




Natürel Zeytinyağında Etil Alkol ve Etil Ester Oluşumu ile Tespit Yöntemleri

Ümmühan Tibet¹  ✉, Pelin Günç Ergönül² , Fahri Yemişçioğlu³ 

¹Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Manisa

²Celal Bayar Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Manisa

³Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir

Geliş Tarihi (Received): 19.08.2020, Kabul Tarihi (Accepted): 19.09.2021

✉ Yazışmalardan Sorumlu Yazar (Corresponding author): ummuhan.tibet@uzzk.org (U. Tibet)

☎ 0 232 486 1193 📠 0 232 486 1194

ÖZ

Natürel sızma zeytinyağı, dünyada olduğu gibi ülkemizde de en çok aranan ve ilgi duyulan gıdalardan birisidir. Bu sebeple de en fazla hile yapılan yağlar arasında yer almaktadır. Natürel sızma zeytinyağında "kolon yağı" olarak ifade edilen işlem görmüş zeytinyağı karışımını tespit etmek için yağ asidi etil esterlerin (FAEE) analizinin yapılması gerekmektedir. Ancak etil esterler sadece kolon yağı taşıyıcı ile yükselmeyip fermentatif bozulma olduğunda, depolama sürecinde ya da diğer kalite kriterlerinde düşme olduğunda limit üzerine çıkabilmektedir. Son yıllarda, etil esterlerin oluşum mekanizmaları incelenerek tarladan sofraya etil ester seviyesinin hangi koşullarda yükseldiğini araştıran birçok makale yayınlanmıştır. Bu çalışmada, etil esterlerin oluşum mekanizması, etil alkolün zeytinyağında esterleşmesini tetikleyen faktörler irdelenmiş ve tespit yöntemleri üstünde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Alkil esterler, Etil ester, Etil alkol, Natürel sızma zeytinyağı

Formation of Ethyl Alcohol and Ethyl Esters in Virgin Olive Oil and Their Detection Methods

ABSTRACT

Extra virgin olive oil is one of the most demanded foods in our country as well as in the world. It is among oils, which is mostly adulterated due to its high demand. For this reason, it is one of the most adulterated oils. Analysis of fatty acid ethyl esters must be carried out in order to detect the processed olive oil mixtures, which is expressed as "mild deodorization oil" in extra virgin olive oil. Ethyl esters not only can reach the limit by mild deodorization of olive oil, but also can rise with fermentative deterioration or with esterify during storage. In recent years, many articles have been published, studying the conditions under which ethyl esters rise from field to table, by examining the formation mechanism of ethyl esters. In this review article, the formation mechanism of ethyl esters and the factors triggering the esterification of ethyl alcohol in olive oil were presented.

Keywords: Alkyl esters, Ethyl ester, Ethyl alcohol, Extra virgin olive oil

GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea L.*) gıda endüstrisinde, sofralık zeytin ve zeytinyağı olmak üzere iki temel gıdanın üretimini sağlayan, Akdeniz havzasında çok büyük öneme sahip bir ağaçtır. Zeytinyağının yapısında bulunan

kimyasal, fiziksel ve duyuşal özellikleri veren bileşikler, sabunlaşan ve sabunlaşmayan kısımlarda yer almaktadırlar. Sabunlaşabilen triağılgliceroller, zeytinyağının ağırlıkça %98'ini temsil eder ve tekli doymamış yağ asitleri bakımından da zengindir. Son yılların yükselen trendi Akdeniz Diyetinde yağ ihtiyacının

%85'i oleik asit bakımından zengin olan zeytinyağı tarafından karşılanmaktadır [1, 2]. Zeytinyağı ve sağlık konusunda yapılan çok sayıda bilimsel çalışmada, günlük beslenme rejiminde doymuş yağ asitlerinin, tekli doymamış yağ asitlerine zengin zeytinyağı ile yer değiştirmesi ile kalp hastalıkları riskinde önemli azalma olduğu görülmüştür [3, 4].

Zeytinyağı sadece tekli doymamış yağ asitleri ile değil, aynı zamanda içerdiği diğer minör bileşenlerle de çok önemli biyolojik faydalar sağlamaktadır. Zeytinyağının biyolojik aktif minör bileşenleri sabunlaşmayan maddeler kısmındadır ve diğer bitkisel yağlardan farklı olarak sabunlaşmayan maddeler bol miktarda skualen içermektedir [5]. Skualen, altı izopren biriminden meydana gelmiş çoklu doymamış bir triterpendir. Zeytinyağında yaklaşık 600-1200 mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda bulunan skualen, kolesterol ile steroid hormonlarının biyosentezinin öncüsüdür [6].

Zeytinyağının kalitesi başta tarımsal koşullar ve zeytin sıkma işlemleri olmak üzere meyvenin sağlamlığı, olgunluk derecesi, hasat ve hasat sonrası koşullar ile zeytinden zeytinyağının elde edilmesi ve depolama sürecinden büyük ölçüde etkilenmektedir [7, 8].

Zeytin ağacı meyvesinden, doğal özelliklerinde hiçbir değişikliğe neden olmayacak bir ısı ortamında doğrudan kırma, yoğurma ve santrifüjleme yolu ile elde edilen natürel zeytinyağı sınıflarından en üstün özellikleri taşıyan grup natürel sızma zeytinyağıdır. Bir meyve suyu gibi algılayabileceğimiz natürel zeytinyağının, tüketici tarafından tercih edilmesi ve yüksek fiyatlarla marketlerde yer alması nedeniyle, kalitesinin ve özgünlüğünün saptanmasında kullanılan kalite ve saflık kriterleri çok büyük önem arz etmektedir [9]. Günümüzde zeytinyağının kalitesinin ve saflığının korunması, ulusal ve uluslararası zeytinyağı mevzuatında yer alan kalite ve saflık kriterlerini belirlemek için uygulanan analitik yöntemler ve güncel düzenlemelerle sağlanmaktadır [10, 11].

Zeytinyağının popülaritesi onun diğer bitkisel yağlarla arasındaki fiyat aralığının açılmasına neden olmaktadır. Bu durum natürel sızma zeytinyağının hem kendi ürün grubu ile hem de diğer bitkisel yağlarla taşıdığına neden olmaktadır. Daha yüksek kâr marjı elde etmek amacıyla da fiyatı daha ucuz diğer bitkisel yağlarla karıştırmak cazip hale gelmektedir [12]. Natürel sızma zeytinyağının kalitesinin düşük ya da taşıdığı olup olmadığı ultraviyole ışığında özgül soğurma, sterol kompozisyonu, gerçek ve teorik ECN 42 trigliserid içeriği arasındaki maksimum fark, stigmastadien ve FAEE analizleri gibi kalite ve saflık kriterleri ile saptanmaktadır.

Natürel zeytinyağında bulunan FAEE, son on yılda gerek bilimsel kamuoyunda gerekse mevzuat açısından irdelenen temel konuların başında gelmektedir. Etil esterleri "off flavour" olarak nitelendirilen olumsuz kalite özellikleri ile birlikte artış gösterebildiklerinden zeytinyağının duyuşal değerlendirilmesinde önemli bir kriter olarak ele alınmıştır. Bu nedenle etil ester miktarının artması, kalite özelliklerinin olumsuz sürece evrildiklerini göstermektedir [13, 14].

Ulusal ve uluslararası mevzuatlarda, natürel sızma zeytinyağına ısı işlem veya kimyasal işlem yapılamayacağı, sıkma sürecine yardımcı enzim, talk gibi maddeler de dahil katkı maddeleri konulamayacağı açıkça ifade edilmektedir [10,11,15]. Kolon zeytinyağı taşıdığı de bu kategoride değerlendirilir. Kolon zeytinyağı taşıdığı, natürel zeytinyağının olumsuz duyuşal özelliklerini maskeleyen, asitlik ve peroksit gibi kalite kriterlerinin değerlerini düşürmek amacıyla düşük sıcaklıkta kısmi deodorizasyon işlemini gerektirmektedir [16,17,18]. Bu taşıdığı tespiti için, etil ester miktarının tayini ulusal ve uluslararası mevzuatlara girmiş ve zeytinyağı sektörünün kullanımına sunulmuştur.

Alkil esterlerin meydana gelmesinde; meyvenin oluşumundan zeytinyağının depolama koşullarına kadar tüm sürecin nasıl etkilendiği, duyuşal özellikler ile alkil esterler arasında bir ilişki olup olmadığı, meyvede oluşan etil alkol miktarının bu mekanizmaya etkisi ile ilgili birçok çalışma gerçekleştirilmiştir [19, 20, 21, 22]. Zeytinin çeşidi, olgunluk durumu, zeytin sıkım sisteminde kırıcının çalışma şekli, iki faz ya da üç faz dekantör kullanımı, üç faz sistemde birim kg zeytin başına kullanılan su miktarı, santrifüj seperatör kullanılıp kullanılmaması ve depolama koşulları FAEE miktarını etkileyen faktörlerdir [23].

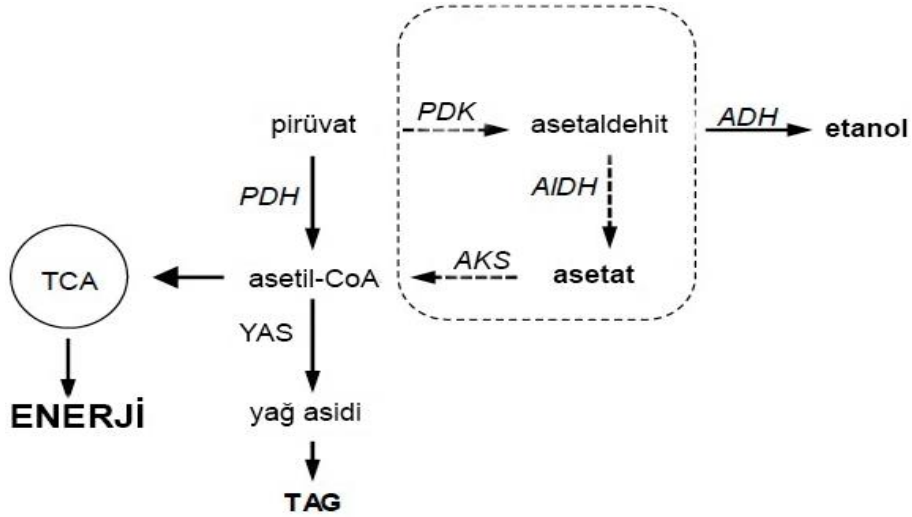
Özetle, Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC) standartlarına göre, yağ asitleri etil esterleri hem kalite kriteri hem de saflık kriteridir [46]. Bu sebeple, dünyada ve ülkemizde etil ester miktarının yasal limitlerin üstünde bulunması hem kalite problemi hem de saflık problemi olarak değerlendirilmektedir. Bu durumun açıklığa kavuşturabilmesi amacıyla natürel zeytinyağlarında etil ester miktarının oluşumunu ve özellikle raf ömrü boyunca değişimini takip etmek büyük önem arz etmektedir.

Ülkemizde Zeytincilik Araştırma Enstitüsü tarafından tescilli alınmış 93 adet yerel zeytin çeşidi bulunmaktadır. Bu çeşitlerden yaygın olarak yetiştirilen ve ekonomik önemi olan Ayvalık, Memecik, Gemlik gibi ana çeşitler ile yine sınırlı üretimi olan Domat, Uslu, Erkence, Sarı Ulak, Kilis yağlık, Saurani gibi çeşitlerin etil ester seviyeleri konusunda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır [24].

Bu derlemenin amacı, etil esterlerin oluşum mekanizmasına dikkat çekmek, etil esteri oluşumu üzerine kısmi gliserid ve etanol varlığının etkisini araştırmak ve bu konuda ticari öneme sahip Türk zeytinyağı çeşitlerinde yapılacak olan çalışmalara ışık tutmaktır.

ETİL ALKOL/ETİL ESTERLERİ OLUŞUM MEKANİZMASI

Zeytin meyvesi, tüm meyveyi saran dış kısmı ekzokarp, yenilebilir etli kısım olan mezokarp ve çekirdek kısmı olan endokarptan oluşan sert çekirdekli bir meyvedir. Şeftali, kayısı, kiraz ve erik gibi diğer sert çekirdekli meyvelerin aksine işlem görmeden, acılığı veren oleuropein gibi sekoroididler gidermeden, direkt olarak tüketilemez. Birçok zeytin çeşidinde etanolün zeytin meyvesinde bulunan doğal bir bileşen olduğu ve zeytin sıkım işlemleri esnasında zeytinyağına geçtiği gözlemlenmiş, yağ asidi etil esteri oluşum mekanizmasında etkili olduğu rapor edilmiştir [21, 25, 26].



Şekil 1. Yağ asidi biyosentezi öncüsü Asetil koenzim A üretiminde biyokimyasal mekanizma [26] (Pirüvat dekarboksilaz PDK, Alkol dehidrogenaz ADH, Triasilgiserol TAG, Pirüvatdehidrogenaz PDH, Trikarboksilik asit TAC, Asetilkoenzim sentezi AKS, Aldehitdehidrogenaz AIDH, Yağ asidi sentezi YAS.)

Figure 1. Biochemical mechanism in the production of acetyl coenzyme A, the precursor of fatty acid biosynthesis [26] (Pyruvate decarboxylase PDK, Alcohol dehydrogenase ADH, Triacylglycerol TAG, Pyruvate dehydrogenase PDH, Tricarboxylic acid TAC, Acetylcoenzyme synthesis AKS, Aldehyde dehydrogenase AIDH, Fatty acid synthesis YAS).

Etanol, pirüvat dekarboksilaz (PDK) ve alkol dehidrogenaz (ADH) enzimlerinin ardışık etkisiyle pirüvattan üretilir (Şekil 1). Bitkide bu bileşiğin bulunması, dokulardaki oksijenin mevcudiyetinde bir azalma ile ilişkili olmak zorunda değildir, çünkü bu yol bitki fizyolojisinde farklı anahtar roller oynayan aerobik koşullar altında (aerobik fermentasyon) çalışabilmektedir [26].

Aksine meyve dokusunda etanol miktarının artması, soğuk, kuraklık veya yüksek karbondioksit (CO₂) konsantrasyonu gibi çevresel şartlar, ADH gen etkisi ve PDK' nin indüksiyonu nedeniyle meydana gelmektedir [27, 28, 26].

Zeytinde etanol oluşumunun sadece hasat sonrası bekleme ve zeytin sıkımı sırasında fermentasyonla oluştuğu bazı İtalyan Araştırmacılar tarafından rapor edilmektedir [29]. Halbuki zeytin meyvesinin olgunlaşması sırasında asetil-CoA blok etkisi ile büyük miktarda triasilgiserol oluşmaktadır. Ancak asetil-CoA, enzimatik kompleks dehidrogenaz (PDH) aktivitesi ile pirüvattan sentezlenmekte ve zeytin meyvesindeki bu sentezlenme PDH'nin inaktive edilmesiyle asetate tarafından gerçekleştirilmektedir [26, 30]. Bu mekanizmada, Şekil 1'de gösterildiği gibi pirüvat daha önce fotosentetik dokularda meydana gelmekte, PDK ve aldehit dehidrogenazın ardışık etkisi ile asetata dönüştürülmektedir. Bu modele göre, ADH aktivitesi, etanole dönüşerek hücreyi sitotoksik aldehitin aşırı birikiminden korumak için bir emniyet valfi olarak işlev görmektedir [26].

FAEE, başlangıçta natürel birinci veya kolon zeytinyağı gibi düşük kaliteli zeytinyağı taşıyıcısının tespit edilmesi için bir saflık kriteri olarak kabul edilirken sonraları yağ asitleri etil esterlerinin yalnızca böyle bir işlemde kaynaklanmadığı, düşük kaliteli natürel zeytinyağlarında da buldukları tespit edilmiştir [31, 32].

Zeytin meyvesindeki FAEE ile fermentatif bozulma sonucu oluşan duyu kusurları arasında bir ilişkinin var olduğu 2017 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir [19]. Etanolün sadece fermentasyon sonucu oluşmadığı, sağlam zeytin meyvelerinde de olgunlaşma süresince etanolün arttığı tespit edilmiştir [21]. Bu aşamada sorulması gereken soru, yağda bulunan etanolün ne kadarının zeytin meyvesinde oluşan fizyolojik reaksiyonlardan meydana geldiği ve ne kadarının fermentatif süreçlerden kaynaklandığıdır. Etanol miktarının yağ asidi etil ester sentezi için bir kaynak olduğu göz önüne alınarak, natürel sızma zeytinyağında etanol miktarının limiti konusunda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [29].

ETİL ALKOL ve ETİL ESTERLERİN OLUŞUMUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

FAEE 'inin oluşumunu etkileyen faktörler konusunda yapılan çalışmalara göre, zeytinin çeşidi, olgunluk seviyesi, zeytin sıkım tesisinde bekletildiği kabın hacmi ve bekleme süresi, kırıcının hızı, zeytin sıkım tesisinin iki faz veya üç faz çalışıyor olması, üç faz sistemlerde zeytin hamuruna ilave edilen su miktarı, dekantöre ilave edilen su miktarı, dikey santrifüj ya da dekantasyonla filtrasyon yapılması, depolama sıcaklığı, süresi, tankın tam dolu olup olmaması gibi birçok faktöre bağlı olarak zeytinyağının yağ asidi etil esteri seviyesi farklılık gösterebilmektedir [23, 33, 34]. Zeytin meyvesinin kalitesine bağlı olarak fermentasyon sürecinde oluşan metanol ve etanolün trans esterifikasyonu ile FAEE meydana gelebilmektedir [35]. Zeytinyağındaki etanol miktarı zeytinin olgunluk derecesine bağlı olarak değişmekte ve iki fazlı sistemlerden elde edilen zeytinyağında etanol daha yüksek bulunmaktadır [23].

Yapılan bir çalışmada, dekantörden dikey santrifüje giren zeytinyağının alkil esterlerinin arttığı saptanmıştır. Dikey santrifüjde kullanılan su miktarının her % birim

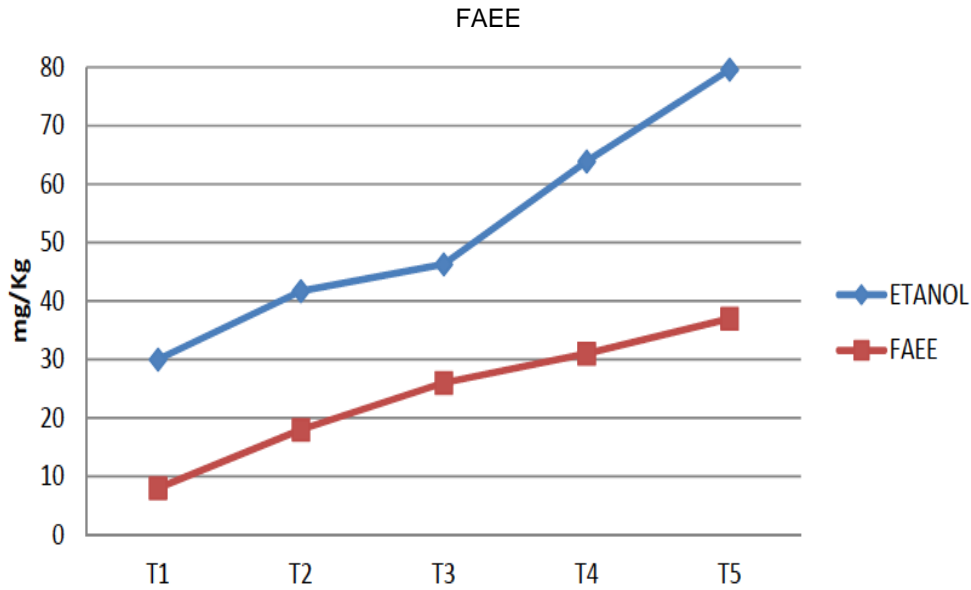
azalmasına karşın etil ester miktarının da 0.6 mg/kg ve 0.8 mg/kg'a kadar azaldığı görülmüştür [36].

İspanyol zeytinyağlarında 100'den fazla farklı kalite sınıfında, çeşidinde ve coğrafi bölgelere ait örneklerde yapılan bir çalışmada, yağ asidi etil ester seviyesinin coğrafi işaretli ürünlerin ayırt edici bir fonksiyonu, kalite kriteri ve natürel sızma zeytinyağına düşük kaliteli natürel zeytinyağı ya da kolon yağı karışımı tespit aracı olarak kullanılabilceği vurgulanmıştır [37]. Metanol ve etanol gibi küçük moleküllü alkoller ile serbest yağ asitlerinin esterleşmesi ile üretilen bu doğal lipit ailesi zeytinyağının çok önemli kalite ve saflık kriteri olarak tanımlanmaktadır.

Natürel sızma zeytinyağlarında etanol seviyesini belirlemek amacıyla yapılan başka bir çalışmada, Cordoba'daki Dünya Zeytin Koleksiyonunda bulunan IFAPA Merkezinde 97 farklı varyetede zeytin meyvesi

incelenmiştir [20]. Bu tarama çalışmasında 2009-2012 hasat dönemlerinde, 3 farklı olgunluk indeksi (1.0; 2.5 ve 5.0) seviyesinde olgunluk ile ADH aktivitesi arasındaki ilişki gözlemlenmiştir. Cordoba zeytin bahçesinde yetişen sağlam ve sağlıklı dane zeytinler elle toplanarak soğuk ortamda hızla taşınmış ve bekletilmeden zeytin sıkım işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonucunda, etanolün, natürel sızma zeytinyağının etil esterlerinin oluşumunda gerekli bir bileşen olduğu, konsantrasyonun, zeytinin varyetesi, iklim koşulları ve meyvenin olgunluk durumuna bağlı olarak değiştiği rapor edilmektedir.

Natürel zeytinyağında etanolün yaygın olarak bulunması, zeytin meyvesinde doğal olarak bulunan ve zeytinin olgunlaşma periyodunda sentezlendiği, hasattan sonra da depolandığı sırada oluşan etanolün, zeytin sıkım işlemi sırasında yağa geçtiği hipotezi doğrulanmaktadır [21, 27, 31].

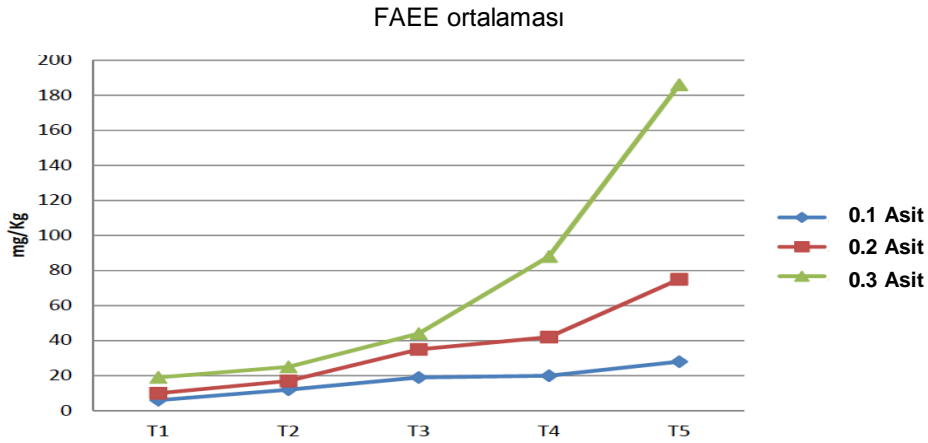


Şekil 2. Etanol ile FAEE'lerin değerlendirilmesi [40]

Figure 2. Evaluation of FFAEs with ethanol [40]

Natürel zeytinyağının depolanması sırasında FAEE 'in kimyasal sentezlenmesi için etanol ve metanol kaynak oluşturduğundan zeytinyağında bu kısa zincirli alkollerin bulunması önemli bir probleme neden olmaktadır [14]. Depolama aşamasında, başlangıçtan itibaren (T1), her iki ayda bir (T2, T3, T4, T5) numune alınarak toplam 8 ay numune alınmış ve zeytinyağının serbest yağ asitleri ile etanol içeriği ortam sıcaklığına ve süreye bağlı olarak esterleşme reaksiyonu ile FAEE 'inin artmasına neden olduğu saptanmıştır [38, 39]. Kontrollü sıcaklık koşulları altında depolanan (yaklaşık 20°C) zeytinyağında TAG

hidrolizinin azaldığı, serbest yağ asitliğindeki değişim gözlemlenerek tespit edilmiştir [31]. Ortam sıcaklığının düşük olması, ayrıca ortamda bulunması muhtemel metil ve etil alkolün esterleşmesi için ihtiyacı olan aktivasyon enerjisine ulaşmasını önleyeceğinden, depolama sıcaklığı ve süresi son derece önemlidir [21]. FAEE 'inin tankta depolama süresince değişimi Şekil 2'de görülmektedir. Buna göre etil alkoldeki artış trendinin etil esterlere göre daha fazla olduğu dikkat çekmektedir.



Şekil 3. Serbest yağ asitliği ile FAEE 'lerin değerlendirilmesi [40]
Figure 3. Evaluation of free fatty acidity and FAEEs [40]

İtalyan zeytinyağlarının yağ asidi alkil esterleri ve özellikle FAEE ile serbest yağ asitliği arasında direkt bir korelasyon olduğu ortaya konulmuştur [38]. Serbest yağ asitliği yükseldikçe depolama sürecinde, yağ asitleri etil esterlerinin daha hızlı arttığı Şekil 3'de görülmektedir [40]

Zeytin meyvesindeki etanol miktarı zeytinin çeşidine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, Hojiblanca çeşidinde etanolün meyvede 6 mg/kg ile 58 mg/kg arasında değiştiği, Picual çeşidinde 0.56 mg/kg ile 2.90 mg/kg arasında ve Arbequina çeşidinde 1.5 mg/kg ile 11.5 mg/kg arasında değiştiği ortaya konmuştur [20].

Tablo 1. Picual, Hojiblanca ve Arbequina çeşitlerinin ortalama etanol içeriği [21].

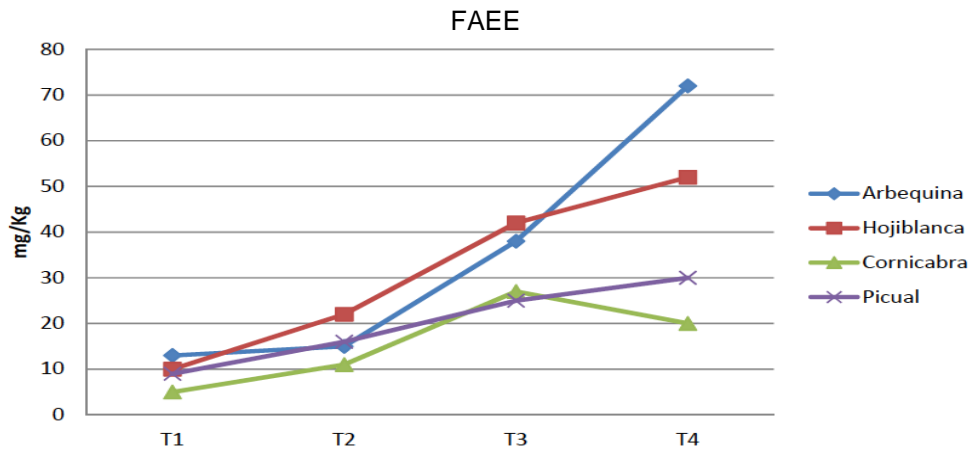
Table 1. Average ethanol content of Picual, Hojiblanca and Arbequina cultivars [21].

Zeytin Çeşidi	Etanol mg/kg
Picual	3.4±1.7 c ^a
Hojiblanca	26.1±10.2 ^a
Arbequina	5.7±1.9 ^b

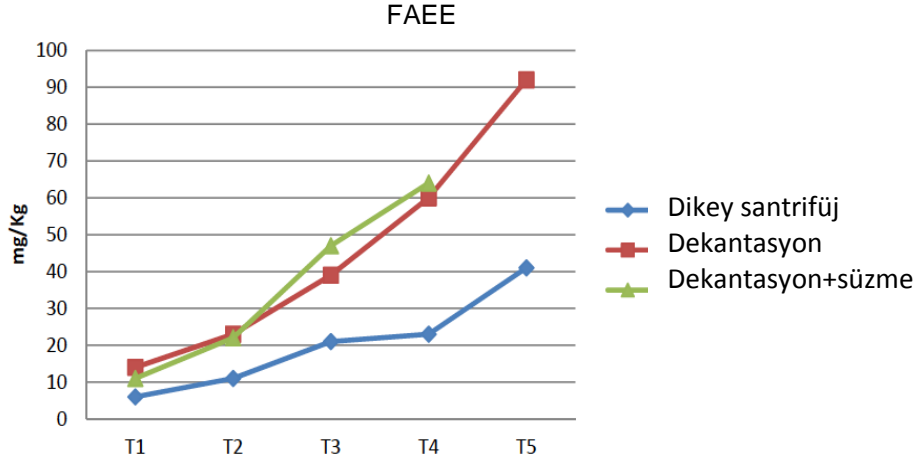
^aFarklı harfler, 0,05 p değeri için ortalamalar arasındaki farkların önemli olduğunu gösterir.

Tablo 1'de ise aynı İspanyol çeşitlerde yapılan farklı bir çalışmada meyvelerde tespit edilen ortalama etanol içerikleri verilmiştir [21]. Etanol miktarının çeşide bağlı olarak miktarı ve depolama süreci ile değişimi Şekil 6'da görülmektedir. Buna göre Cornicabra çeşidinde etil esterlerin değişimi sınırlı kalırken, Arbequina çeşidinde artış görülmektedir. İspanya'da yapılan bir çalışmada incelenen tüm zeytinyağı çeşitlerinde önemli düzeyde etanol bulunmuştur [20]. Ayrıca, meyvenin olgunlaşmasının ileri evrelerinde etanol birikimi ile zeytin meyvesi olgunlaşması sırasında artış gösteren alkol dehidrojenaz aktivitesi seviyeleri arasında uyum olduğu ortaya konmuştur. Oluşan etanol seviyesi, zeytinin çeşidi, olgunlaşma seviyesi, hasat zamanı ve iklim koşullarına bağlı olarak değişmektedir [48].

Zeytin sıkım prosesinde, dekantör kullanımı, dikey santrifüj ya da santrifüj uygulamadan zeytinyağını dekante edip dinlendirerek posasını alma işlemi depolama sürecinde etil ester artışını etkilemektedir [8]. İki fazlı bir dekantörden sonra dikey santrifüjde su tüketimi, kilogram natürel zeytinyağı başına 0.1-0.5 litredir. Üç faz dekantörden sonra dikey santrifüjde su kullanımı 1.5 L/kg'dan fazla olabilmektedir.



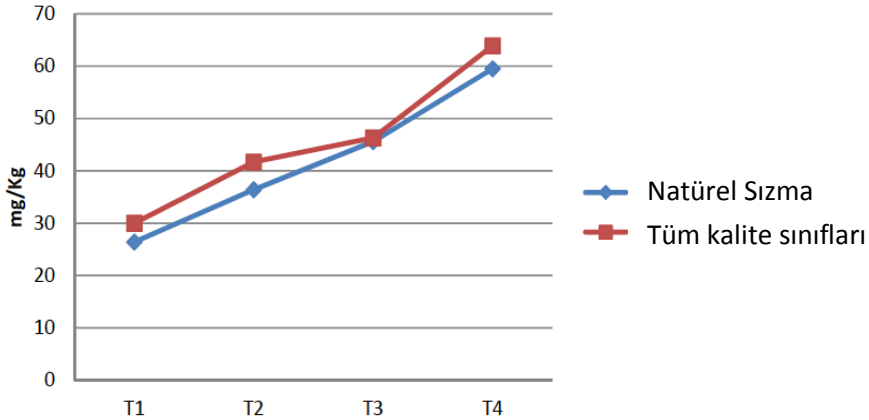
Şekil 4. Zeytinin çeşidi ve etanol miktarının değerlendirilmesi [40]
Figure 4. Evaluation of olive variety and ethanol content [40]



Şekil 5. Dikey santrifüj, dekantasyon ve dekantasyon+ süzme işleminde FAEE'lerin değerlendirilmesi [40]
 Figure 5. Evaluation of FAEEs in vertical centrifugation, decantation and decantation+filtration [40]

Şekil 5'de görüldüğü gibi en az etil ester seviyesi değişimi dikey santrifüj uygulanan zeytinyağı grubunda saptanmıştır. Dekantasyondan sonra filtre edildiğinde, etil ester değişimi üzerinde etkili olmadığı görülmektedir. Son yıllarda, su ve enerji tüketimindeki avantaj nedeniyle İspanya'da dekantörlerin yerini dikey santrifüj

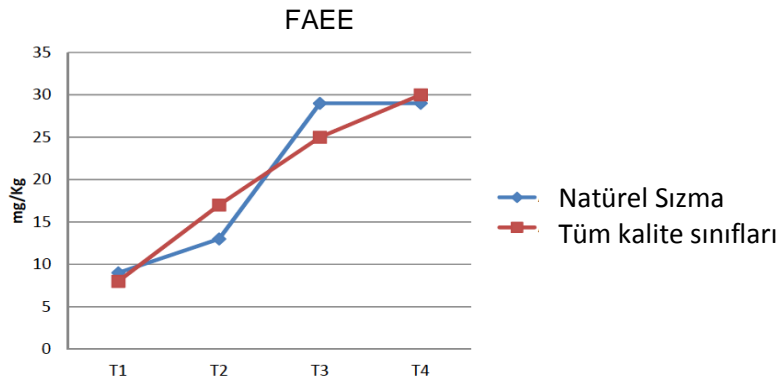
dekantörlerin almaya başladığı rapor edilmiştir [40]. Aynı çalışmada, depolama sürecinde natürel sızma zeytinyağındaki etanol ile diğer tüm kalite sınıflarındaki etanol değişiminin paralellik gösterdiği sonucuna da varılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. Natürel sızma zeytinyağı ile diğer kalitelerin etanol miktarının değerlendirilmesi [40]
 Figure 6. Evaluation of ethanol content of extra virgin olive oil and other qualities [40]

İki fazlı zeytin sıkım tesisinde üretimin her aşamasında minimum su tüketimi olduğundan etanol içeriği daha yüksek bulunmuştur. Aslında daha yüksek polifenol içeriği ve daha yüksek duyu özelliklerine rağmen

bu sistemde suda çözünen etanol ortamdaki uzaklaştırılmadığından, bünyesinde kalan etanol bekleme süresince esterleşerek FAEE'in artışına neden olmuştur (Şekil 7).



Şekil 7. Natürel sızma zeytinyağı ile natürel birinci zeytinyağında FAEE'lerin değerlendirilmesi [40]
 Figure 7. Evaluation of FAEEs in virgin olive oil and virgin olive oil [40]

ETİL ALKOL ve ETİL ESTERLERİ TESPİT YÖNTEMLERİ

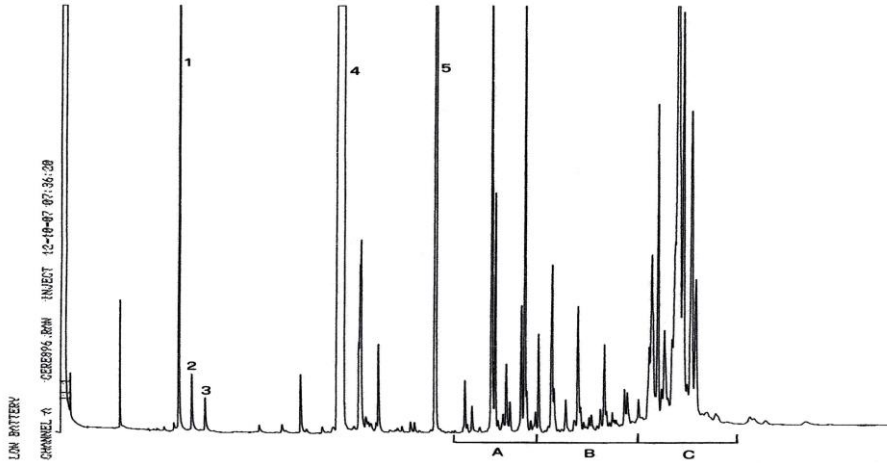
Zeytinyağında yağ asidi metil ve etil esterlerinin belirlenmesi çok eskilere dayanmaktadır. İlk kez 1986 yılında Mariani ve Fedeli, zeytinyağının apolar bileşiklerinden bu fazı ayırmışlar ve Gaz Kromatografi cihazı ile etil ve metil esterleri tespit etmişlerdir [13, 40]. Yağ asidi alkil esterler, zeytinyağının mumsu maddeler fraksiyonundaki yağ asitleri etil esterleri ve yağ asidi metil esterlerin toplamı olarak tanımlanmaktadır [35].

Natürel sızma zeytinyağında alkil esterlerin tayin edilmesi, Uluslararası Zeytin Konseyi tarafından 2009 yılında önerilmiş ve 2011 yılında IOC Ticari standardında değişiklik yapılarak AB ve ülkemiz mevzuatında da yerini almıştır. Mevzuatlara ilk girdiğinde, alkil esterler olarak limit değeri ile metil ve etil esterlerin toplamı sırasıyla

$\Sigma YAME + \Sigma FAEE \leq 75$ mg/kg veya 75 mg/kg
 $\leq \Sigma FAME + \Sigma FAEE \leq 150$ mg/kg ve $\Sigma FAEE / \Sigma FAME \leq 1.5$ mg/kg olmalıdır. [10;11; 43].

Ancak, bu limitin taklit ve tağşişi saptamasındaki yetersizliği ve toplam metil ester seviyesinin taklit ve tağşiş saptanmasında önemli bir rolü olmadığı tespit edildiğinden sadece 16 ve 18 karbonlu etil ester seviyesine ait kriter esas alınmış ve 2015 yılına kadar en fazla 40 mg/kg, 2015/2016 yılından itibaren ise Uluslararası Zeytin Konseyi Ticari Standardı, Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Pirina Yağı Tebliği'nde 35 mg/kg limiti kabul edilmiştir [42, 44].

Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografisi ile Mumsu Maddelerin, Yağ Asitleri Metil Esterleri ve Yağ Asitleri Etil Esterlerinin Tayini metodu, zeytinyağlarında mumsu maddelerin, yağ asitleri metil esterleri ve etil esterlerinin tayini için kullanılan yöntemi tarif eder.



Şekil 8. Natürel sızma zeytinyağı metil esterleri, etil esterleri ve mumsu maddeleri kromatogramı. 1- Metil heptadekanoat iç standart (IS), 2- Metil C18, 3- Etil C18, 4- Skualen, 5- Lauril araşidat iç standart (IS), A- Diterpenik esterler, B- Mumsu maddeler, C- Sterol ve triterpenik esterler [45].

Figure 8. Extra virgin olive oil methyl esters, ethyl esters and waxes chromatogram. 1- Methyl heptadecanoate internal standard (IS), 2- Methyl C18, 3- Ethyl C18, 4- Squalene, 5- Lauril arachidate internal standard (IS), A- Diterpenic esters, B- Waxy substances, C- Sterol and triterpenic esters [45].

Mumsu maddeler ve alkil esterler karbon atomlarının sayılarına göre ayrılır. Bu metot, pirina yağı ile zeytinyağını birbirinden ayırmak ve natürel sızma zeytinyağı için kalite parametresi olarak natürel sızma zeytinyağına tağşiş amacı ile karıştırılan düşük kalitedeki kolon yağı, ham zeytinyağı ve natürel birinci zeytinyağı gibi karışım yağların tespiti için kullanılır [43, 45, 46].

İç standart ilave edilen numunelerin, aktif sulu silikajel içeren kolon kromatografisi ile fraksiyonlarına ayrılması ve trigliserollerden daha az polaritede fraksiyonlara ayrılmış numunenin test koşulları altında doğrudan kapiler kolonlu gaz kromatografisi cihazıyla analiz edilmesi prensibine dayanan bu analitik metot daha

düşük kalitede natürel zeytinyağı veya kolon yağı gibi yağlarla yapılan tağşişin göstergesi niteliğinde natürel sızma zeytinyağının kalitesinin tespitinde tekrarlanabilir ve güvenilir bir metot olarak günümüzde halen kullanılmaktadır [45]. İç standart olarak kullanılan metil heptadekanoat ile C16–C18 arasındaki yağ asitleri metil ve etil esterlerinin pik alanları saptanır [Şekil 8].

Uluslararası Zeytin Konseyi Kimya Uzmanlar Grubunda Kapiler Kolonlu Gaz Kromatografi Cihazı ile Yağ Asidi Metil Esterleri, Yağ Asidi Etil Esterleri ve Mumsu Bileşiklerin Miktarının Tayini metotuna ait metot geliştirme çalışmaları Tablo 2'de görüldüğü üzere devam etmektedir [46, 47].

Tablo 2. FAEE Metotları mukayese tablosu [46, 47]
Table 2. FAEE Methods comparison chart [46, 47]

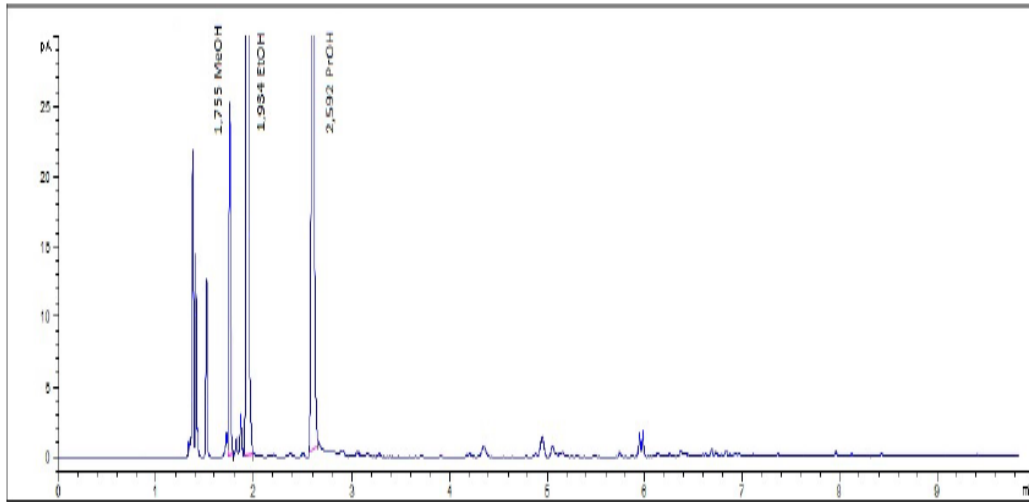
Metot	Dr.Cobo'nun Önerisi	COI/T.20TDoc.28 /rev.1 (2010)	COI/T.20TDoc.28 /rev.2 (2017)
Hidrokarbonların giderilmesi için elusyon hacmi	70mL	Hayır	Hayır
Etil esterler ve vakslar için elusyon hacmi	220mL	220mL	220mL
Trigliseridlerden esterler ve vaksların ayrılması için hekzan/eter oranı		Hekzan/eter 99:1	Hekzan/eter 99:1
Hekzan/eter karışımının ilk 40mL'sinin atılması	Evet	Hayır	Hayır
Esterler için metot validasyonu	>280mg/kg veya beyan edilen metotta etil esterlerin 280mg/kg'la sınırlandırılması	Natürel Sızma zeytinyağında 2010 ring test:5mg/kg ile 280mg/kg etil esterler	

Zeytinyağında etanol ve metanol tayininde uygulanan prensibe göre numune, metanol ve etanolün gaz fazına tamamen desorpsiyonu sağlanana kadar hermetik olarak kapalı bir şişede 110°C'de ısıtılmaktadır. Gaz ve sıvı faz dengeye ulaştığında, gaz fazının belirli bir kısmı, bir alev iyonizasyon dedektörü yardımıyla metanol ve etanolün tespit edilebileceği bir gaz kromatografi cihazına enjekte edilmektedir.

Genellikle metanol ve etanol miktarları kromatogramdaki piklerden, bir iç standart kullanılarak hesaplanmaktadır. 1-propanol çözeltisi, metanol ve etanolün miktarsal tayini için iç standart olarak kullanılmaktadır. Rafine zeytinyağından bir stok çözelti hazırlanır. Dereceli

otomatik pipet kullanılarak 400 µL 1-propanol 4°C'de bir şişe içinde bulunan 32 g rafine zeytinyağına ilave edilerek homojenize edilir. Numuneye eklenecek iç standart ise stok çözeltiden hazırlanır. Bir şişede 24 g rafine zeytinyağına 1.0 g stok çözelti eklenerek homojenize edilir.

Temiz bir cam vial içine yaklaşık 3 g zeytinyağı tartılır. 300 mg iç standart eklenir ve şişe kapağı, sıkma pensesi ile alüminyum hermetik olarak sıkılarak kapatılır. Vial kuru ısıtma sistemine yerleştirilir ve 110°C'de 60 dakika ısıtılır. Gaz ve sıvı fazı dengeye geldiğinde (1 dakika), 500 µL bir termostat kontrollü headspace şırınga kullanılarak aynı sıcaklıkta kromatografi cihazına enjekte edilir.



Şekil 9. Natürel sızma zeytinyağı etanol kromatogramı [46]
Figure 9. Extra virgin olive oil ethanol chromatogram [46]

Şekil 9'da natürel sızma zeytinyağına ait etanol ve metanol içeriğini gösteren kromatogram görülmektedir. Altta formüle göre bileşen miktarı i , mg/kg olarak ifade edilir ve sonuçlar mg/kg olarak iki haneli verilir (1).

$$w_i = \frac{M_{is} \times A_i}{m \times A_{is} \times F_i} \times 1000 \quad (1)$$

A_i i bileşenin alanı,
 A_{is} iç standartın alanı,
 F_i MeOH veya EtOH için tepki faktörü,
 m numune tartımı, g,
 m_{is} iç standart ağırlığı, mg

SONUÇ

İnsanlık tarihinden daha eski tarihi olan ve her türlü koşula dayanarak binlerce yıl yaşayabilen kadim zeytin ağacının çok değerli ürünü olan zeytinyağı, her geçen yıl daha fazla sayıda bilimsel çalışma yapılmasına rağmen halen bilim dünyasının ilgisini çekebilen ender gıdalardan birisidir. Natürel sızma zeytinyağı üretimi hem sağlıklı meyve üretimini hem de hasattan sonra iyi üretim uygulamalarını (Good Manufacture Practice-GMP) gerektirmektedir. 2000'li yıllarda zeytinyağına yapılan kolon yağı taşıdığı nedeni ile gündemimize giren yağ asidi etil ve metil esterlerinin oluşum mekanizmaları özellikle İtalya ve İspanya'da gerçekleştirilen çalışmalarla açıklığa kavuşturulmuştur.

Yağ asidi alkil esterlerinden özellikle etil esterlerin hasattan sonra düşük kalitedeki zeytin danelerinin fermentasyonu sonucu olduğu son yıllardaki çalışmalarla ortaya konmuştur. FAEE, kısa zincirli metanol ve etanol gibi alkoller ile C16 ve C18 gibi serbest yağ asitlerinin esterleşmesi ile oluşmaktadır. Etanol, hasat sonrası zeytinyağı ekstraksiyonuna kadar zeytinlerin fermentasyonu ile üretilmektedir. Ayrıca, zeytin metabolizması çoğunlukla meyvenin olgunlaşması sırasında endojen alkoller üretmektedir.

Bir kalite kriteri olan ve aynı zamanda taşıdığı tespitinde kullanılan FAEE ile bir aroma bileşeni olarak zeytinyağında var olan etil alkol üzerine yapılan çalışmalar, yağ asidi etil ve metil esterleri oluşumunun zeytin danesinin bozulmasının bir sonucu olmakla birlikte etil esterlerin, duyuşal kusurları oluşturan fermantatif süreçlerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca FAEE, kolon zeytinyağı taşıdığı yapılan hilelerin belirlenmesinde de başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Etil esterler ve etanol oluşum koşullarına ait araştırmaların derlendiği bu çalışmada, söz konusu bileşenlerin son derece hassas ve karmaşık etkilerle olduğu ve zeytinyağının duyuşal ve kimyasal özelliklerine etki ederek ürünün ekonomik değerini de değiştirebildiği ortaya konulmuştur. Zeytinyağı üretiminin %70'ini sağlayan özellikle Körfez Bölgesi ile Güney Ege Bölgesi'ndeki Ayvalık, Gemlik, Memecik gibi ana çeşitlerimiz bu gibi süreçlerden nasıl etkilendiği, içerdiği etanol seviyesi ile etil ester oluşum seviyelerine ilişkin veriler son derece sınırlıdır. Bu bakımdan söz konusu ana çeşitlerin etanol içerikleri ve zeytin sıkım sürecinden nasıl etkilendikleri üzerine çalışmaların artırılması gerektiği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Huang, C.L., Sumpio, B.E. (2007). Olive oil the Mediterranean diet and cardiovascular health. *Journal of the American College of Surgeons*, September, 207(3):407-416.
- [2] Perez-Jimenez, F., Ruano, J., Perez-Martinez, P., Lopez-Segura, F., Lopez-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health; not a question of fat alone. *Molecular Nutrition, Food Research*, 51(10), 1199-1208.

- [3] Covas, M.I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research Rev* 55, 175-186.
- [4] Covas, M.I., Konstantinidou, V., Fito, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovasc Pharmacol*, 54, 477-482.
- [5] Lanzon, A., Albi, T., Cert, A., Gracian, J. (1994). The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. *Journal of the American Oil Chemists*, 71, 285-291.
- [6] Perona J.S., Botham K.M. (2013) Olive Oil as a Functional Food: Nutritional and Health Benefits. In: Aparicio R., Harwood J. (eds) Handbook of Olive Oil. Springer, Boston, MA.
- [7] Garcia, J.M., Seller, S., Perez-Camino, M.C. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 11, 3516-3520.
- [8] Gomez-Coca, R.B., Moreda, W., Perez-Camino, M.C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135(3), 1205-1209.
- [9] Morales M.T., Aparicio-Ruiz R., Aparicio R. (2013) Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. In: Aparicio R., Harwood J. (eds) Handbook of Olive Oil. Springer, Boston, MA..
- [10] TGK (2010). Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Prina Yağı Tebliği (Tebliğ No 2010/35), Resmi Gazete, Ankara.
- [11] IOC (2011). International Olive Council Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 6, Madrid, Spain.
- [12] Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M.D., Fregapane, G., Lercker, G. (2009). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: an overview. *Italian Journal of Food Science*, 21(4), 389-406.
- [13] Biedermann, M., Bongartz, A., Mariani, C., Grob, K. (2008). Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research Technology*, 228(1), 65-74.
- [14] Gómez-Coca, R.B., Fernandes, G.D., Pérez-Camino, M.del C., Moreda, W. (2016) Fatty acid ethyl esters (FAEE) in extra virgin olive oil: A case study of a quality parameter. *Food Science and Technology*, 66, 378-383.
- [15] Anonymous (2007). Official Journal of the European Union, L 299/115.
- [16] Aparicio-Ruiz, R., Romero, I., García-González, D.L., Oliver-Pozo, C., Aparicio, R. (2017). Soft-deodorization of virgin olive oil: Study of the changes of quality and chemical composition. *Food Chemistry*, 220, 42-50.
- [17] Grob, K., Biedermann, M., Bronz, M., Schmid, J.P. (1994). Recognition of mild deodorization of edible oils by the loss of volatile components. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 199, 191-194.
- [18] Mariani, C., Venturini, S., Gasparoli, A., Tagliabue, S., Bondioli, P. (2000). Considerazioni preliminary relative agli oli lampanti deodorati. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 77, 49-59.
- [19] Di Serio, M.G., Giansante, L., Di Loreto, G., Faberi,

- A., Ricchetti, L., Di Giacinto, L. (2017). Ethyl esters versus fermentative organoleptic defects in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 219, 33–39.
- [20] García-Vico, L., Belaj, A., León, L., Rosa, R. de la, Sanz, C., Pérez, A.G. (2018). A survey of ethanol content in virgin olive oil. *Food Control*, 91, 248–253.
- [21] Beltran, G., Bejaoui, M.A., Jimenez, A., Sanchez-Ortiz, A. (2015). Ethanol in Olive Fruit. Changes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(22), 5309–5312.
- [22] Masella, M., Guerrini, L., Angeloni, G., Zanoni, B., Parenti, A. (2019). Ethanol from olive paste during malaxation, exploratory experiments. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(1), 1800238.
- [23] Boudebouz, A., Agusti, R., Ricard, B., Montserrat, M. (2019). Effect of agronomic and technological factors on the formation of ethyl esters in virgin olive oil in Catalonia. *Universitat Rovira I Virgili (URV) PhD student Annual Seminar 2019*.
- [24] Köseoğlu, O., Sevim, D., Kadiroğlu, P. (2019). Effects of filtration on the quality properties of extra virgin olive oils during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(3), 291-301.
- [25] Luna, G., Morales, M.T, Aparicio, R., (2006). Characterization of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98(2):243-252.
- [26] Garcia-Vico, L., Belaj, L., Leon, L., De la Rosa, R., Sanz, C., Perez, A.G. (2018). A survey of ethanol content in virgin olive oil. *Postprint of Food Control*, 91, 248-253.
- [27] Moyano, E., Encinas-Villarejo, S., López-Ráez, J.A., Redondo-Nevado, J., Blanco-Portales, R., Bellido, M.L., Sanz, C., Caballero, J.L., Muñoz-Blanco, J. (2004). Comparative study between two strawberry pyruvate decarboxylase genes along fruit development and ripening, post-harvest and stress conditions. *Plant Science*, 166, 835-845.
- [28] Tadege, M., Dupuis, I., Kuhlemeier, C. (1999). Ethanol fermentation: new functions for an 342 old pathway. *Trends in Plant Science*, 8, 320-325.
- [29] Conte, L., Mariani, C., Gallina Toschi, T., Tagliabue, S. (2014). Alkyl esters and related 277 compounds in virgin olive oils: their evolution over time. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 91, 21-29.
- [30] Salas, J.J., Sanchez, J. (1997). Biogenesis of alcohols present in the aroma of virgin olive oil. *Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of Plant Lipids*, 328–330.
- [31] Perez-Camino, M.C., Moreda, W., Cert, A. (2002). Determination of Esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4721-5.
- [32] Gómez-Coca, R.B., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135(3), 1205–1209.
- [33] International Olive Council Chemist Meeting Report 10.09. (2015) Annex 5.a.1.
- [34] Jabeur, Zribi A, Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015). Effect of olive storage conditions on Chemlali olive oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food Chemistry*, 169, 289-296.
- [35] Mariani, C., Bellan, G. (2008). Individuazione di oli di qualità inferiore negli oli di oliva extra vergini. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 1, 3-20.
- [36] Alcalá, S., Ocana, M.T., Cardenas, J.R., Miguel, A.M., Vilar, J., Espinda, F., Moya, M. (2017). Alkyl esters content and other quality parameters in oil mill. A response surface methodology study. *Lipid Science European Journal*, 119(1), 1600026.
- [37] Perez-Camino M. Cert A., Romero Segura, A. (2008). Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (15)6740-6744.
- [38] Di Loreto, G., Giansante, L., Alfei, B., Di Giacinto, L. (2014). Alchil esteri ed altri indicatori per la tutela della qualita e della genuinita degli oli extra vergini Italiani. *Rivista Italiana Sostanze Grasse*, 91, 35-45.
- [39] Gómez-Coca, R.B., Fernandes, G.D., Pérez-Camino, M. del C., Moreda, W. (2016). Fatty acid ethyl esters (FAEE) in extra virgin olive oil: A case study of a quality parameter. *Food Science and Technology*, 66, 378–383.
- [40] IOC (2016). International Olive Council Electronic Working Group on Fatty Acid Ethyl Esters (FAEEs) in extra virgin olive oils (EVOO-Final Report 2016).
- [41] Mariani, C., Fedeli, E. (1986). Detection of extraction olive oils in pressure ones. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 63, 3-17.
- [42] TGK (2017). Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Prina Yağı Tebliği (Tebliğ No: 2017/26), Resmi Gazete (Tarih: 17.09.2017, Sayı: 30183), Ankara.
- [43] EC Commission Regulation (EEC) (2011). No. 61/2011 of 24 January 2011 amending Regulation No. 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, L 23, 1–14.
- [44] IOC (2016). International Olive Council Trade Standard COI/T.15/NC No 3/ Rev.11, Madrid, Spain.
- [45] TGK (2014). Türk Gıda Kodeksi Zeytinyağı ve Prina Yağı Analiz Metotları Tebliği (Tebliğ No: 2014/53), Resmi Gazete (Tarih: 20.11.2014, Sayı: 29181), Ankara.
- [46] IOC (2017). International Olive Council, Determination of the Content of Waxes, Fatty Acid Methyl Esters and Fatty Acid Ethyl Esters by Capillary Gas Chromatography COI/T.20TDoc.28/Rev.2, Madrid, Spain.
- [47] International Olive Council Electronic Working Group for Revision of Codex Trade Standard-Ethyl Esters 20042020-ENK.
- [48] Beltran, G., Sanchez, R., Sanchez-Ortiz, A., Aguilera, M.P., Bejaoui, M.A., Jimenez, A. (2016). How “ground-picked” olive fruits affect virgin olive oil ethanol content, ethyl esters and quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(11), 3801–3806.