



T.C.
NECMETTİN ERBAKANÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BAZI DOĞAL ATIKLARIN LİPAZ
İNAKTİVASYONU AMACIYLA ZEYTİN
YAĞI ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR OLARAK
KULLANIMI**

Habibe DOGHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

10.2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Habibe DOGHAN tarafından hazırlanan “Bazı Doğal Atıkların Lipaz İnaktivasyonu Amacıyla Zeytin Yağı Üretiminde İnhibitör Olarak Kullanımı” adlı tez çalışması .../.../... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Doç. Dr. Nilgün ERTAŞ

.....

Danışman

Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

.....

Üye

Doç. Dr. Nilgün ERTAŞ

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi. Ebru BAYRAK

.....

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

Prof. Dr. İbrahim KALAYCI
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 221319008 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

Habibe DOGHAN

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANSTEZİ

BAZI DOĞAL ATIKLARIN LİPAZ İNAKTİVASYONU AMACIYLA ZEYTİNYAĞI ÜRETİMİNDE İNHİBİTÖR OLARAK KULLANIMI

Habibe DOGHAN

**Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

Danışman: Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

2022, 57 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

Doç. Dr. Nilgün ERTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi. Ebru BAYRAK

Serbest yağ asitliği hem yağın ticari değerinin belirlenmesinde hem de sınıfının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle zeytin yağının serbest yağ asitliğinin düşük seviyede tutulması önemlidir. Asitlik artışında, zeytin meyvesinde bulunan endojen veya mikrobiyal lipaz enzimleri rol oynar. Buradan yola çıkılarak, bu çalışmayla, zeytin yağı ekstraksiyonu öncesi depolama sırasında lipaz aktivitesi inhibe edilmeye çalışılmıştır. Lipaz enzimi üzerinde inhibitör etki gösterme potansiyeli olan bitkisel atıklardan elde edilen ekstraktlar (soğan kabuğu, portakal kabuğu ve ceviz kabuğu ekstraktları) ve bazı çözeltiler (selenyum dioksit (SeO_2) ve pozitif kontrol olarak orlistat çözeltileri) depolama sırasında zeytinlere uygulanmıştır. İlaveten, sıcak suya daldırma işleminin de zeytinde lipaz aktivitesi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla zeytinlerin bir kısmı ekstraksiyon öncesi sıcak suya daldırıldıktan sonra ekstrakt ve çözeltiler ile muamale edilmiştir. Zeytin hamurlarında spektrofotometrik olarak lipaz aktivitesi belirlenmiştir.

Zeytin yağlarında verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, K_{232} ve K_{270} değerleri, renk ve duyu analizi, zeytin hamurlarında ise nem analizi yapılarak yağ numunelerindeki değişimler değerlendirilmiştir.

Yapılan analizler sonucunda, ekstrakt uygulanan zeytinlerin yağlarının serbest yağ asitliğinin daha düşük olduğu görüldüğü gibi, sıcak suya daldırma işlemi ile birlikte ekstrakt muamelesi serbest yağ asitliğini artırmıştır. Soğan kabuğu ekstraktı K_{232} ve K_{270} değerlerini azaltmıştır. Sıcak suya daldırma işlemi ise lipaz aktivitesi üzerinde olumsuz etki göstermiştir. Ekstraktların uygulanmasıyla verimde artış ve peroksit değerlerinde azalma tespit edilmiştir. Özellikle sıcak suya daldırma işlemi ardından portakal kabuğu ve ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerde önemli verim artışları olmuştur.

Anahtar Kelimeler: asitlik, enzim, inhibitör maddeler, lipaz aktivitesi

ABSTRACT

MS THESIS

THE USE OF SOME NATURAL WASTES AS INHIBITORS IN OLIVE OIL PRODUCTION FOR INACTIVATION OF LIPASE

Habibe DOGHAN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN FOODENGINEERING**

Advisor: Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

2022, 57 Pages

Jury

Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU

Doç. Dr. Nilgün ERTAŞ

Dr. Öğr. Üyesi. Ebru BAYRAK

Free fatty acidity is used both to determine the commercial value of the oil and to determine its class. For this reason, it is important to keep to a minimum the free fatty acidity of olive oil. The endogenous or microbial lipase enzyme in the olive fruit plays a role in the increase in acidity. From this point of view, In this study, lipase activity was tried to be inhibited during storage before olive oil extraction. Extracts obtained from vegetable wastes (onion peel, orange peel and walnut peel) and some solutions (selenium dioxide (SeO₂) and orlistat solutions as positive control) that have the potential to exert inhibitory effects on the lipase enzyme were applied to olives during storage. In addition, in order to determine the effect of hot water blanching on lipase activity in olives, some of the olives were treated with extracts and solutions after blanching in hot water before extraction. Lipase activity was determined spectrophotometrically in olive pastes.

Yield, free fatty acidity, peroxide value, K₂₃₂ and K₂₇₀ values, color and sensory analysis in olive oils and moisture analysis in olive pastes were analysed and changes in oil samples were evaluated.

As a result of the analysis, a decrease was observed in the free fatty acidity of the samples sprayed only the extract, while extract treatment combined with hot water immersion resulted in an increase. Onion peel extract decreased K₂₃₂ and K₂₇₀ values. Hot water immersion had a negative effect on lipase activity. With the application of the extracts, an increase in yield and a decrease in peroxide values were determined. Significant yield increases were observed, especially in the samples that were blanched and orange peel and walnut shell extract applied.

Keywords: acidity, enzyme, inhibitory materials, lipase activity

ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım günden bugüne kadar ve tezimi hazırlama sürecinde engin bilgilerini benimle paylaşan, tüm samimiyetiyle her daim yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Derya ARSLAN DANACIOĞLU'na en içten minnet ve şükranlarımı sunarım.

Analiz çalışmalarımda ve tezimin yazılması sürecinde devamlı olarak yanımda olup beni destekleyen, her daim sorularıma karşılık veren ve bütün özverisiyle çalışan Ayşenur ACAR'a teşekkür ederim.

Bütün eğitim hayatım boyunca sonsuz desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve eşime teşekkür ederim.

Habibe DOGHAN
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	12
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	14
2.1. Zeytin yağı ve çeşitleri.....	14
2.1.1. Natürel zeytin yağı.....	14
2.1.2. Diğer çeşitler.....	15
2.1.3. Pirina yağı	15
2.2. Zeytin yağı üretim yöntemleri	16
2.2.1. Geleneksel yöntemle zeytin yağı üretimi.....	16
2.2.2. Modern sistemle zeytin yağı üretimi	16
2.2.3. Sinolea yöntemi	17
2.3. Lipazlar	18
2.3.1. Lipazların sınıflandırılması.....	18
2.3.2. Lipaz aktivitesine etki eden faktörler.....	19
2.4. Sıcak suya daldırma	20
2.5. Çalışmaya Öncülük Eden Literatür Verileri	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Olgunlaşma indeksinin belirlenmesi.....	25
3.2. Metot	25
3.2.1. İnhibitör olarak kullanılacak ekstraktların ve çözeltilerin hazırlanması.....	26
3.2.2. Zeytinyağında yapılan analizler	28
3.2.3. Zeytin hamurunda yapılacak analizler	31
3.2.4. İstatistiksel analiz.....	31
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	32

4.1. Verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri UV özgül soğurma değeri ile ilgili veriler	32
4.2. Zeytin yağı renk değeri (L^* , a^* , b^*) değişimi	36
4.3. Zeytin hamurunun nem içeriği.....	38
4.4. Duyusal analiz sonuçları	40
4.5. Pearson korelasyon sonuçları.....	42
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	44
5.1. Sonuçlar	44
5.2 Öneriler	45
6. KAYNAKLAR	46
EKLER	1



ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 4.1. Ekstrakt, orlistat ve SeO_2 uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların verim, asitlik ve bazı oksidasyon parametreleri analiz sonuçları	33
Çizelge 4.2. Ekstrakt, orlistat ve SeO_2 uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların verim, asitlik ve bazı oksidasyon parametrelerinin çoklu karşılaştırma testi sonuçları..	34
Çizelge 4.3. Çalışılan zeytin hamurlarında nem ve lipaz aktivitesi analiz sonuçları.....	39
Çizelge 4.4. Çalışılan zeytin hamurlarında nem ve lipaz aktivitesi değerlerine ait çoklu karşılaştırma test sonuçları.....	39
Çizelge 4.5. Zeytin yağı örneklerinin verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, K_{232} , K_{270} , L^* , a^* , b^* değerleri, zeytin hamuru nem içeriği ve lipaz aktiviteleri arasındaki Pearson korelasyon katsayıları.....	43
EK 1. Duyusal analiz yapılan örnek isimlerinin kodlaması.....	1
EK 2. Duyusal analiz için panalistlere verilen çizelge	1

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1. Çalışmada uygulanan yöntemlere ait akım şeması.....	27
Şekil 3.2. Ekstrakt uygulanan zeytinlerin görselleri	28
Şekil 4.1. Renk analizinde ölçülen L^* , a^* , b^* değerleri	37
Şekil 4.2. Zeytin yağı örneklerinin duyusal analiz grafikleri	41



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
pH	Potansiyel hidrojen (asitlik bazlık ölçü birimi)
KOH	Potasyum hidroksit
%	Yüzde

Kısaltmalar

mm	Milimetre
ppm	Milyonda bir
mg	Miligram
kg	Kilogram
gr	Gram
dk	Dakika
L	Litre
mL	Mililitre
nm	Nanometre
meq	Mili-equivalent (mili eşdeğer)
M.Ö	Milattan önce
PL	Pankreas lipazı
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi)
mM	Milimolar

1. GİRİŞ

Zeytin ağacı dünyada yetiştirilen en eski ağaçtır. En yaygın olan türü *Olea europaea* L. 'dir. Zeytin meyvesinin en iyi yetişme koşulları kuzey ve güney yarım kürelerin 30 ve 45 paralelleri arasındadır (Luchetti, 2002). Yazları sıcak, kışları ılıman geçen iklimlerde yetiştirilmektedir. Zeytin soğukta zarar görmekte ve 0°C'de yapraklarını dökmekte ve eksi derecelerde gelişmemektedir. Zeytin, suyu sevmesine rağmen susuzluğa dayanıklı bir bitkidir. Verimli bir zeytin üretimi için yıllık ortalama 220 mm yağış olmalıdır. Zeytin ağacının ana kökü yeni kökler vererek gövde ve dalları beslemektedir. Zeytin meyveleri önceleri yeşil renklidir, olgunlaştıkça rengi siyahlaşır (Gemicioğlu, 2016).

Türkiye'de tescilli 90 adet zeytin çeşiti bulunmaktadır. Memecik, Ayvalık, Edremit Yağlık, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Kalembezi, Saurani, Çelebi, Çekişte, Sarı Haşebi, Gemlik, Erkence en bilindik yağ oranı yüksek zeytin çeşitleridir (Kayahan ve Tekin, 2006).

Dünya zeytin ve zeytin yağı üretiminin büyük bir kısmı İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye ve Fas gibi Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yapılmaktadır (Seçer, 2001).

Ülkemizde zeytin çoğunlukla Ege, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yetiştirilmektedir. Gaziantep, Kilis, Şanlıurfa, Kahramanmaraş, Hatay ve Mardin Güneydoğu Anadolu bölgesinde zeytincilik bakımından önemli illerdir (Türkoğlu ve ark., 2012).

Zeytin yağı, zeytine mekanik ve fiziksel işlemler uygulanarak elde edilen, oda sıcaklığında sıvı olan, kendine özgü tat ve kokuya sahip doğal olarak tüketilebilen bir yağdır (Yavuz, 2008). Zeytin yağının kimyasal bileşimi, zeytin meyvesinin çeşidine ve olgunluk derecesine, iklim, işleme ve depolama tekniklerine bağlıdır (Sievers ve Hynninen, 1977). Hasadın geciktiği durumlarda meyve olgunluk derecesinin artmasına bağlı olarak elde edilen zeytin yağında doymamış yağ asitleri oranının arttığı görülmektedir (Altan ve Kola, 2009).

Kimyasal özellik olarak zeytin yağında serbest yağ asitliği, peroksit değeri, ultraviyole ışıktaki özgül soğurma değerleri kalite tespitinde kullanılan önemli özelliklerdir. Serbest yağ asitliği hem yağın ticari değerinin belirlenmesinde hem de sınıfının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu nedenle zeytin yağının serbest yağ

asitliğinin en düşük seviyede tutulması ve mümkünse tamamen bertaraf edilmesi önemlidir (Bıyıklı, 2009). Serbest yağ asitinin artış nedenleri; lipaz enzimi, ısı ve ışık gibi etkenlerdir. Zeytin yağında serbest yağ asiti artışı ransidite ya da diğer adıyla acılaşıma denilen kalite kusurunun oluşmasına yol açmaktadır. Bir diğer kimyasal parametre peroksit değeridir. Yağların oksidasyonunda oluşan hidroperoksitlerin ölçümüyle tespit edilmektedir (Özdoğan ve Tunahıoğlu, 2017). Peroksit değerinin yüksek olması zeytin yağının daha kolay okside olarak tadının bozulmasına (acıma) neden olacağından kaliteyi düşürmektedir. Ultraviyole ışığında özgül soğurma, zeytin yağlarında K_{232} ve K_{270} nm dalga boyunda ölçülen özgül absorbans değerleri, yağın oksidasyona dayanıklılığının bir ölçütü olan önemli bir kalite kriteridir (Susamcı ve ark., 2017). K_{232} değeri, hidroperoksitlerin ve konjuge dienlerin, K_{272} değeri ise karbonilik bileşikler ile konjuge trienlerin miktarını göstermektedir.

Zeytin yağının duyuusal özelliği zeytin çeşiti, olgunluk derecesi, işleme şekli, mevsim ve iklim koşulları, zeytinin hasat zamanı ve depolama koşullarına bağlı olarak değişik özellik göstermektedir (TGK, 2017).

Natürel zeytin yağı üretiminde kısmen zarar görmüş zeytin meyvelerinin kullanımı oksidatif ve enzimatik reaksiyonlarda artışa neden olabilmektedir (Kayahan ve Tekin, 2006). Bu şekilde elde edilen zeytin yağları duyuusal kusurların oluşmasına ve serbest yağ asitliği değerlerinde artışa neden olmaktadır (Ayton ve ark, 2012). Üretim koşullarının yanı sıra depolama ve dağıtım süreçleri de kaliteye etki etmektedir (Peri, 2014). Zeytin yağı kalitesine olgunluk derecesi ve çeşitin %50, hasat tekniklerinin %30, yağ işleme tekniğinin %15, depolama şeklinin %5 oranda etkilediği tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2009).

Bu çalışmada zeytin örneklerine lipaz enzimi üzerine inhibitör etkili olabileceği düşünülen soğan (*Allium cepa* L.) kabuğu, ceviz (*Juglans regia* L.) kabuğu, portakal (*Citrus sinensis*) kabuğu gibi doğal atıklardan elde edilen ekstraktlar ve selenyum dioksit (SeO_2) ve kontrol amaçlı orlistat çözelti halinde spreylenerek zeytinde lipaz aktivitesini yavaşlatmak ve böylece düşük yağ asitliğine sahip zeytin yağın elde etmek amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda lipaz aktivitesini düşüren alternatif uygulamalar önerilebilirken, doğal atıkların değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Zeytin yağı ve çeşitleri

Zeytin yağı yapısında bulundurduğu maddelerden dolayı rengi açık yeşilden sarıya kadar değişmektedir. Örneğin; yeşil renkteli zeytin yağına yeşil rengini veren yapısında 10 ppm'ye kadar klorofil bulundurması, sarı renkli yağda ise yapısında bulunan karoten sarı rengi vermektedir (Çavuşoğlu ve Oktar, 1994; Sibbett ve ark., 1994). Fiziksel yöntemler kullanılarak elde edilen zeytin yağının, kendine özgü aroma ve lezzete sahip olması ve rafinasyon işlemi gerektirmeden de tüketilebilmesi zeytin yağının diğer yağlardan ayıran en önemli özelliğidir (Bayrak ve Kırılan, 2008).

Zeytin yağı bileşenleri, sabunlaşabilen ve sabunlaşamayan bileşenler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Zeytin yağının başlıca sabunlaşabilen bileşenleri triaçilgliseroller ve serbest yağ asitleri ile fosfatidlerdir. Sabunlaşmayan bileşenler ise hidrokarbonlar, alkoller, steroller, pigmentler ve aroma maddeleridir (Boskou, 1996).

Zeytin yağı bileşimi %99 majör bileşenler (oleik asit %56-83, palmitik asit %7.5-20, linoleik asit %3.5-20, stearik asit %3.5-5, linolenik asit < %1,5) ve %1 minör bileşenlerden (α -tokoferol 12-150 mg/kg, fenolik bileşenler 30-500 mg/kg, hidrokarbonlar 0.75 mg/kg, triterpenik alkoller 0.25 mg/kg, alifatik alkoller 0.29 mg/kg, fosfolipitler 40-135 mg/kg, klorofil 1-10 mg/kg, aroma bileşenleri 250-500 mg/kg) oluşmaktadır (Kiritsakis ve Min, 1989). Oleik asit hayvansal ve bitkisel yağlarda en fazla bulunan yağ asitidir. Zeytin yağı tekli doymamış yağ asiti olan oleik asiti yüksek oranda içermektedir. Linoleik asit doymamış monokarboksilik asittir. Diğer adı cis-oktadeka-9-enoikasit'tir. Linolenik asit ise omega-3 yağ asitleri grubuna ait esansiyel bir yağ asididir.

2.1.1. Natürel zeytin yağı

Natürel sızma zeytin yağları, serbest yağ asitliği 100 gr'da 0.8 gr'dan fazla olmayan yağlardır (TGK, 2017). Genellikle erken hasat edilen zeytinlerden soğuk sıkım yöntemiyle elde edilen, tat ve koku özelliklerini koruyan bir yağdır. Ülkemizde üretilen zeytin yağlarının yaklaşık %3'lük kısmı natürel sızma zeytin yağıdır (Türkoğlu ve ark., 2012). Doğrudan tüketime uygun ve serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gr'da 2 gr'dan fazla olmayan yağlara natürel birinci zeytin yağı denmektedir (TGK, 2017). Bu yağlar, ilk sıkımdan sonra sıcak su muamelesi yapılarak elde edilen zeytin

yağıdır. Lezzet ve kokusunda hafif kusurlar olabilmektedir (Türkoğlu ve ark., 2012). Serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gr'da 2 gr'dan fazla olan ve doğrudan tüketime uygun olmayan rafinasyon veya teknik amaçlı kullanıma uygun yağlara ise ham zeytin yağı (rafinajlık) denilmektedir (TGK, 2017).

2.1.2. Diğer çeşitler

Rafine zeytin yağı, ham zeytin yağının doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmadan rafine edilmesi ile oluşan ve serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gr için 0.3 gr'dan fazla olmayan yağlara denilmektedir (TGK, 2017). Rafinasyonla istenmeyen koku giderilip, reçine maddeleri uzaklaştırılıp renk ağartılmakta ve asitlik düşürülmektedir. Bu işlemler olurken istenmeyen özellikler giderilmekte, fakat zeytin yağına has özellikler de kaybolmaktadır (Türkoğlu ve ark., 2012).

Rafine zeytin yağı ile doğrudan tüketime uygun natürel zeytin yağlarının karışımından oluşan serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden 100 gr'da 1 gr'dan fazla olmayan yağa riviera zeytin yağı denir (TGK, 2017). Riviera zeytin yağı elde edilirken genellikle rafine zeytin yağına %10–15 arasında natürel zeytin yağı karıştırılmasıyla birlikte, karışım yapılacak yağların asitlik değeri ve firma tercihine göre oran değişebilmektedir. Bu tip zeytin yağı kızartmalarda ve yemeklerde kullanılmaktadır (Altan ve Kola, 2009).

Zeytin yağlarına değişik baharat, bitki, meyve ve sebzelerin ilave edilmesiyle elde edilen yağlara çeşnili zeytin yağı denilmektedir (TGK, 2017).

2.1.3. Pirina yağı

Zeytin yağı üretiminde zeytin sıkıldıktan sonra geriye kalan yağlı posaya pirina denmektedir. Pirinanın çözücü ekstraksiyonuyla ya da diğer fiziksel işlemler ile elde edilen, reesterifikasyon işleminden geçmemiş, diğer yağlar ve karışımları ile karıştırılmamış, doğrudan tüketime uygun olmayan, rafinasyon veya teknik amaçlı kullanıma uygun yağa ham pirina yağı denir. Ham pirina yağının doğal trigliserit yapısında değişikliğe yol açmayan metotlarla rafine edilerek elde edilen ve serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gr'da 0.3 gr'dan fazla olmayan yağa rafine pirina yağı denir. Rafine pirina yağı ve doğrudan tüketime uygun natürel zeytin yağları karışımından oluşan, serbest yağ asitliği oleik asit cinsinden her 100 gr'da 1.0 gr'dan fazla olmayan yağa pirina yağı denir (TGK, 2017).

2.2. Zeytin yağı üretim yöntemleri

Zeytin yağı ilk olarak zeytinlerin ayakla ezilip sıcak suyla yağının alınması yöntemiyle üretilmiştir. Dünyadaki en eski zeytin yağı üretim yeri M.Ö. 6. yüzyıla ait olup İzmir ilinde bulunan antik Klazomenai kentindedir. Romalılar döneminde ise zeytin iki taş arasında ezilerek yağı alınmıştır. Bu taşın çevrilmesi içi önceleri insan gücü daha sonra hayvan gücü kullanılmıştır. Daha sonra, ezilen zeytinlerin sıkıştırılması için basınç kullanılmaya başlanmıştır. Bunun için hidrolik presler kullanılmış ve bu yöntem geliştirilerek günümüz kontinu sistemlere kadar ulaşılmıştır (Gemicioğlu, 2016).

2.2.1. Geleneksel yöntemle zeytin yağı üretimi

Ayıklanmış, yıkanmış zeytinler taş kırıcılarda kırılmakta ve elde edilen zeytin hamuru bez çuvallara doldurulmaktadır. Dolu çuvallar üst üste dizilerek mekanik pres yardımıyla sıkılmaktadır. Bu esnada yağ çuval deliklerinden süzülerek pirinadan ayrılmaktadır. Bu yöntemde, zeytin en doğal halindedir. Bunun yanı sıra, polifenol ve vitamin içeriği yüksek, aromatik ve meyve kokulu bir yağ elde edilmektedir (Hepsağ ve Kaya, 2018).

2.2.2. Modern sistemle zeytin yağı üretimi

Zeytin yağında üretimi hızlandırıp verimi artırmak, oksidasyonu sınırlandırmak, raf ömrünü uzatmak gibi amaçlarla geliştirilmiş olan iki fazlı ve üç fazlı sistemler bulunmaktadır (Hepsağ ve Kaya, 2018). Her iki sistemde de zeytinler ayıklanıp yıkandıktan sonra metal kırıcılara gelerek kırılmakta, daha sonra kırılmış zeytinler malaksör denen yoğurucu makinelerde yoğurulmaktadır. Bu işleme malaksasyon denilmektedir. Burada amaç elde edilen zeytin hamurunun yağ zerrelere birleştirilerek homojenleştirilmesi, katı-sıvı faz ayırmasına hazırlanmasıdır. Yağ zerrelere birleşerek büyük yağ damlalarını oluşturmakta, yağ-su emülsiyonu kırılarak zeytin yağı serbest hale gelmektedir. Ortalama 28–32°C’ de 40-70 dk süreyle malaksasyon yapılmaktadır. Sıcaklığın yüksek olması durumunda ise alifatik alkol, triterpen dialkol ve vaks gibi maddelerin çözünürlüğünü artırmakta ve zeytin yağında kusurlara neden olmaktadır (Gemicioğlu, 2016).

Yoğurma işleminden sonra zeytin hamuru dekantöre girmektedir. Ayrıca, üç fazlı sistemlerde ayrışmayı sağlamak amacıyla bir miktar su ilave edilmektedir. Genellikle 100 kg zeytin için 60-110 L arasında değişen su kullanımları mevcuttur

(Gemicioğlu, 2016). Yoğunluk farkına dayalı bu ayrıştırmada zeytin yağı, karasu ve kuru pirina olmak üzere üç ayrı faz tek seferde ayrıştırılmaktadır (Hepsağ ve Kaya, 2018). Hızlı ve verimli bir yöntem olmasına rağmen yüksek miktarda su kullanıldığı ve bazen de sıcak su kullanımına bağlı olarak zeytin yağında olması gereken bazı vitaminler, antioksidanlar ve aromalar suya geçerek zeytin yağında kalite kaybına ve besleyici değerinin azalmasına neden olmaktadır (Kayahan ve Tekin, 2006).

İki fazlı sistemlerde ise farklılık dekantöre su ilavesi yapılmadan ayrıştırmanın gerçekleşmesi, zeytin yağı ve zeytin karasuyunu da içeren yaş pirina olmak üzere iki farklı ürün meydana gelmesidir. Bu sistemle üretim yönteminde zeytine sıcak su eklenmediği ve zeytin hamuru ısıtılmadığı için soğuk sıkım olarak ifade edilmektedir. Bu yöntemle üretilen zeytin yağlarında antioksidanlar, aromalar, vitaminler yağdan uzaklaşmaz, kaliteli ve besleyici değeri yüksek güzel bir zeytin yağı elde edilir (Hepsağ ve Kaya, 2018).

Kaliteli zeytin yağı üretilmesini sağlayan bu sistemler, yine kaliteli üretim sağlayan geleneksel yöntemlere kıyasla oksidasyon ve son ürün hijyeni açısından tercih edilen güvenli üretim yöntemleridir (Tokuşoğlu, 2008).

2.2.3. Sinolea yöntemi

Perkolasyon ve seçici filtrasyonda denilen sinolea sisteminin esası yağ ile suyun metal yüzeylere karşı gösterdiği yüzey gerilim katsayılarının farklı olmasından kaynaklanan tutunma kuvvetindeki farklılıktır. Zeytin hamuruna çelik plakalar daldırılıp çıkarılarak gerçekleşen bu yöntemde yağ, su ve diğer maddelerden önce çelik plaka yüzeyine yapışmaktadır. Lastik taraklar vasıtasıyla plakalara yapışan yağ alınmaktadır. Böylece, en iyi kalitede yağ elde edilmekte ve fazladan başka işlemlere gerek duyulmamaktadır. Bu yöntem ile elde edilen zeytin yağı polifenol içeriği bakımından oldukça zengindir. Ayrıca, elde edilen zeytin yağlarının duyu özelliklerinin iyi olması, biyolojik değeri ve kalitesi bakımından üstün olması, yağ-su ayırma işleminde fazla enerji tüketimi gerektirmemesi bu yöntemin avantajlarındandır (Anonymous, 2007). Bunu yanı sıra, sinolea yöntemi sonucunda kalan pirinadaki yağ oranı oldukça yüksek olduğundan bu yöntem tek başına kullanılmamaktadır. Pirinada kalan yağ almak için pirinaya su katılıp yoğurularak santrifüj edilmektedir (Kayahan ve Tekin, 2006).

2.3. Lipazlar

Canlı hücrelerde üretilen, reaksiyonların hızlanmasına sebep olan, bünyesinde farklı maddeler bulunan, girdiği reaksiyonlardan değişmeden çıkan protein yapısındaki moleküllere enzim denilmektedir (Keha ve ark., 2004). Lipazlar, açıl hidrolaz sınıfında bulunan, tersinir hidrolizlerde kataliz olarak görev yapan enzimlerdir. Lipazlar, esterifikasyon ve transesterleşme tepkimelerinde de kataliz görevi görmektedir. Lipaz enzimi lipid-su ara yüzeyinde aktiftirler (Chen ve ark., 2003; Sayari ve ark., 2005). Farklı orijinlerden türeyen lipazlar apolar organik çözücülerde oldukça kararlıdır. Lipazlar, hidroliz, esterifikasyon, aminoliz, transesterifikasyon ve tiyotransesterifikasyon gibi reaksiyonları katalizlemektedir. Hidroliz ve sentez reaksiyonları arasındaki denge su aktivitesi ile kontrol edilmektedir (Öztürk, 2001).

Trigliseritlerin lipaz enzimi ile hidrolizi sonucu yağ asitleri ve gliserol oluşmaktadır. Spektrofotometri, titrimetri, flurometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile serbest yağ asitlerinin tespiti gibi metotlarla lipaz aktivitesi ölçülebilmektedir (Thompson ve ark., 1999). Hiçbir kofaktöre ihtiyaç duymayan lipazların substratı trigliseritlerdir (Jaeger ve ark., 1994). Lipazlar, ester bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Lipaz enziminin etki ettiği reaksiyonda su bulunmuyor ise tepkime tersinir olarak aktivite göstererek gliserit elde edilmesine sebep olmaktadır.

2.3.1. Lipazların sınıflandırılması

Gliseritleri hidrolize etme yeteneklerine göre lipazlar üç gruba ayrılmaktadır.

1,3-spesifik lipazlar: Terminal grubundan parçalanan lipazlar 1,3 spesifik olarak adlandırılırlar. Triaçilgliserinler ile reaksiyon sonucunda yağ asitleri, 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler oluşmaktadır. 1,2 (2,3)-diaçilgliserinler ve 2-monoaçilgliserinler kararsızdır. Bu gliserinler, 1,3-diaçilgliserinlere ve 1(3)-monoaçilgliserinlere izomerleşmektedir. Böylece oluşan izomerler lipaz enzimi ile tekrar substrat olarak kullanılabilirler.

Spesifik olmayan (Non-spesifik) lipazlar: Bu tip lipazlar primer ve sekonder esterleri parçalayabilmektedir. Reaksiyon sonucunda ara ürün olarak di- ve mono- açıl gliserinler oluşmaktadır.

Yağ asiti spesifik lipazlar: *Geotrichum candidum* ve çimlenmemiş yulaf tohumlarının 9,10 doymamış yağ asitlerinin ester bağlarını parçalamaktadır (Yılmaz, 2010).

2.3.2. Lipaz aktivitesine etki eden faktörler

2.3.2.1. Sıcaklık

Mezofilik mikroorganizmalardan elde edilen lipazlar genel olarak 35-50°C’de, termofilik mikroroganizmalardan elde edilen lipazlar ise 60-80°C’de optimum aktiviteye sahiptir (Wang ve ark, 2007). Mezofilik lipazlar 70°C’den daha yüksek sıcaklıklarda kararsızdır. Ortamda organik çözücü ve deterjan bulunduğunda termo kararlı lipazlar 100°C’ye kadar aktivite göstermektedir (Antranikian, 2008).

Hidrolazlar grubunda bulunan lipaz enzimleri çoğunlukla 30-40°C sıcaklıklarında maksimum aktivite göstermektedir. Hayvan ve bitki kaynaklı lipazların ise mantar ve bakteri lipazlara oranla termal istikrarı daha düşüktür (Fadıloğlu, 1996).

2.3.2.2. pH

pH, protein ve substratının arasındaki ilişkiyi etkileyen önemli faktörlerdendir. pH’nın işlevlerinden birisi olan, bir enzim yüzeyindeki elektrostatik potansiyel dağılımı, belli bir seviyeye kadar o enzimin pH aktivite profilini belirlemektedir (Petersen ve ark, 2001). Lipaz enzimi genel olarak 4-11 arasındaki değerlerinde optimum pH’ya sahiptir.

Aeromonas hydrophila lipazı 5-11 pH aralığında aktivitesini korumaktadır. Ancak, 7.5-9.5 pH aralığında ise artan stabilite değerlerine sahiptir (Neelambari ve ark, 2011). *Aeromonas* sp. EBB-1 lipazı ise pH 6-8’de 6 saat inkübasyona maruz bırakıldığında lipaz aktivitesi %80 oranında korunmaktadır (Charoenpanich ve ark, 2011). Lipazın karakterizasyonunda *A. terreus* kullanıldığında, pH 6-9 aralığında lipazın daha kararlı olduğu tespit edilmiştir (Sethi ve ark, 2016).

2.3.2.3. Reaksiyon süresi

Enzim ve substrat reaksiyon süresinin lipaz enzim aktivitesi üzerindeki etkisi 37°C sıcaklıkta farklı sürelerde inkübe edilerek araştırılmış, sonuç olarak, maksimum

lipaz aktivitesi 30 dk inkübasyon süresinden sonra elde edilmiştir. Ayrıca, 30 dk'lık inkübasyondan sonra lipaz aktivitesinde azalma görülmüştür (Sethi ve ark., 2016).

2.3.2.4. Substrat

Lipaz aktivitesinde etkilediği substrat çeşidine göre farklı etkiler söz konusudur. Tuz sahasından izole edilen *Aeromonas veronii* ile yapılan çalışmada, farklı substratlar (susam, hindistan cevizi, neem ve ayçiçek yağları) kullanılarak lipaz enzim aktivitesi incelendiğinde en yüksek lipaz aktivitesi substrat olarak neem yağı kullanıldığında belirlenmiştir (Kamaladevi ve ark., 2014). *Aeromonas* sp. EBB-1 lipazının, sırasıyla 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 C atomuna sahip, sırasıyla *p*-nitrofenil (*p*NP) esterleri (*p*NP-asetat), bütirat, kaprilat, kaprat, laurat, miristat, palmitat ve stearat bileşikleri ile ilgisi araştırıldığında; bu lipazın en iyi aktiviteyi *p*-nitrofenilpalmitat (*p*NPP) substratı ile gösterdiği belirlenmiştir.

2.3.2.5. Çeşitli maddelerin varlığı

Çeşitli sürfaktanlar lipazın katalitik aktivitesini etkilemektedir. Lipaz aktivitesini ağır metal katyonlarının inhibe ettiği, alkali metal katyonlarının ise artırdığı belirlenmiştir. Ca^{+2} katyonunun lipaz enzim aktivitesi üzerine en etkili iyon olduğu tespit edilmiştir (Öztürk, 2001). Ca^{+2} iyonu zeytin yağının lipaz enzimi ile hidrolizini hızlandırmaktadır. Lipaz aktivitesini inhibe eden birçok materyal bulunmaktadır (Öztürk, 2001; Akoh ve Min, 1998). Hesperidin ve bazı ilgili flavonoid glikozitler (neohesperidin, narirutin, naringin) domuz pankreası ve *Pseudomonas* lipazına karşı inhibe edici aktivitesi test edilmiş, hesperidin ve neohesperidin, domuz pankreası lipaz aktivitesini inhibe etmiş, ancak neohesperidin, *Pseudomonas* lipazına karşı herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir. Narirutin ve naringin ise lipaz inhibe edici aktivite göstermemiştir (Kawaguchi ve ark., 1997). Orlistat, Avrupa'da pankreas lipaz inhibitörü olarak klinik olarak onaylanmış tek farmakolojik ajandır.

2.4. Sıcak suya daldırma

Gıdalarda ön işlem olarak kullanılan sıcak suya daldırma işlemi önemli bir aşamadır (Xin ve ark., 2015). Ohmik ısıtma, mikrodalga ısıtma, buhara maruz bırakma gibi farklı ısıtma yöntemleri olsa da en yaygın kullanılan yöntem geleneksel sıcak suya daldırma yöntemidir. Genellikle bu yöntem, ürünün sıcak suya daldırılarak sabit

sıcaklıkta bekletilmesi ile uygulanmaktadır. Geleneksel sıcak suya daldırma işleminde, ürünün kalitesini korumak için sebzelerin yüzey alanı ne kadar geniş olursa sıcak suya daldırma süresi de aynı oranda azalacaktır (Guida ve ark., 2013).

Sıcak suya daldırma işlemi, besinlerde vitaminlerin yıkımına ve renk kaybına neden olurken, sıcak su sıcaklığı ve daldırma süresi lipaz enziminin inaktive edilmesinde önemli rol oynamaktadır (Zheng ve Lu, 2011). Bunun yanı sıra, gıdalarda yapılan kontrollü haşlama işlemi ile vitaminler ve besin öğeleri daha iyi korunabilmektedir (Keçebaş, 2007). Sıcak suya daldırma işleminin, istenmeyen tat ve kokuya sebep olan enzimlerin inaktivasyonunda, renk, tekstür gibi kalite parametrelerinin korunmasında, mikroorganizmaların yok edilmesinde ve pişirme süresinin kısaltılmasında önemli katkıları bulunmaktadır (Ruiz-Ojeda ve ark., 2013; Xin ve ark., 2015).

2.5. Çalışmaya Öncülük Eden Literatür Verileri

Lipazlar, fizyolojik öneme ve endüstriyel potansiyele sahip biyokatalizörler arasında değişen trigliseritlerin ester bağlarının hidrolizini katalize eden enzimlerdir (Bialecka-Florjanczyk ve ark., 2018).

Yağların gliserit bağlarını hidrolizleyen enzimler lipaz enzimleri olarak adlandırılmaktadır. Hidrolizlenme reaksiyonu sonucunda monogliseritler, digliseritler, gliserol ve çeşitli yağ asitleri oluşmaktadır (Al-Taweel ve Sungur, 1995). Hayvan, bitki ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan lipazlar esterazların özel bir sınıfına dahildir (Metin ve Akpınar, 2000).

Lipaz enzimi, esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları katalizlerken aynı zamanda, hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini de katalizlemektedir. Suda çözünabilir substratları hidrolizleyen lipazlar, suda çözünmeyen lipid substratlarına karşı daha yüksek bir enzim aktivitesi sergilemektedir (Veeraragavan ve ark., 1990). Zeytin yağı üretiminde istenilmeyen enzim lipaz enzimidir. Lipaz aktivitesi sonucunda, yağ asiti ve peroksit değerlerinde artış, polifenol içeriğinde azalış ve böylece zeytin yağının kalitesinde düşüş meydana gelmektedir (Elsorady ve ark., 2017).

Katalitik fonksiyonların daha iyi anlaşılması ve biyokataliz sürecini kontrol etme olanağının elde edilmesi, özellikle bazı lipaz aktivatörleri ve inhibitörlerinin araştırılması, yeni uygulamalar bağlamında çok önemli görünmektedir. Lipaz inhibitörü, doğrudan enzim ile etkileşime girmekte ve lipaz etkisini inhibe etmektedir. Bazı bileşikler, ara faza veya substrat moleküllerine adsorpsiyon yoluyla lipolitik reaksiyonu erteleyebilmektedir (Bialecka-Florjanczyk ve ark., 2018).

Lipaz enzimi üzerinde metal iyonlarının katalitik aktiviteyi arttırıcı etkisinin yanı sıra termal stabiliteyi de yükseltici etkileri bulunmaktadır. Yaygın olarak çalışılmış metal iyonları Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} ve Fe^{2+} 'dir. Ca^{+2} katyonu hemen hemen bütün lipazlar için aktivatör olarak görev yapmaktadır (Ahmed ve ark., 2009). Fosfat ve bazı sürfaktantlar lipaz aktivitesini etkilemez ya da çok az düşürürken, *Enterococcus faecalis* suşlarında safra tuzları enzim aktivitesini kısıtlamaktadır (Kar ve ark., 1996). Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} ve Zn^{2+} gibi iyonlar *B. coagulans* BTS⁻³'de lipaz aktivitesini kısıtlarken, K^{+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} ve Mg^{2+} gibi iyonlar artırmakta, Na^{+} iyonunun ise olumlu ya da olumsuz bir etkisi bulunmamaktadır (Kumar ve ark., 2005).

Hesperidin ve bazı ilgili flavonoid glikozitler (neohesperidin, narirutin, naringin) domuz pankreası ve *Pseudomonas* lipazına karşı inhibe edici aktivitesi test edilmiş, Hesperidin ve neohesperidin, domuz pankreası lipaz aktivitesini inhibe etmiş, ancak neohesperidin, *Pseudomonas* lipazına karşı herhangi bir inhibitör aktivite göstermemiştir. Öte yandan narirutin ve naringin, lipaz inhibe edici aktivite göstermemiştir (Kawaguchi ve ark., 1997).

Hesperidin, turunçgillerin ortak bir fenolik bileşenidir ve epikarp, mezokarp, endokarp ve meyve suyunda bulunur. Ayrıca bu bileşik, P vitamini ve hipotansif maddeler olarak bilinmektedir (Matsubara ve ark., 1985). Hesperidin, neohesperidin, narirutin ve naringin, *Citrus* cinsindeki başlıca flavonoid glikozitlerdir (Rouseff ve ark., 1987; Tosa ve ark. 1988).

Orlistat, Avrupa'da pankreas lipaz (PL) inhibitörü olarak klinik olarak onaylanmış tek farmakolojik ajandır. Bununla birlikte, sentetik ilacın uygulanması, çeşitli istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır. Doğal kaynaklı potansiyel PL inhibitörlerinin araştırılması güncel bir araştırma konusudur. Önceden, potansiyel aktif bileşikler olarak çeşitli polifenoller tespit edilmiştir. Aktif flavonoidlerin inhibe edici etkisi, fenolik hidroksil gruplarının sayısına ve konumuna bağlıdır. Fenolik hidroksil gruplarının yüksek sayısı, inhibitör etkiyi artırmaktadır. Ayrıca, (+) - kateşin ve (-) -

epikateşin olarak esterleşmemiş flavan-3-ol'ler, flavan-3-ol esterlerinden daha düşük bir inhibisyon göstermiştir. Yapıda galloil parçalarının varlığı ve flavan-3-ollerin polimerizasyonu, PL inhibisyonunun güçlendirilmesi için gereklidir. Flavonoidlerin ve antosiyaninlerin analizi, glikosilasyonun ortadan kaldırılmasından sonra daha yüksek bir inhibitör aktivite olduğunu göstermektedir. Ayrıca proantosiyaninlerin polimerizasyon derecesi de önemlidir. Fenolik asitlerin araştırılmasında, hidroksibenzoik asitlerin PL'nin aktivitesini hidroksisinnamik asitlere göre daha az inhibe ettiği söylenebilir. Ek olarak, molekülün boyutu ve hidroksil gruplarının halkadaki konumu lipaz inhibisyonunu etkilemektedir(Buchholz ve Melzig, 2015).

Flavonoidlere ek olarak fenolik asitler en çok lipaz inhibisyonu için yaygın olarak incelenen ikincil metabolit sınıflardır. Fenolik asitlerin temel yapısı hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitlerden oluşmaktadır. Genellikle serbest asitler, esterler, glikozitler veya bağlı kompleksler olarak ortaya çıkar. Son yıllarda, bazılarının PL aktivitesini inhibe etme potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir: Gironés-Vilaplana ve ark., (2014) PL üzerinde potansiyel inhibitör aktivite üzerine İspanyol menşeli (limon, portakal, greyfurt, misket limonu, mandalina) meyveler (*Rutaceae*) ile bir çalışma yapmıştır. Kromatografik ve kütle spektrometrik yöntemler kullanılarak, Turunçgillerin hidrometanolik özütü [% 70 (v/v) metanol] daha detaylı olarak incelenmiştir: 4-O-kumaroilkinik asit, 3-O-kafeoilferuoylkinik asit, 3-O-feruoylquinic asit hidratlı, 3-O-caffeoilquinic asit, 5-O-caffeoilquinic asit, 5-O-feruoylquinic asit hidratlı, ferulik asit, sinapik asit ve 3,5-O-diferuoylquinic asit gibi çeşitli hidroksisinnamik asit türevleri tanımlanabilmiştir. Limon (0.1 mg/mL'de %63.95 inhibisyon) ve limon (0.1 mg/mL'de % 57.17 inhibisyon) meyveler içinde PL üzerinde en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. Bununla birlikte, tespit edilen hidroksisinnamik asitler ile inhibe edici potansiyel arasında hiçbir korelasyon belirlenememiştir (Gironés-Vilaplana ve ark.,2014).

Selenyum ve lityum varlığında pirinç kepeği lipazının aktivitesinin bakıldığı çalışmada 1 mM SeO₂ ve Li₂SO₄konsantrasyonunda, enzim aktivitesini sırasıyla %78 ve%71 kaybetmiştir. Selenyumdioksit varlığında, enzim 1 mM konsantrasyonda %78 aktivite kaybetmiş ve bu konsantrasyonun üzerinde tamamen inaktive edilmiştir. Lityum sülfat varlığında, 1 mM konsantrasyonda enzim aktivitesinin %72'si kaybolmuştur (Gangadhara ve ark.,2010).

C vitamini, oksidatif ayrışma ürünü olarak oksalik asit ve hidrolitik fisyon ürünü olarak furfural ile dehidroaskorbik aside oksitlenebilen bir antioksidandır ve son olarak

belirli koşullar altında furoik aside oksitlenmektedir (Yan ve ark, 2014). Furoik asit ve oksalik asidin lipaz inhibitörleri olarak potansiyeli araştırılmıştır. Sonuçlar, lipaz inhibisyonunun doza bağlı olduğunu göstermiştir. Bu iki inhibitörü ekledikten sonra, göreceli enzim aktivitesi, efektör konsantrasyonunun artmasıyla önemli ölçüde azalmıştır. Sonuçlar furoik asidin tartışmasız bir lipaz inhibitörü olduğunu kanıtlamıştır. Furoik asit ve oksalik asidin lipaz inhibisyon aktivitesi karşılaştırılmış ve özellikle furoik asidin belirgin bir etkisi olduğunu göstermiştir. Furoik asit ve oksalik asit için IC₅₀ sırasıyla 2.12 ± 0.04 ve 15.05 ± 0.78 mM'dir. UV dalga boyu taraması ve floresan söndürme deneyleri, furoik asit inhibisyonunun oksalik aside göre daha güçlü olduğunu kanıtlamıştır. Bu bileşiklerin kimyasal veya mikrobiyal moleküler modifikasyonu, lipaz inhibisyonunun gücünü daha da artırabilmektedir. Nihayetinde bu bileşikler, obezitenin klinik tedavisinde değerli olabilir (Tian-Tian Liu ve ark., 2018).

3 mL'lik bir tahlil sisteminde glikolik asit konsantrasyonu değiştirilmiş ve glikolik asidin lipaz katalizli 4-NPP oksidasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Glikolik asidin 4-NPP'nin lipazla katalize edilmiş oksidasyonu üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu ve etkinin bir doz-tepki ilişkisi sergilediği gösterilmiştir. Lipaz aktivitesini inhibe etmek için IC₅₀ değeri 17.29 ± 0.14 mM'dir (Tian-Tian Liu ve ark.,2020).

Bromheksin, Adhatoda vasica adlı bir bitkide bulunan bir madde olan vazisinin sentetik bir analogu olarak elde edilen sentetik bir maddedir. Viskoz veya aşırı mukusla ilişkili solunum rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılan mukolitik bir ajandır (Ellis ve West, 1970). Ek olarak, bromheksin antioksidan özelliklere sahiptir (Felix ve ark.,1996) ve mukoid balgamdaki asit mukopolisakkarit liflerinin yapısını bozar ve daha az viskoz mukus üretir. Bromheksin şu anda COVID-19 tedavisi için, şüpheli ve hafif yeni koronavirüsü olan hastalarda göğüs tıkanıklığı ve öksürük için bir mukolitik ilaç olarak düşünülmektedir (Maggio ve Corsini, 2020). Bromheksin, transmembran protein serin 2 (TMPRSS2) proteazının seçici bir inhibitörüdür (Lucas ve ark.,2014). Bromheksinin lipaz enzimi için inhibitör etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda, bromheksinin IC₅₀'sinin yaklaşık 0.049 mM olduğunu görüldü, bu da ilacın enzimi yüksek afinite ile inhibe edebileceğini göstermiştir (Gholami ve ark.,2020). Bununla birlikte, bromheksin, yaklaşık 32 mM IC₅₀ ile lipaza karşı orlistattan (güçlü bir lipaz inhibitörü) daha düşük afiniteye sahiptir (Sergent ve ark.,2012), ancak yaklaşık 60 mM IC₅₀ ile disiklominden daha yüksek afinitesi bulunmaktadır (Talebi ve ark., 2018)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada 2020-2021 güz hasat dönemine ait Gemlik çeşiti zeytin örnekleri kullanılmıştır. Zeytinler uygun örnek alma yöntemiyle yaklaşık 40-50 kg olacak şekilde elle toplanmıştır. Temin edilen zeytinler hasattan sonra 1-2 gün içerisinde laboratuvara getirilmiş, yabancı maddelerinden ayrılarak temizlenmiştir. Şebeke suyu ile yıkanarak 1200 gr'lık numune partileri hazırlanmıştır.

Çalışmada inhibitör etki sağlamak amacıyla; soğan kabuğu, portakal kabuğu ve ceviz kabuğu ekstraktları elde edilmiştir. Bu amaçla, atık olarak açığa çıkan kabuklar biriktirilmiştir. SeO_2 çözeltisi (Sigma-Aldrich, Almanya) ve pozitif kontrol olarak orlistat çözeltisi (Xenical, Roche, İsviçre, 120 mglık kapsül içeriği toz ürün) kullanılmıştır.

3.1.1. Olgunlaşma indeksinin belirlenmesi

Uluslararası Zeytinyağı Komisyonunca kabul edilen yöntemde, 1 kg zeytinden rastgele 100 adet zeytin seçilerek olgunlaşma indeksi belirlenmiştir (Boskou, 1996). Yaklaşık 5 indekste zeytinler kullanılmıştır.

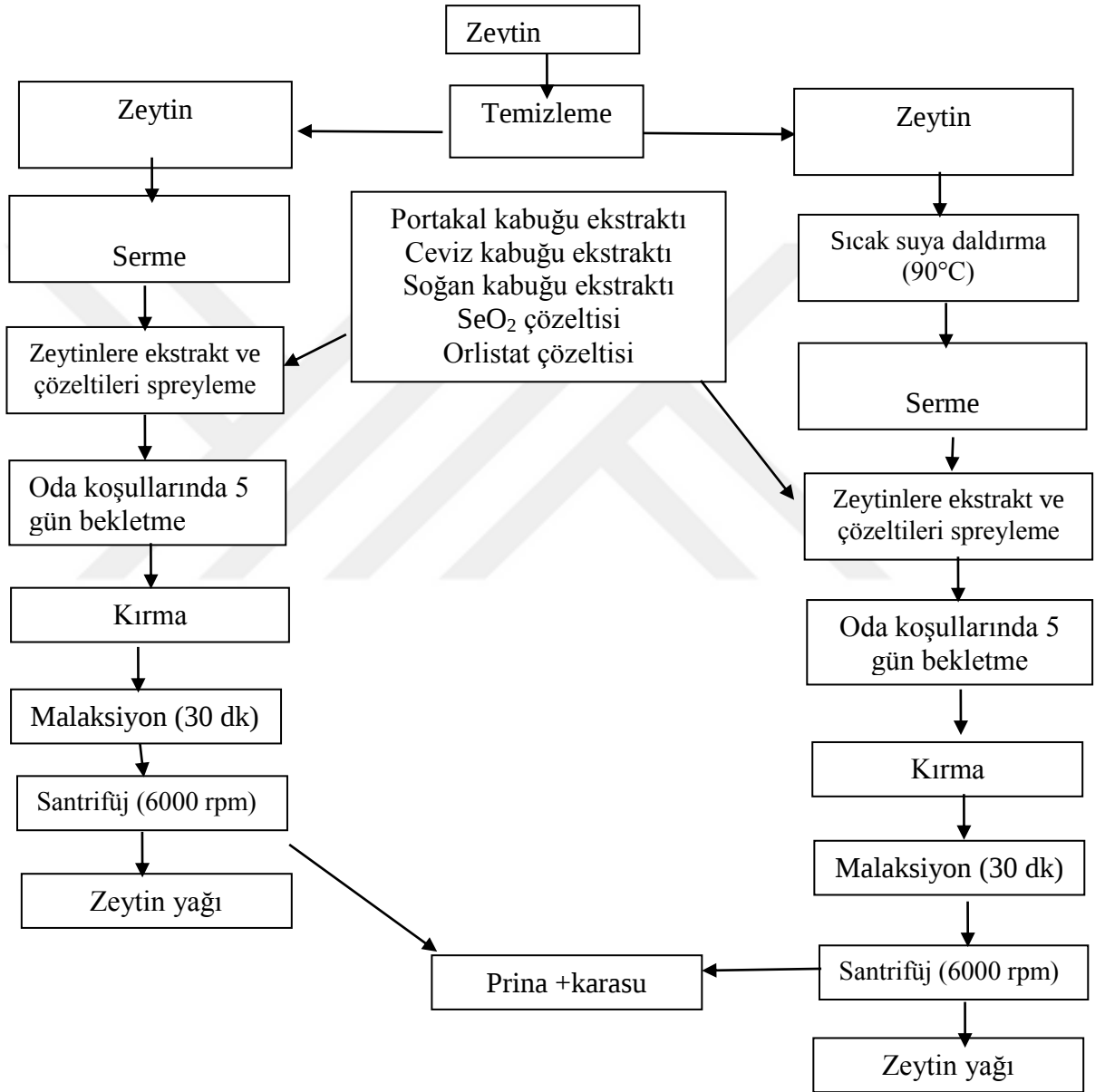
3.2. Metot

Çalışma iki farklı uygulama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan 12 parti zeytin örneğinin ilk 6 tanesi laboratuvarda doğrudan ayrı ayrı olacak biçimde poşetlere serilmiş ve hazırlanmış ekstraktlar ve çözeltiler %5 oranında zeytinlerin her yerine temas edecek şekilde spreylenecek 5 gün oda şartlarında bekletilmiştir. İkinci 6 parti zeytin örneği ise önce 90°C'de 5 dk sıcak suya daldırılmış ve süzülerek ayrı ayrı olacak şekilde laboratuvar tezgâhlarında poşetlerin üzerine serilmiştir. Kuruduktan sonra ekstraktlar ve çözeltiler %5 oranında spreyle uygulanmış ve 5 gün oda şartlarında bekletilmiştir. Bekletme süresi sonunda zeytinler kırma makinesine (Kocamaz, KT 17, Türkiye) konularak kırılmıştır. Kırmanın ardından hamur yoğurma makinesi (Hobart, Corporation, Troy, OH, USA) ile 30 dk yoğurulmuştur. Yoğurma esnasında %10 oranında çeşme suyu ilave edilmiştir. Laboratuvar tipi santrifüj cihazında (Awel Industries, Centrifuge MF 20, France) 6000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek zeytin yağı elde edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra elde edilen zeytin yağı azot gazı altında,

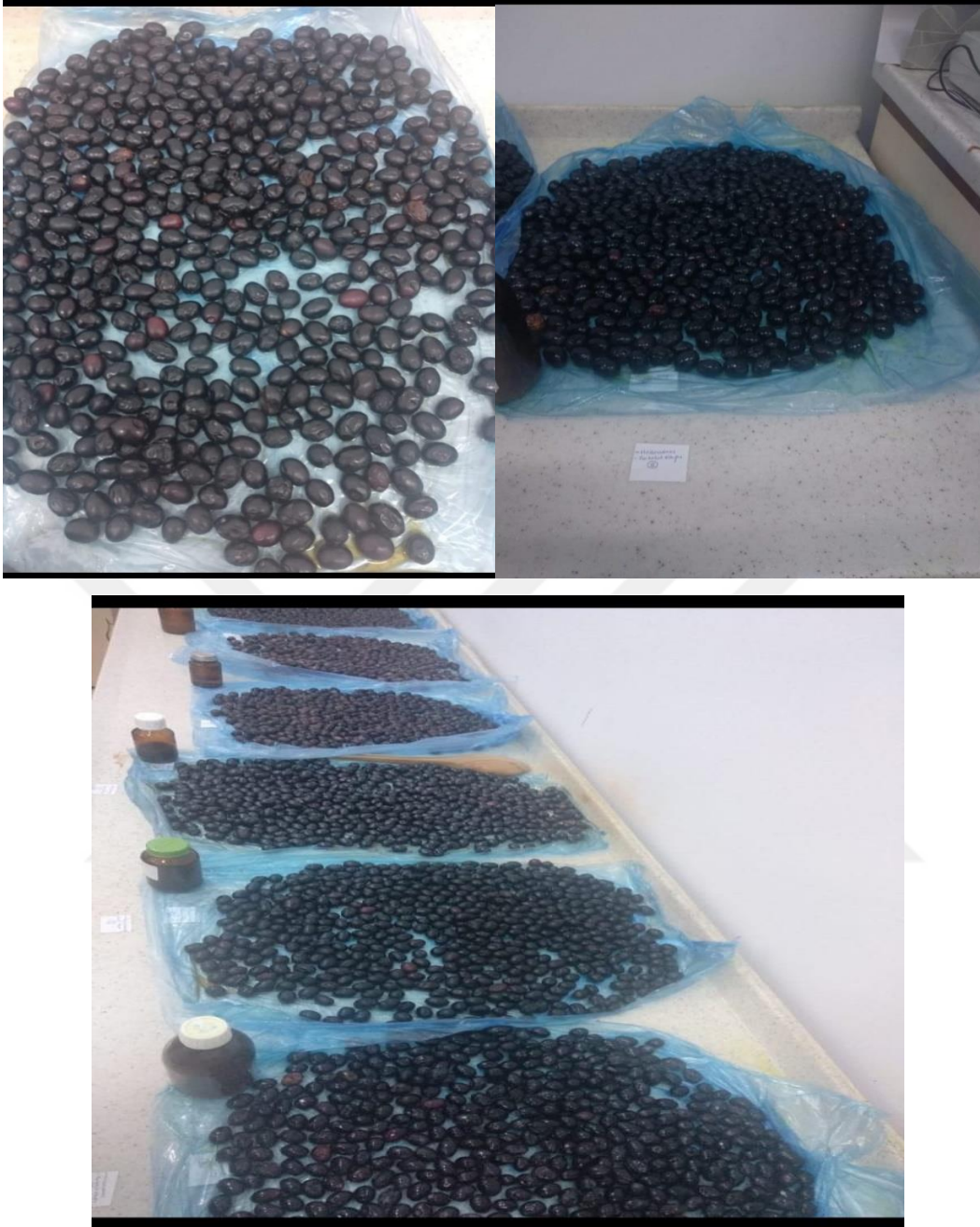
koyu renkli cam şişelere konularak analizlere kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Analizler 3 paralel halinde yürütülmüştür.

3.2.1. İnhibitör olarak kullanılan ekstraktların ve çözeltilerin hazırlanması

Atık olarak biriktirilen soğan, ceviz ve portakal kabukları poşetler içinde laboratuvara taşınmıştır. Soğan ve ceviz kabukları etüvde (Nüve, ES 120, Türkiye) 50 °C’de 3 saat, portakal kabukları ise 50 °C’de 24 saat kurutulmuştur. Kurutulan numuneler laboratuvar tipi paslanmaz çelik öğütücüden (Arsel, Türkiye) geçirilerek toz haline getirilmiştir. Ekstraktları hazırlamak için 4:1(mL/mL) oranlarda etanol ve su karışımı hazırlanmış ve 5:1 oranlarda toz haldeki kabuk ve çözücü karışımı hazırlanmıştır (numune/çözücü oranı ile çözücüdeki etanol/su oranı ön denemelerle belirlenmiştir). Bu karışımlar çalkalamalı su banyosunda çalkalanmış ve süzölmüştür. Ekstraktların kuru madde oranı %20 olacak şekilde 40°C’de evaporatör ile evapore edilmiştir. Ekstraktlar kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Pekic ve ark., 1998; Çöteli ve Karataş, 2017). Toz haldeki SeO₂ ve ilaç olarak kapsül haldeki orlistat çözeltisi ise %5 oranında saf su ile karıştırılıp 50°C’de magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Orlistat, Avrupa’da pankreas lipazını inhibe ettiği klinik olarak kanıtlanmış zayıflama ilacı olarak kullanılan farmakolojik ajandır.



Şekil 3.1. Çalışmada uygulanan yöntemlere ait akım şeması



Şekil 3.2. Ekstrakt uygulanan zeytinlerin görselleri

3.2.2. Zeytinyağında yapılan analizler

3.2.2.1. Zeytin yağı veriminin belirlenmesi

Ekstraksiyon verimi, ekstraksiyon sonunda elde edilen yağ ağırlığının başlangıçta alınan zeytin numunesi ağırlığına oranı şeklinde hesaplanmıştır (Martínez ve ark. 1975). Ekstraksiyon verimi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır:

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

$A_{\text{yağ}}$: ekstrakte edilen yağın kütlesi (kg) ve A_{zeytin} : zeytinin kütlesi (kg).

3.2.2.2. Renk tayini (L^* , a^* , b^*)

Renk bir Minolta Chroma Meter CR-400 (Minolta, Osaka, Japonya) kullanılarak ölçülmüştür. Zeytinyağı örnekleri, 20 mL'lik cam beherlere alınmış, ortamdaki ışıktan etkilenmemesi için etrafı alüminyum folyo ile kaplanarak, renk değerleri cihazın uygun başlığının behere dokundurulması ile her örnek için en az beş ölçüm olacak şekilde kaydedilmiştir. L^* (parlaklık), a^* (kırmızılık) ve b^* (sarılık) değerleri belirlenmiştir (Morello ve ark., 2004).

3.2.2.3. Serbest yağ asitliği tayini

Yüzde serbest yağ asitliği, Anonymous 1989 (AOCS Official Method Ca 5a-40)'a göre yapılmıştır. Yağ örnekleri yaklaşık 2 gr duyarlılıkla bir erlene tartılarak ve 25 mL %95'lik etil alkol ve 50 mL dietil eter eklenilerek çözülmüştür. İndikatör olarak 3-4 damla fenolftalein damlatılarak 0.01 N KOH çözeltisi ile renk pembe oluncaya kadar (30 sn bu renk kalmalı) titre edilmiştir. % serbest yağ asitliği aşağıdaki 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) x 100/1000

3.2.2.4. Peroksit değeri (P_v) tayini

P_v , AOCS Official Method Cd8-53'a göre yapılmıştır. Örneklerden yaklaşık 1 gr 250 mL'lik erlenlere tartılıp, üzerine 10 mL kloroform ve 15 mL asetik asit 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 karıştırılmıştır. 5 dk karanlık ortamda bekletilerek üzerine 75 mL destile su ilave edilmiş ve reaksiyon sonlandırılmıştır. İndikatör olarak nişasta çözeltisinden 3-4 damla ilave edilerek, 0.01 N sodyum tiyosülfat çözeltisi ile titre edilmiştir. P_v aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

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

S: Titrasyonda harcanan sodyum tiyosülfat çözeltisinin mL'si

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

N: Sodyum tiyosülfat çözeltisinin normalitesi

M: Tartılan örnek miktarı, gr

3.2.2.5. UV özgül soğurma değerleri

Özgül soğurma değerleri analizi, AOCS Ch5-91'e göre yapılmıştır. Bu amaçla, yağ örneklerinden 0.1 gr tartılarak 10 mL sikloheksan (Sigma, Amerika) ile tamamlanmıştır. Birincil oksidasyon ürünleri olan konjuge dienler 232 nm, ikincil oksidasyon ürünleri olan özellikle aldehit ve ketonlar 270 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-VIS 1800, Kyoto-Japonya) hekzana karşı ölçülmüştür. Hesaplama aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Anonymous, 2006).

$$\text{Dalga boyundaki soğurma değeri} = A / (c \times l)$$

A: 232 veya 270 nm dalga boyunda ölçülen absorbans

c: Çözelti konsantrasyonu (g/100 mL), l: Küvetteki ışık yolu (1 cm)

3.2.2.6. Duyusal analiz

Her numuneden 15 mL, renk farklılıklarını örtmek için renkli bir kaptan tartılmıştır. Yağların sıcaklığı $28 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de tutulmuştur. Numuneler üç haneli bir rakam ile kodlandırılarak etiketlenmiş ve servis edilmiştir.

Olumlu özellikler meyvemsi, acılık, keskinlik ve tatlılıktır. Olumsuz özellikler paslı/çamurlu tortu, küflü, şarap/sirke –asit/ ekşi, kokuşmuşluk, ransit ve metaliklidir. Renk olarak yeşil/sarı ve doğal olandan farklı niteliklere bakılmıştır. Eklenen ekstraktlardan gelen tat ve koku, toplam tat ve koku, renk yoğunluğu, bulanık ve parçacıklı görünüm kriterleri değerlendirilmiştir. Zeytinyağı numunesi özelliklerinin değerlendirilmesinde 1-9 arası puanlama skalası kullanılmıştır (1: çok kötü, 9: çok iyi). Her örneği 8-10 panelist tatmış ve baskın özellikler için ortalama değer alınmıştır (EEC 640/2008).

3.2.3. Zeytin hamurunda yapılacak analizler

3.2.3.1. Nem içeriği

Zeytin hamurunda nem içeriği belirlenirken 5 gr olarak numuneler tartılmış ve sabit ağırlığa ulaşıncaya kadar $105\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de etüvde 4 saat kurutulmuştur. Aşağıdaki formül ile nem oranı % olarak belirlenmiştir (AOAC International, 2005).

m_1 : Tartım yapılan kabın darası, m_2 : etüvden çıkan numune son tartım, M: munune miktarı: % nem= $[(m_2-m_1)/m]\times 100$

3.2.3.2. Lipaz aktivitesi

Reaksiyon çözeltisi, sırasıyla 95:4:1 oranında 100 mM pH 7.0 fosfat tamponu, etanol ve 50 μM para-nitrofenol bütirat (pNPB) karışımı ile hazırlanmıştır. 0.3 gr zeytin yğı örneğine 2.7 mL reaksiyon çözeltisi ilave edilmiş ve 60°C 'de 15 dk su banyosunda bekletilmiştir. Su banyosundan çıkarılan numune tüpleir -18°C 'de 8 dk bekletilmiş ve reaksiyon sonlanmıştır. 400 nm'de absorbsanları ölçülmüştür (Lee ve ark., 1999).

$$\text{Unit/mg enzim} = (\Delta\text{OD} \times V_f) / (\epsilon_{400\text{nm}} \times t \times b \times V_e)$$

OD = Optik yoğunluk, $\Delta\text{OD} = \text{OD}_{400\text{ nm}} \text{ Örnek} - \text{OD}_{400\text{ nm}} \text{ Kör}$

V_f = Toplam reaksiyon hacmi (2.7 mL)

$\epsilon_{400\text{nm}}$ = p-nitrofenolün milimolar sönme katsayısı (5.081 L/mM)

t = reaksiyon süresi (15 dk)

b = ışık yolu (1 cm)

V_e = reaksiyon karışımındaki enzim hacmi (0.3 gr).

3.2.4. İstatistiksel analiz

Verilerin istatistiksel analizleri, SPSS istatistik programı (IBM SPSS Statistics 22.0, New York, ABD) ile varyans analizi (ANOVA) kullanılarak yapılmıştır. Ortalama değerler arasındaki farklılık ($P<0.05$) Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri UV özgül soğurma değerleri ile ilgili veriler

Bu çalışmada, lipaz enzimi üzerine inhibitör etki göstermeleri amacıyla soğan kabuğu, ceviz kabuğu, portakal kabuğu ekstraktları, SeO_2 ve orlistat çözelti halinde zeytinlere spreyle uygulanmıştır. Ayrıca sıcak suya daldırma işleminin de enzim aktivitesi ile verim ve yağ kalite parametreleri üzerinde etkileri belirlenmiştir. Zeytinler yağa işlenmeden önce depolama sırasında uygulanan bu işlem ile serbest yağ asitliği oluşumunun yavaşlatılması hedeflenmiştir. Elde edilen zeytin yağı numunelerinde verim, renk, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, UV özgül soğurma analizleri yapılmıştır. Zeytin hamurunda ise nem içeriği ve lipaz aktivitesi analizleri yapılmıştır. Çizelge 4.1’de zeytinlere uygulanan ön işlemlerin zeytin yağı kalite kriterleri ve verim üzerine etkileri verilmiştir. Çizelge 4.2’de ise ekstrakt, orlistat ve SeO_2 uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların verim, asitlik ve bazı oksidasyon parametrelerinin çoklu karşılaştırma testi sonuçları verilmiştir. Çalışmada uygulanan işlemlerden sıcak suya daldırma işleminin zeytin yağı verimi üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Ancak daldırma işlemi diğer ekstaklarla birlikte sinerjistik etki yaparak verimi artırıcı etki göstermiştir. Verim %25.27-36.11 arasında değişirken, en az verim artışı soğan kabuğu ekstraktı ve orlistat tek başına uygulandığında, sadece sıcak suya daldırma uygulamasında ve sıcak suya daldırılarak SeO_2 çözeltisinin spreylendiği uygulamalarda görülmüştür. En yüksek verim artışı ise sıcak suya daldırılan ve portakal kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. Ceviz kabuğu ve soğan kabuğu ekstraktı uygulanan zeytinlerde de verimde artış gerçekleşmiştir. Bunun yanı sıra, sıcak suya daldırma işlemiyle birlikte bu ekstraktların uygulanmasıyla verimde artışların daha fazla olduğu görülmüştür. Ekstraktların yağ verimini artırıcı etkisi, içerdikleri yüksek miktarlarda polifenol bileşiklerinin hücre zarı proteinlerini etkileyerek zarın gevreklenmesi ve bu sayede yağ globüllerinin daha kolay alınabilmesi ile açıklanabilir.

Çizelge 4.1’de görülen kalite parametreleri kapsamında, serbest asitlik, peroksit değeri K_{232} ve K_{270} değerleri yer almaktadır. Zeytin yağlarının serbest yağ asitliği %0.74-1.08 arasında değişmiş ve uygulanan işlemlerden önemli ölçüde etkilenmiştir. Daldırma işlemi uygulanmadan ekstrakt ve çözeltilerin uygulanması işlemi sonucu serbest asitlik değerleri %0.74-0.87 aralığında değişmiştir.

Çizelge 4.1. Ekstrakt, orlistat ve SeO₂ uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların verim, serbest asitlik ve bazı oksidasyon testlerine ait sonuçlar

Numune adı		Verim (%)	Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	Peroksit değeri (meq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀
Sıcak suya daldırılmamış	Kontrol	25.34±0.27f [§]	0.89±0.03d	22.11±1.38ab	0.638±0.07b	0.0098±0.0006cd
	Soğan kabuğu ekstraktı	26.54±1.71ef	0.80±0.01ef	22.80±1.98a	0.504±0.07e	0.0083±0.0003fg
	Ceviz kabuğu ekstraktı	34.90±1.66ab	0.87±0.01d	17.53±0.69cd	0.635±0.03b	0.0098±0.0003cd
	Portakal kabuğu ekstraktı	28.30±2.00de	0.78±0.03f	18.20±0.76c	0.612±0.07bc	0.0101±0.0003cd
	Orlistat	26.62±0.64ef	0.81±0.01e	14.82±0.66e	0.401±0.03f	0.0086±0.0004ef
	SeO ₂	25.27±1.41f	0.74±0.01g	17.37±0.59cd	0.542±0.04de	0.0083±0.0005fg
Sıcak suya daldırılmış	Kontrol	25.50±0.99ef	0.87±0.01d	22.52±1.33a	0.763±0.04a	0.0132±0.0001a
	Soğan kabuğu ekstraktı	30.79±1.39cd	0.93±0.01c	22.35±0.52a	0.592±0.06c	0.0093±0.0004de
	Ceviz kabuğu ekstraktı	33.09±1.60bc	1.08±0.01a	21.42±0.66b	0.638±0.05b	0.0105±0.0001c
	Portakal kabuğu ekstraktı	36.11±2.83a	1.02±0.01b	17.12±0.75d	0.759±0.04a	0.0122±0.0007b
	Orlistat	29.51±1.64d	0.93±0.01c	17.86±0.48cd	0.640±0.04b	0.0099±0.0006cd
	SeO ₂	25.55±0.62ef	0.80±0.01ef	17.75±0.96cd	0.548±0.07d	0.0077±0.0001g

*Ortalama değer±standart sapma

§ Aynı sütundaki istatistiksel farklılıklar farklı küçük harflerle gösterilmiştir (P<0.05)

Çizelge 4.2. Ekstrakt, orlistat ve SeO₂ uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların verim, asitlik ve bazı oksidasyon parametrelerinin Duncan çoklu karşılaştırma testi sonuçları

<i>Uygulamalar</i>	Verim (%)	Serbest yağ asitliği (% oleik asit)	Peroksit değeri (meq O₂/kg)	K₂₃₂	K₂₇₀
Sıcak suya daldırılmamış	27.83±3.62b [§]	0.81±0.05b	18.82±2.94b	0.009±0.0001b	0.009±0.0008b
Sıcak suya daldırılmış	30.09±4.18a	0.94±0.09a	19.85±2.41a	0.012±0.0001a	0.011±0.0018a
<i>Ekstraktlar ve çözeltiler</i>					
Kontrol	25.45±0.53c	0.87±0.04d	22.46±0.16a	0.678±0.008b	0.011±0.00b
Soğan kabuğu ekstraktı	29.37±0.52b	0.89±0.02c	22.50±0.17a	0.562±0.007d	0.009±0.00d
Ceviz kabuğu ekstraktı	33.70±0.53a	1.01±0.01a	20.12±0.16b	0.637±0.008c	0.010±0.00c
Portakal kabuğu ekstraktı	33.51±0.52a	0.94±0.02b	17.48±0.15c	0.710±0.009a	0.012±0.00a
Orlistat	28.55±0.52b	0.89±0.02c	16.85±0.16d	0.560±0.007d	0.009±0.00d
SeO₂	25.46±0.51c	0.78±0.01e	17.63±0.16c	0.546±0.008d	0.008±0.00e

*Sonuçlar üç tekerrürün ortalamasıdır.

[§]Farklı harfle işaretlenmiş, aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).

Kontrol örneği ile kıyaslandığında ekstraktlar serbest yağ asitliğinde düşüşe neden olmuştur. Portakal kabuğu ekstraktı en fazla düşüşe neden olan ekstraktır (0.78, % oleik asit). Çizelge 4.1'e göre sıcak suya daldırma işlemi uygulanmış ve uygulanmamış örneklerden serbest yağ asitliği en düşük olan yağ SeO_2 çözeltisi ile muamale edilen zeytinlerden elde edilmiştir. Bunun dışında, sıcak suya daldırılmamış örneklerde, serbest yağ asitliğini düşüren ekstraktlar sırasıyla portakal ve soğan kabuğu ekstraktları iken bunu orlistat çözeltisi uygulanmış örnekler takip etmiştir. Zeytinler sıcak suya daldırılmadan ceviz kabuğu ekstraktı uygulanarak elde edilen zeytin yağı ile kontrol zeytin yağının asitlik değeri üzerine istatistiki olarak önemli bir etkisi olmamıştır.

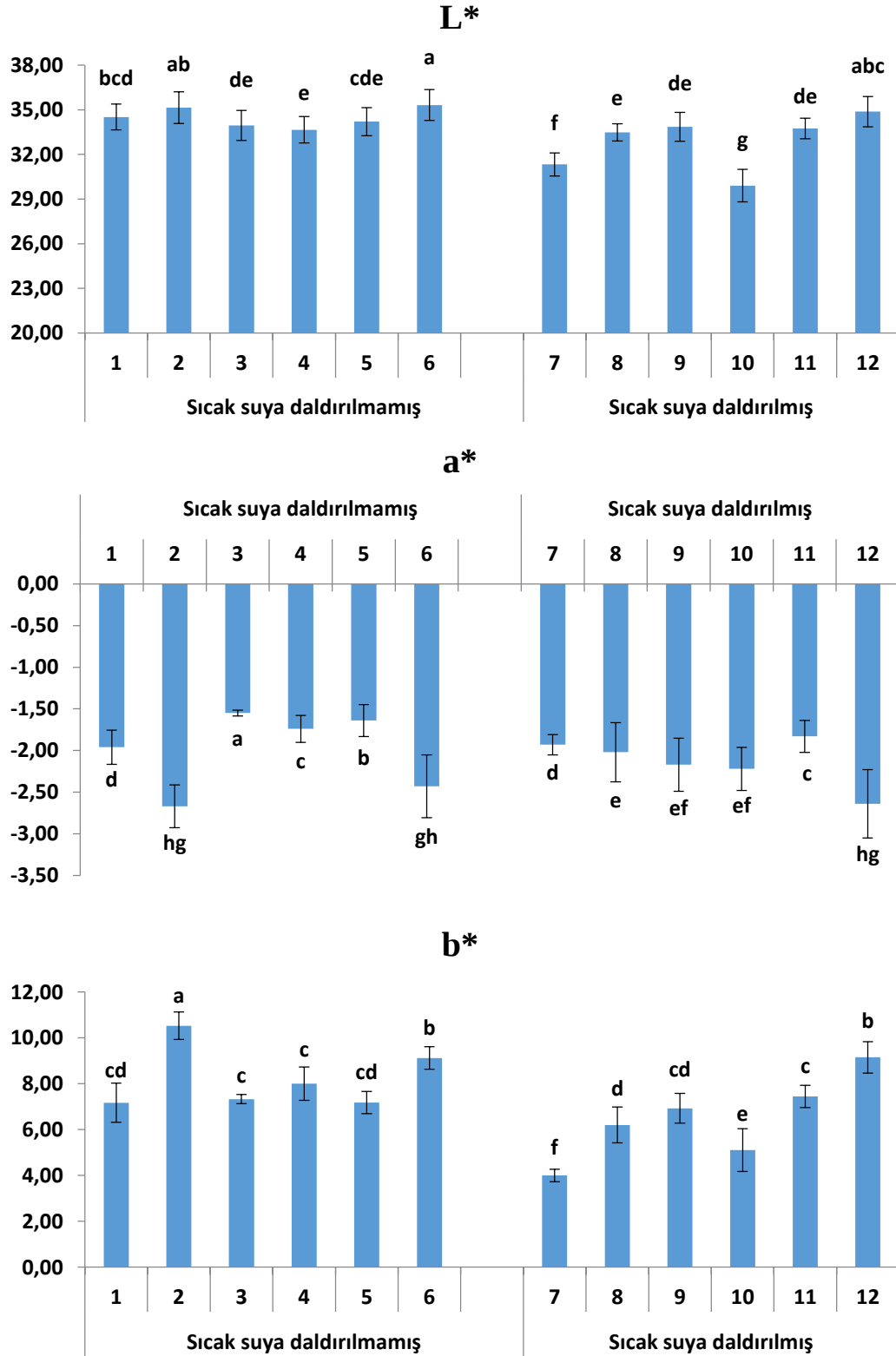
Sıcak suya daldırma işlemi kontrol örneğinde serbest yağ asitliği üzerinde istatistiki olarak önemli bir etki oluşturmamıştır. Ancak sıcak suya daldırılarak ekstrakt uygulanan (SeO_2 uygulanan örnek hariç) zeytinlerden elde edilen yağların serbest yağ asitliğinde artış meydana gelmiştir. Bu olumsuz etki sırasıyla en çok ceviz, portakal, soğan kabuğu ekstraktları ve orlistat çözeltisi uygulanan örneklerde görülmüştür. Bunun yanı sıra, serbest yağ asitliğindeki artışların sıcaklık artışı ile hücre zarı geçirgenliğinin artması ve su varlığında lipazın aktive olması, dolayısıyla hidrolizin artmasından kaynaklandığı ileri sürülebilir. Sıcak suya daldırılmış ve ekstraktlar ile işlem görmüş örneklerde serbest yağ asitliğinde artış olmasının sebebinin, bu işlemlerin yağ globüllerinin yapısının enzim için daha kullanışlı bir substrat haline getirmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Sıcak suya daldırılmış örneklerdeki en düşük asitlik değeri SeO_2 çözeltisi uygulanan örnekte tespit edilmiş ve % oleik asit cinsinden 0.80 ± 0.01 olarak belirlenmiştir. En yüksek serbest asitlik değeri (1.08 ± 0.01) ise sıcak suya daldırılarak ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerle aittir.

Çizelge 4.1'den görüldüğü gibi, zeytin yağı örneklerinin en düşük ve en yüksek peroksit değerleri sırasıyla 17.12 ± 0.75 ve 22.80 ± 1.98 meq O_2/kg olarak belirlenmiştir. Soğan kabuğu ekstraktı ile muamele edilmiş zeytinlerden elde edilen yağda kontrole kıyasla peroksit değeri az da olsa artmıştır. Ceviz kabuğu ekstraktı, portakal kabuğu ekstraktı, orlistat ve SeO_2 'nin peroksit değerini düşürdüğü görülmüştür. En düşük peroksit değeri orlistatla muamele gören zeytinlerin yağlarında tespit edilmiştir. Sıcak suya daldırılan zeytinlerde ceviz kabuğu ekstraktı ve orlistat uygulaması ile peroksit değerleri daha yüksek tespit edilmiştir. Portakal kabuğu ekstraktı uygulaması ise sıcak suya daldırma işlemiyle veya bu işlem uygulanmadan, peroksit sayısında azalma sağlamıştır.

Zeytin yağlarında birincil oksidasyon ürünlerinin absorpsiyonunu gösteren 232 nm ve ikincil oksidasyon ürünlerinin absorpsiyonunu gösteren 270 nm dalga boyları yağın kalite ve oksidatif değişiklikleri hakkında bilgi verebilmektedir. Zeytin yağı örneklerinin K_{232} ve K_{270} değerlerinin sonuçları ve değişimleri Çizelge 4.1’de gösterilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre sıcak suya daldırma işleminin K_{232} ve K_{270} değerlerini kontrole kıyasla önemli ölçüde yükselttiği görülmüştür. SeO_2 ve Orlistat, K_{232} ve K_{270} değerlerini en fazla düşüren uygulamalardır, ancak portakal ve ceviz kabuğu ekstraktları da etkili düşüşler sağlamıştır.

4.2. Zeytin yağı renk değerleri (L^* , a^* , b^*) değişimi

Zeytin yağı örneklerine ait renk değerleri (L^* , a^* , b^*) Şekil 4.1’de verilmiştir. Elde edilen zeytin yağlarında L^* (parlaklık) değeri 29.00-35.00 aralığında değişkenlik göstermiştir. Parlaklığı en fazla olan örnek sıcak suya daldırılmadan SeO_2 çözeltisi uygulanarak elde edilen zeytin yağlarında görülürken, en az olan örnek ise sıcak suya daldırılarak portakal kabuğu ekstraktı uygulanan zeytinlerin yağlarında belirlenmiştir. Her iki uygulamada da SeO_2 çözeltisi uygulanan örneklerin parlaklık değerleri en yüksektir. Ekstrakt ilavesi sonucu en yüksek L^* değeri gösteren örnek sıcak suya daldırılmamış örneklerde soğan kabuğu ekstraktı uygulanan örnekler iken, suya daldırılmış örneklerde ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerdir. Zeytin yağı örneklerinin a^* (yeşillik-kırmızılık) değerlerine bakıldığında, soğan kabuğu ekstraktı ve sıcak suya daldırılarak SeO_2 çözeltisi uygulanan örneklerde yeşillik en yüksek değerde iken ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan zeytinlerden elde edilen zeytin yağı örneğin yeşilliği daha az tespit edilmiştir. Sıcak suya daldırma işlemi kontrol örneğine göre önemli bir fark oluşturmazken, sıcak suya daldırıldıktan sonra ekstrakt uygulaması a^* değerini düşürmüştür. Örneklerin b^* (mavilik-sarılık) değerlerine bakıldığında ise, en yüksek değer sıcak suya daldırılmadan soğan kabuğu ekstraktı uygulanan örnekte tespit edilmiş ve kontrol örneğinden daha sarı bulunmuştur. En düşük b^* değeri sadece sıcak suya daldırılmış kontrol örneğinde belirlenmiş, ancak sıcak suya daldırılarak SeO_2 çözeltisi uygulaması sonucu b^* en yüksek değere ulaşmıştır.



Şekil 4.1. Zeytin yağı örneklerine ait L*, a*, b* değerleri

1: kontrol, 2: soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış, 3: ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış, 4: portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış, 5: orlistat çözeltisi uygulanmış, 6: SeO₂ çözeltisi uygulanmış, 7: sıcak suya daldırma, 8: sıcak suya daldırma + soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış, 9: sıcak suya daldırma + ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış, 10: sıcak suya daldırma + portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış, 11: sıcak suya daldırma + orlistat çözeltisi uygulanmış, 12: sıcak suya daldırma + SeO₂ çözeltisi uygulanmış

4.3. Zeytin hamurunun nem içeriği

Zeytin hamuru örneklerinin nem içerikleri Çizelge 4.3’de verilmiştir. Çizelge 4.4’te ise zeytin hamurlarında nem ve lipaz aktivitesi değerlerine ait çoklu karşılaştırma test sonuçları verilmiştir. Zeytin hamurlarının nem içerikleri %39.53-44.73 arasında değişmiştir. En yüksek nem değerleri %44.73 nem içeriği ile ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerde görülmüştür. %50’den fazla nem içeren zeytin hamurları yağ ekstraksiyonunu zorlaştırmaktadır (Di Giovacchino, 1991). Analiz sonuçlarına göre nem miktarları ceviz, soğan, portakal kabuğu ekstraktları ile belirgin ölçüde artmıştır. Bu artış içinde en büyük etki ceviz kabuğu ekstraktı ile olmuştur. Sıcak suya daldırma işleminin portakal kabuğu ekstraktı ve SeO_2 uygulanan örneklerde nem içeriğini bir miktar artırdığı görülmüştür ($P<0.05$). Diğer uygulamalarda sıcak suya daldırma işlemi ile nem miktarında düşüş görülmüştür. Yani, uygulanan işlem, kullanılan ekstrakt ve çözeltiler zeytin hamurlarının nem miktarlarında farklılıklar gözlenmiş, ancak düzenli bir artış veya azalış tespit edilmemiştir.

Zeytin yağı örneklerinin lipaz aktivitesi 0.0822-0.1057 U/g arasında değişmektedir (Çizelge 4.3). Lipaz aktivite değişimine bakıldığında en düşük değeri SeO_2 çözeltisi uygulanan örnekler vermiştir. Gangadhara ve ark. (2010) lipaz enziminin SeO_2 varlığında (1 Mm)aktivitesinin %78 oranda kaybettiği tespit edilmiştir. Sıcak suya daldırılmamış örneklerde soğan ve portakal kabuğu ekstraktları lipaz aktivitesini önemli seviyede düşürmüş, sıcak suya daldırılmış örneklerde orlistat çözeltisi uygulanan örnekler takip etmiştir. Sergent ve ark., (2012) domuz PL’ı üzerinde yaptıkları araştırmada soğan kabuğunda bulunan kuersetinin güçlü bir lipaz inhibitörü olduğunu tespit etmişlerdir. Suya daldırma işlemi uygulanmadığında bütün ekstraktlar lipaz aktivitesini bir miktar düşürmüş, ancak ceviz kabuğu ekstraktının kullanılması kontrol örneğine göre lipaz aktivitesini bir miktar düşürürken istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmamıştır. Sıcak suya daldırma işlemi kontrol örneğine göre çok az düşüş göstermiş, istatistiksel olarak önemli bir fark yaratmamıştır. Ayrıca, sıcak suya daldırıldıktan sonra ekstrakt ve çözeltilerin uygulandığı zeytin yağı örneklerinin lipaz aktivitesinde beklenilenin aksine artış tespit edilmiştir. Portakal kabuğunda bulunan neohesperidin ve nargininin domuz pankreası ve *Pseudomonas* lipazına karşı inhibe edici aktivitesi belirlenmiştir (Kawaguchi ve ark., 1997). Soğan, ceviz ve portakal kabuğu ekstraktları da sıcak suya daldırma işlemiyle bir arada uygulandığında antagonistik etki ederek lipaz aktivitesinde artışa sebep olmaktadır.

Çizelge 4.3. Çalışılan zeytin hamurlarında nem ve lipaz aktivitesi analiz sonuçları

	Numune adı	Nem içeriği (%)	Lipaz aktivite değişimi (U/g)
Sıcak suya daldırılmamış	Kontrol	40.52±0.87fg [§]	0.0986±0.0017b
	Soğan kabuğu ekstraktı	43.12±1.22b	0.0873±0.0035c
	Ceviz kabuğu ekstraktı	44.73±1.28a	0.0954±0.0051b
	Portakal kabuğu ekstraktı	41.55±0.75 de	0.0873±0.0029c
	Orlistat	40.81±0.71ef	0.0947±0.0027b
	SeO ₂	39.73±0.27gh	0.0822±0.0029c
Sıcak suya daldırılmış	Kontrol	39.53±0.89h	0.0958±0.0052b
	Soğan kabuğu ekstraktı	41.80±0.71cd	0.0970±0.0014b
	Ceviz kabuğu ekstraktı	43.40±0.87b	0.1057±0.0038a
	Portakal kabuğu ekstraktı	42.61±0.54bc	0.1053±0.0058a
	Orlistat	40.43±1.05fgh	0.0966±0.0014b
	SeO ₂	42.06±1.05cd	0.0819±0.0029c

*Ortalama değer±standart sapma

§ Aynı sütundaki istatistiksel farklılıklar farklı küçük harflerle gösterilmiştir (P<0.05)

Çizelge 4.4. Çalışılan zeytin hamurlarında nem ve lipaz aktivitesi değerlerine ait Duncan çoklu karşılaştırma test sonuçları

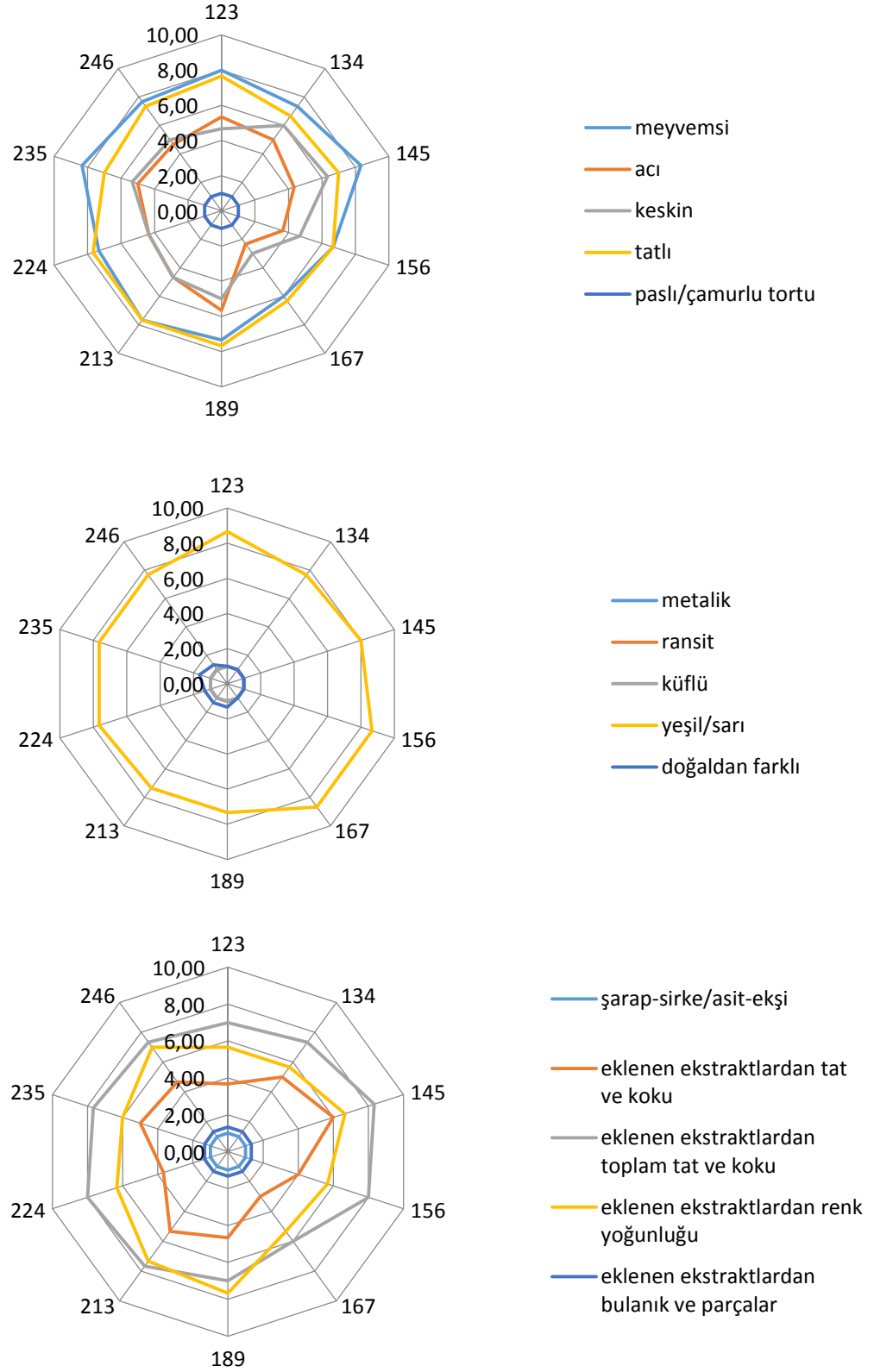
Uygulamalar	Nem (%)	Lipaz aktivite değişimi (U/g)
Sıcak suya daldırılmamış	41.74±0.12a [§]	0.90±0.001b
Sıcak suya daldırılmış	41.64±0.12a	0.97±0.001a
Ekstraktlar ve çözeltiler		
Kontrol	39.86±0.17e	0.97±0.001bc
Soğan kabuğu ekstraktı	42.24±0.17b	0.094±0.001c
Ceviz kabuğu ekstraktı	43.85±0.17a	0.102±0.001a
Portakal kabuğu ekstraktı	42.26±0.17b	0.098±0.001b
Orlistat	40.56±0.17d	0.096±0.001bc
SeO ₂	41.28±0.17c	0.082±0.001d

*Sonuçlar üç tekerrürün ortalamasıdır.

§Farklı harfle işaretlenmiş, aynı sütundaki ortalamalar istatistiki olarak birbirinden farklıdır (P<0.05).

4.4. Duyusal analiz sonuçları

Duyusal analiz için kullanılan çizelge EK 1 ve EK 2’de verilmiştir. Meyvemsilik, tatlılık, acılık, keskinlik özellikleri, yeşil/sarı ve doğal renkten farklı olan renk özellikleri ile “eklenen ekstraktlardan gelen toplam tat ve koku”, “eklenen ekstraktlardan gelen bulanıklık”, şarap-sirke/asit-ekşi özellikleri uygulamalardan önemli seviyede etkilenmemiştir (Şekil 4.2). Sıcak suya daldırılan (189 numaralı örnek) örneklerden elde edilen zeytin yağı daha belirgin bir acı tada sahiptir. Meyvemsilik açısından en yüksek skor ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. Orlistat ile muamele gören zeytinlerin yağında ise acılıkta düşüş algılanmıştır. Hiçbir yağ örneğinde paslı/çamurlu-tortu, küflü ve asit-ekşi gibi olumsuz nitelikli tatlar algılanmamıştır. Soğan kabuğu (134 ve 213. örnekler), ceviz kabuğu (145. örnek) ve portakal kabuğu (156 ve 235. örnekler) ekstraktları uygulanan zeytinlerin yağlarında az da olsa ekstraktlara özgü tat ve koku algılanmıştır. Eklenen ekstraktlardan renk yoğunluğu üzerine sıcak suya daldırma işleminin önemli etkisi olduğu görülmüştür. Genel olarak zeytin yağı numunelerinin hiçbirisi için eklenen ekstraktan kaynaklı bulanıklık ve parçacıklı bir görüntü belirtilmemiştir.



Şekil 4.2. Zeytin yağı örneklerinin duyu analizi grafikleri

123: kontrol, 134: soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış, 145: ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış, 156: portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış, 167: orlistat çözeltisi uygulanmış, 189: sıcak suya daldırma, 213: sıcak suya daldırma + soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış, 224: sıcak suya daldırma + ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış, 235: sıcak suya daldırma + portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış, 246: sıcak suya daldırma + orlistat çözeltisi uygulanmış

4.5. Pearson korelasyon sonuçları

Zeytin yağı örneklerinin verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, UV özgül soğurma değerleri (K_{232} ve K_{270}), renk parametreleri (L^* , a^* , b^*), zeytin hamurunun nem içeriği ve lipaz aktivitesi arasındaki Pearson korelasyon katsayıları belirlenmiş ve Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Özellikle, L^* , b^* değerleri ve lipaz aktivitesi arasında önemli negatif bir korelasyon hesaplanmıştır. L^* ve b^* değerleri ile K_{232} ve K_{270} arasındaki güçlü negatif ilişki, ikincil oksidasyon ürünlerindeki artış ile yağların renginin koyulaştığını göstermiştir. Serbest yağ asitliği değerleri ile K_{232} , K_{270} ve lipaz aktivitesi değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon belirlenmiştir ($P < 0.05$). Lipaz aktivitesi, K_{232} ($r = 0.373$, $P < 0.05$) ve K_{270} ($r = 0.566$, $P < 0.01$) ile anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir. Peroksit değeri ise diğer parametreler ile önemli bir korelasyon göstermemiştir.

Çizelge 4.5. Zeytin yağı örneklerinin verim, serbest yağ asitliği, peroksit değeri, K_{232} , K_{270} , L^* , a^* , b^* değerleri, zeytin hamuru nem içeriği ve lipaz aktiviteleri arasındaki Pearson korelasyon katsayıları

	Verim	Serbest yağ asitliği	Peroksit değeri	K_{232}	K_{270}	L^*	a^*	b^*	Nem içeriği	Lipaz aktivitesi
Verim	1									
Serbest yağ asitliği	0.653**	1								
Peroksit değeri	-	-	1							
K_{232}	0.503**	0.513**	-	1						
K_{270}	0.555**	0.588**	-	0.855**	1					
L^*	-0.474**	-0.529**	-	-0.777**	-0.900**	1				
a^*	-	-	-	-	-	-	1			
b^*	-0.353*	-0.536**	-	-0.627**	-0.745**	0.813**	-0.515**	1		
Nem içeriği	0.628**	-	-	-	-	-	-	-	1	
Lipaz aktivitesi	0.532**	0.841**	-	0.373*	0.566**	-0.535**	0.339*	-0.651**	-	1

**Korelasyon 0.01 düzeyinde önemlidir

*Korelasyon 0.05 düzeyinde önemlidir

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Zeytin yağının önemli kalite parametrelerinden olan serbest yağ asitliğinin artışının engellenmesinin hedeflendiği çalışmada, ekstraksiyon öncesi zeytinler sıcak suya daldırma işlemine ve/veya farklı ekstrakt ve çözeltilerin uygulanmasına tabi tutulmuştur. SeO_2 'i takiben sırasıyla orlistat, soğan kabuğu ve portakal kabuğu lipaz aktivitesinde düşüşe sebep olmuştur. Ceviz kabuğu ve sıcak suya daldırma beklenen inaktivasyonu sağlamamıştır. Sıcak suya daldırma ile beraber ekstraktların uygulanması lipaz aktivitesinde artışa neden olmuştur.

Çalışmada uygulanan işlemlerden sıcak suya daldırma işleminin zeytin yağı verimi ve serbest yağ asitliği ve lipaz aktivitesi üzerinde üzerine önemli bir etkisi görülmemiştir. Sıcak suya daldırma işleminin K_{232} ve K_{270} değerlerini kontrole kıyasla önemli ölçüde yükselttiği görülmüştür. Ancak daldırma işlemi diğer ekstaktlarla birlikte verimi artırıcı etki göstermiştir. En yüksek verim artışı ise sıcak suya daldırılan ve **portakal kabuğu ekstraktı** uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. Ceviz kabuğu ve portakal kabuğu ekstraktı uygulanan zeytinlerde de verimde artış gerçekleşmiştir.

Kontrol örneği ile kıyaslandığında ekstraktlar serbest yağ asitliğinde düşüşe neden olmuştur. **Portakal kabuğu ekstraktı** en fazla düşüşe neden olan ekstrakttır. Bunun dışında, sıcak suya daldırılmamış örneklerde, serbest yağ asitliğini düşüren ekstraktlar sırasıyla portakal ve soğan kabuğu ekstraktları iken bunu orlistat çözeltisi uygulanmış örnekler takip etmiştir. Ancak sıcak suya daldırılarak ekstrakt uygulanan zeytinlerden elde edilen yağların serbest yağ asitliğinde artış meydana gelmiştir. Bu işlemlerin yağ globüllerinin yapısının enzim için daha kullanışlı bir substrat haline getirmiş olabileceği düşünülmektedir. Ceviz ve **portakal kabuğu ekstraktları** uygulaması peroksit sayısında önemli azalma sağlamıştır.

Zeytin hamuru nem miktarları ceviz, soğan, portakal kabuğu ekstraktları ile belirgin ölçüde artmıştır. Bu artış içinde en büyük etki ceviz kabuğu ekstraktı ile olmuştur.

Lipaz aktivitesi açısından SeO_2 en etkili uygulama olmuştur. Lipaz aktivite düşüşünü sıcak suya daldırılmamış örneklerde soğan ve **portakal kabuğu ekstraktı**

sağlamıştır. Suya daldırma işlemi uygulanmadığında bütün ekstraktlar lipaz aktivitesini bir miktar düşürmüştür.

Sıcak suya daldırılan örneklerden elde edilen zeytin yağında acılık artmıştır. Meyvemsilik açısından en yüksek skor ceviz kabuğu ekstraktı uygulanan örneklerde tespit edilmiştir. Hiçbir yağ örneğinde paslı/çamurlu-tortu, küflü ve asit-ekşi gibi olumsuz nitelikli tatlar algılanmamıştır. Ekstraktlara özgü tat ve koku olumsuz değerlendirilmemiştir.

L^* ve b^* değerleri ile K_{232} , K_{270} ve lipaz aktivitesi arasında güçlü negatif korelasyon hesaplanmıştır. İkincil oksidasyon ürünlerindeki artış ile yağların renginin koyulaştığı anlaşılmıştır. Serbest yağ asitliği değerleri ile K_{232} , K_{270} ve lipaz aktivitesi değerleri arasında anlamlı pozitif korelasyon belirlenmiştir.

5.2 Öneriler

Çalışma sonuçları SeO_2 'in lipaz aktivitesini azalttığını göstermiştir. Ancak SeO_2 toksik etkileri olabileceğinden, tüketilmesi uygun olmayan bir maddedir. Bu nedenle olumlu sonuç vermesine rağmen önerilmemektedir. Soğan kabuğu ve portakal kabuğu ekstraktlarının, zeytin lipaz aktivitesinde bir miktar düşüşe sebep olduğu görülmüştür. Araştırmada kullanılan doğal atıklar kurutularak ekstrakt haline getirilmiştir. Özellikle portakal kabuğu, ekstrakt halinde uygulanması ile verimde artış sağlaması, serbest yağ asitliği ve peroksit sayısının artışı engellemesi ve lipaz aktivitesi üzerinde inhibe edici etkisi nedeniyle endüstriyel boyutta bu amaçla değerlendirilebilecek bir artıktır. İleri ki çalışmalarda ekstraktların daha yoğun konsantrasyonlarda uygulanması faydalı sonuçlar verebilecektir. Sıcak suya daldırma işleminde uygulanan suyun sıcaklık derecesi ve uygulama süresinde değişiklikler yapılarak olumlu etkiler elde etme amacıyla denemeler yürütülebilir. Yine olumlu etki ettiği bilinen orlistat ile ekstraktlar farklı oranlarda kombine edilerek denemeler yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Al-Taweel, R. And Sungur, S.,1995, Lipaz enzimleri ile yağların modifikasyon biyoteknolojisi.Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Abd,*Gıda* 20(5).299-304.
- Altan, A., Kola, O., 2009, Yağ işleme teknolojisi. Bizim Büro Yayınevi. S.230, Sakarya.
- Ahmed E.H., Raghavendra T., Madamwar A.D., 2009, Thermostable alkaline lipase from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification and application in organic synthesis, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160:2102-2113.
- Akoh, C.C., Min, D.B., 1998, Microbial lipases and enzymatic interesterification in food lipids-chemistry, *Nutrition and Biotechnology*. Marcel Deccer. Inc. New York. 641-698.
- Anonim, 2007, Zeytinleri ezerek yağ çıkarma. www.sadecezeytin.com/teknikler.htm. Erişim tarihi:04.05.2007.
- Anonymous, 1989, Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society, fourth edition, Methods: Ca 5a-40, Cd8-53, Ch 5-91.
- Antranikian, G., 2008, Industrial relevance of thermophiles and their enzymes,Thermophiles: biology and technology at high temperatures, Robb, F., Antranikian, G.,Grogan, D., Driessen, A., *CRC Press*, Boca Raton, s. 113–60.
- Anwar, F., Zreen, Z., Sultana, B., 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.
- AOAC International, 2005, Official methods of analysis of AOAC international (18th), AOAC International, Washington, DC.
- Ayton, J., Mailer, R.J., Graham, K. 2012, The effect of storage conditions on extra virgin olive oil quality, RIRDC Publication No: 12/024
- Bachkatova N.A.,Severina LO. 1980, Isolation and characterization of intracellular lipase from *Serratia marcescens*. *Biochemical Society Transactions*. 28:771–3.
- Bahçeci, K.S., Serpen, A., Gökmen, V., Acar, J., 2005, Study of lipoxygenase andperoxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage. *Journal of Food Engineering*, 66, 187- 192.
- Bayrak, A.,Kıralan, M., 2008, Sızma zeytinyağı ve kalite faktörleri, İstanbul, Hasat Yayıncılık, 80.
- Bıyıklı, K., 2009, Türk zeytinyağlarının saflık derecelerinin belirlenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

- Bialecka-Florjanczyk, E., Fabiszewska, A.U., Krzyczkowska, J., Kurylowicz, A., 2018, Synthetic and natural lipase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18:8, 672-683.
- Boskou, D., 1996, The olive oil composition. In: Olive oil, Pp. 5–18. Champaign, IL: AOCS Press
- Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J.J., Garrido, A., 1999, Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 3535–3540.
- Buchholz, T., Melzig, M.F. 2015, Polyphenolic compounds as pancreatic lipase inhibitors. *Planta Medica* 2015; 81: 771–783.
- Chang, C.H., Lin, H.Y., Chang, C.Y., Liu, Y.C., 2006, Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes, *Journal of Food Engineering*, 77, 478-485.
- Chartrain M., Katz L., Marcin C., Thien M., Smith S., Fisher E., 1993, Purification and characterization of a novel bioconverting lipase from *Pseudomonas aeruginosa* MB 5001. *Enzyme and Microbial Technology*. 15:575–580.
- Charoenpanich, J., Suktanarag, S., Toobbucha, N. 2011, Production of a thermostable lipase by *Aeromonas* sp EBB-1 isolated from marine sludge in Angsila, Thailand. *Journal of the Science Society of Thailand*. 37. 105-114.
- Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. 2003, Detection and impact of protease and lipase activities in milk powders. *International Dairy Journal*, 13: 255-275.
- Choo, D.W., Kurihara, T., Suzuki, T., Soda, K., Esaki, N., 1998, A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2):486–491.
- Coloric, M., Veberic, R., Solar, A., Hudina, M., Stampar, F., 2005, Phenolic acids, syringaldehyde, and juglone in fruits of different cultivars of *Juglans regia* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6390-6396.
- Çavuşoğlu, A., Oktar, A., 1994, The effect of agronomical factors & pre milling storage conditions on olive oil quality, *Olivea*. 52.
- Çötel, E., Karataş, F., 2017, Zerdeçal (*Curcuma longa* L.) bitkisindeki antioksidan vitaminler ve glutatyon miktarları ile total antioksidan kapasitesinin belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 33(2): 91-101.
- Di Giovacchino, L., 1991, L'estrazione dell'olio con la centrifugazione diretta delle paste di olive. Nota I: influenza della granulazione, *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 68 (8), 413-420.
- EEC 640/2008, Commission Regulation (EC) No. 640/08, amending regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive and olive pomace oils and on their analytical methods.

- Ellis, G.P., West, G.B., 1970, Progress in medicinal chemistry. Vol. 7. London, UK: Butterworth & Co Pub., 44–45.
- Elsorady, M.E.I., Girgis, A.Y., El-labban, A.A., 2017, Influence of filtration on olive oil quality during storage. *Life Science Journal*, 14(5).
- Fadıloğlu, S. 1996, Kinetics of olive oil hydrolysis by free and immobilised *Candida rugosa* lipase. Ph.D. Thesis. University of Gaziantep
- Felix, K., Pairet, M., and Zimmermann, R., 1996, The antioxidative activity of the mucoregulatory agents: ambroxol, bromhexine and *N*-acetyl-L-cysteine. A pulse radiolysis study. *Life sciences*, 59 (14), 1141–1147.
- Gangadhara, Ramesh Kumar, P. & Prakash, V. 2010, The structure functional catalytic activity of rice bran lipase in the presence of selenium and lithium. *European Food Research and Technology*, 230, 551–557.
- Gemicioğlu, Y., 2016, Türkiye’de zeytinyağı üretiminde kullanılan yöntemler ve makine sistemlerinin varlığı. Yüksek Lisans Tezi. Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyosistem Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Tekirdağ.
- Gholami, A., Minai-Tehrani, D., ve Eftekhari, F., 2020, Bromhexine and its inhibitory effect on lipase – kinetics and structural study, *Archives of Physiology and Biochemistry*
- Gironés-Vilaplana A, Moreno DA, García-Viguera C. 2014, Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food & Function Journal*. 5: 764–772.
- Gorjanović, S. Ž., Rabrenović, B. B., Novaković, M. M., Dimić, E. B., Basić, Z. N. Ve Sužnjević, D. Ž., 2011, Cold-pressed pumpkin seed oil antioxidant activity as determined by a DC polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging, *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 88 (12), 1875–1882.
- Guida, V., Ferrari, G., Pataro, G., Chambery, A., Maro, A. D., Parente, A., 2013, The effects of ohmic and conventional blanching on the nutritional, bioactive compounds and quality parameters of artichoke heads. *LWT-Food Science and Technology*. 53. 569–579.
- Guncheva, M., Zhiryakova, D. 2011, Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68 (1). 1–21.
- Hepsağ, F., Kaya, R., 2018, Natürel zeytinyağı üretim aşamalarının aroma bileşenleri üzerine etkileri. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*. 4. 1/2.
- Hasan F., Shah A.A. and Abul-Hameed A. 2006, Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology*. 56(3):247–252.
- Hiol A., Jonzo M.D., Rugani N., Druet D., Sarda L., Comeau L.C. 2000, Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26:421–430.

- Hotta, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T., 2002, Extremely stable and versatile carboxylesterase from a hyperthermophilic archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (39).25–31.
- IUPAC, 1992, Regulation no. 2432, in Standard Methods for the Analysis of Oils, Fat and Derivatives. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O.1994, Bacterial lipases. *FEMS Microbiolog Reviews*.5: 29–63.
- Keçebaş, T., 2007, Farklı haşlama uygulamalar ile saklamanın kurutulmuş brokolinin renk ve antioksidan aktivitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Adana.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S.S. and Gupta R. 2005, Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*.41:38-44.
- Kumura H., Mikawa K. and Saito Z. 1993, Purification and characterization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* No 33. *Milchwissenschaft-Milk Science International*. 48:431–4.
- Kamaladevi, B., Prabhavathi, P., Sankareswaran, M., Anbalagan, S., Radhakrishnan, N., Prabhu, D. 2014, Screening and medium optimization of lipase producing bacteria from saltpan. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences*. 72-77.
- Kar M.K., Ray L. and Chattopadhyay P. 1996, Isolation and identification of alkaline thermostable lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. *Indian Journal of Experimental. Biology*. 34:535–8.
- Kasana R.C., Kaur B. and Yadav S.K. 2008, Isolation and identification of a psychrotrophic *Acinetobacter* sp. CR9 and characterization of its alkaline lipase. *Journal of Basic Microbiology*, 48 (3):207–12.
- Kayahan, M., Tekin,A., 2006, Zeytinyağı üretim teknolojisi. Ankara Üniversitesi. Mühendislik Fakültesi. Gıda Mühendisliği Bölümü.Ankara.
- Keçeli, T., 2000, Antimicrobial and antioxidant activity of olive oil phenolics, in food science and technology. *The University of Reading*: Reading 312 s.
- Keha, E.E. Ve Kufrevioglu, O., 2004, Biyokimya. Aktif Yayınevi. Erzurum.
- Kiritsakis, A.K. 1998, Olive oil from tree to the table. 2nd Edition. *Food & Nutrition Pres., Inc.*, 347s.
- Kawaguchi, K., Mizuno,T., Aida K. and Uchino,K.1997, Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61 (I), 102-104.
- Koç M., 2013, *Geobacillus* türlerinde termostabil lipaz üretimi, yüksek lisan tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B. C., Choi, H. J., Kim, D. S., Suhartono, M. T., Pyun, Y. R., 1999, Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1, *FEMS Microbiology Letters*, 179 (2), 393–400.
- Lee S.Y. and Rhee J.S. 1993, Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*. 15:617–23.
- Lucas, J.M., Heinlein C., Kim T, Hernandez SA., Malik MS., 2014, The androgen-regulated protease TMPRSS2 activates a proteolytic cascade involving components of the tumor microenvironment and promotes prostate cancer metastasis. *Cancer Discovery*, 4 (11), 1310–1325.
- Luchetti, F. 2002. Importance and future of olive oil in the world market-an introduction to olive oil. *European Journal of Science and Technology*. 104: 559-563.
- Maggio, R., Corsini, G.U., 2020, Repurposing the mucolytic cough suppressant and TMPRSS2 protease inhibitor bromhexine for the prevention and management of SARS-CoV-2 infection. *Pharmacological research*, 157, 104837.
- Martínez, J.M., Munoz, E., Alba, J., Lanzón. A., 1975, Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos Abencor, *Grasas y Aceites*, 26:379–385.
- Matsubara, Y., Kumamoto, M., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H., Yokoi, K. 1985, *Agricultural and Biological Chemistry*. 49, 909-914.
- Metin, K. ve Akpınar, M.A., 2000. Oncorhynchus mykiss walbaum, 1792 karaciger lipaz enziminin bazı kinetik özellikleri. *Turkish Journal of Biology*. 24 (2000) 489–502.
- McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K., 2001, Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts, *Food Chemistry*. 73 (1), 73-84.
- Minguez, M. I., Rejano, J., Gandul, B., Hinginio. A. and Garrido, 1991, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68:332.
- Morello, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M. J., 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.
- Muraoka T., Ando T. and Okuda H.J. 1982, Purification and properties of a novel lipase from *Staphylococcus aureus* 226. *Biochem (Tokyo)*. 92:1933–9.
- Neelambari, V., Vasanthabharathi, V., Balasubramanian, R., Jayalakshmi, S. 2011, Lipase from marine *Aeromonas hydrophila*. *Research Journal of Microbiology*. 6:658-668.
- Nergiz, C., Ünal, K. 1989, Natürel zeytinyağında bulunan fenolik bileşikler ve stabiliteye olan etkileri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Dergisi*, Seri: B Gıda Mühendisliği, Cilt: 7 Sayı: 2, 119–127.
- Ohkuro I., Komatsuzaki T., Kawashima M., Kuriyama S. 1978, Influence of NaCl on colonies and lipase of *Natto bacilli*. *Medicine and Biology*. 97:171–4.

- Özdoğan, D., Tunalıoğlu, R., 2017, Zeytinyağında kalite. *Zeytin Bilimi* 7(1).25-31.
- Öztürk, F., Yalçın, M., Dıraman, H., 2009, Türkiye zeytinyağı ekonomisine genel bir bakış. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*,4 (2): 35-51.
- Öztürk B. 2002, Lipaz Enzimi: Yapısal Özellikleri ve Uygulama Alanları. *Gıda Mühendisliği Dergisi*.12:20-23.
- Öztürk, B. 2001, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Institute of Technology. İzmir.
- Paradiso, V. M., Clemente, A., Summo, C., Pasqualone, A., Caponio, F., 2016, Towards green analysis of virgin olive oil phenolic compounds: Extraction by a natural deep eutectic solvent and direct spectrophotometric detection, *Food Chemistry*, 212,43–47.
- Pekic, B., Kovac, V., Alonso, E., Revilla, E., 1998, Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds, *Food Chemistry*, 61(1/2), 201-206.
- Petersen, M. T. N., Fojan, P., Petersen, S. B. 2001, How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology*. 85. 115–147.
- Roginsky, V. and Lissi, E.A., 2005, Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food, *Food Chemistry*, 92, 235-254.
- Rouseff, R.L., Martin, S. F. Youtsey, C.O. 1987, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35, 1027-1030.
- Royter, M., Schmidt, M., Elend, C., Höbenreich, H., Schäfer, T., Bornscheuer, U., 2009, Thermostable lipases from the extreme thermophilic anaerobic bacteria *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* SOL1 and *Caldanaerobacter subterraneus* subsp. tengcongensis. *Extremophiles*,13 (5). 769–783.
- Ruiz-Ojeda, L. M., Penas, F. J.,2013, Comparison study of conventional hot-water and microwave blanching on quality of green beans, *International Journal of Food Science and Technology*., 20. 191-197.
- Ryan, D.,Robards, K. 1998, Phenolic compounds in olives, *Analyst*. 123 (5): s.31R-44R
- Sayari, A., Frikha, F., Miled, N., Mtibaa, H., Ali ,Y.B., Verger, R., Gargouri, Y., 2005, N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties, *FEBS Letters*, 579: 976–982.
- Seçer, A., 2001, Doğu akdeniz bölgesinde zeytin ve zeytinyağı üretimi, pazarlaması ve bölgede zeytinciliği geliştirme olanakları. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Sergent, T., Vanderstraeten, J., Winand, F., Beguin, P., Schneider, Y.J., 2012, Phenolic compounds and plant extracts as potential natural anti-obesity substances, *Food Chemistry*, 135, 68–73.

- Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, Montedoro, G. F., 2009, Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure, *Inflammopharmacology*, 17: 76-84.
- Sethi, B. K., Nanda, P. K., Sahoo, S. 2016, Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10, *Brazilian Journal of Microbiology*, 47. 143–149.
- Sievers, G. P., Hynninen, H. 1977. *Journal of Chromatograph*. 134: 359-366.
- Sugiura, M., Oikawa, T., Hirano, K., Inukai, T., 1977, Purification, crystallization and properties of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Biochimica et Biophysica Acta* a. 488:353–8.
- Susamcı, E., Ötleş, S., Dıraman, H. 2017, Zeytinyağı, Sofralık Zeytin ve Zeytinyağı Teknolojisi, 1. Baskı, Bassaray Matbaası, İzmir, 319.
- Talebi, M., Minai-Tehrani D., Fazilati M. 2018, Inhibitory action of dicyclomine on lipase activity, kinetics and molecular study. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107 (Part B), 2422–2428.
- TGK, 2017, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği, R.Gazete 17.09.2017-30183 Tebliğ No:2017/26.
- Tian-Tian Liu, Wei-Chao Su, Qing-Xi Chen, Dong-Yan Shen, Jiang-Xing Zhuang 2020, The inhibitory kinetics and mechanism of glycolic acid on lipase, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38:7, 2021-2028,
- Tian-Tian Liu, Xiao-Rong He, Run-Xue Xu, Xiao-Bing Wu, Ya- Xin Qi, Jian-Zhong Huang, Qiong-Huan Chen, Qing-Xi Chen, 2018, Inhibitory mechanism and molecular analysis of furoic acid and oxalic acid on lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 120, 1925-1934.
- Tiryaki, G.Y., Karaman, H.T. 2004, Erken hasadın zeytinyağı kalitesi üzerine etkileri. 8. Ulusal Gıda Kongresi, 24-26 Mayıs 2004, Bursa.
- Tokuşoğlu, Ö., 2008, Zeytin ve zeytin ürünleri kimyası, mikrobiyolojisi, kalite kontrolü ve teknolojisi. Celal Bayar Üniversitesi Lisansüstü ders notları. s.158. Manisa.
- Tosa, S., Ishihara, S., Toyota, M., Yosida, S., Nakazawa, H. Tomimatsu, T. 1988, *Shoyakugaku Zasshi* (in Japanese), 42, 41—47.
- Talon R., Dublet N., Montel M.C., Cantonnet M. 1995, Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Current Microbiology*. 30:11–6.
- Thompson, C. A. , Delaquis, P.J., Mazza, G. 1999, Detection and measurement of microbial lipase activity: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39: 165–187.

- Türkoğlu, H., Kanık, Z., Yakut, A., Güneri, A., Akın, M., 2012, Nizip ve çevresinde satışa sunulan zeytinyağı örneklerinin bazı özellikleri. *HR. Ü. Z. F. Dergisi*. 16(3).1-8.
- USDA/ARS, 2013, US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Flavonoid Content of Selected Foods.
- Veeraragavan, K., Colpitts, T. and Gibbs, B. F., 1990, Purification and characterization of two distinct lipases from *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1044: 26-33.
- Villarreal-Lozoya, J.E., Lombardini, L., Cisneros-Zevallos, L. 2007, Phytochemical constituents and antioxidant capacity of different pecan [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] cultivars, *Food Chemistry*, 102: 1241–1249.
- Vinha, A., F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveria, M. B., Seabra, R. M., 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.
- Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Liu, Z., Li, J., 2007, Diversity of lipase-producing yeasts from marine environments and oil hydrolysis by their crude enzymes, *Annals of Microbiology*, 57, 495–501. www.mucahitkivrak.baun.edu.tr, Erişim Tarihi: 05.04.2021.
- Yan, R.Z., Mu, H.X., An, Z.Y., 2014, Determination of furoic acid in vitamin C with High Performance Liquid Chromatography, *Guangzhou Chemical Industry*. 42. 97-100.
- Yavuz, H., 2008, Türk zeytinyağlarının bazı kalite ve saflık kriterlerinin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- Xiao, H., Pan, Z., Deng, L., El-Mashad, H. M., Yang, X., Mujumdar, A. S., Gao, Z., Zhang, Q., 2017, Recent developments and trends in thermal blanching- A comprehensive review. *Information Processing in Agriculture*. 4. 101-127.
- Xin, Y., Zhang, M., Xu, B., Adhikari, B., Sun, J., 2015, Research trends in selected blanching pretreatments and quick freezing technologies as applied in fruits and vegetables: A review. *International Journal of Refrigeration*. 57. 11-25.
- Yılmaz, E., 2010, Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir anti-inflammatör olan s-naproksenin oluşumunda kullanılması. Selçuk Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, Konya.
- Zheng, H., Lu, H., 2011, Effect of microwave pretreatment on the kinetics of ascorbic acid degradation and peroxidase inactivation in different parts of green asparagus (*Asparagus officinalis* L.) during water blanching. *Food Chemistry*. 128. 1087-1093.



EKLER**EK 1.** Duyusal analiz yapılan örnek isimlerinin kodlaması

Numune no	Numune adı
123	Kontrol
134	Soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış
145	Ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış
156	Portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış
167	Orlistat çözeltisi uygulanmış
189	Sıcak suya daldırma
213	Sıcak suya daldırma + soğan kabuğu ekstraktı uygulanmış
224	Sıcak suya daldırma + ceviz kabuğu ekstraktı uygulanmış
235	Sıcak suya daldırma + portakal kabuğu ekstraktı uygulanmış
246	Sıcak suya daldırma + orlistat çözeltisi uygulanmış

EK 2. Duyusal analiz için panalistlere verilen çizelge

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
123																		
134																		
145																		
156																		
167																		
189																		
213																		
224																		
235																		
246																		

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