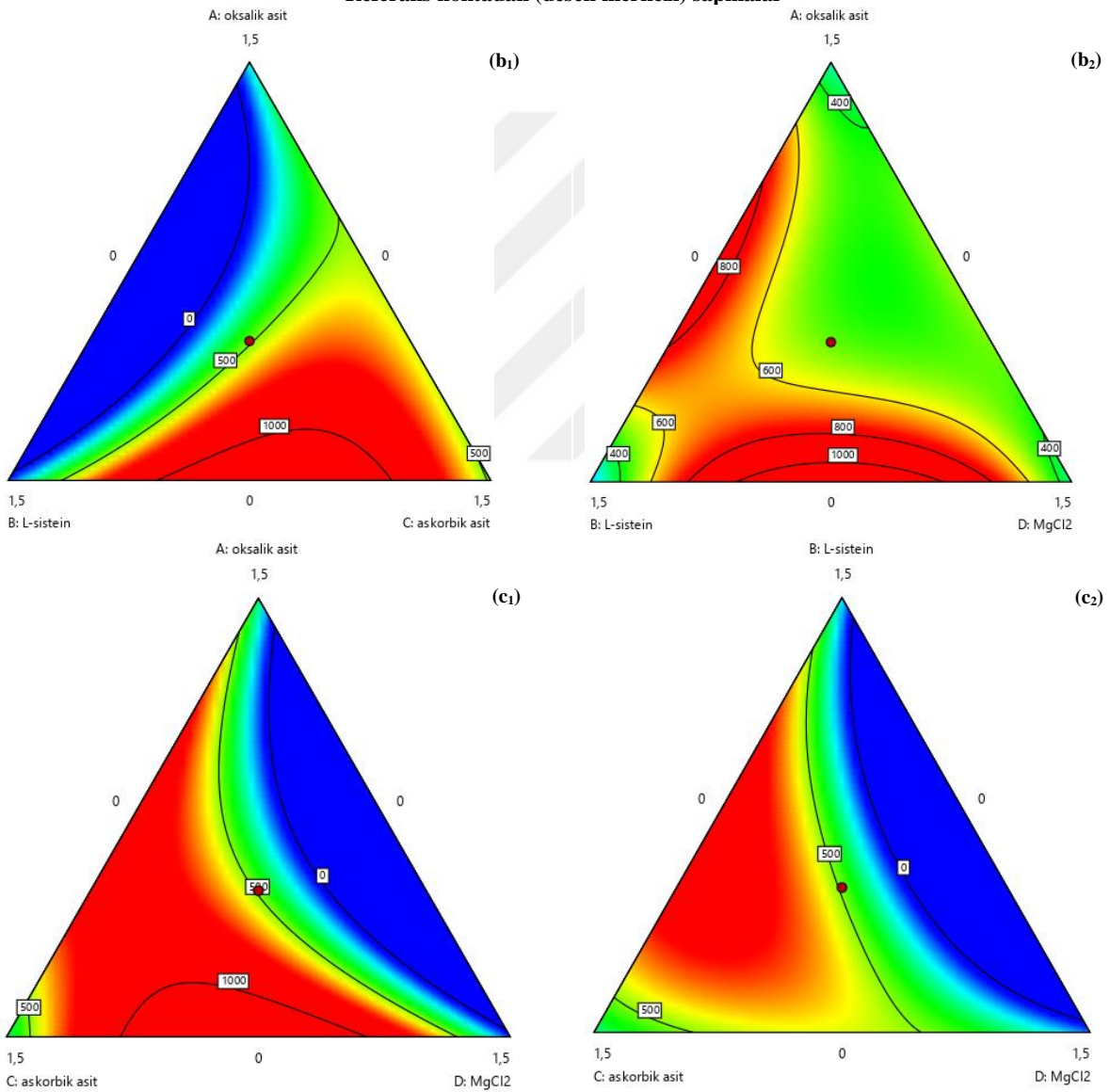
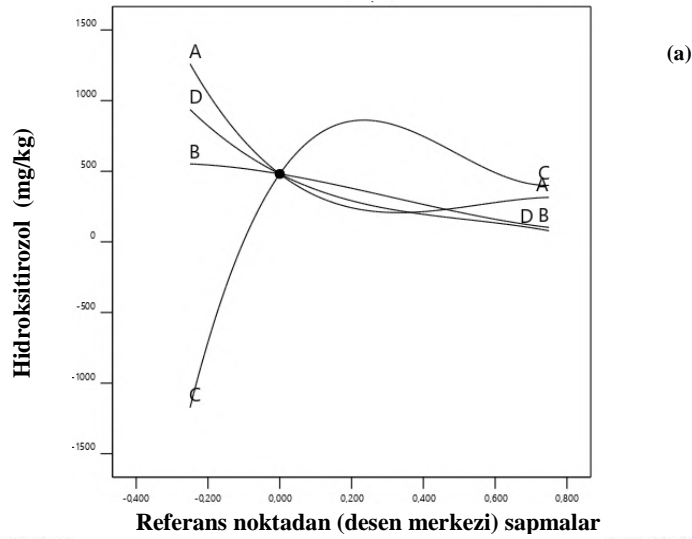
İnhibitör maddelerin zeytin hamurlarının hidroksitirozol, tirozol, vanillik asit ve vanillin değerleri üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuş ve sırasıyla Şekil 4.35, Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de verilmiştir.

OA, L-sis ve  $MgCl_2$  katkılarının miktarlarının artması hidroksitirozol miktarını ilk duruma göre azaltmıştır (Şekil 4.35a). Ayrıca, L-sis miktarının artması hidroksitirozol içeriğini neredeyse sürekli azaltmıştır. AA kullanımının artırılması zeytin hamurunun hidroksitirozol miktarını olumlu yönde etkilemiştir (Şekil 4.35c<sub>1</sub>, Şekil 4.35c<sub>2</sub>). Şekil 4.35c<sub>1</sub>, Şekil 4.35c<sub>2</sub>'ye göre OA,  $MgCl_2$  kullanımı ve L-sis,  $MgCl_2$  kullanımı hidroksitirozol miktarını önemli derecede etkilememiştir.

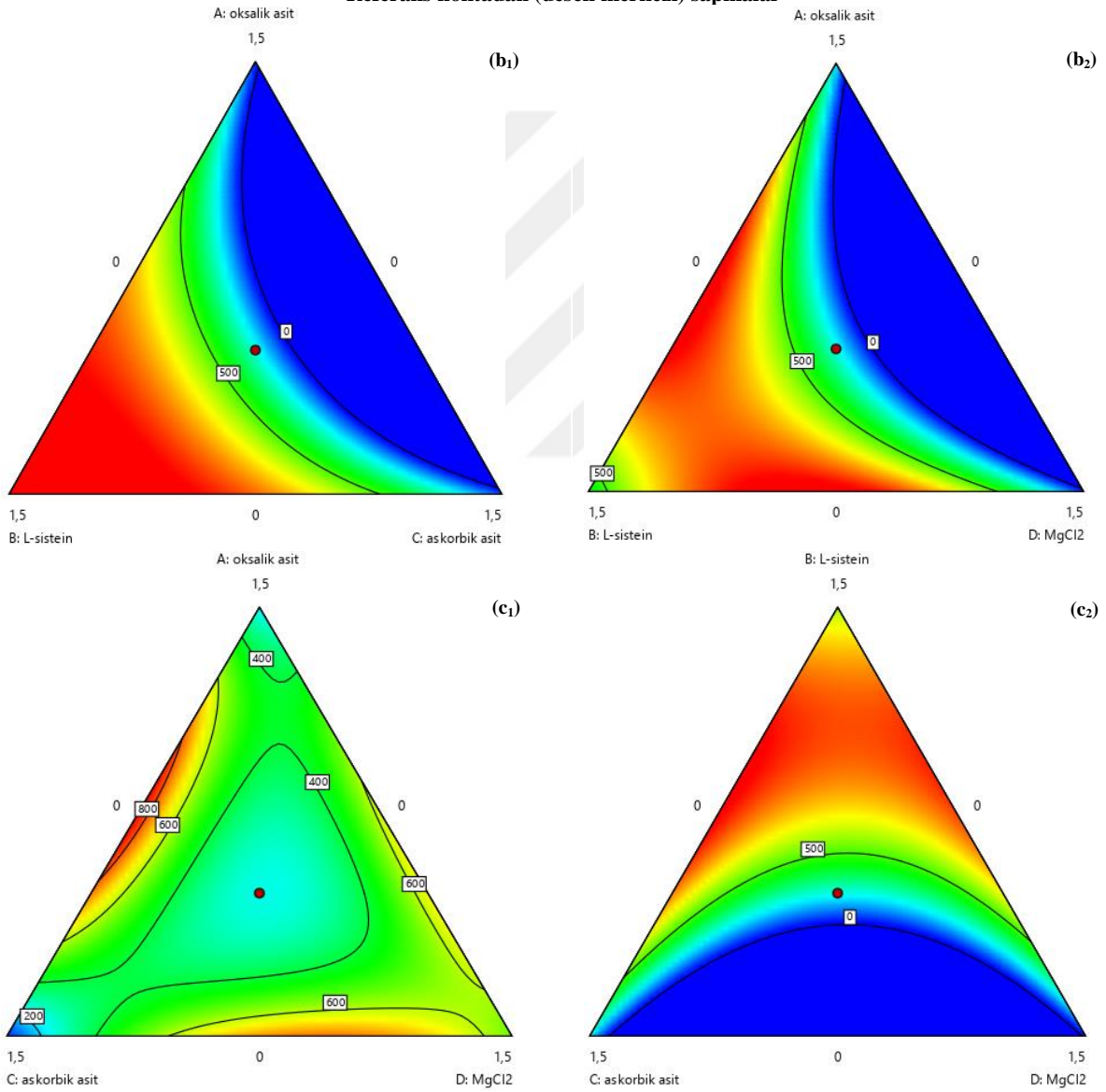
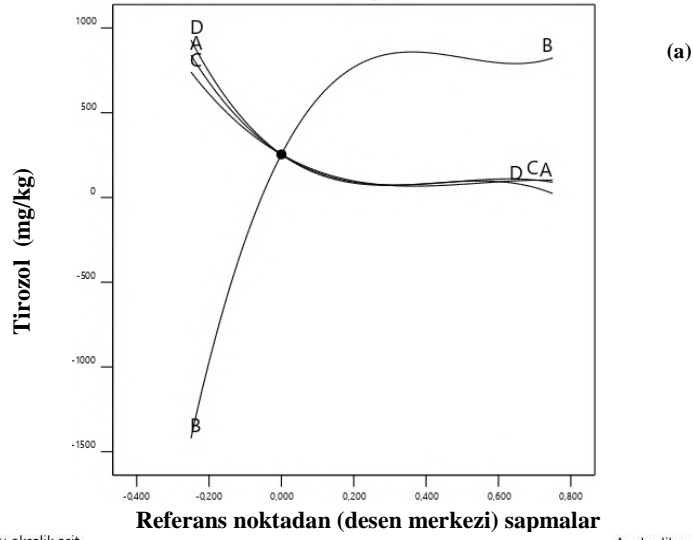
Şekil 4.36a'da görüldüğü gibi zeytin hamurunda kullanılan OA, AA ve  $MgCl_2$  katkıları tirozol miktarını azaltırken, L-sis katkı maddesinin kullanımı artırmıştır. Orta seviyeye kadar OA, AA ve  $MgCl_2$  kullanım miktarının artması tirozol içeriğini azaltırken, L-sis kullanım miktarının artması tirozol içeriğini artırmıştır. OA, AA (Şekil 4.36b<sub>1</sub>), OA,  $MgCl_2$  ve AA,  $MgCl_2$  (Şekil 4.36c<sub>2</sub>) kullanımı tirozol içeriğini önemli seviyede etkilememiştir. Bunun yanı sıra, L-sis kullanımının artması hamurdaki tirozol içeriği üzerine pozitif etki göstermektedir (Şekil 4.36b<sub>1</sub>, Şekil 4.36b<sub>2</sub> ve Şekil 4.36c<sub>2</sub>).

Zeytin hamurunda bulunan vanillik asit içeriği için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde orta seviyeye kadar OA ve L-sis kullanım miktarlarının artması vanillik asit içeriğini azaltırken AA ve  $MgCl_2$  kullanım miktarının artması vanillik asit içeriğini artırmıştır (Şekil 4.37a). Zeytin hamurlarındaki en yüksek vanillik asit değeri L-sis, AA (Şekil 4.37b<sub>1</sub>) ve L-sis,  $MgCl_2$  (Şekil 4.37b<sub>2</sub>) katkı maddelerin kullanımı ile belirlenmiştir. Buradan, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  kullanımının artması vanillik asit içeriği üzerinde pozitif etkide bulunduğu söylenebilir.

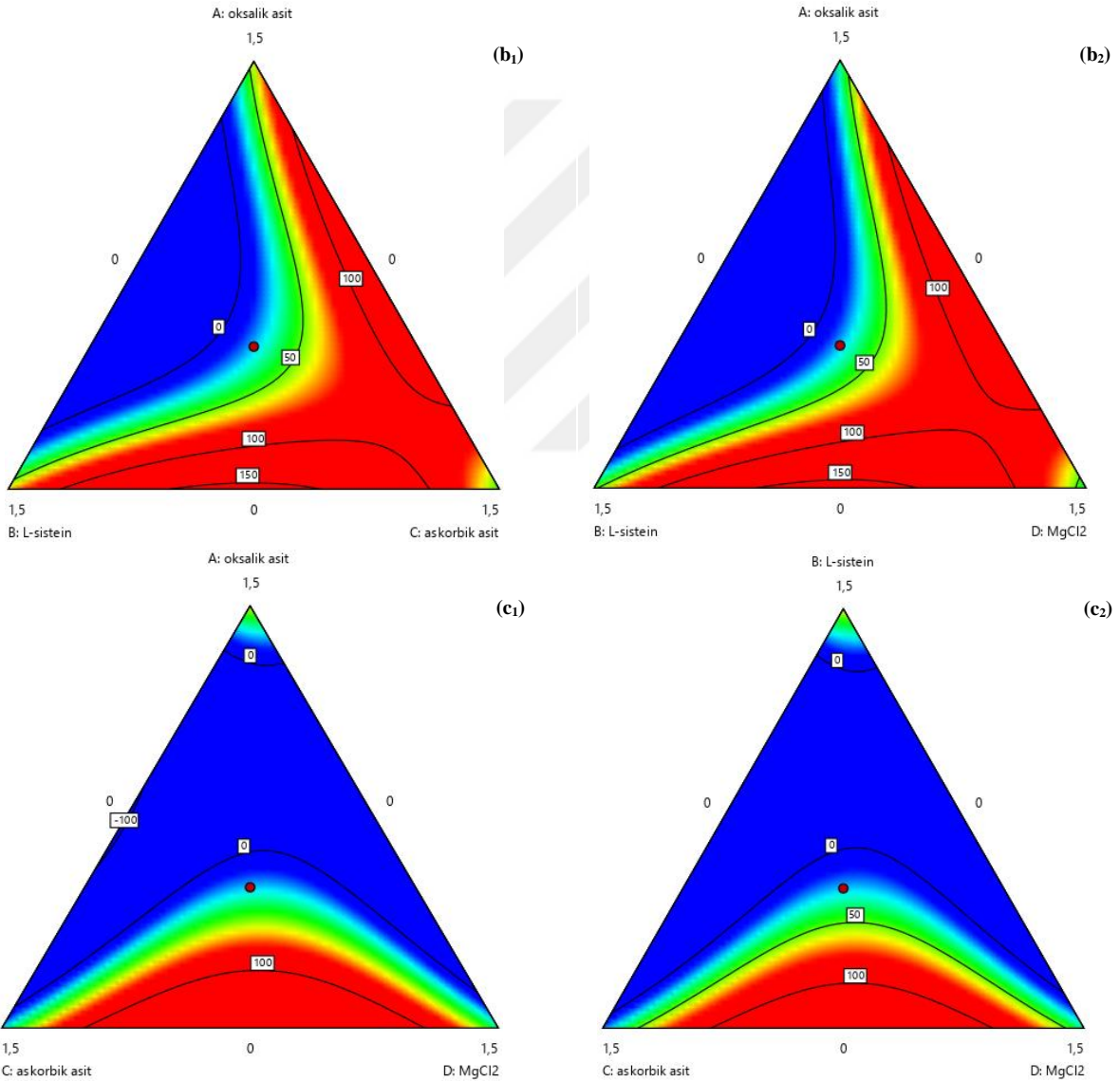
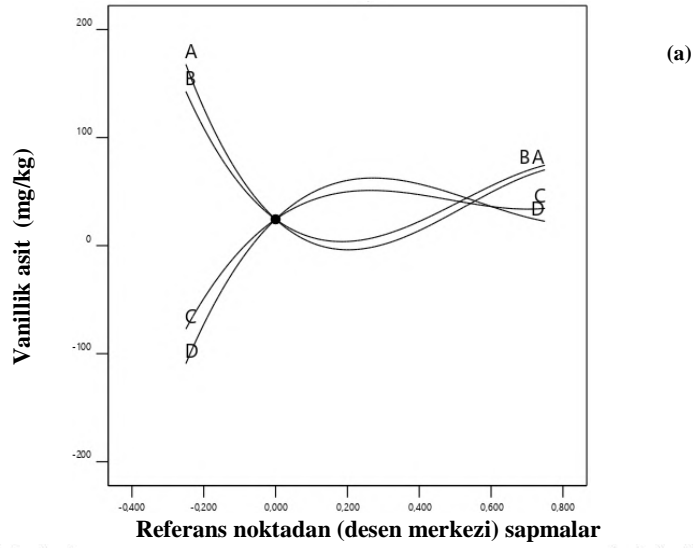
Şekil 4.38'de zeytin hamurunda bulunan vanillin değerleri üzerine kullanılan katkı maddelerin etkisi görülmektedir. Orta noktaya kadar OA ve AA kullanım miktarının artması vanillin değerlerini azaltırken, L-sis ve  $MgCl_2$  kullanım miktarının artması ise vanillin değerlerini artırmaktadır. L-sis kullanımının artması vanillin içeriği üzerine pozitif etki göstererek neredeyse doğrusal olarak arttığı görülmüştür. L-sis ve AA (Şekil 4.38b<sub>1</sub>), L-sis ve  $MgCl_2$  (Şekil 4.38b<sub>2</sub>) ve AA ve  $MgCl_2$  (Şekil 4.38c<sub>1</sub>) kullanımı vanillin üzerine pozitif etkide bulunmaktadır.



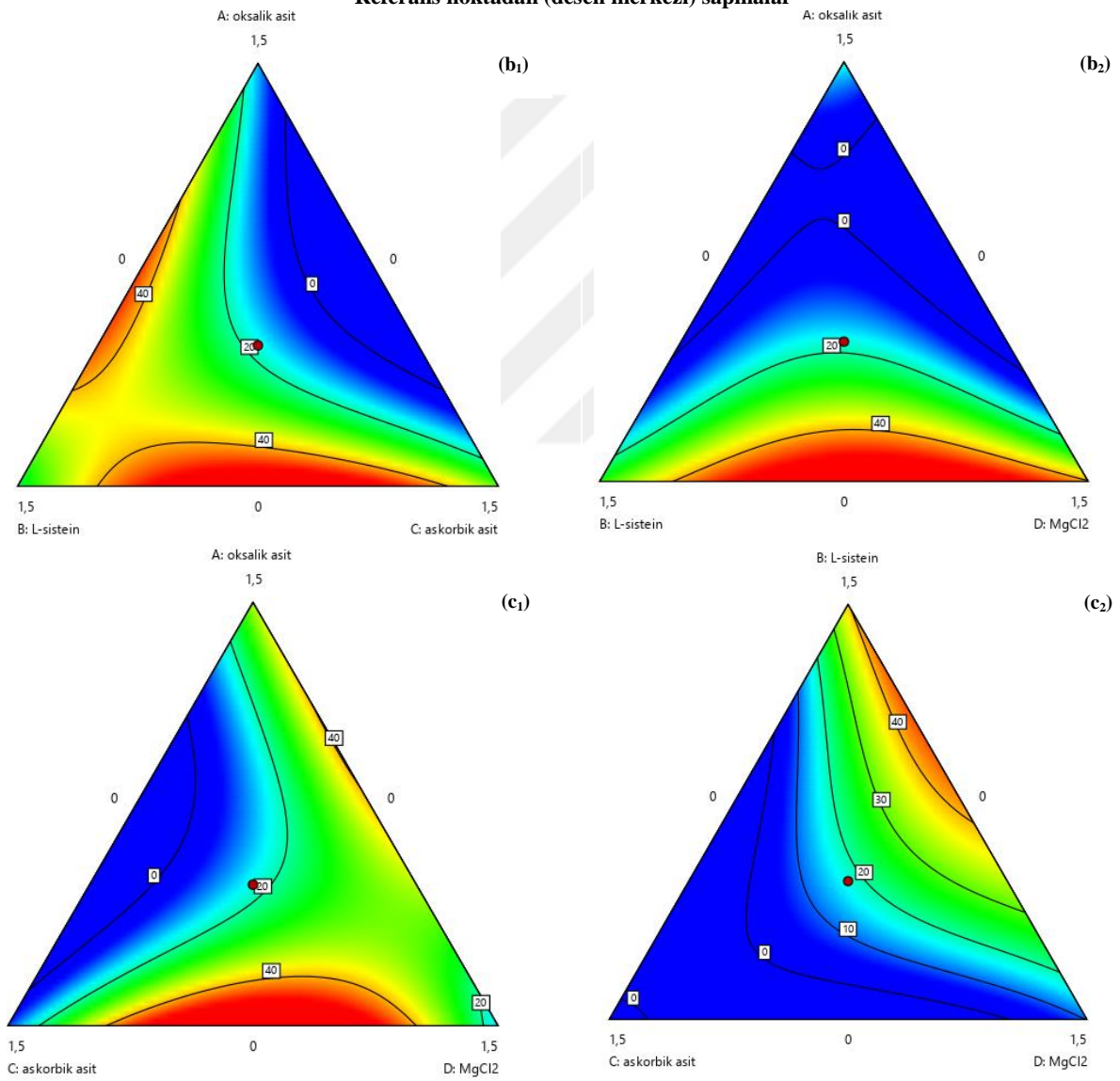
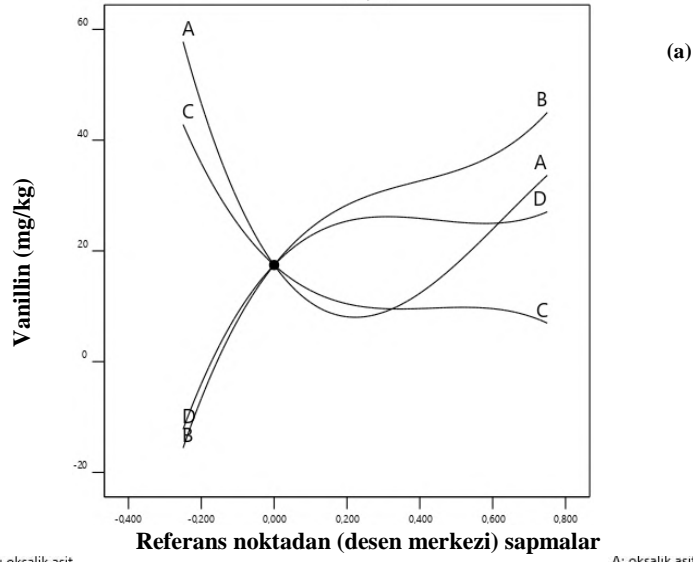
**Şekil 4.35.** Katkı maddelerinin hidroksitirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri  
a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.36.** Katkı maddelerinin tirozol içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.37.** Katkı maddelerinin vanillik asit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.38.** Katkı maddelerinin vanillin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

CCD'de katkı maddenin verbaskozit, rutin, oleuropein, luteolin ve apigenin içerikleri üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğim ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41, Şekil 4.42 ve Şekil 4.43).

OA katkı maddesinin kullanım miktarlarının artmasıyla verbaskozit miktarı ilk duruma göre neredeyse bir değişiklik göstermemiştir (Şekil 4.39a). Şekil 4.39a'da görüldüğü gibi  $MgCl_2$  katkı maddesinin kullanımının artmasıyla verbaskozit miktarı hemen hemen doğrusal bir etki göstermiştir. L-sis ve  $MgCl_2$  kullanım miktarının artmasıyla orta seviyeye kadar verbaskozit içeriği artmış orta seviyeden sonra L-sis miktarı bir miktar daha artarak hafif bir düşüşe sebep olurken  $MgCl_2$  miktarında artış devam etmiştir (Şekil 4.39a). Kontur grafiği ise formülasyondaki OA oranının artması ile verbaskozit içeriğini azalttığını göstermiştir (Şekil 4.39b<sub>2</sub>).  $MgCl_2$  konsantrasyonunun verbaskozit içeriği üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.39b<sub>1</sub>).

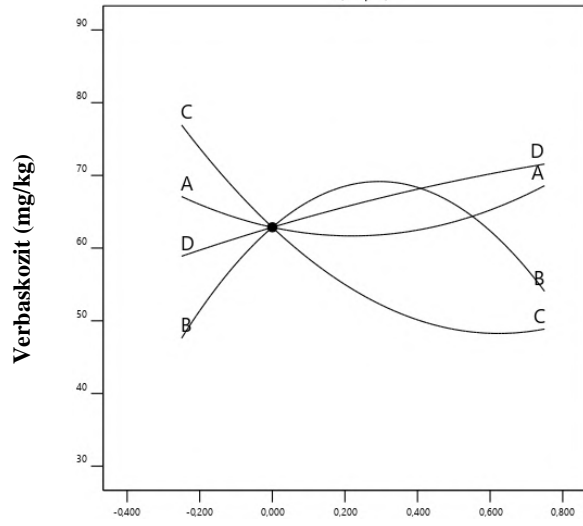
Rutin miktarı için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde OA, L-sis ve AA kullanımının artması rutin miktarı üzerine olumlu etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.40a). Orta seviyeye kadar  $MgCl_2$  kullanımı rutin miktarını azaltmış, orta noktadan sonra bir miktar daha azaltarak rutin miktarı üzerine en fazla etki eden katkı olmuştur. Şekil 4.40b<sub>1</sub>'de görüldüğü gibi, AA kullanımı rutin miktarını azaltmıştır. OA ve L-sis'in düşük kullanım miktarlarında en yüksek rutin değeri belirlenmiştir (Şekil 4.40b<sub>2</sub>). Ayrıca, L-sis miktarının rutin içeriği üzerine etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.40c<sub>2</sub>).

Şekil 4.41a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre OA ve L-sis kullanımı ile oleuropein miktarında artış olurken AA ve  $MgCl_2$  kullanımı ile oleuropein miktarında azalma görülmektedir. Orta seviyeye kadar OA ve L-sis kullanımı oleuropein miktarın artmış daha sonra bir miktar artırarak sabitlemiştir. AA ve  $MgCl_2$  katkıları ise ters etki gösterdiğinden, zeytin hamurunda oleuropein miktarı üzerine olumsuz etki yaptığı, diğer katkı maddelerinin ise olumlu etki yaptığı söylenebilir. Şekil 4.41.b<sub>1</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki L-sis konsantrasyonunun artırılması zeytin hamurlarında daha düşük oleuropein miktarı ile sonuçlanmıştır. En yüksek oleuropein içeriği yüksek oranda kullanılan OA (Şekil 4.41c<sub>1</sub>) ve L-sis (Şekil 4.41c<sub>2</sub>) ile elde edilen zeytin hamuru örneklerinde belirlenmiştir.

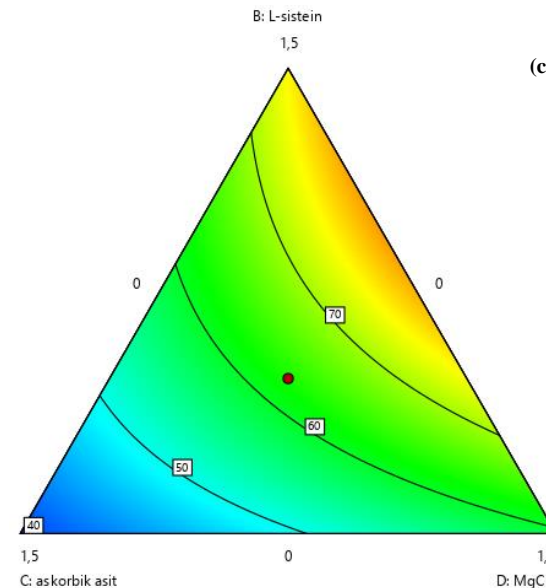
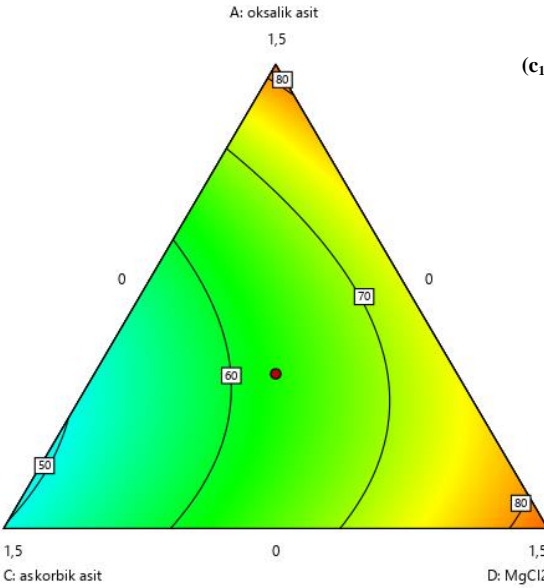
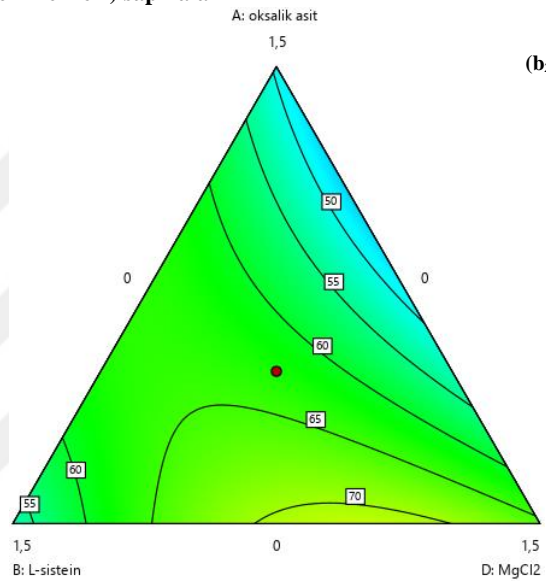
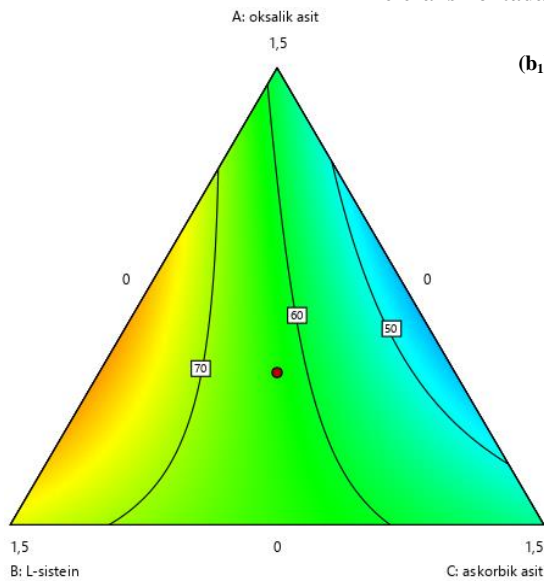
Şekil 4.42a'da görüldüğü gibi, OA ve L-sis kullanımının artması ile luteolin içeriği üzerine önemli bir etki yapmadığı tespit edilmiştir. AA ve  $MgCl_2$  kullanımının artması ise luteolin içeriği üzerine pozitif etki göstererek arttığı görülmüştür. Luteolin içeriği ile ilgili oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde orta seviyeye kadar  $MgCl_2$  kullanımı luteolin içeriğini artırırken, OA, L-sis ve AA kullanımı azaltmıştır.  $MgCl_2$  konsantrasyonunun artması, zeytin hamurunun luteolin içeriğini artırmıştır (Şekil 4.42c<sub>1</sub>). L-sis kullanımının artması luteolin içeriği üzerine negatif etkide bulunmuştur (Şekil 4.42b<sub>2</sub> ve Şekil 4.42c<sub>2</sub>).

Şekil 4.43a'ya göre OA ve L-sis katkıları ile AA ve MgCl<sub>2</sub> katkıları benzer etki göstermişlerdir. OA ve L-sis'in benzer özellik gösterdiği Şekil 4.43c<sub>1</sub> ve Şekil 4.43c<sub>2</sub>'de gösterilirken, AA asit ve MgCl<sub>2</sub>'nin benzer özellik gösterdiği Şekil 4.43b<sub>1</sub> ve Şekil 4.43b<sub>2</sub>'de gösterilmiştir. OA ve L-sis'in kullanım miktarlarındaki artış apigenin miktarını orta seviyeye kadar azaltmıştır. Ayrıca, orta seviyeden sonra OA ve L-sis kullanımını çok az azalırken daha sonra bir miktar artmıştır. OA ve L-sis kullanımındaki artış apigenin içeriği üzerine önemli bir etkide bulunmamıştır. Kontur grafiği, formülasyonda AA ve MgCl<sub>2</sub> katkıları apigenin miktarını daha fazla etkilerken (Şekil 4.43b<sub>1</sub>, Şekil 4.43b<sub>2</sub>) OA ve L-sis katkıları daha az etkilemiştir (Şekil 4.43c<sub>1</sub>, Şekil 4.43c<sub>2</sub>).

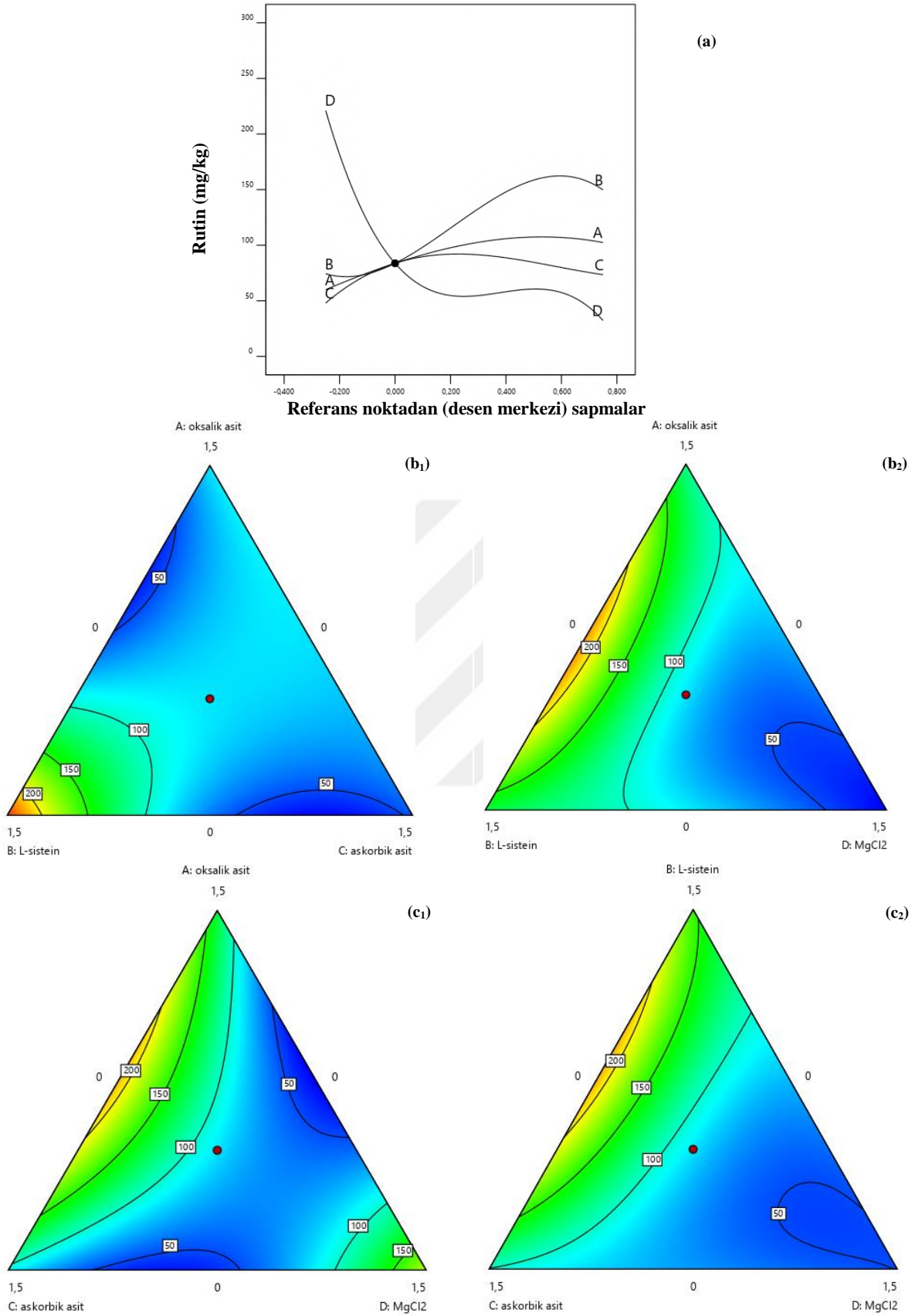




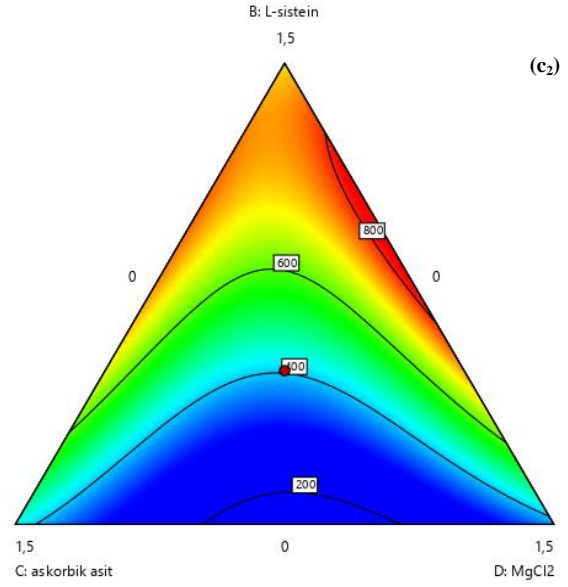
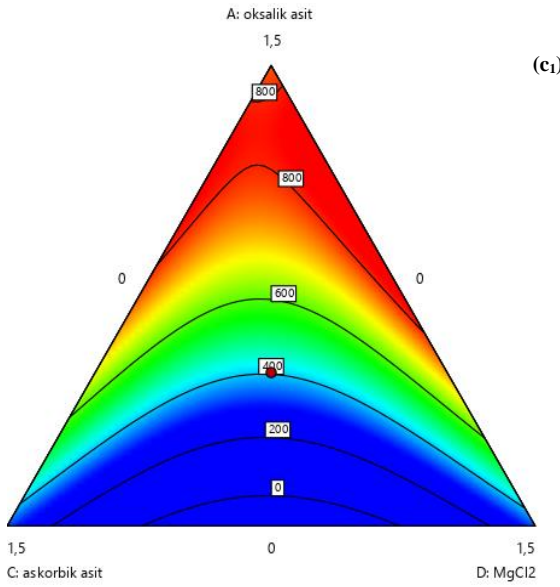
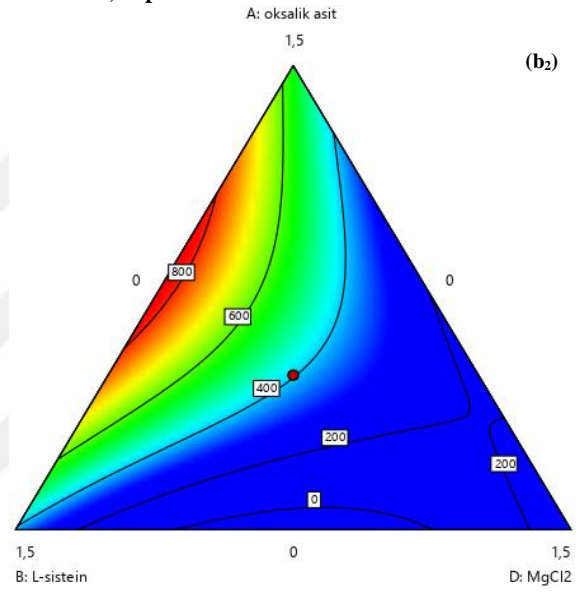
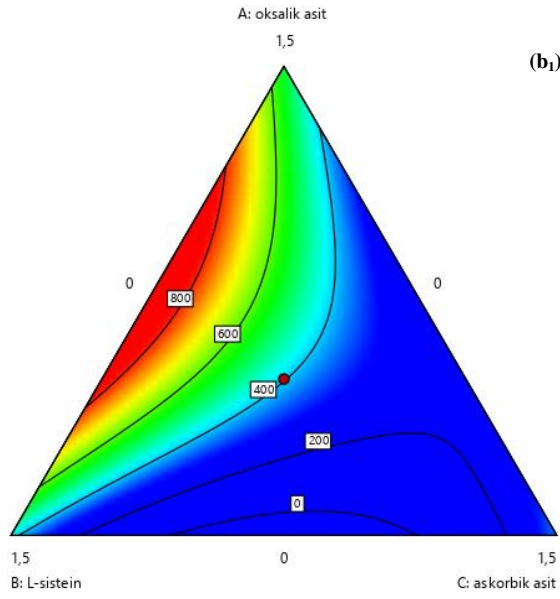
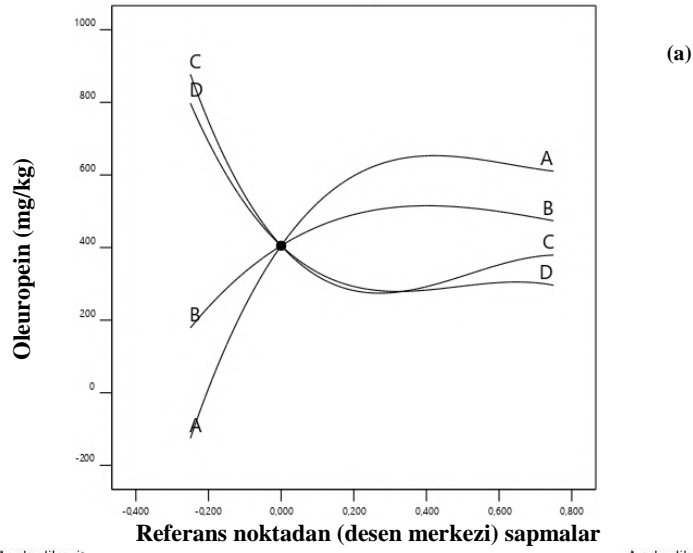
(a)



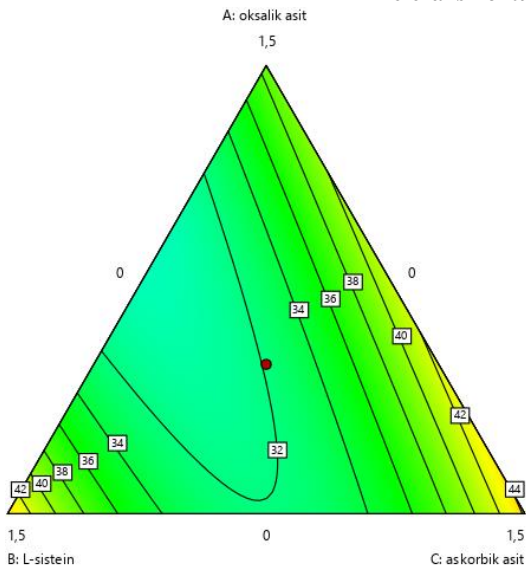
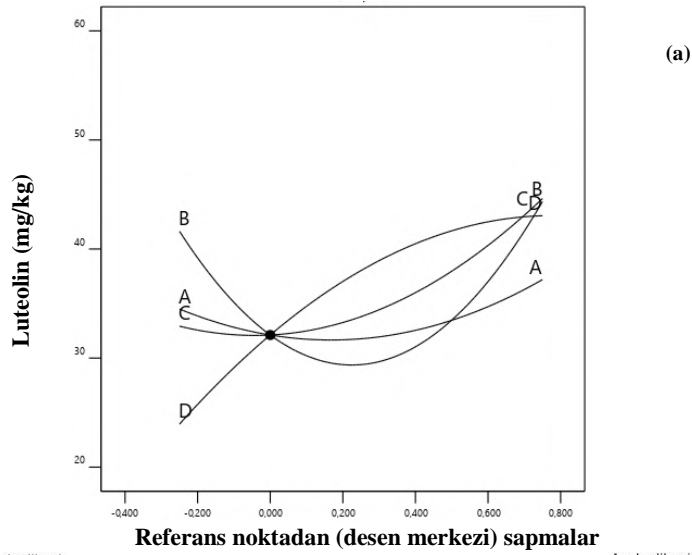
**Şekil 4.39.** Katkı maddelerinin verbaskozit içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



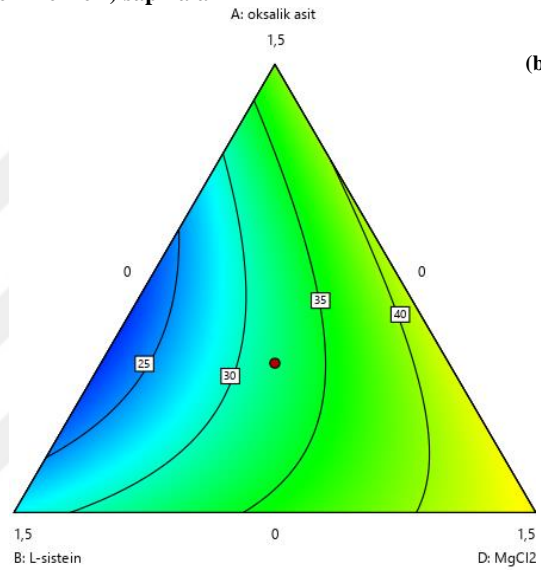
**Şekil 4.40.** Katkı maddelerinin rutin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



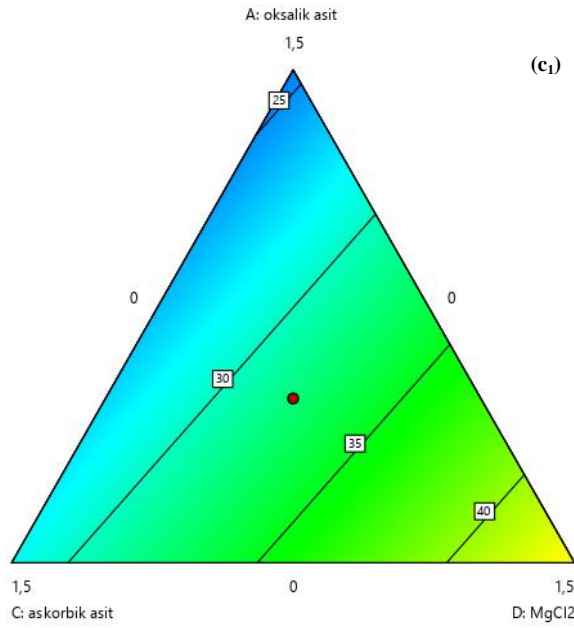
**Şekil 4.41.** Katkı maddelerinin oleuropein içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



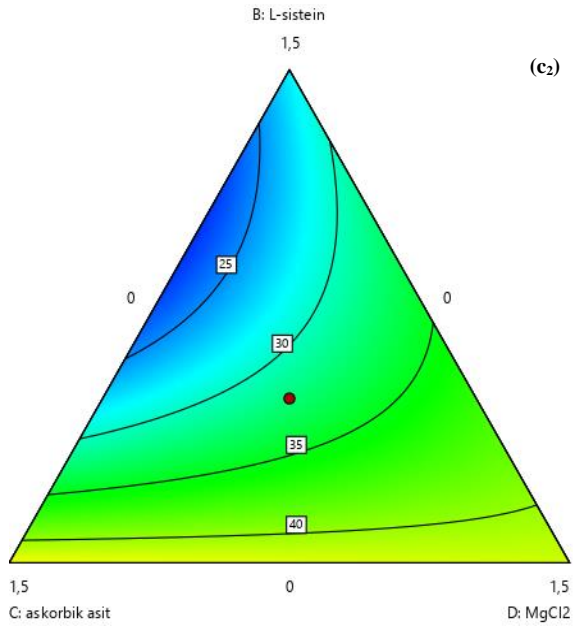
(b<sub>1</sub>)



(b<sub>2</sub>)

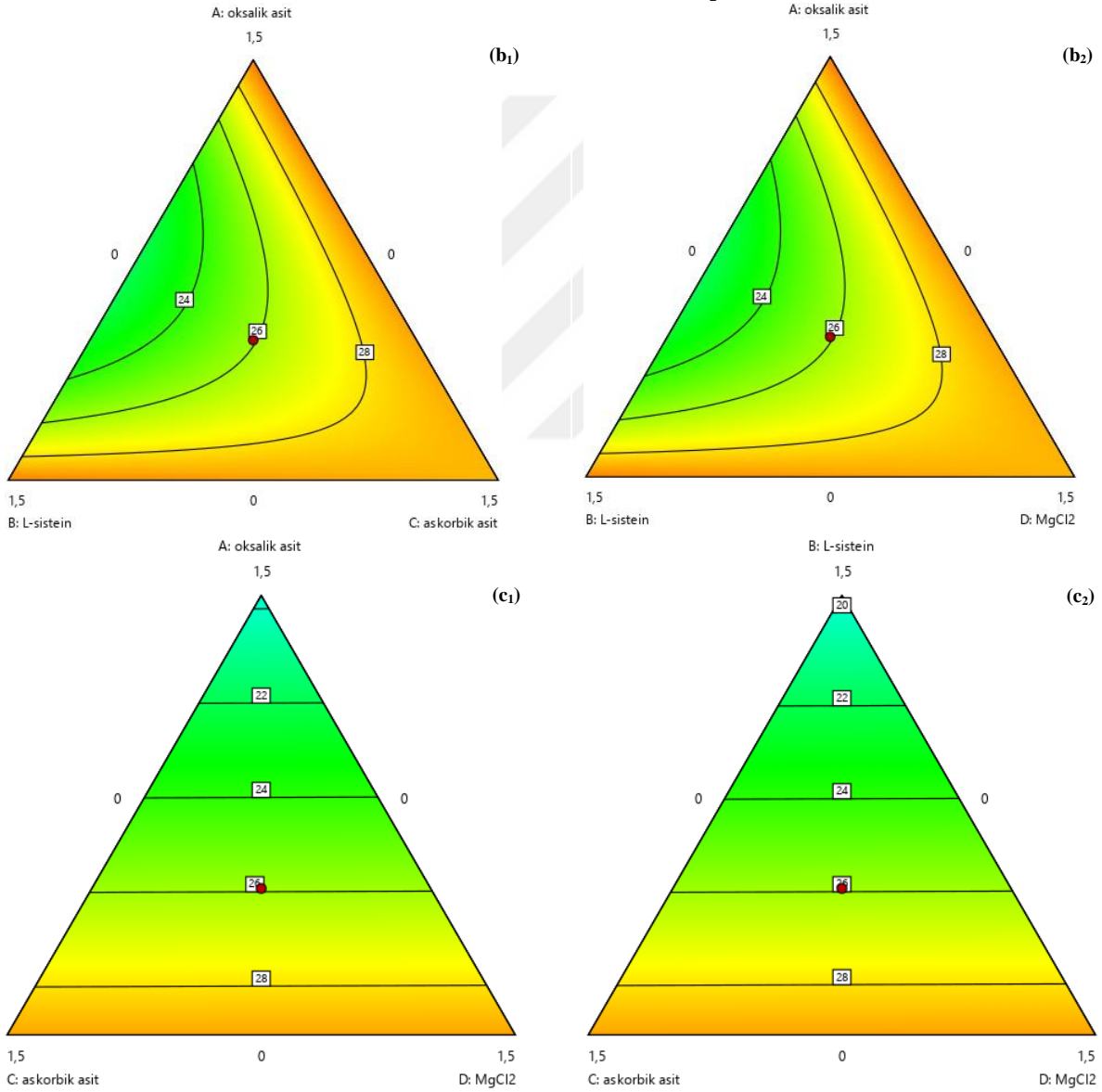
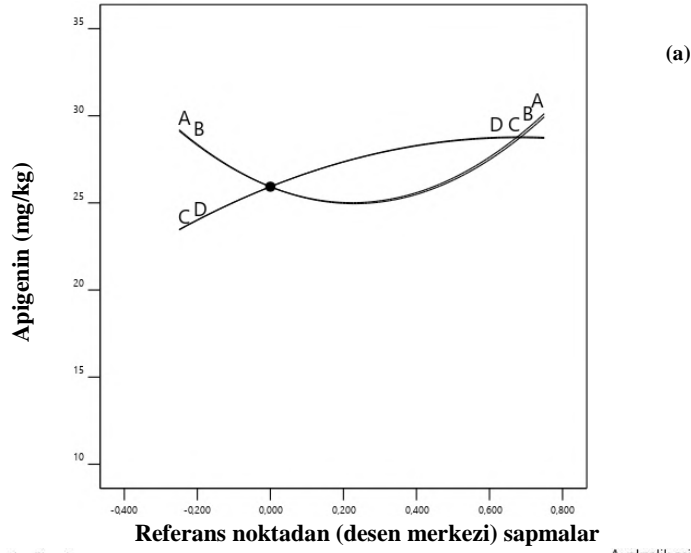


(c<sub>1</sub>)



(c<sub>2</sub>)

**Şekil 4.42.** Katkı maddelerinin luteolin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.43.** Katkı maddelerinin apigenin içeriği (mg/kg) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

#### 4.4.7. Enzim analiz sonuçlarının değerlendirilmesi

İnhibitörlerin fenolik biyosentez üzerindeki etkisini araştırmak için zeytin hamurlarında fenolik bileşiklerin oluşumunda/dönüşümünde yer alan POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz gibi üç ana enzim aktivitelerindeki değişimler değerlendirilmiştir (Çizelge 4.32). Gösterildiği gibi POD enzim aktivitesi en düşük %1 OA + %1 L-sis örneklerinde sırasıyla 5.26 ve 5.90 IU olduğu, en yüksek ise %2 MgCl<sub>2</sub> örneklerinde sırasıyla 70.51-69.23 IU olduğu belirlenmiştir. Zeytinyağı ekstraksiyon işlemi sırasında POD enzim aktivitesinin fenolik bileşik oksidasyonuna katkıda bulunduğu dikkate alındığında, %1 OA + %1 L-sis katkılarının zeytin hamurlarındaki POD enzim aktivitesini azalttığı görülmüştür. Düşük POD enzim aktivitesi gösteren diğer örnekler sırasıyla %2 L-sis, %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 L-sis + %1 AA içeren örneklerde belirlenmiştir. Bu verilerden yararlanılarak POD enzim aktivitesinin inhibisyonunda L-sis etkili bir katkı maddesi olarak görülmüştür denilebilir. Çizelge 4.32’de verilen sonuçlar MgCl<sub>2</sub>’nin AA, OA ve L-sis’e kıyasla daha yüksek bir POD enzim aktivitesi değerine sahip olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.18’de de görüldüğü gibi, yüksek POD enzim aktivitesi nedeniyle, MgCl<sub>2</sub> katkısı ile daha düşük toplam fenol içeriği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, POD enzim aktivitesinin kullanılan katkı çeşitine ve miktarına belirgin şekilde bağlı olduğu tespit edilmiştir.

Zeytin hamurundaki PPO enzim aktivitesi, katkı madde ilave edilen örneklerde kontrol örneğine göre daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.32). Zeytin hamuru PPO enzim aktivitesi 33.08-77.69 IU arasında değişmektedir. Örnekler içerisinde en düşük PPO aktivitesi gösteren örnekler sırasıyla %2 OA ve %2 AA içeren örneklerdir. Bu verilerden yararlanılarak, L-sis düşük POD aktivitesine neden olurken OA ve AA ise düşük PPO aktivitesine neden olmuştur. AA, sistein (Kuijpers ve ark., 2012; Kuijpers ve ark., 2013) ve OA (Son ve ark., 2000a, 2000b) literatür verileriyle uyumlu olarak, PPO enzimleri üzerinde inhibe edici bir etki göstermiştir. OA ve AA gibi organik asitlerle pH’nın düşürülmesi, enzimin denatürasyonuna sebep olabilir ve ortamın pH’sını enzimlerin çalışması için gerekli optimum pH’dan daha düşük tutabilir (Zhou ve ark., 2019). OA, kuşkonmaz, brokoli, Brüksel lahanası, havuç, sarımsak, marul, soğan, maydanoz, bezelye, patates, turp, ıspanak, domates ve şalgam gibi çok sayıda bitkinin doğal bileşenidir (Yoruk ve ark., 2004). PPO enziminin OA tarafından inhibisyonu, aktif olmayan bir kompleks oluşturmak için bakırın aktif bölgesine bağlanması ile açıklanmıştır (Prenen ve ark., 1984). İnhibisyon derecesi sadece OA konsantrasyonundan değil aynı zamanda pH’dan da etkilendiği bilinmektedir. OA katekol-kinon oluşumunu azaltmış ve kinon ağartması gözlenmemiştir. Farklı PPO enzim kaynakları, farklı tipte inhibisyon mekanizması sergiler. Son ve ark., (2001), OA’nın mantar PPO enzimi üzerinde rekabetçi inhibisyon gösterdiğini bulmuşlardır. Aydemir (2004), OA’nın enginar PPO

enzimine rekabetçi olmayan inhibisyon ve kereviz kökü PPO enzimine rekabetçi inhibisyon gösterdiğini tespit etmiştir (Aydemir ve Akkanlı, 2006). AA, oluşan o-kinonları, o-fenolik bileşiklere indirgeyerek renk bozunmasını engellemekte ve bu sırada AA parçalanmaktadır. Ayrıca, AA ortamdaki oksijeni indirgeyerek de kararlı reaksiyonlarını ikinci bir yolla inhibe etme özelliğine sahiptir. Meyve ve sebzelerin işlenmesinde, işlenmekte olan ürünün rengini korumak amacı ile AA'ın yaygın olarak kullanılma nedeni budur (Ertürk, 2004; Dogan ve Salman, 2004). AA ayrıca PPO enzim reaksiyonlarında moleküler oksijenin uzaklaştırılması için bir oksijen tutucu görevi görür (Friedman, 1996). Bunun yanı sıra, AA ve L-sis maddelerinin PPO enzimi için etkili birer katkı olduğu ancak AA'nın L-sis'e göre daha etkili bir PPO enzim katkısı olduğu belirlenmiştir (Eidhin ve ark., 2005; Diken, 2020). %2 AA kullanımı (36.15-33.85 IU) %2 L-sis kullanımına (53.85-54.62 IU) göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. (Çizelge 4.32). %1 L-sis + %1 AA kullanıldığında (53.85 IU) ise bu etki çok az düşmüştür. Dolayısıyla, L-sis ve AA maddelerinin eşit miktarda kullanımının sinerjik etki yaratmadığı görülmüştür. Enzimatik oksidasyon sırasında, sistein, sisteinil adüktleri (eklenmiş ürünleri) oluşturarak o-kinonları yakalar. Sistein-kinon adüktleri, PPO enziminin rekabetçi bir inhibitörüdür. Yani, yeterli miktarda sistein ile fenol, renk oluşumu olmaksızın sisteinil adüktlerinde tamamen parçalanır (Richard-Forget ve ark., 1992). Ayrıca, L-sis amino asidinin bakır ile kararlı bir kompleks oluşturabileceği ve böylece enzimatik esmerleşmeyi geciktirebileceği öne sürülmüştür (Pongsakul ve ark., 2006). Moleküler oksijen varlığında, PPO enzimi, monofenollerin o-difenollere hidroksilasyonunu (monofenolaz aktivitesi) ve o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonunu (difenolaz aktivitesi) katalize etmektedir (Chazarra ve ark., 2001). Bu reaksiyonların ürünleri, yoğunlaştırma ve biriktirme yoluyla siyah veya kahverengi polimerler üretmek için çeşitli hücre moleküllerini kovalent olarak değiştirebilen ve çapraz bağlayabilen oldukça reaktif moleküllerdir (Clodoveo ve ark., 2014). PPO enzim aktivitesi en yüksek %2 MgCl<sub>2</sub> kullanılan örneklerde sırasıyla 76.92-77.69 IU olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.34). Bunu, 61.54 U/gr değeri ile %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> karışımının ilavesi ile belirlenen PPO enzim aktivitesi takip etmiştir. Ca<sup>+2</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ve Mg<sup>+2</sup> iyonlarının PPO enzimini %75 oranında inhibe ettiği belirlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlardaki metal iyonlarının canlılar için toksik olduğu bilindiğinden, metallerin yüksek konsantrasyonlarda enzimlerin çeşitli bölgeleri ile etkileşerek enzimi inhibe ettiği düşünülmektedir (Çesko ve ark., 2023). MgCl<sub>2</sub> enzimin aktif bölgesine bağlanarak substratla rekabet etmektedir. Aktif bileşeni Mg olan MgCl<sub>2</sub> tuzu inhibe edici özelliğe sahiptir. MgCl<sub>2</sub>, alanin transaminaz enziminin aktif bölgesine bağlanıp ve alanin transaminaz enziminin substratı ile rekabetçi bir ilişki göstermektedir (Park ve ark., 2020). Fenolik bozunma, oksijene ihtiyaç duyan PPO enzimi müdahalesi ile olmaktadır. Dolayısıyla PPO

enzim aktivitesi fenolik maddelerin oksidasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Fenolik bileşikler, PPO enzimi tarafından enzimatik olarak oksitlenmektedir. Oksitlenme, zeytin meyve dokularının kırılmasıyla başlar ve oksitlenme başlar başlamaz zeytin hamurunun renk değişikliğine neden olmaktadır. Esmerleşme önleyici bir madde olan L-sistein, PPO ve POD enzimlerinin çok etkili inhibitörü olarak bilinir (Eidhin ve ark., 2005; Sharma ve Rao, 2013). Çok sayıda araştırma L-sisteinin avokado, armut, yenedünya, mango, elma, muz, enginar, patlıcan, şeftali gibi farklı taze kesilmiş meyve ve sebzelerde tek başına veya farklı organik asitler ya da yenilebilir kaplamalarla kombinasyon halinde en etkili esmerleşmeyi önleyici maddelerden biri olduğunu bildirmiştir (Dorantes-Alvarez ve ark., 1998; Ding ve ark., 2002; Gorny ve ark., 2002; Guerrero-Beltrán ve ark., 2005; Rojas-Grau ve ark., 2006; Bico ve ark., 2009; Amodio ve ark., 2011, Cabezas-Serrano ve ark., 2013; Ghidelli ve ark., 2014; Colantuono ve ark., 2015). Sonuçlar yine çalışılan tüm numunelerde kullanılan katkı çeşitinin ve miktarının zeytin PPO enzim aktivitesini etkilediğini göstermektedir.

Zeytin hamuru  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinin gelişimi ile ilgili olarak sonuçlar Çizelge 4.32’de verilmiştir.  $\beta$ -glukozidaz enzimi zeytin hamurunda doğal olarak bulunmaktadır (Fernández-Bolaños ve ark., 1995). İnhibitör ilaveli zeytinlerin hamurları kontrol örneği ile kıyaslandığında önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Zeytin hamuruna katkı maddelerinin eklenmesiyle en yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25  $MgCl_2$  örneği en düşük  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini ise %2  $MgCl_2$  içeren örnekler göstermiştir. Fenolik glikozitleri hidrolize eden  $\beta$ -glukozidaz enzimi sızma zeytinyağının fenolik içeriğini etkileyen ana biyokimyasal bir faktör olabilmektedir (Peres ve ark., 2017). Çizelge 4.18’de verilen toplam fenolik madde değerlerine bakıldığında ise %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25  $MgCl_2$  örneğinin diğer örneklere göre yüksek değere sahip olmadığı, ancak %2  $MgCl_2$  örneklerinin ise en düşük fenolik içeriğe sahip olduğu görülmektedir. Öte yandan, katkı ilave edilmiş zeytin hamurlarında %2  $MgCl_2$ , %2 AA ve %1 OA + %1 AA kullanıldığında,  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinde çarpıcı bir azalmaya neden olmaktadır. Çizelge 4.32’de gösterildiği gibi,  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$  katkıları sırasıyla %51.54-51.62, %27.67-30.48, %18.95-20.15 ve %11.01-11.25 oranlarında artırmıştır. Dolayısıyla, OA’nın  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini olumlu yönde etkilediğini söyleyebiliriz.

**Çizelge 4.32.** Zeytin hamuruna katkı maddelerin ilavesiyle elde edilen zeytin hamurunun enzim aktiviteleri

Numune no	POD enzim aktivitesi (IU)	PPO enzim aktivitesi (IU)	$\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi (IU)
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	24.36 $\pm$ 1.15*	46.92 $\pm$ 0.06	205.22 $\pm$ 0.51
%1 OA + %1 L-sis	5.26 $\pm$ 0.55	47.69 $\pm$ 0.12	189.11 $\pm$ 7.53
%2 MgCl <sub>2</sub>	70.51 $\pm$ 0.58	76.92 $\pm$ 1.53	154.00 $\pm$ 7.13
%2 L-sis	7.69 $\pm$ 1.41	53.85 $\pm$ 1.53	181.00 $\pm$ 3.28
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	19.23 $\pm$ 1.00	38.46 $\pm$ 1.15	203.56 $\pm$ 3.02
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	12.82 $\pm$ 2.08	39.23 $\pm$ 1.13	200.11 $\pm$ 1.07
%2 AA	33.33 $\pm$ 0.58	36.15 $\pm$ 0.51	165.00 $\pm$ 2.08
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	7.69 $\pm$ 1.00	61.54 $\pm$ 0.58	218.11 $\pm$ 4.44
%2 OA	19.23 $\pm$ 1.00	33.08 $\pm$ 0.51	210.22 $\pm$ 1.17
%2 AA	32.05 $\pm$ 0.58	33.85 $\pm$ 0.50	166.67 $\pm$ 0.67
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	15.38 $\pm$ 1.00	46.15 $\pm$ 0.10	214.00 $\pm$ 1.76
%2 OA	17.95 $\pm$ 0.58	37.69 $\pm$ 0.55	210.33 $\pm$ 6.49
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	20.51 $\pm$ 1.53	38.46 $\pm$ 0.58	201.78 $\pm$ 0.51
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	14.10 $\pm$ 0.58	46.15 $\pm$ 0.20	190.56 $\pm$ 2.04
%2 MgCl <sub>2</sub>	69.23 $\pm$ 1.00	77.69 $\pm$ 1.48	154.33 $\pm$ 6.96
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	11.54 $\pm$ 1.73	38.46 $\pm$ 0.49	184.00 $\pm$ 3.38
%1 L-sis + %1 AA	8.97 $\pm$ 1.15	53.85 $\pm$ 0.58	173.44 $\pm$ 4.73
%1 OA + %1 AA	19.23 $\pm$ 1.00	46.15 $\pm$ 0.30	171.22 $\pm$ 1.02
%2 L-sis	7.82 $\pm$ 0.95	54.62 $\pm$ 0.55	177.00 $\pm$ 7.23
%1 OA + %1 L-sis	5.90 $\pm$ 0.40	46.15 $\pm$ 1.00	192.33 $\pm$ 5.86
<b>K</b>	100	100	138.78 $\pm$ 5.36

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama  $\pm$  standart sapma

Farklı katkı maddelerle elde edilen zeytin hamurlarının POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimleri için belirlenen varyans analiz sonuçları Çizelge 4.33’de verilmiştir. İnhibitör maddelerin POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi değerleri üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek için sırasıyla özel kübik, kuadratik ve kuadratik modelleri önerilmiştir. Zeytin hamurlarının POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değerlerine ait varyans analiz çizelgesi incelendiğinde P değerleri sırasıyla  $<0.0001$ ,  $0.0002$  ve  $0.0029$  olarak hesaplanmış olup katkı maddelerden en az birisinin zeytin hamurlarının POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ( $P<0.05$ ). ANOVA tablosuna göre, OA  $\times$  L-sis, OA  $\times$  AA, OA  $\times$  MgCl<sub>2</sub>, L-sis  $\times$  AA, L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub>, AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub>, OA  $\times$  L-sis  $\times$  AA, OA  $\times$  L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub>, L-sis  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonları POD enzim aktivitesi üzerine önemli düzeyde etkili bulunmuştur ( $P<0.01$ ). Ayrıca, POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzimi aktivite değerleri için Çizelge 4.33’e göre, L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerini ( $P<0.01$ ), OA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu sadece PPO enzim aktivitesini ( $P<0.05$ ), AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu ise sadece  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini ( $P<0.05$ ) istatistiksel olarak önemli düzeyde etkilediği tespit edilmiştir. POD enzim aktivitesi için geliştirilen tüm modeller uyumsuzluk testini geçerken ( $P>0.05$ ), PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi için geliştirilen tüm modeller ise uyumsuzluk testini geçememiştir ( $P<0.05$ ). Model uyumsuzluğu testinde ise P değerleri sırasıyla  $0.8738$ ,  $0.0015$  ve  $<0.0001$  olarak belirlenmiş olup model uyumsuzluğunun sadece POD enzim aktivite değişim değeri için önemsiz olduğu tespit edilmiştir ( $P>0.05$ ). POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerinin belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>:  $0.9996$ ,  $0.7898$  ve  $0.6922$  ve uyarlanan belirleme katsayıları R<sup>2</sup>:  $0.9988$ ,  $0.7147$  ve  $0.5823$  olarak bulunmuştur. Dolayısıyla, POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerindeki değişkenliğin sırasıyla %99.96, %78.98 ve %69.22’si belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. R<sup>2</sup> ve uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri arasındaki farkın az olması istatistiksel olarak önemsiz olan terimlerin tespit edilen modelden olabildiğince uzaklaştırıldığını göstermektedir. POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.33’te verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının yanı sıra L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitelerini etkilemektedir. L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu POD ve PPO enzim aktivitesi için negatif interaksiyona sahipken,  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi için pozitif korelasyona sahiptir.

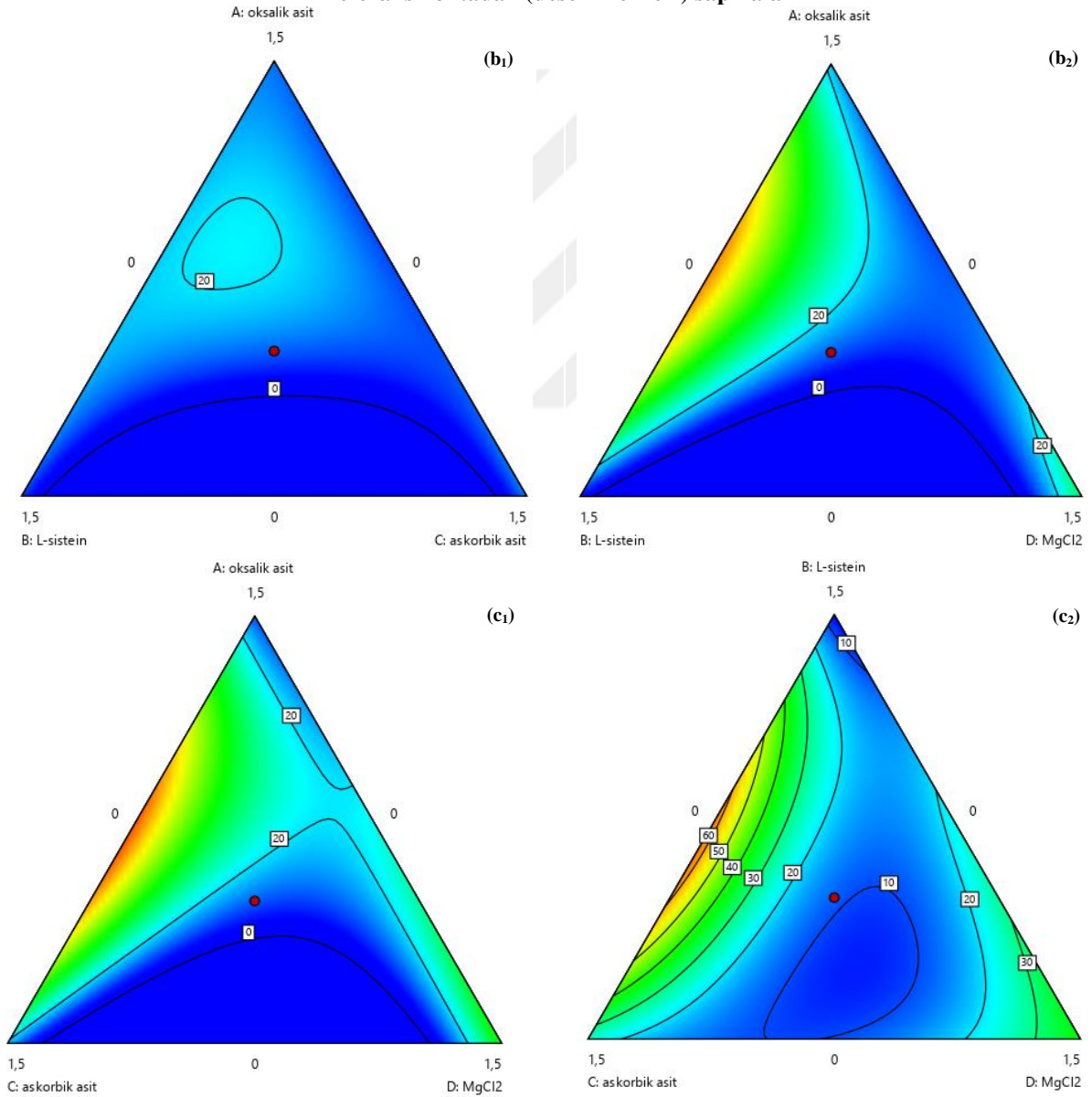
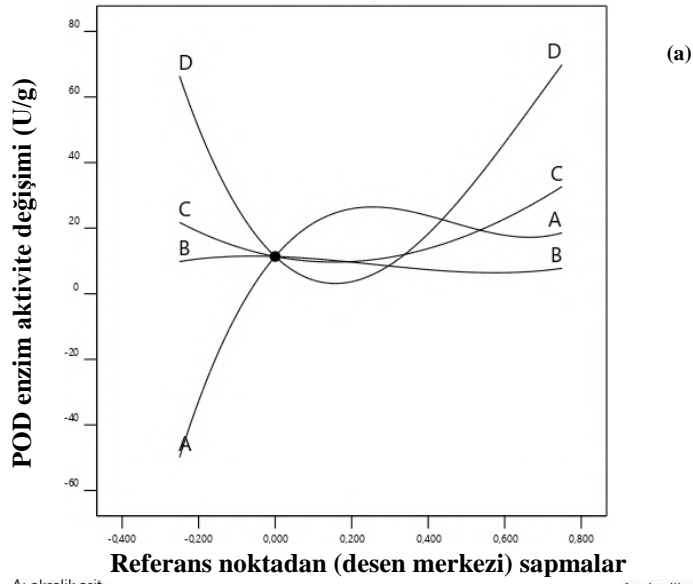
**Çizelge 4.33.** Zeytin hamurlarının POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak Model	POD enzim aktivite değişimi			PPO enzim aktivite değişimi			$\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
	12	1337.31	<0.0001	5	10.52	0.0002	5	6.30	0.0029
AB	1	191.22	<0.0001	-	-	-	-	-	-
AC	1	84.78	<0.0001	-	-	-	-	-	-
AD	1	1273.15	<0.0001	1	5.49	0.0344	-	-	-
BC	1	253.22	<0.0001	-	-	-	-	-	-
BD	1	669.65	<0.0001	1	12.20	0.0036	1	9.67	0.0077
CD	1	2811.82	<0.0001	-	-	-	1	7.39	0.0166
ABC	1	469.24	<0.0001	-	-	-	-	-	-
ABD	1	21.32	0.0024	-	-	-	-	-	-
BCD	1	452.33	<0.0001	-	-	-	-	-	-
Hata Model uyumsuzluğu	7	-	-	14	-	-	14	-	-
Saf hata	2	0.1387	0.8738	9	23.08	0.0015	9	85.81	<0.0001
Toplam	5	-	-	5	-	-	5	-	-
	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.9996	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9988		R <sup>2</sup> =0.7898	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.7147		R <sup>2</sup> =0.6922	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5823	
$\text{POD} = 18.58 \times A + 7.78 \times B + 32.68 \times C + 69.86 \times D - 30.39 \times (A \times B) - 25.86 \times (A \times C) - 100.22 \times (A \times D) - 45.03 \times (B \times C) - 73.23 \times (B \times D) - 148.94 \times (C \times D) + 1564.93 \times (A \times B \times C) + 33.57 \times (A \times B \times D) - 1539.04 \times (B \times C \times D)$									
$\text{PPO} = 38.94 \times A + 58.55 \times B + 36.51 \times C + 73.67 \times D - 65.97 \times (A \times D) - 98.35 \times (B \times D)$									
$\beta\text{-glukozidaz enzimi aktivite değişimi} = 433.99 \times A + 257.92 \times B + 159.76 \times C + 133.79 \times D + 987.12 \times (B \times D) + 867.82 \times (C \times D)$									
A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl <sub>2</sub>									

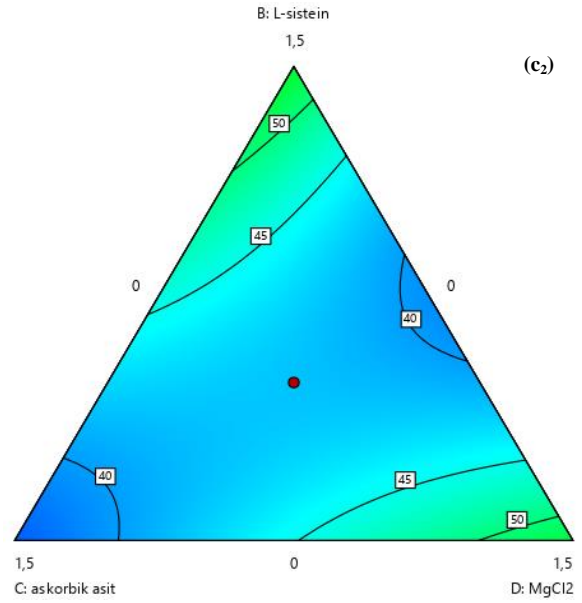
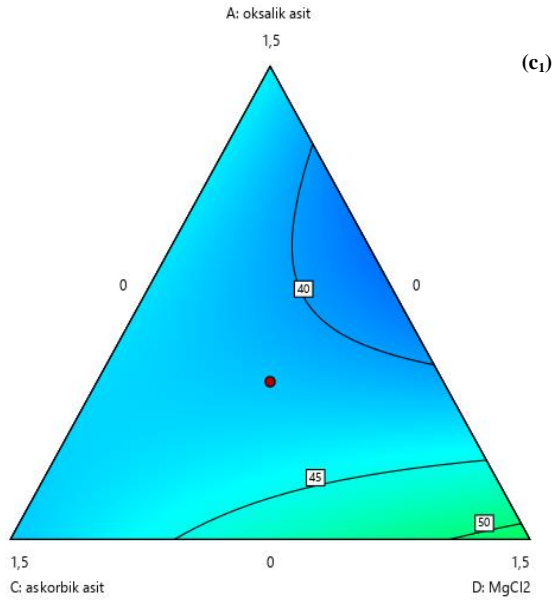
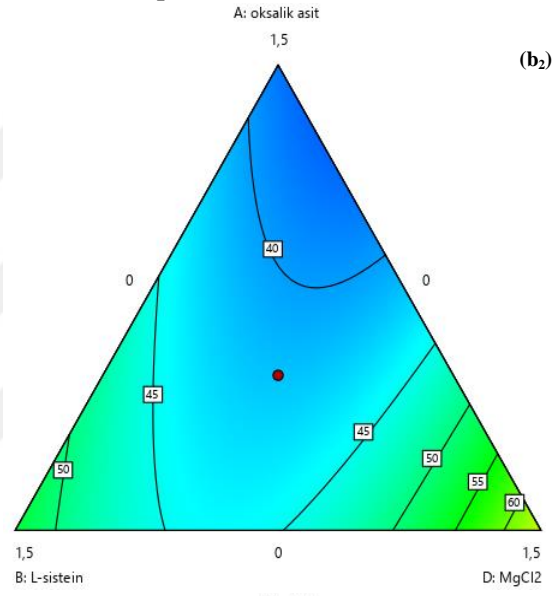
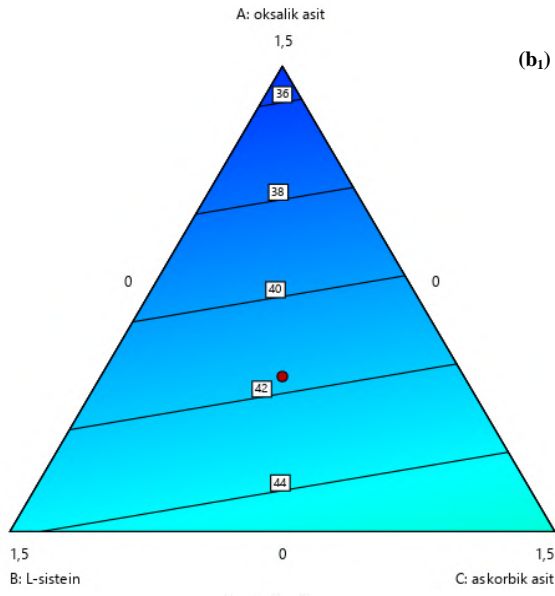
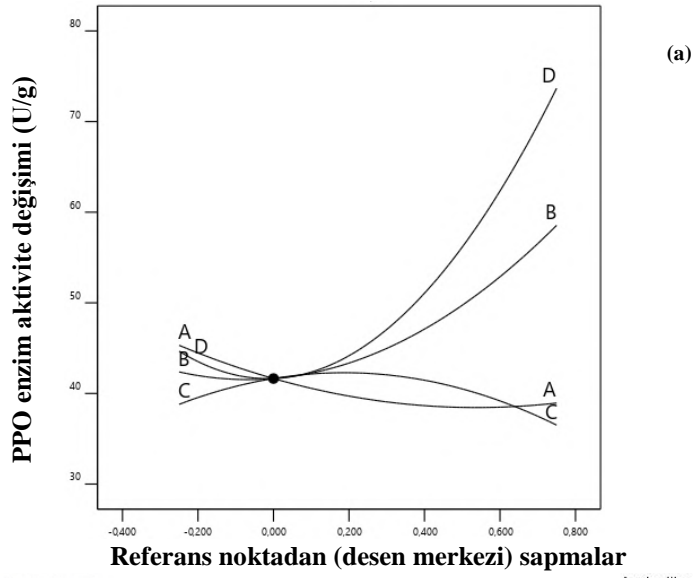
CCD’de katkı maddenin POD, PPO ve  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğim ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.44, Şekil 4.45 ve Şekil 4.46). L-sis, AA ve  $MgCl_2$  katkılarının kullanım miktarlarının artmasıyla POD enzim aktivitesi ilk duruma göre neredeyse bir değişiklik göstermemiştir. OA kullanım miktarının artmasıyla orta seviyeye kadar POD enzim aktivitesi artmış orta seviyeden sonra bir miktar daha artarak hafif bir düşüşe sebep olmuştur (Şekil 4.44a). Hem L-sis ve AA konsantrasyonunun hem de AA ve  $MgCl_2$  konsantrasyonunun POD enzim aktivitesi üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.44c<sub>1</sub>). Çizelge 4.32’de de bahsedildiği gibi POD enzim aktivitesinin azalmasında, kullanılan diğer katkı maddelere göre L-sis kullanımı daha etkin bulunmuştur.

PPO enzim aktivitesi için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde OA ve AA kullanımının artması PPO enzim inhibisyonu üzerine olumlu etki yaptığı görülmüştür (Şekil 4.45a). Orta seviyeye kadar OA ve  $MgCl_2$  kullanımı PPO enzim aktivitesini azaltmış, L-sis kullanımı çok az azaltmış, AA kullanımı ise artırmıştır. En düşük PPO enzim aktivite değişimi OA ile elde edilen zeytin hamurlarında (Şekil 4.45b<sub>1</sub>), en yüksek PPO enzim aktivite değişimi ise  $MgCl_2$  ile elde edilen zeytin hamurlarında (Şekil 4.45b<sub>2</sub>) görülmüştür. Ayrıca, L-sis ve  $MgCl_2$  miktarının PPO enzim aktivitesi üzerine etkisinin yüksek olduğu tespit edilmiştir.

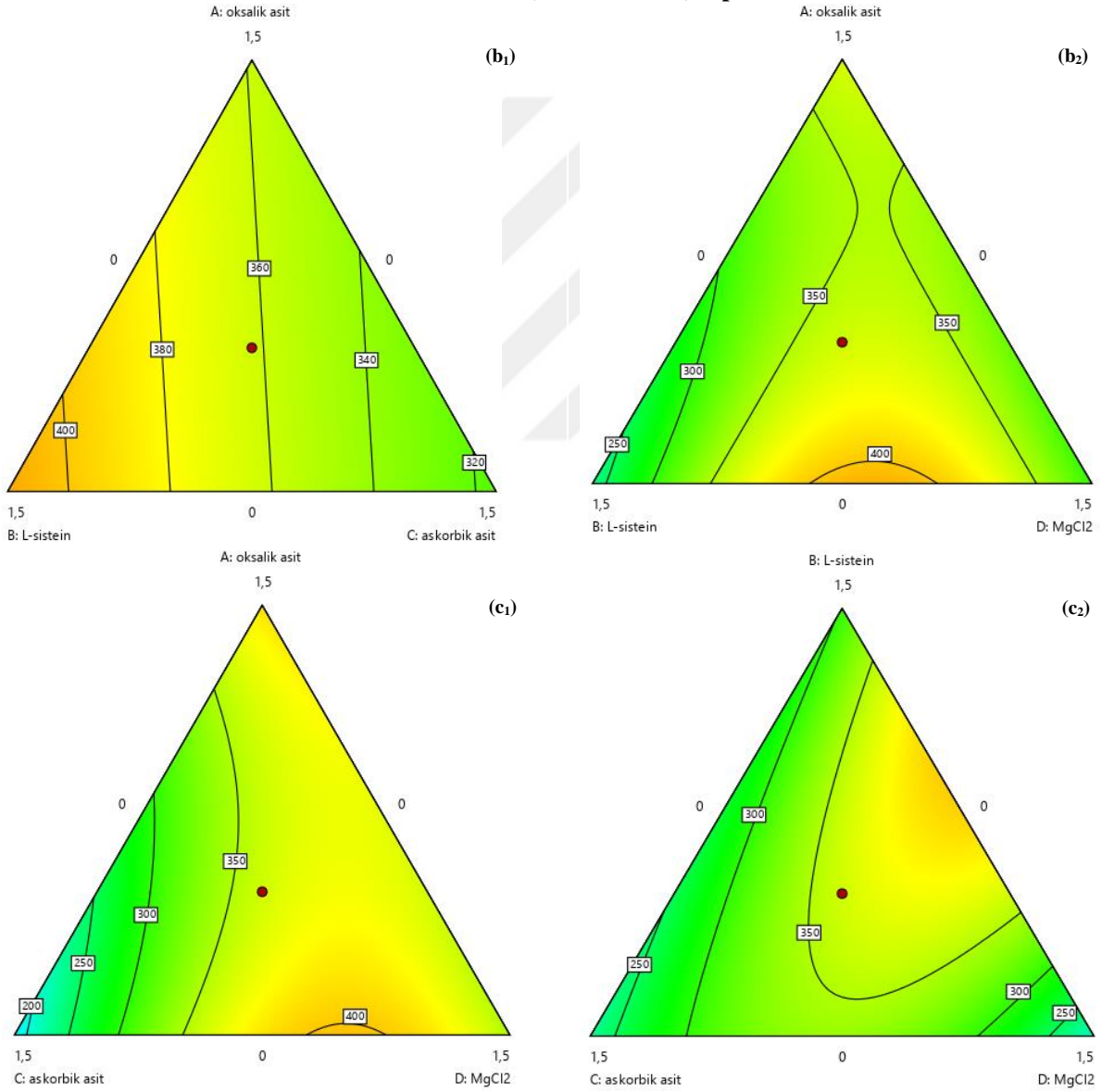
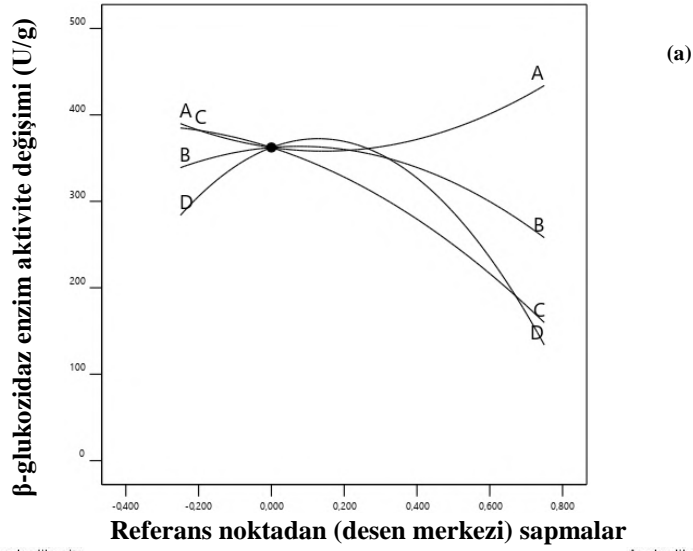
Şekil 4.46a’daki iz eğim grafiğindeki verilere göre OA kullanımı ile  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinde artış olurken L-sis, AA ve  $MgCl_2$  kullanımı ile  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesinde azalma görülmektedir. Orta seviyeye kadar L-sis ve  $MgCl_2$  kullanımı  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesini artmış daha sonra ters etki göstermiştir. Bu sebeple, OA zeytin hamurunda  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine olumsuz etki yaptığı, diğer katkı maddelerinin ise olumlu etki yaptığı söylenebilir. Şekil 4.46b<sub>1</sub>’de görüldüğü gibi, formülasyondaki L-sis konsantrasyonunun artırılması zeytin hamurlarında daha yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivitesi ile sonuçlanmıştır.



**Şekil 4.44.** Katkı maddelerinin POD enzim aktivite değişimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.45.** Katkı maddelerinin PPO enzim aktivite değışimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

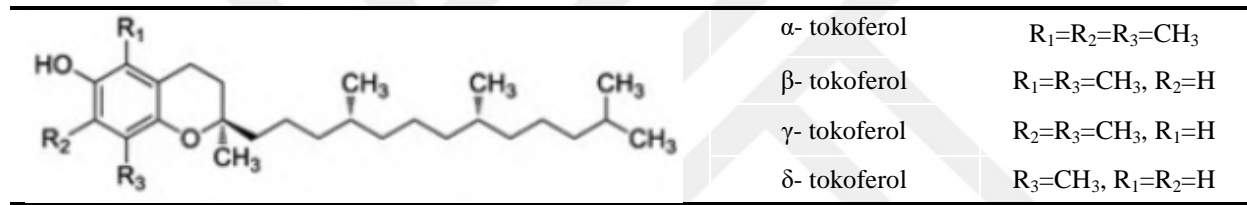


**şekil 4.46.** Katkı maddelerinin  $\beta$ -glukozidaz enzim aktivite değişimi üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

#### 4.4.8. Zeytinyağı örneklerinin tokoferol ve tokotrienol içerikleri

Tokoferoller lipofilik yapıda fenolik bileşikler olup yağın E vitamini aktivitesi ve antioksidan özelliğinden sorumludur. E Vitamini, dört tokoferol ve dört tokotrienol dahil olmak üzere güçlü antioksidan lipit bileşiklerinin bir havuzudur. Her iki bileşik grubu, kromanol çekirdeği üzerindeki metil gruplarının sayısına ve konumuna göre doğal olarak  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - ve  $\delta$ - formlarında meydana gelmektedir. Zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında katkı maddelerin kullanılmasıyla elde edilen zeytinyağlarının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - ve  $\delta$ -tokoferol, toplam tokoferol ve  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ - tokotrienol içerikleri sırasıyla Çizelge 4.34 ve Çizelge 4.35'te sunulmuştur.

Tokoferoller, fenolik maddelerle beraber, zeytinyağının antioksidan özelliklerinde önemli bir rol oynamakta ve depolama sırasında kalitenin korunmasına yardımcı olmaktadır (Lozano-Sánchez ve ark., 2010). Zeytinyağı numunelerinin tokoferol içeriğinin tespiti amacıyla yapılan analiz sonucunda  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokoferol ve toplam tokoferol içerikleri tespit edilmiştir. Şekil 4.47'de tokoferollerin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Tokoferollerin kimyasal yapıları

Tespit edilen toplam tokoferol ve tokoferol türlerinin miktarları Çizelge 4.34'te verilmiştir. Zeytinyağı numunelerindeki tokoferollerin toplam kütle fraksiyonları 151.46 ile 312.51 mg/kg arasında değişmektedir. İnhibitor ilave edilerek elde edilen tüm örneklerde toplam tokoferol kütle fraksiyonunda dalgalanmalar meydana gelmesine rağmen önemli ölçüde artışlar görülmektedir. Bunun yanı sıra, katkıların toplam tokoferol miktarları üzerine etkisi incelendiğinde katkı miktarları, çeşitleri ve oranları ile düzenli bir artış gözlenmemiştir. Toplam tokoferol içeriği en yüksek %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> içeren örnekte görülmüştür. Bu da, %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> oranlarında kullanılan katkı maddeler tokoferol moleküllerinin zeytin hücrelerinden en iyi şekilde serbest kalmasına neden olabilmesi olarak açıklanabilir. Zeytinde bulunan enzimler lezzet ve raf ömrü ile ilgili önemli gelişmelere sebep olurken, yağa minör bileşenlerin (fenoller, tokoferoller, uçucular, karotenler, ksantofiller ve klorofil) daha fazla geçişine de sebep olmuştur (Chiacchierini ve ark., 2007). Katkı maddeleri tek başlarına %2 oranında kullanıldığında POD ve PPO enzim aktiviteleri ile uyumlu olarak, enzim aktiviteleri yüksek olan %2 MgCl<sub>2</sub> örneğinde daha düşük toplam tokoferol içeriği belirlenmiştir. %2 L-sis ve %2 OA katkıları kullanıldığında ise enzim aktiviteleri daha düşük olup toplam fenolik

madde ve toplam tokoferol içerikleri hem birbirlerine yakın olup hem de kontrol örneğine göre daha yüksektir.

Sızma zeytinyağındaki tokoferol fraksiyonu esas olarak  $\alpha$ - tokoferolden oluşurken  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -tokoferol daha az temsil edilmektedir ve konsantrasyonları 100 mg/kg'ı geçmemektedir (Ricciutelli ve ark., 2017; Galanakis ve ark., 2020). Yenilebilir yağlarda oksidasyonu engelleyen ve insan sağlığı için son derece faydalı olan tokoferol türleri içerisinde en yüksek değer özellikle E vitamini etkinliği ile bilinen  $\alpha$ -tokoferolden elde edilmiştir.  $\alpha$ -tokoferol, toplam tokoferol fraksiyonunun %90'ından fazlasını oluşturan tokoferol izomeridir (Şpika ve ark., 2015). Andjelkovic ve ark., (2008) İspanyol ve Fransız zeytinyağlarında  $\alpha$ - tokoferolleri belirlemiş ve 128-239 mg/kg arasında değişen düzeylerde bulmuştur. Bu çalışmada, zeytinyağı örneklerinin  $\alpha$ - tokoferol içerikleri 140.74-276.09 mg/kg arasında değişmiştir. Elde edilen zeytinyağlarının da  $\alpha$ - tokoferol miktarları diğer çeşitlerden daha yüksek bulunmuştur, bunu  $\gamma$ - tokoferol çeşiti takip etmiştir. Zeytinyağının  $\alpha$ - tokoferol içeriği ile antiinflamatuvar ve antiendotelial aktivasyon özellikleri arasında pozitif bir ilişki olduğundan zeytinyağında bulunan  $\alpha$ - tokoferol miktarı önem arz etmektedir (Perona ve ark., 2006). En yüksek  $\alpha$ - tokoferol içeriği 276.09 mg/kg yağ değeri ile %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> içeren örnek iken en düşük  $\alpha$ - tokoferol içeriği 140.74 mg/kg yağ değeri ile kontrol örnekte tespit edilmiştir. İnhibitör uygulaması miktara ve çeşite bağlı olarak zeytinyağlarının  $\alpha$ - tokoferol içeriklerini artırmış veya azaltmıştır. %2 oranında OA ve AA uygulanan örnekler birbirlerine yakın miktarlarda  $\alpha$ - tokoferol içermektedir.

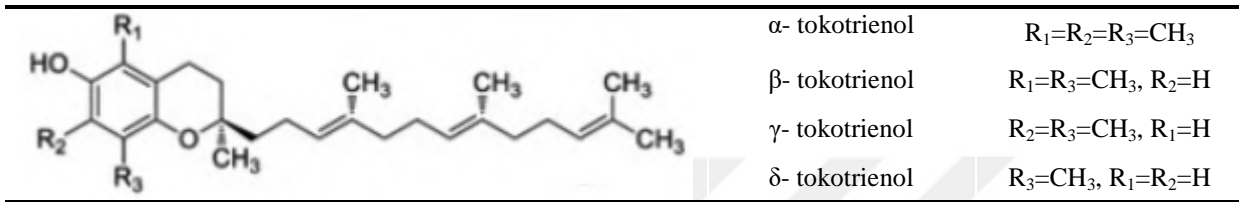
Zeytinyağı numunelerinin  $\beta$ - tokoferol miktarları 1.23-4.98 mg/kg arasında değişmiştir. En yüksek  $\alpha$ - ve  $\delta$ - tokoferol konsantrasyonu sırasıyla %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> ve %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> örneklerine ait zeytinyağlarında, en yüksek  $\beta$ - ve  $\gamma$ - tokoferol konsantrasyonları ise sırasıyla %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> ve %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> örneklerine ait zeytinyağlarında belirlenmiş ve sırasıyla 276.09, 1.92, 4.98, 25.59 mg/kg yağ değerlerine sahiptir. İnhibitör ilavesi, katkı miktarı, çeşiti ve bileşimlerine bağlı olarak zeytinyağlarının  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokoferol konsantrasyonlarını artırmış veya azaltmıştır. Bütün tokoferol çeşitlerinde en düşük miktarlar kontrol örneklerinde tespit edilmiştir. %2 L-sis içeren örneklerden görüldüğü gibi L-sis katkı ilavesi  $\beta$ -tokoferol miktarını artırmıştır.

Zeytinyağı ekstraksiyonu sırasında uygulanan farklı katkıları sonucunda elde edilen zeytinyağlarının  $\gamma$ - tokoferol içerikleri 10.62 -25.59 mg/kg arasında değişmiştir. %2 L-sis ve %2 MgCl<sub>2</sub> kullanılan örneklerden elde edilen zeytinyağlarının  $\gamma$ - tokoferol içeriği %2 OA ve %2 AA kullanılan örneklerden elde edilen zeytinyağlarının  $\gamma$ - tokoferol içeriğinden daha

yüksek bulunmuştur. L-sis ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının ortak kullanıldığı %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> örneğinde diğer ikili kombinsyonlara göre daha yüksek değer elde edilmiştir.

İnhibitör ilavesiyle elde edilen zeytinyağlarının δ- tokoferol içerikleri 0.82-1.92 mg/kg arasında bulunmuştur. %2 L-sis ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarındaki δ- tokoferol içeriği diğer %2 katkı maddesi eklenen örneklere göre nispeten daha yüksek bulunmuştur.

Yağın sabunlaşmayan fraksiyonun ana bileşiklerinden olan tokoller canlı metabolizmasında doğal antioksidanları harekete geçirerek yüksek E vitamini aktiviteleri ile bilinmektedirler (Chen ve ark., 2011). Şekil 4.48'de tokotrienollerin kimyasal yapıları gösterilmiştir.



Şekil 4.48. Tokotrienollerin kimyasal yapıları

Bitkisel yağların bileşimi, spektral bantların floresan yoğunluğunu etkilemekte ve tokollerin içeriği değiştiğinde değişmektedir. Hem tokoferoller hem de tokotrienoller, pozisyona, metilasyon derecesine göre bir kromanol başı ve bir fitil kuyruğu ile karakterize edilen benzer yapıları sahiptir (Patel ve ark., 2011; Rizvi ve ark., 2014). Tokotrienoller, 3, 7 ve 11 numaralı karbonlarda 3 çift bağa sahip farnesil yan zincirindeki doymunluk derecesiyle tokoferollerden ayrılırken tokoferoller, 3 kiral karbonlu doymuş fitil yan zincirine sahiptir (Fu ve ark., 2014). İncelenen zeytinyağlarının tokotrienol bileşenlerinin içerikleri Çizelge 4.35'te verilmiştir. Çizelge 4.35'ten de görüldüğü gibi tokotrienol izomerlerinin değerleri birbirlerine yakın olmakla beraber diğer tokotrienol çeşitlerine göre β- tokotrienol (0.54-3.66 mg/kg yağ) bir miktar daha baskın bir bileşen olarak belirlenmiştir. α- tokotrienol (0.33-0.72 mg/kg), γ- tokotrienol (0.30-0.78 mg/kg) ve δ- tokotrienol (0.30-1.32 mg/kg) içerikleri ise birbirlerine daha yakın bulunmuştur. Tokotrienolün α- β- izomerleri kontrol numunesine kıyasla %1 OA + %1 AA içeren örnekte en yüksek değeri göstermiştir. γ- ve δ- tokotrienolün en yüksek değerleri ise %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> içeren örnek olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, %1 L-sis + %1 AA içeren örneğin γ- tokotrienol değerinde kontrol örneğine göre bir değişiklik görülmemiştir. Sızma zeytinyağının kardiyoprotektif (kalbi koruyucu) rolünün yanısıra zeytinyağında doğal olarak bulunan minör bileşenler antimikrobiyal, antioksidan ve anti-inflamatuvar aktivitelerinden kaynaklanan potansiyel olarak faydalı biyolojik etkilere sahiptir (Yubero-Serrano ve ark., 2019). Tokotrienoller de bilinen bir kardiyoprotektif etkiye sahip güçlü antioksidanlardır (Vasanthi ve ark., 2012). Tokotrienoller yağın stabilitesini ve besleyici özelliklerini sağlamaktadır (Edem, 2002; Mba

ve ark., 2015). Ayrıca, tokotrienollerin kolesterol sentezinin doğal inhibitörü olduğu belirtilmiştir (Edem, 2002). %2 OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanıldığında  $\alpha$ - tokotrienol içerikleri sırasıyla 0.45-0.42 mg/kg, 0.41-0.37 mg/kg, 0.33-0.33 mg/kg ve 0.48-0.45 mg/kg;  $\beta$ - tokotrienol içerikleri sırasıyla 3.04-2.93 mg/kg, 1.08-0.99 mg/kg, 1.12-0.95 mg/kg ve 1.03-0.95 mg/kg;  $\gamma$ - tokotrienol içerikleri sırasıyla 0.74-0.67 mg/kg, 0.39-0.36 mg/kg, 0.48-0.33 mg/kg ve 0.46-0.41 mg/kg;  $\delta$ - tokotrienol içerikleri sırasıyla 0.38-0.33 mg/kg, 0.80-0.88 mg/kg, 0.53-0.49 mg/kg ve 0.49-0.56 mg/kg bulunmuştur. Dolayısıyla, MgCl<sub>2</sub> katkı maddesi kullanıldığında en yüksek  $\alpha$ - tokotrienol içeriği, OA katkısı kullanıldığında en yüksek  $\beta$ - ve  $\gamma$ - tokotrienol içeriği, L-sis katkısı kullanıldığında ise en yüksek  $\delta$ - tokotrienol içeriği elde edilmiştir. Buradan yağın stabilitesini artırmada %2 oranında kullanılan OA etkili bir katkı olmuştur denilebilir. Tokoferoller singlet oksijenin söndürücüleri olarak işlev görürken (Choe ve Min, 2006, 2009), tokotrienollerin otooksidasyonda antioksidan aktiviteleri bulunmaktadır (Kim, 2014). %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> katkılarını ilave edildiği örnek en yüksek  $\alpha$ - ve  $\beta$ - tokotrienol içeriği verirken, en yüksek  $\gamma$ - tokotrienol içeriği %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> içeren örnekte ve en yüksek  $\delta$ - tokotrienol içeriği %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> içeren örnekte tespit edilmiştir. Bu yüzden, katkı ilavesi ile elde edilen zeytinyağlarının  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol içeriklerindeki artış olan örneklerin antioksidan aktivitelerini yükseltebilmesi ile açıklanabilir.

**Çizelge 4.34.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen tokoferol içerikleri (mg/kg yağ)

Numune no	Toplam tokoferol	$\alpha$ -tokoferol	$\beta$ - tokoferol	$\gamma$ - tokoferol	$\delta$ - tokoferol
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	278.16 $\pm$ 1.24*	243.54 $\pm$ 1.53	4.80 $\pm$ 0.12	25.59 $\pm$ 0.83	1.32 $\pm$ 0.08
%1 OA + %1 L-sis	261.05 $\pm$ 1.37	223.50 $\pm$ 1.74	3.27 $\pm$ 0.24	22.18 $\pm$ 0.75	1.68 $\pm$ 0.06
%2 MgCl <sub>2</sub>	194.85 $\pm$ 1.44	164.34 $\pm$ 1.66	3.96 $\pm$ 0.22	21.99 $\pm$ 0.69	1.45 $\pm$ 0.05
%2 L-sis	219.20 $\pm$ 1.55	189.04 $\pm$ 1.82	3.73 $\pm$ 0.31	21.03 $\pm$ 0.57	1.53 $\pm$ 0.07
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	223.14 $\pm$ 1.39	195.03 $\pm$ 1.43	4.11 $\pm$ 0.18	21.15 $\pm$ 0.23	0.96 $\pm$ 0.05
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	262.80 $\pm$ 1.47	230.01 $\pm$ 1.55	4.44 $\pm$ 0.25	22.98 $\pm$ 0.55	1.32 $\pm$ 0.09
%2 AA	222.44 $\pm$ 1.66	197.79 $\pm$ 1.46	3.65 $\pm$ 0.34	18.95 $\pm$ 0.74	1.19 $\pm$ 0.05
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	194.52 $\pm$ 1.40	171.33 $\pm$ 1.51	3.18 $\pm$ 0.45	16.38 $\pm$ 0.68	0.99 $\pm$ 0.03
%2 OA	220.12 $\pm$ 1.62	191.15 $\pm$ 1.73	3.56 $\pm$ 0.51	18.83 $\pm$ 0.64	1.30 $\pm$ 0.07
%2 AA	209.14 $\pm$ 1.52	183.81 $\pm$ 1.59	3.55 $\pm$ 0.23	17.26 $\pm$ 0.58	0.82 $\pm$ 0.02
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	288.12 $\pm$ 1.45	255.99 $\pm$ 1.47	4.77 $\pm$ 0.16	23.73 $\pm$ 0.66	1.35 $\pm$ 0.08
%2 OA	209.12 $\pm$ 1.67	183.25 $\pm$ 1.50	3.40 $\pm$ 0.35	17.53 $\pm$ 0.75	1.25 $\pm$ 0.05
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	312.51 $\pm$ 1.53	276.09 $\pm$ 1.64	4.98 $\pm$ 0.41	24.63 $\pm$ 0.51	1.80 $\pm$ 0.07
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	266.04 $\pm$ 1.55	235.35 $\pm$ 1.71	4.23 $\pm$ 0.27	20.94 $\pm$ 0.62	1.44 $\pm$ 0.06
%2 MgCl <sub>2</sub>	180.00 $\pm$ 1.37	154.26 $\pm$ 1.59	3.81 $\pm$ 0.36	18.84 $\pm$ 0.53	1.37 $\pm$ 0.05
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	261.39 $\pm$ 1.56	227.61 $\pm$ 1.62	4.29 $\pm$ 0.44	22.95 $\pm$ 0.96	1.92 $\pm$ 0.08
%1 L-sis + %1 AA	180.87 $\pm$ 1.81	157.83 $\pm$ 1.90	3.00 $\pm$ 0.28	15.60 $\pm$ 0.75	1.05 $\pm$ 0.05
%1 OA + %1 AA	234.33 $\pm$ 1.76	203.55 $\pm$ 1.68	3.63 $\pm$ 0.43	19.89 $\pm$ 0.67	1.17 $\pm$ 0.06
%2 L-sis	210.25 $\pm$ 1.39	181.25 $\pm$ 1.77	3.62 $\pm$ 0.54	19.65 $\pm$ 0.85	1.32 $\pm$ 0.07
%1 OA + %1 L-sis	238.12 $\pm$ 1.57	210.48 $\pm$ 1.63	3.43 $\pm$ 0.37	25.34 $\pm$ 0.93	1.26 $\pm$ 0.05
<b>K</b>	151.46 $\pm$ 0.36	140.74 $\pm$ 0.06	1.23 $\pm$ 0.05	10.62 $\pm$ 0.08	0.90 $\pm$ 0.04

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama  $\pm$  standart sapma.

**Çizelge 4.35.** Ekstraksiyonda uygulanan farklı katkı maddeleri sonucunda elde edilen zeytinyağlarında belirlenen tokotrienol içerikleri (mg/kg yağ)

Numune no	$\alpha$ - tokotrienol	$\beta$ - tokotrienol	$\gamma$ - tokotrienol	$\delta$ - tokotrienol
%1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	0.48 ±0.01*	1.17 ±0.03	0.78 ±0.02	0.48 ±0.02
%1 OA + %1 L-sis	0.45 ±0.02	1.42 ±0.03	0.56 ±0.03	0.51 ±0.02
%2 MgCl <sub>2</sub>	0.48 ±0.02	1.03 ±0.04	0.46 ±0.03	0.49 ±0.01
%2 L-sis	0.41 ±0.01	1.08 ±0.04	0.39 ±0.02	0.80 ±0.04
%1 OA + %1 MgCl <sub>2</sub>	0.48 ±0.03	0.54 ±0.01	0.51 ±0.01	0.36 ±0.03
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	0.45 ±0.01	2.34 ±0.03	0.75 ±0.02	0.51 ±0.04
%2 AA	0.33 ±0.02	1.12 ±0.03	0.48 ±0.03	0.53 ±0.04
%0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl <sub>2</sub>	0.42 ±0.01	1.35 ±0.04	0.48 ±0.03	0.39 ±0.01
%2 OA	0.45 ±0.01	3.04 ±0.05	0.74 ±0.04	0.38 ±0.02
%2 AA	0.33 ±0.02	0.95 ±0.02	0.33 ±0.02	0.49 ±0.03
%0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl <sub>2</sub>	0.39 ±0.02	1.14 ±0.03	0.45 ±0.03	0.30 ±0.01
%2 OA	0.42 ±0.01	2.93 ±0.05	0.67 ±0.02	0.33 ±0.01
%1 L-sis + %1 MgCl <sub>2</sub>	0.72 ±0.01	3.18 ±0.07	0.66 ±0.02	0.45 ±0.02
%1 AA + %1 MgCl <sub>2</sub>	0.57 ±0.03	1.89 ±0.04	0.45 ±0.03	1.17 ±0.05
%2 MgCl <sub>2</sub>	0.45 ±0.03	0.95 ±0.02	0.41 ±0.04	0.56 ±0.02
%0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl <sub>2</sub>	0.60 ±0.03	1.92 ±0.03	0.78 ±0.05	1.32 ±0.03
%1 L-sis + %1 AA	0.42 ±0.02	1.92 ±0.04	0.30 ±0.02	0.75 ±0.01
%1 OA + %1 AA	0.87 ±0.02	3.66 ±0.06	0.36 ±0.02	1.20 ±0.02
%2 L-sis	0.37 ±0.03	0.99 ±0.02	0.36 ±0.01	0.88 ±0.02
%1 OA + %1 L-sis	0.42 ±0.01	1.51 ±0.04	0.49 ±0.01	0.57 ±0.01
<b>K</b>	0.36 ±0.01	1.53 ±0.03	0.30 ±0.01	0.69 ±0.01

Katkı maddelerinin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA, Kontrol örneği (katkı maddesiz): K şeklindedir.

\*Ortalama ± standart sapma.

Çizelge 4.36’da zeytinyağlarında belirlenen  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tokoferol ve toplam tokoferol miktarları için belirlenen varyans analiz sonuçları verilmiştir. İnhibitör maddelerin  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol üzerindeki etkilerinin tanımlanmasında özel kübik model olarak belirlenmiştir.  $\delta$ -tokoferol ise modellenememiştir. Zeytinyağlarının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerlerine ait varyans analizinde modellere ait P değerleri sırasıyla 0.0017, 0.0033, 0.0017 ve 0.0003 olarak belirlenmiş olup katkı maddelerden en az birinin zeytinyağlarının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerleri üzerinde istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). İnhibitör maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytinyağlarının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerleri üzerine önemli seviyede etkilediği görülmektedir ( $P < 0.05$ ). Buna göre, zeytinyağı  $\alpha$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerleri üzerine L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub>,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerleri üzerine ise OA  $\times$  AA  $\times$  L-sis interaksiyonları önemli etkiye sahip olmuştur ( $P < 0.01$ ). L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu  $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol içerikleri için L-sis  $\times$  AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonları ise  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol içeriklerini önemli seviyede etkilemiştir ( $P < 0.05$ ). L-sis  $\times$  AA interaksiyonu  $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol üzerine etkileşiminin önemli olduğu tespit edilmiştir ( $P < 0.05$ ). OA  $\times$  L-sis interaksiyonu  $\gamma$ -tokoferol ( $P < 0.01$ ) ve toplam tokoferol ( $P < 0.05$ ) üzerine istatistiksel olarak önemli bir etkiye sahiptir. Model uyumsuzluğu testinde P değerleri sırasıyla 0.0781, 0.6668, 0.7541 ve 0.1850 olarak hesaplanmıştır, dolayısıyla model uyumsuzluğunun  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol için önemli olmadığı tespit edilmiştir ( $P > 0.05$ ).  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.8066, 0.7365, 0.8768 ve 0.9366 iken uyarlanan belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.6937, 0.6149, 0.7660 ve 0.8663 şeklinde bulunmuştur. Dolayısıyla,  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol içeriğindeki değişkenliğin sırasıyla %80.66, %73.65, %87.68 ve %93.66’sı belirlenen modeller ile açıklanabilmektedir. Uyarlanan R<sup>2</sup> değerleri ise R<sup>2</sup> değerlerine yakın olduğundan tespit edilen  $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerleri arasında yüksek bir uyumluluk oranının olduğu belirlenmiştir.  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferolün regresyon eşitlikleri Çizelge 4.36’da verilmiştir. İnhibitör maddelerin katsayılarına göre OA, L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının pozitif etkilerinden dolayı bu etkileşimlerin zeytinyağının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferol içeriğini artırdığı belirlenmiştir.

**Çizelge 4.36.** Zeytin hamurlarının  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -tokoferol ve toplam tokoferol değerlerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	$\alpha$ -tokoferol			$\beta$ -tokoferol			$\gamma$ -tokoferol			$\delta$ -tokoferol			Toplam tokoferol		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	7	7.15	0.0017	6	6.06	0.0033	9	7.91	0.0017	Hiçbir modelle ifade edilemedi			10	13.31	0.0003
AB	-	-	-	-	-	-	1	12.15	0.0059	-	-	-	1	7.05	0.0262
BC	-	-	-	-	-	-	1	6.23	0.0317	-	-	-	1	5.37	0.0457
BD	1	24.60	0.0003	1	8.77	0.0110	1	6.55	0.0284	-	-	-	1	52.91	<0.0001
CD	1	10.09	0.0080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	17.64	0.0023
ABC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4.00	0.0767
ABD	-	-	-	-	-	-	1	4.20	0.0675	-	-	-	-	-	-
ACD	1	11.33	0.0056	1	14.93	0.0020	1	31.79	0.0002	-	-	-	1	30.80	0.0004
BCD	1	8.17	0.0144	1	7.69	0.0158	1	5.99	0.0345	-	-	-	1	7.57	0.0224
Hata	12	-	-	13	-	-	10	-	-	-	-	-	9	-	-
Model uyumsuzluğu	7	3.86	0.0781	8	0.7368	0.6668	5	0.5213	0.7541	-	-	-	4	2.37	0.1850
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	-	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	-	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.8066		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.6937	R <sup>2</sup> =0.7365		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.6149	R <sup>2</sup> =0.8768		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.7660	-			R <sup>2</sup> =0.9366		Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8663
$\alpha$ -tokoferol = $0.4191 \times A + 0.4373 \times B + 0.3497 \times C + 0.5206 \times D + 1.76 \times (A \times C)$															
$\beta$ -tokoferol = $3.49 \times A + 3.46 \times B + 3.64 \times C + 4.09 \times D + 4.77 \times (B \times D) + 140.75 \times (A \times C \times D) - 102.55 \times (B \times C \times D)$															
$\gamma$ -tokoferol = $18.81 \times A + 20.35 \times B + 18.70 \times C + 21.06 \times D + 16.80 \times (A \times B) - 15.52 \times (B \times C) + 16.03 \times (B \times D) - 323.96 \times (A \times B \times D) + 889.30 \times (A \times C \times D) - 392.25 \times (B \times C \times D)$															
$\delta$ -tokoferol = -															
Toplam tokoferol = $221.92 \times A + 214.53 \times B + 221.69 \times C + 190.93 \times D + 121.58 \times (A \times B) - 138.29 \times (B \times C) + 431.40 \times (B \times D) + 249.60 \times (C \times D) - 3009.12 \times (A \times B \times C) + 8351.85 \times (A \times C \times D) - 4226.00 \times (B \times C \times D)$															

A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

İnhibitör maddelerin zeytinyağındaki tokoferoller üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğimi ve kontur grafikleri oluşturulmuştur. Şekil 4.49, Şekil 4.50, Şekil 4.51 ve Şekil 4.52’de sırasıyla  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -tokoferol ve toplam tokoferole ait grafikler verilmiştir.

Şekil 4.49a’ya göre OA kullanım miktarlarındaki artış orta seviyeye kadar  $\alpha$ -tokoferol içeriğini artırırken daha sonra az miktarda azalma göstermiştir. L-sis kullanım miktarlarındaki artış  $\alpha$ -tokoferol miktarını orta seviyeye kadar azaltmıştır. Orta seviyeden sonra L-sis kullanımı  $\alpha$ -tokoferol miktarını çok az azaltmıştır. L-sis kullanımındaki artış  $\alpha$ -tokoferol içeriği üzerine en fazla negatif etkide bulunmuştur. AA ve  $MgCl_2$  kullanımındaki artış  $\alpha$ -tokoferol miktarında çok fazla değişime neden olmamıştır. En yüksek  $\alpha$ -tokoferol miktarı OA ve  $MgCl_2$  katkılarının düşük miktarlarda kullanılmasıyla üretilen zeytinyağlarında görülmüştür (Şekil 4.49b<sub>2</sub>). Kontur grafiği, formülasyonda AA ve  $MgCl_2$  katkılarının düşük miktarlarda kullanılmasıyla  $\alpha$ -tokoferol miktarında daha yüksek değerler elde edilmiştir (Şekil 4.49c<sub>2</sub>).

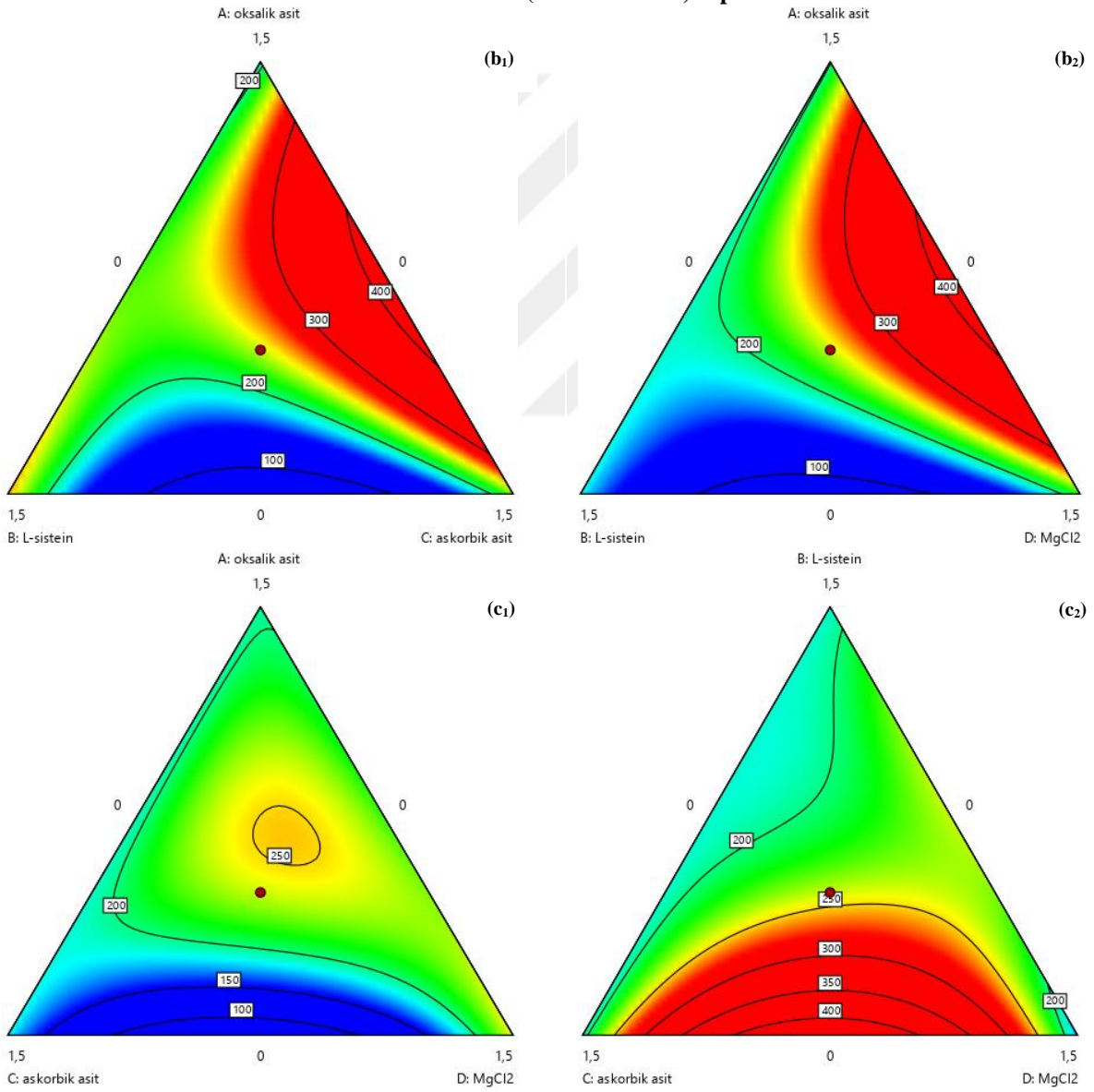
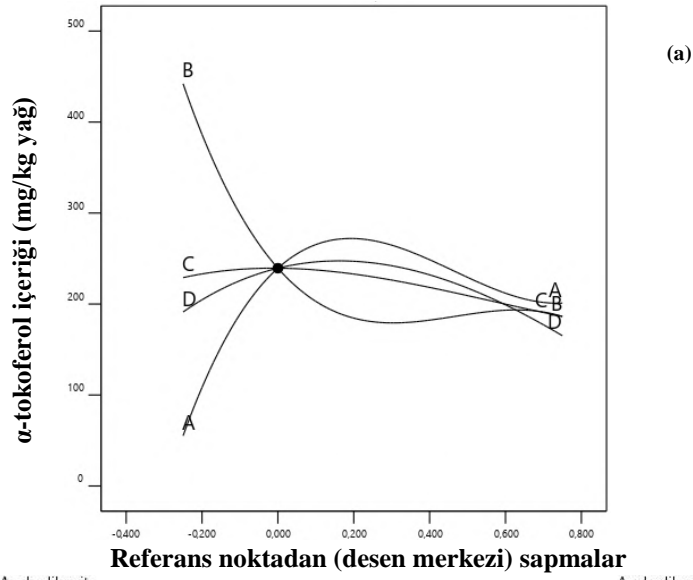
$\beta$ -tokoferol içeriği için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde OA ve L-sis katkılarının kullanım miktarlarının artması  $\beta$ -tokoferol içeriği üzerine fazla miktarda etkili iken AA ve  $MgCl_2$  katkılarının kullanım miktarlarının artması  $\beta$ -tokoferol içeriği üzerine neredeyse etkili olmadığı gözlenmektedir (Şekil 4.50a). Yani, OA  $\beta$ -tokoferol miktarını önemli ölçüde artırırken L-sis önemli ölçüde azaltmış, AA ve  $MgCl_2$  ise çok fazla etkili olmamıştır. Orta seviyeye kadar OA, AA ve  $MgCl_2$  kullanımı  $\beta$ -tokoferol içeriğini artırmış, L-sis ise ters yönde etki göstermiştir. Şekil 4.50b<sub>1</sub>’ye göre, düşük oranda OA ve AA kullanılarak üretilen zeytinyağının en yüksek  $\beta$ -tokoferol içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.  $MgCl_2$  kullanımının artması  $\beta$ -tokoferol içeriği üzerine negatif etkide bulunurken (Şekil 4.50b<sub>2</sub>), AA kullanımının artması  $\beta$ -tokoferol içeriğinin üzerine çok az pozitif etkide bulunmuştur (Şekil 4.50c<sub>1</sub>).

Şekil 4.51a’da görüldüğü gibi, OA ve AA katkılarının kullanım miktarlarının artmasıyla  $\gamma$ -tokoferol içeriği artarken, L-sis’in kullanım miktarlarının artmasıyla  $\gamma$ -tokoferol içeriği azalmış,  $MgCl_2$  katkısı ise çok fazla bir etki göstermemiştir. OA ve AA katkılarının kullanım miktarının artmasıyla orta seviyeye kadar  $\gamma$ -tokoferol içeriği artmış orta seviyeden sonra bir miktar daha artarak daha sonra hafif bir azalmaya sebep olmuştur. Formülasyondaki OA ve  $MgCl_2$  oranlarının artmasıyla  $\gamma$ -tokoferol içeriği azalmaktadır (Şekil 4.51b<sub>2</sub>). Ayrıca, AA ve  $MgCl_2$  oranlarındaki artış  $\gamma$ -tokoferol içeriğini azaltmıştır (Şekil 4.51c<sub>2</sub>).

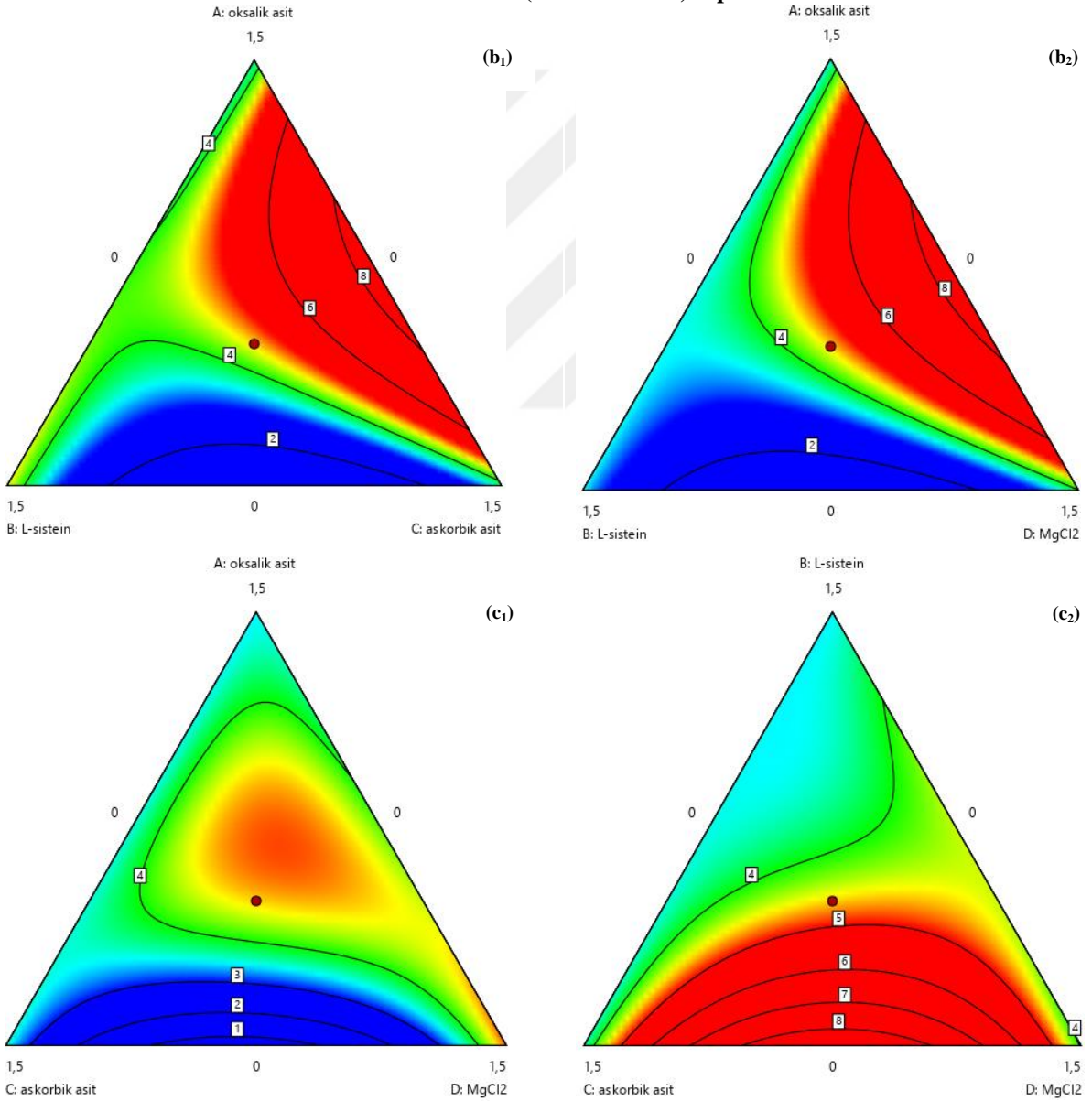
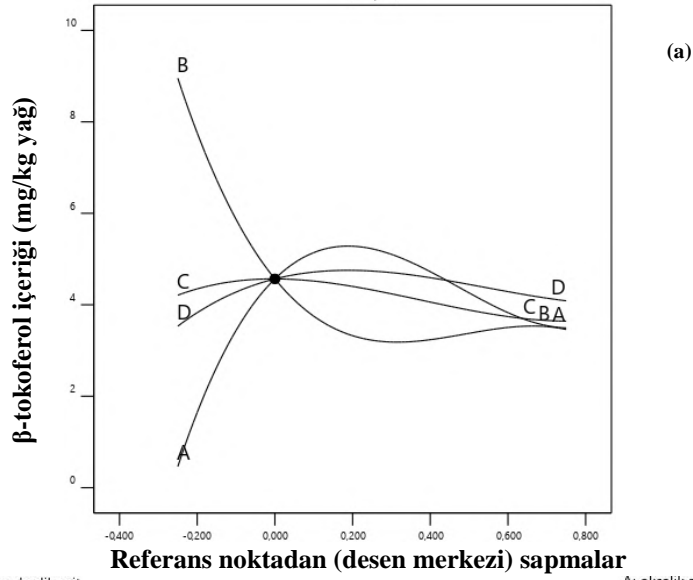
Toplam tokoferol içeriği için oluşturulan iz eğim grafiği incelendiğinde OA ve  $MgCl_2$  kullanımının artması toplam tokoferol içeriği üzerine olumlu etki yaparken L-sis ve AA kullanımının artması toplam tokoferol içeriği üzerine olumsuz etki yapmıştır (Şekil 4.52a).

Orta seviyeye kadar OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı toplam tokoferol içeriğini artırırken L-sis ve AA kullanımı ise azaltmıştır. Şekil 4.52a'daki iz eğim grafiğindeki verilere göre, L-sis kullanımı toplam tokoferol miktarında daha fazla azalmaya, OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı ise daha fazla artışa sebep olmuştur. OA, AA ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarının artması ile zeytinyağının toplam tokoferol miktarlarında azalma görülmektedir (Şekil 4.52b<sub>1</sub>, Şekil 4.52b<sub>2</sub>). Şekil 4.52c<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki AA ve MgCl<sub>2</sub>'nin ortak kullanımı ile elde edilen toplam tokoferol miktarının azaldığı görülmektedir.

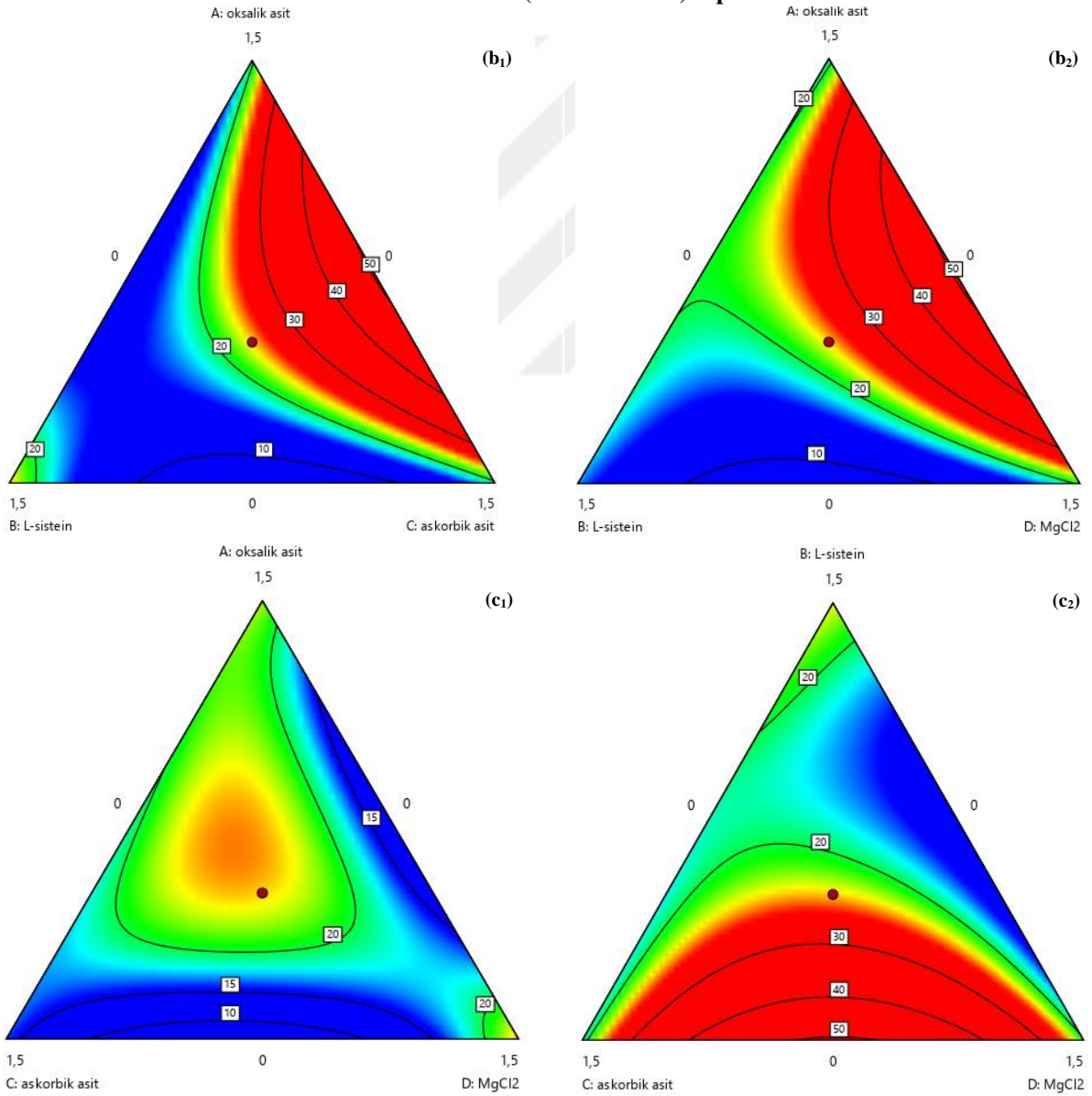
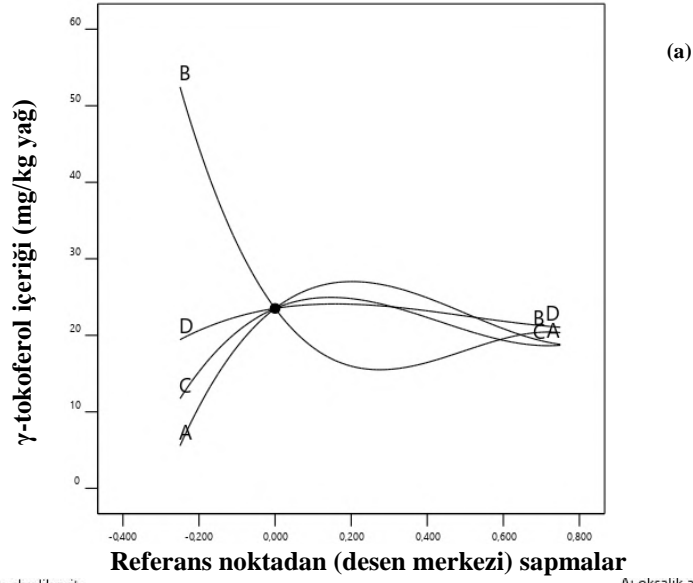




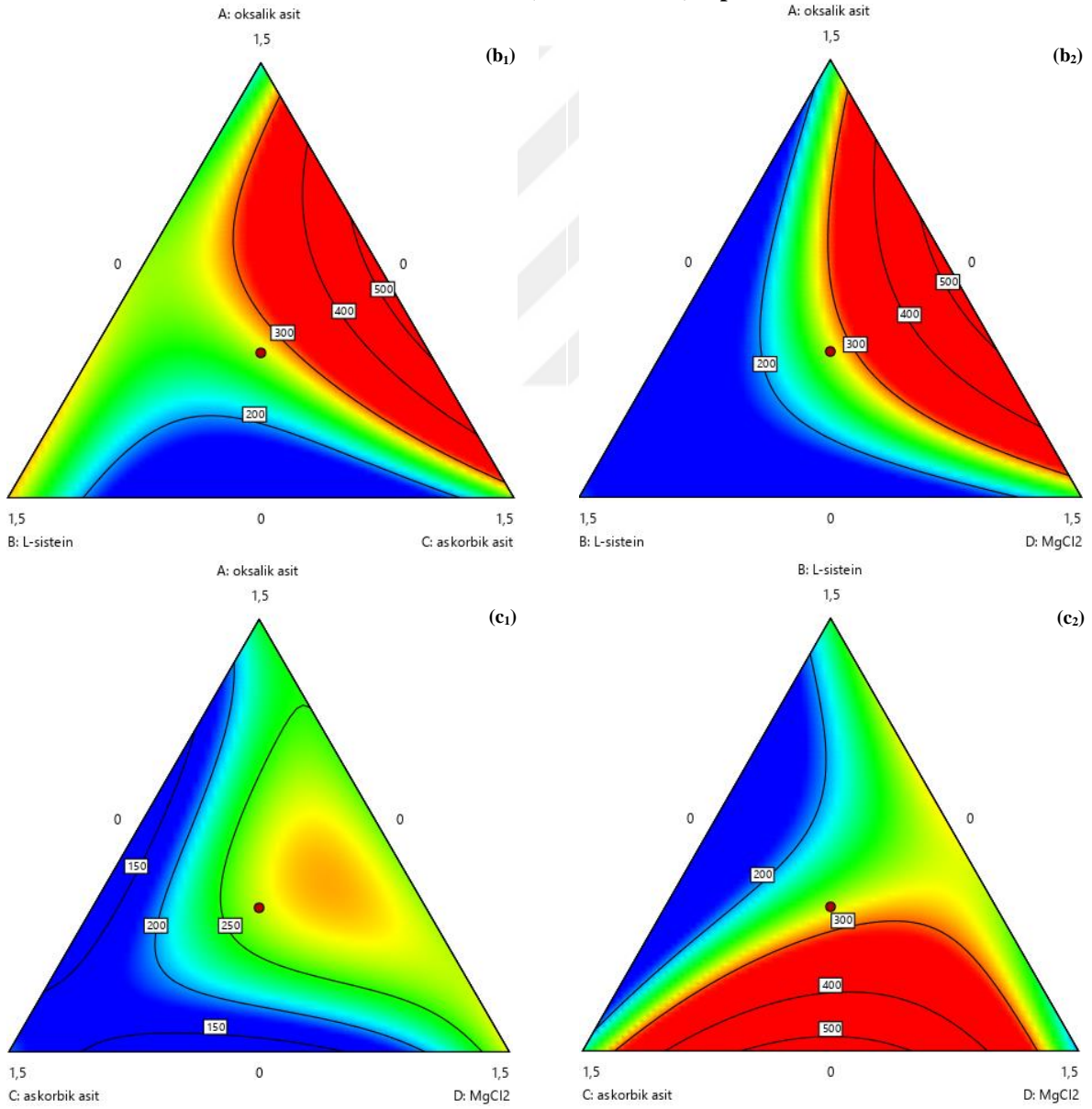
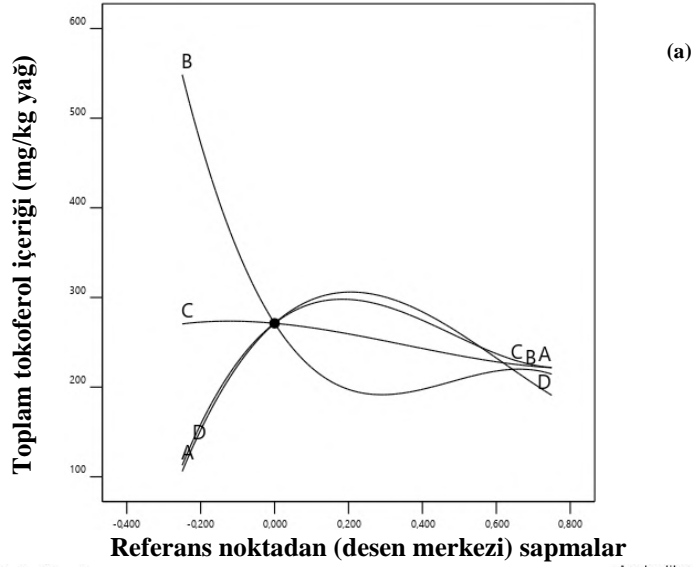
**Şekil 4.49.** Katkı maddelerinin  $\alpha$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.50.** Katkı maddelerinin  $\beta$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.51.** Katkı maddelerinin  $\gamma$ -tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)



**Şekil 4.52.** Katkı maddelerinin toplam tokoferol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi, b<sub>1</sub> – b<sub>2</sub>, c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>. Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D: MgCl<sub>2</sub>)

Farklı katkı maddelerle elde edilen zeytinyağlarının  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol içerikleri için en uygun modeller ve bunlara ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.37’de verilmiştir. İnhibitör maddelerin  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol içerikleri üzerindeki etkilerini belirlemek için sırasıyla kuadratik, özel kübik, özel kübik ve kuadratik modelleri tespit edilmiştir.  $\alpha$ -  $\beta$ - ve  $\gamma$ - tokotrienol değerlerinin modellerine ait P değerleri  $<0.0001$  olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.37). Varyans analizinde %95 güven aralığındaki ( $P<0.05$ ) modellerle çalışılmak tercih edildiğinden elde edilen  $\alpha$ -  $\beta$ - ve  $\gamma$ - tokotrienol sonuçları  $P<0.05$  olduğundan, istatistiksel olarak önemli bir model oluşturulmuştur. İnhibitör maddelerin bazı interaksiyon etkilerinin zeytinyağlarının  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol değerleri üzerine önemli seviyede etkilediği görülmektedir ( $P<0.05$  ve  $P<0.01$ ). Buna göre, OA  $\times$  AA interaksiyonu  $\alpha$ -  $\beta$ - tokotrienol değerleri üzerine istatistiksel olarak  $P<0.01$ , Ayrıca,  $\beta$ -  $\delta$ - tokotrienol değerleri AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonunun etkisi ile önemli ölçüde değişmiştir ( $P<0.05$ ). L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve OA  $\times$  L-sis  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonlarının  $\beta$ -  $\gamma$ - tokotrienol değerleri üzerine ise istatistiksel olarak  $P<0.01$  düzeyinde etki etmektedir. OA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> ve L-sis  $\times$  AA interaksiyonları ise  $\beta$ - tokotrienol değeri üzerine istatistiksel olarak önemli bulunurken ( $P<0.01$ ), OA  $\times$  L-sis interaksiyonunun da birinci dereceden etkisi önemli düzeyde etkili bulunmuştur ( $P<0.05$ ).  $\gamma$  -tokotrienol değerleri için geliştirilen model uyumsuzluk testini geçmiştir ( $P>0.05$ ). Model uyumsuzluğu testindeki P değerleri ise sırasıyla 0.0009, 0.0017, 0.7638 ve 0.0003 olarak tespit edilerek model uyumsuzluğunun sadece  $\gamma$ -tokotrienol değeri için önemli olmadığı belirlenmiştir ( $P>0.05$ ). Tokotrienol izomerlerinin belirleme katsayıları sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.6111, 0.9558, 0.9030 ve 0.5424 ve uyarlanan belirleme katsayıları ise sırasıyla R<sup>2</sup>: 0.5074, 0.9068, 0.8324 ve 0.3790 olarak bulunmuştur. R<sup>2</sup> ile uyarlanan R<sup>2</sup> arasındaki fark mümkün olduğunca azaltılarak istatistiksel olarak önemsiz olan terimlerin tespit edilen modellerde daha az bulunması sağlanmıştır. Tespit edilen R<sup>2</sup> değerleri ile  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol verilerindeki değişkenliğin sırasıyla %61.11, %95.58, %90.30 ve %54.24’ünün belirlenen model ile açıklanabileceği gösterilmektedir. Değişkenliğin geri kalanları ise (sırasıyla %38.89, %4.42, %9.7 ve %45.76) bu modeller tarafından açıklanamamaktadır (Çizelge 4.37).  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol değerleri için oluşturulan regresyon eşitliği Çizelge 4.37’de verilmiştir. ANOVA tablosuna göre, model katsayıları incelendiğinde,  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol değerleri üzerine OA, L-sis, AA, MgCl<sub>2</sub> katkılarının pozitif etkileri bulunmaktadır. OA  $\times$  AA interaksiyonu ise  $\alpha$ -  $\beta$ - ve  $\delta$ - tokotrienol değerleri için pozitif interaksiyon gösterirken,  $\gamma$ - tokotrienol değeri için negatif interaksiyon göstermektedir. AA  $\times$  MgCl<sub>2</sub> interaksiyonu ise  $\beta$ -  $\delta$ - tokotrienol değerleri için pozitif interaksiyon göstermektedir.

**Çizelge 4.37.** Zeytinyağlarının  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ -  $\delta$ - tokotrienol içeriklerini etkileyen bağımsız değişkenlerin modellenmesi

Kaynak	$\alpha$ -tokotrienol			$\beta$ -tokotrienol			$\gamma$ -tokotrienol			$\delta$ -tokotrienol		
	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri	SD	F-değeri	P-değeri
Model	4	5.89	0.0047	10	19.48	<0.0001	8	12.80	0.0001	5	3.32	0.0348
AB	-	-	-	1	5.62	0.0419	-	-	-	-	-	-
AC	1	21.55	0.0003	1	31.36	0.0003	1	6.42	0.0278	1	8.06	0.0131
AD	-	-	-	1	25.54	0.0007	-	-	-	-	-	-
BC	-	-	-	1	10.45	0.0103	-	-	-	-	-	-
BD	-	-	-	1	53.84	<0.0001	1	13.15	0.0040	-	-	-
CD	-	-	-	1	10.47	0.0102	-	-	-	1	5.34	0.0366
ABC	-	-	-	-	-	-	1	14.34	0.0030	-	-	-
ABD	-	-	-	1	15.51	0.0034	1	14.30	0.0030	-	-	-
ACD	-	-	-	-	-	-	1	6.68	0.0254	-	-	-
Hata	15	-	-	9	-	-	11	-	-	14	-	-
Model uyumsuzluğu	10	28.43	0.0009	4	24.54	0.0017	6	0.5384	0.7638	9	45.76	0.0003
Saf hata	5	-	-	5	-	-	5	-	-	5	-	-
Toplam	19	-	-	19	-	-	19	-	-	19	-	-
	R <sup>2</sup> =0.6111	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.5074		R <sup>2</sup> =0.9558	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.9068		R <sup>2</sup> =0.9030	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.8324		R <sup>2</sup> =0.5424	Uyarlanan R <sup>2</sup> =0.3790	
$\alpha$ -tokotrienol = 0.4191 × A + 0.4373 × B + 0.3497 × C + 0.5206 × D + 1.76 × (A×C)												
$\beta$ -tokotrienol = 2.92 × A + 1.02 × B + 1.05 × C + 0.9788 × D - 2.21 × (A×B) + 6.56 × (A×C) - 5.98 × (A×D) + 3.78 × (B×C) + 8.77 × (B×D) + 3.79 × (C×D) - 63.53 × (A×B×D)												
$\gamma$ -tokotrienol = 0.7019 × A + 0.3516 × B + 0.3876 × C + 0.4269 × D - 0.7153 × (A×C) + 1.02 × (B×D) + 27.26 × (A×B×C) - 27.53 × (A×B×D) + 18.60 × (A×C×D)												
$\delta$ -tokotrienol = 0.3188 × A + 0.7494 × B + 0.4906 × C + 0.4158 × D + 2.81 × (A×C) + 2.30 × (C×D)												

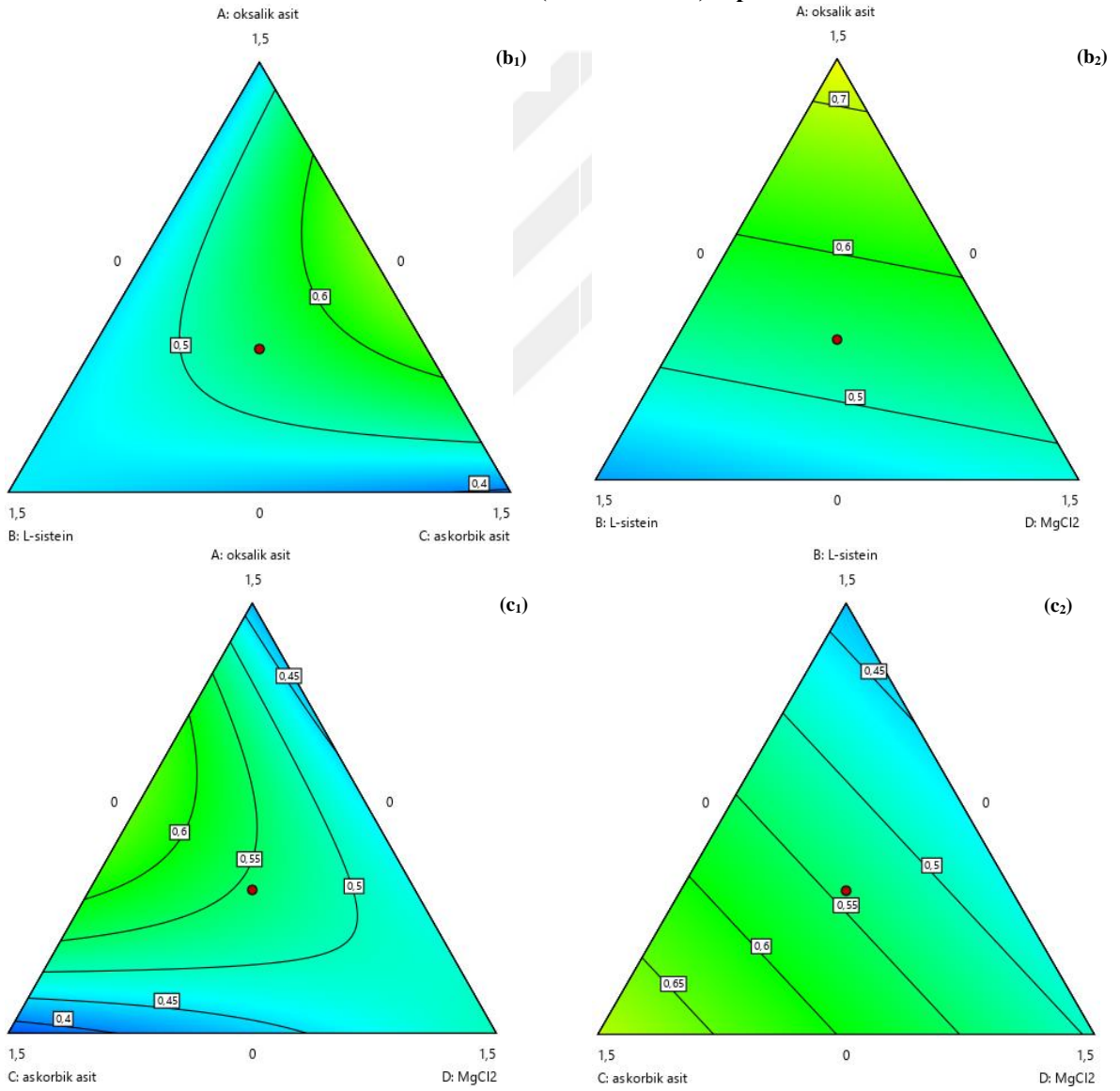
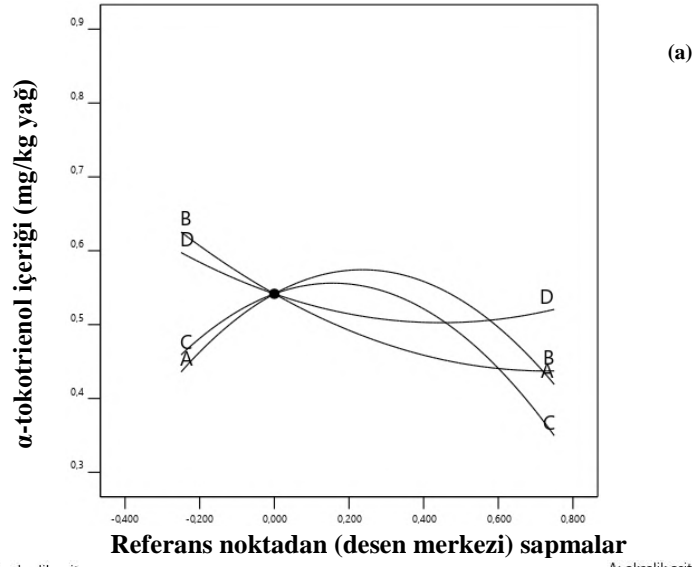
A: Oksalik asit; B: L-sistein; C: Askorbik asit; D: MgCl<sub>2</sub>

İnhibitör maddelerin  $\alpha$ -  $\beta$ -  $\gamma$ - ve  $\delta$ - tokotrienol üzerine etkisini görmek amacıyla her bir katkı madde için ayrı ayrı iz eğim ve kontur grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.53, Şekil 4.54, Şekil 4.55 ve Şekil 4.56). Şekil 4.53a'ya göre OA ve AA kullanım miktarlarındaki artış belli bir seviyeye kadar  $\alpha$ -tokotrienol içeriğini artırırken daha sonra azalış göstermiştir. Kontur grafiği ise formülasyondaki L-sis ve MgCl<sub>2</sub> oranlarının artması ile  $\alpha$ -tokotrienol içeriğini azalttığını göstermiştir (Şekil 4.53c<sub>2</sub>). Ayrıca, OA ve AA kullanımları ile L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımları hemen hemen benzer etki göstermiştir (Şekil 4.53a).

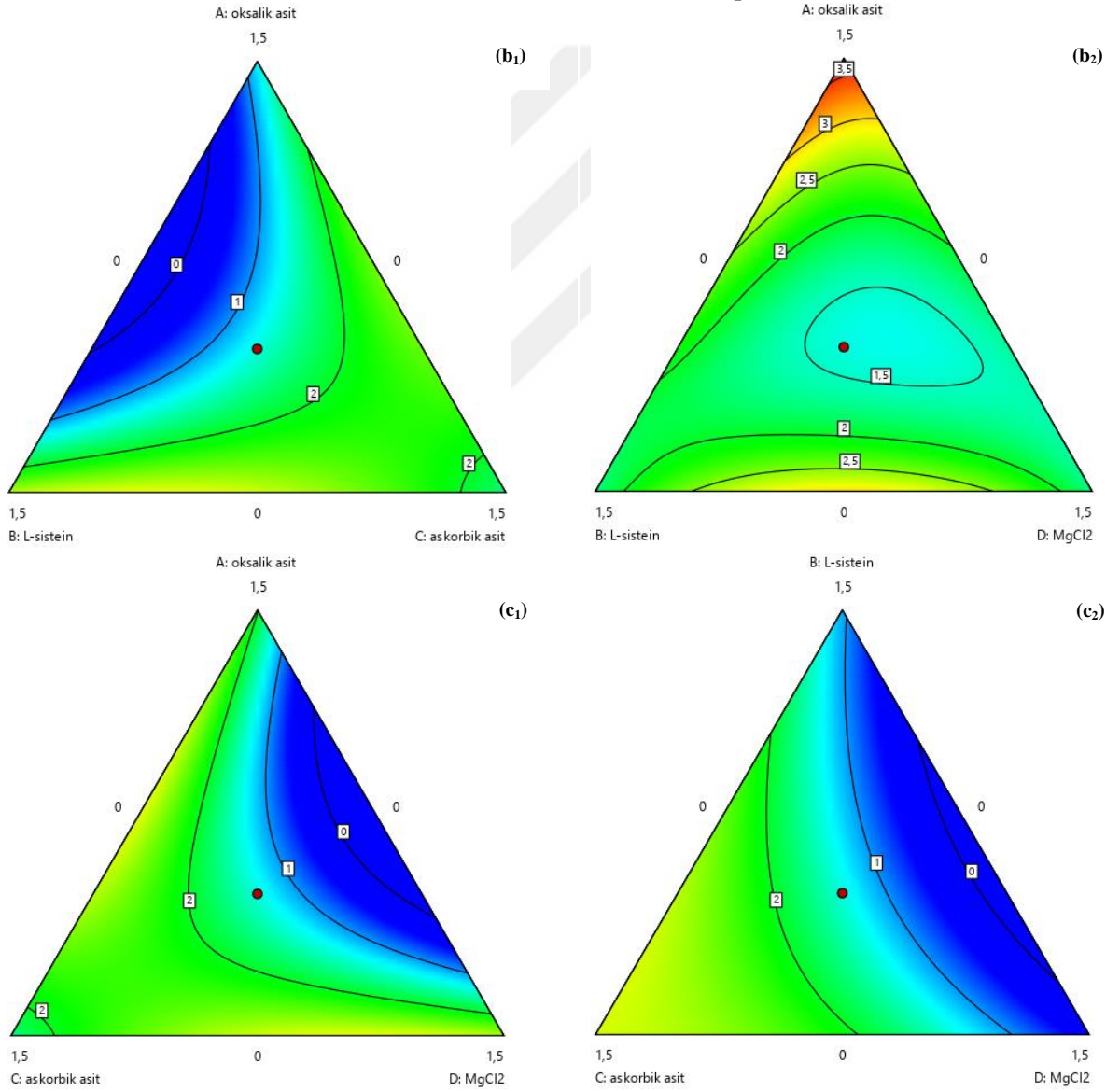
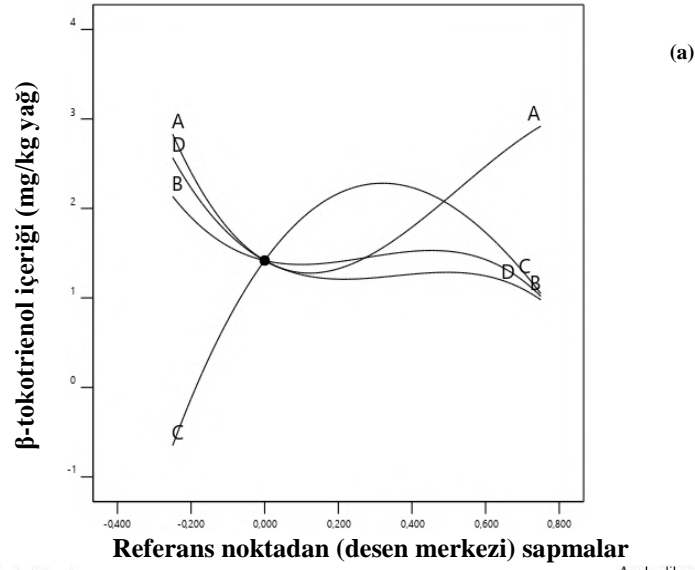
Şekil 4.54a'da görüldüğü gibi orta seviyeye kadar OA ve MgCl<sub>2</sub> kullanım miktarının artması  $\beta$ -tokotrienol içeriğini azaltırken, L-sis ve AA kullanım miktarının artması  $\beta$ -tokotrienol içeriğini artırmıştır. Orta seviyeden sonra ise L-sis, AA ve MgCl<sub>2</sub>  $\beta$ -tokotrienol içeriğini bir miktar azaltırken, OA kullanım miktarının artması ise  $\beta$ -tokotrienol içeriğini fazla miktarda artırmıştır. MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması ise  $\beta$ -tokotrienol içeriği üzerine negatif etkide bulunmuştur. Şekil 4.54b<sub>2</sub>'de görüldüğü gibi, formülasyondaki OA konsantrasyonunun arttırılması, zeytinyağlarında daha yüksek  $\beta$ -tokotrienol içeriği ile sonuçlanmıştır.

$\gamma$ -tokotrienol içeriği için oluşturulan iz eğim incelendiğinde AA ve MgCl<sub>2</sub> katkılarının kullanım miktarlarının artması ile  $\gamma$ -tokotrienol içeriği üzerine etkisinin yüksek olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.55). Yani, AA  $\gamma$ -tokotrienol içeriğini önemli ölçüde artırmış MgCl<sub>2</sub> ise önemli ölçüde azaltmıştır. Orta seviyeye kadar OA ve AA kullanımı  $\gamma$ -tokotrienol içeriğini artırmış, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> ise azaltmıştır. En yüksek  $\gamma$ -tokotrienol içeriği düşük oranda kullanılan OA ve L-sis ile üretilen zeytinyağı örneklerinde belirlenmiştir (Şekil 4.55b<sub>2</sub>).

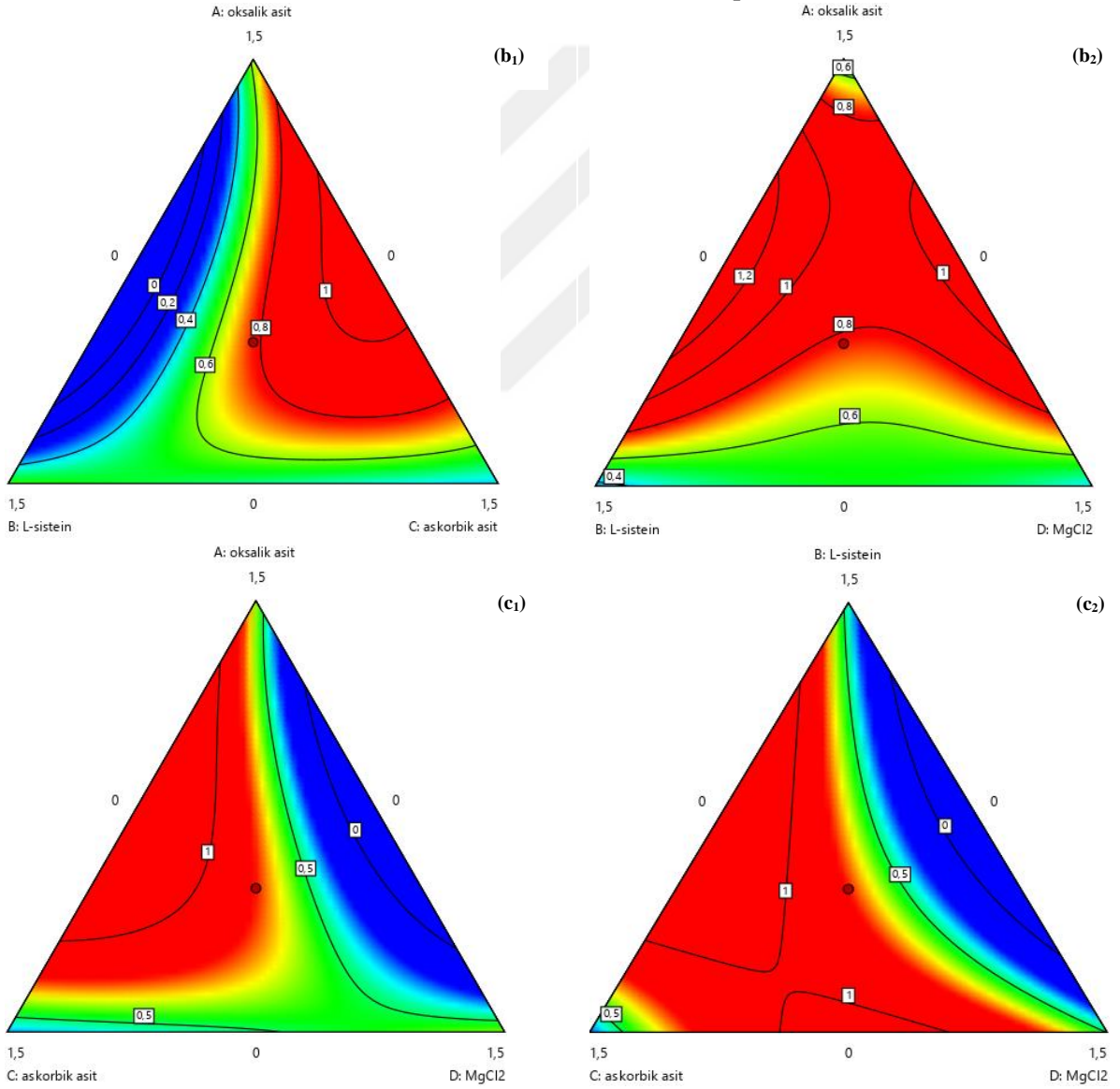
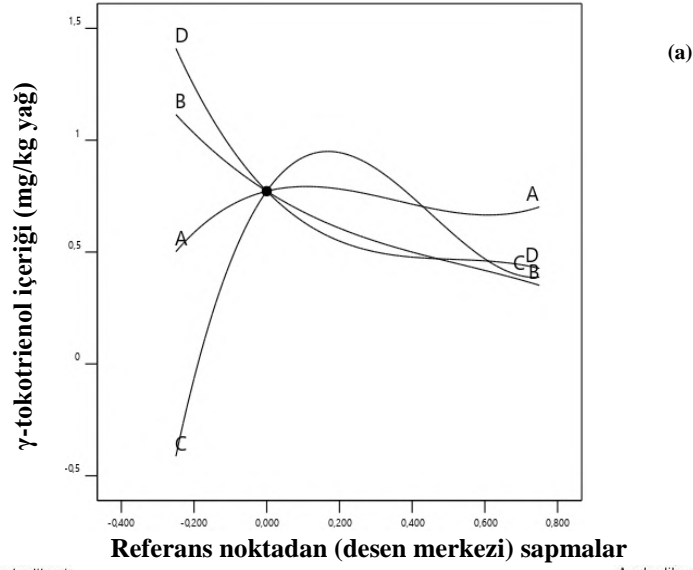
Şekil 4.56'da görüldüğü gibi, AA kullanımının artması ile  $\delta$ -tokotrienol içeriği üzerine neredeyse bir etki yapmadığı tespit edilmiştir. MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması ise  $\delta$ -tokotrienol içeriği üzerine negatif etki göstererek doğrusal olarak azaldığı görülmüştür. İnhibitör maddelerden OA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> miktarlarının artması  $\delta$ -tokotrienol içeriği üzerine olumsuz bir etkiye neden olmuştur.  $\delta$ -tokotrienol içeriği ile ilgili oluşturulan iz eğim incelendiğinde orta seviyeye kadar AA kullanımı  $\delta$ -tokotrienol içeriğini artırırken, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımı azaltmıştır. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun artması, zeytinyağının  $\delta$ -tokotrienol içeriğini sürekli azaltmıştır (Şekil 4.56c<sub>1</sub>). OA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının artması  $\delta$ -tokotrienol içeriği üzerine negatif etkide bulunmuştur.



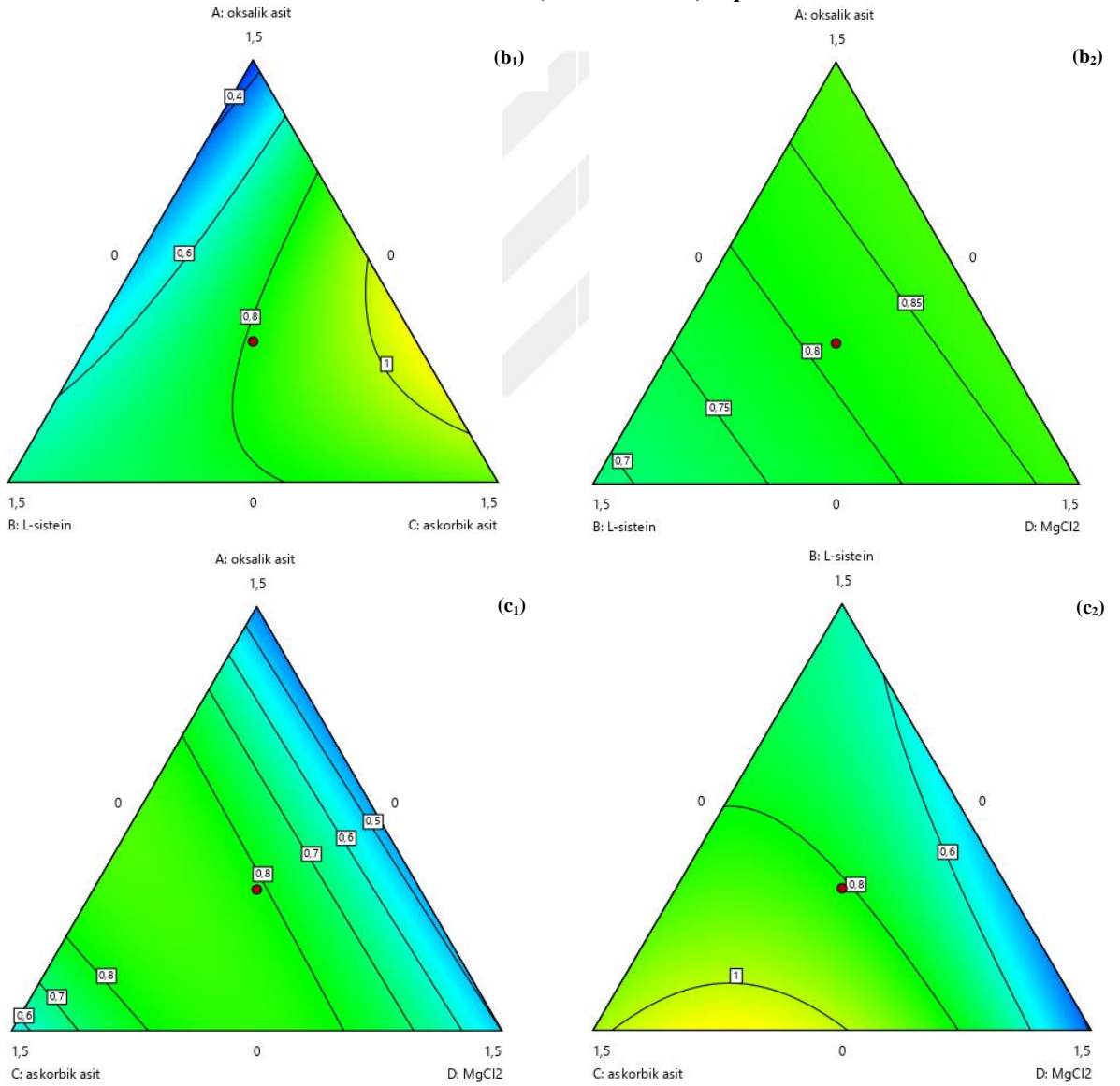
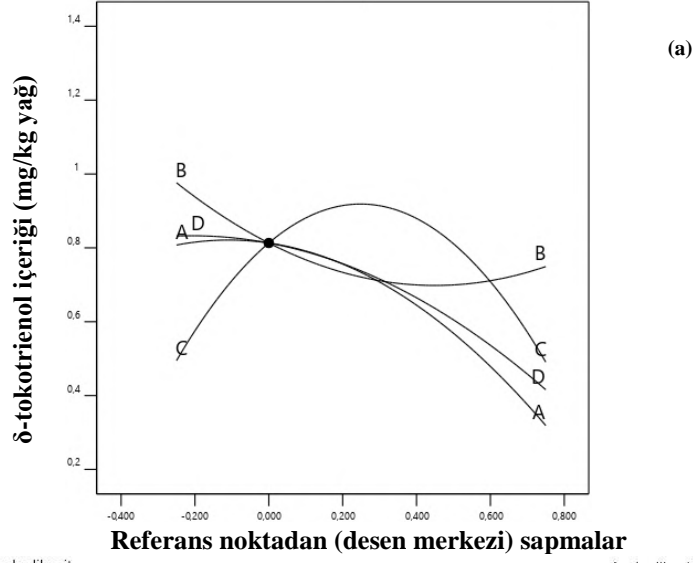
**Şekil 4.53.** Katkı maddelerinin  $\alpha$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.54.** Katkı maddelerinin  $\beta$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.55.** Katkı maddelerinin  $\gamma$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )



**Şekil 4.56.** Katkı maddelerinin  $\delta$ -tokotrienol içeriği (mg/kg yağ) üzerine etkisini gösteren optimizasyon grafikleri a. İz eğimi,  $b_1 - b_2$ ,  $c_1 - c_2$ . Kontur grafiği (A: Oksalik asit, B: L-sistein, C: Askorbik asit, D:  $MgCl_2$ )

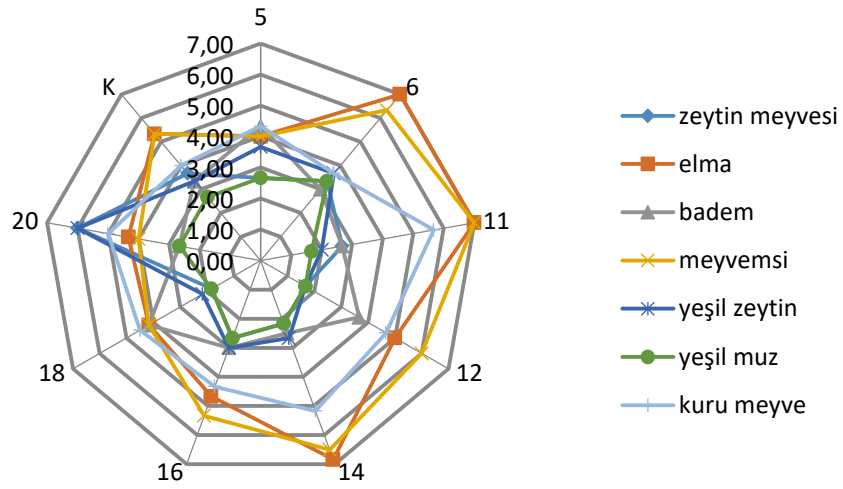
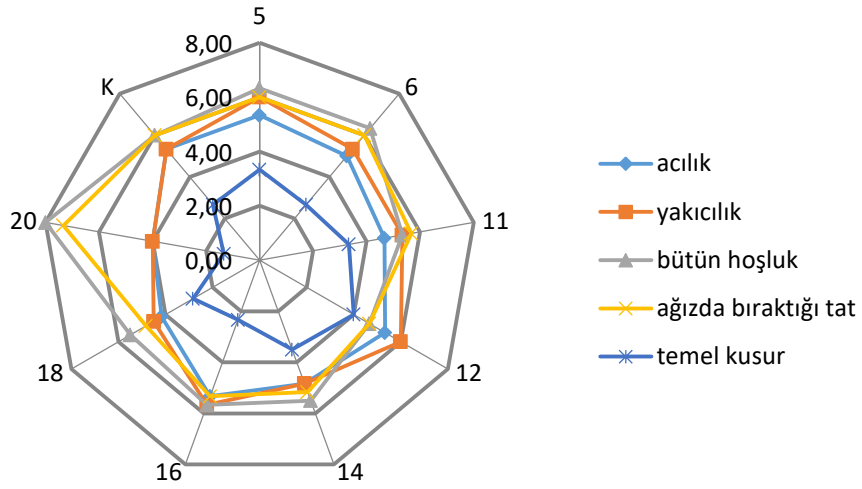
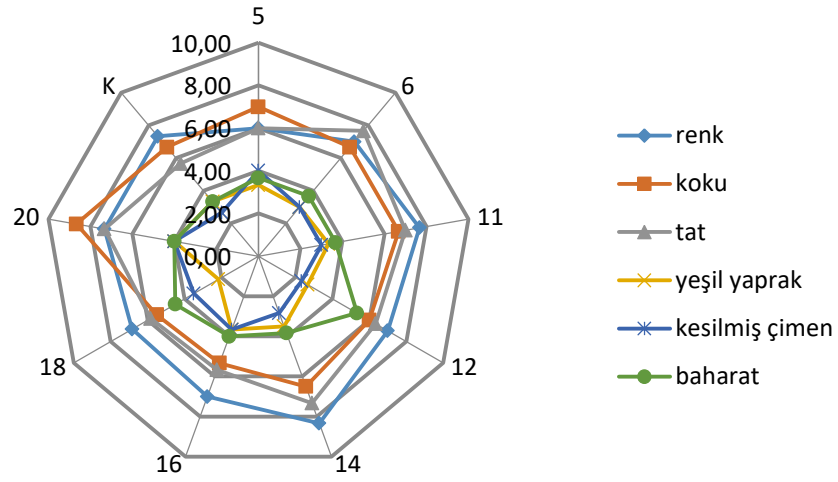
#### 4.4.9. Zeytinyağı örneklerinde duyuusal analiz sonuçları

Sızma zeytinyağı kalitesini tanımlamak için duyuusal özellikler kullanılmaktadır. Yağın organoleptik özelliklerinin tam açıklaması yalnızca duyuusal analiz yoluyla elde edilebilmektedir (Gargouri ve ark., 2015). Duyusal analiz Çizelge 4.4'te verilen katkı madde ilave edilerek elde edilen 20 adet zeytinyağı örnekleri ve katkı madde ilave edilmeyen kontrol örneği yüksek verim, toplam fenolik madde, indüksiyon süresi ve düşük serbest yağ asitliği, peroksit değeri,  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerleri, ayrıca düşük POD, PPO ve yüksek  $\beta$ -glukozidaz enzim aktiviteleri göz önünde bulundurularak ön eleme yapılmıştır. Ön eleme sonucunda 9 örnek seçilmiştir. 1-9 arasında puanlamanın yapıldığı duyuusal değerlendirmede 1: çok kötü, 9: çok iyi şeklinde belirlenmiştir. Örnekler için seçilen parametrelerin ortalama değerleri karşılaştırılarak değerlendirildiğinde, bulunan sonuçlar radar diyagramı olarak Şekil 4.57'de verilmiştir. Duyusal analiz için oluşturulan form EK 1'de verilmiştir.

Duyusal analiz sonuçlarına göre elde edilen zeytinyağlarının duyuusal tanımlayıcıları katkı maddelerden ve miktarlarından farklı ölçülerde etkilendiği gösterilmiştir (Şekil 4.57). Farklı parametreler kullanılarak elde edilen zeytinyağlarının duyuusal özellikleri renk, koku, tat; tat özellikleri olarak yeşil yaprak, kesilmiş çimen, baharat, zeytin meyvesi, elma, badem, meyvemsi, yeşil zeytin, yeşil muz, kuru meyve, acılık, yakıcılık, bütün hoşluk, ağızda bıraktığı tat ve temel kusur parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu verilere ait değerler sırasıyla 6.00-8.33, 5.33-8.67, 5.67-7.67, 2.17-4.00, 2.33-4.00, 3.33-5.33, 1.67-6.00, 4.00-7.00, 2.50-4.33, 4.00-7.00, 1.67-6.00, 1.67-2.67, 3.67-5.67, 4.00-5.33, 4.00-6.00, 4.67-8.00, 4.67-7.33, 1.33-4.00 aralığında belirlenmiştir. Şekil 4.57'den görüldüğü gibi bütün hoşlukluk ve ağızda bıraktığı tat %1 OA + %1 L-sis ilaveli örnekte en yoğun, en düşük acılık ve yakıcılık özellikleri algılanmıştır. Fenolik bileşikler sızma zeytinyağının acı ve yakıcılık gibi duyuusal özelliklerinden sorumludur (Andrewes ve ark., 2003, Mateos ve ark., 2004, Inarejos-García ve ark., 2009, Restuccia ve ark., 2018). Çizelge 4.18'e de bakıldığında %1 OA + %1 L-sis ilaveli örnek, kontrol örneğine göre daha düşük toplam fenol içeriğine sahip olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla, çalışmada tespit edilen acılık ve yakıcılık özelliklerinin düşük duyuusal değerlendirilmesi ile uyumlu bir sonuç elde edilmiştir. Ayrıca, temel kusurlara düşük de olsa rastlanmıştır. PPO enzim aktivitesinin neden olduğu enzimatik bozunma, zeytinyağının fenol içeriğinin azalmasına neden olmaktadır. Böylece, enzimatik bozunmanın engellenmesi ile sızma zeytinyağının

duyusal kabul edilebilirliği ve besin değerindeki istenmeyen değişiklikler önlenebilmektedir (Migliorini ve ark., 2012).

Panelistlerin %2 OA ve %1 OA + %1 AA örnekler için yaptığı yorumlara bakıldığında; %2 OA (12. örnek) ilaveli örnekte yemek tadı, %1 OA + %1 AA (18. örnek) ilaveli örnekte kavrulmuş soğan tadı temel kusur olarak belirlenmiştir. Şekil 4.57'deki duyusal değerlendirme sonuçlarına bakıldığında ise %2 OA içeren örnekte baharat, acılık, yakıcılık ve temel kusur değerleri diğer örneklere göre yüksek bulunmuştur. Bundan dolayı, Çizelge 4.18'de verilen toplam fenolik madde değerleri ile uyumlu bulunduğu görölmüştür. Ayrıca, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği Ek-2'de natürel sızma zeytinyağlarında meyvemsiliğin 0'dan (sıfır) büyük olması gerektiği belirtilmiştir (TGK, 2017). Duyusal analize dahil edilen örnekler natürel sızma zeytinyağı kategorisine girmemekle beraber tüm örneklerin meyvemsilik değerleri 4.00-7.00 aralığında değişmektedir. Ekstrakte edilen zeytinyağlarının herhangi birisinde, analiz edilen duyusal parametrelerin hiçbirisi tarafından sıfır değerleri algılanmamıştır. Yorumlar incelendiğinde, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örneklerinde elma ve meyvemsi tadın birbirlerine çok yakın değerler aldığı görölmektedir. %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örnekleri incelendiğinde elma ve meyvemsi tadı AA ve MgCl<sub>2</sub> kullanımının neden olduğu söylenebilir. Duyusal değerlendirmeye tabi tutulan örneklerden %1 OA + %1 L-sis örneği en fazla zeytin meyvesi tadının var olduğu görölmüştür. Kontrole göre %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> örneğinde elma ve yeşil muz tadı; %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> örneklerinde elma ve kuru meyve tadı; %2 OA örneğinde badem tadı, %1 OA + %1 L-sis örneğinde yeşil zeytin ve kuru meyve tadı, %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> örneğinde yeşil muz ve kuru meyve tadı, %1 OA + %1 AA örneğinde ise kuru meyve tadı daha baskın olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.57.** Katkı maddelerin eklenmesi sonucu elde edilen zeytinyağlarının duysal analiz sonuçları  
 5: %1 OA + MgCl<sub>2</sub> %1, 6: %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, 11: %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub>, 12: %2 OA, 14: %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub>, 16: %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub>, 18: %1 OA + %1 AA, 20: %1 OA + %1 L-sis, K: Kontrol örneği (katkı maddesi ilavesiz)

#### 4.5. Yanıt Yüzey Metodu ile Belirlenen Optimum Proses Koşulları

Yanıt yüzey metodu kullanılarak katkı maddeleri ile elde edilen zeytinyağlarının katkı madde oranları optimize edilmiş ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.38’de verilmiştir. Çizelge incelendiğinde verim, oksidatif stabilite, yağların toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivite,  $\beta$ -glukozidaz aktivitesi ve toplam tokoferol miktarı maksimize edilip; serbest yağ asitliği, peroksit,  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerleri, POD ve PPO enzim aktivitesi değerleri ve 100 kg’daki maliyet değerleri ise minimize edilmiştir. Bu durumda katkı maddelerinin optimum kullanım oranları %0.089 OA + %0.060 L-sis + %1.098 AA + %0.753  $MgCl_2$  şeklindedir. Ayrıca, istenilen koşullar maksimize ve minimize edilip optimum katkı maddesi karışımları kullanıldığında maliyet 100 kg zeytin için 408.81 TL olurken, DPPH ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivite değerleri göz ardı edilerek, 100 kg zeytin için en düşük maliyet (219.56 TL) %1.334 OA + %0.00 L-sis + %0.547 AA + %0.120  $MgCl_2$  katkı maddesi karışımında belirlenmektedir. En yüksek verim optimum koşullarda %19.38 iken L-sis’in %1.652 oranında kullanıldığında bir miktar daha yüksek (%20.32) bulunmuştur, fakat bu durumda peroksit,  $K_{232}$  ve oksidatif stabilite değerleri, toplam fenolik madde, DPPH ve  $\beta$ -karoten ağartma yöntemi ile antioksidan aktivite ve POD ve PPO enzim aktivitesi değerleri göz ardı edilmektedir. Bu koşullar göz önüne alındığında verim açısından optimum koşulların kullanılması daha uygun olacaktır. Bunlara ilaveten, %1.652 L-sis kullanılan örnek ise maliyetin en fazla (3794.45 TL) olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.38. Zeytinyağları katkı maddelerinin optimum miktarları

Numune no	Optimizasyon	Verim (%)	Maliyet (TL/100kg)
1	%0.089 OA + %0.060 L-sis + %1.098 AA + %0.753 $MgCl_2$	19.38	408.81
2	%1.334 OA + %0.00 L-sis + %0.547 AA + %0.120 $MgCl_2$	18.66	219.56
3	%2 OA + %0.00 L-sis + %0.00 AA + %0.00 $MgCl_2$	19.45	142.89
4	%0.00 OA + %0.145 L-sis + %1.855 AA + %0.00 $MgCl_2$	17.89	734.45
5	%0.00 OA + %1.652 L-sis + %0.348 AA + %0.00 $MgCl_2$	20.32	3794.45

İnhibitörlerin kısaltmaları: Oksalik asit: OA, L-sistein: L-sis, Askorbik asit: AA şeklindedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

Tez çalışmasının, ilk aşamasında RSM ile kırma hızları ve malaksiyon sıcaklık değerlerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, elde edilen zeytinyağlarında serbest yağ asitliği, peroksit değeri ve toplam fenolik madde içeriği, zeytin hamurlarında ise PPO ve POD enzim aktivite değerleri kullanılarak RSM’de analiz edilmiştir. İkinci aşamada ise, birinci aşamada belirlenen optimum koşullarda (1000 rpm kırma hızı ve 26.6 °C malaksiyon sıcaklığı) zeytin hamuruna %2 oranında OA, AA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> maddeleri tek başına ve çeşitli kombinasyonlar halinde, toplamı %2 olacak şekilde uygulanmıştır. Böylece, çalışmada, PPO ve POD enzimlerinin aktivitesi OA, AA, L-sis ve MgCl<sub>2</sub> maddeleri ile inhibe edilerek fenolik bileşiklerin oksidasyonu minimize edilmiştir. Ayrıca, bu maddelerin zeytinyağının duyu özellikleri, antioksidan aktivite ve raf ömrü üzerine etkileri de incelenmiştir.

İnhibitör maddelerin ilave edilmesi ve geleneksel yöntem ile elde edilen zeytinyağı verimi karşılaştırıldığında önemli farklılıklar belirlenmiştir. %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> ilavesi verimi %44.8 artırırken, serbest yağ asitliği değerini ise %20 azaltmıştır. İnhibitör ilavesi ile verim %10.86-50.79 aralığında artış gösterirken serbest yağ asitliği %4.28-30 aralığında artış göstermiştir. İnhibitörler tek başına kullanıldığında ise %2 OA içeren örnekler hem verim hem de serbest asitlik değeri açısından en fazla artışa sebep olurken, %2 AA içeren örnekler daha az verim artışına sebep olmuştur.

İnhibitör ilavesiyle elde edilen zeytinyağlarının hepsinde klorofil ve karotenoid değerlerinde kontrole göre belirgin azalma olmuştur. İnhibitörler tek başlarına ilave edildiklerinde en yüksek klorofil miktarı %2 OA ilavesi (12.66-14.26 mg/kg) ile gerçekleşirken en düşük klorofil miktarı %2 MgCl<sub>2</sub> (9.78-10.13 mg/kg) ilavesi ile gerçekleşmektedir. İnhibitörler tek başına kullanıldıklarında ise karotenoid miktarları birbirlerine yakın bulunmuştur. %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> ilavesi ile toplam klorofil miktarı (7.71 mg/kg), %1 OA + %1 AA ilavesi ile de toplam karotenoid miktarı (3.96 mg/kg) en düşük değerdedir.

Örneklerin koyuluk açıklık (L\*) değerlerinde önemli bir farklılık görülmemiştir. Sadece %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilavesi ile bir miktar koyulaşma görülürken, %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilavesinde ise bir miktar açık renk tespit edilmiştir. b\* değerinde de %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> ilavesi önemli ölçüde artışa neden olup sarılık değeri daha belirgin görülmüştür. İnhibitör ilaveli örneklerin tamamında a\* değerinde

azalışlar görülmüştür. Sadece %2 MgCl<sub>2</sub> ve %2 AA katkılarının ilavesi ile b\* değerleri kontrole kıyasla azalmıştır.

İnhibitörler tek başına kullanıldıklarında (%2 MgCl<sub>2</sub> hariç) kontrol örneğine göre peroksit değeri ve K<sub>232</sub> değerlerini azaltmıştır. %2 MgCl<sub>2</sub> hariç diğer tek başına uygulanan katkı maddeleri ise (%2 L-sis, %2 AA ve %2 OA) kontrol örneğine göre oksidatif stabilite değerlerini artırmıştır. Rancimat ile belirlenen indüksiyon süresini (sa) kontrol örneğine göre %2 L-sis yaklaşık 1.5 kat artırırken %2 OA yaklaşık 4 kat artırmıştır. K<sub>270</sub> değerini %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 OA + %1 MgCl<sub>2</sub> katkıları dışında diğer katkılar çok fazla etkilememiştir. %0.25 OA + %1.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> katkı ilavesi ile K<sub>232</sub> değeri azalıp, oksidatif stabilite ve peroksit değeri artmıştır. İnhibitörlerin ilave edilmesiyle örneklerin çoğunda peroksit, K<sub>232</sub> ve K<sub>270</sub> değerleri azaltılıp oksidatif stabilite değerleri artırılarak pozitif bir etki sağlanmıştır.

Toplam fenolik madde ve DPPH radikal giderme aktivitesi katkı ilaveli bütün zeytinyağlarında artış göstermiştir. %2 MgCl<sub>2</sub> ilavesi ise toplam fenolik madde ve DPPH inhibisyon değeri açısından diğer katkı ilaveli zeytinyağı örneklerine göre geride kalmıştır. DPPH değeri için en fazla artış %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> ilavesi ile olmuştur (%90.19). İnhibitörlerin tek başlarına kullanımları ile kontrole göre toplam fenolik madde ve DPPH değerlerinde artış görülürken, %2 L-sis ve %2 OA uygulamaları β-karoten ağartma yöntemiyle belirlenen antioksidan miktarlarında azalmaya neden olmuştur. β-karoten ağartma değerleri %2 AA ilavesi ile en yüksek değerine ulaşmıştır (%13.59-13.69).

İnhibitör ilaveli zeytin hamuru örneklerinin (%2 MgCl<sub>2</sub> ve %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> katkıları hariç) nem değeri kontrol örneğine göre azalmıştır. %2 AA katkı maddesi ilavesiyle elde edilen zeytin hamurlarının toplam fenolik madde içeriği kontrole göre yaklaşık 2.6 kat artarken DPPH değerleri ise yaklaşık 2 kat artışa neden olmuştur. Ayrıca, katkı maddeler ilave edilerek elde edilen tüm zeytin hamurlarında kontrole göre toplam fenolik madde ve DPPH değerlerinde artış görülürken, β-karoten ağartma yöntemiyle belirlenen antioksidan değerlerinde kontrole göre düşüş görülmüştür. Antioksidan kapasite değerlerindeki farklılıklar her bir antioksidan maddenin çeşitli radikallere karşı farklı reaksiyon mekanizmasına sahip olmasına dayandırılabilir. β-karoten ağartma değerleri ise kontrol dışında %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> ilavesi ile elde edilen zeytinyağlarında daha yüksektir.

İnhibitör ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarında belirlenen 3,4-DHPEA, p-HPEA ve apigenin miktarlarında kontrole göre belirgin artış gözlenmiştir. %2 MgCl<sub>2</sub> ilavesi neticesinde yağda kafeik asit, homovanillik asit ve oleokantal miktarları kontrole göre daha fazla bulunmuştur. %1 L-sis + %1 AA ile vanillin, 3,4-DHPEA-EDA ve luteolinde en fazla düşüş tespit edilmiştir. Zeytin hamurlarındaki flavonoidlerden apigenin ve luteolin miktarlarındaki maksimum azalma %1 OA + %1 L-sis katkı ilavesiyle, maksimum artış ise %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> katkı ilavesiyle bulunmuştur. İnhibitör ilaveli örneklerin tamamında 3,4-DHPEA, p-HPEA, vanillin ve verbaskozit miktarları kontrol örneğine göre daha yüksektir.

%2 MgCl<sub>2</sub> katkısı zeytin hamurlarındaki POD ve PPO enzim aktivitesini maksimum seviyeye yükseltmiştir, β-glukozidaz enzim aktivitesini ise minimum seviyeye düşürmüştür. Katkı ilaveli örneklerin hepsinde, kontrole kıyasla β-glukozidaz enzim aktivitesinde artış görülmüştür. POD ve PPO enzim aktiviteleri ise azalmıştır. Katkı maddeleri ilavesi ile POD enzim aktivitesinde farklı oranlarda azalmalar görülürken, PPO aktivitesi neredeyse yarıya düşmüştür.

Bütün örneklerin toplam tokoferol, α, β, γ ve δ tokoferol içerikleri kontrol örneğine göre yüksek olarak belirlenmiştir. %1 L-sis + %1 MgCl<sub>2</sub> katkısıyla elde edilen zeytinyağında en yüksek toplam tokoferol, α ve β tokoferol miktarları bulunmuştur. γ-tokoferol içeriği %1.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub> ilave edilen örnekte yüksek seviyede, %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5 MgCl<sub>2</sub> ilave edilen örnekte ise δ-tokoferol içeriği yüksek seviyededir.

%1 OA + %1 L-sis ilave edilerek elde edilen zeytinyağının koku, bütün hoşluk ve ağızda bıraktığı tat parametreleri en yüksek beğeniyi almıştır. Duyusal analizde kullanılan katkı maddesi ilaveli yağların hepsinde baharat, temel kusur ve yeşil muz parametreleri birbirine yakın değerlerde olup daha düşük puanlama yapılmıştır. %0.25 OA + %0.25 L-sis + %1.25 AA + %0.25 MgCl<sub>2</sub>, %0.25 OA + %0.25 L-sis + %0.25 AA + %1.25 MgCl<sub>2</sub> ve %1 AA + %1 MgCl<sub>2</sub> katkıları ilave edilerek elde edilen zeytinyağlarında elma tadı en baskın tat olarak belirlenmiştir.

## 5.2. Öneriler

Zeytinyağının toplam fenolik madde miktarında katkı madde kullanımı ile oluşan değişiklikler büyük ölçüde katkı maddelerinin oksidatif enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkisine dayanmaktadır. Kırma aşamasında meyve dokusunun bozulması ve ardından zeytin hamurunun yoğrulması sırasında POD ve PPO enzim aktivitesinin oynadığı spesifik roller hakkında daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Bu biyokimyasal

süreçlerin daha iyi anlaşılması sızma zeytinyağı kalitesini iyileştirmek için yeni biyoteknolojik yaklaşımların tasarlanmasında yardımcı olacaktır. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, zeytin POD ve PPO enzim aktivitelerinin sızma zeytinyağının fenolik profilini nasıl şekillendirdiğini değerlendirmek ve sızma zeytinyağının endüstriyel ekstraksiyonu sırasında POD ve PPO enzim aktivitelerini incelemektir. Ayrıca, katkı olarak kullanılan maddelerin beraber kullanımlarının yanı sıra farklı oranlarda kullanımının da sinerjik etkileri araştırılmıştır.

Antioksidan aktivitede ve toplam fenolik madde içeriğinde en yüksek artış %2 OA ve %2 L-sis kullanıldığında görülmüştür. Ayrıca, %2 OA kullanıldığında da oksidasyon analiz sonuçları açısından olumlu sonuçlar (peroksit,  $K_{232}$  ve  $K_{270}$  değerlerinde azalma, oksidatif stabilite değerinde artış) tespit edilmiştir. Bu sebeple, %2 OA katkısı PPO ve POD enzimlerinin inhibisyonu açısından önerilebilir. %2  $MgCl_2$  kullanımı toplam fenolik madde ve DPPH radikal giderme aktivitesi kontrol zeytinyağına göre önemli etki göstermemiştir. Bunun yanı sıra, oksidasyon analizleri açısından, kontrol zeytinyağına göre peroksit ve  $K_{232}$  değerlerini artırırken, oksidatif stabilite değerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu sebeple, %2  $MgCl_2$  kullanımı zeytinyağı ekstraksiyonunda enzimler üzerinde düşük inhibisyon etkisi ve zeytinyağı kalite özelliklerinde olumlu sonuç vermediğinden dolayı kullanımı önerilmemektedir.

PPO ve POD enzimleri ile polifenoller, bitki hücrelerinin farklı organellerinde bulunmaktadır. Bitki hücresi hasar gördüğünde enzimler ve fenolik maddeler birbirleriyle buluşarak reaksiyona girer. Dolayısıyla, antioksidan kapasite ve toplam fenolik içerik azalır. Çalışmada kullanılan katkı maddelerinin antioksidan aktivite ve toplam fenolik madde kaybını önlemek için kullanılabilceği gösterilmiştir. OA, L-sis, AA ve  $MgCl_2$ ; PPO ve POD enzim aktivitelerini engellerken aynı zamanda zeytinyağının toplam fenolik madde ve antioksidan aktivitesini arttırmıştır. Özellikle %0.5 OA + %0.5 L-sis + %0.5 AA + %0.5  $MgCl_2$  katkı madde karışımı, zeytinyağı veriminde artış sağlaması, serbest yağ asitliği ve peroksit sayısının artışının engellemesi ve oksidoredüktazlardan olan PPO ve POD enzimleri üzerinde inhibe edici etkisi nedeniyle endüstriyel boyutta değerlendirilebilecek bir karışım olabilir.

Enzim aktivitelerinin inhibe edilmesi ile fenolik bileşikleri dolayısıyla zeytinyağının antioksidan özelliklerini korurken kaliteli bir zeytinyağını elde etmek mümkün olmuştur. Gelecek çalışmalarda katkı maddelerin kombinasyonları çeşitlendirilerek zeytinyağı ekstraksiyonunda kullanılması faydalı sonuçlar verebilecektir. Ek olarak, PPO ve POD enzimlerinin inhibisyonu açısından olumlu

sonuç verdiği bilinen %2 OA ve %2 L-sis maddelerinin farklı oranlarda kullanımı ve ayrıca bu maddelerin farklı oranlarda kombinasyonları üzerine araştırmalar yapılması gelecekte çalışma konusu olarak değerlendirilmelidir.



## 6. KAYNAKLAR

- Abdelmaksoud, T. G., Mohsen, S. M., Duedahl-Olesen, L., Elnikeety, M. M. and Feyissa, A. H., 2018, Optimization of ohmic heating parameters for polyphenoloxidase inactivation in not-from-concentrate elstar apple juice using RSM, *Journal of Food Science and Technology*, 55, 2420–2428.
- Altunkaya, A. and Gokmen, V., 2008, Effect of various inhibitors on enzymatic browning, antioxidant activity and total phenol content of fresh lettuce (*Lactuca sativa*), *Food Chemistry*, 107, 1173-1179.
- Amiot, M.J., Fleuriot, A. and Macheix, J.J., 1996, Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 823-826.
- Amirante, P., Clodoveo, M.L., Tamborrino, A., Leone, A. and Paice, A., 2010a, Influence of the Crushing System: Phenol Content in Virgin Olive Oil Produced from Whole and De-Stoned Pastes. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*; Preedy, V. R., Watson, R. R., Eds.; Academic Press: London, pp 69–76.
- Amirante, P., Arena, G., Clodoveo, M. L., Dugo, G., Leone, A., Lo Turco, V., Pollicino, D. and Tamborrino, A., 2007, Virgin olive oil production from de-stoned pastes: A new technology to improve the shelf life of the product, *Italian Journal of Food Science* 19:116–120
- Amirante, P., Di Renzo, G.C., Di Giovacchino, L., Bianchi, B. and Catalano, P., 1993, *Olivæ*, 48,43–53.
- Amodio, M.L., Cabezas-Serrano, A.B., Peri, G. and Colelli, G., 2011, Post-cutting quality changes of fresh-cut artichokes treated with different anti-browning agents as evaluated by image analysis, *Postharvest Biology and Technology*, 62, 213-220.
- Andjelkovic, M., Van Camp, J., Pedra, M., Renders, K., Socaciu, C. and Verhe, R., 2008, Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:5181–5187.
- Andrewes, P., Busch, J.L.H.C., de Joode, T., Groenewegen, A. and Alexandre, H., 2003, Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxyligstroside glycon as a key contributor to pungency, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1415-1420.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C. and Vito, R., 2001, Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils, *Food Chemistry*, 72, 19–28.
- Anonymous, 1989, Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, fourth edition, Methods: Ca5a-40, Cd8-53, Ch5-91.

- Anwar, F., Zreen, Z., Sultana, B. and Jamil, A., 2013, Enzyme-aided cold pressing of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.): Enhancement in yield, quality and phenolics of the oil, *Grasas y Aceites*, 64 (5), 463-471.
- Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L., Oliver-Pozo, C.2, Tena, N., Morales, M.T. and Aparicio, R., 2016, Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118, 299-307.
- Arogba, S.S., Ajiboye, O.L., Ugboko, L.A., Essienette, S.Y. and Afolabi, P.O., 1998, Properties of polyphenol oxidase in mango (*Mangifera indica*) kernel, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (4), 459-462.
- Arslan, F.N. and Janssen, H.G., 2018, Chemometrics-Assisted Optimization of Beta-/Gamma-Tocol Separation on a C30 Stationary Phase in Reversed-Phase LC, *Chromatographia*, 81, 1453–1465.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Saurez, M. and Motilva, M.J., 2007, Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process, *European Food Research and Technology*, 225, 617– 625.
- Aydemir, T. and Akkanlı, G., 2006, Purification and Characterization of polyphenol oxidase from celery root (*Apium graveolens*) and the investigation on enzyme activity of some inhibitors, *International Journal of Food Science and Technology*, 41(9), 1090–1098.
- Aydemir, T., 2004. Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from artichoke (*Cynara sclymus* L.), *Heads Food Chemistry*, 87(1), 59–67.
- Beauchamp, G.K., Keast, R.S.J., Morel, D., Lin, J. et al., 2005, Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil, *Nature*, 437, 45– 46.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Lercker, G., 2007, Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods: an overview of the last decade, *Molecules*, 12 (8), 1679–1719.
- Ben Taârit, M., Msaada, K., Hosni, K. and Marzouk, B., 2012, Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves grown under saline conditions, *Industrial Crops and Products*, 38, 58–63.
- Berenguer, M.J., Vossen, P. M., Grattan, S.R., Connell, J.H. and Polito, V.S., 2006, Tree irrigation levels for optimum chemical and sensory properties of olive oil, *Hort Science*, 41, 427–432.
- Bialecka-Florjanczyk, E., Fabiszewska, A.U., Krzyczkowska, J. and Kuryłowicz, A., 2018, Synthetic and Natural Lipase Inhibitors, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(8), 672-683.

- Bico, S.L.S., Raposo, M.F.J., Morais, R.M.S.C. and Morais, A.M.M.B., 2009, Combined effects of chemical dip and/or carrageenan coating and/or controlled atmosphere on quality of fresh-cut banana, *Food Control*, 20, 508-514.
- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T.G. and Lercker, G., 2003, Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection, *Journal of Chromatography A*, 1011, 163-172.
- Boskou, D., 2000, Olive oil. In: Mediterranean diets. Simopoulos, A. and Visioli, F., Eds., Karger Press, Basel. 56–77.
- Boskou, D., 1996, Olive oil chemistry and technology. history and characteristics of the olive tree. AOCS Press, Champaign, Illinois: 1 - 6.
- Boselli, E., Di Lecce, G., Strabbioli, R., Pieralisi, G. and Frega, N.G., 2009, Are virgin olive oils obtained below 27°C better than those produced at higher temperatures? *LWT - Food Science and Technology*, 42, 748–757.
- Brenes-Balbuena, M., García-García, P. and Garrido-Fernandez, A., 1992, Phenolic compounds related to the black color formed during the processing of ripe olives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1192–1196.
- Briante, R., Febbraio, F. and Nucci, R., 2003, Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the Mediterranean diet, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 6975-6981.
- Bubola, K.B., Koprivnjak, O., Sladonja, B. and Luki, I., 2012, Volatile compounds and sensory profiles of monovarietal virgin olive oil from Buza, Crna and Rosinjola Cultivars in Istria (Croatia), *Food Technology and Biotechnology*, 50(2) 192–198.
- Cabezas-Serrano, A.B., Amodio, M.L. and Colelli, G., 2013, Effect of solution pH of cysteine-based treatments to prevent browning of fresh-cut artichokes, *Postharvest Biology and Technology*, 75, 17-23.
- Caponio, F., Durante, V., Varva, G., Silletti, R., Previtali, M.A., Viggiani, I., Squeo, G., Summo, C., Pasqualone, A., Gomes, T. and Baiano, A., 2016, Effect of infusion of spices into the oil vs. combined malaxation of olive paste and spices on quality of naturally flavoured virgin olive oils, *Food Chemistry*, 202, 211-228.
- Caponio, F., Gomes, T., Summo, C. and Pasqualone, A., 2003, Influence of the Type of Olive-Crusher Used on the Quality of Extra Virgin Olive Oils, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105 (5), 201–206.
- Caponio, F. and Catalano, P., 2001, Hammer crushers vs disk crushers: the influence of working temperature on the quality and preservation of virgin olive oil, *European Food Research and Technology*, 213, 219–224.

- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P. and Ferreira, I. C., 2014, Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 377–399.
- Casamenti, F., Grossi, C., Rigacci, S., Pantano, D., Luccarini, I. and Stefani, M., 2015, Oleuropein aglycone: A possible drug against degenerative conditions. In vivo evidence of its effectiveness against Alzheimer's disease, *JAD, Journal of Alzheimer's Disease*, 45(3), 679-688.
- Cecchi, L., Breschi, C., Migliorini, M., Canuti, V., Fia, G., Mulinacci, N. and Zanoni, B., 2019, Moisture in rehydrated olive paste affects oil extraction yield and phenolic compound content and profile of extracted olive oil, *European Journal of Lipid Science Technology*, 121, 1800449.
- Charoenprasert, S., and Mitchel, A., 2012, Factors influencing phenolic compounds in table olives (*Olea europaea*), *Agriculture Food Chemistry*, 60, 7081–7095.
- Chazarra, S., García-Carmona, F. and Cabanes, J., 2001, Hysteresis and positive cooperativity of iceberg lettuce polyphenol oxidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 (3), 769–775.
- Chen, H., Angiuli, M., Ferrari, C., Tombari, E., Salvetti, G. and Bramanti, E., 2011, Tocopherol speciation as first screening for the assessment of extra virgin olive oil quality by reversed-phase high-performance liquid chromatography/fluorescence detector, *Food Chemistry*, 125, 1423-1429.
- Cheng, X.F., Zhang, M. and Adhikari, B., 2013, The inactivation kinetics of polyphenol oxidase in mushroom (*Agaricus bisporus*) during thermal and thermosonic treatments, *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 674–679.
- Chiacchierini, E., Mele, G., Restuccia, D. and Vinci, G., 2007, Impact evaluation of innovative and sustainable extraction technologies on olive oil quality, *Trends in Food Science and Technology*, 18, 299e305.
- Choe, E. and Min, D.B., 2009, Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8, 345–358.
- Choe, E. and Min, D.B., 2007, Chemistry of deep-fat frying oils, *Journal of Food Science*, 72, 5, R77-R86.
- Choe, E. and Min, D.B., 2006, Mechanisms and factors for edible oil oxidation, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-86.
- Chow, Y. N., Louarme, L., Bonazzi, C., Nicolas, J. and Billaud, C., 2011, Apple polyphenol oxidase inactivation during heating in the presence of ascorbic acid and chlorogenic acid, *Food Chemistry*, 129, 761–767.
- Cimato, A., Mattei, A. and Osti, M., 1990, Variation of polyphenol composition with harvesting period, *Acta Horticulturae*, 286, 453-456.
- Clodoveo, M.L., Camposeo, S., Amirante, R., Dugo, G., Cicero, V. and Boskou, D., 2015, Research and innovative approaches to obtain virgin olive oils with a

- higher level of bioactive constituents, *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*, 179-215.
- Clodoveo, M.L., Hbaieb, R.H., Kotti, F., Mugnozza, G.S. and Gargouri, M., 2014, Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 135–154.
- Clodoveo, M.L., Dipalmo, T., Schiano, C., La Notte, D., 2014c. What's Now, What's New and What's Next in Virgin Olive Oil Elaboration Systems? A Perspective on Current Knowledge and Future Trends, *Journal of Agricultural Engineering*, 45(2), 49–59.
- Clodoveo, M.L., 2012, Malaxation: Influence of virgin olive oil quality. Past, present and future. An overview, *Trends in Food Science and Technology*, 25, 13–23.
- Colantuono, F., Amodio, M.L., Colelli, G. and Castillo Garcia, S., 2015, Application of antioxidant compounds to preserve fresh-cut peaches quality, *Acta Horticulturae*, 1084, 633-642.
- Çesko, C., Gashi, S., Arabaci, G., Palūzar, H., Durmishi, B., Bruçi, E., Vllasaliu, F., and Özdemir, N., 2023, Investigation of the effects of pesticides on 'Jonagold' apple (*Malus x domestica*) polyphenol oxidase enzyme activity, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 47, 57-66.
- De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. and Alvarez-Parrilla, E., 2019, Phenolic compounds, *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 253–271.
- Degl'Innocenti, E., Guidi, L., Pardossi, A. and Tognoni, F., 2005, Biochemical study of leaf browning in minimally processed leaves of lettuce (*Lactuca sativa* L. var. Acephala), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53,9980–9984.
- Di Giovacchino, L., 1991, L'estrazione dell'olio con lacentrifugazione diretta delle paste di olive. Nota I: influenza della gramolazione, *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 68 (8), 413-420.
- Di Maio, I., Esposto, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Veneziani, G., Urbani, S., et al. 2013, Characterization of 3,4-DHPEA-EDA oxidation products in virgin olive oil by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *Food Chemistry*, 138, 1381-1391.
- Di Maio, I., Esposto, S., Taticchi, A., Selvaggini, R., Veneziani, G., Urbani, S., et al. 2011, HPLC-ESI-MS investigation of tyrosol and hydroxytyrosol oxidation products in virgin olive oil, *Food Chemistry*, 125, 21-28.
- Di Vaio, C., Nocerino, S., Paduano, A. and Sacchi, R., 2013, Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93,1134–1139.
- Dias, L.M., Rodrigues, N., Veloso, A.C.A., Pereira, J.A. and Peres, A.M., 2016, Monovarietal extra-virgin olive oil classification: A fusion of human sensory

- attributes and an electronic tongue, *European Food Research and Technology*, 242:259–270.
- Difonzo, G., Russo, A., Trani, A., Paradiso, V.M., Ranieri, M., Pasqualone, A., Summo, C., Tamma, G., Silletti, R. and Caponio, F, 2017, Green extracts from Coratina olive cultivar leaves: antioxidant characterization and biological activity, *Journal of Functional Foods*, 31, 63-70.
- Diken, M.E, 2020, Inhibitory effect of garlic extracts on polyphenoloxidase, *BAUN Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(1), 240-247.
- Ding, C.K., Chachin, K., Ueda, Y. and Wang, C.Y., 2002, Inhibition of loquat enzymatic browning by sulfhydryl compounds, *Food Chemistry*, 76, 213-218.
- Dogan, S. and Salman, Ü., 2004, Partial characterization of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) polyphenol oxidase, *European Food Research and Technology*, 226, 93-103, (2007).
- Dorantes-Alvarez, L., Parada-Dorantes, L., Ortiz-Moreno, A., Santiago Pineda, A., Chiral-Boix, S. and Barbosa Canovas, G., 1998, Effect of anti-browning compounds on the quality of minimally processed avocados, *Food Science and Technology International*, 4, 107-113.
- Dugo, G., Rotondo, A., Mallamcace, D., Cicero, N., Salvo, A., Rotondo, E. and Corsaro, C., 2015, Enhanced Detection of Aldehydes in Extra-Virgin Olive Oil by Means of Band Selective NMR Spectroscopy, *Physica A*, 420, 258–264.
- Duman, A.K., Özgen, G.Ö. and Üçtuğ, F.G., 2020, Environmental life cycle assessment of olive pomace utilization in Turkey, *Sustainable Production and Consumption*, 22, 126-137.
- Ebrahimzadeh, H., Motamed, N., Rastgar-Jazii, F., Montasser-Kouhsari, S. and Shokraii, E. H., 2003, Oxidative enzyme activities and soluble protein content in leaves and fruits of olives during ripening, *Journal of Food Biochemistry*, 27, 181–196.
- Edem, D.O, 2002, Palm oil: Biochemical, physiological, nutritional, hematological and toxicological aspects: A review, *Plant Foods for Human Nutrition*, 57:(3-4), 319-341.
- Eidhin, D.M., Murphy, E. and O’beirne, D., 2005, Polyphenoloxidase from apple (*malus domestica* Borkh. Cv Bramley’s Seedling): purification strategies and characterization, *Journal of Food Science*, 7(1), 51–58.
- Ertürk, H., (2004), *Cynara scolymus* L. bitkisinden elde edilen polifenol oksidaz enziminin kinetik özelliklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).
- Fernandes-Silva, A.A., Falco, V., Correia, C.M. and Villalobos, F.J., 2013, Sensory analysis and volatile compounds of olive oil (cv. *Cobrançosa*) from different irrigation regimes, *Grasas y aceites*, 64(1), 59-67.

- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A. and Heredia, A., 1995, Activity of cell wall-associated enzymes in ripening olive fruit, *Physiologia Plantarum*, 93(4), 651-658.
- Friedman, M., 1996, Food browning and its prevention: An overview, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 631-653.
- Fregapane, G. and Salvador, M.D., 2013, Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components (Special Issue: Olive oil: quality, composition and health benefits), *Food Research International*, 54(2), 1907-1914.
- Fu, J.Y., Che, H.L., Tan, D.M.Y., Teng, K.T., 2014, Bioavailability of tocotrienols: evidence in human studies, *Nutrition and Metabolism*, 11, 5.
- Galanakis, C.M., Aldawoud, T.M.S., Rizou, M., Rowan, N.J. and Ibrahim, S.A., 2020, Food ingredients and active compounds against the coronavirus disease (COVID-19) pandemic: A comprehensive review, *Foods*, 9(11):1701.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2015, Modulating oxidoreductase activity modifies the phenolic content of virgin olive oil, *Food Chemistry*, 171, 364–369.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A. and Pérez, A.G., 2011, Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil, *Food Research International*, 44, 629–635.
- García-Vico, L., García-Rodríguez, R., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2017, Biochemical aspects of olive freezing-damage: Impact on the phenolic and volatile profiles of virgin olive oil, *Food Science and Technology*, 86, 240-246.
- Gargouri, B., Zribi, A. and Bouaziz, M., 2015, Effect of containers on the quality of Chemlali olive oil during storage, *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 1948–1959.
- Ghidelli, C., Mateos, M., Rojas-Argude, C. and Perez-Gago, M.B. 2014, Extending the shelf life of fresh-cut eggplant with a soy protein-cysteine based edible coating and modified atmosphere packaging, *Postharvest Biology and Technology*, 95, 81-87.
- Goğuş, F., Ozkaya, M. ve Otleş, S., 2009, Zeytinyağı, *Ankara*, Eflatun Yayınevi, 1-269.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G. and Salvador, M.D., 2008, Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils, *International Food Research Journal*. 41, 433–440.
- Gorjanović, S.Ž., Rabrenović, B.B., Novaković, M.M., Dimić, E.B., Basić, Z.N. and Sužnjević, D.Ž., 2011, Cold-pressed pumpkin seed oil antioxidant activity as determined by a DC polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge, *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (12), 1875–1882.

- Gorny, J.R., Hess-Pierce, B., Cifuentes, R.A. and Kader, A.A., 2002, Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives, *Postharvest Biology and Technology*, 24, 271-278.
- Guerrero-Beltrán, J. A., Swanson, B. G. and Barbosa-Cánovas, G. V., 2005, Inhibition of polyphenol in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid, *LWT- Food Science and Technology*, 38, 625–630.
- Guerrini, L., Migliorini, M., Giusti, M. and Parenti, A., 2017, The influence of crusher speed on virgin olive oil characteristics, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1), 1600156.
- Gutierrez-Rosales, G., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J. and Minguéz-Mosquera, M.I., 2010, Metabolites involved in Oleouropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8, 12924–12933.
- Haddada, F.M., Krichene, D., Manai, H., Oueslati, I., Daoud, D. and Zarrouk, M., 2008, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(10), 905-913.
- Hbaieb, R.H., Kotti, F., Valli, E., Bendini, A., Toschi, T.G. and Gargouri, M., 2017, Effect of Tunisian olive ripeness on endogenous enzymes and virgin olive oil phenolic composition, *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 43-50.
- Hbaieb, R.H., Kotti, F., García-Rodríguez, R., Gargouri, M., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2015, Monitoring endogenous enzymes during olive fruit ripening and storage: Correlation with virgin olive oil phenolic profiles, *Food Chemistry*, 174, 240–247.
- Hocaoglu, S.M., Haksevenler, B.H.G., Basturk, I., Talazan, P. and Aydoner, C., 2018, Assessment of technology modification for olive oil sector through mass balance: A case study for Turkey, *Journal of Cleaner Production*, 188, 786-795.
- Inarejos-García, A.M., Fregapane, G. and Desamparados, S.M., 2011, Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components, *European Food Research and Technology*, 232, 441–451.
- Inarejos-García, A.M., Androulaki, A., Salvador, M.D., Fregapane, G. and Tsimidou, M., 2009, Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness, *Food Research International*, 42, 279-284.
- International Olive Council, 2019. World olive oil and table olive figures. [Online] Available at: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/#figures> (Accessed 20.6.2019).
- Jolayemi, O.S., Tokatli, F. and Ozen, B., 2016, Effects of malaxation temperature and harvest time on the chemical characteristics of olive oils, *Food Chemistry*, 211, 776–783.
- Kalua, C.M., Bedgood, D.R., Bishop, A.G. and Prenzler, P.D., 2006, Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during

- virgin olive oil production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7641–7651.
- Kayashima, T. and Katayama, T., 2002, Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1573 (1), 1-3.
- Kim, H.J., 2014, Effect of  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocotrienol on the oxidative stability of lard, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91(5),777-782.
- Klimczak, I. and Gliszczyńska-Świgło, A., 2017, Green tea extract as an anti-browning agent for cloudy apple juice, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 1420–1426.
- Knecht, K., Sandfuchs, K., Kulling, S.E. and Bunzel, D., 2015, Tocopherol and tocotrienol analysis in raw and cooked vegetables: A validated method with emphasis on sample preparation, *Food Chemistry*, 169, 20–27.
- Kuijpers, T.F., Gruppen, H., Sforza, S., van Berkel, W.J. and Vincken, J.P., 2013, The antibrowning agent sulfite inactivates *Agaricus bisporus* tyrosinase through covalent modification of the copper-B site, *The FEBS Journal*, 280, 6184–6195.
- Kuijpers, T.F., Narváez-Cuenca, C.E., Vincken, J.P., Verloop, A.J., van Berkel, W.J. and Gruppen, H., 2012, Inhibition of enzymatic browning of chlorogenic acid by sulfur-containing compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 3507–3514.
- Kulisić, T., Radonić, A., Katalinić, V. and Miloš, M., 2004, Use of different methods for testing antioxidant activity of oregano essential oil, *Food Chemistry*, 85, 633–640.
- Laane, C., Bruggeman, Y. and Winkel, C., 2003, Applications of oxireductases in foods. In: *Hand book of Food Enzymology*. Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J. and Wong, D.W.S., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Landi, M., Degl'Innocenti, E., Guglielminetti, L. and Guidi, L., 2013, Role of ascorbic acid in the inhibition of polyphenol oxidase and the prevention of browning in different browning-sensitive *Lactuca sativa* var. capitata (L.) and *Eruca sativa* (Mill.) stored as fresh-cut produce, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1814–1819.
- Lante, A., Tinello, F. and Nicoletto, M., 2016, UV-A light treatment for controlling enzymatic browning of fresh-cut fruits, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 34, 141–147.
- Lante, A. and Zocca, F., 2010, Effect of  $\beta$ -cyclodextrin addition on quality of precooked vacuum packed potatoes, *LWT- Food Science and Technology*, 43, 409–414.
- Leri, M., Nosi, D., Natalello, A., Porcari, R., Ramazzotti, M., Chiti, F., et al., 2016, The polyphenol Oleuropein aglycone hinders the growth of toxic transthyretin amyloid assemblies, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 30, 153-166.

- Li, S., Le, S., Wang, X., Bai, J., Wang, R. and Zhao, Y., 2020, Functional analysis of organic acids on different oilseed rape species in phytoremediation of Cadmium pollution, *Plants*, 9(7), 884.
- Li, X., Pei, J., Wu, G. and Shao, W., 2005, Expression, purification and characterization of a recombinant beta-glucosidase from *Volvariella volvacea*, *Biotechnology Letters*, 27, 1369-1373.
- Liu, W., Zou, L. Q., Liu, J. P., Zhang, Z. Q., Liu, C. M. and Liang, R. H., 2013, The effect of citric acid on the activity, thermodynamics and conformation of mushroom polyphenoloxidase, *Food Chemistry*, 140, 289–295.
- Loizzo, M. R., Tundis, R. and Menichini, F., 2012, Natural and synthetic tyrosinase inhibitors as antibrowning agents: An update, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11, 378–398.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A., 2010, Composición del aceite de oliva. In F. Fernández-Gutiérrez and A. Segura-Carretero (Eds.), *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía (195–224)*. Málaga: Fundación Unicaja.
- Lu, Y., Khoo, T.J. and Wiart, C., 2014, Antioxidant Activity Determination of Citronellal and Crude Extracts of *Cymbopogon citratus* by 3 Different Methods, *Pharmacology and Pharmacy*, 5, 395-400.
- Luaces, P., Romero, C., Gutiérrez, F., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2007, Contribution of olive seed to the phenolic profile and related quality parameters of virgin olive oil, *Journal of Science of the Food and Agriculture*, 87, 2721–2727.
- Makroo, H. A., Saxena, J., Rastogi, N. K. and Srivastava, B., 2017, Ohmic heating assisted polyphenol oxidase inactivation of watermelon juice: Effects of the treatment on pH, lycopene, total phenolic content, and color of the juice, *Journal of Food Processing and Preservation*, 41,1 –9.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M.C. and García, J.M., 2004, Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81, 71275.
- Marangoni, A.G., Palma, T. and Stanley, D.W., 1996, Membrane effects in postharvest physiology, *Postharvest Biology and Technology*, 7,193–217.
- Marmesat, S., Morales, A., Velasco, J., Ruiz-Mendez, M.V. and Dobarganes, M.C., 2009, Relationship between changes in peroxide value and conjugated dienes during oxidation of sunflower oils with different degree of unsaturation. *Grasas y Aceites*, 60 (2), 155–160.
- Martins, L.L., Reis, R., Moreira, I., Pinto, F., Sales, J. and Mourato, M., 2013, Antioxidative response of plants to oxidative stress induced by cadmium. In: *Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects*. Fujita, M.H.M.,Ed., Nova Science Publishers, Inc.

- Marx, I.M.G., Rodrigues, N., Veloso, A.C.A., Casal, S., Pereira, J.A. and Peres, A.M., 2021, Effect of malaxation temperature on the physicochemical and sensory quality of cv. Cobrançosa olive oil and its evaluation using an electronic tongue, *LWT - Food Science and Technology*, 137,110426.
- Mayer, A. M., 1986, Polyphenol oxidases in plants-recent progress, *Phytochemistry*, 26:11–20.
- Mba, O.I., Dumont, M.J. and Ngadi, M., 2015, Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry—A review, *Food Bioscience*, 10: 26-41.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M. and Robards, K., 2001, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chemistry*, 73 (1), 73-84.
- Migliorini, M., Cecchi, L., Cherubini, C., Trapani, S., Cini, E. and Zanoni, B., 2012, Understanding degradation of phenolic compounds during olive oil processing by inhibitor addition, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114 (8), 942–950.
- Minguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sanchez Gomez, A.H. and Garrido-Fernandez, J., 1991, Color-pigment correlation in virgin olive oil, *Journal of The American Oil Chemists' Society*, 68 (5),332-336.
- Misra, N. N., Koubaa, M., Roohinejad, S., Juliano, P., Alpas, H., Inácio, R. S., ... Barba, F. J., 2017, Landmarks in the historical development of twenty first century food processing Technologies, *Food Research International*, 97, 318–339.
- Morello, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J. and Romero, M.P., 2004, Changes in commercial virgin olive oil (cv. *Arbequina*) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction, *Food Chemistry*, 85, 357-364.
- Mourato, M., Reis, R. and Martins, L.L., 2012, Characterization of plant antioxidative system in response to abiotic stresses: A focus on heavy metal toxicity. *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, p. 388. Dichio, G. M. a. B., Ed., InTech.
- Mugelli, M., Migliorini, M., Viti, P., Cherubini, C. et al., 2005, *Olio Extra Vergine di Oliva. Ricerche e Innovazioni per il Miglioramento della Qualità*, 1st Edn., Camera di Commercio, Florence, Italy.
- Nergiz, C. and Engez, Y., 2000, Compositional variation of olive fruit during ripening, *Food Chemistry*, 69, 55-59.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., et al., 2008, Biosynthesis and biotransformations of phenol conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L, *Natural Product Reports*, 25, 1167–1179.
- Ortega-Garcia, F. and Peragon, J., 2009, Phenylalanine ammonialyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10331–10340.

- Ortega-García, F., Blanco, S., Peinado, M.A. and Peragón, J., 2008, Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. 'Picual' trees during fruit ripening, *Tree Physiology*, 28, 45–54.
- Ötleş, S., ve Özyurt, V.H., 2012, Oleuropein ve önemi, *Zeytin Bilimi*, 3(1), 59-71.
- Palma-Orozco, G., Sampedro, J. G., Ortiz-Moreno, A. and Nájera, H., 2012, In situ inactivation of polyphenol oxidase in mamey fruit (*Pouteria sapota*) by microwave treatment, *Journal of Food Science*, 77, C359–C365.
- Pantano, D., Luccarini, I., Nardiello, P., Servili, M., Stefani, M. and Casamenti, F., 2016, Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 83, 54-62.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P. and Calamai, L., 2008, The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 735–741.
- Park, E.S., Yu, T., Yang, K., Choi, S., Lee, S.M. and Park, K.Y., 2020, Cube natural sea salt ameliorates obesity in high fat diet-induced obese mice and 3T3-L1 adipocytes, *Scientific Reports*, 10:3407
- Patel, V., Rink, C., Khanna, S. and Sen, C.K., 2011, Tocotrienols: the lesser known form of natural vitamin E, *Indian Journal of Experimental Biology*, 49(10), 732.
- Peres, F., Martins, L.L. and Ferreira-Dias, S., 2017, Influence of enzymes and technology on virgin olive oil composition, *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 57, 14, 3104–3126.
- Peres, F., Martins, L.L. and Ferreira-Dias, S., 2014, Laboratory-scale optimization of olive oil extraction: Simultaneous addition of enzymes and microtalc improves the yield, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1054-1062.
- Peres, F., Martins, L.L., Mourato, M. and Ferreira-Dias, S., 2013b, The role of polyphenol oxidases and peroxidases from olive fruits on the composition of virgin oil. In: EUROFOODCHEM XVII, Istanbul, pp. 722.
- Perestrelo, R., Silva, C., Silva, P. and Câmara, J.S., 2017, Global volatile profile of virgin olive oils flavoured by aromatic/medicinal plants, *Food Chemistry*, 227, 111–121.
- Perez, R., Vargas, R., Martínez, F., García, E. and Hernandez, B., 2003, Antioxidant activity of alkaloids from *Bocconia arborea*. A study on six testing methods, *Ars Pharmaceutica*, 44, 5–21.
- Perona, J.S., Cabello-Moruno, R. and Ruiz-Gutiérrez, V., 2006, The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17, 429–445.

- Pirisi, F.M., Cabras, P., Cao, C.F., Migliorini, M. and Magelli, M., 2000, Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1191-1196.
- Polari, J.J., Garcí-Aguirre, D., Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo, A. and Wang, S.C., 2018, Impact of industrial hammer mill rotor speed on extraction efficiency and quality of extra virgin olive oil, *Food Chemistry*, 242, 362-368.
- Pongsakul, N., Leelasart, B. and Rakariyatham, N., 2006, Effect of L-cysteine, potassium metabisulfite, ascorbic acid and citric acid on inhibition of enzymatic browning in Longan, *Chiang Mai Journal of Science*, 33(1), 137-141.
- Ponting, D.J. and Joslyn, M.A., 1948, Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extractly, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 19, 47-63.
- Prenen, J.A.C., Boer, P. and Mees, E.J.D., 1984, Absorption kinetics of oxalate from oxalate-rich food in man, *American Journal of Clinical Nutrition*, 40(5), 1007–1010.
- Puértolas, E. and de Marañón, I.M., 2015, Olive oil pilot-production assisted by pulsed electric field: Impact on extraction yield, chemical parameters and sensory properties, *Food Chemistry*, 167,497-502.
- Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E. and Valente–Mesquita, V. L., 2008, Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control, *Food Reviews International*, 24, 361–375.
- Ramírez, E. C., Whitaker, J. R. and Virador, V. M., 2003, Polyphenol Oxidase. In: *Handbook of Food Enzymology*. Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T. and Brunton, N., 2011, Effect of thermal and nonthermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances, *Food Research International*, 44, 1875–1887.
- Restuccia, D., Clodoveo, M.L., Corbo, F. and Loizzo, M.R., 2018, De-stoning technology for improving olive oil nutritional and sensory features: The right idea at the wrong time, *Food Research International*, 106, 636–646.
- Reboredo-Rodríguez, P., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., Desamparados Salvador, M., Cancho-Grande, B., et al., 2017, State of the art on functional virgin olive oils enriched with bioactive compounds and their properties, *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 668.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. and Simal-Gándara, J., 2014, Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils, *Food Chemistry*, 158, 534–545.
- Reddy, K.V.K. and Naidu, K.A., 2016, Oleic acid, hydroxytyrosol and n-3 fatty acids collectively modulate colitis through reduction of oxidative stress and IL-8

- synthesis; in vitro and in vivo studies, *International Immunopharmacology*, 35, 29-42.
- Ricciutelli, M., Marconi, S., Boarelli, M.C., Caprioli, G., Sagratini, G., Ballini, R. and Fiorini, D., 2017, Olive oil polyphenols: a quantitative method by high performance liquid-chromatographydiode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim, *Journal of Chromatography A*, 1481:53–63.
- Richard-Forget, F.C., Goupy, P. M. and Nicolas, J.J., 1992, Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning 2. Kinetic studies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2108–2113.
- Rigacci, S. and Stefani, M., 2016, Nutraceutical properties of olive oil polyphenols. An Itinerary from cultured cells through animal models to humans, *International Journal of Molecular Sciences*, 17 (6), E843.
- Rizvi, S., Raza, S.T., Ahmed, F., Ahmad, A., Abbas, S. and Mahdi, F., 2014, The role of vitamin E in human health and some diseases, *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 14(2), e157.
- Roginsky, V., and Lissi, E.A., 2005, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92(2), 235-254.
- Rojas-Grau, M.A., Sobrino Lopez, A., Tapia, M.S. and Martín Belloso, O., 2006, Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents, *Journal of Food Science*, 71, 59-65.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez Ortiz, A., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2012, The role of olive  $\beta$ -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil, *Food Research International*, 45, 191–196.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2011, Virgin olive phenolic profile as a result of the anabolic and catabolic enzymes status in the olive fruit, *Acta Horticulturae*, 924, 379–384.
- Romero-Segura, C., Sanz, C. and Pérez, A. G., 2009, Purification and characterization of an olive fruit beta-glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7983–7988.
- Rovellini, P. and Cortesi, N., 2002, Liquid chromatography-mass spectrometry in the study of oleuropeina and ligstroside aglycons in virgin olive oil: Aldehydic, dialdehydic forms and their oxidized products, *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79, 1– 13.
- Ryan, D., Robards, K. and Lavee, S., 1999, Changes in phenolic content of olive during maturation, *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 265-274.
- Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., Sanz, C. and Pérez, A.G., 2011, Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipooxygenase activity load during the oil extraction process, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3),812–822.

- Sanmartin, C., Venturi, F., Macaluso, M., Nari, A., Quartacci, M.F., Sgherri, C., Flamini, G., Taglieri, I., Ascricchi, R., Andrich, G. and Zinnai, A., 2018, Preliminary results about the use of argon and carbon dioxide in the extra virgin olive oil (EVOO) storage to extend oil shelf life: Chemical and sensorial point of view. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1800156.
- Saxena, J., Ahmad Makroo, H. and Srivastava, B., 2017, Effect of ohmic heating on polyphenoloxidase (PPO) inactivation and color change in sugar canejuice, *Journal of Food Process Engineering*, 40, 1–11.
- Segade, M., Bermejo, R., Silva, A., Paiva-Martins, F., Gil-Longo, J. and Campos-Toimil, M., 2016, Involvement of endothelium in the vasorelaxant effects of 3,4-DHPEA-EA and 3,4-DHPEA-EDA, two major functional bioactives in olive oil, *Journal of Functional Foods*, 23, 637-646.
- Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P. and Garrido-Fernández, A., 2009, Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved, *Food Chemistry*, 114, 1380–1385.
- Segovia-Bravo, K.A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A., 2007, Characterization of polyphenol oxidase from the manzanilla cultivar (*Olea europea pomiformis*) and prevention of browning reactions in bruised olive fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6515–6520.
- Serrano, A., De la Rosa, R., Sánchez-Ortiz, A., Cano, J., Pérez, A.G., Sanz, C., 2021, Chemical components influencing oxidative stability and sensorial properties of extra virgin olive oil and effect of genotype and location on their expression, *LWT Food Science Technology*, 136:110257.
- Servili, M., 2014, The phenolic compounds: a commercial argument in the economic war to come on the quality of olive oil? *Oils Seed Fats Corps Lipids*, 21(5), D509.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R. and Montedoro, G.F., 2007a, Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7028-7035.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F. and Morozzi, G., 2004, Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil, *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.
- Servili, M. and Montedoro, G.F., 2002, Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.
- Servili, M., Baldioli, M., Begliomini, A. L., Selvaggini, R. and Montedoro, G.F., 2000, The phenolic and volatile compounds of virgin olive oil: Relationships with the endogenous oxidoreductases during the mechanical oil extraction process. In: *Flavour and Fragrance Chemistry*, pp. 163–173. Lanzotti, V. and Tagliatalata-Scafati, O., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Sharma, S. and Rao, R., 2013, Nutritional quality characteristics of pumpkin fruit as revealed by its biochemical analysis, *International Food Research Journal*, 20(5), 2309-2316.
- Shindler, J.S. and Bardsley, W.G., 1975, Steady-state kinetics of lactoperoxidase with ABTS as chromogen, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67 (4), 1307-1312.
- Siliani, S., Mattei, A., Benevieri Innocenti, L. and Zanoni, B., 2006, Bitter taste and phenolic compounds in extra virgin olive oil: An empirical relationship, *Journal of Food Quality*, 29, 431– 441.
- Soares, J.M. and Fonseca, G.G., 2008, Effect of L-ascorbic acid and sodium metabisulfite in the inhibition of the enzymatic browning of minimally processed apple, *International Journal of Agricultural Research*, 3, 196–201.
- Soler-Rivas, C., Espin, J. C. and Wichers, H. J., 2000, Oleuropein and related compounds, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1013– 1023.
- Son, S.M., Moon, K.D. and Lee, C.Y., 2001, Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices, *Food Chemistry*, 73(1), 23–30.
- Son, S.M., Moon, K.D. and Lee, C.Y., 2000a. Kinetic study of oxalic acid inhibition on enzymatic browning, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2071–2074.
- Son, S.M., Moon, K.D., and Lee, C.Y., 2000b. Rhubarb juice as a natural antibrowning agent, *Journal of Food Science*, 65, 1288–1289.
- Spadafora, A., Mazzuca, S., Chiappetta, F. F., Parise, A., Perri, E. and Innocenti, A. M., 2008, Oleuropein-specific-[beta]-glucosidase activity marks the early response of olive Fruits (*Olea europaea*) to mimed insect attack, *Agricultural Sciences in China*, 7, 703–712.
- Špika, M.J., Kraljić, K., Koprivnjak, O., Škevin, D., Žanetić, M. and Katalinić, M., 2015, Effect of agronomical factors and storage conditions on the tocopherol content of oblica and leccino virgin olive oils, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92, 1293–1301.
- Stefanoudaki, E., Koutsaftakis, A. and Harwood, J.L., 2011, Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chemistry*, 127, 1481–1486.
- Takahama, U. and Oniki, T., 2000, Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions, *International Journal of Plant Research*, 113, 301–309.
- Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., León, L., De la Rosa, R., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A., 2016, From olive fruits to olive oil: Phenolic compound transfer in six different olive cultivars grown under the same agronomical conditions, *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 337.

- Tamborrino, A., Urbani, S., Servili, M., Romaniello, R., Perone, C. and Leone, A., 2020, Pulsed electric fields for the treatment of olive pastes in the oil extraction process, *Applied Sciences*, 10(1), 114.
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V.M., Romaniello, R., Summo, C., Pasqualone, A., Catalano, P., Bianchi, B. and Caponio, F., 2017, Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics, *Journal of Food Engineering*, 205, 34-46.
- Taticchi, A., Esposito, S. and Servili, M., 2014, The basis of the sensory properties of virgin olive oil. In: Olive oil sensory science, pp. 33–54. Monteleone, E. a. S. L., Ed., John Wiley & Sons, Ltd., New York.
- Taticchi, A., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R. and Servili, M., 2013, The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil, *Food Chemistry*, 136(2), 975–983.
- TGK, 2017, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği. Erişimi adresi: <https://www.mevzuat.gov.tr/mevzuat?MevzuatNo=20224&MevzuatTur=9&MevzuatTertip=5>.
- Toivonen, P.M.A., 1992, The reduction of browning in parsnips, *Journal of Horticultural Sciences*, 67, 547–551.
- Tunalıoğlu, R. and Durdu, Ö.F., 2012, Assessment of future olive crop yield by a comparative evaluation of drought indices: a case study in western Turkey, *Theoretical and Applied Climatology*, 108(3–4):397–410.
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedo, S., Failla, O., Bassi, D. and Serraiocco, A., 2007, Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L) and correlations with oxidative stability, *Scientia Horticulturae*, 112, 108–119.
- Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği, *Tebliğ No: 2017/26*.
- Tzika, E. D., Sotiroudis, T., Papadimitriou, V. and Xenakis, A., 2009, Partial purification and characterization of peroxidase from olives (*Olea europaea* cv. *Koroneiki*), *European Food Research and Technology*, 228, 487–495.
- Vasanthi, H.R, Parameswari, R.P. and Das, D.K., 2012, Multifaceted role of tocotrienols in cardioprotection supports their structure: Function relation, *Genes and Nutrition*, 7, 19–28.
- Vasto, S., Buscemi, S., Barera, A., Di Carlo, M., Accardi, G. and Caruso, C., 2014, Mediterranean diet and healthy ageing: A Sicilian perspective, *Gerontology*, 60(6), 508-518.
- Veneziani, G., Esposito, S., Taticchi, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Sordini, B. and Servili, M., 2018, Characterization of phenolic and volatile composition of extra

- virgin olive oil extracted from six Italian cultivars using a cooling treatment of olive paste, *LWT*, 87, 523-528.
- Veneziani, G., Esposto, S., Taticchi, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Di Maio, I., Sordini, B. and Servili, M., 2017, Cooling treatment of olive paste during the oil processing: Impact on the yield and extra virgin olive oil quality, *Food Chemistry*, 221, 107-113.
- Vergara-Domínguez, H., Roca, M. and Gandul-Rojas, B., 2013, Characterisation of chlorophyll oxidation mediated by peroxidative activity in olives (*Olea europaea* L.) cv. *Hojiblanca*, *Food Chemistry*, 139, 786–795.
- Villano, D., Vilaplana, C., Medina, S., Algaba-Chueca, F., Cejuela-Anta, R., Martínez-Sanz, J.M., et al., 2016, Relationship between the ingestion of a polyphenol rich drink, hepcidin hormone, and long-term training, *Molecules*, 21(10).
- Vinha, A.F., Ferreres, F., Silva, B.M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J.A., Oliveria, M.B., Seabre, R.M. and Andrade, P.B., 2005, Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influence of cultivar and geographical origin, *Food Chemistry*, 89 (4), 561–568.
- Visioli, F. and Galli, C., 2002, Biological properties of olive oil phytochemicals, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (3), 209–221.
- Visioli, F., Bellomo, G. and Galli, C., 1998, Free radical scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 60– 64.
- Vitaglione, P., Savarese, M., Paduano, A., Scalfi, L., Fogliano, V. and Sacchi, R., 2015, Healthy virgin olive oil: A matter of bitterness, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1808-1818.
- Wessels, B., Schulze-Kaysers, N., Damm, S. and Kunz, B., 2014, Effect of selected plant extracts on the inhibition of enzymatic browning in fresh-cut apple, *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87, 16 –23.
- Yahyaoui, A., Rigane, G., Mnif, S., Ben-Salem, R., Acar, A. and Arslan, D., 2019, Ultrasound Technology Parameters: Effects on Phenolics in Olive Paste and Oil in Relation to Enzymatic Activity, *European Journal of Lipid Science and Technology*. 121, 5, 1800295.
- Yoruk, R., Yoruk, S., Balaban, M.O. and Marshall, M.R., 2004, Machine Vision Analysis of antibrowning potency for oxalic acid: a comparative investigation on banana and apple, *Journal of Food Science*, 69(6), 281–289.
- Yuan, Z. Y. and Jiang, T. J., 2003, Horseradish peroxidase. Handbook of Food Enzymology. Whitaker, J. R., Voragen, A. G. J. and Wong, D. W. S., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York.
- Yubero-Serrano, E.M., Lopez-Moreno, J., Gomez-Delgado, F. and Lopez-Miranda, J., 2019, Extra virgin olive oil: More than a healthy fat, *European Journal of Clinical Nutrition*, 72,8–17.

- Yue, W., Ming, Q.L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C.J., Han, T., et al., 2016, Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (2), 215-232.
- Zago, L., Squeo, G., Bertoncini, E.I., Difonzo, G. and Caponio, F., 2019, Chemical and sensory characterization of Brazilian virgin olive oils, *International Food Research Journal*, 126,108588.
- Zhao, X., Guo, S., Ma, Y., Zhao, W., Wang, P., Zhao, S., Wang, D., 2022, Ascorbic acid prevents yellowing of fresh-cut yam by regulating pigment biosynthesis and energy metabolism, *Food Research Internationa*, 157, 111424.
- Zhou, L., Liao, T., Liu, W., Zou, L., Liu, C., and Terefe, N.S., 2019, Inhibitory effects of organic acids on polyphenol oxidase: From model systems to food systems, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–28.
- Zhou, Z.Q., Xiao, J., Fan, H.X., Yu, Y., He, R.R., Feng, X.L., et al., 2017, Polyphenols from wolfberry and their bioactivities, *Food Chemistry*, 214, 644-654.
- Zhou, L., Tey, C. Y., Bingol, G. and Bi, J., 2016, Effect of microwave treatment on enzyme inactivation and quality change of defatted avocado puree during storage, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 61-67.
- Zullo, B. A., Di Stefano, M. G., Cioccia, G. and Ciafardini, G., 2014, Evaluation of polyphenol decay in the oily fraction of olive fruit during storage using a mild sample handling method, *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 160–168.

## EKLER

### EK-1 İnhibitör maddeler ilavesiyle ekstrakte edilen zeytinyağlarının duyu analizi puanlama formu

Numune no	Renk	Koku	Tat	Yeşil yaprak	Kesilmiş çimen	Baharat	Acılık	Yakıcılık	Bütün hoşluk	Ağızda bıraktığı tat	Temel kusur	Zeytin meyvesi	Elma	Badem	Meyvemsi	Yeşil zeytin	Yeşil muz	Kuru meyve
120																		
276																		
254																		
365																		
387																		
142																		
433																		
119																		
401																		

Puanlama 1-9 arasındadır. 1: Çok kötü, 9: Çok iyi