

**T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SALAMURA SİYAH ZEYTİN ÜRETİMİNDE FARKLI TUZDA VE  
DÜŞÜK SICAKLIKTA FERMENTASYON UYGULAMASININ  
OLGUNLAŞMA VE KALİTEYE ETKİSİ**

**AYŞEGÜL KUMRAL**

**DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**BURSA 2005**

T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SALAMURA SİYAH ZEYTİN ÜRETİMİNDE FARKLI TUZDA VE DÜŞÜK  
SICAKLIKTA FERMENTASYON UYGULAMASININ OLGUNLAŞMA VE  
KALİTEYE ETKİSİ

AYŞEGÜL KUMRAL

DOKTORA TEZİ  
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 23/12/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliğiyle kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU  
Danışman



Prof. Dr. Arif SOYLU



Yrd. Doç. Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU



Prof. Dr. Kadir HALKMAN



Yrd. Doç. Dr. Vildan UYLAŞER

## ÖZET

Bu çalışma farklı tuz derişimleri ve düşük sıcaklıkta starter uygulamasının Gemlik çeşidi zeytinlerin fizikokimyasal ve mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisini saptamak amacıyla yapılmıştır. Fermentasyon geleneksel Gemlik metodu ile, düşük tuz ve laktik starter kullanılarak yapılmıştır. Salamuralar, düşük sıcaklıkta (18 °C), taze zeytinlerden izole edilen laktik asit bakterileri (*Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides*) ve ticari *Lactobacillus plantarum* kültürü ile aşıl原因mıştır. Kùltürler salamura ortamına De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) sıvı besiyeri veya steril fizyolojik tuzlu su (FTS) ile aktarılmıştır. 10-12 °C fermentasyon koşullarında en yüksek toplam asit ve en düşük pH değerlerine %7 tuzlu salamura ile aşıl原因ma ortamı olarak MRS sıvı besiyerinin kullanıldığı *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides*'den oluşan karışık kültür ve tek başına *Leuconostoc cremoris* kültürü ile aşıl原因anan denemelerin salamuralarında ve ürünlerinde rastlanmıştır. Tuz derişimi ve kullanılan laktik kültürün toplam asit ve pH üzerine etkisi istatistiki açıdan önemli bulunmuştur. Taşıyıcı olarak MRS sıvı besiyeri kullanılan denemelerle ile FTS kullanılan denemeler arasında olgunlaşma süreleri açısından fark görölmüştür.

Fermentasyon süresince yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucunda tüm denemelerde laktik asit bakterisi gelişimine maya gelişiminin eşlik ettiği görölmüş, hiçbir denemede *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. En fazla maya gelişmesi *Lactobacillus plantarum* kültürü ile aşıl原因anan uygulamada saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Salamura siyah zeytin, düşük tuz, düşük sıcaklık, laktik asit fermentasyonu, laktik asit bakterisi, Gemlik yöntemi

## ABSTRACT

### **The Effect of Different Salt Concentrations and Low Temperature on the Ripening and Quality Characteristics of Brined Black Olives**

The effect of low temperature and different salt concentrations on the physicochemical and microbiological characteristics of brined black olives of Gemlik variety were studied. Fermentation was carried out according to the traditional Gemlik method with modifications like low salt concentrations and lactic starter addition. The brines were inoculated with lactic acid bacteria which were previously isolated from cold fermentation brines (*Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides*) and a commercial strain of *Lactobacillus plantarum*. De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) broth or physiological salt solution were used as transferring medium to inoculate bacteria cultures to fermentation brines. The highest total acidity and the lowest pH values were determined at the brines and fermentation products which were inoculated with the mixed culture of *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides* and *Leuconostoc cremoris* culture alone at 7% salt concentration and 10-12°C fermentation conditions. The effect of salt concentration and the lactic culture used on the total acidity and pH were found to be statistically important. Maturation time of experiments was influenced from the type of inoculum carrier.

Lactic acid bacteria survival was accompanied by yeast development and no *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* species were determined in all treatments during fermentation. The highest yeast development was observed at the brines inoculated with *Lactobacillus plantarum*.

**Key words:** Black olives in brine, low salt, low temperature, lactic acid fermentation, lactic acid bacteria, Gemlik method.

## İÇİNDEKİLER

## Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
İÇİNDEKİLER .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	4
2.1. Salamura siyah zeytin üretimi .....	4
2.1.1. Fermentasyon sırasında görülen değişiklikler .....	7
2.1.1.1. Fermentasyon sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler...	7
2.1.1.2. Şeker miktarındaki değişiklikler .....	8
2.1.1.3. Acılığın giderilmesi .....	9
2.1.1.4. pH ve asitlik değişimi .....	9
2.2. Starter kültürlerin gelişimi .....	10
2.3. Laktik asit fermentasyonları .....	10
2.4. Starter kültürlerin gıdaların korunmasındaki rolü .....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	22
3.1. Materyal .....	22
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. Denemede kullanılan laktik asit bakterilerinin izolasyonu .....	22
3.2.2. Elde edilen izolatların tanılanması .....	23
3.2.2.1. Gram boyama.....	23
3.2.2.2. Hücre şekilleri .....	23
3.2.2.3. Katalaz testi.....	23
3.2.2.4. Glikozdan gaz oluşturma.....	23
3.2.2.5. 15 ve 45°C'de MRS sıvı besiyerinde gelişme.....	23
3.2.2.6. %5, %7.5 ve %10 tuzda gelişme.....	24
3.2.2.7. Eskulin hidrolizi.....	24
3.2.2.8. Karbonhidratlardan asit oluşumu.....	24
3.2.3. Aşılama kültürlerinin hazırlanması.....	25
3.2.4. Zeytinlerin salamuraya alınması.....	25

3.2.5. Fermentasyon uygulaması.....	26
3.2.6. Mikrobiyolojik Analizler.....	26
3.2.6.1. Toplam aerob mezofil bakteri sayımı .....	26
3.2.6.2. Toplam laktik asit bakterisi sayımı .....	28
3.2.6.3. Enterobakteri sayımı .....	28
3.2.6.4. <i>Pseudomonas</i> sayımı.....	28
3.2.6.5. Maya ve küf sayımı.....	29
3.2.7. Ham ve işlenmiş zeytinlere uygulanan fiziksel ve kimyasal analizler.....	29
3.2.7.1. Kilogramda meyve sayısı.....	29
3.2.7.2. Meyve ve çekirdek boyutları.....	29
3.2.7.3. Et/çekirdek oranı.....	30
3.2.7.4. Toplam kurumadde tayini.....	30
3.2.7.5. Kül tayini .....	30
3.2.7.6. Toplam asit tayini .....	30
3.2.7.7. Tuz tayini .....	30
3.2.7.8. İndirgen şeker tayini .....	30
3.2.7.9. Toplam azot tayini .....	31
3.2.7.10. Yağ tayini .....	31
3.2.7.11. Oleuropein tayini .....	31
3.2.7.12. pH okumaları .....	32
3.1.8. Bulguların istatistiksel analizi .....	32
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA .....	33
4.1. İzolatların tanı çalışma sonuçları ve tartışması .....	33
4.2. 2002-2003 dönemi sonuçları (1. yıl) sonuçları .....	36
4.2.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal bulgular .....	36
4.2.2. Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve tartışması .....	38
4.2.3. Fermentasyon sonunda ürünlerin kimyasal analiz sonuçları .....	40
4.3. 2003-2004 dönemi (2. yıl) sonuçları .....	44
4.3.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları .....	44
4.3.2. Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve	

tartışması .....	46
4.3.3. Fermentasyon sonunda elde edilen ürünlerin kimyasal analiz sonuçları .....	49
4.4. 2004-2005 dönemi (3. yıl) sonuçları .....	52
4.4.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları .....	52
4.4.2. Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve tartışması .....	54
4.4.3. Fermentasyon sonunda ürünlerin kimyasal analiz sonuçları.....	58
4.4.4. Mikrobiyolojik analiz sonuçları .....	62
5. SONUÇ .....	74
KAYNAKLAR .....	77
TEŞEKKÜR .....	83
ÖZGEÇMİŞ .....	84

## ÇİZELGELER DİZİNİ

## Sayfa

Çizelge 1.1: Avrupa Birliği'nde 1999-2003 döneminde sofralık zeytin üretim, tüketim ve ihracat ortalamaları ve yüzde oranları .....	2
Çizelge 1.2: Değişik ülkelerin 1999-2003 döneminde sofralık zeytin üretim, tüketim ve ihracat ortalamaları ve yüzde oranları .....	2
Çizelge 1.3: Bazı ülkelerin 1990-2003 döneminde sofralık zeytin ithalat ortalamaları ve yüzde oranları .....	3
Çizelge 2.1: Salamura siyah zeytin işlemede kullanılmak üzere hasat edilmiş farklı çeşitlerin indirgen şeker içerikleri.....	8
Çizelge 3.1: 2002-2003 üretim yılında uygulanan fermentasyon denemesi .....	27
Çizelge 3.2.: 2003-2004 üretim yılında uygulanan fermentasyon denemesi .....	27
Çizelge 3.3.: 2004-2005 üretim yılında uygulanan fermentasyon denemesi .....	28
Çizelge 4.1.: <i>Leuconostoc</i> türlerine ait şeker ve alkol testi sonuçları .....	34
Çizelge 4.2.: Zeytinlerden izole edilen bakterilerin gaz oluşumu ve tuzda gelişme yetenekleri .....	35
Çizelge 4.3.: <i>L. brevis</i> ve <i>L. plantarum</i> 'un diğer özellikleri .....	36
Çizelge 4.4.: Gemlik çeşidi zeytin örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri ...	37
Çizelge 4.5.: Aşılama bakterisi kültürlerinin başlangıç popülasyonları .....	39
Çizelge 4.6.: Tuz derişiminin salamuralarda laktik asit oluşumu üzerine etkisi ....	39
Çizelge 4.7.: Fermentasyon sırasında salamuralardaki NaCl (g/100mL) değişimi ..	42
Çizelge 4.8.: Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları .....	42
Çizelge 4.9.: 2003-2004 sezonunda kullanılan Gemlik çeşidi hammaddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	45
Çizelge 4.10.: Bakteri kültürlerine ait aşılama popülasyonları .....	46
Çizelge 4.11.: Fermentasyon sırasında meydana gelen sıcaklık değişimleri .....	47
Çizelge 4.12.: L1,L2,L3 bakterileri ile muamele edilmiş zeytinlerde fermentasyon sonucunda oluşan laktik asit düzeylerinin Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması .....	47
Çizelge 4.13.: Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları .....	51
Çizelge 4.14.: 2004-2005 sezonunda kullanılan Gemlik çeşidi hammaddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri .....	53



Çizelge 4.15.: Bakteri kültürlerine ait aşılama populasyonları .....	54
Çizelge 4.16.: Fermentasyon döneminde sıcaklık değişimi (ortalama) .....	54
Çizelge 4.17.: pH düzeylerinin Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması	56
Çizelge 4.18.: Fermentasyon sırasında oluşan toplam asitlik düzeylerinin Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması .....	57
Çizelge 4.19.: Salamuralarda tuz değişimine ait %1 düzeyinde Duncan testi sonuçları .....	58
Çizelge 4.20.: Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları ....	60
Çizelge 4.21.: Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan laktik asit bakteri sayısının Duncan testi ile %5 düzeyinde gruplandırılması	63
Çizelge 4.22.: Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan toplam mezofil aerob bakteri sayısının Duncan testi ile %5 düzeyinde gruplandırılması .....	65
Çizelge 4.23.: Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan maya sayısının Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması .....	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## Sayfa

Şekil 2.1.: Salamura siyah zeytin işleme yöntemine ait akış şeması .....	5
Şekil 4.1.: Fermentasyon sırasında salamuralardaki toplam asitlik değişimi .....	40
Şekil 4.2.: Fermentasyon sırasında salamuralardaki tuz (g/100mL) değişimi .....	41
Şekil 4.3.: Fermentasyon sırasında salamuralardaki asitlik değişimi .....	48
Şekil 4.4.: Fermentasyon sırasında salamuralarda tuz değişimi .....	48
Şekil.4.5.: Fermentasyon sırasında salamuralarda pH değişimi .....	55
Şekil.4.6.: Fermentasyon sırasında salamuralarda asitlik değişimi .....	55
Şekil.4.7.: Fermentasyon sırasında salamuralarda tuz değişimi .....	56
Şekil.4.8.: Tüm örneklerle ait laktik asit bakterisi sayım sonuçları .....	62
Şekil.4.9.: Tüm örneklerle ait toplam mezofil aerob bakteri sayım sonuçları .....	64
Şekil.4.10.: Tüm örneklerle ait maya-küf sayım sonuçları .....	66
Şekil.4.11.: Kontrol grubunun fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	67
Şekil.4.12.: L1 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	68
Şekil.4.13.: L2 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	69
Şekil.4.14.: L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	70
Şekil.4.15.: L1-L2 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	70
Şekil.4.16.: L1-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	72
Şekil.4.17.: L2-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	72
Şekil.4.18.: L1-L2-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	73
Şekil.4.19.: LP muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler .....	73

## 1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea* L.) dünyanın tropik ve sub-tropik bölgesinde yetişen ve meyveleri sofralık olarak ve yağ üretiminde kullanılabilen önemli bir meyve türüdür. Sofralık zeytin işleme İspanya, Türkiye, Yunanistan ve diğer Akdeniz ülkeleri tarafından çok uzun zamandır bilinen ve uygulanan bir endüstri ve gelenektir. Bu yüzyılın başından itibaren bu ülkelere, Amerika Birleşik Devletleri ile birlikte başka ülkeler de katılmış olup, sofralık zeytin dünya genelinde tanınan bir ürün haline gelmiştir (Garrido Fernandez ve ark.,1997). Birçok fermentasyon ürünü içinde sofralık zeytinin ayrı bir yeri vardır. Dünyada toplam sofralık zeytin üretimi son 40 yıl içinde yıllık ortalama %1.5-2 oranında artışlarla 2003/04 ürün yılında 1.581.000 ton seviyesine ulaşmıştır (Piga ve ark.,2001; Anonim, 2005). Avrupa Birliği (AB) ve dünya genelinde 1999-2003 yılları arasındaki sofralık zeytin üretim, tüketim, ihracat ve ithalat değerleri Çizelge 1.1.-1.3.'de verilmiştir.

Günümüzde sofralık zeytin, İspanyol usulü yeşil zeytin üretimi, Yunan usulü doğal siyah zeytin üretimi ve Kaliforniya usulü zeytin üretimi olmak üzere 3 farklı yöntemle işlenmektedir. Yunan usulü doğal siyah zeytin, ülkemizde alkali uygulaması olmaksızın doğal fermentasyon yolu ile üretilen ve Gemlik yöntemi olarak bilinen salamura siyah zeytin tipini ifade etmektedir. Ülkemiz dışında Yunanistan ve Kuzey Afrika ülkelerinde yaygın olarak üretilip, tüketilmektedir. Bu tip zeytinin en önemli üreticisi Türkiye (%24-27) olup, onu Yunanistan (%18-21) izlemektedir. 1960 yılından sonra bu tip zeytin üretimi azalmasına rağmen halen dünya sofralık zeytin üretiminin %30'unu oluşturmaktadır (Tassou ve ark., 2002). Doğal fermentasyonla salamura siyah zeytin üretimi için ülkemizde *Gemlik*, Yunanistan'da *Conservolea*, İspanya'da ise *Hojiblanca* çeşidi zeytinler kullanılmaktadır. Bu çeşitlerin tamamı son üründe istenen aroma, renk ve dokuyu sağlayan hammadde özelliklerine sahiptirler (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Bazı çeşitlerin dışında, sofralık zeytinlerin genellikle fermente edilerek değerlendirilmesinden dolayı fermentasyon işleminin bilinmesi ve fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik kontrolünün iyi bir şekilde yapılması; ürünün hazırlanması, depolanması ve güvenliğinin sağlanması açısından önemlidir. Sofralık zeytinleri de içine alan fermente ürünler, hazırlanmaları ve muhafazaları tuzlama ve fermentasyonun birleşik etkisi ile sağlanan ürünler olarak tanımlanabilir. Bu şekilde işlemin bir çok

**Çizelge 1.1.** Avrupa Birliği'nde 1999-2003 döneminde sofralık zeytin üretim, tüketim ve ihracat ortalamaları ve yüzde oranları. <sup>1)</sup>

Ülke	Üretim (1000 ton)	Tüketim (1000 ton)	İhracat (1000 ton)
Fransa	2.0 (%0.3)	43.5 (%8.9)	1.7 (%0.8)
İtalya	66.5 (%10.2)	140.5 (%28.9)	1.6 (%0.8)
İspanya	467.6 (%71.8)	184.9 (%38.0)	169.0 (%80.4)
Portekiz	11.1 (%1.7)	14.0 (%2.9)	4.0 (%1.9)
Yunanistan	104.3 (%16.0)	28.5 (%5.9)	32.6 (%15.5)
Almanya	-	33.9 (%7.0)	0.6 (%0.3)
Hollanda	-	5.0 (%1.0)	0.3 (%0.1)
İngiltere	-	14.4 (%3.0)	0
Avusturya	-	2.9 (%0.6)	0
İsveç	-	6.0 (%1.2)	0.1 (%0)
<b>Toplam</b>	<b>651.4 (%100)</b>	<b>486.4 (%100)</b>	<b>210.3 (%100)</b>

**Çizelge 1.2.** Değişik ülkelerin 1999-2003 döneminde sofralık zeytin üretim, tüketim ve ihracat ortalamaları ve yüzde oranları. <sup>1)</sup>

Ülke	Üretim (1000 ton)	Tüketim (1000 ton)	İhracat (1000 ton)
AB	651.5 (%43.9)	486.5(%34.4)	210.3 (%53.0)
ABD	97.5 (%6.6)	194.6 (13.8)	4.5 (%1.1)
Arjantin	44.0 (%3.0)	14.3 (%1.0)	31.0 (%7.8)
Cezayir	44.9 (%3.0)	41.4 (%2.9)	0
Fas	82.5(%5.6)	23.9 (%1.7)	60.3 (%15.2)
İsrail	17.8 (%1.2)	16.8(%1.2)	1.8 (%0.4)
Mısır	157.5 (%10.6)	99.3 (%7.1)	4.5 (%1.1)
Suriye	121.3 (%8.2)	100.3 (%7.1)	5.0 (%1.3)
Tunus	9.5 (%0.6)	9.0 (0.6)	0.4 (%0.1)
Türkiye	156.0 (%10.5)	117.3 (8.3)	35.8 (9.0)
Ürdün	18.3 (%1.2)	7.8 (0.5)	0.8 (%0.2)
<b>Toplam</b>	<b>1485.3 (%100)</b>	<b>1413.9 (%100)</b>	<b>396.8 (%100)</b>

<sup>1)</sup>www.internationaloliveoil.org

**Çizelge 1.3.** Bazı ülkelerin 1990-2003 döneminde sofralık zeytin ithalat ortalamaları ve yüzde oranları.<sup>1)</sup>

<b>Ülke</b>	<b>İthalat (1000 ton)</b>
AB	60.4 (%15.7)
ABD	107.8 (%28.0)
Avustralya	12.0 (% 3.1)
Brezilya	47.8 (%12.4)
İsrail	3.3 (%0.8)
İsviçre	26.0 (%6.8)
Meksika	4.5 (%1.2)
Kanada	21.4 (%5.6)
Romanya	13.3 (%3.4)
S.Arabistan	17.0 (%4.4)
<b>Toplam</b>	<b>384.3 (%100)</b>

yararları olup, bunlar şu şekilde sıralanabilir (Garrido Fernandez ve ark., 1997):

- Uygunsuz koşullarda bütün özelliğini yitirecek bir ürünün uzun süre muhafaza edilebilmesine olanak sağlar,
- Tuz, düşük pH ve organik asitlerin etkisi ile ısıtılma işlemi gerek kalmadan ürün dayanıklılığı sağlandığından enerji tüketimi oldukça düşüktür,
- Sıcaklığa duyarlı önemli besin elementleri, renk ve yapı gibi fiziksel özelliklerin korunmasına olanak sağlar.

Sayılan tüm yararların yanında, ülkemizde geleneksel yöntemle üretilen salamura zeytinlerde tuz içeriğinin tüketici sağlığını tehdit edecek boyutta yüksek olması, bu kadar yüksek tuz derişimine rağmen mikrobiyel güvencenin tam anlamı ile sağlanamaması ve bölgemizde zeytin hasadının kış aylarına rastlamasından dolayı zeytin olgunlaşmasının çok uzun sürmesi, salamura siyah zeytin işlemede farklı uygulamaların yapılmasını kaçınılmaz hale getirmiştir. Starter kültürlerin zeytin işlemede kullanılması konusunda ise yapılan araştırmaların çoğu İspanyol usulü yeşil zeytin üretimi alanında yoğunlaşmış, alkali ile muamele görmemiş salamura siyah zeytin işleme alanında ise yeterince çalışmaya rastlanmamıştır.

<sup>1)</sup>[www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Salamura siyah zeytin üretimi

Doğal siyah zeytinler, tam olgun veya tam olgunluğa ulaşmaya yakın durumda hasat edilen, üretim bölgesi, zamanı ve çeşide göre değişmekle beraber kırmızı-siyah, koyu menekşe, yeşilimsi-siyah veya koyu kestane renkli meyvelerden elde edilen ürünler olarak tanımlanmaktadır (Garrido Fernandez ve ark., 1997; Aktan ve Kalkan, 1999).

Bu grup içinde ticareti en çok yapılan ve uluslar arası pazarın %30'unu oluşturan, doğal siyah salamura zeytin olarak adlandırılan zeytin tipidir. Bunlar alkali uygulamasına maruz kalmadan, doğrudan salamuraya alındığından işlem görmemiş zeytinler grubuna dahil edilmektedir. Alkali uygulaması görmüş zeytinlere göre yoğun meyve aromasına sahip, çoğunlukla hafif acı lezzetli oldukları, salamura içinde fermentasyon yolu ile üretilip, muhafaza edildikleri belirtilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

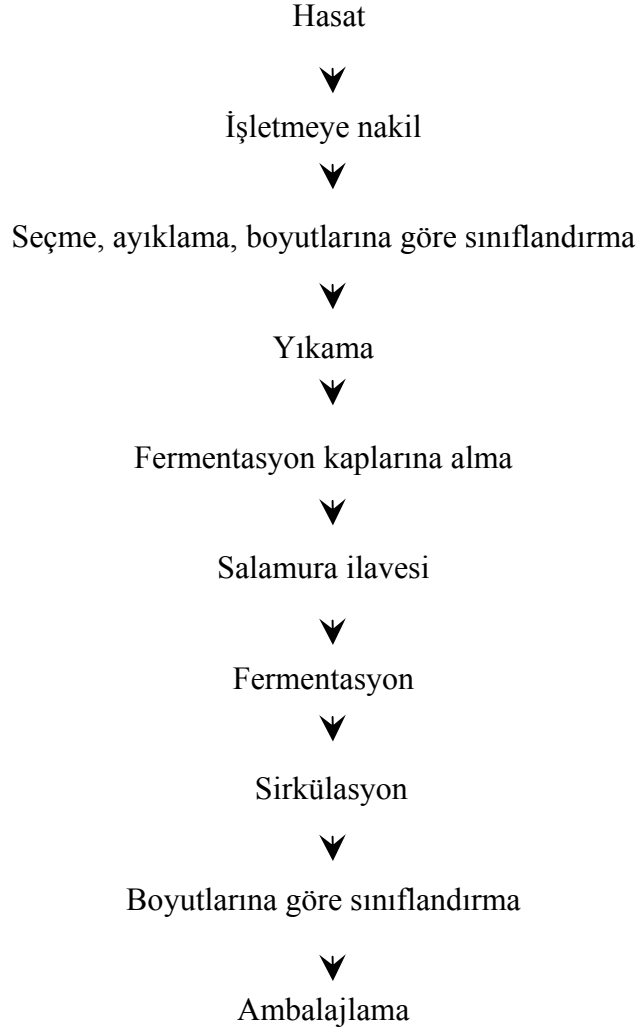
Geleneksel yöntemle salamura siyah zeytin üretimi Türkiye'de Marmara Bölgesi'nde özellikle de Bursa'da, Yunanistan da ise iç bölgelerden Ege Denizi sahiline kadar olan bölgede yaygın olarak yapılmaktadır.

Bu tip zeytin işlemenin en önemli özellikleri;

- Üretimde tuz dışında, çok düşük düzeyde kimyasal kullanımı ile doğal bir işleme yöntemi olması,
- Kaliforniya ve İspanyol yöntemi ile zeytin işlemeye göre daha düşük yatırım ve enerji gereksinimi şeklinde özetlenmiştir.

Son yıllarda bu tür zeytin üretiminin İspanya'da da özellikle Cordoba bölgesinde yaygınlaşmaya başladığı bildirilmektedir. Dünya'daki toplam üretimin %25'ini gerçekleştiren Türkiye'nin üretimde birinci sırada olduğu, ürünün büyük bir kısmının ülke içi pazarda tüketildiği, toplam üretimin % 18-21'ini gerçekleştiren Yunanistan'ın ise toplam ihracatın % 50'sini elinde bulundurarak ihracatta birinci sırada yer aldığı belirtilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Salamura siyah zeytin üretim basamakları Şekil 2.1.'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.1.** Salamura siyah zeytin işleme yöntemine ait akış şeması (Aktan ve Kalkan, 1999).

Daha önce de belirtildiği gibi işlenecek meyveler tam olgunlaştıkları dönemde veya hemen öncesinde hasat edilmelidir. Bu yüzden meyve dış yüzeyinin rengi hasat zamanının belirlenmesinde uygun bir ölçüt değildir. Fermentasyon sonunda istenen renkte ürün elde etmek için ürünün hasat zamanının belirlenmesinde zeytinlerden ürünü temsil edecek şekilde örnek alınması, çekirdeğe yakın yerden kesilmesi ve meyve eti renginin incelenmesi gerekmektedir. Bölgeye ve hasat edilecek çeşide göre değişmekle birlikte en iyi hasat zamanının menekşe-siyah rengin çekirdekten başlayarak meyve eti kalınlığının ortasına kadar ilerlediği dönem olduğu belirtilmektedir. Hasat döneminin başında ve sonunda hasat edilen zeytinler arasında oldukça büyük farklar vardır. Erken hasat edilen meyvelerin işleme sonrası iyi bir yapıya sahip olmalarına rağmen

renklerinin istenen özellikte olmadığı, geç hasat edilenler de ise istenen rengin oluştuğu ancak dokunun erken hasat edilenler kadar sert olmadığı bildirilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Zeytinlerin hasadının elle yapılması, mümkün olan en kısa sürede gözenekli plastik kasalar içinde en fazla 20-22 kg zeytin olacak şekilde işletmeye nakledilmesi önerilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997; Aktan ve Kalkan, 1999).

Ayıklama ve eğer yapılıyorsa sınıflandırmayı takiben zeytinler yüzeysel kirlerin uzaklaştırılması için yıkanmalıdır. Yıkama sularının bileşimi araştırıldığında Gram negatif bakteriler ve düşük düzeyde mayalar saptanmış, laktik asit bakterilerine ise rastlanmadığı, yıkamalar süresince meyvelerdeki polifenol kaybının ise ihmal edilebilir düzeyde olduğu bildirilmiştir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Gram negatif bakteriler genellikle bozulmaya sebep olan mikroorganizmalar olmalarına rağmen salamura siyah zeytinler üzerine gaz cebi oluşumu gibi bozucu etkilerinin olmadığı, varlıklarından kaynaklanan ve en sık rastlanan etkinin ise CO<sub>2</sub> oluşumuna bağlı olarak fermentörlerden salamura taşması olduğu ifade edilmektedir. Gram negatif bakterilerin varlığından kaynaklanan olumsuzlukların, başlangıç pH'nın HCl, asetik asit veya laktik asit kullanılarak ayarlanması ile giderilebileceği, bu uygulama ile özellikle *Bacillus* ve *Clostridium* türleri gibi istenmeyen mikroorganizmaların gelişiminin önlenebileceği belirtilmiştir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Günümüzde zeytinler üzerlerine basınçlı su püskürtülerek yıkanmaktadır. Yıkamayı takiben zeytinlerin vakit geçirmeden salamuraya alınmaları önerilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Salamura siyah zeytin üretimi iki farklı fermentasyon tipi kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir:

1. Az veya çok anaerob ortamda gerçekleşen geleneksel fermentasyon,
2. Son dönemlerde İspanyol araştırmacılar tarafından geliştirilen aerob işleme yöntemi.

Bu çalışma kapsamında birinci yöntem kullanılarak üretilen zeytinlerden bahsedilecektir.

Doğal fermentasyon ile salamura siyah zeytin üretiminde meyvelere alkali uygulanmadığı için suda çözünen maddelerin salamuraya geçişinin çok yavaş olduğu ve



olgunlaşmanın oldukça uzun sürdüğü belirtilmektedir. Bu sırada oldukça karmaşık bir mikrobiyolojik gelişmenin görüldüğü, gram negatif bakteriler, gram pozitif laktik koklar, mayalar yanında eğer tuz oranı % 6-7'nin altında ise bazı *Lactobacillus* türlerine rastlanabildiği, fakat genellikle ortama hakim olanların mayalar olduğu ifade edilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

### **2.1.1. Fermentasyon sırasında görülen değişiklikler**

#### **2.1.1.1. Fermentasyon sırasında görülen mikrobiyolojik değişiklikler**

Geleneksel salamuralı siyah zeytin fermentasyonları, ortamın aerob veya anaerob oluşuna bakılmaksızın, kapakların sadece meyveleri salamura altında tutmak amacıyla kullanıldığı genellikle son derece dikkatsiz koşullarda yapılan bir üretim şeklidir. Bu şekilde yüzeyde küf gelişimine olanak sağlanarak şeker tüketimi hızlanmakta ve fermentasyon sonucu oluşan asitler yıkıma uğramaktadır. Küflerin yumuşama ve kötü kokulu fermentasyona sebep olmalarının yanında, mikotoksin oluşturmalarından dolayı bu tür işleme sistemi güvenilirliğini kaybetmiştir. Göçmen ve ark. (2000), salamura siyah zeytin havuzlarında yaptıkları araştırmalarda *Penicillium* cinsinin en fazla rastlanan cins olduğunu, diğer cinslerin ise *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Phoma* ve *Thalaromyces* cinsi olduklarını belirtmişlerdir.

Salamurada siyah zeytin fermentasyonları sırasında en sık rastlanan bulaşma etkeni mikroorganizmalar küfler ile *Bacillus*, *Clostridium* cinsine ait türlerdir. bunlar yıkama ile kısmen uzaklaştırılıp, yüksek tuz konsantrasyonu, anaerob ortam koşulları ve eğer yapılırsa pH ayarlaması ile engellenebilmektedir. Bunların dışında Gram negatif bakteriler, mayalar ve laktik asit bakterilerine rastlanabilir. Gram negatif bakteriler zeytinlerin salamuraya alınmalarının 2. gününde en yüksek seviyelerine ulaşırlar ve 7-15. güne kadar da varlıklarını sürdürürler. Maya sayısı fermentasyonun başından itibaren artar ve salamuraya almayı takiben 10-25. günlerde en üst seviyeye ulaşır. *Saccharomyces oleaginosus* İspanyol çeşitlerinde en sık rastlanan (% 34.8) tür olup onu *Hansenula anomola* (% 27.3) izlemektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

Salamuralı fermentasyon yöntemi ile siyah zeytin üretiminde laktik asit bakterileri her zaman varlığını gösterememektedir. Çünkü hem tuz konsantrasyonu hem de sıcaklık gelişmeleri için uygun değildir. Ortam pH'ının yaklaşık 4.5, toplam asit

miktarının ise %0.1-0.4 arasında olmasının laktik asit bakterisi aktivitesinin eksikliğini gösterdiği ifade edilmektedir. Bazı zeytin çeşitlerinin tamamen olgunlaşmalarına rağmen laktik asit bakterilerinin aktivitesini durduracak kadar yüksek polifenol içeriğine sahip oldukları, diğer çeşitler için tuz konsantrasyonu % 8'in altında kaldığı ve sıcaklık çok düşük olmadığı sürece laktik asit bakterilerinin gelişmelerini sürdürdüğü belirtilmektedir. Hojiblanca çeşidi ile yapılan çalışmalar, tuz derişiminin % 8'in altında olduğu salamuralarda, fermentasyonun ilk günlerinde *Pediococcus* (homofermentatif) ve *Leuconostoc* (heterofermentatif) türlerinin; takip eden süreçte *Lactobacillus plantarum* gelişiminin saptandığı ifade edilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

### 2.1.1.2. Şeker miktarındaki değişiklikler

Fermentasyon için oldukça büyük öneme sahip olan şekerlerin salamuraya geçişi meyveler salamuraya alınır alınmaz başlar. Geçiş etkileyen en önemli etkenler meyve kabuğu geçirgenliği, zeytin-salamura oranı, sıcaklık ve tuz konsantrasyonudur. Büyük tanklarda (10 ton) gerçekleştirilen fermentasyonlarda meyve-salamura oranı 2:1 olduğunda salamurada fermente olabilir madde miktarının artışı ile hızlı seyreden fermentasyon ve yüksek oranda gaz oluşumu sebebiyle gaz cebi oluşumu gözlenebilir. Böyle durumlarda tanklardaki meyve miktarlarının azaltılması önerilmektedir. Fermentasyon sonunda salamura ve meyvedeki indirgen şeker miktarının sırasıyla % 0.3 ve % 0.6 olduğu belirtilmektedir. Bu değerlere uzun süre salamurada bekletme sonucu ulaşılabilceği ve meyvelerde daha yüksek şeker içeriklerine rastlanabileceği ifade edilmektedir. Salamura siyah zeytin işlemede kullanılmak üzere hasat edilmiş farklı çeşitlerin indirgen şeker içerikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Ortamda serbest

**Çizelge 2.1.** Salamura siyah zeytin işlemede kullanılmak üzere hasat edilmiş farklı çeşitlerin indirgen şeker içerikleri (Garrido Fernandez ve ark., 1997)

Çeşit	Şeker içeriği (g glikoz/100g yaş meyve eti)
Gemlik (Türkiye)	4.45
Edincik (Türkiye)	5.94
Conservolea (Yunanistan)	2.92
Hojiblanca (İspanya)	2.08
Lechin (İspanya)	3.00
Verdial (İspanya)	1.60

şekerlere ek olarak mayalar ve diğer mikroorganizmalar tarafından yıkıma uğratıldıktan sonra şeker kalıntıları veren antosiyaninler ve polifenollerin de mevcut olduğu, bu maddelerin salamuradakine ek olarak ürün ambalajlandığında dahi mikrobiyel gelişmeye olanak sağlayarak ve fermentasyon bitiş noktasının saptanmasını zorlaştırdığı belirtilmektedir. İşleme sürecine tüm fermente olabilir maddeler tükendiğinde ve fermentasyon duracak noktaya geldiğinde son verilmektedir. Bu noktaya bazı ülkelerde ancak Ağustos sonunda gelinebilir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

### **2.1.1.3. Acılığın giderilmesi**

Şeker miktarına ek olarak fermentasyonun bitiş noktasının saptanmasında rol oynayan diğer bir etkende acılık miktarıdır. Salamura siyah zeytinlerde acılık, oleuropeinin salamuraya geçişi veya bu maddeyi parçalama yeteneğindeki mikroorganizmalar vasıtası ile olmaktadır. Oleuropein ve diğer polifenollerin difüzyonunun diğer organik maddelere benzer oranlarda gerçekleştiği, geçişin bir denge oluşana yani meyve ve salamuranın hemen hemen eşit miktarlarda oleuropein, tuz, asit, protein ve diğer suda çözünebilir maddeleri içerdiği noktaya dek devam ettiği belirtilmektedir. Zaman zaman salamuranın değiştirilmesinin meyvedeki oleuropein miktarını azaltabileceği ifade edilmekte, ancak bu uygulama maliyetinden dolayı pek tercih edilmemektedir. Salamuralı fermentasyon yöntemi ile işlenecek zeytinlerin erken hasat edilerek işlenenlere göre daha düşük konsantrasyonda polifenol içerdikleri dolayısıyla laktik asit bakterileri üzerine engelleyici etkinin daha düşük olduğu, zeytin dokusunun da daha yumuşak olduğundan suda çözünebilir maddelerin salamuraya geçişi ile laktik asit fermentasyonu gerçekleşebildiği bildirilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

### **2.1.1.4. pH ve asitlik değişimi**

Salamuraların başlangıç tuz konsantrasyonu düşük tutulduğunda laktik asit fermentasyonunun tam anlamıyla gerçekleşebildiği, pH'ın 4'ün altındaki değerlere, asit düzeyinin ise %1'in üzerindeki seviyelere ulaşabildiği, bu şekilde elde edilen ürünün ise tüketici tarafından mükemmel olarak kabul edildiği belirtilmektedir. Laktik asit fermentasyonu ile elde edilen düşük pH ve yüksek asit değerleri ile yüksek oranda tuz kullanımına gerek kalmadan ürünün güvenli muhafazasının sağlanabileceği, geleneksel

yöntemlerle üretimlerde ise yüksek konsantrasyonda tuz kullanımı, başlangıç pH'ının ayarlanmaması gibi etkenlerden dolayı pH düşüşünün 4.0-4.5'de durduğu, toplam asit miktarının ise 0.5 g laktik asit/l düzeyinde kaldığı belirtilmektedir (Garrido Fernandez ve ark., 1997).

## 2.2. Starter kültürlerin gelişimi

İnsanoğlu fermentasyon işleminin, fermente üründen bir kısmın daha sonraki işlemlerde kullanılmak üzere ayrılması ile geliştirilebileceğini fark ettiğinde starter kültür kullanımının ilk uygulamaları da başlamıştır. Geçen süre içerisinde starter kültür endüstrisi önemli bir gelişme göstermiştir. Tüm fermente ürünlerin işlenmesinde kullanılan mikroorganizmalarla ilgili oldukça fazla bilgi edinilmesinin yanında, en fazla gelişmenin süt fermentasyonlarında yer alan bakteri kültürlerinde olduğu ifade edilmektedir (Gilliland,1988).

## 2.3. Laktik asit fermentasyonları

Laktik asit bakterileri sağlık açısından tüketilmesi faydalı olan birçok gıdanın üretilmesi ve muhafazasında önemli rol oynamaktadır. Laktik asit fermentasyonu, çoğunlukla sıcaklık uygulaması gerektirmeyen ve genellikle fazla pahalı olmayan bir muhafaza türüdür. Laktik asit fermentasyonu ile üretilen gıdalar her kıtada dünya nüfusunun beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Birçok gıdanın üretilmesi ve muhafazasında önemli rol oynayan laktik asit bakterilerinin, genellikle yapay ortamlarda zor gelişmelerine rağmen, birçok gıdada hızla aktivite göstererek ortam pH'ını, eşlik eden diğer mikroorganizmaların gelişemeyecekleri düzeye indirdikleri, kendi gelişmelerini önlemeden önce *Leuconostoc* ve laktik *Streptococ* türlerinin ortam pH'ını 4.0-4.5'e, *Lactobacillus* ve *Pediococcus* türlerinin ise 3.5 seviyelerine kadar düşürebildikleri ifade edilmektedir. Bazı *Laktobacillus* türlerinin laktik asit üretmelerinin yanında, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) oksidasyonu ile hidrojen peroksit oluşturduğu ve bu yolla diğer bulaşma etkeni mikroorganizmalar üzerine antibiotik etkisi yarattıkları, kendilerinin ise oluşan hidrojen perokside karşı dayanıklı oldukları belirtilmektedir (Steinkraus, 1992).

#### 2.4. Starter kültürlerin gıdaların korunmasındaki rolü

Starter kültürün görevini eksiksiz olarak yerine getirmesi ile, hem bozulmaya sebep olan hem de hastalık yapıcı mikroorganizmaların üretim ve depolama sırasında gelişmeleri yavaşlatılabilmektedir. Gelişmeyi önleyici en önemli nedenin, starter olarak kullanılan bakterinin gelişmesi sırasında oluşan asidik ortam olduğu, bazı durumlarda ise engelleyici etkinin tamamının starter kültürler tarafından üretilen kompleks antagonist sistemlerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Peroksitler, antibiyotikler ve tam anlamıyla açıklanamamış metabolitler bunlar arasında sayılabilmektedir. Tüm ihtimaller göz önüne alındığında koruyucu yada engelleyici etkinin starter kültürler tarafından üretilen bir dizi faktörün kombinasyonu ile sağlanabileceği, üretilen asidin tipinin de antagonist etkinin yoğunluğu açısından önemli olduğu ifade edilmektedir (Gilliland,1988).

Zeytin işleme alanında yapılan çalışmaların çoğu İspanyol yöntemi ile yeşil zeytin işleme veya alkali uygulayarak acılığı giderilmiş siyah zeytinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Salamura siyah zeytin fermentasyonları sırasında görülen değişiklikler ve işlemede starter kullanımına dair yapılmış çok az sayıda çalışmaya rastlanmıştır.

Şahin ve ark. (2000), işleme sırasında tuz kullanılmayan, yani sıfır tuzlu ürün elde etmek amacıyla yaptıkları çalışma ile tuz içermeyen siyah ve yeşil zeytin üretiminin olanaklı olduğunu belirtmişlerdir.

Mule ve ark. (2000), hipertansiyon hastaları için düşük sodyum içeriğine sahip,  $CaCl_2$  ve  $KCl$  içeren salamuraları deneyerek, duyuusal özellikleri iyi, sodyum içeriği düşük ürünler elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Zuritz ve Maldonado (2004), yeşil zeytinlerde epidermise sodyum geçişini saptamak amacıyla matematiksel ve deneysel açıdan basit bir yöntem geliştirmişlerdir.

Uylaşer ve Şahin (2004), salamura siyah zeytin üretiminde kullanılan Gemlik yönteminin uygulama şeklini değiştirerek temiz, kaliteli ve dış pazara uygun Gemlik tipi zeytin üretilme olanağını araştırmışlardır. Bu amaçla 2001 ve 2002 hasat yıllarında İznik'ten satın alınan siyah zeytinleri, tamamen kapalı, 100 l hacimli, paslanmaz çelik tanklarda; ilk yıl % 11.7 tuzlu salamurada ve 10, 20, 30, 40  $kg/m^2$  baskı altında; ikinci yıl % 5 ve % 7 tuzlu salamurada ve 35  $kg/m^2$  baskı altında bakteri kültürü aşılmalı olarak işlemişlerdir. Araştırmacılar ilk yıl ürünlerinin 5 ayda tüketim olgunluğuna geldiğini ve en iyi sonuçların 30 ve 40  $kg/m^2$  baskı uygulamasından alındığını

belirtmişlerdir. İkinci yıl ürünleri 2.5 ayda tüketim olgunluğuna gelmiş ve % 7 tuzlu salamurada işlenen üründe % 2.5 tuz miktarı belirlenerek dış pazarlarda da rahatlıkla satılabilecek kalitede ürün elde edilmiştir.

Özay ve Borcaklı (1996), doğal fermentasyonla yüksek kaliteli sofralık siyah zeytin üretebilmek amacıyla yaptıkları çalışmada iki farklı tuz derişiminde (% 6 ve % 14) gerçekleşen fermentasyonu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik açıdan incelemişlerdir. Tüm denemelerde mayaların baskın mikroorganizma grubu olduğunu, % 6 tuzlu örneklerde salamura değişimi ile laktik asit bakterisi gelişiminin artmasına rağmen aynı durumun % 14 tuzlu örneklerde görülmediğini belirtmişlerdir. En yüksek titrasyon asitliğinin % 6 tuzlu salamuralarda saptandığını (0.59 g/100 ml), bunu 48 gün sonra salamurası değiştirilen % 6 tuzlu salamuralı denemenin izlediğini (0.43 g/100 ml), en düşük titrasyon asitliğine (0.36 g/100 ml) ise yüksek tuz derişimli denemede rastlandığını ifade etmişlerdir. Tüm denemelerde indirgen şekerlerin mikroorganizmalar tarafından etkin bir şekilde tüketilmiş olduğunu, kalıntı miktarların 0.05-0.1 g/100 ml arasında değiştiğini, son üründe tuz derişiminin yüksek tuzlu denemelerde 5.2g/100 g, düşük tuzlu denemelerde ise 3.27-3.58 g/100 g olarak saptandığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, son ürünlerde yaptıkları duyuşal değerlendirme sonucunda muameleler arasında fark gözlemlenmediğini belirtmişlerdir ( $p>0.05$ ).

Tunç ve ark.(2000), fermentasyonunu tamamlamış Gemlik tipi zeytinlerin vakumlu ambalajlanmasında şişme olayının geciktirilmesi üzerine yaptıkları çalışma sonucunda, Gemlik tipi zeytinlerin vakumlu ambalajlanmasında fermentasyonun tamamlanmış olması gerektiğini, fermentasyon tamamlandığında vakumlu ambalajlanacak zeytinlere antimikrobiyel madde ilavesi ve haşlama işleminin gerekmediğini, vakumlu ambalajlanmış zeytinlerin bozulmasında sıcaklığın etkili olmadığını ve salamuralı olarak ambalajlanmış zeytinlere göre mikrobiyolojik yüklerinin daha az olduğunu belirtmişlerdir.

Tassou ve ark. (2002), farklı sıcaklık (18 °C, 25 °C ve ortam sıcaklığı) ve tuz derişimlerinin (% 4, % 6 ve % 8) Conservolea çeşidi zeytinin doğal fermentasyonla siyah zeytine işlenmesi sırasında meydana gelen mikrobiyolojik ve fizikokimyasal değişiklikleri 190 gün süre ile izlemişlerdir. Başlangıç florasının Gram-negatif bakteriler, laktik asit bakterileri ve mayalardan oluştuğunu, Gram negatiflerin tüm muamelelerde engellendiğini, laktik asit bakterileri ve mayaların ise faaliyetlerini

sürdürdüğünü belirtmişlerdir. 25 °C ve 18 °C sıcaklık ve % 4 ve % 6 tuz derişimi uygulanan salamuralarda laktik asit bakterisi gelişiminin teşvik edildiğini, sonuçta yüksek asitlik ve düşük pH derecelerine ulaşıldığını, bunun yanında % 8 tuz derişiminde laktik asit bakterisi gelişiminin olumsuz yönde etkilendiğini, fermentasyon yeteneğindeki mayaların aktivitesinin arttığını ve sonuç olarak düşük asit ve yüksek pH değerine sahip ürün elde edildiğini ifade etmişlerdir. Ortam sıcaklığındaki denemelerde ise laktik asit bakterisi gelişiminin tuz derişiminden bağımsız, fakat sıcaklık dalgalanmalarına bağılı olarak değişiklik gösterdiğini, mayaların ise sıcaklık dalgalanmalarından etkilenmediğini gözlemlemişlerdir. Tanısı yapılan laktik asit bakterilerinin ise *Lactobacillus mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* olduğu belirtilmiştir. En iyi fermentasyon koşullarının 25 °C ve % 6 tuz konsantrasyonu olduğu ve bu koşullarda salamura serbest asitliğinin % 1.28, pH'nın ise 3.8 olduğunu, yapılan duyusal değerlendirme sonucunda 25°C'de fermentasyona bırakılan zeytinlerin 5 ay sonunda tatlandığı ve istenmeyen kötü tat ve koku oluşumunun gözlemlenmediği bildirmişlerdir.

Piga ve ark. (2001), Bosana, Manna ve Sivigliana sarda adlı 3 Sardunya zeytin çeşidinin fiziksel, kimyasal, teknoloji ve pazarlama açısından doğal fermentasyonla salamura siyah zeytin işlemeye uygunluğunu araştırmışlardır.

Korukluoğlu ve ark. (2002), taze zeytinlerde doğal olarak bulaşık bulunan laktik asit bakterilerini ve bunların zeytin fermentasyonuna uygunluklarını, bu değerlendirme alanında starter kullanımına yönelik önerilerin geçerliliğini veya alınması gereken önlemleri belirlemek amacıyla 1998/1999 ve 1999/2000 hasat dönemlerinden üçü yeşil olmak üzere toplam 18 taze zeytin örneğini araştırma materyali olarak kullanmışlardır. Bunların 12'sinden laktik asit bakterilerinin izolasyonunu yapmışlar ve 38 izolat elde etmişlerdir. Bu izolatlardan 12 tanesinin *L. plantarum*, 4 tanesinin *L. brevis*, 17 tanesinin *L. mesenteroides*, 4 tanesinin *L. lactis ssp. lactis* ve yalnızca 1 tanesinin *P. damnosus* türüne ait oldukları belirtilmiştir. Hem 15 °C'de ve % 10 tuzda gelişme yeteneğinde oluşları, hem de oldukça fazla sayıda karbon kaynağından yararlanmaları ve homofermentatif olup, gazlı bozulmalar yönünden tehlike oluşturmamaları nedeniyle *L. plantarum* ve *L. lactis ssp. lactis* türlerinin doğal veya aşılmalı zeytin fermentasyonuna uygun oldukları araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Ancak bu iki türden ikincisine daha önce zeytinlerde yapılan araştırma ve çalışmalarda hiç

değinilmemiş olması nedeniyle, yapılacak bir çalışmada *L. lactis ssp. lactis*'in zeytin fermentasyonu için uygunluğunun incelenmesi gerektiği belirtilmiştir. Araştırma bünyesinde tanılanan laktik asit bakterilerinin büyük çoğunluğunun % 8 tuza kadar gelişebilmeleri, bu nedenle en azından laktik asit fermentasyonu bitinceye kadar salamuradaki tuz miktarının % 8'i geçmeyecek şekilde uygulanması gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır.

Duran ve ark.(1993), salamurada bekletme süresi (1, 3, 5, 7 ve 9 gün), tuz derişimi (% 6, % 3 ve % 0 w/v) ve glikozun, doğrudan salamuraya alınan zeytinlerde *L. plantarum* varlığı üzerine etkisini araştırmışlardır. Eğer salamura olarak musluk suyu kullanılıyorsa (%0 NaCl) başlangıç aşılama oranının sürdürülebilmesi için aşılama işleminin salamuraya almayı takiben 3 gün sonra, eğer %3'lük salamura kullanılıyorsa 7 gün sonra yapılması araştırmacılar tarafından önerilmektedir. Ortamda glikozun varlığı özellikle Cacerana çeşidi için bakterinin varlığını olumlu yönde etkilediği, %3 tuzlu salamura denemesinde suya geçen polifenollerin *L. plantarum* üzerine engelleyici etkisinin ise belirgin düzeyde olduğu belirtilmiştir. % 6 tuz derişimi ve polifenol konsantrasyonunun birleşik etkisinin Hojiblanca çeşidi için 7. güne gelindiğinde *L. plantarum* varlığında önemli düşüslere neden olduğu vurgulanmıştır. *L. plantarum* varlığı üzerinde en önemli etkiye sahip iki faktörün salamurada bekletme süresi (besin maddesi geçişi için yeterli olmalı) ve besin maddeleri yetersiz olduğunda bakteri varlığında önemli düşüslere sebep olan tuz derişimi olduğu, düşük tuz derişimlerinin fermente olabilirliği artırdığı tüm muamelelerde kendiliğinden gelişen floranın varlığı ile gözlemlendiği belirtilmiştir.

Duran Quintana ve ark. (1999), soğukta fermente olan zeytin salamuralarından izole ettikleri 4 farklı *L. plantarum* suşunun özgün gelişme oranlarını sıvı MRS besiyerinde ve yeşil zeytin salamuralarında 2 farklı pH (4.5 ve 5) değeri, 3 farklı tuz derişimi (%3, %4, ve %5) ve 3 farklı gelişme sıcaklığında (9, 12 ve 15°C ) denemişlerdir. MRS besiyerinde, asitlik üzerine en etkili faktörün sıcaklık olduğunu, salamurada ise özgün gelişme oranı üzerine en etkili faktörün pH, asit oluşumu üzerine ise sıcaklık olduğunu belirtmişlerdir. İki ortamda da başlangıç pH'ı olarak 5.0'in, 12-15 °C'de istenen asitlik düzeyinin oluşumunu sağladığı ifade edilmiştir. Araştırmacılar belirlenen koşulları (başlangıç pH'ı 5.0, %3 w/v NaCl derişimi, 12 °C inkübasyon sıcaklığı) benzer koşullardaki yeşil zeytin salamurasında, tespit edilen 3 suş için



denemişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlar ışığında uygun başlangıç koşulları ayarlanıp, starter kültür kullanıldığında soğuk iklim koşullarına sahip bölgelerde de normal fermentasyon işleminin gerçekleştirilebileceği belirtmişlerdir.

Sánchez ve ark.(2000), İspanyol usulü yeşil zeytin fermentasyonu kimyası hakkında kapsamlı bilgi edinmek amacıyla, hem doğal hem de *Lactobacillus pentosus* CECT 5138 suşu kullanılan aşılmalı fermentasyon salamuraları ve zeytin suyunda meydana gelen fizikokimyasal değişiklikleri gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar , fermentasyon oranının, fermentasyon tipine bağlı olmaksızın, zeytin suyunda salamuraya göre daha düşük, salamuralarda fermentasyon sonunda oluşan toplam asit miktarının ise, zeytin suyuna göre belirgin olarak ( $p<0.05$ ) yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Montano ve ark. (2003), yaptıkları araştırmada fermentör ve zeytinleri klorlu su ile yıkamış, steril alkali, su, salamura kullanarak, *L. plantarum* kültürü ile aşılama öncesi ortama laktik asit ilave etmişlerdir. 34 günlük fermentasyon süresi sonunda sitrik asit, mannit ve malik asidin tamamının yıkıldığını, mevcut glikoz ve fruktozun ~%90'ının, sakkarozun ise %30'undan azının kullanıldığını ifade etmişlerdir. Fermentasyon sonunda D-, L-laktik asit, etil alkol, süksinik asit ve asetik asit oluştuğu, D-laktik asidin L-laktik aside göre daha baskın olduğu belirtmişlerdir.

Garrido ve ark.(1993), fermentasyon başlangıcında salamuranın tuz (% 6 ve % 0) ve asit derişimi (% 0.3 ve % 0.6), starter kullanımı ve aerob/anaerob koşulların zeytin işleme ve muhafazası sırasında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler üzerine etkisini incelemişlerdir.

De Castro ve ark. (2002), yeşil zeytin fermentasyonunda *Enterococcus casseliflavus* CC45 ve *Lactobacillus pentosus* CECT 5138 starter kültürlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar yüksek pH'lı salamuralardan toplam 32 adet *Enterococcus* suşu izole etmişler ve fenotipik yöntemlerle tanısını yapmışlardır. 3 *Enterococcus casseliflavus* suşunu yapılan ön denemeler sonucunda seçmiş ve *Lactobacillus* kültürü ile birlikte kullanmışlardır. CC45 salamuraya alındıktan 1 gün sonra, *Lactobacillus* kültürü ise 2 gün sonra aşılannmıştır. Çalışmada mikrobiyolojik gelişme, hammadde ve ürün analizlerinin yanında, fermente olmuş zeytinlerin aromaları da değerlendirilmiş, aşılama ile hızlı bir asit artışı, karbonhidrat tüketimi ve pH düşüşünün gözlemlendiği

belirtilmiştir. En iyi sonucun, iki kültürün bir gün ara ile birbiri ardına aşılandığında elde edildiği ifade edilmiştir.

Nychas ve ark. (2002), doğal fermentasyonla siyah zeytin üretiminde salamurada meydana gelen asit ve pH değişimleri ile birlikte, mikrobiyolojik gelişmenin yerini saptamak, mayalar ve seçilmiş mikroorganizma gruplarının populasyon dinamiklerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada; fermentasyon sırasında *Enterobacteriaceae* temsilcileri ve *Pseudomonas* türlerinin sayısının azaldığını, bunun yanında laktik asit bakterisi ve maya sayısının arttığını saptamışlardır. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemeler sonucunda ise fermentasyon sırasında zeytinin epikütikula mumsu tabakasında mayalarca zengin biofilm (epicuticular wax) oluşumu gözlemlemişlerdir. Mayaların stoma açıklıklarında baskın olduğu, bakterilerin ise stoma altı hücre içi boşluklarında yoğun olarak buldukları belirtilmiştir.

Sánchez ve ark.(2001), alkali uygulanmış yeşil zeytinlere, alkali pH'da (pH>9) *Lactobacillus pentosus* CECT 5138 kültürü aşılamaı denemişlerdir. Başlangıçta 1-2 log düzeyinde kayıp olsa da, uygulama zamanına bağlı olarak, kültürlerin geliştiği ve hızlı bir fermentasyon başladığı belirtilmiştir. Aşılama ile aşılamaı kontrol gruplarına göre potansiyel bulaşma etkenleri ve *Enterobacteriaceae* populasyonunun azaltıldığını, hızlı bir asit artışı ve pH düşüşünün sağlandığını ifade etmişlerdir. Arka arkaya 3 sezon boyunca yapılan denemeler sonucunda, yüksek pH'da gelişebilen laktobasillerin kullanımının mümkün olduğunu, fakat başlangıçtaki düşük canlı kalma oranını dikkate alarak aşılama oranının yüksek tutulması gerektiğini belirtmişlerdir.

Panagou ve ark. (2003), Conservolea çeşidi işlem görmemiş zeytinlerde *Lactobacillus pentosus* ticari suşunu denemişlerdir. Başlangıçta suşun salamura ortamına adaptasyonundan kaynaklanan 0.5 log'lık bir kayıp olmasına rağmen kültürlerin yeterli düzeyde geliştiği ve hızlı bir fermentasyon sürecinin başladığı bildirilmiştir. Aşılama ile aşılamaı kontrol grubuna göre potansiyel bulaşma etkeni olan *Enterobacteriaceae* varlığında azalma ve hızlı bir asit artışı ve pH düşüşü gözlemlendiği bildirilmiştir. Fenolik maddelerin salamuraya geçişinin meyve epidermisinin engelleyici etkisi ile oldukça yavaş seyrettiği ve starteri etkilemediği ifade edilmiştir. HPLC analizi ile yeşil zeytin fermentasyonu sonucunda laktik ve asetik asit yanında daha düşük konsantrasyonlarda sitrik, tartarik ve malik asit de belirlendiği belirtilmiştir. Araştırmacılar bu çalışma ile elde edilen sonuçların, alkali uygulaması

olmadan laktik starter kullanılarak endüstriyel boyutta yeşil zeytin üretiminde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Vega Leal-Sánchez ve ark.(2003), zeytin fermentasyon salamurasından izole ettikleri bakteriosin oluşturma yeteneğindeki *Lactobacillus plantarum* LPCO10 suşunu İspanyol usulü yeşil zeytin üretiminde denemişlerdir. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda asit oluşumu ve starter kültürün başlangıç popülasyonu üzerine en etkili faktörün salamuranın tuz derişimi olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek aşılama oranı, starter taşıyıcı olarak MRS kullanımı, aşılama zamanı, pH ayarlamada kullanılan asidin tipinin de az da olsa asit oluşumu üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Araştırılan tüm başlangıç koşulları için *Lactobacillus plantarum* LPCO10 suşunun, doğal florayı baskıladığı, kontrol grubuna göre fermentasyonun ilk 25 gününde hızlı asit artışı ve pH düşüşü sağladığı ifade edilmiştir. Bunu takiben doğal floradaki laktobasillerin yavaş yavaş gelişmeye başladığı, laktik kokların popülasyonunun arttığı, *Lactobacillus plantarum* LPCO10 suşunun ise azaldığı, aşılamanın maya gelişimini teşvik ettiği bildirilmiştir. Araştırmacılar elde ettikleri bulgular ışığında geleneksel yöntemle İspanyol usulü yeşil zeytin üretiminin, MRS içinde süspansiyon halinde ve konsantrasyonu  $\geq 10^7$  olan *Lactobacillus plantarum* LPCO10 suşu kullanılarak geliştirilebileceğini, dikkat edilmesi gerekenin fermentasyon başlangıcında tuz derişimini % 4'ün altında tutmak, pH'ı asetik asit kullanarak 4.5-6.5 arasına getirmek ve salamuraya almayı takiben 1-4'üncü günde aşılamanın gerçekleştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Chorianopoulos ve ark. (2005), ısıt işlem görmemiş ve pastörize edilmiş *Conservolea* çeşidi zeytinlere, değişik oranlarda glikoz ve sakkaroz ilave ederek *Lactobacillus plantarum* kültürü aşılmalı fermentasyon denemişlerdir. Araştırmacılar, şeker ilavesinin bakteri gelişme oranı üzerine etki etmese de hızlı asit artışı ve pH düşüşü sağladığını belirtmişlerdir. Isıt işlem görmemiş zeytinlerde her iki şekerin de yeterli miktarda (%0.5, %1  $wv^{-1}$ ) ilavesinin pH düşüşünü hızlandırdığı, fermentasyonun ilk günlerindeki *Enterobacteriaceae* gelişimini durdurduğu ve erken dönem bulaşmalarını engelleyerek son ürün güvencesini sağladığı ifade edilmiştir. *Lactobacillus plantarum*'un tek başına florayı oluşturduğu pastörize edilmiş denemelerde pH düşüşünün ısıt işlem görmemiş olanlara göre daha yavaş olduğu bildirilmiştir. Her iki uygulamada da laktik asidin baskın asit olduğu, artan şeker

ilavesinin asit oluşumunu ve verimini artırdığı, sakkaroz ilave edilmiş ve pastörize edilmiş örnekler dışında kalanlarda az miktarlarda da olsa asetik asit oluştuğu ifade edilmiştir.

Korukluoğlu ve ark.(2000), Bursa merkez, Gemlik, İznik ve Orhangazi'den paketli veya açık olarak satın alınan 20 örnekte ince tabaka kromatografisi kullanılarak örneklerde var-yok deneyi ile okratoksin A, patulin, penisilik asit, sitrinin ve sterigmatosistin araştırması yapmışlardır. Araştırma materyali tüm örneklerin okratoksin A bakımından temiz olduğu, bir örneğin sitrinin, üç örneğin patulin, dört örneğin cılız olmakla birlikte sterigmatosistin ve yedi örneğin ise penisilik asit bakımından pozitif sonuç verdiğini ifade etmişlerdir.

Göçmen ve ark.(2000), salamura siyah zeytinlerde bozulma etkeni küfleri saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada salamura siyah zeytinlerde en fazla rastlanan küfün *Penicillium* cinsi olduğunu, diğer cinslerin ise *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Ulocladium*, *Rhizopus*, *Phoma* ve *Thalaromyces* olduklarını belirlemişlerdir.

Marsilio ve ark. (2005), Ascolena terena çeşidi zeytinin Yunan ve İspanyol usulleri ile işlendiğinde fenolik bileşiminde meydana gelen değişimi incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre, İspanyol yöntemi ile büyük kısmı giderilen fenolik maddelerin doğal yöntemde önemli bir oranda kaldığını ifade edilmiştir. Laktik asit bakterisi ile aşılamanın örneklerin pH, toplam asit, mikrobiyolojik yük ve lezzetini etkilediği, panelistler tarafından yapılan duyusal değerlendirme sonucunda, laktik asit bakterisi aşılmalı olan örneklerin aşılamasızlara göre daha tatlı ve aromatik olarak değerlendirildiği belirtilmiştir.

Zeytinlerde acılığın giderilmesi, mikrobiyel faaliyet üzerine engelleyici etkileri ile zeytinin fermentasyonu sonunda renginin optimizasyonu üzerinde etkilerinden dolayı oleuropein ve diğer fenolik maddeler, onların türevleri ve parçalanma ürünlerinin saptanması oldukça önemli bir konu halini almış ve bu konuda birçok çalışma yapılmaya başlanmıştır.

Acı lezzetli bir sekoiridoid-glikozit olan ve zeytin meyvesi yanında zeytin yaprağında da bulunan oleuropein, oleuropein parçalama yeteneğine sahip *L. plantarum* suşları tarafından üretilen beta-glikozidaz enzimi tarafından hidrolize edilebilmektedir. Ciafardini ve ark. (1994), zeytin salamurasından izole edilmiş 3 *L. plantarum* suşunu

(B17, B20 ve B21) araştırmaları kapsamında denemişlerdir. Mikroorganizmalar tarafından oluşturulan beta-glikozidazın, oleuropein olarak bilinen 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-glikopiranosit'i hidrolize etme yeteneğinde olduğu, bakteri suşuna bağlı olarak, ortamda % 2 glikoz varlığının enzim aktivitesini % 40-50 oranında engellediği belirtilmiştir. B 21 suşu ile 30 °C'de 7 günlük inkübasyon sonunda oluşan ürünlerin trimetilsilil türevlerinin kromatografik analizi sonucunda oleuropeinin tüm hidroliz ürünlerine rastlanıldığı bildirilmiştir. 21 günlük inkübasyon sonunda,  $\beta$ -3,4-dihidroksifeniletanol miktarındaki artış ile oleuropein ve aglikonun iz miktarlara düştüğu yazarlar tarafından belirtilmiştir.

Rozés ve Perez (1996), *L. plantarum* DSM 10492 suşunun gelişimi ve DL-laktik asit oluşumu üzerine oleuropein ve NaCl'ün etkisini araştırmışlardır. *L. plantarum* gelişiminin artan miktarlarda oleuropein ilavesinden glikoz varlığı veya yokluğunda etkilenmediği belirtilmiştir. Artan oranlarda NaCl ilavesi gelişme geriliğine sebep olmuş, buna ek olarak %8 tuzda gelişme görülmemiştir. NaCl ve oleuropeinin birlikte ilavesinin gelişmeyi tamamen durdurduğu gözlenmiştir. Ana fermentasyon ürünü olan DL-laktik asit yanında uzun süreli inkübasyon sonunda asetik asit de saptanmıştır. *L. plantarum*, oleuropein varlığında DL-laktik asit oluşturabilmiş, fakat artan oleuropein varlığında DL-laktik asit oluşumu azalmıştır. Diğer yandan ışıl işlem görmüş oleuropeinin bakterisit etkisinin olduğu bildirilmiştir.

Marsilio ve ark. (1996), *L. plantarum* ATCC 8014 ve sofralık zeytin salamuralarından izole edilen *L. plantarum* B21 suşları ile inkübasyon sonucunda ortaya çıkan oleuropein türevlerini gaz kromatografisi kullanarak saptamışlardır. Sonuç olarak bakteri suşlarının başlangıçta oleuropeini beta-glikozidaz aktivitesi ile parçalandığını ve bir aglikon (saptanabilen ilk ara bileşik) oluştuğunu bildirmişlerdir. İkinci aşamada bu türevin, esteraz aktivitesi ile 2-(3,4-dihidroksifenil) etanol ve elenoik aside dönüştüğünü belirtmişlerdir.

Marsilio ve Lanza (1998), oleuropein yıkma özelliğindeki *Lactobacillus plantarum* suşunun oleuropein ve onun parçalanma ürünü hidroksitrosol ve *p*-kumarik asit varlığında gelişmesi üzerine glikoz ve NaCl'ün etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 10 g/l oleuropein, 2 g/l hidroksitrosol ve tuzun bir aradaki varlığının bakteri gelişimini engellemediği halde, 1g/l *p*-kumarik asit varlığının düşük de olsa engelleyici etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışma ile araştırmacılar bakteriyel

beta-glikozidaz ve esterazın oleuropeinin yıkılmasında rol oynadığını da vurgulamışlardır. Ortamda glikoz varlığının *L. plantarum*'un oleuropein yıkımını olumsuz yönde etkilediği ifade edilmiştir.

Ruiz-Barba ve ark.(1993), alkali ile muamele edilmiş ve edilmemiş zeytin salamuralarından özütlenmiş polifenollerin *Lactobacillus plantarum* üzerine engelleyici etkilerini araştırmışlardır. İkili fenolik fraksiyon kullanımının (glizozitler, oleuropein ve verbaskozit) *L. plantarum* üzerine engelleyici etkisinin daha yüksek olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Amiot ve ark. (1986), Picholine, Lucques ve Salonenque çeşitlerinin gelişme ve olgunlaşma süreçleri boyunca, Bouteillan, Verdale, Cailletier, Zrappola, Tanche, L11, L365, VP7 çeşitlerinin ise sadece olgunlaşma süreçlerinde fenolik bileşenlerini (oleuropein, verbaskozit, rutin ve luteolin 7-glikozit) saptamışlardır.

Bianco ve ark. (1998), oleuropeinin yeni bioaktif türevlerini saptamışlar ve <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR tekniği ile karakterize etmişlerdir.

Ryan ve Robards (1998), yaptıkları çalışmada zeytinlerde bulunan fenolik bileşenlerin fonksiyonlarını, özelliklerini, dağılımlarını etkileyen faktörleri ve belirlenmelerinde kullanılan yöntemleri derlemiştir.

Ryan ve ark. (1999a), Manzanillo ve Cucco çeşitlerinin fenolik içeriklerini, HPLC ile ayırım işlemini takiben, ultra viole, floresans ve kütle spektrometrik dedektör kullanarak saptamışlardır. Aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında katı-faz ekstraksiyon uygulamasını takiben ters fazlı sıvı kromatografi kullanarak zeytin örneklerinin fenolik içeriklerini saptamışlardır (Ryan ve ark.,1999b).

Bianco ve Uccela (2000), İspanya, Portekiz, Yunanistan ve İtalya'dan elde ettikleri örneklerin fenolik bileşenlerini araştırmışlardır.

McDonald ve ark. (2001), HPLC/UV, HPLC/APCI ve HPLC/ESI dedektör sistemleri kullanarak zeytin örneklerinin fenolik bileşimlerini saptamışlardır.

Saija ve Uccela (2001), zeytinde bulunan biofenollerin insan sağlığı üzerine fonksiyonel etkilerini yaptıkları çalışmada derlemiştir. Araştırmacılar Akdeniz beslenme kültürüne sahip toplumlarda kronik hastalıklara yakalanma riskinin daha düşük olduğunu, bunun diyetle alınan bitkisel antioksidanların fonksiyonel etkilerinden kaynaklandığını, sofralık zeytinler ve zeytin yağlarında bulunan biyofenollerin

antioksidan ve antimikrobiyel etkileri sayesinde ise bir çok rahatsızlık ve enfeksiyon riskinin azaltılabileceğini belirtmişlerdir.

Blekas ve ark.(2002), Yunanistan'da üretilen zeytinleri biofenol kaynağı olarak değerlendirdikleri çalışmada zeytinlerin çoğunun iyi birer fenolik madde kaynağı olduğunu saptamışlar, hidroksitrosol, tirosol ve luteolinin değerlendirilen tüm örnekler içinde en çok rastlanan fenol bileşenleri olduğunu belirtmişlerdir.

Briante ve ark.(2002), iki İtalyan zeytin çeşidi olan Ascolana Terena ve Frantoio çeşitlerinin olgunlaşma süreçlerinde fenolik madde ve enzim aktivitesi değişikliklerini gözlemlemişlerdir.

Romero ve ark. (2002a), ters fazlı kromatografik ayırma yöntemlerinde hidroksitrosol ile karıştırılan hidroksitrosol 4- $\beta$ -D-glikozit'in ayırımını sağlayan bir yöntem geliştirmişlerdir.

Romero ve ark.(2002b), doğal siyah İspanyol zeytin çeşitlerinin fenolik madde içeriklerini saptamışlardır.

Cunha ve ark. (2001), HPLC/UV detektör kullanarak sofralık zeytinlerdeki başlıca karboksilik asitleri (laktik, asetik, süksinik ve sitrik asit) saptamaya çalışmışlardır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırma materyali olarak kullanılan zeytinler Gemlik çeşidi olup İznik'te faaliyet gösteren İZPAŞ A.Ş.'nden satın alınmıştır. Zeytinler 2002, 2003 ve 2004 yılları Aralık ayında siyah zeytin işleme olgunluğunda hasat edilmiş ve Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü pilot tesisine getirilerek işlemeye alınmıştır.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. Denemede kullanılan laktik asit bakterilerinin izolasyonu

Siyah olgunluktaki zeytinler zenginleştirme amacıyla aşağıda bileşimi verilen, De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) sıvı besiyerine aşılama yapılmış ve 16-18°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bulunarak mikroorganizma gelişmesi izlenen tüpler alınarak, steril fizyolojik tuzlu su kullanılarak uygun seyreltmeler yapıldıktan sonra ve MRS-Agar'a ekim yapılmıştır. Aynı sıcaklıkta inkübasyon sonunda gelişen kolonilerden farklı görünümde olanların mikroskopik incelemeleri sonunda uygun görülenlerle MRS-Agar'a batırma kültürleri yapılmış ve tanıları yapılmak üzere buzdolabı koşullarında saklanmaya alınmıştır.

MRS sıvı besiyerinin bileşimi (Anonim, 1996):

Pepton	10.0 g
Maya özütü	4.0 g
Et özütü	8.0 g
Glikoz	20.0 g
Tween-80	1 ml
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Diamonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.04 g
Damıtık su	1000 ml
pH: 6.2±0.2	



### **3.2.2. Elde edilen izolatların tanılanması**

Yukarıda anlatıldığı şekilde izolasyonu yapılan bakterilerin tanısında morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla aşağıda sıralanan özellikler belirlenmiştir.

#### **3.2.2.1. Gram boyama:**

Elde edilen izolatların Gram reaksiyon özellikleri, 18-24 saatlik genç kültürlerle Gram boyama uygulanarak tespit edilmiştir (Temiz,1994).

#### **3.2.2.2. Hücre şekilleri:**

İzolatların hücre şekilleri, Gram boyama sonrasında ve ayrıca hazırlanan basit preparatlarda yapılan mikroskopik incelemeler sonucunda belirlenmiştir.

#### **3.2.2.3. Katalaz testi:**

Temiz bir test tüpüne alınan %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üzerine 1ml sıvı izolat kültürü eklenerek hava kabarcıklarının oluşup, oluşmamasına göre değerlendirilmiştir (Temiz,1994).

#### **3.2.2.4. Glikozdan gaz oluşturma:**

İzole edilen bakterilerin homofermentatif veya heterofermentatif olduklarını saptamak amacıyla yukarıda bileşimi verilen MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Hazırlanan besiyeri 10'ar ml olarak tüplere pipetlenmiş ve içlerine Durham tüpü yerleştirildikten sonra 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Aşılana tüpler 30°C'de 21 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Her gün kontrol edilerek Durham tüplerinde gaz oluşup oluşmadığı gözlenmiştir. Gaz oluşturan tüpler heterofermentatif, oluşturmayan tüpler ise homofermentatif olarak değerlendirilmiştir (Başoğlu, 1976).

#### **3.2.2.5. 15 ve 45°C'de MRS sıvı besiyerinde gelişme:**

Yukarıda bileşimi verilen MRS sıvı besiyeri hazırlanıp, 16x160 mm'lik tüplere 10'ar ml olacak şekilde tüplere doldurulmuş ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Soğutulup aşılana tüpler 15 ve 45°C'ye ayarlanmış inkübatörlerde 21 gün süre ile gelişmeye bırakılmış ve gelişme durumları izlenmiştir (Başoğlu, 1976).

### 3.2.2.6. %5, %7.5 ve %10 tuzda gelişme:

Yukarıda bileşimi verilen MRS sıvı besiyerine %5, %7.5 ve %10 tuz ilave edilerek, ayrı ayrı tüplere 10'ar ml olacak şekilde doldurulmuş ve 121°C'de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Soğumayı takiben aşılana tüpler 30°C'de 21 gün süre ile inkübasyona bırakılmış ve gelişme durumları kaydedilmiştir.

### 3.2.2.7. Eskulin hidrolizi:

Bu testte aşağıda bileşimi verilen modifiye edilmiş MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Pepton	10.0 g
Maya özütü	4.0 g
Tween-80	1 ml
Di-potasyum hidrojen fosfat	2.0 g
Sodyum asetat	5.0 g
Diamonyum hidrojen sitrat	2.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Mangan sülfat	0.04 g
Damıtık su	1000 ml
pH: 6.2±0.2	

Bu şekilde hazırlanan besiyerine %0.5 oranında eskulin ve indikatör olarak da % 0.05 oranında FeCl<sub>3</sub> ilave edilerek 8x110 mm'lik tüplere 5'er ml olarak paylaştırılmıştır. 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra bakteri kültürleri ile aşılanmıştır. Aşılamayı takiben 30 °C'de 21 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinde siyah renk oluşumu gözlenenler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Başoğlu, 1976).

### 3.2.2.8. Karbonhidratlardan asit oluşumu:

İzole edilen bakterilerin hangi karbonhidratlardan asit oluşturabildiğini saptamak amacıyla yukarıda verilen bileşimden şeker çıkarılmış olan MRS sıvı besiyeri kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyerine % 0.2'lik klorfenol kırmızısından litreye 20 ml olacak şekilde ilave edilmiş ve 8x110 mm'lik tüplere 5'er ml olarak doldurulmuştur. Tüpler 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edildikten sonra membran filtrasyon tekniği ile sterilize edilen karbonhidratlar ana besiyerine %1 olacak şekilde

ilave edilmiştir. Genç bakteri kültürleri ile aşılanan tüpler 30 °C'de 21 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Asit oluşumu ile sarı renge dönen tüpler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Başoğlu, 1976).

Bu testte karbonhidrat kaynağı olarak glikoz, maltoz, nişasta, sorboz, ramnoz, sellobiyoz, riboz, arabinoz, ksiloz, rafinoz, melibiyoz, trehaloz, galaktoz, sakkaroz, laktoz, mannit, inosit ve dekstrin kullanılmıştır.

### **3.2.3. Aşılama kültürlerinin hazırlanması**

Fermentasyonda kullanılacak, tanısı yapılmış kültürler, tuza dayanıklılıkları ve gaz oluşturma yeteneklerine göre seçilmiştir. Çoğaltılmaları amacıyla MRS besiyeri kullanılmış, bakterilerin salamura ortamına adaptasyonlarını sağlamak için içerisine ilave olarak % 10 zeytin yaprağı özütü ve % 5 tuz ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanmış besiyerine stok kültürden aşılama yapılmış, 16-18 °C'de  $10^7$ - $10^8$  kob/ml hücre yoğunluğuna ulaşana kadar inkübasyona bırakılmıştır.

#### ***Zeytin yaprağı özütünün hazırlanışı:***

İnce ince kıyılmış 100 g zeytin yaprağına 100 ml damıtık su ilave edilerek kaynar su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir. Özütlemeyi takiben sıcak halde adi filtre kağıdından süzülerek berraklaştırılmış, ardından 0.20 µm gözenek çapına sahip membran filtreden süzülerek sterilize edilmiş ve gerektiğinde steril koşullar altında MRS besiyerine yukarıda verilen oranda ilave edilmiştir.

### **3.2.4. Zeytinlerin salamuraya alınması**

İşletmeye getirilen zeytinler, çürük, ezik, bereli ve böcek zararı görmüş olanları ayıklanmış, basınçlı su ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Fermentasyon 25 l'lik plastik bidonlarda gerçekleştirilmiştir. Bidonlar sıcak deterjanlı su ile yıkandıktan sonra kaynamakta olan su içerisinde 10 dakika bekletilmiş, son olarak 100 ppm K-metabisülfid içeren su ile durularak kurumaya bırakılmıştır. Böylece kaplardan gelebilecek bulaşma riski en aza indirilmeye çalışılmıştır. Her bir kaba 13 kg yıkanmış zeytin konmuş, üzerlerine 12 l kaynatılıp soğutulmuş salamura ilave edilmiş ve % 6 oranında bakteri kültürleri ile aşılanmıştır. Birbirini takip eden 3 sezonda uygulanan

deneme desenleri aşağıda çizelgeler halinde özetlenmiştir. Bütün denemeler 3 tekerrürlü olarak yapılmıştır.

### **3.2.5. Fermentasyon uygulaması**

2002-2003 üretim yılında uygulanan fermentasyon deneme deseni izelge 3.1'de özetlenmiştir. Kontrol grupları hariç tüm bidonlara bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan aşılama kültürlerinin herbirinden % 1.5 olacak şekilde toplam % 6 oranında aşılama yapılmıştır. Kültürlerin salamura ortamına taşınmasında santrifüjleme yapılmamış, üslü çoğalma evresindeki kültürler geliştirildikleri zeytin yaprağı özütü ve tuz katkılı besiyeri ile aktarılmıştır.

2003-2004 üretim yılında uygulanan fermentasyon deneme deseni izelge 3.2.'de özetlenmiştir. Bölüm 3.2.2'de bahsedildiği şekilde hazırlanan kültürler santrifüjlenerek ayrılmış, steril fizyolojik su ile süspansiyon haline getirildikten sonra salamura ortamına aktarılmıştır.

2004-2005 üretim yılında uygulanan fermentasyon deneme deseni izelge 3.3'de özetlenmiştir. Kontrol grupları hariç tüm bidonlara bölüm 3.2.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kültürlerden tek tek veya karışımlar halinde aşılama yapılmıştır. Kültürlerin salamura ortamına taşınmasında santrifüjleme yapılmamış, üslü çoğalma evresindeki kültürler geliştirildikleri zeytin yaprağı özütü ve tuz katkılı besiyeri ile aktarılmıştır.

### **3.2.6. Mikrobiyolojik analizler**

Deneme süresince örneklerden aseptik koşullarda alınan belirli hacimdeki salamura % 0,85'lik steril fizyolojik su ile seyreltilmiş ve elde edilen seyreltikler toplam aerob mezofilik bakteri, toplam laktik asit bakterisi, Enterobakteri, *Pseudomonas* ve maya-küf sayımları için kullanılmıştır.

#### **3.2.6.1. Toplam aerob mezofil bakteri (TAMB) sayımı**

TAMB sayımı Plate Count Agar besiyeri kullanılarak yapılmıştır. Petri kutuları 30 °C'de 48 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda koloni sayımları yapılmıştır (Doğan ve Tükel, 2000; Panagou ve ark., 2002).

**Çizelge 3.1.** 2002-2003 üretim yılında uygulanan fermentasyon denemesi

Muamele no:	Tuz (%)	Laktik Asit Bakteri İzolatı	Aşılama Oranı	Aşılama ortamı
1 (K)	5	-	-	-
2	5	L1+L2+L3+L4	$\Sigma\%6$ (%1.5+1.5+1.5+1.5)	MRS
3 (K)	7	-	-	-
4	7	L1+L2+L3+L4	$\Sigma\%6$ (%1.5+1.5+1.5+1.5)	MRS
5 (K)	15	-	-	-
6	15	L1+L2+L3+L4	$\Sigma\%6$ (%1.5+1.5+1.5+1.5)	MRS

L1, *Lactobacillus brevis*; L2, *Leuconostoc cremoris*, L3, *Leuconostoc paramesenteroides*, L4, *Leuconostoc dextranicum*

**Çizelge 3.2.** 2003-2004 üretim yılında uygulanan fermentasyon denemesi

Muamele no:	Tuz (%)	Laktik Asit Bakterisi	Aşılama Oranı	Aşılama Ortamı
1 (K)	7	-	-	-
2	7	L1	$\Sigma\%1.5$	FTS
3	7	L2	$\Sigma\%1.5$	FTS
4	7	L3	$\Sigma\%1.5$	FTS
5	7	L1+L2	$\Sigma\%1.5$ (%0.75+%0.75)	FTS
6	7	L1+L3	$\Sigma\%1.5$ (%0.75+%0.75)	FTS
7	7	L2+L3	$\Sigma\%1.5$ (%0.75+%0.75)	FTS
8	7	L1+L2+L3	$\Sigma\%1.5$ (%0.5+%0.5+%0.5)	FTS

**Çizelge 3.3.** 2004-2005 sezonunda uygulanan fermentasyon denemesi

<b>Muamele no:</b>	<b>Tuz (%)</b>	<b>Laktik Asit Bakterisi</b>	<b>Aşılama Oranı</b>	<b>Aşılama Ortamı</b>
1 (K)	7	-	-	-
2	7	L1	$\Sigma\%4.5$	MRS
3	7	L2	$\Sigma\%4.5$	MRS
4	7	L3	$\Sigma\%4.5$	MRS
5	7	L1+L2	$\Sigma\%4.5$ (%2.25+2.25)	MRS
6	7	L1+L3	$\Sigma\%4.5$ (%2.25+2.25)	MRS
7	7	L2+L3	$\Sigma\%4.5$ (%2.25+2.25)	MRS
8	7	L1+L2+L3	$\Sigma\%4.5$ (%1.5+1.5+1.5)	MRS
9	7	LP	$\Sigma\%4.5$	MRS

LP, *Lactobacillus plantarum*.

### 3.2.6.2. Toplam laktik asit bakterisi (TLAB) sayımı

TLAB sayımı MRS besiyerine % 1.5 agar katılarak dökme yöntemi ile yapılmıştır. Petri kutuları 30°C’de 48-72 saat süre ile inkübasyona bırakılmış ve bu süre sonunda oluşan kolonilerin sayımları yapılmıştır (Panagou ve ark., 2002)

### 3.2.3. Enterobakteri sayımı

Enterobakteri sayısı Violet Red Bile Glikoz (VRBG) Agar kullanarak dökme kültür yöntemi ile tespit edilmiştir. 37 °C’de inkübasyona bırakılan petrilere 24-48 saat sonunda gelişen kırmızı renkli koloniler sayılmıştır (Anonim, 1996; Panagou ve ark., 2002). Besiyeri kaynar su banyosunda devamlı karıştırarak tamamen çözüldürüldükten sonra 2 dakikadan uzun olmayacak şekilde bekletilmiştir.

### 3.2.6.4. *Pseudomonas* sayımı

*Pseudomonas* sayımı için aşağıda bileşimi verilen *Pseudomonas* Agar’a gliserin ilave edilmiş ve 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Oluşan koloniler 366 nm dalga boyundaki UV lamba ışığında incelenmiş, parlak yeşil renkli koloniler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Pseudomonas Agar F Base (Anonim, 1996):

Tripton	10.0 g	
Pepton	10.0 g	
Mg-sülfat	1.5 g	
Di-potasyum hidrojen fosfat	1.5 g	
Agar	12 g	
Gliserin	10.0 ml	
Damıtık su	1000 ml	pH: 7.2±0.2

### 3.2.6.5. Maya ve küf sayımı

Maya ve küf sayımı için aşağıda bileşimi verilen Oksitetrasiklin Glikoz Yeast Ekstrakt (OGY) Agar kullanılmıştır. 30 °C’de inkübasyona bırakılan petrilerde 48-72 saat sonunda gelişen koloniler sayılmıştır (De Castro, 2002).

Oksitetrasiklin Glikoz Yeast Ekstrakt Agar (OGYA) Bileşimi (Anonim, 1996):

Maya özütü	5.0 g	
Glikoz	10.0 g	
Agar	15.0 g	
Oksitetrasiklin	1.0 g	
Damıtık su	1000 ml	pH: 6.5±0.2

Maya özütü, glikoz ve agar karıştırılıp, çözündürüldükten sonra 121°C’de 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra 50 °C’ye soğutulan besiyerine oksitetrasiklin ilave edilmiştir.

### 3.2.7. Ham ve işlenmiş zeytinlere uygulanan fiziksel ve kimyasal analizler

#### 3.2.7.1. Kilogramda meyve sayısı

Zeytin örneklerinden 100 g tartılmış ve bu miktarda kaç adet meyve olduğu sayılarak kilogramdaki meyve sayısı belirlenmiştir (Anonim, 1997).

#### 3.2.7.2. Meyve ve çekirdek boyutları

Rastgele seçilen 30 zeytin meyvesinin en ve boyu bir kumpas yardımı ile 0,1 mm duyarlılıkla ölçülmüştür. Ölçümü takiben zeytinlerin çekirdekleri çıkartılmış ve aynı şekilde çekirdek boyutları da belirlenmiştir (Anonim, 1997).

### 3.2.7.3. Et/çekirdek oranı

100 g zeytin örneği tartılmış ve çekirdekleri çıkartılmıştır. Et ve çekirdek kısımları ayrı ayrı tartılıp yüzde oranları hesaplanmıştır. % Et oranı, % çekirdek oranına bölünerek et/çekirdek oranı hesaplanmıştır (Yazıcıoğlu, 1966).

### 3.2.7.4. Toplam kurumadde tayini

Homojen bir şekilde parçalanmış zeytin örneklerinden daha önce  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı etüvde bekletilerek darası alınmış kurumadde kaplarına 10'ar gram tartılmış, aynı etüvde sabit ağırlığa gelene dek bekletilmiştir. Hesaplama yolu ile önce 10g'daki, sonra 100g'daki kurumadde miktarı bulunmuştur (Uylaşer ve Başoğlu, 2000).

### 3.2.7.5. Kül tayini

Etüvde sabit ağırlığa gelene dek bekletilerek darası alınmış porselen krozelere ~5 g örnek tartılmış ve  $525\pm 25^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı kül fırınında yakma işlemine tabi tutulmuştur. Tartım farkları hesaplanarak örneğin kül içeriği belirlenmiştir (Uylaşer ve Başoğlu, 2000).

### 3.2.7.6. Toplam asit tayini

Örneğin tahmini asit içeriğine bağlı olarak yapılmış seyreltme sıvıları filtre kağıdından süzölmüş, süzöntülerden 10 ml alınarak fenol fitalein ayırıcı eşliğinde ayarlı 0,1N NaOH çözeltisi ile titre edilerek toplam asit miktarı bulunmuştur (Anonim, 1997).

### 3.2.7.7. Tuz tayini

Asitlik tayininde hazırlanan seyreltme sıvısı süzöntülerinden tuz tayininde de yararlanılmış, Anonim, (1997)'de belirtildiği şekilde 0.1N  $\text{AgNO}_3$  çözeltisi ile %5'lik  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$  ayırıcı eşliğinde kiremit kırmızısı renge dek titre edilmiştir .

### 3.2.7.8. İndirgen şeker tayini

Spektrofotometrik olarak çalışılmıştır. Bir deney tüpüne aşağıda bileşimi verilen 6 ml dinitrosalisilik asit çözeltisi; üzerine, yeterli oranda seyreltilmiş, 5'er ml Carrez I ve II çözeltileri ile durultulup aktif kömürle rengi giderilmiş 2 ml örnek süzöntüsü ilave edilmiştir. Karışım kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilip, süre sonunda akan su



altında soğutmuş ve 540 nm’de saf su ve dinitrosalisilik asit çözeltisinden oluşan tanığa karşı okuma yapılmıştır. Okunan absorbans değeri standart eğriden elde edilen katsayı (k) ve seyreltme oranı ile çarpılarak % glikoz değeri hesaplanmıştır (Amodioha, 1998).

***Dinitrosalisilik asit çözeltisinin hazırlanışı:***

Dinitrosalisilik asit	1 g
2M NaOH	20 ml
K-Na-Tartarat	20 g

Damıtık su ile 100 ml’ye tamamlanır.

**3.2.7.9. Toplam azot tayini**

Homojen bir şekilde parçalanmış zeytin örneklerinden tam tartımla ~1g örnek azot yakma tüpüne alınmıştır. Üzerine 15 ml yoğun sülfirik asit ve 1 adet selen yakma tableti eklenmiş ve 380°C’de berrak açık yeşil renk oluşana kadar yakma işlemine tabi tutulmuştur. Soğutulan tüp içeriğine 40 ml damıtık su ilave edilmiş ve cihazın damıtma birimine takılmıştır. Diğer taraftan 50 ml % 2’lik borik asit ve metil kırmızısı-brom kresol yeşili karışık ayırıcı içeren erlen cihazın damıtık toplama bölgesine yerleştirilmiştir. 75 ml % 40’lık NaOH eklendikten sonra damıtma işlemine başlanmıştır. Erlen 150 ml damıtık toplandıktan sonra işleme son verilmiştir. Erlen içeriği ayarlı 0,1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile titre edilmiştir. Elde edilen titrasyon sarfiyatı kullanılarak % azot miktarı, % azot miktarı 6.25 faktörü ile çarpılarak % protein miktarı hesaplanmıştır (Uylaşer ve Başoğlu, 2000).

**3.2.7.10. Yağ tayini**

Homojen bir şekilde parçalanmış zeytin örneklerinden tam tartımla ~10 g tartılarak kartuş içine yerleştirilmiş, Uylaşer ve Başoğlu (2000)’na göre Soxhlet düzeneğinde özütlemeye tabi tutulmuştur.

**3.2.7.11. Oleuropein tayini**

Çekirdekleri çıkartılan zeytinler blendırda parçalanarak 50 g tartılmıştır. Bir beherde üzerine 100 ml saf su ilave edilip 5 dakika kaynatılmış ve vakum altında

Watman no:4 kağıdından süzölmüştür. Filtre kağıdı üzerinde kalan kalıntı alınıp tekrar 100 ml damıtık su ile 5 dakika kaynatılmış ve 2. süzöntü elde edilmiştir. Süzöntüler birleştirilmiş ve damıtık su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Bundan 2.5 ml alınmış ve 25ml'lik ölçü balonuna pipetlendikten sonra üzerine 2 ml % 1'lik jelatin çözeltisi ilave edilip, çalkalanmış ve analitik saflıkta aseton ile çizgiye tamamlanmıştır. Karışımdan 20 ml alınarak, üzerine 4g analitik saflıkta  $Al_2O_3$  ilave edilmiş ve kuvvetle çalkalanmıştır.  $Al_2O_3$  çöktükten sonra üstteki berrak kısım alınarak spektrofotometrede 345 nm'de asetona karşı okuma yapılmış, sonuç absorbands değeri olarak verilmiştir (Diez ve ark., 1972).

#### **%1'lik jelatin çözeltisinin hazırlanışı:**

Önce doymuş NaCl çözeltisi hazırlanır. Sonra 1 g jelatin bir miktar doymuş NaCl çözeltisi ile çözündürölüp, 100 ml'ye tamamlanır (Diez ve ark., 1972).

#### **3.2.7.12. pH okumaları**

Örneklerin pH değeri Nel pH 840 model pH-metre kullanarak belirlenmiştir.

#### **3.2.8. Bulguların istatistiksel analizi**

Örneklerin analizi 3 tekerrürlü olarak yapılmış, elde edilen sonuçların tesadüf parsellerinde varyans analizi ve Duncan testi, JMP 5 Statistical Discovery Software programı kullanılarak yapılmıştır (SAS Institute, 2002).

## 4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

### 4.1. İzolatların tanı çalışma sonuçları ve tartışması

Gerçekleştirilen tanı deney sonuçlarına göre, araştırmada kullanılmak üzere elde edilen bakteri izolatlarının *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides* ve *Leuconostoc dextranicum* olduğu saptanmış; sonuçlarla ilgili ayrıntılı bilgiler aşağıda verilmiştir.

#### *Leuconostoc cinsi*

Hücrelerin küresel, fakat agarlı besiyerinde geliştiğinde mercimek şeklinde olduğu, çoğunlukla ikili veya zincirler halinde bulunduğu gözlenmiştir. Gram pozitif, fakültatif anaerob ve hareketsiz olmalarının yanı sıra, spor oluşturmamaktadırlar. Kolonileri küçük, düzgün yuvarlak, gri-beyaz renkte olup, batırma kültürlerinde, yüzeydeki cılız gelişmenin yanında kanal boyunca yoğun bir şekilde gelişmektedir. Sıvı kültürlerde gelişme sırasında yeknesak bir bulanıklık görülmüştür. Bu gözlemler Garvie (1986) ile uyumludur. Bunlar dışında Garvie (1986)'e göre optimum sıcaklıkları 20-30 °C olmasına karşın 5-30 °C'ler arasında gelişme gösterirler. Gelişmeleri fermente edebilecekleri karbonhidratların varlığına bağlıdır. Katalaz negatiftirler.

Taze zeytinlerin 18 °C'de inkübasyonu ile elde edilen izolatlardan 8'i morfolojik ve fizyolojik özellikleri ile bu cinsin temsilcileri olarak tanımlanmışlardır. Ancak bu izolatlar değişik karbon kaynaklarının fermentasyonuna göre üç ayrı özellik göstermişler ve bu durumda Garvie (1986)'nin tanımlaması da dikkate alınarak üç ayrı türe ayrılmıştır.

#### *Leuconostoc cremoris (Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris)*

Hücre morfolojisi genel tanımda bahsedilen şekilde olup, uzun zincirler oluştururlar. Şekerler ile alkollerin fermentasyon testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Test sonuçları Garvie (1986)'nin tanımlamasına göre değerlendirildiğinde izolatın *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* alt türüne ait olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 4.1.** *Leuconostoc* türlerine ait şeker ve alkol testi sonuçları (Garvie, 1986)

<b>Karbonhidrat</b>	<b><i>L. cremoris</i></b>	<b><i>L. dextranicum</i></b>	<b><i>L. paramesenteroides</i></b>
Arabinoz	-	-	-
Sellobiyoz	+	+	+
Galaktoz	-	+	+
Glikoz	+	+	+
Laktoz	+	+	-
Maltoz	+	+	+
Mannit	-	-	-
Melibiyoz	-	+	+
Rafinoz	+	+	+
Riboz	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+
Trehaloz	+	+	+
Ksiloz	-	+	+
Eskulin hidrolizi	+	+	+
İnozit	-	-	-
Niştasta	-	-	-
Dekstrin	-	-	-
Ramnoz	-	-	-
Sorboz	-	-	-

İzolatların gaz oluşumu ve tuza dayanıklılık testlerinin sonuçları da Çizelge 4.2’de sunulmuştur. % 5 tuzda güçlü, % 7.5 tuzda orta derecede, % 10 tuzda ise çok zayıf gelişme gösterebilmiştir. Glikozdan çok zayıf olarak gaz oluşturmuş, diğer cins temsilcilerine göre yüksek tuz derişimine daha fazla dayanıklılık göstermiştir.

#### ***Leuconostoc dextranicum (Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum)***

Hücrelerin morfolojik özellikleri genel tanımda anlatıldığı şekildedir. Şekerler ile alkollerin fermentasyon testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Testler sonucunda elde edilen bulguların Garvie (1986)’nin tanımlaması ışığında değerlendirilmiş, izolatın *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* alt türüne ait olduğu saptanmıştır. Glikozdan gaz oluşumu ve tuza dayanıklılık testleri sonuçlarına bakıldığında (Çizelge 4.2), glikozdan çok zayıf gaz oluşturduğu, 3C kültürü dışındakilerin % 10 tuz derişiminde gelişemediği saptanmıştır.

#### ***Leuconostoc paramesenteroides***

Hücreye ait morfolojik özellikler yukarıda belirtilmiştir. Şekerler ile alkollerin fermentasyon testlerine ait sonuçlar Çizelge 4.1.’de verilmiştir. Test sonuçları Garvie (1986)’nin tanımlamasına göre değerlendirildiğinde izolatın *Leuconostoc*

**Çizelge 4.2.** Zeytinlerden izole edilen bakterilerin gaz oluşumu ve tuzda gelişme yetenekleri

Kültür no:	Kültür adı:	Gaz oluşumu	Tuza dayanıklılık		
			% 5	% 7.5	% 10
1A		+	+++	++	+
1B	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+++	++	+
1C		+	+++	++	+
2C		+	+++	++	-
	<i>Leuconostoc</i>				
2B	<i>paramesenteroides</i>	+	+++	++	-
3A		±	+++	++	±
3B	<i>Leuconostoc cremoris</i>	±	+++	++	±
2A		+	+++	++	-
3C		±	+++	++	+
4A	<i>Leuconostoc dextranicum</i>	±	+++	++	-
4B		±	+++	++	-
4C		±	+++	++	-

Bulanıklık derecesi; +++ , kuvvetli, ++ , orta, + , zayıf, ±, çok zayıf, -, bulanıklık saptanmadı.

*paramesenteroides* türüne ait olduğu belirlenmiştir. Glikozdan gaz oluşumu ve tuza dayanıklılık testleri sonucunda (Çizelge 4.2), glikozdan çok zayıf gaz oluşturduğu, % 5 tuzda güçlü, % 7.5 tuzda ise orta derecede gelişme gösterdiği, % 10 tuza ise dayanıksız olduğu saptanmıştır.

#### ***Lactobacillus* cinsi**

#### ***Lactobacillus brevis***

Hücrelerin şekillerinin kıvrık uçlu çomaklar şeklinde olduğu, tekli veya kısa zincirler halinde bulunduğu saptanmış, 45 °C'de gelişme görülmemiştir (Çizelge 4.3). Şekerlerin ve alkollerin fermentasyonuna ait test sonuçları Çizelge 4.3'de sunulmuştur. Elde edilen izolatların 4'ünün morfolojik ve fizyolojik özellikleri ile bu cinsin temsilcileri olduğu belirlenmiştir. Değişik karbon kaynaklarını fermente etme yetenekleri incelenmiş, Kandler ve Weiss (1986)'ın tanımlamaları dikkate alınarak izolatların *L. brevis* türünün temsilcileri oldukları görülmüştür. İzolatlara ait glikozdan gaz oluşumu ve tuza dayanıklılık testi sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. Glikozdan

**Çizelge 4.3.** *L. brevis* ve *L. plantarum*'un diğer özellikleri

<b>Karbonhidrat</b>	<b><i>L. brevis</i></b>	<b><i>L. plantarum</i>*</b>
Arabinoz	-	d
Sellobiyoz	-	+
Eskulin	+	+
Galaktoz	+	+
Glikoz	+	+
Laktoz	-	+
Maltoz	+	+
Mannitol	-	+
Melibiyoz	+	+
Rafinoz	-	+
Ramnoz	-	-
Riboz	+	+
Sakkaroz	-	+
Trehaloz	-	+
Ksiloz	+	d
Sorboz	-	b
Dekstrin	-	b
Niştasta	-	b
İnosit	-	b
15 °C'de gelişme	+	+
45 °C'de gelişme	-	-

\*: *L. plantarum*'un özellikleri Kandler ve Weiss (1986)'dan alınmıştır, b: Kaynakta bulguya rastlanmadı.

gaz oluşumu oldukça yavaş gerçekleşmiş, % 5 tuzlu besiyerinde kuvvetli, % 7.5 tuzda orta, % 10 tuz derişiminde de 2C kodlu izolat hariç zayıf da olsa gelişme gözlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir *Lactobacillus* türü de *Lactobacillus plantarum* (L2-1) kültürü olup, bu ticari suş WISBY Starter Cultures and Media (Niebüll) firmasından temin edildiğinden dolayı morfolojik, kültürel ve biyokimyasal özellikleri tespit edilmemiştir.

## 4.2. 2002-2003 dönemi (1. yıl) sonuçları

### 4.2.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları

2002-2003 döneminde temin edilen ve denemelerde kullanılan hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Denemede kullanılan zeytinlerin meyve boyutları ortalama olarak 14.4-20.4 mm, çekirdek boyutları ise 8.2-15.3 mm olarak ölçülmüştür. Şahin ve ark.(2000), Gemlik zeytini için meyve boyutlarını 15.8-20.8 mm, olarak belirtmişler. Elde edilen değerler araştırmacıların belirttiği değerlere yakınlık göstermiştir.

**Çizelge 4.4.** Gemlik çeşidi zeytin örneklerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Meyve boyu (mm)	20.40
Meyve çapı (mm)	14.40
Çekirdek boyu (mm)	15.30
Çekirdek çapı (mm)	8.20
Kg'da meyve sayısı	356
Et/çekirdek oranı	4.60
İndirgen şeker (% g/100g)	2.85
Yağ oranı (kurumaddede, % g/100g)	51.40
Protein (Nx6.25) içeriği (% g/100g)	2.63
Kurumadde (% g/100g)	59.51
Kül (% g/100g)	2.12
Oleuropein (Absorbans)	0.40

Özay ve Borcaklı (1996) ile Şahin ve ark. (2000) Gemlik zeytini için kilogramda meyve sayısını sırasıyla 318 ve 304 adet olarak belirtmişlerdir. Bu değerler Çizelge 4.4'de belirtilen değerden düşüktür. Bu durumun da meyve boyutlarında olduğu gibi yetiştirme koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Hammaddenin et/çekirdek oranı 4.6 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Şahin ve ark. (2000), Gemlik zeytini için bu değeri 4.8 olarak bildirmişlerdir. Deney bulguları araştırmacıların belirttiği değerden yüksek olup, meyve boyutunun küçük olmasına karşın et oranının fazla olduğunu göstermektedir.

Hammaddenin indirgen şeker içeriği 2.85 g/100g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.4). Özay ve Borcaklı (1996) zeytin örnekleri için bu değeri %4.62, Şahin ve ark.(2000) ise %1.74 olarak belirtmişlerdir. Deneme bulguları Şahin ve ark.(2000)'na göre yüksek, Özay ve Borcaklı (1996)'ya göre düşük bulunmuştur.

Zeytinlerin yağ içeriği kurumaddede %51.4, protein içeriği ise %2.63 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Özay ve Borcaklı (1996) yağ içeriğini kurumadde üzerinden %42.63, protein içeriğini ise %2.38 olarak belirtmişlerdir. Şahin ve ark. (2000) ise yağ içeriğini yağ ağırlık üzerinden %35.1, protein içeriğini ise %2.28 olarak saptamışlardır. Denemede elde edilen bulgulara göre kullanılan hammaddenin yağ ve

protein içeriği diğer araştırcıların Gemlik eşidi zeytin için belirttiği değerlerden yüksek bulunmuştur.

zay ve Borcaklı (1996) nem ve kl değerlerini sırasıyla %35.58 ve %1.6 olarak, şahin ve ark. (2000) ise %31.3 ve %1.87 olarak belirtmişlerdir. Denemede kullanılan zeytinlerin nem ve kül içeriği sırasıyla 40.59 g/100g ve 2.12 g/100g olarak tespit edilmiş (izelge 4.4), bulgular diğer araştırcılara göre yüksek değerler göstermiştir.

şahin ve ark. (2000) oleuropein içeriğini 1.1 olarak belirtmişlerdir. Deneme kapsamında elde edilen 0.400 değer (izelge 4.4) araştırcıların belirttiği değerden düşük bulunmuştur. Materyalin oleuropein içeriğinin düşük, protein içeriğinin yüksek olmasının fermentasyonun seyri açısından olumlu olacağı düşünülmektedir.

#### **4.2.2.Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve tartışması**

Yapılan tanı testleri ile belirlenen *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides* ve *Leuconostoc dextranicum* türleri ile hazırlanan kültürler fermentasyonda aşılama için kullanılmıştır. Aşılama kültürlerinin hücre sayıları izelge 4.5’de verilmiştir.

Zeytinler salamuraya alınır alınmaz kültürlerle aşılanmıştır. Fermentasyonun gerçekleştiği ortam sıcaklığı, zeytinlerin salamuraya alındığı andan, fermentasyonun sonlandığı ve zeytinlerin olgunlaştığı 63. güne kadar en düşük 10 C, en yüksek 12 C olacak şekilde seyretmiştir. Denemede kullanılan starter kültürlerin aşılama oranları izelge 3.3’de verilmiştir. Panagou ve ark. (2003)’da aşılamada taşıyıcı ortam olarak MRS sıvı besiyeri kullanmışlar ve fermentasyonun gerçekleştiği ortam sıcaklığını 25 C’de sürekli olarak sabit tutmuşlardır. Araştırcılar  $10^8$  kob/ml hücre populasyonuna sahip bir günlük genç kültürden 20 l hacimli fermentasyon kaplarına, aşılama sonrası kaptaki başlangıç populasyonu  $10^3$ - $10^4$  kob/ml olacak şekilde aşılama işlemine gerçekleştirmişlerdir. Fakat bölgemizde zeytin hasadının kış aylarına rastlaması ve dolayısıyla fermentasyonun gerçekleştirileceği ortam sıcaklıklarının oldukça düşük olması dolayısıyla deneme 10-12 C ortam sıcaklığında gerçekleşmiştir. Fermentasyon ortamının sıcaklığının düşük olması, buna bağlı olarak başlangıçtaki asitlik artışının düşük düzeylerde seyretmesi sebebiyle fermentasyonun 21. gününde ikinci bir bakteri aşılaması gerçekleştirilmiştir.



**Çizelge 4.5.** Aşılana bakteri kültürlerinin başlangıç popülasyonları

<i>Kültür kodu</i>	<i>Aşılama popülasyonu (kob/ml)</i>	
	<i>I. Aşılama</i>	<i>II. Aşılama</i>
L1	$3.6 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$
L2	$9.8 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$
L3	$1.7 \times 10^7$	$5.4 \times 10^7$
L4	$9.9 \times 10^7$	$3.8 \times 10^8$

Starter olarak seçilen tüm laktik asit bakterileri heterofermentatif olmasına rağmen % 7 tuz derişimine sahip salamurada 10-12 °C’de 63. gün gibi kısa sayılabilecek fermentasyon süresinde asitlik 0.75 g/100 ml değerine ulaşmıştır. Salamuralardaki toplam asit değişimi (% , g laktik asit/100 ml) Şekil 4.1.’de gösterilmiştir.

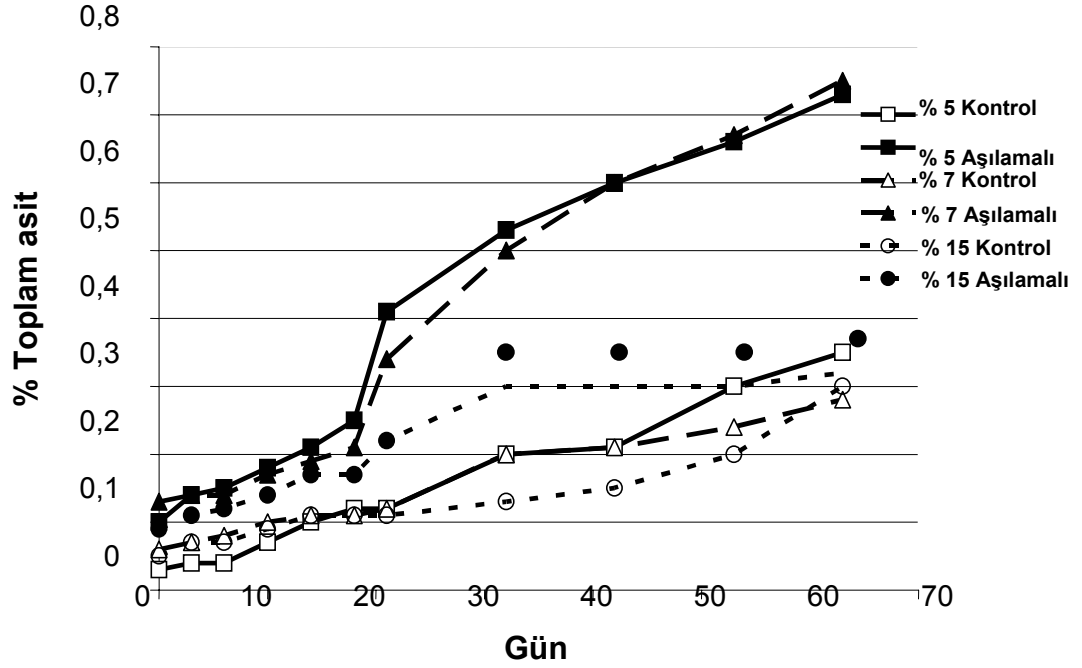
Tuz derişiminin asitlik oluşumu üzerine etkisi ise Çizelge.4.6’da özetlenmiştir. Salamuralarda mikrobiyel faaliyet sonucu ulaşılan en yüksek asitlik değeri % 7 tuz derişiminde 0.75 g/100 ml’dir. Tuz derişimi % 5 ve % 7 olan salamuralarda laktik asit bakterisi faaliyeti sonucu asitlik oluşumu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.01$ ). Fakat % 5 tuzlu salamurada laktik asit bakterisi yanında maya gelişimi de gözlenmiştir.

Çizelge 4.6’dan da anlaşıldığı gibi starter ilavesi hem % 5 hem de % 7 tuzlu salamurada artan laktik asit oluşumuna sebep olmuş (Panagou et al., 2003; Duran Quintana et al., 1999), % 15 tuzlu salamurada ise düşük sıcaklık yanında yüksek tuz derişiminin de etkisi ile aynı etki gözlenmemiştir.

**Çizelge 4.6.** Tuz derişiminin salamuralarda laktik asit oluşumu üzerine etkisi

<i>Muamele no</i>	<i>Deneme kodu</i>	<i>Toplam asit ortalamaları (% , g/100ml)</i>
1	% 5 (Kontrol)	0.347±0.050 b
2	% 5 Aşılama	0.733±0.058 a
3	% 7 (Kontrol)	0.277±0.030 b
4	% 7 Aşılama	0.750±0.061 a
5	% 15 (Kontrol)	0.297±0.015 b
6	% 15 Aşılama	0.323±0.032 b

*Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir ( $p<0.01$ ).*



**Şekil 4.1.** Fermentasyon sırasında salamuralardaki toplam asit değişimi.

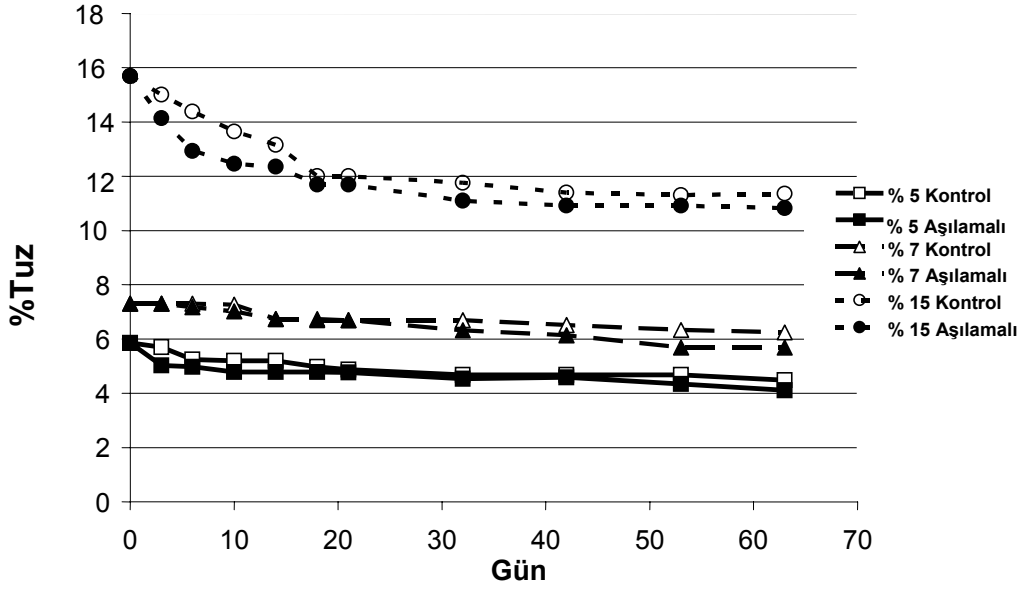
Vega Leal Sanchez ve ark.(2003)'da yaptıkları çalışma ile tuz derişiminin fermentasyon üzerine etkisinin çok önemli olduğunu, özellikle başlangıçtaki tuz derişiminin düşük tutulması gerektiğini belirtmişlerdir.

Fermentasyon sırasında salamuralardaki tuz derişimi (% , g/100 ml) Çizelge 4.7. ve Şekil 4.2.'de görülmektedir. Salamuranın tuz derişimi mikrobiyel gelişmeyi kontrol ederek, fermentasyon sürecini etkilemektedir. Fermentasyon sırasında tuz miktarı % 5 tuzlu salamuralarda 5.85-4.10 g/100 ml, % 7 tuzlu salamuralarda 7.31-5.68 g/100 ml ve %15 tuzlu salamuralarda ise 15.7-10.82 g/100 ml arasında derişmiştir. Fermentasyon süresince salamuralara tuz ilave edilmemiştir.

Fermentasyonun 63. günü sonunda zeytinlerin acılığı azalmış ve tüketim olgunluğuna gelmiştir.

#### 4.2.3. Fermentasyon sonunda ürünlerin kimyasal analiz sonuçları

Fermentasyon sonunda elde edilen ürünlere ait fiziko-kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.8.'de özetlenmiştir. Zeytinlerin kurumadde içerikleri  $52.26 \pm 0.56$  -  $57.55 \pm 0.35$



**Şekil 4.2.** Fermentasyon sırasında salamuralardaki tuz (g/100 ml) değişimi.

g/100 g arasında değişmiş, en düşük kurumadde içeriği %5 tuzlu aşılmalı örnekte, en yüksek kurumadde ise % 15 tuzlu aşılmalı örnekte saptanmıştır (Çizelge 4.8). Kılıç ve Çakır (1989) örneklerinin kurumadde içeriğini 46.1-52.50 g/100 g, Korukluoğlu (1992) 58.21-59.33 g/100 g, Özay ve Borcaklı (1996) 49.2-50.42 g/100 g, Garrido Fernandez ve ark. (1997) 39.66 g/100 g, Piga ve ark. (2001) ise 42.65-46.93 g/100 g olarak belirtmişlerdir. Deneme örneklerinin kurumadde içerikleri Korukluoğlu (1992)'na göre düşük, diğer tüm araştırmacıların belirttiği değerlere göre yüksek bulunmuştur.

Zeytinlerin kül içerikleri  $2.30 \pm 0.10$  g/100 g ile  $5.06 \pm 0.11$  g/100 g arasında değişmiştir. En yüksek değer %15 tuzlu kontrol grubunda, en düşük değer ise % 5 tuzlu aşılmalı denemelerde rastlanmıştır. Çizelge 4.8.'den de görülebileceği gibi, % 7 ve % 15 tuzlu denemelerin kontrol grupları ile muameleleri arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur ( $p < 0.01$ ). % 5 tuzlu örneklerde ise kontrol ile aşılama uygulaması aynı gruba dahil olmuştur. Korukluoğlu (1992) örneklerinin kül içeriklerini 1.35-1.53 g/100 g, Özay ve Borcaklı (1996) ise 2.41 g/100 g ile 4.70 g/100 g arasında belirtmişlerdir. % 5 ve % 7 tuzlu deneme örnekleri araştırmacıların belirttiği değer aralığında kalmış, % 15 tuzlu deneme örnekleri ise yüksek tuz içeriğine bağlı olarak belirtilen değerlerin üzerinde bulunmuştur.

Zeytinlerin protein içerikleri,  $2.01 \pm 0.1$ g/100 g ile  $2.35 \pm 0.18$  g/100 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.8). En düşük değer % 5 tuzlu kontrol grubunda, en yüksek değer

**Çizelge 4.7.** Fermentasyon sırasında salamuralardaki ortalama NaCl (g/100 ml) değişimi

Örnek kodu	GÜN										
	0	3	6	10	14	18	21	32	42	53	63
5 % (Kontrol)	5.85	5.70	5.25	5.19	5.19	4.9	4.87	4.68	4.68	4.68	4.48
5 % Aşılama	5.85	5.02	4.97	4.78	4.78	4.8	4.76	4.53	4.58	4.34	4.10
7 % (Kontrol)	7.31	7.31	7.31	7.27	6.73	6.7	6.7	6.70	6.61	6.33	6.24
7 % Aşılama	7.31	7.31	7.17	7.02	6.73	6.7	6.7	6.32	6.14	5.68	5.68
15 % (Kontrol)	15.7	15.01	14.39	13.65	13.16	12.0	12.0	11.7	11.40	11.31	11.36
15 % Aşılama	15.7	14.14	12.94	12.46	12.36	11.7	11.7	11.1	10.92	10.92	10.82

**Çizelge 4.8.** Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları

Örnek kodu	Kurumadde (g/100g)	Kül (g/100g)	Protein (g/100g)	Yağ (kurumaddede) (g/100g)	İndirgen şeker (g/100g)	Tuz (g/100g)	Toplam asitlik (g/100g)	Oleuropein (Assorbans)
% 5 (K)	54.65±1.10a**	2.42±0.06b**	2.01±0.10b**	27.77±5.95ab**	1.33±0.02a**	1.54±0.15c**	0.41±0.01c**	0.081±0.005 a**
% 5 (A)	52.26±0.56a**	2.30±0.10b**	2.35±0.18a**	22.72±5.89b**	1.30±0.14ab**	1.55±0.16c**	0.65±0.03a**	0.043±0.005b**
% 7 (K)	54.12±0.79a**	2.94±0.16ab**	2.12±0.08ab**	25.46±1.07ab**	1.21±0.06abc**	2.34±0.19b**	0.58±0.04b**	0.058±0.005b**
% 7 (A)	53.61±1.57a**	2.68±0.03b**	2.17±0.07ab**	24.17±5.08ab**	1.01±0.07c**	2.52±0.19b**	0.70±0.02a**	0.054±0.005b**
% 15 (K)	55.78±1.09a**	5.06±0.11a**	2.12±0.11ab**	26.87±4.91ab**	1.19±0.15abc**	4.63±0.09a**	0.53±0.01b**	0.063±0.005ab**
% 15 (A)	57.55±0.35a**	3.70±2.32ab**	2.16±0.08ab**	35.31±1.78a**	1.09±0.05bc**	4.60±0.08a**	0.53±0.00b**	0.081±0.005ab**

Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki olarak farklılığı göstermektedir. \*\*, Farklılıklar Duncan testine göre %1 düzeyinde önemlidir.

ise %5 tuzlu aşılmalı denemede saptanmıştır. Diğer muamelelerin protein içerikleri bu aralıkta kalmış ve birbirlerine yakın değerler göstermişlerdir. Kılıç ve Çakır (1989), olgunlaşmış ürünlerin protein içeriklerini 1.13g/100 g ile 1.43 g/100 g arasında saptamışlardır. Özay ve Borcaklı (1996) ise 1.76 g/100 g ile 1.95 g/100 g aralığını belirtmişlerdir. Piga ve ark. (2001)'na göre ise protein içerikleri 0.92 g/100 g ile 1.44 g/100 g arasında değişmiştir. Örneklerin tamamının protein içeriği diğer araştırmacıların belirttiklerinden yüksek bulunmuştur. İklim ve yetiştirilme koşullarının etkisi ile hammaddenin protein içeriğinin yüksek olmasının bu duruma sebep olduğu düşünülmektedir. % 5 tuzlu salamuralı muameleler hariç tüm denemelerde, kontrol grupları ile muameleler arasında istatistiksel anlamda fark bulunmamıştır ( $p>0.01$ ).

Zeytinlerin yağ içerikleri  $22.72\pm 5.89$  g/100 g ile  $35.31\pm 1.78$  g/100 g arasında değişmiştir. En yüksek değer % 15 tuzlu aşılama uygulamasında, en düşük değer ise % 5 tuzlu aşılmalı denemede elde edilmiştir (Çizelge 4.8). Bu aralıktaki diğer denemeler birbirlerine yakın değerler göstermiş ve aralarında istatistiksel anlamda fark bulunmamıştır ( $p>0.01$ ). Kılıç ve Çakır (1989), yağ içeriğini en düşük 23.32 g/100 g, en yüksek ise 33.93 g/100 g olarak belirtmişlerdir. Denemede elde edilen sonuçlar araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiştir.

İndirgen şeker içerikleri açısından örnekler incelendiğinde en düşük ( $1.01\pm 0.07$  g/100 g) değeri % 7 tuzlu aşılmalı deneme, en yüksek değeri ise ( $1.33\pm 0.02$  g/100 g) % 5 tuzlu kontrol grubu göstermiştir (Çizelge 4.8). Korukluoğlu (1992) indirgen şeker içeriğini 2.80-3.02 g/100 g olarak belirtmiştir. Tüm örneklerin indirgen şeker içeriği araştırmacının belirttiği değerlerden düşük bulunmuştur. % 7 tuzlu aşılmalı muamelenin indirgen şeker içeriğinin en düşük olmasının, en yüksek asitliğe dolayısıyla laktik asit bakterisi aktivitesine sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı kültür kullanımının örneklerin indirgen şeker içerikleri üzerine etkisinin % 1 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür.

Deneme örneklerinin tuz içeriği  $1.54\pm 0.15$  g/100 g ile  $4.63\pm 0.09$  g/100 g arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.8). En yüksek tuz içeriği % 15 tuzlu kontrol grubunda, en düşük tuz içeriği ise % 5 tuzlu kontrol grubunda saptanmıştır. Tüm muamelelerin tuz içerikleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.01$ ). Kılıç ve Çakır (1989) tuz miktarını 3.32 g/100g ile 4.66 g/100g arasında vermişlerdir.

Deneme örneklerinin çoğu bu aralığın alt sınırının da altında kalmış, sadece % 15 tuzlu örneklerde üst sınıra yakın değerler belirlenmiştir.

Toplam asitlik düzeyleri açısından örnekler incelendiğinde, en düşük değer % 5 tuzlu kontrol grubunda ( $0.41 \pm 0.01$  g/100 g), en yüksek değer ( $0.70 \pm 0.02$  g/100 g) ise % 7 tuzlu aşılmalı denemede elde edilmiştir. Çizelge 4.8'den de görüldüğü gibi, % 15 tuzlu örnekler hariç diğerlerinin tümünde kontrol grupları ile aşılmalı denemeler arasında farkın istatistiksel anlamda önemli olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.01$ ). Bu durumun % 15 gibi yüksek tuz derişiminde fermentasyon gerçekleşmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

### **4.3. 2003-2004 dönemi (2. yıl) sonuçları**

#### **4.3.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları**

2003-2004 döneminde alınan ve denemelerde kullanılan hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.9'da verilmiştir.

2003-2004 ürün yılında kullanılan hammaddenin boyutları ortalama olarak 15.1-19.3 mm, çekirdek boyutları ise 8.3-14.4 mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.9). 2002-2003 sezonunda kullanılan hammaddenin meyve boyutları ortalama 14.4-20.4 mm, çekirdek boyutları ise ortalama 8.2-15.3 mm olarak belirlendiği yukarıda dikkate alındığında; Bu dönemde kullanılan hammaddenin bir sezon önceki örneklere ait değerler ile Şahin ve ark. (2000)'nın verdiği değerlere az-çok yakınlık gösterdiği söylenebilir.

İkinci deneme yılı zeytinleri kilogramda dane sayısı 338 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Özay ve Borcaklı (1996) ile Şahin ve ark. (2000) ise Gemlik zeytini için kilogram dane sayısını sırasıyla 318 ve 304 adet olarak belirtmişlerdir. Bu dönem zeytinin kilogramdaki dane sayısı önceki sezon kullanılan hammaddeye göre yüksek, fakat diğer araştırmacıların verilerine göre düşük bulunmuştur.

Materyal olarak kullanılan zeytinin et/çekirdek oranı 4.2 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.9). Bu değer Şahin ve ark. (2000)'nın Gemlik zeytini için bildirdiği değerden ve bir önceki dönem kullanılan hammaddeden düşük olduğu görülmüştür.

Hammaddenin indirgen şeker içeriği 2.86 g/100 g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.9). Özay ve Borcaklı (1996) bu değeri % 4.62, Şahin ve ark. (2000) ise % 1.74 olarak

**Çizelge 4.9.** 2003-2004 sezonunda kullanılan Gemlik çeşidi hammaddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Meyve boyu (mm)	19.30
Meyve çapı (mm)	15.10
Çekirdek boyu (mm)	14.40
Çekirdek çapı (mm)	8.30
Kg'da dane sayısı	338
Et/çekirdek oranı	4.21
İndirgen şeker (% g/100g)	2.86
Yağ oranı (kurumaddede, % g/100g)	53.11
Protein (Nx6.25) içeriği (% g/100g)	2.00
Kurumadde (% g/100g)	59.51
Kül (% g/100g)	2.12
Oleuropein (Absorbans)	0.41

belirtmişlerdir. Deneme bulgularının Şahin ve ark. (2000)'na göre yüksek, Özay ve Borcaklı (1996)'ya göre ise düşük olduğu, buna karşın önceki deneme yılında kullanılan hammadde ile aynı değere sahip olduğu saptanmıştır.

Örneğin yağ içeriği kurumaddede % 53.1, protein içeriği ise % 2.00 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Özay ve Borcaklı (1996) örneklerinin yağ içeriğini kurumadde üzerinden % 42.63, protein içeriğini ise % 2.38 olarak belirtmişlerdir. Şahin ve ark. (2000) ise yağ içeriğini yağ ağırlık üzerinden % 35.1, protein içeriğini ise % 2.28 olarak saptamışlardır. Denemede elde edilen bulgulara göre kullanılan hammaddenin yağ içeriği diğer araştırmacıların Gemlik çeşidi zeytin için belirttiği değerlerden yüksek olmasına rağmen protein içeriğinin düşük olduğu görülmüştür.

Özay ve Borcaklı (1996) nem ve kül değerlerini sırasıyla % 35.58 ve % 1.6 olarak, Şahin ve ark. (2000) ise % 31.3 ve % 1.87 olarak belirtmişlerdir. Denemede kullanılan hammaddenin nem ve kül içeriği sırasıyla 40.59 g/100 g ve 2.12 g/100 g olarak belirlenmiş (Çizelge 4.9) ve bu araştırmacılara göre yükseklik göstermiştir.

Şahin ve ark. (2000) örneklerinin oleuropein içeriğini 1.1 olarak belirtmişlerdir. Bu değer deneme kapsamında elde edilen bulgulardan (0.414) yüksektir (Çizelge 4.9).

#### 4.3.2. Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve tartışması

Denemede aşılama kültürü olarak *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris* ve *Leuconostoc paramesenteroides* kullanılmıştır. 2002-2003 sezonunda deneme kapsamında bulunan *Leuconostoc dextranicum* dekstran oluşturma yeteneğinden dolayı üründe sünmeye neden olmuş ve bu nedenle ikinci yılda deneme kapsamına alınmamıştır. 2002-2003 dönemi deneme sonuçları en yüksek toplam asitlik düzeyine mikrobiyel açıdan güvenli bir şekilde % 7 tuz içeren salamuralarda ulaşıldığını göstermiştir. Bu veriler ışığında tüm denemelerde % 7 tuz derişimi kullanılmış, uygulanan deneme deseni Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Bakteri kültürlerine ait aşılama populasyonları Çizelge 4.10'da belirtilmiştir.

**Çizelge 4.10.** Bakteri kültürlerine ait aşılama populasyonları

<i>Kültür kodu</i>	<i>Kültür adı</i>	<i>Aşılama populasyonu (kob/ml)</i>
L1	<i>Lactobacillus brevis</i>	5,2 x10 <sup>7</sup>
L2	<i>Leuconostoc cremoris</i>	7,8 x10 <sup>7</sup>
L3	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	1,04x10 <sup>7</sup>

Fermentasyon ilk döneminde ortam sıcaklığı sabit kalmış, fakat fermentasyonun 85. gününden sonra yükselmeye başlamıştır. Fermentasyon sırasında meydana gelen sıcaklık değişimleri Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. 85. günden sonra sıcaklığın yükselmesi ile fermentasyon hız kazanmıştır (Şekil.4.3).

Fermentasyon süresince salamuralardaki asit ve tuz değişimleri sırasıyla Çizelge 4.12-4.13 ve Şekil 4.3-4.4'de verilmiştir. Fermentasyon sonucunda salamuralarda meydana gelen laktik asit düzeylerine ait varyans analizi ve % 5 düzeyinde Duncan testine ait sonuçlar Çizelge 4.11'de özetlenmiştir.

Çizelge.4.12'den de anlaşılacağı üzere denemeler arasında en yüksek asitlik değerleri % 1 güven aralığında, % 0.81 olarak, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris* ve *Leuconostoc paramesenteroides* kültürlerinin karışık olarak kullanıldığı denemede elde edilmiştir. Bu sonuç 2002-2003 sezonu bulguları ile paralellik göstermiştir. Yapılan denemeler sonucunda % 1 güven aralığında L1-L2-L3, L2 ve kontrol grubu dışındaki denemeler arasındaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır. L2-L3 karışık kültürü ile L1 kültürünün kullanıldığı denemelerde % 0.74, L1-L3 karışık kültürünün denendiği denemede ise % 0.73 toplam asit seviyesine ulaşılmıştır. 2002-



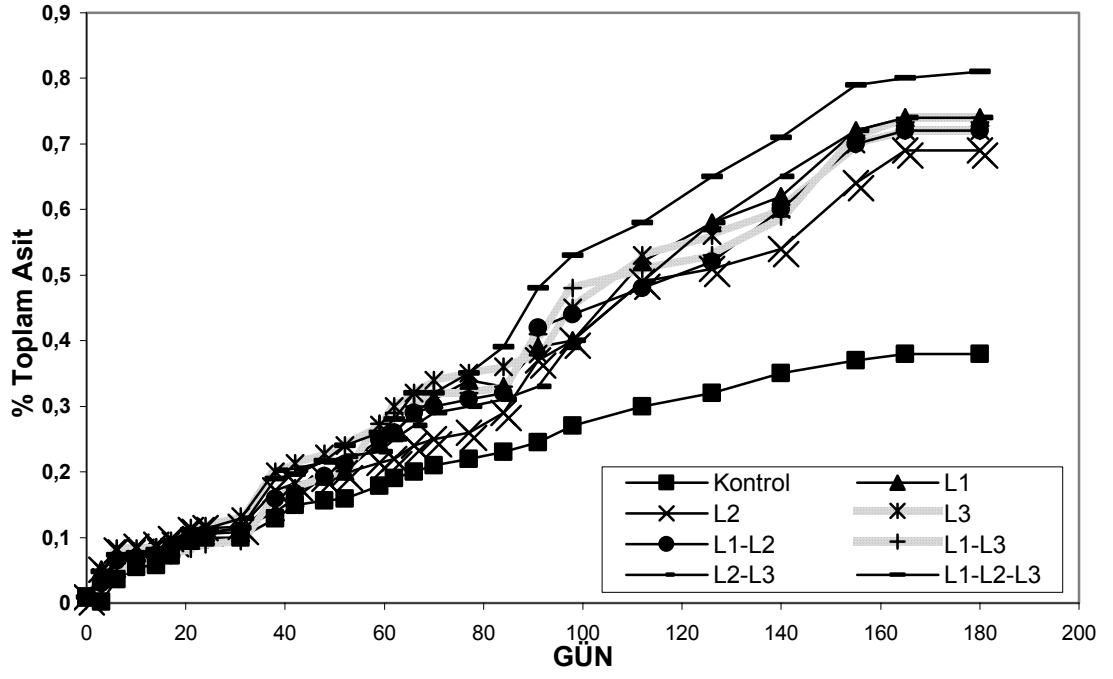
**Çizelge 4.11.** Fermentasyon sırasında meydana gelen sıcaklık değişimleri

Fermentasyon Dönemi (Gün)	Sıcaklık (°C)
0-85	En düşük:8°C, En yüksek: 12°C
85-180	En düşük:12°C

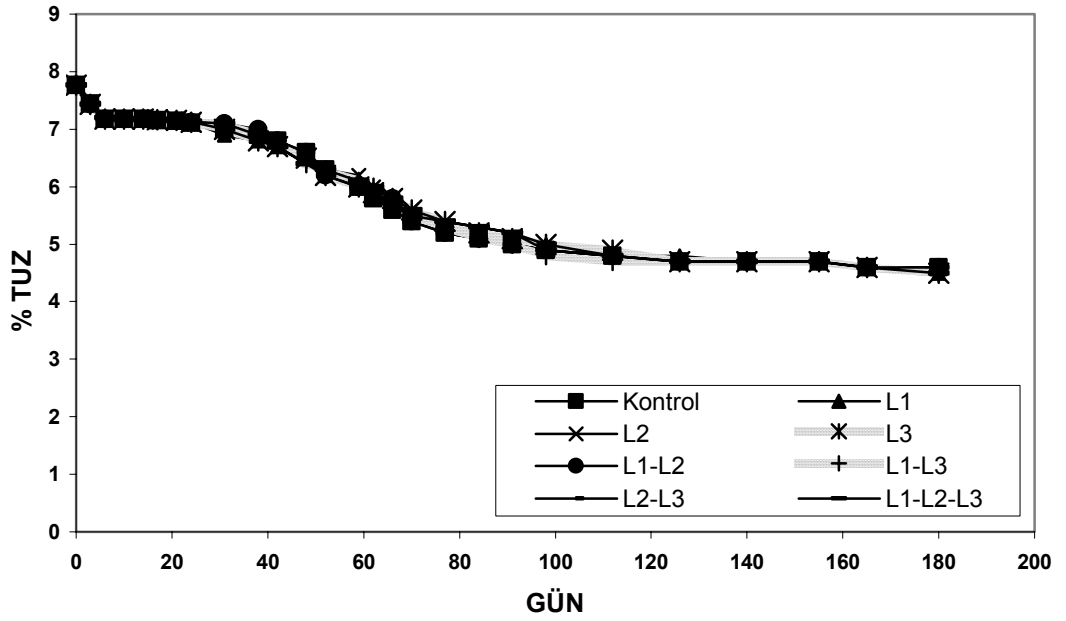
**Çizelge 4.12.** L1, L2, L3 bakterileri ile muamele edilmiş zeytinlerde fermentasyon sonucunda oluşan laktik asit düzeylerinin Duncan testi ile % 1 düzeyinde gruplandırılması

Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	Toplam asitlik ortalamaları (%)
L1-L2-L3	0,81±0.02 a
L2-L3	0,74±0.03 ab
L1	0,74±0.02 ab
L1-L3	0,73±0.02 ab
L3	0,72±0.02 ab
L1-L2	0,72±0.02 ab
L2	0,69±0.02 b
KONTROL	0,38±0.02 c

2003 döneminde, salamuranın toplam asit düzeyinin % 0.75 seviyesine ulaşması için 63 gün sürmesine rağmen, bu yıl denemelerinde aynı seviyeye 180 gün sonunda ulaşılmıştır. Salamuralardaki tuz seviyesi aynı olmasına rağmen asitlik seviyesinin geç yükselmesi ortam sıcaklığının önceki yıla göre az da olsa düşük seyretmesine, aşılama kültürlerin santrifüjlenmesi ve taşıyıcı olarak MRS yerine fizyolojik su kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. L3 ve L1-L2 kültürlerinin kullanıldığı denemelerde % 0.72, L2 kültürünün kullanıldığı denemede ise % 0.69 toplam asit değerine ulaşılmıştır. Kontrol grubu en düşük düzeyde (% 0.38) kalmıştır.



Şekil 4.3. Fermentasyon sırasında salamuralarda toplam asit değişimi.



Şekil 4.4. Fermentasyon sırasında salamuralarda tuz değişimi.

Sonuç olarak daha önce yapılmış çalışmalarda da gözlemlendiği gibi fermentasyon için uygun başlangıç koşulları hazırlandığında laktik starter kullanımının zeytin salamuralarında toplam asit düzeyini artırdığı saptanmıştır (Vega Leal-Sanchez ve ark., 2003). De Castro ark. (2002), fermentasyonun 28. gününde % 0.70, Vega Leal-Sanchez ve ark. (2003) ise fermentasyonun 62. gününde % 0.7-0.9 laktik asit düzeyine ulaşmışlardır. Bu bulgular ışığında bu yılın sonuçları, ilk yılın bulguları yanında De Castro ve ark. (2002) ve Vega Leal-Sanchez ve ark. (2003)'nın sonuçları ile çelişki oluşturmaktadır. Bu durumun yukarıda da belirtildiği gibi kültürlerin santrifüjlenmesi, aşılama taşıyıcı olarak fizyolojik su kullanılması ve fermentasyon sıcaklığının diğer denemelerde uygulananlara göre düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Vega Leal Sanchez ve ark. (2003), aşılama taşıyıcı olarak MRS kullanımının salamura kullanımına göre asitlik üzerine etkisinin % 5 düzeyinde önemli olduğunu belirtmişlerdir. Toplam asit düzeyi fermentasyonun 160. gününden itibaren hemen hemen sabit seviyede kalmıştır. 85. günden itibaren gözlenen asitlik artışı ise sıcaklığın yükselmesi ile açıklanabilir.

Salamuraların tuz düzeyi fermentasyonun 126. gününe kadar düşüş göstermiş, izleyen sürede % 4.5-4.7 seviyesinde seyretmiştir (Şekil 4.4).

#### **4.3.3. Fermentasyon sonunda elde edilen ürünlerin kimyasal analiz sonuçları**

2003-2004 yılı denemelerinde fermentasyon sonunda elde edilen ürünlere ait kimyasal analiz ve varyans analizi sonuçları Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelgeden de görüldüğü gibi fermentasyon sonunda elde edilen örneklerin protein içerikleri  $1.90 \pm 0.03$  g/100 g ile  $2.13 \pm 0.09$  g/100 g arasında değişmiştir. En yüksek değer kontrol grubunda, en düşük değer ise L2-L3 kültürü ile aşılama denemede ortaya çıkmıştır. Kullanılan kültürün, ürünün protein içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuş, en düşük ve en yüksek protein içeriğine sahip ürünler dışında kalanlar arasında farkın önemsiz olduğu saptanmıştır. Kılıç ve Çakır (1989) salamura zeytinlerde protein miktarını 1.13 g/100 g ile 1.43 g/100 g arasında, Özay ve Borcaklı (1996), 1.76 g/100 g ile 1.95 g/100 g arasında, Piga ve ark.(2001) ise 0.92 g/100 g ile 1.44 g/100 g arasında vermişlerdir. Araştırmacıların belirttiği değerler, deneme ürünleri arasında en az protein içeriğine sahip olandan bile

düşük seviyede kalmıştır. Elde edilen bulgular bir önceki yıl deneme bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Fermentasyonu tamamlanan zeytinlerin yağ içerikleri  $19.67 \pm 2.34$  g/100 g ile  $35.21 \pm 2.34$  g/100 g arasında değişiklik göstermiştir. En düşük değer L2-L3 denemesinde, en yüksek değer ise L1-L3 denemesinde saptanmıştır (Çizelge 4.13). Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin yağ içerikleri arasındaki farkın % 1 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. L1, L2 ve L1-L2-L3 ile K ve L3 denemeleri arasında istatistiksel anlamda farklılık görülmemiştir. Kılıç ve Çakır (1989), kuru ağırlık üzerinden yağ içeriğini  $44.73$  g/100 g ile  $67.08$  g/100 g arasında bulmuşlardır. Garrido Fernandez ve ark.(1997) ise salamuralı fermentasyon yöntemi ile işlenmiş zeytinlerin olgunlaştıktan sonraki yağ içeriğini kuru ağırlık üzerinden % 38.82 olarak belirlemiştir. Denemede elde edilen sonuçlar, araştırmacıların belirttiği değerlerden düşük, önceki yıl denemelerinden elde edilen sonuçlara ise yakın bulunmuştur.

Ürünlerin indirgen şeker içeriği incelendiğinde en düşük değer L1-L2 denemesinde ( $0.10 \pm 0.00$  g/100 g), en yüksek değer ise L2-L3 denemesinde ( $0.75 \pm 0.03$  g/100 g) saptanmıştır (Çizelge 4.13). Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin indirgen şeker içeriği üzerine etkisi % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kontrol, L1, L3 ve L1-L2-L3 ile L2 ve L1-L3 muameleleri arasında ise farklılık görülmemiştir. Tüm örneklerin indirgen şeker içerikleri Korukluoğlu (1992)'nin belirttiği değerlerden ( $2.80-3.02$  g/100 g) düşük bulunmuştur.

İşlenmiş zeytinlerin oleuropein içerikleri  $0.09 \pm 0.01$  ile  $0.19 \pm 0.00$  arasında değişmiş, en düşük değer L1-L3, en yüksek değer ise L1-L2 denemesinde saptanmıştır. Farklı kültür uygulamasının örneklerin oleuropein içeriği üzerine etkisi % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 4.13'de de görülebileceği gibi L1-L2 ve kontrol grubu ile L1, L2, L3, L2-L3 ve L1-L2-L3 muameleleri arasında istatistiksel anlamda fark görülmemiştir.

Deneme zeytinlerinin kurumadde içeriği  $47.8 \pm 0.37$  g/100 g ile  $49.54 \pm 1.09$  g/100 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.13). Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin kuru madde içeriğini etkilemediği görülmüştür ( $p > 0.01$ ). Kılıç ve Çakır (1989), kurumadde içeriğini  $46.1-52.50$  g/100 g, Özay ve Borcaklı (1996)  $49.2-50.42$  g/100 g, Garrido Fernandez ve ark. (1997)  $39.66$  g/100 g, Piga ve ark. (2001) ise  $42.65-46.93$  g/100 g olarak belirtmişlerdir. Deneme örneklerinin kurumadde içerikleri Kılıç ve Çakır (1989)

**Çizelge 4.13.** Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları

<b>Muamele kodu</b>	<b>Protein (g/100g)</b>	<b>Yağ (K.m.'de g/100g)</b>	<b>İndirgen şeker (g/100g)</b>	<b>Oleuropein (g/100g)</b>	<b>Kurumadde (g/100g)</b>	<b>Kül (g/100g)</b>	<b>Toplam asitlik (g/100g)</b>	<b>Tuz (g/100g)</b>
<b>Kontrol</b>	2.13±0.09 a*	20.57±2.87bc**	0.56±0.01 ab**	0.19±0.00a**	49.54±1.09a**	3.16±0.01a**	0.37±0.00c**	2.068±0.01abc*
<b>L1</b>	2.06±0.09 ab*	26.04±2.34abc**	0.55±0.01 ab**	0.13±0.00b**	49.32±0.03a**	3.06±0.03a**	0.74±0.02ab**	2.88±0.01c*
<b>L2</b>	2.10±0.09 ab*	25.57±2.34abc**	0.44±0.01 b**	0.13±0.01b**	48.86±0.44a**	3.34±0.31a**	0.68±0.02b**	2.45±0.06e*
<b>L3</b>	2.03±0.14 ab*	22.05±2.34bc**	0.52±0.00 ab**	0.13±0.00b**	47.80±0.37a**	3.12±0.03a**	0.72±0.00ab**	3.05±0.04ab*
<b>L1-L2</b>	1.93±0.05 ab*	29.64±2.34ab**	0.10±0.00 c**	0.19±0.00a**	48.11±1.34a**	3.28±0.06a**	0.72±0.00ab**	3.14±0.02a*
<b>L1-L3</b>	1.99±0.03 ab*	35.21±2.34a**	0.43±0.05 b**	0.09±0.01c**	48.52±0.96a**	3.17±0.23a**	0.73±0.00ab**	2.67±0.01d*
<b>L2-L3</b>	1.90±0.03 b*	19.67±2.34c**	0.75±0.03 a**	0.13±0.00b**	48.64±0.46a**	3.22±0.08a**	0.74±0.00ab**	3.12±0.08a*
<b>L1-L2-L3</b>	2.05±0.06 ab*	27.78±2.34abc**	0.48±0.18 ab**	0.12±0.00b**	49.21±0.01a**	3.14±0.08a**	0.80±0.06a**	2.96±0.02bc*

**\*\***, Muameleler arasındaki fark %1 düzeyinde önemlidir, **\*** muameleler arasındaki fark %5 düzeyinde önemlidir, aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farklılıkları göstermektedir.

ile Özey ve Borcaklı (1996)'nın belirttikleri değerler arasında olmasına rağmen, Garrido Fernandez ve ark. (1997) ile Piga ve ark. (2001)'na göre yüksek bulunmuştur.

Olgunlaşmış ürünlerin kül miktarlarının  $3.06 \pm 0.03$  g/100 g ile  $3.34 \pm 0.31$  g/100 g arasında değiştiği saptanmıştır (Çizelge 4.13). Değişik kültürlerin kullanımının ürünlerin kül içeriğine etkisinin % 1 ve % 5 düzeyinde önemsiz olduğu belirlenmiştir. Tüm örneklerin kül içerikleri önceki yıl % 7 tuzlu salamurada olgunlaştırılan örneklere göre daha yüksek bulunmuştur. Özey ve Borcaklı (1996), salamura zeytinde kül miktarını 2.41 g/100 g-4.70 g/100 g olarak vermişlerdir. Deneme örneklerin kül içerikleri bu sınırlar içinde kalmasına rağmen, Garrido Fernandez ve ark. (1997) verdikleri değer (%6.88) altında kalmıştır.

Ürünlerin toplam asit değerleri  $0.37 \pm 0.00$  g/100 g ile  $0.80 \pm 0.06$  g/100 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.13). Yapılan varyans analizi sonucunda farklı aşılama kültürü kullanımının örneklerin asit miktarı üzerine etkisinin % 1 düzeyinde önemli olduğu görülmüştür. En yüksek değer L1-L2-L3 aşılama denemede, en düşük değer ise kontrol grubunda saptanmıştır. Piga ve ark. (2001), örneklerinin toplam asit seviyelerini 0.091-0.101 g/100g olarak bildirmişlerdir. Araştırma zeytinlerinin tümünün asit düzeyi araştırmacıların belirttiği değerlerin üzerinde bulunmuştur. L1, L3, L1-L2, L1-L3 ve L2-L3 aşılama arasında istatistiksel anlamda fark bulunmamıştır. Fermentasyon ürünlerinin tuz içerikleri  $2.45 \pm 0.06$ - $3.14 \pm 0.02$  g/100 g arasında değişmiştir. Varyans analizi sonucunda kültür kullanımının örneklerin tuz içeriği üzerine % 5 düzeyinde etkili olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.13).

#### **4.4. 2004-2005 dönemi sonuçları (3. yıl)**

##### **4.4.1. Hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları**

2004-2005 sezonunda temin edilen ve denemelerde kullanılan hammaddeye ait fiziksel ve kimyasal analiz sonuçları Çizelge 4.14'de verilmiştir.

2004-2005 yılına ait hammaddenin meyve boyutları 15.5-21.0 mm, çekirdek boyutları ise 8.3-14.9 mm'dir (Çizelge 4.14). Araştırmanın ilk yılında meyve boyutları 14.4-20.4 mm, ikinci yılında ise 15.1-19.3 mm olarak belirlenmiştir. Buna göre her üç yılda kullanılan hammaddenin boyutları birbirlerine ve Şahin ve ark.(2000)'nın Gemlik zeytini için verdikleri değerlere yakınlık göstermiştir.

**Çizelge 4.14.** 2004-2005 sezonunda kullanılan Gemlik çeşidi hammaddenin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Meyve boyu (mm)	21.00
Meyve çapı (mm)	15.50
Çekirdek boyu (mm)	14.90
Çekirdek çapı (mm)	8.30
Kg'da dane sayısı	286
Et/çekirdek oranı	4.50
İndirgen şeker (% g/100g)	1.70
Yağ oranı (kurumaddede, % g/100g)	31.50
Protein (Nx6.25) içeriği (% g/100g)	2.25
Kurumadde (% g/100g)	54.91
Kül (% g/100g)	1.72
Oleuropein (Absorbans)	0.57

Hammaddenin kilogramda meyve sayısı 286 adet olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.14). Bu değer, önceki deneme yılının yanında, Özay ve Borcaklı (1996) ile Şahin ve ark.(2000)'nin denemelerinde kullanıkları zeytinlere göre oldukça düşüktür.

Taze zeytinin et/çekirdek oranı 4.5 olarak belirlenmiştir(Çizelge 4.14). Bu değer ikinci deneme yılı değerlerinden yüksek fakat, ilk deneme yılı değerleri ile Şahin ve ark.(2000)'nin değerlerinden düşüktür.

İndirgen şeker içeriği 1.70 g/100 g olarak saptanmıştır (Çizelge 4.14). Bu değer Şahin ve ark.(2000)'nin Gemlik zeytini için verdiği değerlere yakın olmasına rağmen, ilk iki deneme yılı verileri ile Özay ve Borcaklı (1996)'nin belirttiği değerlerden düşük bulunmuştur.

Materyalin yağ içeriği kurumaddede % 31.5 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.14). Özay ve Borcaklı (1996) Gemlik zeytini için yağ oranını kurumaddede % 42.63, Şahin ve ark.(2000) ise % 51.09 olarak vermişlerdir. Bu deneme yılında kullanılan hammaddenin yağ içeriği, hem diğer araştırmacıların belirttiği değerlere hem de önceki sezonlarda kullanılan hammaddelere göre düşük bulunmuştur.

Özay ve Borcaklı (1996) nem ve kül değerlerini sırasıyla % 35.58 ve % 1.6, Şahin ve ark.(2000) ise % 31.3 ve % 1.87 olarak saptamışlardır. Denemede kullanılan hammaddenin nem ve kül içeriği ise yine sırasıyla % 45.09 ve % 1.72 bulunmuştur (Çizelge 4.14). Taze zeytinin nem değeri bu araştırmacılara ve önceki yılların örneklerine göre yüksek değerler göstermiştir. Kül içeriği ise Özay ve Borcaklı (1996)'nin belirttiği

değerlerden yüksek, Şahin ve ark.(2000)'nin verileri ile ilk iki yıl örneklerinden düşük bulunmuştur.

Hammaddenin oleuropein değeri 0. 572 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). Önceki iki yıl ölçümlerine göre yüksek olan bu değer, Şahin ve ark.(2000)'nin belirttiği (1.1) değerden oldukça düşüktür.

#### 4.4.2.Aşılama kültürlerinin fermentasyon sonuçları, bulguları ve tartışması

Denemede kullanılan kültürlerin aşılama anındaki populasyonları Çizelge 4.15'de verilmiştir. Yapılan literatür çalışması sonucunda benzer çalışmalarda çoğunlukla tercih edilen *Lactobacillus plantarum* L2-1 (WISBY Starter Cultures and Media, Niebüll) kültürü, zeytinlerden izole edilip kullanılan kültürlerle karşılaştırmak amacıyla bu yılki deneme kapsamına alınmıştır. Aşılama taşıyıcı olarak MRS kullanılmış, kültürler santrifüjleme işlemi uygulanmamıştır. Uygulanan deneme deseni ve aşılama oranları Çizelge 3.5'de verilmiştir. Fermentasyon süresince ortam sıcaklığında meydana gelen değişimler ise Çizelge 4.16'da verilmiştir.

**Çizelge 4.15.** Bakteri kültürlerine ait aşılama populasyonları

<i>Kültür kodu</i>	<i>Kültür adı</i>	<i>Aşılama populasyonu (kob/ml)</i>
L1	<i>Lactobacillus brevis</i>	$6.8 \times 10^8$
L2	<i>Leuconostoc cremoris</i>	$6.7 \times 10^8$
L3	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	$1.04 \times 10^9$
LP	<i>Lactobacillus plantarum</i>	$1.6 \times 10^9$

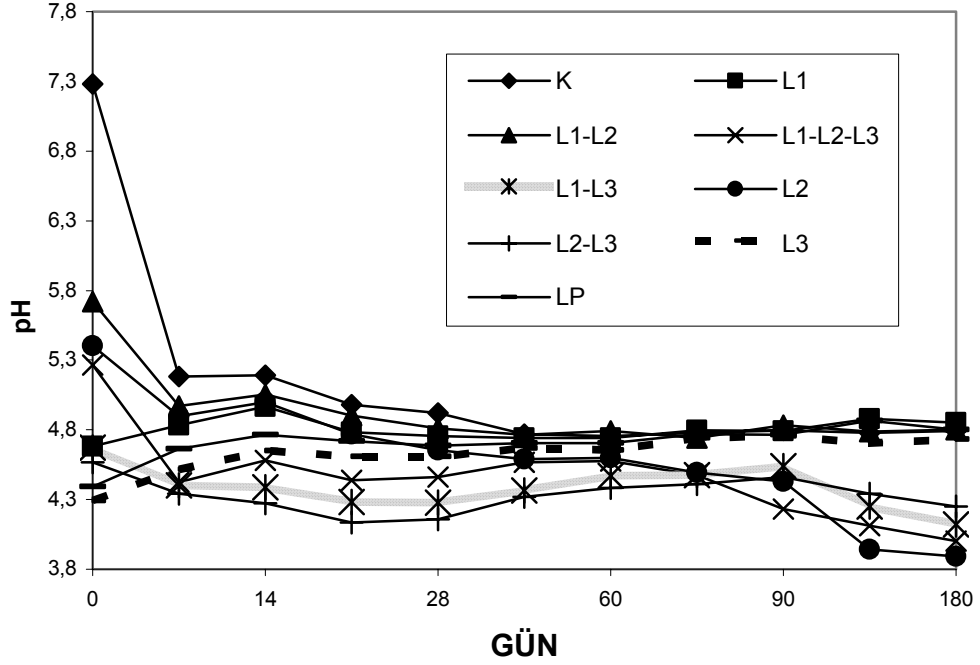
**Çizelge 4.16.** Fermentasyon döneminde sıcaklık değişimi (ortalama)

<i>Fermentasyon Dönemi (Gün)</i>	<i>Sıcaklık (°C)</i>
0-120	En düşük: 10 °C, En yüksek: 12 °C
120-180	En düşük: 12 °C

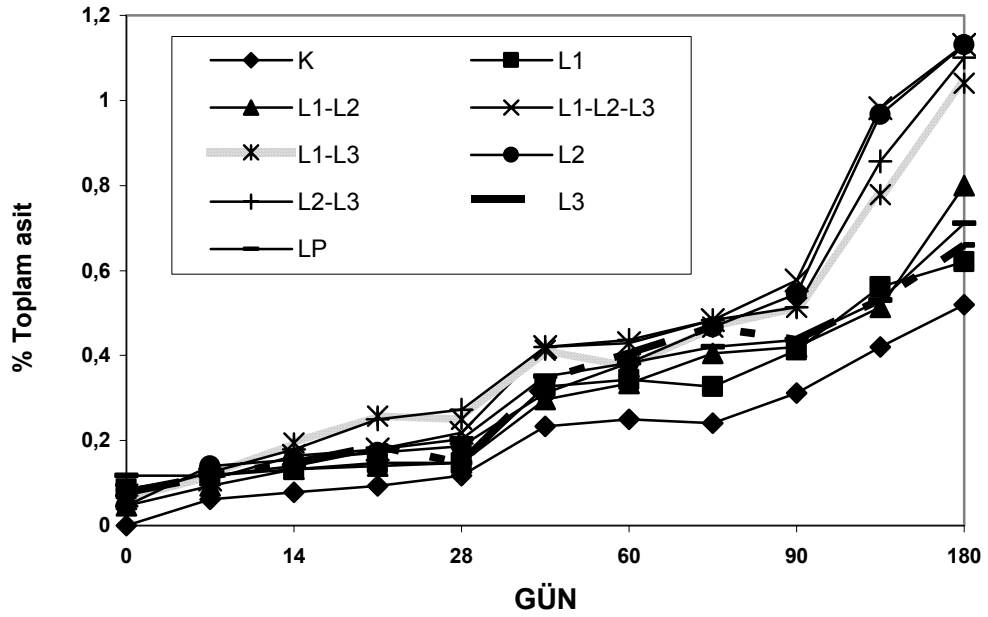
Fermentasyon sırasında ortam sıcaklığı oldukça stabil seyretmiş ve ilk 120 gün boyunca sürekli olarak en düşük:10 °C, en yüksek: 12 °C olarak ölçülmüştür. 120. günden sonra havaların ısınması ile birlikte ortam sıcaklığı da yükselmeye başlamış, en düşük sıcaklık bir süre daha sabit seyretmesine rağmen en yüksek sıcaklık değerleri



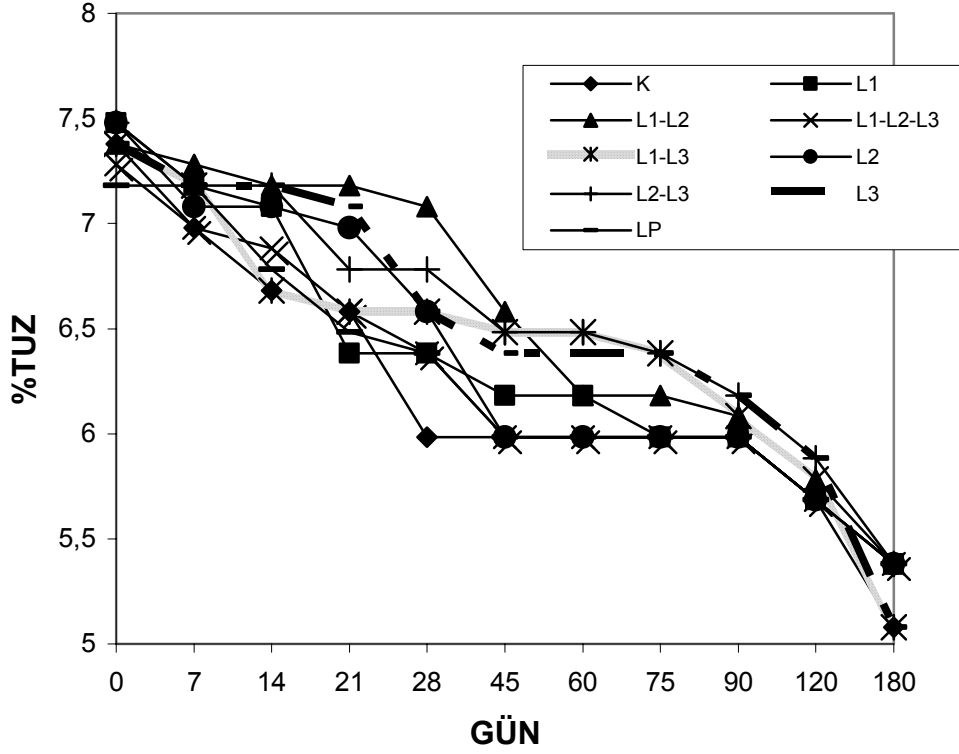
artış göstermeye başlamıştır. Fermentasyon sırasında örneklerde gözlenen pH, toplam asit ve tuz değişimleri Şekil 4.5-4.7’de verilmiştir.



Şekil 4.5. Fermentasyon sırasında salamuralarda pH değişimi.



Şekil 4.6. Fermentasyon sırasında salamuralarda toplam asit değişimi.



Şekil 4.7. Fermentasyon sırasında salamuralarda tuz değişimi.

Fermentasyon sonunda ulaşılan pH düzeyleri Duncan testi ile % 1 düzeyinde gruplandırılmış, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.17'da verilmiştir.

Çizelge 4.17. pH düzeylerinin Duncan testi ile % 1 düzeyinde gruplandırılması

Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	pH
L1	4.88±0.08 a
LP	4.86±0.10 ab
L1-L2	4.78±0.07 abc
KONTROL	4.78±0.03 abc
L3	4.70±0.01 abc
L1-L3	4.33±0.20 bcd
L2-L3	4.22±0.14 cd
L1-L2-L3	4.11±0.24 d
L2	3.94±0.08 d

Kullanılan kültürlerin, denemelerde pH değişimi üzerine etkisinin önemli olduğu görülmüştür ( $p<0.01$ ). En düşük pH değeri ( $3.94\pm 0.08$ ) L2 kültürü ile aşılanmış denemede saptanmış, onu L1-L2-L3 ( $4.11\pm 0.24$ ) karışık kültürü ile aşılanan deneme izlemiştir (Çizelge 4.17). Fermentasyonun ilk günlerinde LP, L1 ve L3 kültürü ile aşılanan denemeler hariç, tüm uygulamalarda pH düşüşü gözlenmiş, özellikle kontrol grubunda düşüşün oldukça keskin olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Kontrol grubunda pH 7.28'den 5.18'e, L2 denemesinde, 5.40'dan 4.89'a, L1-L2-L3 denemesinde ise 5.26'dan 4.42'ye düşmüştür. pH değerleri devam eden süreçte de az da olsa düşmeye devam etmiş, fermentasyonun 45. gününden itibaren ise aynı seviyede kalmıştır. Bu sonuçlar Tassou ve ark. (2002)'nin bulguları ile paralellik göstermiştir. LP, L1 ve L3 kültürleri ile aşılanan denemelerde ise pH yükselişi 14. günde durmuş, sonrasında stabil bir seyir izlemiştir.

Fermentasyon sırasında oluşan toplam asit miktarları Duncan testi ile % 1 düzeyinde gruplandırılmış elde edilen sonuçlar Çizelge 4.18'de verilmiştir.

**Çizelge 4.18.** Fermentasyon sırasında oluşan toplam asit değerlerinin Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması

Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	Toplam asit ortalamaları (%)
L1-L2-L3	$0.98\pm 0.08$ a
L2	$0.97\pm 0.08$ a
L2-L3	$0.86\pm 0.10$ a
L1-L3	$0.78\pm 0.07$ a
L1	$0.56\pm 0.08$ b
LP	$0.53\pm 0.10$ b
L3	$0.53\pm 0.08$ b
L1-L2	$0.51\pm 0.08$ b
K	$0.42\pm 0.08$ b

Kullanılan kültürlerin, denemelerde laktik asit oluşumu üzerine etkisinin önemli olduğu görülmüş ( $p<0.01$ ), L1-L2-L3, L2, L2-L3 ve L1-L3 aşılama arasındaki farkın ise önemli olmadığı bulunmuştur (Çizelge 4.18). Fermentasyonun 120. günü sonunda ulaşılan en yüksek asit değerine ( $0,98\pm 0.08$  log kob/ml) üç kültürün karışık olarak kullanıldığı uygulamada ulaşılmıştır. Bu sonuç önceki yıl denemelerinin sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Her ne kadar L1, LP, L3, L1-L2 ve K denemeleri aynı grupta yer alsalar da en düşük asit düzeyinin ( $0,42\pm 0.08$  log kob/ml) kontrol grubunda meydana

geldiği görülmüştür. Bu bulgular daha önce elde edilen deneme sonuçları ve yapılan diğer araştırmalar ile benzerlik göstermiştir (De Castro ve ark., 2002, Vega Leal-Sanchez ve ark., 2003).

Fermentasyon sonunda salamuralarda ulaşılan tuz düzeyleri Duncan testi ile % 1 ve % 5 düzeyinde test edilmiş (Çizelge 4.19), denenen kültürlerin, salamuranın tuz seviyesindeki değişim üzerinde etkisi olmadığı görülmüştür ( $p>0.05$ ). Salamuralarda tuz düzeyleri tüm uygulamalarda fermentasyon süresince düşüş göstermiştir (Şekil 4.7).

**Çizelge 4.19.** Salamuralarda tuz değişimine ait % 1 ve % 5 düzeyinde Duncan testi sonuçları

Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	% Tuz
L3	5.88±0.1 a
L1-L3	5.83±0.1 a
L2-L3	5.83±0.2 a
L1-L2	5.78±0.1 a
L1	5.68±0.0 a
L2	5.68±0.0 a
KONTROL	5.68±0.0 a
L1-L2-L3	5.68±0.0 a
LP	5.68±0.0 a

#### 4.4.3. Fermentasyon sonunda elde edilen ürünlerin kimyasal analiz sonuçları

Fermentasyon sonunda elde edilen ürünlere ait analiz sonuçları Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20’den de görüleceği gibi örneklerin protein miktarları  $1.92\pm 0.07$  g/100 g ile  $2.23\pm 0.002$  g/100 g arasında değişmiş; en düşük değer L1-L2-L3, en yüksek değer ise kontrol ve L1 uygulamalarında saptanmıştır. Değişik kültürlerin kullanımının örneklerin protein içeriği üzerine etkisinin % 5 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.20). L1-L2-L3 uygulamasının düşük protein içeriğinin, en fazla laktik asit bakterisi faaliyetinin gözlemlendiği muamele olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kılıç ve Çakır (1989) salamura zeytinlerde protein miktarlarını  $1.13$  g/100 g ile  $1.43$  g/100 g arasında, Özay ve Borcaklı (1996),  $1.76$  g/100 g ile  $1.95$  g/100 g arasında, Piga ve ark.(2001) ise  $0.92$  g/100 g ile  $1.44$  g/100 g arasında saptamışlardır. Deneme

örneklerinin protein içeriklerinin araştışıcıların belirttiği değerlerin üzerinde fakat, geçmiş iki yıl ürünlerinin seviyesinde olduğu görölmüştür.

Örneklerin yağ içerikleri  $22.69 \pm 1.59$  g/100 g ile  $30.18 \pm 1.59$  g/100 g arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4.20). En düşük değer L1 denemesinde, en yüksek değer ise L3 denemesinde saptanmıştır. Ürünlerin yağ içeriği arasındaki farkın % 1 düzeyinde önemli olduğu bulunmuştur. L1 ve L1-L2 ile K ve L1-L3 denemeleri arasında istatistiksel anlamda farklılık görölmemiştir. Kılıç ve akır (1989), kuru ağırlık üzerinden zeytinin yağ içeriğini  $44.73$  g/100 g ile  $67.08$  g/100 g arasında vermişlerdir. Garrido Fernandez ve ark. (1997) ise salamuralı fermentasyon yöntemi ile işlenmiş zeytinlerin olgunlaştıktan sonraki yağ içeriğini kuru ağırlık üzerinden % 38.82 olarak bildirmişlerdir. Denemede elde edilen sonuçlar, araştışıcıların belirttiği değerlerden düşük, ilk iki yıl denemelerinde elde edilen sonuçlara ise yakın bulunmuştur.

Örneklerin indirgen şeker içeriği incelendiğinde en düşük değer L1-L2-L3 denemesinde ( $0,13 \pm 0.00$  g/100 g), en yüksek değer ise kontrol grubunda ( $0.78 \pm 0.00$  g/100 g) saptanmıştır (Çizelge 4.20). Farklı kültürlerle aşılamanın ürünün indirgen şeker içeriği üzerine etkisi %1 düzeyinde önemli bulunmuşsa da L1, L2 ve L1-L2; L3, L2-L3 ve LP ile L1-L3 ve L1-L2-L3 aşılamaları arasında farklılık görölmemiştir. Korukluoğlu (1992) indirgen şeker içeriğini  $2.80-3.02$  g/100 g arasında belirtmiştir. Tüm örneklerin indirgen şeker içeriği bu değerlerden düşük bulunmuştur. Elde edilen bulgular 2003-2004 deneme dönemi bulgularına yakınlık göstermekle birlikte, 2002-2003 dönemi sonuçlarına göre düşük olduğu gözlenmiştir.

Örneklerin oleuropein içerikleri  $0.06 \pm 0.01$  ile  $0.16 \pm 0.001$  arasında değişmiş, en düşük değer L3, en yüksek değer ise L1 denemesinde saptanmıştır (Çizelge 4.20). Farklı kültür uygulamasının örneklerin oleuropein içeriği üzerine etkisi % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kontrol, L1-L3 ve L1-L2-L3 ile L1-L2 ve kontrol grubu ile L3, L2-L3 ve LP aşılamaları arasında istatistiksel anlamda fark görölmemiştir. Tüm örneklerin oleuropein içerikleri Korukluoğlu (1992)'na göre ( $0.134-0.254$ ) düşük bulunmuştur. Dönem bulguları önceki yıllar bulguları ile benzerlik göstermiştir.

Deneme örneklerinin kurumadde içeriği  $47.08 \pm 0.29$  g/100g ile  $49.68 \pm 1.09$  g/100g arasında değişmiştir (Çizelge 4.20). Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin kuru madde içeriğini etkilemediği görölmüştür ( $p > 0.01$ ). Kılıç ve akır (1989), kurumadde

Çizelge 4.20. Fermentasyon sonunda ürünlere ait kimyasal analiz sonuçları

Muamele kodu	Protein (g/100g)	Yağ (K.m.'de, g/100g)	İndirgen şeker (g/100g)	Oleuropein (g/100g)	Kurumadde (g/100g)	Kül (g/100g)	Toplam asitlik (g/100g)	Tuz (g/100g)
<b>Kontrol</b>	2.23±0.13 a*	26.81±1.59abcd**	0.78±0.00 a**	0.12±0.004 c**	47.99±0.84 a**	2.85±0.08 a*	0.07±0.01d**	2.48±0.05a*
<b>L1</b>	2.21±0.002 a*	22.69±1.59d**	0.54±0.00 b**	0.16±0.001 a**	48.97±0.29 a**	2.49±0.11 b*	0.46±0.00c**	2.34± 0.01b*
<b>L2</b>	2.17±0.10 ab*	28.26±1.59abc**	0.54±0.07 b**	0.15±0.001 ab**	47.08±0.29 a**	2.77±0.06 a*	0.92±0.00a**	2.35± 0.01b*
<b>L3</b>	2.00±0.06 ab*	30.18±1.59a**	0.33±0.00 c**	0.06±0.001 d**	47.85±2.08 a**	2.91±0.03 a*	0.46±0.01c**	2.32± 0.04b*
<b>L1-L2</b>	1.98±0.03 ab*	28.78±1.59abc**	0.49±0.02 b**	0.14±0.00 b**	49.25±0.25 a**	2.89±0.06 a*	0.57±0.07bc**	2.36± 0.02b*
<b>L1-L3</b>	2.16±0.12 ab*	25.65±1.59abcd**	0.19±0.00 d**	0.07±0.001 c**	47.82±1.48 a**	2.83±0.05 a*	0.71±0.14ab**	2.34± 0.03b*
<b>L2-L3</b>	1.97±0.14 ab*	25.30±1.59bcd**	0.36±0.02 c**	0.12±0.009 d**	49.68±0.22 a**	2.94±0.18 a*	0.69±0.13abc**	2.38± 0.01b*
<b>L1-L2-L3</b>	1.92±0.07 b*	29.70±1.59ab**	0.13±0.00 d**	0.07±0.002 c**	48.83±0.94 a**	2.95±0.07 a*	0.91±0.00a**	2.34± 0.01b*
<b>LP</b>	2.03±0.02 ab*	24.05±1.96cd**	0.36±0.02 c**	0.06±0.001 d**	46.99±0.88 a**	2.86±0.07 a*	0.71±0.13ab**	2.34± 0.01b*

Aynı sütündeki farklı harfler istatistiki olarak farklılığı göstermektedir. \*, Farklılıklar Duncan testine göre %5 düzeyinde önemlidir; \*\*,Farklılıklar Duncan testine göre %1 düzeyinde önemlidir.

içeriğini 46.1-52.50 g/100 g, Özay ve Borcaklı (1996) 49.2-50.42 g/100 g, Garrido Fernandez ve ark. (1997) 39.66 g/100 g, Piga ve ark. (2001) ise 42.65-46.93 g/100 g olarak vermişlerdir. Deneme örneklerinin kurumadde içerikleri Kılıç ve Çakır (1989) ile Özay ve Borcaklı (1996)'nın belirttiği aralıklar içinde olmasına rağmen, Garrido Fernandez ve ark. (1997) ile Piga ve ark. (2001)'na göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar çeşit itibarıyla normal karşılanmalıdır. Dönem sonuçları, önceki dönemlere ait bulgularla yakınlık göstermiştir.

Olgunlaşmış ürünlerin kül içeriklerinin  $2.49 \pm 0.11$  g/100 g ile  $2.95 \pm 0.07$  g/100 g arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.20). En düşük kül içeriği L1 denemesinde en yüksek kül içeriği ise L1-L2-L3 denemesinde saptanmıştır. Değişik kültürlerin kullanımının ürünlerin kül içeriğine etkisinin % 5 düzeyinde önemli olduğu belirlenmiştir, L1 denemesi dışındaki uygulamalar arasındaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır. Tüm örneklerin kül içerikleri 2002-2003 yılının % 7 tuzlu salamurada olgunlaştırılan ürünlerine yakın fakat 2003-2004 yılı örneklerine göre yüksek bulunmuştur.

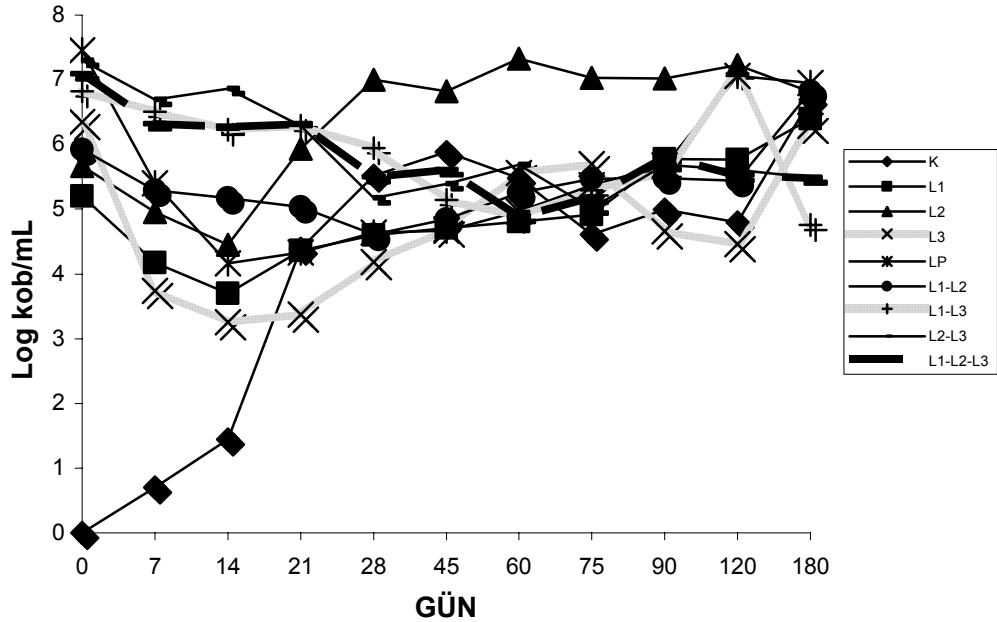
Örneklerin toplam asit seviyeleri  $0.07 \pm 0.01$  g/100 g ile  $0.92 \pm 0.00$  g/100 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.20). Yapılan varyans analizi sonucunda farklı aşılama kültürü kullanımının örneklerin asit düzeyi üzerine %1 düzeyinde etkili olduğu görülmüştür. En yüksek değer L2 ve L1-L2-L3 aşılama gruplarında, en düşük değer ise kontrol grubunda saptanmıştır. Piga ve ark. (2001), salamura zeytinde toplam asit seviyelerini 0.091-0.101 g/100 g olarak bildirmişlerdir. Kontrol grubu hariç muamelelerin tümünün asit düzeyi araştırmacıların belirttiği değerlerin üzerinde bulunmuştur. L2 ve L1-L2-L3 muamelelerinin asitlik düzeyi, önceki yıl aynı kültürler ile yapılan muamelelerin fermentasyon sonunda saptanan asit düzeyleri ile aynı düzeyde saptanmıştır. Bu durum farklı aşılama metodu ve ortamı kullanılmasına rağmen aynı değere ulaşılması açısından dikkat çekicidir.

Fermentasyon ürünlerinin tuz içerikleri  $2.32 \pm 0.04$ - $2.48 \pm 0.05$  g/100 g arasında değişmiştir (Çizelge 4.20). Varyans analizi sonucunda kültür kullanımının örneklerin tuz içeriği üzerine % 5 düzeyinde etkili olduğu görülmüş, kontrol grubu dışındaki tüm muameleler arasında ise fark olmadığı saptanmıştır. Denemelerin tuz içerikleri önceki yılın %7 tuzlu salamuralı örneklerinin tuz içerikleri ile aynı bulunmuştur. Kılıç ve Çakır

(1989) tuz içeriğinin 3.31-4.36 g/100 g arasında olduğunu belirtmişlerdir. Deneme örneklerinin tamamının tuz içeriği bu aralığın alt sınırının da altında kalmıştır.

#### 4.4.4. Mikrobiyolojik analiz sonuçları

Fermentasyon süresince örneklerde gelişen mikrobiyel faaliyetler, toplam mezofil aerob bakteri, laktik asit bakterisi, maya-küf, Enterobakteri ve *Pseudomonas* sayımları ile izlenmiştir. Fermentasyon süresince yapılan mikrobiyolojik analizlerin sonunda hiçbir örnekte Enterobakteri ve *Pseudomonas* türlerine rastlanmamıştır. Tüm örneklere ait laktik asit bakterisi sayım sonuçlarına varyans analizi ve Duncan testi uygulanması ile; muameleler arasında fermentasyon süresi sonunda ulaşılan laktik asit bakterisi sayısı açısından farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Tüm örneklere ait laktik asit bakterisi sayım sonuçları Şekil 4.8’de verilmiştir. Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan laktik asit bakterisi sayısının Duncan testi ile % 5 düzeyinde gruplandırılması ile elde edilen sonuçlar Çizelge. 4.21’de gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Tüm örneklere ait laktik asit bakterisi sayım sonuçları



**Çizelge 4.21.** Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan laktik asit bakterisi sayısının Duncan testi ile % 5 düzeyinde gruplandırılması

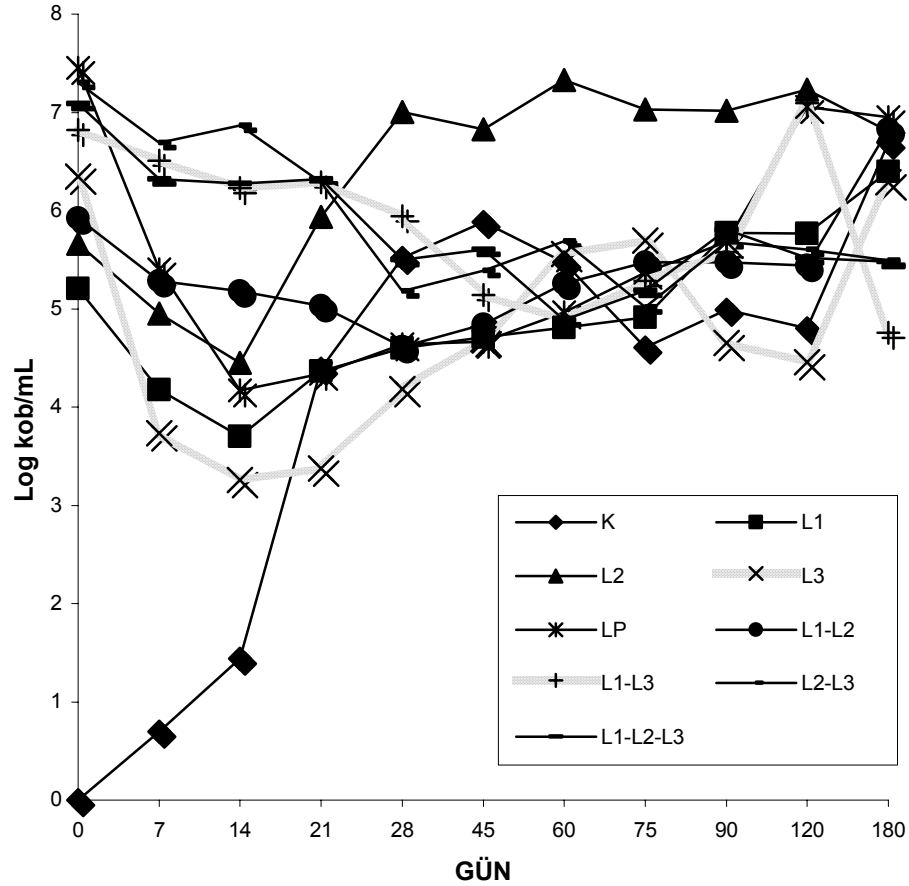
Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	Laktik asit bakterisi sayısı (Log kob/ml)
L1-L3	6.78±0.17 a
L1-L2-L3	6.71±0.22 a
L1-L2	6.71±0.22 a
LP	6.71±0.22 a
L2	6.57±0.33 a
L2-L3	6.56±0.28 ab
K	6.51±0.31 ab
L3	6.27±0.06 ab
L1	5.75±0.38 b

Fermentasyon sonunda en yüksek laktik asit bakterisi sayısına L1-L3 denemesinde, en düşük laktik asit bakterisi sayısına ise L1 denemesinde ulaşılmıştır (Çizelge 4.21). Duncan testi sonucunda L1-L3, L1-L2-L3, L1-L2, LP ve L2 aşılmalı deneyler arasında farklılığın önemli olmadığı görülmüştür ( $p < 0.05$ ). Erişilen en yüksek laktik asit bakterisi sayısı  $6.78 \pm 0.17$  log kob/ml olarak belirlenmiştir. Bu değer fermentasyon sonunda De Castro ve ark. (2002), Tassou ve ark. (2002) ile Panagou ve ark. (2003)'nın ulaştığı değerlerden düşük kalmıştır. Bu durumun diğer çalışmalarda salamuraya glikoz vb. fermentasyonu kolaylaştıracak maddelerin ilavesi ve daha yüksek sıcaklık uygulanmasından kaynaklandığı söylenebilir. Bunun yanında L2-L3 denemesinde  $6.56 \pm 0.28$  log kob/ml, L3 denemesinde  $6.27 \pm 0.06$  log kob/ml, L1 denemesinde ise  $5.75 \pm 0.38$  log kob/ml seviyelerine erişilmiştir. Kontrol grubunda ise laktik asit bakterisi sayısı  $6.51 \pm 0.31$  log kob/ml olarak saptanmıştır. L1 ve L3 denemelerinin laktik asit bakterisi seviyesi kontrol grubuna göre daha düşük kalmıştır. Bu durumun ise aşılamanın kültürlerin salamura ortamı ve düşük sıcaklık derecelerine uyum sağlayamamaları, kontrol grubu florasında doğal olarak bulunan laktik asit bakterilerinin ise daha kolay uyum göstermelerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kontrol grubu hariç, muamelelerin tümünde laktik asit bakterisi sayısı aşılamaı takiben değişen oranlarda düşüş göstermiş fakat sonrasında tekrar yükselmeye başlamıştır (Şekil 4.8). Bu düşüşün kültürlerin ortama uyum süreci sırasında

gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Kontrol grubunda ise laktik asit bakterisi sayısı fermentasyonun 45. gününe kadar hızlı bir yükselme göstermiş, fakat takip eden dönemde inişli çıkışlı bir süreç sonunda  $6.51 \pm 0.31$  log kob/ml seviyesinde kalmıştır (Şekil 4.8).

Fermentasyon süresince tüm muamelelerde görülen toplam mezofil aerob bakteri sayısı değişimi Şekil 4.9’da görülmektedir. Tüm örneklerle ait toplam mezofil aerob bakteri (TMAB) sayımı sonuçlarına varyans analizi ve Duncan testi uygulanması ile; muameleler arasında fermentasyon süresi sonunda ulaşılan toplam mezofil aerob bakteri sayısı açısından farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0.05$ ). Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan toplam mezofil aerob bakteri sayısının Duncan testi ile %5 düzeyinde gruplandırılması Çizelge 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.9. Tüm örneklerle ait toplam mezofil aerob bakteri sayım sonuçları.

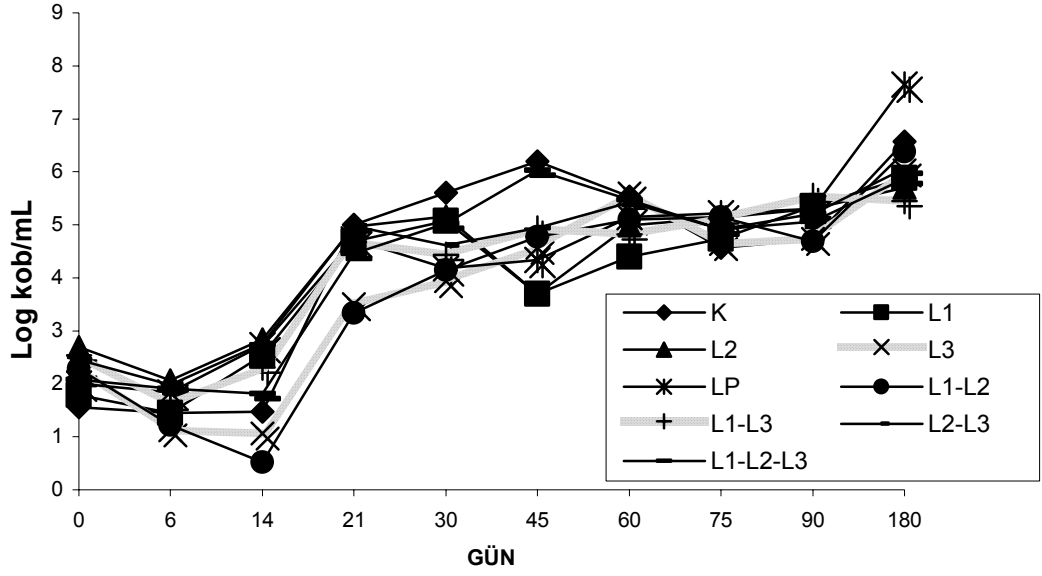
**Çizelge 4.22.** Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan toplam mezofil aerob bakteri sayısının Duncan testi ile % 5 düzeyinde gruplandırılması

Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	Toplam mezofil aerob bakteri sayısı (Log kob/ml)
LP	6.71 ±0.38 a
L1-L2	6.64 ±0.41 ab
K	6.63 ±0.32 ab
L1-L2-L3	6.59 ±0.18 ab
L2	6.57 ±0.33 ab
L2-L3	6.46 ±0.29 ab
L3	5.94 ±0.27 ab
L1-L3	5.87 ±0.25 ab
L1	5.75 ±0.38 b

Fermentasyon sonunda en yüksek TMAB sayısına LP uygulamasında ( $6.71 \pm 0.38$  log kob/ml), en düşük değere ise L1 uygulamasında ( $5.75 \pm 0.38$  log kob/ml) rastlanmıştır. LP uygulamasını L1-L2, K, L1-L2-L3, L2, L2-L3, L3 ve L1-L3 uygulamaları takip etmiştir. Bu denemelerin arasında TMAB sayısı açısından farkın önemsiz olduğu görülmüştür ( $p > 0.05$ ). En düşük TMAB sayısının saptandığı L1 denemesi bu açıdan kontrol grubunun dahi gerisinde kalmıştır.

Kontrol grubu hariç, muamelelerin tümünde TMAB sayısı aşlamayı takiben değişen oranlarda düşüş göstermiş fakat sonrasında tekrar yükselmeye başlamıştır. Kontrol grubunda ise TMAB sayısı fermentasyonun 21. gününe kadar hızlı bir yükselme göstermiş, takip eden dönemde ise daha yavaş şekilde yükselmeye devam etmiş ve  $6.63 \pm 0.32$  log kob/ml seviyesine ulaşmıştır.

Tüm örneklerde görülen maya-küf sayısı değişimi Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu örneklere ait maya sayımı sonuçlarına varyans analizi ve Duncan testi uygulanmış; muameleler arasında fermentasyon süresi sonunda ulaşılan maya sayılarında saptanan farklılığın önemli olduğu saptanmıştır ( $p < 0.01$ ). Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan maya sayısının Duncan testi ile %1 düzeyinde gruplandırılması Çizelge 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Tüm örneklerle ait maya-küf sayım sonuçları.

Çizelge 4.23. Tüm muamelelerde fermentasyon süresi sonunda ulaşılan maya sayısının Duncan testi ile % 1 düzeyinde gruplandırılması

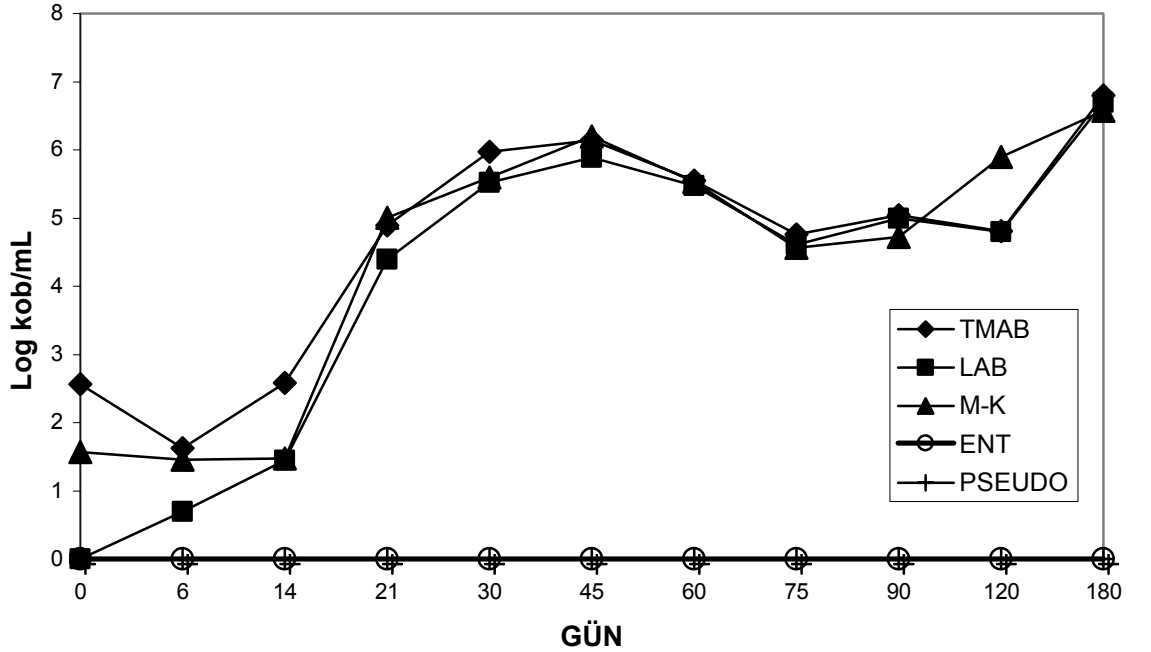
Muameleler (Laktik Asit Bakterileri)	Maya sayısı (Log kob/ml)
LP	7.64±0.27 a
L1-L2	6.19±0.27 b
K	6.07±0.27 b
L2-L3	6.03±0.33 b
L1	5.87±0.27 b
L3	5.79±0.27 b
L1-L2-L3	5.76±0.27 b
L2	5.61±0.27 b
L1-L3	5.61±0.24 b

Fermentasyon sonunda en yüksek maya sayısı (7.64 log kob/ml) LP kültürü ile aşıl原因 denemede saptanmıştır (Çizelge 4.23). Diğer tüm muameleler arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı görülmüştür ( $p>0.01$ ). LP kültürü dışındaki tüm kültürlerle aşıl原因 denemelerde maya gelişimi üzerine etkinin aynı olması, bu kültürlerin doğal salamura ortamından izole edilmeleri, dolayısıyla aynı orijine sahip

olmayan LP kültürüne göre ortama daha iyi uyum sağlayarak maya gelişimini önlediklerini düşündürmektedir.

Fermentasyon başlangıcında tüm örneklerde maya sayısı düşme göstermiş, fakat izleyen dönemde hepsinde artış gözlenmiştir (Şekil 4.10). Her ne kadar LP muamelesi dışındaki tüm muameleler arasında fark görülmesi de en düşük maya gelişimi L2 ( $5.61 \pm 0.27$  log kob/ml) ve L1-L3 ( $5.61 \pm 0.24$  log kob/ml) muamelelerinde saptanmıştır. Fermentasyon süresince yapılan ekimler sonucunda hiçbir küf gelişmesi olmamıştır.

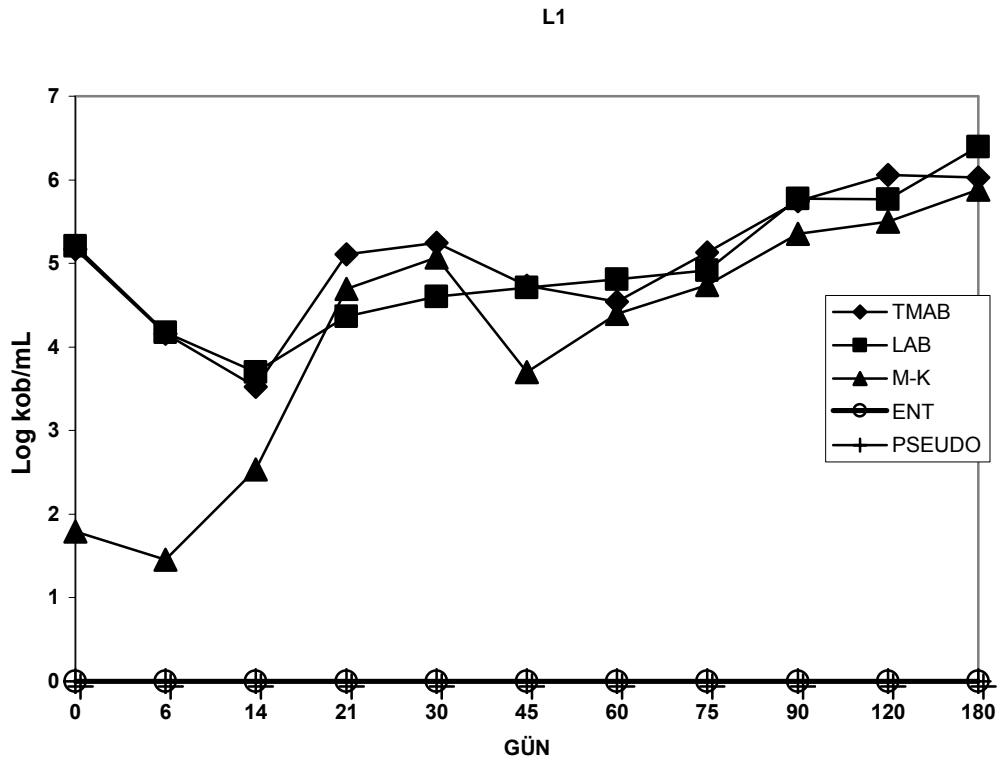
Şekil 4.11’de fermentasyon sırasında kontrol grubunda saptanan mikrobiyel değişiklikler gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB sayısında fermentasyonun başında düşüş gözlenmesine rağmen, takip eden süreçte artış görülmüştür. Maya sayısı ise fermentasyonun başında sabit kalmasına rağmen ilerleyen süreçte hızlı bir artış göstermiştir. Fermentasyon başlangıcında laktik asit bakterisi saptanmamasına rağmen fermentasyonun devamında bu grup mikroorganizmalar da hızlı bir artış göstermiştir. Fermentasyonun 21. gününden sonra TMAB, laktik asit bakterisi ve maya gelişimi birlikte seyretmiştir. Fermentasyon sonunda TMAB sayısı 6.8 log kob/ml, laktik asit bakterisi sayısı 6.7 log kob/ml, maya sayısı ise 6.6 log kob/ml düzeylerine ulaşmıştır.



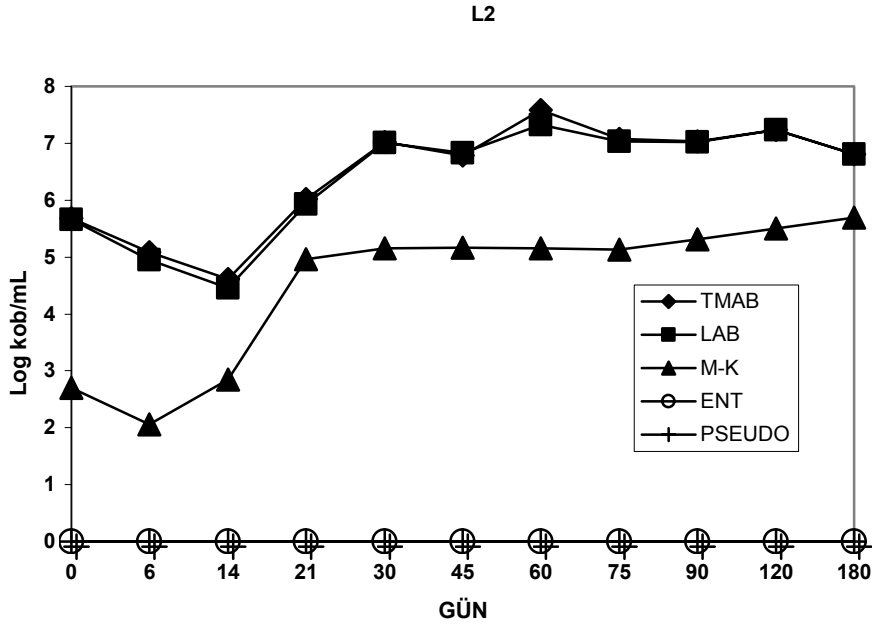
Şekil 4.11. Kontrol grubunun fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.

Fermentasyon sırasında L1 muamelesinde saptanan mikrobiyel değişiklikler Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB sayısında başında düşüş gözlenmesine rağmen takip eden süreçte artış görülmüştür. Maya sayısında da fermentasyon başlangıcında bir düşüş gözlenmiş fakat, sonrasında hızlı bir artış belirlenmiştir. Laktik asit bakterisi sayısında da 5.2 log kob/ml seviyelerinden düşüş gözlenmiş, ardından tekrar yükselişle fermentasyon sonunda 6.4 log kob/ml seviyelerine ulaşılmıştır. Fermentasyon sonunda TMAB sayısı 6.03 log kob/ml, maya sayısı ise 5.9 log kob/ml düzeylerine ulaşmıştır.

Fermentasyon dönemi boyunca L2 kültürü kullanılarak yapılan denemede meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.13’de belirtilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB ve laktik asit bakterisi gelişimi fermentasyonun başından itibaren paralel seyretmiş, başlangıçta gözlenen düşüşün ardından yükseliş saptanmış 45. günden



Şekil 4.12. L1 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.

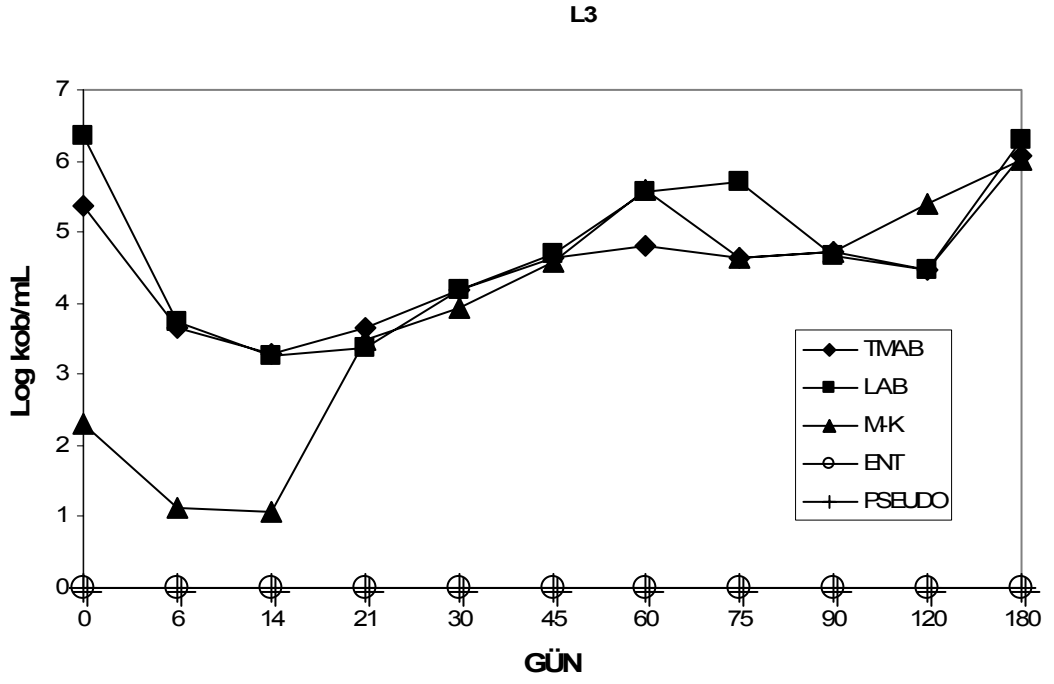


Şekil 4.13. L2 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.

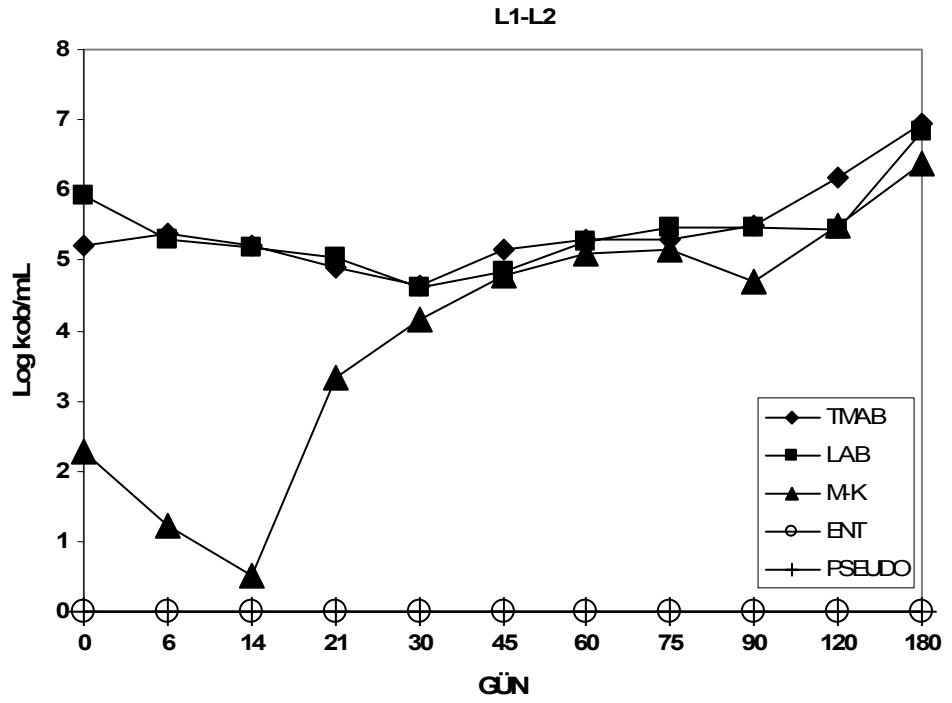
İtibaren de stabil bir seyir izlemiştir. Fermentasyon sonunda laktik asit bakterisi sayısı ile TMAB sayısı 6.8 log kob/ml olarak saptanmıştır. Fermentasyon başlangıcında maya sayısında da bir düşüş gözlenmiş, fakat sonrasında hızlı bir artış belirlenmiştir. Fermentasyonun 21. gününden itibaren ise maya gelişimi hemen hemen durağan bir seyir izlemiş ve 5.69 log kob/ml düzeyine ulaşmıştır.

Şekil 4.14'de fermentasyon sırasında L3 kültürü ile aşılana muamelede saptanan mikrobiyel değişiklikler gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. Fermentasyon başlangıcında TMAB, laktik asit bakterisi ve maya sayılarında düşüş gözlenmiş, takip eden süreçte ise her üç grubun da yükselme eğilimine girdiği saptanmıştır. Fermentasyonun 21 ile 45. günü arasında üç grubun gelişimi eşit düzeyde seyretmiş, sonrasında laktik asit bakterisi sayısı düşmüş, maya ve TMAB sayısı artışını sürdürmüştür. Fermentasyon bitiminde her üç grubun sayısı da yükselmiş, 6 log kob/ml seviyelerine ulaşmıştır. Fermentasyonun 120. gününden itibaren gözlenen laktik asit bakterisi ve TMAB sayısı artışı yükselen sıcaklığa bağlanabilir.

Fermentasyon dönemi boyunca L1-L2 kültürü kullanılarak yapılan denemede meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.15'de belirtilmiştir. Fermentasyon



Şekil 4.14. L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel gelişmeler.



Şekil 4.15. L1-L2 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.



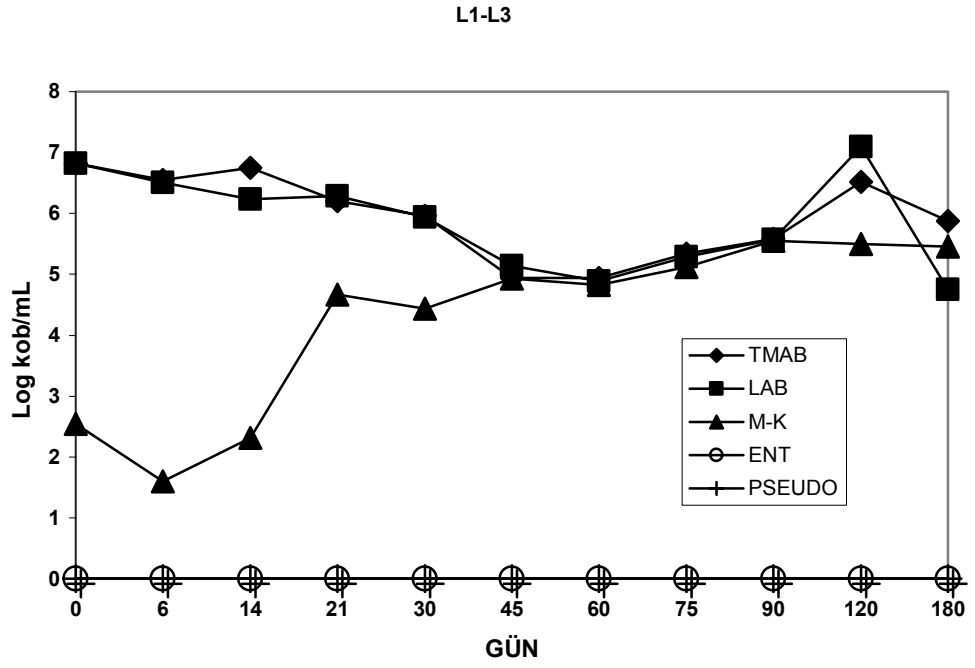
süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB ve laktik asit bakterisi gelişimi fermentasyonun ilk haftasından itibaren paralel seyretmiş, başlangıçta düşüş gözlenen maya gelişimi de fermentasyonun 14. gününden sonra artmaya başlamıştır. Fermentasyon sonunda TMAB sayısı 6.9 log kob/ml, laktik asit bakterisi sayısı 6.8 log kob/ml ve maya sayısı 6.4 log kob/ml seviyelerine ulaşmıştır.

Fermentasyon dönemi boyunca L1-L3 kültürü kullanılarak yapılan denemede meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.16'da gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB ve laktik asit bakterisi sayısı fermentasyon başından itibaren azalmaya başlamış, fermentasyonun 45. gününe dek düşmeye devam etmiştir. Sonrasında az da olsa yükselme gözlenmiş, fakat başlangıç popülasyonlarına ulaşamamıştır. Fermentasyon sonunda TMAB sayısı 5.87 log kob/ml, laktik asit bakterisi sayısı ise 4.75 log kob/ml olarak saptanmıştır. Maya sayısı fermentasyonun başlangıcından 6. güne kadar azalmış, takip eden süreçte ise sürekli artış göstermiştir. Başlangıçta 2.54 log kob/ml olan maya seviyesi fermentasyon sonunda 5.45 log kob/ml düzeyine ulaşmıştır.

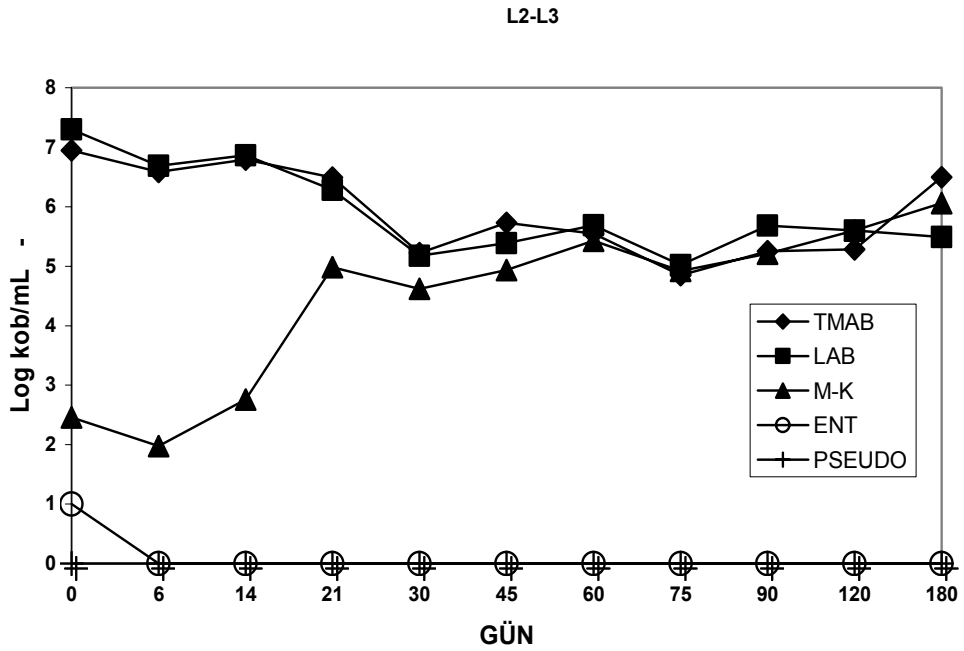
L2-L3 kültürü kullanılarak yapılan denemede meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.17'de gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamış, TMAB, laktik asit bakterisi ve maya gelişimi L1-L3 denemesine benzer şekilde seyretmiştir.

L1-L2-L3 kültürü kullanılarak yapılan denemede meydana gelen mikrobiyolojik değişimler Şekil 4.18.'de gösterilmiştir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamış, TMAB, laktik asit bakterisi ve maya gelişimi L1-L3 ve L2-L3 denemelerine benzer şekilde seyretmiştir.

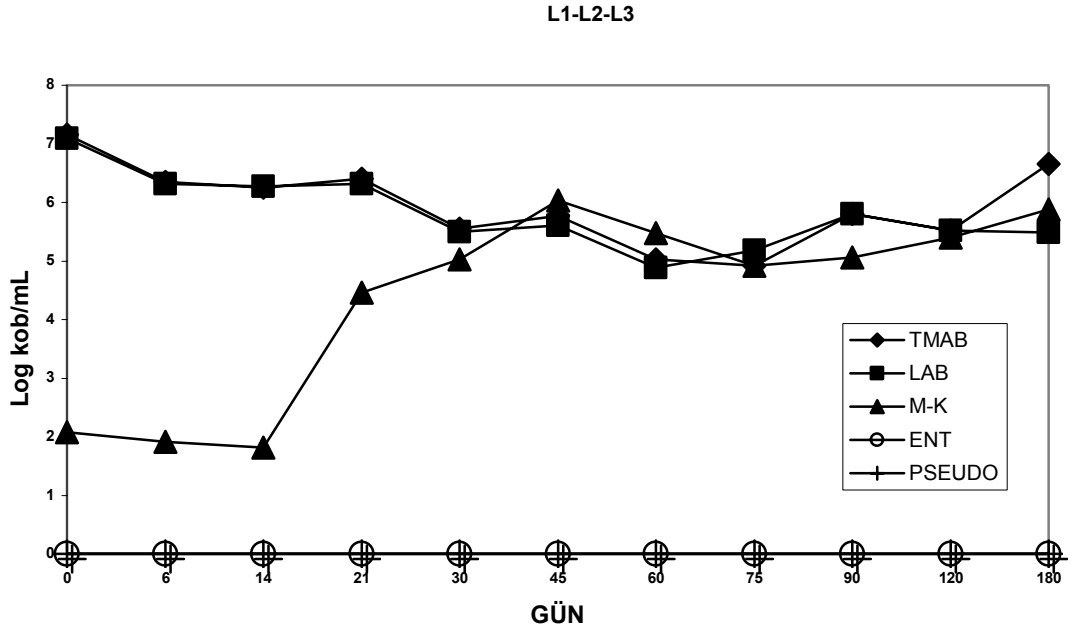
LP kültürünün kullanıldığı muamelenin fermentasyonu sırasında gözlenen mikrobiyel değişiklikler Şekil 4.19'da görülmektedir. Fermentasyon süresince yapılan ekimlerde *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. TMAB ve laktik asit bakterisi sayısı fermentasyonun başlangıcında 7.4 log kob/ml iken fermentasyon süresince düşüş göstermiş ve fermentasyon sonunda 6.95 log kob/ml değerine ulaşmıştır. Maya sayısı fermentasyon başında 2 log kob/ml düzeyinde iken fermentasyon süresince artış göstermiş ve 7.64 log kob/ml seviyesine ulaşmıştır.



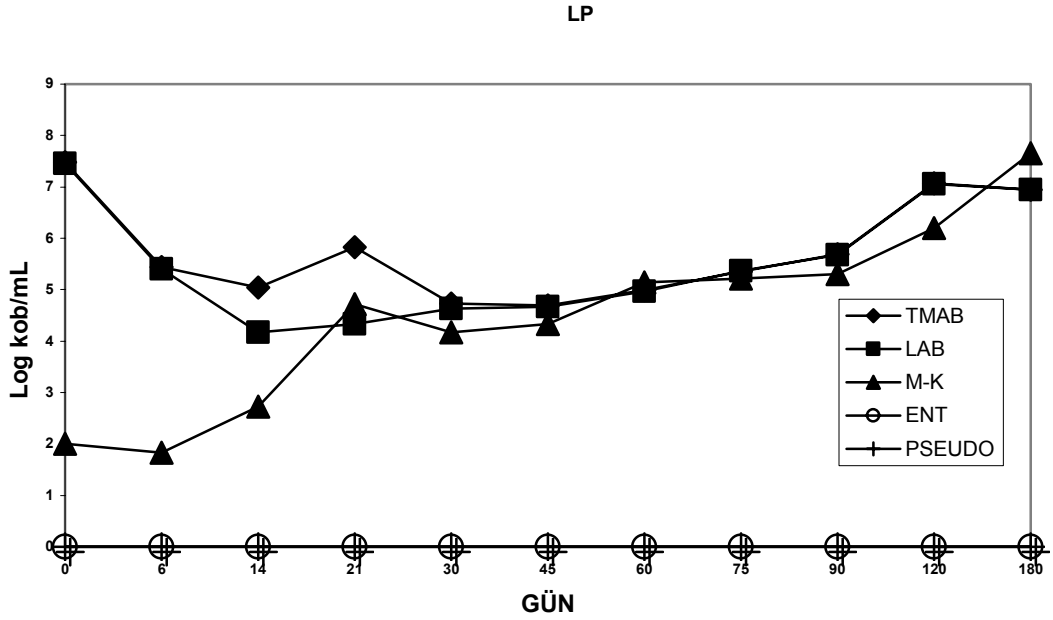
Şekil 4.16. L1-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyolojik değişiklikler.



Şekil 4.17. L2-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.



Şekil 4.18. L1-L2-L3 muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.



Şekil 4.19. LP muamelesinin fermentasyonu sırasında görülen mikrobiyel değişiklikler.

## 5. SONUÇ

Birbirini izleyen üç yılda arka arkaya yapılan denemeler kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- a. Soğukta fermentasyona bırakılan salamura siyah zeytinlerden laktik asit bakterileri izole edilmiş, tanı işlemleri sonucunda bu bakterilerin *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris* ve *Leuconostoc dextranicum* olduğu saptanmıştır.
- b. Bu kültürlerden *Leuconostoc dextranicum* dekstran oluşturma yeteneğinden dolayı deneme kapsamı dışında bırakılmış, diğer kültürler ile ticari bir *Lactobacillus plantarum* kültürü tek tek veya karışımlar halinde deneme salamuralarına ilave edilmiştir. Bu şekilde Gemlik yöntemi olarak adlandırılan salamuralı fermentasyon yöntemi ile geleneksel yöntemlerle 9-12 ayda olgunlaştırılabilen zeytinlerin daha kısa sürede tüketilebilir hale getirilebileceği belirlenmiştir.
- c. En kısa olgunlaşma süresi aşılama ortamı olarak MRS sıvı besiyerinin kullanıldığı ve kültürlerin santrifüjlemeden doğrudan geliştirildikleri ortamla aşılama durumunda elde edilmiştir. Bu şekilde fermentasyon süresince 2 kez aşılama ugulamalarda zeytinlerin 63 gün gibi kısa bir sürede acılık tamamen giderilmiş olarak tüketim olgunluğuna eriştikleri saptanmıştır.
- d. Aşılama sırasında santrifüjleme yapılmadan geliştirildikleri MRS besiyeri ile aşılama örneklerde, santrifüjleme yapıldıktan sonra fizyolojik su ile aşılama örneklerine göre daha yüksek asitlik derecelerine daha kısa sürede ulaşılmıştır. En yüksek asitlik derecesi her türlü aşılama şeklinde de üç kültürün tür adları karışık olarak kullanıldığı denemelerde ulaşılmış, bunu *Leuconostoc cremoris* kültürünün tek başına aşılandığı denemeler izlemiştir.
- e. Kültürler arasında en hızlı pH düşüşü üç kültürün karışık olarak denendiği muamelede görülmüş, en düşük pH dereceleri ise yine *Leuconostoc cremoris* kültürü ve üç kültürün karışık olarak denendiği muamelelerde saptanmıştır.
- f. Fermentasyon sırasında salamuralardaki tuz değişimi açısından denemeler arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).
- g. Fermentasyon sonunda örneklerin protein içerikleri incelendiğinde değişik kültürlerin kullanımının örneklerin protein içeriği üzerine etkisinin Duncan testine göre

önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ). Her üçyılıda elde edilen ürünler protein içerikleri bakımından birbirine yakın bulunmuştur.

h. Fermentasyon ürünlerinin yağ içerikleri tüm sezonlara ait denemelerde birbirine yakın sonuçlar vermiş, farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin yağ içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ).

i. Fermentasyon sonunda elde edilen örneklerin indirgen şeker içerikleri oldukça farklı değerler göstermiştir. Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin indirgen şeker içeriği üzerine etkisinin Duncan testine göre önemli olduğu saptanmıştır ( $p<0.01$ ).

j. Fermentasyon sonunda elde edilen örneklerin oleuropein içerikleri hammaddelere göre düşük olduğu görülmüş, farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin oleuropein düzeyleri arasındaki fark ise Duncan testine göre önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Her üç ürün yılı sonunda elde edilen bulgular birbiri ile benzerlik göstermiştir.

k. Deneme örneklerinin kurumadde içeriği ile ilgili bulgular yıllar arasında farklılık göstermemiş, farklı kültürlerle aşılamanın ürünlerin kurumadde içeriğini etkilemediği istatistiksel olarak saptanmıştır ( $p>0.05$ ).

l. Örneklerin kül içerikleri açısından yıllar arasında farklılıklar görülmüş, farklı kültürlerle aşılama örneklerinden ikinci yıl denemesi sonunda elde edilenler dışındakilerin kül miktarları arasındaki fark Duncan testine göre önemli bulunmuştur ( $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ).

m. Örneklerin toplam asit seviyelerine bakıldığında en yüksek değerlerin üç kültürün karışık olarak kullanıldığı denemelerde elde edildiği görülmüş, farklı kültürlerle aşılamanın ürünlerin toplam asit düzeyine etkisinin Duncan testine göre önemli olduğu belirlenmiştir ( $p<0.01$ ).

n. Fermentasyon ürünlerinin sağlık açısından oldukça büyük öneme sahip olan tuz içeriği incelendiğinde, geleneksel yöntemlerle üretilen zeytinlere göre çok düşük oranda tuz içerdikleri saptanmıştır. Farklı kültürlerle aşılamanın örneklerin tuz içeriği arasındaki fark ise Duncan testine göre önemli bulunmuştur ( $p<0.01$  ve  $p<0.05$ ).

o. Fermentasyon süresince yapılan mikrobiyolojik analizlerin sonunda hiçbir muamelede *Pseudomonas* ve Enterobakteri türlerine rastlanmamıştır. Muameleler arasında fermentasyon sonunda ulaşılan laktik asit bakterisi sayısı açısından görülen fark Duncan testine göre önemli bulunmuş ( $p<0.05$ ), üç kültürün karışık olarak kullanıldığı kültür yanında farklı uygulamalarında aynı seviyelere ulaştığı görülmüştür.

Tüm örneklerde kültürlerle maya gelişiminin eşlik ettiği saptanmış, ulaşılan maya sevipleri arasındaki fark ise Duncan testine göre önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Muameleler arasında en fazla maya gelişimi gözlenenin ise *Lactobacillus plantarum* aşılmalı deneme olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında, uygun laktik starter kullanılarak, ortam sıcaklığının oldukça düşük olduğu kış aylarında geleneksel yöntemlere göre daha kısa sürede güvenli bir fermentasyon gerçekleştirilebileceği görülmüştür. Ancak diğer ülkelerde yapılan çalışmaların çoğu alkali uygulanmış yeşil ve siyah zeytinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yüzden salamura siyah zeytin işlemede kullanılacak, bulaşma etkenlerine ve düşük sıcaklık derecelerine dayanıklı, kısa sürede fermentasyon ortamına uyum sağlayabilen laktik starterlerin geliştirilmesi ve kullanılabilir hale getirilmesi için çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- AKTAN N., H. KALKAN. 1999. Sofralık Zeytin Teknolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi. İzmir. s. 122.
- AMIOT, M.-J., A. FLEURIET, J.-J. MACHEIX. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 34:823-826.
- AMODIOHA, A.C. 1998. Effect of cultural conditions of the growth and amyolytic enzyme production by *Rhizopus oryzae*. Arch. of Phytopathology and Plant Protection. 32: 1-9
- ANONİM, 1996. MERCK Microbiology Manual. Darmstadt, Germany. s.385.
- ANONİM, 1997. Sofralık Zeytin. TS 774. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara. s.12.
- ANONİM, 2005. [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org).
- BAŞOĞLU, F. 1976. Domates ve biber salçalarının bozulmasına sebep olan bazı bakterilerin izolasyon ve identifikasyonları üzerine araştırmalar. İhtisas Tezi (Yayınlanmamış), Ankara. 70 s.
- BIANCO, A., I. MUZZALUPO, A.I. PIPERNO, G. ROMEO, N. UCCELA. 1998. Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47:3531-3534.
- BIANCO, A., N. UCCELA. 2000. Biophenolic components of olives. Food Research International. 33:475-485.
- BLEKAS, G., C. VASSILAKIS, C. HARIZANIS, M. TSIMIDOU, D.G. BOSKOU. 2002. Biophenols in table olives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50:3688-3692.
- BRIANTE, R., M. PATUMI, S. LIMONGELLI, F. FEBBRAIO, C. VACCARO, A. DI SALLE, F. LA CARA, R. NUCCI. 2002. Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. Plant Science. 162:791-798.
- CHORIANOPOULOS, N.G., I.S. BOZIARIS, A. STAMATIOU, G.-J. E. NYCHAS. 2005. Microbial association and acidity development of unheated and pasteurized green-table olives fermented using glucose or sucrose supplements at various levels. Food Microbiology. 22:117-124.

- CIAFARDINI, G., V. MARSILIO, B. LANZA, N. POZZI. 1994. Hydrolysis of oleuropein by *L. plantarum* strains associated with olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 60(11): 4142-4147.
- CUNHA, S.C., I.M.P.L.V.O. FERREIRA, J.O. FERNANDES, M.A. FARIA, M. BEATRIZ, P.P. OLIVEIRA, M.A. FERREIRA. 2001. Determination of lactic, acetic, succinic and citric acids in table olives by HPLC/UV. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 24(7):1029-1038.
- DE CASTRO, A., A. MONTANA, F.-J. CASADO, A.-H. SANCHEZ, L. REJANO. 2002. Utilization of *Enterococcus casseliflavus* and *Lactobacillus pentosus* as starter cultures for Spanish-style green olive fermentation. *Food microbiology*. 19:637-644.
- DIEZ, M.J.F., A.C. FERNANDEZ, F.C. CANOHO, M.C.D. QUINTANA, J.L.C. CASANUOVA. 1972. Elaboracion de Aceitunas Negras de Mesa. s.91-93.
- DOĞAN, H., Ç. TÜKEL. 2000. Toplam Aerobik Mezofilik Bakteri. Alınmıştır. *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Sim Matbaacılık, Ankara. 351 s.
- DURAN, M.C., P. GARCIA, M. BRENES, A. GARRIDO. 1993. *Lactobacillus plantarum* survival during first days of ripe olive brining. *Systematic and Applied Bacteriology*. 16(1): 153-158.
- DURAN QUINTANA, M.C., P. GARCIA GARCIA, A. GARRIDO FERNANDEZ. 1999. Establishment of conditions for green table olive fermentation at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*. 51: 133-143.
- GARRIDO A., P. GARCIA, A. MONTANA, M. BRENES, M.C. QUINTANA. 1993. Biochemical changes during the preservation stage of ripe olive processing. *Die Nahrung*. 37(6): 583-591.
- GARRIDO FERNANDEZ, A., M.J. FERNANDEZ DIEZ, M.R. ADAMS. 1997. *Table Olives: Production and Processing*. Chapman & Hall, London. 481 s.
- GARVIE, I.E. 1986. Genus *Leuconostoc*. 'Alınmıştır. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition*, Ed. P.H.A. Sneath', The Williams & Wilkins, Baltimore. 1599 s.
- GILLILAND, S.E. 1988. Historical development of cultured foods. "Alınmıştır. *Bacterial starter cultures for foods*, Ed. S.E. Gilliland", CRC Press, Florida. 205 s.



- GÖÇMEN, D., M. KORUKLUOĞLU, V. UYLAŞER, O. GÜRBÜZ, A. YILDIRIM, İ. ŞAHİN. 2000. Salamura zeytinlerde bozulma etkeni küfler. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu. 6.-9. Haziran. Bursa. s. 467-472.
- KANDLER, O., N. WEISS. 1986. Regular, Nonsporing Gram-Positive Rods. 'Alınmıştır. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Eighth Edition, Ed. P.H.A. Sneath', The Williams&Wilkins, Baltimore. 1599 s.
- KILIÇ, O., M.D. ÇAKIR. 1989. Kısa sürede sofralık zeytin üretiminde uygulanabilecek yöntemler. Bursa I. Uluslararası Gıda Sempozyumu. 4-6 Nisan. s. 236-241.
- KORUKLUOĞLU, M. 1992. Sofralık zeytin fermentasyonu üzerine araştırmalar. Doktora Tezi (Yayınlanmamış), U.Ü. Fen Bilimleri Ens. Gıda Bilimi ve Tek. Ana Bilim Dalı, Ankara. 177 s.
- KORUKLUOĞLU, M., O. GÜRBÜZ, V. UYLAŞER, A. YILDIRIM, İ. ŞAHİN. 2000. Gemlik tipi zeytinlerde mikotoksin kirliliğinin araştırılması. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu. 6.-9. Haziran. Bursa. s.214-219.
- KORUKLUOĞLU, M., O. GÜRBÜZ, İ. ŞAHİN. 2002. Taze zeytin mikroflorasında bulunan laktik asit bakterilerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi. 8(2):109-113.
- MARSILIO, V., B. LANZA, N. POZZI. 1996. Progress in table olive debittering: Degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. Journal of the American Oil Chemists Society. 73(5): 593-597.
- MARSILIO, V., B. LANZA. 1998. Characterisation of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines(phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. Journal of the Science of Food and Agriculture. 76(4): 520-524.
- MARSILIO V., L. SEGHETTI, E. IANNUCCI, F. RUSSI, B. LANZA, M. FELICIONI. 2005. Use of a lactic acid bacteria starter 80 re during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. Journal of the Science of food and Agriculture. 85:1084-1090.
- McDONALD, S., P.D. PRENZLER, M. ANTOLOVICH, K. ROBARDS. 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. Food Chemistry. 73:73-84.

- MONTANO, A., A.H. SANCHEZ, F.J. CASADO, A. DE CASTRO, L. REJANO. 2003. Chemical profile of industrially fermented green olives of different varieties. *Food Chemistry*. 82:297-302.
- MULE, R., A.S. FODALE, C.B. BATI, A. TUCCI, A. DI PISA. 2000. Preliminary results of a new processing in order to tain green table olives with low sodium content. *Industrie Alimentari*. 39(394):844-847.
- NYCHAS, G.-J.E., E.Z. PANAGOU, M.L. PARKER, K.W. WALDRON, C.C. TASSAU. 2002. Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities in the cover brine. *Letters in Applied Microbiology*. 34: 173-177.
- ÖZAY, G. ve M. BORCAKLI. 1996. Effect of brine replacement and salt concentration on the fermentation on the fermentation of naturally black olives. *Food Research International*. 28(6): 553-559.
- PANAGOU, E.Z., C.C. TASSOU, C.Z. KATSABOXAKIS. 2002. Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20°C. *International Journal of Food Science and Technology*. 37:635-641.
- PANAGOU, E.Z., C.C. TASSOU, C.Z. KATSABOXAKIS. 2003. Induced lactic acid fermentation of untreated green olives of the *Conservolea* cultivar by *Lactobacillus pentosuss*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83:667-674.
- PIGA A., F. GAMBELLA, V. VACCA, M. AGABBIO. 2001. Response of three Sardinian olive cultivars to Greek-style processing. *Italian Journal of Food Science*. 1(13):29-40.
- ROMERO, C., M. BRENES, P. GARCIA, A. GARRIDO. 2002a. Hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50:3835-3839.
- ROMERO, C., P. GARCIA, M. BRENES, A. GARCIA, A. GARRIDO. 2002b. Phenolic compounds in natural black Spanish olive varieties. *European Food Research and Technology*. 215:489-496.
- ROZES, N., C. PEREZ. 1996. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of *L. plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45:839-843.

- RUIZ-BARBA, J.L., M. BRENES-BALBUENA, R. JIMENEZ-DIAZ, P. GARCIA-GARCIA, A. GARRIDO-FERNANDEZ. 1993. Inhibition of *L. plantarum* by polyphenols extracted from two different kinds of olive brine. *Journal of Applied Bacteriology*. 74(1):15-19.
- RYAN, D., K. ROBARDS. 1998. Phenolic compounds in olives. *Analyst*. 123:31R-44R.
- RYAN, D., K. ROBARDS, S. LAVEE. 1999a. Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*. 34:265-274.
- RYAN, D., K. ROBARDS, S. LAVEE. 1999b. Determination of phenolic compounds in olives by reversed-phase chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 832:87-96.
- SAS Institute, 2002. JMP 5 Statistical Discovery Software. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- SAIJA, A. ve N. UCCELA. 2001. Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Science & Technology*. 11:357-363.
- SANCHEZ, A.-H., A. DE CASTRO, L. REJANO, A. MONTANO. 2000. Comparative study on chemical changes in olive juice and brine during green olive fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:5975-5980.
- SANCHEZ, A.-H., L. REJANO, A. MONTANO, A. DE CASTRO. 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 67:115-122.
- STEINKRAUS, K.H. 1992. Lactic acid fermentations. *Applications of Biotechnology to traditional fermented foods*. National Academy Press. Washington. s. 157.
- ŞAHİN, İ., M. KORUKLUOĞLU, V. UYLAŞER, D. GÖÇMEN. 2000. Diyet zeytini ve zeytin ezmesi üretimi. *Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu*. 6-9. Haziran. Bursa. s.502.
- TASSOU, C.C., E.Z. PANAGOÜ, K.Z. KATZABOXAKIS. 2002. Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines. *Food Microbiology*. 19:605-615.
- TEMİZ, A. 1994. Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Şafak Matbaacılık Ltd. Şti. Ankara. s.266.

- TUNÇ, B., N. TÜMER, S. İLHAN. 2000. Fermentasyonunu tamamlamış Gemlik tipi zeytinlerin vakumlu ambalajlanmasında şişme olayının geciktirilmesi üzerine araştırmalar. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu. 6.-9. Haziran. Bursa. s.200-206.
- UYLAŞER, V., F. BAŞOĞLU. 2000. Gıda Analizleri I-II Uygulama Kılavuzu. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Uygulama Kılavuzu No: 9. Bursa.
- UYLAŞER, V., İ. ŞAHİN. 2004. Salamura siyah zeytin üretiminde geleneksel Gemlik yönteminin günümüz koşullarına uyarlanması. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 18(1):105-113.
- VEGA LEAL-SANCHEZ, M.J.L. RUIZ-BARBA, A.H. SANCHEZ, L. REJANO, R. JIMENEZ-DIAZ, A. GARRIDO. 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. Food Microbiology. 20: 421-430.
- YAZICIOĞLU, T. 1966. Bursa ilinde salamura zeytin elde olunması, salamura zeytin bileşimi ve besin değeri üzerinde bir araştırma. A.Ü.Z.F. Yayın No:268. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara, s.42
- ZURITZ, C.A., M. B. MALDONADO. 2004. A simple method to determine diffusion of sodium in the epidermis of green olives. Journal of Food Process Engineering. 27: 328–344.

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden, son aşamaya gelinceye kadar çok değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, ilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ilk danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmet ŞAHİN ve ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. Fikri BAŞOĞLU'na, çalışmam süresince kullandığım hammaddenin temininde verdikleri destekten dolayı Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakóltesi Dekanlığı'na, tez çalışmam süresince faydalandığım değerli tavsiyelerinden dolayı tez izleme komitesi üyelerim Sayın Prof.Dr. Arif SOYLU ve Sayın Yrd.Doç.Dr. Mihriban KORUKLUOĞLU'na, maddi ve manevi olarak sürekli desteklerini gördüğüm sevgili annem Gülşen YILDIRIM ve sevgili babam İsmail YILDIRIM'a, tezimin başından sonuna kadar sürekli yardım, destek ve güç aldığım sevgili eşim Alper KUMRAL'a teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül KUMRAL, 1976 yılında Bursa'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bursa'da tamamladı. 1994 yılında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'ne girdi. Bu bölümden 1998 yılında mezun oldu. Aynı yıl Gıda Bilimleri Bilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı ve araştırma görevliliğine atandı. 2001 yılında "Bazı Baharatların Bağırsak Patojeni Bakteriler Üzerine Etkisi" konulu tezini tamamlayarak Gıda Yüksek Mühendisi unvanını aldı. Aynı yıl Gıda Bilimleri Bilim Dalı'nda doktora eğitimine hak kazandı. 2002 yılında "Salamura Siyah Zeytin Üretiminde Farklı Tuzda ve Düşük Sıcaklıkta Fermentasyon Uygulamasının Olgunlaşma ve Kaliteye Etkisi" konulu tezinin çalışmalarına başladı. Evli olan araştırmacı halen aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir.