

Zeytinyağı Aromasının Oluşumunda Lipoksijenaz Yolu Reaksiyonları

Lipoxygenase Pathway Reactions in the Formation of Olive Oil Aroma

Emin YILMAZ¹, Mustafa ÖĞÜTCÜ²

¹Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Müh.-Mim. Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 17020, Çanakkale

²Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bayramiç Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü, Bayramiç, Çanakkale

Geliş tarihi: 23.02.2012

Kabul tarihi: 15.07.2012

Özet

Lipoksijenaz yolu reaksiyonları, bitkilerde olgunlaşma sürecinde farklı amaçlarla kullanılacak bazı kimyasal maddelerin üretildiği bir seri enzimatik reaksiyondan oluşur. Genellikle doymamış yağ asitlerinin substrat olarak harcandığı bu yolla, bazı bitki hormonları, savunma molekülleri ve aroma maddeleri sentezlenir. Zeytin meyvesinin gelişim sürecinde aktifleşen lipoksijenaz, hidroperoksit liaz ve alkol dehidrojenaz enzimleriyle, doymamış yağ asitleri bir seri reaksiyonla volatil C6 aromatiklerine dönüşür. Bunlar tipik zeytin ve zeytinyağı aroması için çok önemlidir. Bu derlemede, lipoksijenaz yolu enzimleri, reaksiyonları ve kontrol yolları hakkındaki bilgiler tartışılmıştır. Farklı zeytin türlerinde, olgunlaşma periyodunca bu enzimlerin araştırılması ve modifikasyonları natürel zeytinyağı aromasında mümkün olan iyileştirmelerin yapılabilmesi için gereklidir.

Anahtar kelimeler: Zeytinyağı, lipoksijenaz aktivitesi, aroma

Abstract

The lipoxygenase pathway includes a series of enzymatic reactions in plants where some chemicals are produced during the maturation stage for some purposes. Generally some unsaturated fatty acids are utilized as substrates and some plant hormones, defence molecules and aromatics are synthesized. During the ripening process of the olive fruit, the lipoxygenase, hydroperoxide lyase and alcohol dehydrogenase enzymes activate and produce some C6 aromatics. These are essential components of the typical olive and olive oil aroma. In this review, the pathway enzymes, their activities and control mechanisms have discussed. Studying the activities of these enzymes and modifying them in different olive cultures during the development and ripening period are imperial to success some changes in the perceived aroma of the naturel olive oils.

Keywords: Olive oil, lipoxygenase activity, flavor

Giriş

Bitkisel kaynaklı gıda maddelerinde aromanın çok önemli bir kısmı bitki fizyolojisinin bir parçası olarak gelişme sürecinde sentezlenir. İşlenmiş gıdalarda, gıda işlem operasyonlarının etkisiyle de bazı aromalar oluşur. Gıdaların tüketiciler tarafından beğenilmesinde ve yeniden satın alınma kararında hissedilen aroma kalitesi hiç şüphesiz diğer kalite kriterleri kadar önemlidir. Bir gıda maddesi

ne kadar sağlıklı, hijyenik koşullarda sunulmuş olursa olsun, tat, lezzet ve aromasının tüketici beğenisini karşılayabilecek kalitede olması gereklidir (Yılmaz, 2001).

Bitkilerin normal gelişim fizyolojileri sürecinde, hücrede birçok enzimatik reaksiyonlar oluşur. Birçok meyve ve sebzelerde aromanın, lipoksijenaz yolu reaksiyonları, glikozid yıkımı reaksiyonları, şikimik asit yolu reaksiyonları, karotenoid yıkım

reaksiyonları, amino asit yıkım reaksiyonları sonucu ve diğer bazı reaksiyonlarla üretildiği bilinmektedir. Bazılarında bu reaksiyonların bir kısmı baskın olurken bazı bitkilerde sadece bir tanesi de etken olabilir. Lipoksijenaz yolu reaksiyonları aromanın oluşumu yanında bitki fizyolojisinde önemli diğer metabolitleri de üretir. Bunlar bitki gelişim ve olgunlaşmasında, savunma sistemlerinde ve diğer fizyolojik hadiselerinde görevlidirler. Zeytin meyvesinin gelişim sürecinde aktifleşen lipoksijenaz yolu enzimlerinin çalışması sonucu zeytinde ve dolayısıyla da zeytinyağında çok önemli bazı aroma maddeleri sentezlenir. Bu reaksiyonların ve enzimlerinin kinetiğinin bilinmesi bazı teknolojik işlemlerde istenen modifikasyonların ve kontrolün yapılmasıyla arzu edilir aromada zeytinyağlarının üretilmesine de yardımcı olabilecektir (Yılmaz, 2001). Bu makalede zeytin meyvesinde lipoksijenaz yolu incelenecek, zeytin dokusundaki enzimlerin özellikleri ve zeytinyağı aromasının biyosentezi açıklanacaktır.

LOX yolu reaksiyonları ve fizyolojik görevleri

Bitki dokularında lipit peroksidasyonu enzimatik yollarla başlar ki bunun en önemli yolu oksilipin / lipoksijenaz (LOX) yolu reaksiyonlarıdır. LOX yolu reaksiyonlarının ürünleri, hücreye gelen uyarı tipi, kullanılan substratlar ve reaksiyonun meydana geldiği hücre içi bölgeye göre değişir. Bununla beraber, yağ asitlerinin oksitlenmesiyle oluşmuş bileşenlere bir jenerik isim olarak oksilipin adı verilmiştir. Bunun içinde yağ asidi hidroperoksitleri, hidroksi yağ asitleri, epoksi yağ asitleri, keto yağ asitleri, volatil aldehitler ve siklik bileşenler bulunur. Bu ürünler taze bitkilerde aromayı, tadı ve dokunun dayanıklılığını etkilerler. Genel olarak, bu yolda doymamış yağ asitleri substrat olarak kullanılırsa da, *cis,cis*-1,4-pentadiene yapısındaki yağ asitleri tercih edilen substratlardır. Bitkilerde linoleik ve linolenik asit, memelilerde ise araşidonik ve eikozapentaenoik asit ana substratlardır (Gardner, 1995; Zimmerman and Vick, 1987).

Bitkilerdeki LOX yolunun volatil aroma maddeleri üreten dalından başka, önemli bitki büyüme hormonlarından olan jasmonik asit ve traumatinin de sentezlendiği yolları vardır. Ancak bu makalenin

ana teması aroma sentez reaksiyonlarıdır. LOX yolunda ilk reaksiyon, substrat olarak kullanılacak yağ asitlerinin, hücresel uyarı sisteminin çalışmasıyla hidroliz (lipoliz) reaksiyonlarıyla serbest hale gelmesidir. Daha sonra serideki ilk reaksiyon lipoksijenaz katalizidir. LOX katalizi 3 aşamada oluşur; a) iki çift bağ arasındaki metilen grubundan hidrojenlerin stereospesifik olarak uzaklaştırılması, b) oluşan serbest radikalın allil düzlemde yeniden dizaynı ve c) moleküler oksijenin, *2-trans,4-cis*-pentadienil-1 radikaline bağlanması. Birinci basamağın hız-limitleyici reaksiyon olduğu belirlenmiştir. Bilinen tüm bitki LOX'ları, linoleik veya linolenik asitin C-11 proçiral merkezine saldırır. Oluşan bis-allil radikalleri (n+2) veya (n-2) izomerizasyonuna uğrar. Birçok LOX yüksek seviyede bölge-seçiciliği gösterir ve linoleik asiti, 13(S)-hidroperoksi-*cis*-9,*trans*-11-oktadekanoik asit (13S-HPOD) ve 9(S)-hidroperoksi-*trans*-10,*cis*-12-oktadekanoik aside (9S-HPOD); linolenik asiti de, 13(S)-hidroperoksi-*cis*-9,*trans*-11,*cis*-15-oktadekatrienoik asite (13S-HPOT) ve 9(S)-hidroperoksi-*trans*-10,*cis*-12,*cis*-15-oktadekatrienoik aside (9S-HPOT) dönüştürür (Gardner, 1995; Grechkin, 1998). Oluşan bu hidroperoksitler daha sonra substrat olarak diğer bazı yollarda kullanılırlar: hidroperoksit liaz (HPL) yolu, hidroperoksit dehidrataz (HPD) yolu, hidroperoksit izomeraz (HPI) (allen oksit sentaz yolu) yolu ve hidroperoksit-bağımlı peroksijenaz / epoksijenaz (HPP / HPE) yolu (Zhuang ve ark, 1998).

Volatil aromatiklerin üretildiği HPL yolunda 'heterolitik' ve 'homolitik' metabolizma reaksiyonlarıyla yağ asidi hidroperoksitleri parçalanır. Homolitik yol anaerobiktir ve serbet radikal seviyesinde reaksiyon oluşur. Heterolitik yolda, hidroperoksi yağ asitlerinin hidroperoksit karbonu ile komşu metin grubu arasındaki bağda kopma sağlanır. Bu reaksiyonla, 13-hidroperoksitlerden C6 aldehitleri ve C12 aldoasitleri ve 9-hidroperoksitlerden de C9 aldehitleri ve C9 aldoasitleri oluşur. Zeytin meyvesin için çizilen LOX yolu reaksiyonları Şekil 1'de gösterilmiştir. HPL reaksiyonunun mekanizması a) epoksi allilik karboksasyon veren, hidroperoksit protonasyon-dehidrasyonu, b) epoksi allil katyonunun, oksoniyum iyonuna değişimi, c)

ürünün hemiasetale hidroksilasyonu, ve d) hemiasetalin 2 aldehite dekompoze olması basamaklarından oluşur. HPL yolunun birincil ürünleri birçok bitkide tipik aromayı oluşturur. Sentezlenen bu birincil ürünler daha sonra 3 ayrı reaksiyonla dönüştürülebilir. Birincisinde allilik izomerizasyon ile, 3-Z-alkenaller, 2-trans-alkenallara dönüşür (örneğin *cis*-3-hekzenalin *trans*-2-hekzenale dönüşümü); ikincisinde, alkol dehidrojenaz (ADH) enziminin aktivitesiyle aldehit indirgenmesi reaksiyonları oluşur (örneğin *cis*-3-hekzenalin *cis*-3-hekzenole dönüşümü); üçüncüsünde, *cis*-3-alkenallerin eşdeğer hidroperoksit türevlerine oksijenasyonu oluşur. Tüm bu reaksiyonların ürünleri, yaraların iyileşmesi, sitostatik aktivite, DNA yıkımı, protein-modifikasyonları, antimikrobiyal aktivite, zararlılara (böcek) karşı dayanıklılık, fungal toksisite, yaşlanma, ikincil metabolit indüksiyonu, etilen stimülasyonu, büyümenin inhibisyonu gibi çok önemli bitki fizyolojik olaylarında da rol alırlar (Zhuang ve ark, 1998; Grechkin, 1998; Gardner, 1995).

LOX yolu reaksiyonlarında, yağ asidi hidroperoksitlerinin devam edeceği diğer önemli alt yol allen oksit sentaz reaksiyonudur. Bu reaksiyonla yağ asidi hidroperoksitlerinden önce 12-okso-fitodienoik asit sentezlenir. Bunun bir seri dönüşümü sonucunda 7-izo-jasmonik asit ve jasmonik asit ile bazı türevleri sentezlenir. Bunlar önemli bitki hormonlarıdır. Genel olarak LOX yolu reaksiyonları normal bitkisel dokuda çok düşük seviyede oluşursa da, herhangi bir uyarı (fungal enfeksiyon, yaralanma, kesme v.b.) sonucu aktifleşir. Dolayısıyla bu etkilere karşı bir savunma mekanizması gelişir. Jasmonik asit ve türevlerinin fizyolojik etkileri oldukça çeşitli ve fazladır. En önemli biyolojik etkileri şunlardır: a) depo proteinleri, LOX enzimi, proteinaz inhibitörleri, napin, krusiferin, polifenol oksidaz, peroksidaz, yağ-taşıyıcı proteinler gibi hücre içi proteinlerin sentezini başlatmak, b) protein yıkımını başlatmak, c) ikincil metabolit sentezini başlatmak, d) tüber oluşumunu hızlandırmak, e) yaşlanma ve gelişmenin durdurulması, f) etilen stimülasyonu, çimlenmenin inhibisyonu, yaprak oluşumunun engellenmesi, likopen inhibisyonu gibi diğer etkiler (Gardner, 1995). Bu makalenin

asıl ilgi alanı LOX yolunun volatil sentezlenen dalı olduğu için bitki fizyolojisine ait bu kısmın daha fazla detayından kaçınılacaktır.

LOX yolu reaksiyonlarıyla volatile aroma maddeleri arasındaki ilişkiyi açıklamak üzere bazı *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Genellikle bu çalışmalarda bazı bitki dokuları parçalandıktan sonra linoleik asit ile inkübe edilmiş ve oluşan volatillerin konsantrasyon değişimi zamanla izlenmiştir. Bu çalışmalarda bitki doku ekstraktının kaynatılmasının veya H₂O₂ ile muamelesinin sentezi durdurduğu, FeSO₄ ve CuCl₂ katılımlarının ise yükselttiği gösterilmiştir. Ayrıca radyoaktif izotop işaretli substratlarla da ürünler izlenmiş ve enzimlerin volatile aromatikleri sentezlemede görevli oldukları belirlenmiştir (Matthew ve ark, 1972). Öte yandan, domates meyvesinde LOX yolu enzim aktivitesinin üretilen aromatic konsantrasyonuyla ilişkisinin belirsiz olduğu, sebebinde substrat konsantrasyonu olabileceği bildirilmiştir (Shewfelt ve ark., 2001).

Zeytin meyvesinde LOX yolu reaksiyonları

Birçok meyvede olduğu gibi zeytin meyvesinde de olgunlaşma sırasında ve hasat sonrası depolama ve işlemler sırasında bazı enzim aktiviteleri gelişmekte ve substratlardan son ürün olarak uçucu aromatik maddeler sentezleyebilmektedirler. Zeytin ve zeytinyağı aromasında çok önemli bir yer tutan C5 ve C6 aldehit ve alkoller tipik 'yeşil, kesilmiş çimen, çiçek, meyvemsi' karakterlerini sağlayan volatillerdir ve bunlar LOX yolunun ürünleridir. Bu reaksiyon yolunun ürünleri arasında yağ asidi hidroperoksitleri, hidroksi yağ asitleri, epoksi ve keto yağ asitleri, volatil aldehitler ve alkoller ve siklik bileşenler bulunmaktadır. Bu yolun genel substratı *cis,cis*-1,4-pentadien yapısındaki yağ asitleridir (bitkilerde linoleik ve linolenik asitler). Reaksiyonlar lipolitik enzim aktivitesiyle başlar. Lipaz/Fosfolipaz faaliyetleri sonucu serbest hale gelen linoleik ve linolenik asitler üzerinde seridedeki ilk çalışmayı lipoksijenaz (LOX) enzimi yapar. Lipoksijenaz enzimleri buldukları kaynağa göre farklı spesifiklik gösterirler ve bir seri hidroperoksi yağ asitleri üretirler (6-, 9-, 10-, ve 13-hidroperoksi yağ asitleri). Oluşan bu hidroperoksitler daha son-

ra, hidroperoksit liaz (HPL) enziminin aktivitesiyle eşdeğer aldehit ve aldoasitleri verir. HPL reaksiyon ürünleri daha sonra alkol dehidrojenaz (ADH) enzim aktivitesiyle eşdeğer alkollere dönüşür. Veya allil izomerizasyonu ve alkol asetil transferaz (ATT) aktiviteleriyle eşdeğer alkol, ester ve ketonlara dönüşürler. Zeytin meyvesi için önerilmiş LOX yolu reaksiyonları Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu reaksiyonlardan üretilen volatiller meyvenin tür, yetiştirme koşulları ve olgunluk derecesine göre farklı miktarlarda oluşarak tipik aromayı meydana getirirler. Ayrıca meyvenin zedelenmesi, hasat sonrası uygun olmayan koşullarda bekletilmesi, dokuda korunmuş olan enzimleri aktifleştirdiği için reaksiyon hızlanarak istenmeyen miktarlarda volatil birikmesine de neden olabilir (Yılmaz, 2001).

Zeytinde LOX yolu reaksiyonları detaylı olarak 1990'larda çalışılmıştır. Yapılan bir çalışmada zeytin meyvesinde hem yol enzimlerinin aktiviteleri tespit edilmiş hem de ham enzim ekstraktı uygun substratlarla inkübe edilerek, volatillerin oluşumu gözlenmiştir. Zeytinde özellikle 13-hidroperoksitlerin parçalandığı ve bunlardan da ana olarak heksanal ve *trans*-2-heksanal oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca zeytin lipoksijenazının 9-hidroperoksitleri daha fazla ürettiği, ancak zeytin hidroperoksit liazının ise 9-hidroperoksi spesifik olduğu ifade edilmiştir (Olias ve ark, 1993).

Zeytin meyvesinde lipoksijenaz enziminin varlığı ve aktivitesi araştırılmıştır. Bir çalışmada, zeytin meyvesinde LOX'un özellikle membran fraksiyonlarında yoğunlaştığı ve optimum pH değerinin 5.0 ile 5.5 arasında olduğu ve enzimin özellikle linolenik asiti substrat olarak tercih ettiği bildirilmiştir. Ayrıca bu çalışmada enzimin hem linoleik asit hem de linolenik asitten %75-90 oranında 13-hidroperoksi yağ asitleri ürettiği ve enzim aktivitesinin çiçeklenmeden 15 hafta sonra maksimuma çıktığı rapor edilmiştir (Sanchez ve ark, 1999). Benzer diğer bir çalışmada ise, zeytin LOX'unun biri 6.5 ve diğeri 8.5'de olmak üzere iki pH optimumunun bulunduğu ve en yüksek aktivitenin çiçeklenmeden sonraki 120. günde tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca LOX aktivitesiyle zeytin fe-

nölü olan oleuropeinin ters ilişkili olarak değiştikleri de belirlenmiştir (Gregorio ve ark, 2000). Farklı zeytin türlerinde yapılan bir kinetik çalışmada LOX için optimum pH olarak 6.0 ve optimum sıcaklık olarak ta 30 °C belirlenmiştir. Bu çalışmada LOX için Vmax, 4-130 ünite/mg protein ve Km de 62.2-118 µM aralığında belirlenmiştir. Ayrıca her bir zeytin türünün enzim aktivitesi ve toplam C6 volatil madde miktarı karşılaştırılmış ve doğrusal bir ilişki bulunmuştur (Ridolfi ve ark, 2002).

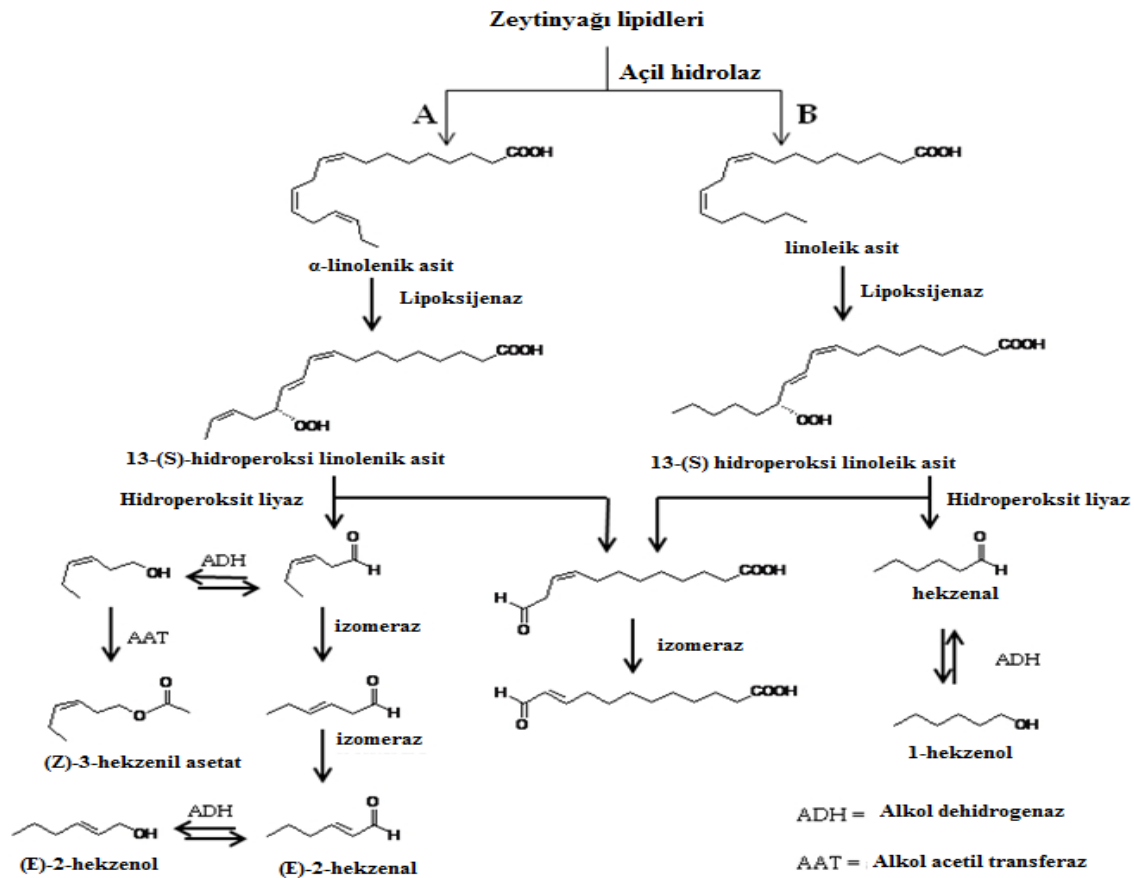
Bir başka çalışmada ise zeytin meyvesinin olgunlaşması sürecindeki LOX aktivitesi değişimi ve klorofil pigmentindeki oksidasyon takip edilmiştir. Enzim aktivitesinin yüksek olduğu durumlarda, okside klorofilin de arttığı ve meyvelerdeki yeşil noktalanma görüntüsünün bu ilişkiden kaynaklandığı bildirilmiştir (Minguez-Mosquera ve ark, 2003). Zeytinyağına geçen LOX aktivitesi de bir çalışmada rapor edilmiştir. Natürel zeytinyağları toplam protein, LOX ve polifenol oksidaz (PPO) enzim aktiviteleri için analiz edilmiş ve enzimlerin yağda da aktif oldukları bulunmuştur. Her iki enzimin de hem proteazlara hem de sıcaklığa karşı hassas olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan kinetik çalışma sonucu, LOX'un linoleik asit substratı ile Km değeri 0.5 mM ve PPO'nun 4-metilcateşol substratı ile Km değeri de 152 mM olarak rapor edilmiştir (Sotiroudis ve ark, 1998).

Zeytin meyvesinde hidroperoksit liaz (HPL) enzim aktivitesi de analiz edilmiştir. Yüksek malaksasyon sıcaklığında bu enzimin aktivitesi düştüğü için toplam volatil miktarında önemli düşüşler gözlenmiştir. HPL aktivitesinin 15 °C civarında en yüksek olduğu ve 35 °C'nin üzerinde ise aktivitenin aniden düştüğü tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda malaksasyon sıcaklığının 20 °C'yi geçmemesinin önemi vurgulanmıştır (Sanchez ve Salas, 1999). Enzim aktivite ve kinetik çalışmaları biraz daha zor olan ve özel substratlarının laboratuarda sentezlenmesi gerekli olan HPL'in assayı için kolay teknikler literatürde bildirilmiştir (Vick, 1991). Olgunlaşan zeytin meyvelerinde LOX yolunun önemli diğer enzimi olan alkol dehidrojenaz (ADH) da analiz edilmiştir. Heksanal substrat olarak kullanıldığında zeytinde 3 tip ADH bulunmuş-

tur. Bunlardan birisi, NAD-bağımlı enzim, hekzanal için yüksek Km (2.1 mM) vermiştir. Diğer ikisi NADP-bağımlı ve hekzanal için yüksek Km (1.9) ve düşük Km (0.04) gösteren formlardır. Ayrıca enzim aktivitesinin çiçeklenmeden sonra 25. haftaya kadar arttığı ve daha sonra azalmaya başladığı da gösterilmiştir (Sanchez ve Salas, 1998).

Zeytin polifenol oksidaz (PPO) enzimini analiz etmek için duyarlı, spesifik ve güvenilir bir spektroskopik teknik geliştirilmiştir. Genel olarak PPO aktivitesi fenollerin hidroksilasyonu ve difenollerin oksidasyonu reaksiyonlarını kapsar. Tipik olan özellik enzimin reaksiyon ürünü tarafından kuvvetle inhibe edilmesidir. Bu nedenle assay sistemlerinde özel substrat preparatları kullanılır (Rescigno ve ark, 2001). Zeytin meyvesinin olgunlaşma sürecindeki PPO ve peroksidaz enzim aktiviteleri de izlenmiştir. Aktivitenin olgunlaşma sürecinde sürekli arttığı ve tam meyve gelişiminde

maksimuma ulaştığı ve bu aşamadan sonrada yüksek aktivitenin korunduğu gözlenmiştir (Ebrahimzadeh ve ark, 2003). Bir diğer çalışmada ise zeytinden ekstrakte edilen fenol oksidaz enzim kompleksi, karasudaki fenollerin polimerizasyonunda kullanılmıştır. Karasudaki fenoller çevre kirliliğine neden olduğu için bunların oksidasyon ve takiben otopolimerizasyonu sonucu ayrıştırılması önemlidir. Yapılan çalışma olumlu sonuçlar vermiş ancak enzimin çok kısa sürelerde aktivitesini kaybettiği bulunmuştur. Dolayısıyla işlemin ekonomik olamayacağı bildirilmiştir (Toscano ve ark, 2003). Zeytinyağının tipik tadının oluşumunda rol alan ve antioksidan özellik gösteren tirosol ve hidroksitirosol yine zeytinde doğal olarak bulunan ligstrosid ve oleuropein glukozidlerinin β -glukozidaz enzimi tarafından parçalanmasıyla açığa çıkmaktadır. Yağa geçen bu maddeler aroma değil de tat üzerinde etkili olmaktadır (Kiritsakis, 2002).



Şekil 1. Zeytinde Lipoksijenaz Pathway Reaksiyonları ve Oluşan Ana Volatiller (Benincasa, ve ark., 2003, Kiritsakis, 2002 ve Sindona ve ark, 2003'den alınmıştır).

Düşük molekül ağırlıklı (300 Da'dan az) moleküller oda sıcaklığında uçucu duruma gelebilirler (volatil) ve eğer burun ile algılanabilen bir kokuya sahiplerse aromatik olarak adlandırılırlar. Zeytin meyvesinde ve zeytinyağında, aldehit, alkol, ester, hidrokarbon, keton, furan, meyve esterleri gibi çok farklı kimyasal yapıda yüzlerce volatil tesbit edilmiştir. Bunlardan en az 120 kadarının algılanan aromaya katkı sağladığı, ancak bunlardan sadece 30 civarında molekülün tipik zeytinyağı aroması açısından önemli bulunmuştur. Bunlar duyuşal eşik değerlerine göre direkt olarak veya indirekt olarak aromayı oluştururlar. Bu önemli aromatiklerden de çok önemli bir kısım LOX yolundan üretilmektedir. Bir çalışmada farklı zeytin türlerinde LOX aktivitesi ve C6 volatil miktarları karşılaştırılmıştır. Yüksek LOX aktivitesine sahip türlerde daha yüksek oranda volatil aromatik konsantrasyonu bulunmuştur. Bu çalışmada LOX yolunda üretilen ve tanımlanan zeytinyağı aromatikleri Tablo 1'de duyuşal tanımlayıcı terimleriyle gösterilmiştir (Ridolfi ve ark, 2002). Tablodan da görüldüğü gibi LOX yolu aromatikleri 'kesilmiş çimenden tatlı, elma ve çileğe' kadar değişen karakterlerde aromalar sağlarlar.

Tablo 1. Zeytinyağında Bulunan ve LOX Yolunda Üretilen Aromatikler (Ridolfi ve ark, 2002'den alınmıştır).

Aroma Maddesi	Duyuşal Tanımı
3-Pentanon	Tatlı
1-Penten-3-one	Tatlı, Çilek
Hekzanal	Yeşil, Elma
1-Penten-3-ol	Islak toprak
<i>trans</i> -2-Hekzanal	Kötü
1-Pentanol	Yeşil-meyvemsi
<i>trans</i> -2-Penten-1-ol	Keskin, acımsı
1-Hekzanol	Yeşil elma
<i>trans</i> -3-Hekzan-1-ol	Meyve, Yumuşak
<i>cis</i> -3-Hekzan-1-ol	Yeşil
<i>trans</i> -2-Hekzan-1-ol	Yeşil, Muz
(E,E)-2,4-Hekzadienal	Olgun meyve

Zeytinyağındaki aromatik maddelerin tür ve konsantrasyonları, ağaç türü, coğrafi orijin, meyve olgunluk seviyesi, işleme tekniği ve operasyon değişkenleriyle depolama koşulları tarafından etkilenmektedir. Bunların etki yollarının ve yönlerinin incelenmesi bu makalenin konusu olmamakla beraber, zeytin türüne ilaveten, hasat olgunluğu, hamur malaksasyon koşulları ve yağ ayırma yönteminin en önemli faktörler olduğu bildirilmiştir. Zeytin meyve kabuk renginin yeşilden pembeye

değiştirdiği dönemlerde C6 aldehit konsantrasyonunun en yüksek olduğu bildirilmiştir. Malaksasyon sıcaklığının 30 °C civarında olduğu koşullarda hoşça giden seviyede yeşil aromalarının oluştuğu, daha yüksek sıcaklıklarda ise sorunların oluştuğu bulunmuştur (Kalua ve ark., 2007).

Uluslararası Zeytin Konseyi (IOC, 1987) zeytinyağlarının duyuşal olarak tanımlanması için bir sistem önermiştir. Bu sistemde duyuşal tanımlayıcılar pozitif, negatif ve diğerleri olarak ayrılmıştır. Pozitif tanımlayıcı terimlerden 'meyvemsi' nin etil propiyonat ve heksil asetat tarafından; 'bitter' teriminin kinonlar, caffeic acid ve alkaloidler tarafından; 'yakıcı' teriminin ise 1-penten-3-one tarafından oluşturulduğu bildirilmiştir. IOOC tarafından yaygın duyuşal negatif veya hata tanımlayıcıları olarak belirlenen 'küflü' anaerobik fermentasyonlardan; 'topraksı-nemli' küf ve maya aktivitesi sonucu oluşan 2-heptanone ve 2-nonanone tarafından; 'çamurlu' dip zeytinlerinden ve çamurla temastan; 'şarapsı-sirkemsi' fermentasyonlarla oluşan asetik asit, etil asetat ve etanolden; 'metalik' 1-penten-3-one bileşeninden ve 'ransit'in bazı doymamış aldehitlerden kaynaklandığı bildirilmiştir. Genel olarak, zeytinyağında bulunan C6 aldehit ve alkoller, tatlılık algılarıyla, C5 aldehit ve alkoller pozitif manada yakıcılık ve acılık algılarıyla, küçük ketonların yine pozitif algılarıyla, esterlerin meyvemsilik algılarıyla ve karboksilik asitlerin çok yakıcı ve negatif algılarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kalua ve ark., 2007).

Zeytinyağının depolanma sürecinde, çevre koşulları ve yağın bileşimine bağlı olarak oksidasyon reaksiyonları oluşabilir. Enzimatik olmayan oto-oksidasyon ve foto-oksidasyon ile, yağda kalan LOX ve benzeri enzimlerden kaynaklanan enzimatik oksidasyonlar zeytinyağının dayanıklılığını önemli derecede belirler. Özellikle depo sıcaklığı, ışıklandırma durumu, oksijene açıklık durumu ve yağın antioksidan madde bileşimi belirleyici faktörlerdir. Zeytinyağında depolama sürecinde bir kısım LOX ve diğer oksidasyon enzimlerinin bulunduğu bildirilmiştir. Özellikle yaygın uygulamada olan zeytinlerin çekirdekleriyle beraber hamur haline getirilmesinde çekirdek enzimlerinin de yağa geçtiği bulunmuştur. Ancak özellikle depo sıcaklığı ve

oksijen temasının bu enzim faaliyetlerinin kontrolü için yeterli olabileceği bildirilmiştir. Düşük sıcaklıklarda depolanan yağlarda keton ve aldehitlerin, oksijenle-temaslı ortamlarda depolanan yağlarda karboksilik asitlerin ve yüksek sıcaklıkta depolanan yağlarda ise polimerik uçucu bileşenlerin dominant hale geldiği bildirilmiştir (Boskou, 1996; Kalua ve ark., 2007).

Zeytin meyvesinden yağ ekstraksiyonu sürecinde lipoksijenaz aktivitesinin, uçucu bileşenlerin biyosentezi için sınırlayıcı bir faktör olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla uçucu bileşen profilleri farklı olan iki (Arbequina ve Picual) zeytin çeşidinin natürel zeytinyağına işleme sürecinde eksojen LOX aktivitesi (LOX-1) ve LOX (octyl gallate, phenidone, and phenylbutazone) inhibitörleri kullanılarak LOX aktivite yükleri modifiye edilmiştir. Çalışmada sonuç olarak, LOX aktivitesinin yağda uçucu bileşenlerin sentezi için limitleyici bir faktör olduğu ve bu sınırlamanın Picual çeşidinde Arbequina çeşidine göre daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmada, LOX aktivitesinin bu sınırlayıcı etkisinin genellikle işleme sırasında öğütme basamağında olduğu bildirilmiştir (Sanchez-Ortiz ve ark., 2011).

Sonuç ve öneriler

Bitkilerde çok önemli fizyolojik rolleri bulunan LOX yolu reaksiyonları, zeytin meyvesinin gelişimi sürecinde aktifleşerek, zeytinyağına geçen bazı tipik aromatikleri üretir. Gerçekte bu aromatiklerden hangilerinin tüketiciler tarafından arzu edildiği duyuşsal analizler ve aletli aromatik madde analizleriyle belirlenebilmektedir. Dolayısıyla arzu edilen aromatiklerin seviyeleri de ayarlanabilir. Böylece çok daha kaliteli ürünler markete sunulabilir. Bu amaçla, genetik seviyede müdahaleler, meyve olgunlaşması ve hasat zamanının kontrolü, işleme koşullarının kontrolü, ekzojen enzim kullanımı gibi yollar denenebilir. Örneğin, zeytinde HPL aktivitesi artırılırken, ADH ve AAT aktiviteleri düşürülebilirse daha ‘yeşilimsi veya çimensi’ aromada yağlar üretilebilir, veya ATT aktivitesi artırılabilirse daha ‘meyvemsi’ yağlar üretilebilir (Kalua ve ark., 2007). Yukarıda özetlendiği gibi, zeytinyağı aromasının en önemli bileşenlerini oluşturan LOX yolu enzimlerini ve reaksiyonlarını bilmek ve kontrol etmek, istenen aroma ve lezzetin oluşturulmasında önem arz etmektedir.

Kaynaklar

- Benicasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G. ve Tagarelli, A. 2003. Assay of Aroma Active Components of Virgin Olive Oils from Southern Italian Regions by SPME-GC/Ion Trap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:733- 741.
- Boskou, D. Olive Oil: Chemistry and Technology. AOCS Pres, Illinois, USA.
- Ebrahinzadeh, H., Motamed, N., Rastgar-Jazii, F., ve Shokraii, E. 2003. Oxidative enzyme activities and soluble protein content in leaves and fruits of olives during ripening. *J. Food Biochem*, 27:181-196.
- Gardner, H.W. 1995. Biological roles and biochemistry of the lipoxygenase pathway. *Hort. Sci.* 30(2):197-205.
- Grechkin, A. 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 37(5):317-352.
- Gregorio, A.D., Dugo, G., ve Arena, N. 2000. Lipoxygenase activities in ripening olive fruit tissue. *J. Food Biochem*, 24:417-426.
- IOOC. 1987. Sensory analysis: general basic vocabulary. COI/T. 20/Doc. No. 4, Madrid, İspanya.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., ve Robards, K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review. *Food Chem.* 100:273-286.
- Kiritsakis, A.K. 2002. Virgin olive oil composition and its effect on human health. *INFORM*, 13:237-241.
- Matthew, J.A., Chan, H.W-S., ve Galliard, T. 1972. A simple method for the perception of pure 9-D-hydroperoxide of linoleic acid and methyl linoleate based on the positional specificity of lipoxygenase in tomato fruit. *Lipids.* 12(3):324-325.
- Minguez-Mosquera, I., Gallardo-Guerrero, L., Jaren-Galan, M., ve Hornero-Mendez, D. 2003. Evidence for the involvement of lipoxygenase in the oxidative processes associated with the appearance of gren staining alteration in the Gordal olive. *J. Sci. Food Agric.* 83:1487-1492.

- Olias, J.M., Perez, A.G., Rios, J.J., ve Sanz, L. 1993. Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the 'green' odor notes. *J. Agric. Food Chem.* 41:2368-2373.
- Rescigno, A., Valgimigli, L., Sanjust, E., Curreli, N., Rinaldi, A., ve Pedulli, G.F. 2001. Photometric assay for polyphenol oxidase activity in olives, olive pastes, and virgin olive oils. *JAOCS*, 78:1245-1248.
- Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M., ve Fontanazza, G. 2002. Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *J. Agric. Food Chem.* 50:835-839.
- Sanchez, J., Salas, J., Williams, M., ve Harwood, J. 1999. Lipoxygenase activity in olive (*olea europaea*) fruit. *JAOCS*, 76(10):1163-1168.
- Sanchez, J., ve Salas, J.J. 1998. Alcohol dehydrogenases from olive (*olea europaea*) fruit. *Phytochemistry*, 48:35-40.
- Sanchez, J., ve Salas, J.J. 1999. The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide lyase. *J. Agric. Food Chem.*, 47:809-812.
- Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., Sanz, C. ve Pérez, A.G.2012. Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipoxygenase activity load during the oil extraction process. *J. Agric.Food Chem.* 60:812–822.
- Shewfelt, R.L., Yılmaz, E., Tandon, K.S., Scott, J.W., ve Baldwin, E.A. 2001. Absence of a clear relationship between lipid pathway enzymes and volatile compounds in fresh tomatoes. *J. Plant Physiol.* 158:1111-1116.
- Sindona, G., Benincasa, C., De Nino, A., Peri, E., Lombardo, N., ve Tagarelli, A. 2003. Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/Ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem*, 51:733-741.
- Sotiroudis, T.G., Georgalaki, M.D., ve Xenakis, A. 1998. The presence of oxidizing enzyme activities in virgin olive oil. *JAOCS*, 75(2):155-159.
- Toscano, G., Colarieti, M.L., ve Greco, G. 2003. Oxidative polymerisation of phenols by a phenol oxidase from green olives. *Enzyme Microb. Technol.*, 33:47-54.
- Vick, B.A. 1991. A spectrophotometric assay for hydroperoxide lyase. *Lipids.* 26(4):315- 317.
- Yılmaz, E. 2001. Oxylipin pathway in the biosynthesis of fresh tomato volatiles. *Turk. J. Biol.* 25:351-360.
- Zhuang, H., Barth, M.M., ve Hilderbrand, D.F. 1998. Fatty acid oxidation in plant tissues. *In: Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology.* C.C. Akoh and D.B. Min (Eds), p.333-375, Marcel Dekker, NY.
- Zimmerman, D.C., ve Vick, B.A. 1987. The lipoxygenase pathway. *In: The Metabolism, Structure, and Function of Plant Lipids.* P.K. Stumpf, J.B. Mudd, and W.D. Nes (Eds), p. 383-390, Plenum Press, NY.

İLETİŞİM

Doç. Dr. Emin YILMAZ
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi,
Gıda Mühendisliği Bölümü, 17020, Çanakkale
E-posta: emin7yilmaz@hotmail.com