

**SOFRALIK SİYAH ZEYTİNDE  
AFLATOKSİJENİK KÜF GELİŞİMİ ve  
AFLATOKSİN OLUŞUMUNA  
*Lactobacillus plantarum* ve  
BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ ETKİLERİ**

**Şafak YILDIRIM**

**Doktora Tezi**

**Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI**

**II. Danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ**

**2009**

T.C.  
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**SOFRALIK SIYAH ZEYTİNDE AFLATOKSİJENİK KÜF GELİŞİMİ ve  
AFLATOKSİN OLUŞUMUNA *Lactobacillus plantarum* ve BAZI BİTKİ  
EKSTRAKTLARININ ETKİLERİ**

Şafak YILDIRIM

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Muhammet ARICI  
İKİNCİ DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

TEKİRDAĞ-2009

Her hakkı saklıdır

Prof. Dr. Muhammet ARICI ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ danışmanlığında, Şafak YILDIRIM tarafından hazırlanan bu çalışma 23/02/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Mehmet DEMİRCİ

*İmza :*

Üye : Prof. Dr. Muhammet ARICI (Danışman)

*İmza :*

Üye : Doç. Dr. Osman SAĞDIÇ

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ (II. Danışman)

*İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fisun KOÇ

*İmza :*

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

Prof. Dr. Orhan DAĞLIOĞLU  
**Enstitü Müdürü**

# ÖZET

Doktora Tezi

SOFRALIK SİYAH ZEYTİNDE AFLATOKSİJENİK KÜF GELİŞİMİ ve AFLATOKSİN OLUŞUMUNA *Lactobacillus plantarum* ve BAZI BİTKİ EKSTRAKTLARININ ETKİLERİ

Şafak YILDIRIM

Namık Kemal Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhammet ARICI  
İkinci danışman: Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

Bu araştırmada, bitki ekstraktlarının (*Origanum onites*, *Satureja hortensis*, *Capsicum annum*, *Olea europaea*) farklı konsantrasyonlarının ve potasyum sorbatın sofralık siyah zeytinlerde küf gelişimi ve aflatoksin oluşumuna etkileri incelenmiştir. Bu amaçla iki farklı deneme yapılmıştır.

İlk denemede ham zeytinler, düşük tuzlu (%4,5) salamuralarda, laktik starter kültür (*Lactobacillus plantarum*), değişik oranlarda bitki ekstraktları ve potasyum sorbat ile muamele edilmiştir. Örneklerin yarısı *Aspergillus parasiticus* NRRL 465 ile, diğer yarısı ise *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilerek fermentasyona bırakılmıştır. Fermentasyon süresince küf gelişimi, laktik asit bakterilerinin gelişimi ve pH değişimi kontrol edilmiştir. Fermentasyon sonunda HPLC tekniği kullanılarak aflatoksin analizi yapılmıştır.

İkinci denemede, fermente zeytinlere değişik oranlarda bitki ekstraktları ve potasyum sorbat ilave edilmiştir. Örneklerin yarısı *A. parasiticus* NRRL 465 ile, diğer yarısı ise *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilerek %97 nispi nemde, farklı sıcaklıklarda (+4°C ve +25°C), 15 ve 30 gün süreyle depolanmışlardır. Örneklerde 15. ve 30. günlerde aflatoksin analizi yapılmıştır.

Araştırma kapsamında, bitki ekstraktlarının tek başlarına ve potasyum sorbat ile birlikte *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkileri (*in vitro*) inhibisyon zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. Ekstraktların *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkileri *S. hortensis* > *O. onites* > *C. annum* > *O. europaea* olarak tespit edilmiştir.

Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarının antifungal etkinliği de (*in vitro*) belirlenmiştir. *O. onites*, *S. hortensis* ve bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarında yüksek oranda engelleme görülürken *C. annum* ve *O. europaea* küf gelişimlerini teşvik etmişlerdir.

Her iki denemeye ait örneklerin aflatoksin analiz sonuçları, belirlenebilirlik limitinin (LOQ-Limit of Quantification) altında kaldığından, aflatoksin sonuçları raporlanmamıştır.

**Anahtar kelimeler:** Aflatoksin, *Aspergillus parasiticus*, bitki ekstraktları, *Lactobacillus plantarum*, zeytin

2009, 86 sayfa

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### THE EFFECTS of *Lactobacillus plantarum* and SOME PLANT EXTRACTS in GROWTH of AFLATOXIGENIC MOULD and AFLATOXIN PRODUCTION in TABLE BLACK OLIVES

Şafak YILDIRIM

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Main Science Division of Food Engineering

Supervisor : Prof. Dr. Muhammet ARICI  
Co-Supervisor : Assist. Prof. Dr. Tuncay GÜMÜŞ

In this research, effects of different concentrations of plant extracts (*Origanum onites*, *Satureja hortensis*, *Capsicum annuum*, *Olea europaea*) and potassium sorbate on mould growth and aflatoxin production in table olives were investigated. Two different experiments were performed for this aim.

In the first experiment, raw olives were treated with lactic starter culture (*Lactobacillus plantarum*), plant extracts at different concentrations and potassium sorbate in low salted brine (4.5%). Half of the samples were inoculated with *Aspergillus parasiticus* NRRL 465 and the other half were inoculated with *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Growth of mould and lactic acid bacteria and changes of pH value were controlled during the fermentation. After the fermentation period, the amounts of aflatoxin contents in the samples were measured with HPLC method.

In the second experiment, different concentrations of plant extracts and potassium sorbate were added to fermented olives. As in the first experiment half of these samples were inoculated with *A. parasiticus* NRRL 465 and the other half of them were inoculated with *A. parasiticus* NRRL 2999. The samples were stored at conditions of 97% relative humidity and different temperatures (+4°C ve +25°C) for 15 and 30 days. Samples were tested for their aflatoxin contents at the end of 15th and 30th days.

In this research, inhibitory effects (*in vitro*) of plant extract combinations with potassium sorbate were determined on *Lb. plantarum*. In this experiment, inhibition zone sizes were measured. Inhibitory effects of plant extracts on *Lb. plantarum* were determined as *S. hortensis* > *O. onites* > *C. annuum* > *O. europaea*.

Antifungal effects (*in vitro*) of plant extracts and their combinations with potassium sorbate were also determined. While the growth of moulds were completely inhibited by the extracts of *O. onites*, *S. hortensis* and plant extracts with potassium sorbate combinations, *C. annuum* and *O. europaea* stimulated the mould growth.

Results of aflatoxin analyses that belong to samples of both studies were under the quantification limit (LOQ-Limit of Quantification) so that aflatoxin results were not reported in the research.

**Keywords:** Aflatoxin, *Aspergillus parasiticus*, plant extracts, *Lactobacillus plantarum*, olive,

2009, 86 pages

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AFB<sub>1</sub></b>	Aflatoksin B <sub>1</sub>
<b>dk</b>	Dakika
<b>g</b>	Gram
<b>HPLC</b>	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
<b>K-sorbat</b>	Potasyum sorbat
<b>kg</b>	Kilogram
<b>kob</b>	Koloni oluşturan birim
<b>L</b>	Litre
<b>log</b>	Logaritma
<b>mg</b>	Miligram
<b>mL</b>	Mililitre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>NaCl</b>	Sodyum klorür
<b>ppb</b>	Milyarda bir kısım
<b>ppm</b>	Milyonda bir kısım
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>µL</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>°C</b>	Celsius derecesi

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ</b>	4
2.1. Zeytinin Bileşimi	4
2.2. Zeytinlerde Küf Gelişimi ve Mikotoksinlerin Oluşumu	8
2.3. Aflatoksinler ve Özellikleri	12
2.4. Baharatların Antimikrobiyal Etkinliği	17
2.4.1. <i>Origanum onites</i> 'in antimikrobiyal etkinliği	23
2.4.2. <i>Satureja hortensis</i> 'in antimikrobiyal etkinliği	24
2.4.3. <i>Capsicum annuum</i> 'un antimikrobiyal etkinliği	25
2.4.4. <i>Olea europaea</i> 'nın antimikrobiyal etkinliği	27
2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etkinliği	28
2.6. Baharat ve Ekstraktlarının Laktik Asit Bakterileri Üzerine İnhibitör Etkileri	31
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM</b>	33
3.1. Materyal	33
3.2. Yöntem	34
3.2.1. Ekstraksiyon	34
3.2.2. Küf kültürlerinin çoğaltılması	34
3.2.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> 'un çoğaltılması	34
3.2.4. Bitki ekstraktlarının <i>Lactobacillus plantarum</i> üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi	35
3.2.5. Bitki ekstraktlarının <i>Aspergillus parasiticus</i> üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi	35
3.2.6. Starter kültür hazırlama	36
3.2.7. Zeytin fermentasyonu denemesi	36
3.2.8. Fizikokimyasal Analizler	38
3.2.8.1. Suda çözünür kurumadde tayini	38
3.2.8.2. pH değeri tayini	38
3.2.8.3. Tuz analizi	38
3.2.8.4. Şeker analizi	39
3.2.9. Mikrobiyolojik Analizler	39
3.2.9.1. Laktik asit bakterisi sayısının belirlenmesi	39
3.2.9.2. Küf sayısının belirlenmesi	39
3.2.10. Fermente Siyah Zeytin Denemesi	40
3.2.11. Aflatoksin Analizi	42
3.2.11.1. Ekstraksiyon ve filtrasyon	42
3.2.11.2. İmmünoaffinitite kolon safhası	43
3.2.11.3. Elüsyon	43
3.2.12. İstatistiksel Analiz	43
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA</b>	44
4.1. Ham Zeytinlerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri	45

4.2. Bitki Ekstraktlarının ( <i>in vitro</i> ) <i>Lactobacillus plantarum</i> Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi	46
4.3. Bitki Ekstraktlarının ( <i>in vitro</i> ) Antifungal Etkinliği	49
4.4. Fermentasyon Süresince pH Değerlerinde Meydana Gelen Değişiklikler	52
4.5. Fermentasyon Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayılarındaki Değişim	61
4.6. Fermentasyon Süresince Küf Sayılarındaki Değişim	65
4.7. Fermentasyon Sonrası Zeytinlerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri	69
4.8. Aflatoksin Analiz Sonuçları	70
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	72
<b>6. KAYNAKLAR</b>	75
<b>EKLER</b>	
EK 1	83
TEŞEKKÜR	85
ÖZGEÇMİŞ	86



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 3.1. Fermente siyah zeytin denemesine ait örnekler	41
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının <i>A. parasiticus</i> NRRL 465 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999 üzerine etkisi ( <i>in vitro</i> )	51
Şekil 4.2. Fermentasyon süresince salamuralardaki pH değişimleri	55
Şekil 4.3(i) Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim	63
Şekil 4.3(ii) Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim	64
Şekil 4.4(i) Fermentasyon süresince küf sayılarındaki değişim	67
Şekil 4.4(ii) Fermentasyon süresince küf sayılarındaki değişim	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Türkiye’de gıda maddeleri için belirlenen aflatoksin limit değerleri	16
Çizelge 3.1. Zeytinlere uygulanan muamelelere göre örneklerin numaralandırılması	37
Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan Gemlik çeşidi ham siyah zeytinin bazı fizikokimyasal analiz sonuçları	45
Çizelge 4.2. Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının, <i>Lactobacillus plantarum</i> üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonu çapları (mm)	46
Çizelge 4.3. Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının antifungal etkileri (% engelleme)	50
Çizelge 4.4. Fermentasyon süresince örneklerdeki pH değişimleri	53
Çizelge 4.5. Birinci haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.6. Yedinci haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.7. On dördüncü haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	57
Çizelge 4.8. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, birinci haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları	58
Çizelge 4.9. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, yedinci haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları	59
Çizelge 4.10. Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, 14. haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları	60
Çizelge 4.11 Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim (log kob/mL)	62
Çizelge 4.12 Fermentasyon süresince örneklerin küf sayılarındaki değişim (log kob/mL)	65
Çizelge 4.13 Fermentasyon sonunda zeytinlerin bazı fizikokimyasal analiz sonuçları	69

## 1. GİRİŞ

Sofralık zeytin, kültüre alınmış zeytin ağacı (*Olea europaea sativa* Hoffg, Link) meyvelerinin tekniğine uygun olarak acılığı giderilip, laktik asit fermentasyonuna tabi tutularak veya tutulmayarak gerektiğinde laktik asit ve/veya diğer katkı maddeleri ilave edilen, pastörizasyon veya sterilizasyon işlemi uygulanarak veya doğrudan elde edilen mamuldür (Anonim 2003).

Temel gıda maddelerimizden olan zeytin, insanların ilk keşfettiği besinlerden biri olup, içerdiği yağ, protein, karbonhidrat, vitamin ve mineral maddeler nedeniyle sağlıklı beslenmenin bir parçası olarak kahvaltılık ve yemeklerde sıkça kullanılmaktadır.

Dünya üzerinde zeytinin yetiştiği yerler incelendiğinde, özellikle Akdeniz ikliminin görüldüğü ülkelerde yaygın olarak yetiştiği görülmektedir. Akdeniz iklim kuşağında bulunan ülkemizde de zeytin ağacı Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nde yaygın olarak bulunmakta ve sofralık zeytin, zeytin yağı, zeytin ezmesi gibi ürünlere işlenmektedir.

Ülkemizde sofralık zeytin üretiminin en yoğun gerçekleştiği yer Ege Bölgesi olup bunu Marmara Bölgesi izlemektedir. Sofralık zeytin üretimimizin büyük bir kısmı "Gemlik yöntemi" olarak adlandırılan yöntemle üretilmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlu salamuralarda, 6-8 ay gibi uzun bir sürede tamamlanan bu üretim yönteminde zeytinlerin olgunlaştırılması büyük beton ya da polietilen havuzlarda spontan fermentasyonla yapılmaktadır. Bu süreç içerisinde, hammaddenin uygun olmayan koşullarda muhafaza edilmesi, uygulanan işleme teknikleri, yetersiz hijyenik koşullar nedeniyle zeytinlerde birtakım sorunlar olabilmektedir. Özellikle zeytin havuzlarında yüzeyde "kefeke" adı verilen küf tabakasının oluşumu gerek sağlık gerekse ekonomik açıdan sorun teşkil etmektedir (Aktan ve Kalkan 1999).

Zeytinin depolanması, paketlenmesi ve dağıtımı esnasında da uygun olmayan şartlara bağlı olarak, küflerin de aralarında bulunduğu birçok mikroorganizma bozulmaya neden olmaktadır (Fernandez ve ark. 1997). Bunların içinde mikotoksin üreten küfler de bulunabilmekte ve fermentasyon süresince mikotoksin üretebilmektedirler. Bu küflerin gelişmesinin engellenmesi başta hijyen kurallarına uygun üretimle sağlanabilir. Ancak geleneksel metotla

üretimde ve üretimden sonraki aşamalarda, özellikle depolamada küfler gelişerek ekonomik kayıplar yanında toksin üretirler. Bu aşamada engellenmeleri genellikle kimyasal koruyucu veya ısı ile işlemle gerçekleştirilir. Dolayısıyla çeşitli kimyasal koruyucularla küf gelişmesi ve toksin üretimi engellenmeye çalışılır. Doğal bitki ekstraktlarının kimyasal koruyucuların alternatifi olarak kullanımına yönelik araştırmalar son yıllarda artış göstermektedir. Bu çerçevede zeytinlerde küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunun engellenmesi için söz konusu materyallerin kullanım potansiyeli olduğu şüphesizdir.

Küf gelişimi zeytinlerde bozulmalara ve buna bağlı olarak ekonomik kayıplara, küflerin sekonder metabolitleri olan mikotoksinler ise insanlarda hastalıklara neden olmaktadır. Küf kontaminasyonunda ve mikotoksin oluşumunda, çevre faktörleri etkilidir. Bu faktörlerin etkisinin bilinmesi, sağlık risklerinin ve ekonomik kayıpların azaltılabilmesi açısından faydalıdır. Mikotoksinlerin, insan ve hayvanlarda toksik rahatsızlıklara neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Ancak küfler, gıdalar ve hastalıklar arasında bir bağlantı olduğu son yıllarda dikkate alınmaktadır. Mikotoksinlerden kaynaklanan hastalıkların minimize edilebilmesi için, gıdaların mikotoksin içerikleri üzerine uygun düzenlemelerin yapılması gerekmektedir (Begum ve Samajpati 2000).

Gıdalarda mikrobiyal bozulmaların engellenmesi için genellikle kimyasal koruyucular kullanılmaktadır. Küf gelişimi ve buna bağlı olarak mikotoksin oluşumunu engellemek için de çeşitli antimikrobiyal maddeler kullanılmaktadır. Günümüzde, görsel ve yazılı iletişim araçlarının etkisi ile tüketiciler, sağlıklı beslenme, güvenli gıda konularında bilinçlenmekle birlikte, beslenme tarzının hastalıklara yakalanma riski ile yakın ilişkili olduğunu da düşünmektedirler. Ürünlerde kalıntı bırakabilen kimyasal gıda katkı maddelerinin, kanser ve benzeri hastalıklara yol açtığı fikrinin yaygınlaşması ile özellikle doğal gıdalara olan ilgi artmıştır. Günümüzde bilim dünyasında yapılan araştırmalar temelde doğal beslenme tarzına yönelik gerçekleştirilmekte olup gıda sanayi de tüketicilerin farklılaşan tercih ve beklentilerine uygun olarak ürün geliştirmeye yönelmiştir. Gıda maddelerinin üretimlerinde tabii antimikrobiyal maddelerin kimyasal koruyucular yerine kullanılmaya başlandığı veya buna yönelik bir eğilim olduğu görülmektedir. Bu çerçevede baharat ve bitki ekstraktlarından sıklıkla yararlanılmaktadır. Baharat ve bitki ekstraktlarının hoş koku vermeleri yanında, bir çoğu fenolik maddelerce zengin olup yine bir çoğu antimikrobiyal ve antioksidan özelliğe sahiptirler (Deans ve Svoboda 1990, Panizzi ve ark. 1993).

Bu araştırma ile, aflatoksijenik kf aşılanmış zeytinlerde, zeytinle uyum sağlayabilecek bitki ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarının antifungal maddeyle (potasyum sorbat) mukayeseli olarak; siyah zeytin fermentasyonunda *Lactobacillus plantarum*'la birlikte, fermente siyah zeytinde ise, rutubetli ortamda farklı sıcaklık değerlerinde depolama ile kf gelişimi ve aflatoksin oluşumuna etkileri ile zeytinin aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Zeytinin Bileşimi

Temel gıda maddelerimizden olan zeytin, insanların ilk keşfettiği besinlerden biri olup, içerdiği yağ, esansiyel yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler, çeşitli mineral maddeler, organik asitler, oligosakkaritler, biyofenoller ve pektik bileşenler nedeniyle sağlıklı beslenme açısından oldukça önemli bir besin maddesidir (Savaş ve Uylaşer 2007).

Sofralık zeytinlerde antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteye sahip fenolik bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenlerin bazıları; oleuropein, hydroxytyrosol, tyrosol, ligstroside, hydroxytyrosilelenolate, tyrosilelenolate, kafeik asit, homovanillic asit, syringic asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *o*-kumarik asittir (Saija ve Uccella 2001).

Tanılgan ve ark. (2007), Gemlik, Kilis, Uslu, Tirilye ve Ayvalık zeytin çeşitlerinin kimyasal özelliklerini araştırdıkları bir çalışmada, zeytinlerin Ca, Fe, K, Mg, Na ve P içeriklerinin yüksek olduğunu, Gemlik çeşidinin K, Na ve P içeriğinin diğer çeşitlere göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Yağ asidi bileşimi incelendiğinde ise oleik asidin (%65,7-83,6) en yüksek konsantrasyondaki yağ asidi olduğu ve bunu palmitik asit (%8,1-15,2), linoleik asit (%3,5-15,5), stearik asit (%2,0-5,6), linolenik asidin (%0,1-3,0) izlediğini bildirmişlerdir.

Çeşitler arasında büyük farklılıklar olduğundan, her bir çeşit içinde bile, gelişme ve olgunlaşma durumuna bağlı olarak farklılıklar gözlemlendiğinden zeytinin kesin bileşimini vermek zordur. Çeşidin yanı sıra yetiştirilme şartları ve işleme teknikleri zeytin bileşimini etkilemektedir. Genel bir değerlendirme ile zeytinde yaklaşık olarak %50-70 su, %15-30 yağ, %1-3 protein, %1-3 lif, %1-5 kül, %2-6 şeker bulunmaktadır (Tetik 2001).

Karaman ve ark. (2006) Gemlik'in farklı köylerinden topladıkları Gemlik çeşidi ham siyah zeytinlerde, kurumadde değerlerinin %40,11 ile %52,69 arasında, indirgen şeker miktarlarının %2,32 ile %2,70 arasında, pH değerlerinin ise 5,05-5,42 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Türk ve ark. (2000) tarafından Gemlik çeşidi zeytinlerde yapılan analizlerde ham danede ortalama %55,78 nem, %26,90 yağ, %2,014 şeker tespit edilmiş olup, pH değerini 5,10, serbest asitlik değerini ise %0,576 olarak bildirmişlerdir.

Barut (2000) Gemlik zeytin çeşidine ait taze meyvelerin kimyasal bileşimlerini incelediği bir çalışmada, zeytinleri 2 yıl süre ile “var” ve “yok” dönemlerini kapsayacak şekilde incelemiştir. Gemlik çeşidinde toplam şeker miktarının “var” döneminde %3,21 iken “yok” döneminde %3,35, pH değerinin var döneminde 5,60 iken yok döneminde 5,70 olduğunu belirtmiştir. Çalışmanın yapıldığı her iki yılda da “yok” dönemlerinde, “var” dönemlerine göre, genel olarak pH, yağ, protein ve şeker oranlarının daha yüksek, asit oranının da daha düşük olduğunu bildirmiştir. “Yok” döneminde ağaç üzerinde az miktarda ürünün olmasının meyve olgunlaşmasına, dolayısıyla da meyvedeki kimyasal kompozisyonun farklı olmasına neden olduğunu belirtmiştir. “Yok” dönemini yaşayan ağaçlar içerdikleri karbonhidrat ve diğer fotosentez ürünlerini daha az sayıdaki meyvenin gelişimi için kullandıklarından meyvelerin “var” dönemindeki ağaçlara göre, daha fazla yağ, protein ve şeker içermelerinin söz konusu olduğunu, bunun da “yok” dönemindeki ağaçlardaki verim miktarının düşük olmasına rağmen, meyve kalitelerinin yüksek olmasının nedenlerinden olduğunu belirtmiştir.

Akçay ve ark. (2000), Gemlik zeytininde yaptıkları bir araştırmada, taze ve siyah salamura meyvelerin kimyasal bileşimini incelemiştir. Denemenin yürütüldüğü 1. yıl Gemlik yöresindeki taze zeytinlerde pH değerleri 5,34, 2.yıl ise 6,07, salamura zeytinlerde ise 1.yıl pH 4,44, 2.yıl 5,87 bulunduğu belirtilmiştir. Su oranı taze zeytinlerde 1.yıl %44,86, 2.yıl %44,11 olarak, salamura zeytinlerde ise 1.yıl %46,10, 2.yıl %47,08 olarak bulunduğu bildirilirken laktik asit cinsinden asitliğin taze zeytinlerde 1.yıl %0,96, 2.yıl %0,51, salamurada 1.yıl %0,82, 2.yıl %0,70 olarak bulunduğu, % invert şeker miktarının ise taze zeytinlerde 1.yıl %1,33, 2.yıl %1,62, salamura zeytinlerde 1.yıl %1,44, 2.yıl %1,28 olarak tespit edildiği, yağ miktarınsa 1. ve 2. yıllarda taze zeytinlerde sırasıyla %20.82 ve %23.92, salamurada %18.84 ve %23.87 olarak bulunduğu belirtilmiş ve bu değişimlerin hasat zamanı, kültürel işlemler vb. koşullara göre değişebildiği bildirilmiştir.

Arıcı ve Aktan (1997) farklı salamura yöntemlerinin, zeytinlerin kimyasal bileşimi üzerine etkilerini incelemiştir. Bu amaçla zeytin örnekleri, farklı tuz konsantrasyonlarında ve bazılarında laktik asit ilave edilerek fermente edilmişlerdir. Ham danelerde indirgen şeker oranının %2,30-3,91 ve kurumadde değerlerinin de %32,40-34,96 arasında değiştiği bildirilmiştir. Fermentasyon sonunda pH değerlerinin 3,72-4,83 arasında değiştiği, indirgen şeker oranının %0,109-0,529 ve kurumadde değerlerinin de %53,72-57,81 arasında değiştiği belirtilmiştir. Laktik asit katkısı yapılmış olan zeytin örneklerinde pH'nın düşmesiyle fermentasyonun kolaylaştığı ve dolayısıyla bu örneklerde indirgen şeker oranının düşük

olduğu, salamura zeytinlerde ki kurumadde miktarının, salamurada bekletme sırasında su kaybı nedeniyle ham zeytinlerden yüksek olduğu belirtilmiştir.

Ülkemizde “Gemlik Yöntemi” olarak adlandırılan yöntemle sofralık siyah zeytin üretiminde sofralık siyah zeytinin hasadı, danenin iyice siyahlaştığı ve et kısmının da menekşe-mor renk almaya başladığı zaman yapılır. İşletmeye getirilen zeytinler seçme ve ayıklama işlemine tabi tutularak ezilmiş, zedelenmiş, hastalıklı, haşere tahribatı olmuş, çok küçük, ham ve rengi uygun olmayan daneler ayklanır. Salamura kaplarına, salamuradaki tuz miktarı %10 civarında olacak şekilde bir kat tuz, bir kat zeytin konulur ve ardından su ilave edilir. Kapların üzerine ağırlık konularak 6-8 ay süre ile fermentasyona bırakılır. Fermentasyon sonunda zeytinlere bir yıkama işlemi uygulanır. Parçalanmış, rengi bozuk, kusurlu daneler ayıklandıktan sonra, zeytinler iriliklerine göre sınıflandırılarak ambalajlanır (Türker 1974).

Gemlik yöntemi ile üretilen zeytinlerin tuz konsantrasyonu yüksek, fermentasyon süresi ise oldukça uzun olup, bu durum zeytinlerde buruşmalara, besin değerinde kayıplara neden olmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonunun olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak ve uzun fermentasyon süresini kısaltmak amacıyla çalışmalar yapılmaktadır. Tuz konsantrasyonu, zeytindeki çözünür maddelerin difüzyonunu etkilediği gibi, mikrobiyal gelişmede de etkili olmaktadır. Salamurada tuz oranı %8’in altına düştüğünde ortama laktik asit bakterileri hakim olmaktadır. Fermentasyonun ilk safhasında *Escherichia* ve *Aerobacter* cinslerine ait bakteriler, laktik asit bakterileri ve mayalardan meydana gelen kompleks bir mikrobiyota faaliyette bulunur. Bunların içinde, laktik asit bakterilerinin çoğalarak ortama hakim olması ve laktik asit fermentasyonunu gerçekleştirmesi istenmektedir. Fakat spontan bir fermentasyonda bunun olması garanti değildir. Bu sebeple fermentasyon başlangıcında laktik starter kültür kullanılması tavsiye edilmektedir. Starter kültür kullanılmasıyla ortamın asitliği yükselir, istenmeyen mikroorganizmaların gelişimi engellenir ve homojen bir ürün yapısı, lezzeti sağlanır. Siyah sofralık zeytin fermentasyonunda *Leuconostoc mesenteroides* asit üretimini başlatmakta; *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* ve *Lactobacillus fermentum* fermentasyonu tamamlamaktadır. Zeytin üretiminde koruyucu madde olarak, maya ve küflere karşı inhibitör etkisi olan potasyum sorbat kullanılabilir (Türker 1974, Pederson 1979, Kılıç 1984, Aktan ve Kalkan 1999).



Borcaklı ve Özay (2000) Gemlik çeşidi zeytinlerde gerçekleştirdikleri bir zeytin fermentasyonu denemesinde, toplam hacmin %1'i oranında aşılınmış *Lactobacillus plantarum*'u starter kültür olarak kullanmışlar ve %6 tuz konsantrasyonu içeren salamuralarda zeytinleri 5,5 ay boyunca 15, 23 ve 35°C'lerde muhafaza etmişlerdir. Mikroorganizma aşılınmış denemelerde, laktik asit bakterilerinin bir an önce gelişmesi ve dolayısıyla ortam pH'sının düşük kalmasını amaçlamışlardır. Denemelere başlamadan önce ham zeytinlerin mikrobiyolojik ve kimyasal içeriğini belirlemişlerdir. Mikroorganizma yükünün Gram-negatif bakterilerden ( $5,7 \times 10^4$  kob/g) ve mayalardan ( $8,6 \times 10^5$  kob/g) oluştuğunu saptamışlar ve zeytine karakteristik lezzet veren laktik asit bakterilerine rastlanmadığını belirtmişlerdir. Ancak fermentasyon süresince laktik asit bakterilerinin geliştiği ve laktobasillerden ağırlıklı olarak *Lactobacillus plantarum* ve koklardan da *Leuconostoc mesenteroides* tiplerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Ön işlemden sonra laktik asit bakterilerinin salamurada gelişmeye başladığı ve 3. günde 15°C'de 5,2 log kob/mL, 23°C'de 5,6 log kob/mL ve 35°C'de 6 log kob/mL seviyesine ulaştığını bildirmişlerdir. Yirmiüçüncü ve 37. günlere kadar genel bir artış gözlemlendiği ve değerlerin 7-8,2 log kob/mL arasında değiştiği, daha sonraki analizlerde zaman zaman küçük artışlar göstererek gelişen laktobasillerin 136. günden sonra 7,2-7,4 log kob/mL değerlerine düşerek ortamdaki varlıklarını 162. günde de korumuş olduklarını belirtmişlerdir. Çoğunluğunu *Leuconostoc mesenteroides*'in oluşturduğu koklar 15°C ve 23°C'de , 23. günde 7,5 log kob/mL miktarına ulaşmış ve sırası ile 67. ve 140. günlerde gelişmelerinin durduğunu bildirilmiştir. Kok büyümesinin 35°C'de 37. günde erkenden son bulduğunu da belirtilmiştir.

Zeytin ve ark. (2008) laktik starter kültür kullanmadan yaptıkları bir zeytin denemesinde, fermentasyonun ilk 3 haftasında laktik asit bakterisine rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Tunç ve ark. (2000), %10'luk salamurada fermentasyonu tamamlanmış Gemlik tipi zeytinlerde laktik asit bakterisi sayısının  $2,4 \times 10^3$  kob/g, küf sayısının ise 70 kob/g olarak bulunduğunu bildirmişlerdir.

Marsilio ve ark. (2005) Yunan ve İspanyol tipi yeşil zeytin üretiminde starter kültür olarak laktik asit bakterisi kullandıkları bir çalışmada İspanyol tipi zeytinlerde toplam fenolik madde miktarının, spontan fermentasyon ile üretilen zeytinlerden oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir. Laktik asit bakterisi ile inokülasyonun zeytinin pH, toplam asitlik, mikrobiyal profil ve lezzetliliğini etkilediğini belirtmişlerdir.

## 2.2. Zeytinlerde Küf Gelişimi ve Mikotoksinlerin Oluşumu

Ülkemizde uygulanmakta olan siyah zeytin üretim tekniklerine bakıldığında bunlar çoğunlukla geniş çaplı havuzlarda, yüksek tuz konsantrasyonlu salamuralarda (>%10), 6-8 ay gibi uzun bir sürede gerçekleştirilmektedir (Aktan ve Kalkan 1999). Bu şekilde gerçekleştirilen bir üretimde sıcaklık, rutubet, su aktivitesi gibi faktörlerin etkisiyle küfler gelişerek ürünün beslenme değerini düşürmekte ve teknolojik kalitesinde önemli zararlara neden olmaktadır (Gümüş ve Arıcı 2005).

Ülkemiz için zeytin salamuracılığı denilince ilk akla gelen ürün siyah zeytindir. Ülkemizde siyah zeytin salamuracılığında yaygın olarak kullanılan yöntem “Gemlik Yöntemi” olarak kaynaklara geçmiştir. Çok eski zamanlardan beri uygulanmakta olan Gemlik yönteminin günümüzdeki uygulaması da gelişen hijyen bilgi ve bilincine uygun olmayacak şekilde sürmektedir. Bu da salamura havuzlarında diğer bulaşmalar yanında, yüzeyde aşırı bir küf gelişmesine izin vermektedir. Bu ise, yalnızca havalı ortamda gelişebilen, ancak aşırı enzimatik yetenekleri olan bu mikroorganizmaların bir yandan ürünün yumuşamasına ve küf tadı almasına, diğer yandan oluşturdukları toksik maddelerle tüketici sağlığını tehdit edici nitelik kazanmasına neden olmaktadır (Korukluoğlu ve ark. 2000).

Eltem ve Öner (1995), 1987-1988 yılları arasında Marmara ve Ege Bölgelerinden elde ettikleri 55 adet naturel siyah zeytinin küf florasını incelemişlerdir. 15 adet *Penicillium* izolatı, 11 adet *Aspergillus* izolatı, 2 adet *Alternaria*, 1 adet *Eurotium* ve 1 adette *Cladosporium* izolatı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Şahin ve ark. (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, Bursa yöresindeki salamura havuzlarında gelişen küflerin büyük çoğunluğunun *Penicillium* türü küfler olduğu belirtilmiştir.

Fernandez ve ark. (1997), zeytin üretimi sırasında salamuranın yüzeyinde başta *Penicillium* olmak üzere, *Aspergillus* ve *Rhizopus* küf türlerinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Göçmen ve ark. (2000), salamura siyah zeytinlerde bozulma etmeni küfleri inceledikleri bir çalışmada, *Penicillium* cinsinin en fazla rastlanan küf cinsi olduğu, diğer cinslerin ise *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Eurotium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Phoma* ve *Thalaromyces* cinsine ait türler olduklarını belirtmişlerdir.

Gıdalarda küf gelişiminin olmasının, her zaman mikotoksin oluşumu ile sonuçlanmadığı, aynı şekilde görsel olarak küf gelişiminin olmamasının mikotoksinlerin oluşmadığı anlamına gelmediği belirtilmiştir. Zeytinlerde küf gelişimi, küfün meyve eti içerisine girişi ile başlamaktadır. Bunu misel gelişimi ve mikotoksin oluşumu takip etmektedir (Betina 1989, Weidenbörner 2001).

Sanz-Perez ve ark. (1973) tarafından İspanya'da yapılmış olan bir çalışmada, *Aspergillus flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin zeytinde de gelişebildiği ve aflatoksin oluşturabildiği belirtilmiştir.

Bazı araştırmacılar zeytinin aflatoksin oluşumu için zayıf bir substrat olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın yapılan başka çalışmalarda aflatoksin bulgularının elde edilmiş olması, araştırmalar esnasında otoklavda sterilizasyon uygulanması, analiz yöntemi gibi pek çok faktörün sonuçları etkileyebildiği belirtilmiştir (Mahjoub ve Bullerman 1987a, Leontopoulos ve ark. 2003). Nitekim Daradimos ve ark. (2000) zeytinyağında aflatoksin analizini iki farklı metot ile yapmışlar ve yöntemlerden birinde hiç aflatoksin bulunamamışken, diğer yöntemle yapılan aflatoksin analizi sonucunda örneklerin %72'sinde aflatoksin B<sub>1</sub> bulunduğunu belirlemişlerdir.

Mahjoub (1985) Tunus zeytinleri ile yaptığı bir çalışmada, zeytinlerin aflatoksin üreten küflerle bulaşık olduğunu belirlemiştir. Sağlam veya zedelenmiş zeytinlerde *A. flavus* gelişimini incelemiş, zedelenmiş tanelerde gelişmenin daha güçlü olduğunu fakat zeytinde aflatoksin oluşmadığını bildirmiştir.

Mahjoub ve Bullerman (1987b), sağlam ve zedelenmiş taze zeytinlerde küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunu araştırdıkları bir çalışmada, 15, 25 ve 35°C sıcaklıklarda 7, 14 ve 21 günlük inkübasyon sürelerinde *A. flavus* NRRL 6555 ve *A. parasiticus* NRRL 2999 suşları ile aşılanan zeytinlerde küf gelişimi ve aflatoksin üretimini incelemişlerdir. Zedelenmiş tanelerde küf gelişiminin daha fazla olduğunu ancak örneklerde aflatoksin bulunamadığını belirtmişlerdir. Ancak zeytinler ezme haline getirilip, küflerle aşılandıktan ve 25°C'de 7 gün inkübasyondan sonra aflatoksin oluşumu olduğunu belirtmişlerdir.

Eltem (1996) tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'de üretilmiş sofralık siyah salamura zeytinlerden izole edilmiş 5 adet *A. flavus* ve 2 adet *A. parasiticus* suşlarını sağlam taze siyah

zeytin, hasarlı taze siyah zeytin ve taze zeytin ezmesine inoküle etmiş ve hasarlı zeytinlerde küflerin daha iyi geliştiğini belirtmiştir.

Sağlam zeytinlerde, zeytin meyvesini çevreleyen zarın, küf gelişimine karşı koruyucu bir özellik gösterdiği belirtilmiştir (Mahjoub ve Bullerman 1987b, Tantaoui-Elaraki ve Mannioui 1996).

Korukluoğlu ve ark. (2000) Gemlik yöntemi ile üretilmiş zeytinlerde yaptıkları bir araştırmada, ince tabaka kromatografisi kullanılarak örneklerde, var-yok deneyi ile aflatoksin, okratoksin A, patulin, penisik asit, sitrinin ve sterigmatosistin varlığını araştırmışlardır. Araştırma materyali tüm örneklerin okratoksin A bakımından temiz çıktığı, bir örneğin sitrinin, üç örneğin patulin, dört örneğin iz miktarda olmakla birlikte sterigmatosistin ve yedi örneğin penisik asit bakımından pozitif sonuç verdikleri bildirilmiştir. Ayrıca birer örneğin aflatoksin B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, üç örneğin aflatoksin B<sub>1</sub> ve dört örneğin aflatoksin G<sub>2</sub> ile kirli bulunduğu belirtilmiştir.

Arıcı (2001) yaptığı bir araştırmada zeytinlerde *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* ve *Penicillium crysogenum* izole ettiğini, izole edilen bu küflerden *P. expansum* ve *P. crysogenum*'un mikotoksin üretebildiğini ancak zeytinlerin hiçbirinde mikotoksine rastlanmadığını bildirmiştir.

Şahin ve ark. (1999) tarafından salamura siyah zeytinler de küf varlığı ve aflatoksin gelişimi üzerine yapılan bir araştırmada, Gemlik yöntemi ile yapılan salamura siyah zeytin havuzlarındaki kefeke adı ile bilinen zar tabakasında *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsine ait küfler tespit edilmişken, satışa sunulan paketli veya açık haldeki zeytinlerde ise yalnızca *Penicillium* türlerinin izole edildiğini bildirmişlerdir. Piyasadan ve işletmelerden temin ettikleri 20 zeytin örneğinin mikotoksinlerle bulaşık olduğunu belirtmişlerdir.

Arıcı ve ark. (2005) İstanbul ve Tekirdağ'dan temin ettikleri salamura siyah zeytin örneklerinde yaptıkları bir çalışmada, analiz edilen 64 örneğin 30'unun 0,05 ile 0,31 µg/kg arasında aflatoksin B<sub>1</sub>, 11'inin 0,04 ile 0,07 µg/kg aflatoksin B<sub>2</sub>, 6'sının 0,04 ile 0,13 µg/kg aflatoksin G<sub>1</sub> ve 1 örneğinde 0,07 µg/kg aflatoksin G<sub>2</sub> ile kontamine olduğunu fakat örneklerin hiç birisinin Türk Gıda Mevzuatı'nda belirtilen maksimum aflatoksin limitlerini aşmadığını belirlemişlerdir.

Gourama ve Bullerman (1988), potasyum sorbat ve natamisin *Aspergillus ochraceus*'un gelişmesi ve penisilik asit oluşturma kabiliyeti üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırma kapsamında önce 500, 1000 ve 1500 µg/mL potasyum sorbat ve 1, 10, 20 µg/mL natamisin konsantrasyonları denenmiştir. Deneme sıcaklıkları 15, 25 ve 35°C olarak belirlenmiş ve süre olarak da 7, 14 ve 21. günler esas alınmıştır. Belirtilen oranlarda sorbat içeren maya ekstraktı/sakaroz besiyerinde, küf gelişimi ve sporlanmanın geciktiği belirtilmiştir. Penisilik asit oluşumunun ise yalnızca 35°C'de koruyucu konsantrasyonunun artışı ile her üç süre sonunda da azalma görüldüğü belirtilmiştir. Natamisinin de küf gelişimi ve spor oluşumunu geciktirdiği ve konsantrasyon artışına paralel olarak penisilik asit oluşumunda azalma olduğu belirtilmiştir.

Leontopoulos ve ark. (2003) *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin oluşumunu inceledikleri bir çalışmada hasarlı siyah zeytinleri substrat olarak kullanmışlardır. Hasarlı zeytinlerde AFB<sub>1</sub> oluştuğu tespit edilmiş olup bunun risk oluşturacak düzeyde olmadığı ve zeytinlerin risk oluşturacak düzeyde aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olmadığı belirtilmiştir.

Ghitakou ve ark. (2006) yeşil ve siyah zeytinlerde *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin oluşumunu inceledikleri bir çalışmada, zeytinlere *A. parasiticus* aşlamışlar ve inkübasyon süresi boyunca toksin oluşumunu incelemişlerdir. Siyah zeytinlerde toksin oluşmazken, yeşil zeytinlerde 18 günlük inkübasyon süresi sonunda 65 ppb düzeyinde AFB<sub>1</sub> oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Yiğit ve Korukluoğlu (2007) fermente siyah zeytinlerde bozulma etmeni küflere (*Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Fusarium semitectum* ve *Penicillium roqueforti*) karşı koruyucu olarak potasyum sorbatın değişik konsantrasyonlarını (100-1000 mg/L), farklı pH değerleri (pH 4,5, pH 5, pH 5,5, pH 6 ve pH 6,5) ve tuz konsantrasyonlarında (%0, %3,5, %5, %7,5 ve %10) incelemişlerdir. Tüm faktörlere karşı en hassas küfün *A. alternata* olduğu, en dayanıklı küfün ise *P. roqueforti* olduğu belirtilmiştir. pH değeri 5 iken %3,5 NaCl ortamında 100 mg/L potasyum sorbat uygulamasının *A. alternata* ve *F. semitectum* küflerini inhibe edildiğini belirtmişlerdir. pH 5'de %10 NaCl, 300 mg/L potasyum sorbat ve %7,5 NaCl, 400 mg/L potasyum sorbat uygulamalarının *A. niger* ve *P. roqueforti*'ye karşı koruyucu etki gösterdikleri belirtilmiş ve potasyum sorbatın fermente gıdalarda fungal gelişime karşı uygun bir korucuyu olduğu bildirilmiştir.

### 2.3. Aflatoksinler ve Özellikleri

Gıdalarda ve yemlerde bulunan filamentli funguslar (hifli küfler) denildiğinde taksonomide Mycobiota (funguslar alemi) içinde Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota bölümleri altında yer alan değişik cins ve türdeki funguslar akla gelmektedir. Tarımsal ürünler hasattan başlayarak işleme ve depolama aşamalarında ortam koşullarına, tarım ürününün bileşimine ve su içeriğine bağlı olarak değişik küflerle kontamine olurlar (Tunail 2000).

Küfler gıdalarda meydana getirdikleri çeşitli olumlu ve olumsuz değişiklikler nedeniyle hem sağlık açısından hem de endüstriyel açıdan önemlidirler. Küfler gıda maddelerinde renk bozulmaları, acılık, arzu edilmeyen kokuların oluşumu, beslenme değerinde kayıplar ve mikotoksin oluşumu gibi olumsuzluklara neden olabilmektedirler (Topal ve ark. 1999).

Mikotoksinler, birçok gıdada ve yem maddesinde küfler tarafından üretilen, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden ikincil küf metabolitleridir. Küf gelişmesi ve mikotoksin üretimi üzerine etkili olan faktörler; substratın kimyasal yapısı, substratın nemi, sıcaklık, pH değeri, bulaşma oranı ve oksijendir (Betina 1989, Northolt ve ark. 1996, Tunail 2000).

Gıda ve yemler çok çeşitli küflerle kontamine olabilmektedir. Mikotoksin üreten küf sayısının günümüzde yaklaşık 350 kadar olduğu bilinmektedir. Mikotoksinlerin çoğu *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* ve *Alternaria* gibi küfler tarafından üretilmektedir (Tunail 2000).

Üretici suşları, oluşum şartları, kimyasal yapıları ve gösterdikleri toksik etkiler bakımından birbirinden ayrılan mikotoksinlere, küf gelişiminin gözlemlendiği birçok gıdada rastlanabilir. Karşılaşılma sıklığı ve toksik etkileri göz önüne alındığında aflatoksinler, okratoksinler, sitrinin, penisilik asit ve patulin önemli mikotoksinlerdir. Aflatoksinler, gıda ve yemlerde risk oluşturan en önemli mikotoksinlerdendir. Kimyasal olarak bisfuranocoumarin yapısına sahip olup *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius* ve bunların alt türleri tarafından üretilirler. Aflatoksinler B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> ve M<sub>2</sub> formlarına sahip olup, en yüksek toksik etkiyi AFB<sub>1</sub> göstermektedir (Betina 1989, Tunail 2000, Karaca ve Yemiş 2008).

Vücuda alınan aflatoksinin (özellikle AFB<sub>1</sub>) neden olduğu akut, subakut ve kronik olarak seyreden mikotoksikosis aflatoksikosis denir. Hayvanlar üzerinde yapılan çok sayıda

araştırma toksinin kanserojen olduğunu da göstermiştir. AFB<sub>1</sub> insanlar için kanserojen özellikte olup, tüm aflatoksinlerin mutajen ve teratojen etkileri tespit edilmiştir (Betina 1989).

Aflatoksinler sağlık açısından risk oluşturmanın yanı sıra, ekonomik olarak da büyük önem taşımaktadırlar. Dünyada bu nedenle meydana gelen ekonomik kayıpların oldukça yüksek seviyelerde olduğu bildirilmektedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO), dünya gıda üretiminin %25'inin mikotoksinlerle kontamine olduğunu belirtmektedir (Özkaya ve Temiz 2003).

Aflatoksinle bulaşık gıdaların ve yemlerin detoksifikasyonu için akla gelebilecek her yöntem denenmiştir. Aflatoksin gıdalar içerisinde çok stabildir ve termoresistans özelliğinden dolayı pastörizasyon, buharda pişirme, fırında pişirme ve hatta sterilizasyon yöntemleri ile toksinin parçalanması olanaklı değildir (Tunail 2000).

Mikotoksinler stabil yapıda oldukları için gıda ve yemlerde oluştuklarında varlıklarını uzunca bir süre koruyabilmektedirler. Yetiştirme, hasat, depolama ve işleme aşamalarında küf kontaminasyonunun engellenmesine ve mikotoksinlerin oluşumunun önlenmesine çalışılmaktadır. Küf kontaminasyonu ürünün hasatı ve onu izleyen aşamalarda alınacak hijyen ve sanitasyon önlemleri ve bilinçli uygulamalarla büyük ölçüde engellenebilir. Aflatoksin oluşumunun önlenmesinde ikinci ve daha da önemli adım ise hammadde, ara ürünler ve son ürüne çeşitli şekillerde bulaşan küflerin gelişiminin önlenmesidir. Bu da üretimde iyi bir teknoloji kullanma ve bilinçli uygulamalarla mümkün olabilir. Ancak küflerin gelişme isteklerinin az olması ve buna bağlı olarak da hemen hemen her yerde ve koşulda üremeleri nedeniyle, mikotoksin oluşumunun önlenmesinde büyük güçlükler yaşanmakta ve çoğu kez başarısız kalınabilmektedir. Aflatoksin kontaminasyonunun önlenemediği durumlarda üründen aflatoksinin uzaklaştırılması ve detoksifikasyon amacıyla çok sayıda araştırma yapılmakta ve fiziksel (ayıklama, soyma, presleme, adsorbsiyon, süzme, ekstraksiyon, ısıtma, güneşe maruz bırakma), kimyasal (asitlerler, alkaliler, SO<sub>2</sub>, vitamin C, NaCl gibi kimyasal maddelerle muamele) ve biyolojik (kontamine olmuş üründe mikotoksin parçalayan mikroorganizmanın geliştirilmesi, laktik asit bakterileri ile fermantasyon uygulamaları) birçok yöntem denenmektedir (Goldblatt ve Dollear 1977, Tunail 2000, Desphande 2002, Özçelik ve ark. 2003).

Küf kontaminasyonuna maruz kalmış gıdaların, küflü olmayanlardan ayrılması, küflü kısımların soyulması ile meyvelerdeki çürük kısımların ayrılması mikotoksinlerin elimine edilmesinde uygulanan başlıca fiziksel işlemlerdir. Mikotoksinler, ısı işlem uygulamalarında %10-30 oranında parçalanırken, güneş ışığında bu oran daha yüksek olup % 83-94 seviyelerindedir. Yağlı tohumların preslenmesi sonucunda, aflatoksinlerin % 80-85'i pres kekine geçmektedir. Elma suyunda oluşan patulinin uzaklaştırılmasında aktif kömürden süzme işleminin etkili olduğu, aflatoksinlerin parçalanması için gerekli olan UV ve iyonize ışın dozunun çok yüksek olup, gıdalarda istenmeyen değişimlere neden olabileceği belirtilmiştir (Özçelik ve ark. 2003).

Mikotoksinlerin kimyasal yöntemlerle parçalanmasında çeşitli oksidatif maddeler (NaOCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, KMnO<sub>4</sub>, Cl<sub>2</sub>), kuvvetli asit ve alkaliler (NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) kullanılabilir. Yer fıstığının %5'lik NaCl çözeltisi ile kaynatılması sonucu aflatoksin miktarı azalırken, depo atmosferine %5 oranında CO verilip O<sub>2</sub>'nin %2 oranında azaltılması *Aspergillus flavus* gelişimini ve aflatoksin oluşumunu engellediği bildirilmiştir (Özçelik ve ark. 2003).

Aflatoksinin üründen uzaklaştırılması ile ilgili olarak araştırılan fiziksel ve kimyasal uygulamalara dayanan yöntemler, belirli ölçülerde başarılı bulunmalarına karşın; tam olarak toksinleri elimine edememeleri, besin bileşenlerinde kayıplara neden olmaları ve yüksek maliyet gerektirmeleri gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Bu alanda çalışan birçok araştırmacı; dekontaminasyon için en iyi çözümün, biyolojik detoksifikasyon olacağı, bunun tehlikeli kimyasalların kullanılmasını önleyeceği, gıda ve yemlerde besin değerleri ve yenilebilirlik özelliklerinde önemli kayıplara neden olmayacağını belirtmektedirler (Bata ve Lasztity 1999).

Aflatoksinlerin biyolojik olarak parçalanması ile ilgili olarak 1000 kadar mikroorganizmanın, aflatoksinleri parçalamaya yönelik etkinliklerinin araştırıldığı bir çalışmada sadece *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184 suşunun aflatoksinini parçalayabildiği belirlenmiştir (Ciegler ve ark. 1966).

Biyolojik yöntemlerden üzerinde en çok çalışılanlardan biri, mikotoksinin fermentasyon yoluyla giderilmesidir (Özkaya ve Temiz 2003). Gıda üretiminde starter olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksinjenik küflere karşı inhibitör etki gösterdiği de çeşitli araştırmacılarca saptanmıştır (Luchese ve ark. 1992, El-Nezami ve ark. 1998). *Lactobacillus*



*plantarum*'un bazı suşlarının da çeşitli ortamlarda *Aspergillus parasiticus*'un bazı suşlarını veya aflatoksin üretimlerini inhibe ettiği bilinmektedir (Gourama ve Bullerman 1995, Onilude ve ark. 2005).

Mikotoksinlerin sağlık üzerinde olumsuz etkilerinin belirlenmesi ve ihracatı yapılan pek çok tarımsal ürünün mikotoksin içermesi nedeniyle uluslararası pazarlarda yer bulamayıp ekonomik kayıplar yaşanması, bu konuda yasal düzenlemelerin yapılmasını zorunlu kılmıştır. Günümüzde pek çok ülke aflatoksin, okratoksin A, sitrinin, patulin, zearalenon, deoksinivalenol, T-2 toksin, fumonisin gibi mikotoksinlerin gıda ve yemlerde bulunabilecek en yüksek düzeylerini yasal olarak belirlemiştir (Tunail 2000). Çizelge 2.1.'de Türkiye'de gıda maddeleri için belirlenen aflatoksin limit değerleri görülmektedir.

Tarım ürünlerimizin başta AB ülkelerinde olmak üzere, gelişmiş ülkelerde pazar bulabilmesi ve pazar payını arttırabilmesinin ilk koşulu, o ülkelerin standartlarına uygunluğu ile sınırlıdır. Bilindiği gibi AB ve diğer gelişmiş ülkelerde çevre ve insan sağlığı çok önemlidir. Bunun içindir ki hiçbir gelişmiş ülke, hatta gelişmekte olan ülkeler bile, standartlarına uygun olmayan tarım ürünlerinin sınırlarından içeri girmesini istememektedirler (Delen 2000).

**Çizelge 2.1.** Türkiye’de gıda maddeleri için belirlenen aflatoksin limit değerleri (Anonim 2008)

<b>Gıda Maddesi</b>	<b>Maksimum limit (µg/kg)</b>		
	<b>B<sub>1</sub></b>	<b>B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub></b>	<b>M<sub>1</sub></b>
<b>AFLATOKSİN</b>			
Fındık, antepfıstığı gibi sert kabuklu meyveler, yer fıstığı, yağlı tohumlar, kuru meyveler ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar	5,0 <sup>(1)</sup>	10,0 <sup>(1)</sup>	-
Yerfıstığı (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	8,0 <sup>(1)</sup>	15,0 <sup>(1)</sup>	-
Tahıllar (karabuğday ( <i>Fagopyrum</i> sp.) dahil) ve bunlardan üretilen işlenmiş gıdalar (doğrudan tüketilen veya gıda bileşeni olarak kullanılan)	2,0	4,0	-
Mısır (doğrudan tüketime sunulmadan veya gıda bileşeni olarak kullanılmadan önce sınıflandırma, ayıklama gibi fiziksel işlemlere tabi tutulacak olan)	5,0	10,0	-
Çiğ süt <sup>(2)</sup> , ısıtılmış süt, süt bazlı ürünlerin üretiminde kullanılan süt	-	-	0,050
Baharatların aşağıdaki türleri için; - Kırmızıbiber ( <i>Capsicum</i> spp.) (bunların kurutulmuş meyveleri, kırmızıbiber ve acı kırmızıbiberin bütün ve toz hali dahil) - Karabiber ( <i>Piper</i> spp.) (bunların meyveleri, akbiber ve karabiber dahil) - Hintceviz/Muskat ( <i>Myristica fragrans</i> ) - Zencefil ( <i>Zingiber officinale</i> ) - Zerdeçal ( <i>Curcuma longa</i> )	5,0	10,0	-
Bebek ve küçük çocuk ek gıdaları <sup>(3)</sup>	0,10	-	-
Bebek formülleri ve devam formülleri <sup>(4)</sup> (bebek sütleri ve devam sütleri dahil)	-	-	0,025
Bebekler için özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar <sup>(5)</sup>	0,10	-	0,025
Diğer gıda maddeleri (bulunması muhtemel riskli gıdalar)	5,0	10,0	0,5

<sup>(1)</sup> Maksimum limit yerfıstığı, fındık ve kuru meyvelerin yenilebilir kısımlarına uygulanır. Fındık, kabuklarıyla analiz edilecek ise aflatoksin içeriği hesaplanırken bulaşanın tümünün yenilebilir kısım üzerinden olduğu kabul edilir

<sup>(2)</sup> “TGK – Çiğ Süt ve Isıtılmış Görmüş İçme Sütleri Tebliği”nde tanımlanan ürünü kapsar.

<sup>(3)</sup> “TGK – Bebek ve Küçük Çocuk Ek Gıdaları Tebliği”nde tanımlanan gıdaları kapsar. Maksimum miktar kuru madde üzerinden geçerlidir.

<sup>(4)</sup> “TGK – Bebek Mamaları ve Bebek Formülleri Tebliği” ve “TGK – Devam Mamaları ve Devam Formülleri Tebliği”nde tanımlanan ürünleri kapsar. Bu ürünler için maksimum limit üretici tarafından verilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan kullanıma hazır olarak satışa sunulan ürünlere uygulanır.

<sup>(5)</sup> “TGK – Özel Tıbbi Amaçlı Diyet Gıdalar Tebliği”nde tanımlanan ürünleri kapsar. Maksimum limit, süt ve süt ürünleri için üretici tarafından verilen kullanım talimatına göre hazırlanan veya doğrudan kullanıma hazır olarak satışa sunulan ürünleri ve süt ve süt ürünleri dışındaki ürünler için ise kurumadde üzerinden geçerlidir.

## 2.4. Baharatların Antimikrobiyal Etkinliği

Tüm dünyada baharatlar gıda hazırlamada yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Kullanılan baharatlar ülke ve kültürlerle göre oldukça farklı olmasına rağmen, kullanım amacı genellikle gıdaların lezzetini artırmaktır. Baharatların gıda maddelerinde kullanımı ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sonucunda ortaya çıkan bir diğer kullanım nedeni ise, bazı baharatların patojenlere karşı inhibitör etki göstererek, gıdaların raf ömrünü uzatmasıdır (Billing ve Sherman 1998).

Sekonder bileşikler (alkoller, uçucu yağlar, glikozidler, flavanoidler, tanenler, fenoller, renk maddeleri ve reçineler) açısından zengin olan bitki türleri tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer almaktadır (Baydar 2005, Koyuncu ve ark. 2008).

Baharatlar ile baharatlardan elde edilen ekstraktların, uçucu yağların ve bileşenlerinin değişik bakteri ve fungus türlerine karşı inhibitör etkileri çeşitli *in vitro* çalışmalarla araştırılmaktadır. Yapılan araştırmalar sonucunda bazı bitkilerin ekstrakt ve uçucu yağlarının antimikrobiyal özellik gösterdiği belirtilmiştir (Akgül 1993, Boyraz ve Özcan 1997, Dorman ve Deans 2000, Baydar ve ark. 2004).

Baharatların gıda muhafazasında kullanımı ile ilgili olarak laboratuvar çalışması ilk kez 1911 yılında Hoffman ve Evans tarafından yapılmıştır. Günümüzde, doğal koruyucuların kullanımına karşı ilginin artması, baharatların antimikrobiyal etkileri konusundaki araştırmaların yaygınlaşmasına neden olmuştur. Ayrıca fermente ürünlerin üretiminde kullanılan starter kültürlerle karşı inhibitör aktivitelerinin bilinmesi gereği de, bu araştırmaların önemini artırmaktadır (Çon ve ark. 1998).

Antimikrobiyal bileşikler mikrobiyal gelişimi ya da canlılığı azaltarak işlenmiş ya da işlenmemiş gıdaların raf ömrünü uzatabilirler. Bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin gıda güvenliğini yüksek oranlarda korumayı başardığı ve bitkisel ekstraktların gıdalarda doğal antimikrobiyal olarak kullanılabilceği yapılan bilimsel araştırmalarla kanıtlanmıştır (Kotzekidou ve ark. 2008).

Gıda kaynaklı pek çok patojen kekik, mercanköşk, tarçım, sarımsak, hardal, soğan, köri, fesleğen, zencefil gibi bitkilerin ekstraktlarına karşı duyarlıdır. Bitki ve baharatlardaki

antimikrobiyal bileşenler en çok bunların esansiyel yağ fraksiyonlarında bulunmaktadır. Gram-pozitif bakteriler, Gram-negatif bakterilere göre baharatlardaki antimikrobiyal bileşenlere karşı daha hassastırlar. Bazı baharatlar starter kültürün asit üretimini teşvik ederek, fermentasyon hızına olumlu yönde etki ederler. Baharatların yapısında bulunan bazı antimikrobiyal bileşenler fenoller, alkoller, eterler, aldehitler, ketonlar ve hidrokarbonlardır (Marino ve ark.1999, Ceylan ve Fung 2004).

Dünya genelinde gıda kaynaklı hastalıklar önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Gıda zehirlenmeleri, koruyucu yöntemler kullanılmasına rağmen halen hem tüketicileri hem de gıda endüstrisini tehdit etmektedir. Buna rağmen tüketicilerin, koruyucu içeren gıdaların güvenliği konusunda endişeleri vardır. Bu nedenle, gıda kaynaklı hastalık olaylarının azaltılması için daha yeni ve daha etkili tekniklere artan bir şekilde ilgi vardır. Yapılan araştırmalar sonucunda, bitkiler gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin güvenli gıda üretimine katkıda bulunduğu belirtilmektedir (Alzokery ve Nakahara 2003, Koyuncu ve ark. 2008).

Bazı esansiyel yağ bileşenlerinin, antifungal etkinlikleri ve antiaflatoksijenik özellikleri üzerine yapılan bir çalışmada; 20 adet esansiyel yağ bileşeninin, *Aspergillus flavus*'un gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Geraniol, nerol, citronellol (alifatik yağ), cinnamaldehyde (aromatik aldehid) ve timolün (fenolik keton) *A. flavus* gelişimini ve toksin sentezini tamamen inhibe ettiği, cinnamaldehyde ve timol bileşenlerinin minimum inhibisyon konsantrasyonları 200-250 ppm iken, geraniol, nerol ve citronellol bileşenlerinin ise 500 ppm olduğu belirtilmiştir. Citral, citronellal ve öjenol bileşenlerinin fungal gelişim ve toksin oluşumunu 8 günlük inkübasyon süresince engellediği, 15 günden sonra ise toksin üretiminin kontrolden büyük çıktığı bildirilmiştir (Ale 1994).

Asehrou ve ark. (1997) yeşil zeytin fermentasyonunda maya ve küflerin inhibe edilebilmesi amacıyla bütün halinde sarımsak, sarımsağın su ekstraktı ve yağını kullanmışlardır. En yüksek inhibitör etkiyi sarımsak yağının gösterdiğini, laktik asit bakterileri üzerinde ise herhangi bir inhibitör etkinin belirlenmediğini bildirmişlerdir.

Montes-Belmont ve Carvajal (1998) mısır tanelerini *A. flavus* türüne karşı koruma amaçlı yaptıkları bir araştırmada; kekik, mercanköşk, karanfil, tarçın, fesleğen, nane ve Meksika çayı bitkilerinin esansiyel yağlarının, mısır tanelerinde küf gelişimini inhibe ettiğini, yağların

bileşiminde bulunan timol ve o-methoxycinnamaldehyde bileşenlerinin mısır tanelerindeki kontaminasyonu önemli ölçüde azalttığını ve bu etkinin gerçekleştiği optimal dozunda %3-5 olduğunu belirtmişlerdir.

Fan ve Chen (1999), Galler soğanının etanol ekstraktının *A. flavus* ve *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, *A. flavus* ve *A. parasiticus* sporlarının canlı kalmasının ekstrakt konsantrasyonuna ve ekstraktın etkisine maruz kaldığı süreye bağlı olduğunu bildirmişlerdir. 10 mg/mL konsantrasyondaki ekstrakt ile sıvı besiyerinde 25 °C sıcaklıkta 30 gün boyunca muamele edilen küflerde misel gelişiminin tamamen inhibe edildiğini belirtmişlerdir. 2 haftalık inkübasyon süresince, 10 mg/mL ekstrakt ilavesinin aflatoksin üretimini inhibe ettiği, 5 mg/mL'lik ekstrakt konsantrasyonunun ise çok düşük miktarda aflatoksin üretimine izin verdiği ve bu sonuçlar doğrultusunda Galler soğanı ekstraktının test edilen küflere karşı, aynı konsantrasyonda ilave edilen sorbat ve propiyonat gibi koruyucularla aynı güçlü inhibitör etkiyi gösterdiği bildirilmiştir.

Bir çeşit su yosunu olan *Sargassum filipendula* ekstraktının *A. parasiticus* gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Martinez-Lozano ve ark. 2000).

*A. flavus*'un gelişimi ve Aflatoksin B<sub>1</sub> oluşumunun inhibe edilmesi amacıyla Pinto ve ark. (2001) *Polymnia sonchifolia* yapraklarının sulu ekstraktlarını kullanmışlardır. Bu amaçla *A. flavus*'un spor süspansiyonundan ve ekstraktın farklı konsantrasyonlarından 50 mL'lik YES medium içerisine inoküle etmişler ve Aflatoksin B<sub>1</sub>'i ince tabaka kromatografisi ile belirlemişlerdir. Ekstraktın, kullanılan tüm konsantrasyonları AFB<sub>1</sub> üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

Rajkumar ve Berwal (2003) *Penicillium chrysogenum*, *P. expansum*, *P. verrugosum*, *A. flavus* ve *A. parasiticus* toksijenik küfleri üzerine karanfil (*Eugenia caryophyllus*) ekstraktının inhibitör etkinliğini inceledikleri bir çalışmada *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. verrugosum*, *A. flavus* ve *A. parasiticus* küfleri üzerine minimum inhibisyon konsantrasyonlarını sırasıyla %0,86, %1,12, %1,08, %1,30 ve %0,92 ağırlık/hacim (a/h) olarak belirlemişlerdir.

Rhajaoui ve ark. (2003) Fas'ta yetişen, endemik bir bitki türü olan *Zygophyllum geatum*'un metanol, etanol, kloroform ve su ile elde edilmiş ekstraktlarının bazı patojenik küfler üzerine etkilerini incelemişlerdir. İncelenen tüm küflere karşı en yüksek inhibitör etkiyi, *Zygophyllum*

*geatumum*'un metanol ekstraktının gösterdiği ve minimum inhibisyon konsantrasyonu değerinin 200-600 µg/mL olduğunu bildirmişlerdir. Metanol ekstraktının en yüksek antifungal etkiyi 4 mg/mL konsantrasyonda gösterdiği, 1 mg/mL'lik konsantrasyonda *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un gelişimini sırasıyla %17 ve %67 oranında azalttığını, etanol ekstraktının ise fungal gelişimin engellenmesi üzerine kısmi bir etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

*A. parasiticus* NRRL 2999 suşunun gelişimi üzerine bazı baharat hidrosollerinin etkisinin *in vitro* olarak incelendiği bir çalışmada; anason, kimyon, rezene, nane, mercanköşk, zahter ve kekik hidrosollerinin misel gelişimi üzerine güçlü inhibitör etki gösterdiği; sumak, deniz rezenesi, biberiye, adaçayı, Ege adaçayı, defne ve fesleğen hidrosollerinin misel gelişimini tam olarak inhibe etmediği ve en düşük inhibitör etkiyi sumağın gösterdiği bildirilmiştir (Özcan 2005).

Rasooli ve Owlia (2005), *Thymus eriocalyx* ve *Thymus X-porlock*'dan elde edilen esansiyel yağların *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, esansiyel yağların içindeki başlıca bileşenlerin sırasıyla timol (%31,7-63,8), β-phellandrene (%13,30-38,7), *cis*-sabinene hydroxide (%8,1-9,6), 1,8-cineole (%1,7-2) ve β-pinene (%1,31-2) olduğu belirtmişlerdir. *A. parasiticus* gelişimini durdurmak için gerekli olan doz 250 ppm iken, letal dozun *Thymus eriocalyx* için 500 ppm, *Thymus X-porlock* için ise 1000 ppm olduğunu belirtmişlerdir. Elektron mikroskopunda yaptıkları inceleme sonucunda *A. parasiticus*'un inhibisyonu için gerekli minimum inhibisyon konsantrasyonu olan 250 ppm esansiyel yağ ile muamele sonucunda hücre duvarı, hücre zarı ve hücre organellerinin zarar gördüğünü belirtmişler ve sonuç olarak esansiyel yağların bazı gıda maddelerinde fungal enfeksiyonlara karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Sanchez ve ark. (2005) mısırdaki *Agave asperrima* ve *Agave striata* türlerinin etanol, metanol ve su ekstraktlarının *A. flavus*, *A. parasiticus* gelişimi ve aflatoksin üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. *Aspergillus* suşlarında 10<sup>6</sup> spor/mL veya 6 g mısıra 10<sup>6</sup> spor olacak şekilde aşılama yapmışlar ve bitki ekstraktlarını da ilave ederek 28°C'de 8 gün inkübasyona bırakmışlardır. En yüksek inhibitör etkinliği, bitkilerin çiçeklerinden elde edilen ekstraktların gösterdiğini, minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) besiyerinde 0,5-2 mg/mL olduğunu belirtmişlerdir. Bitkilerin saplarından elde edilen ekstraktlarda besiyerinde gözlenen minimum inhibisyon konsantrasyonunun 15-30 mg/mL olduğu ve çiçek ekstraktlarının minimum inhibisyon konsantrasyonunun, mısırdaki gerçekleştirilen denemelerde yüksek (>30

mg/g) olduğunu belirtmişlerdir. Aflatoksinlerin %99'unun, MİK değerlerinin yarısı ile inhibe edildiği belirtilmiştir.

Vargas-Arispuro ve ark. (2005), *Larrea tridentata* (gür çalılık) ekstraktının *A. flavus* ve *A. parasiticus* üzerine antifungal etkinliğini inceledikleri bir çalışmada *Larrea tridentata* ekstraktında bulunan metil-nordihidroguaiaretik asit (metil-NDGA) ve nordihidroguaiaretik asidin (NDGA) her iki küf türüne karşı antifungal aktiviteye sahip olduklarını, metil-NDGA'nın 300 mg/mL düzeyinde, NDGA'nın ise 500 mg/mL düzeyinde uygulanmasıyla küf gelişimini inhibe ettiklerini bildirmişlerdir.

Boyras ve Koçak (2006) kekik (*Thymus vulgaris* L.), kimyon (*Cuminum cyminum* L.), ardıç (*Juniperus communis* L.), nane (*Mentha piperita* L.), zakkum (*Nerium oleander* L.), sarmaşık (*Hedera helix* L.), çörtük (*Echinophora tenuifolia* L.), ısırgan (*Urtica dioica* L.), okaliptus (*Eucalyptus* sp.) ve yavşan (*Artemisia* sp.) ekstraktlarının, *Alternaria mali* Roberts, *Fusarium oxysporum* Synder & Hansen, *Botrytis cinerea* Pers., *Sclerotinia sclerotiorum* (Libert) de Bary ve *Colletotrichum circinans* (Berk.) Vogl. üzerine inhibitör etkilerini incelemişlerdir. Bitki ekstraktlarını 0,5 mL, 1 mL ve 2 mL/100 mL besiyeri dozunda uygulamışlar ve kekik ekstraktının test edilen tüm küflerin gelişimini tamamen engellediğini belirtmişlerdir. Kimyon ekstraktının yüksek dozlarının küflerin gelişimini tamamen engellediğini, buna karşın düşük dozlarının *A. mali* ve *S. sclerotiorum*' a karşı düşük antifungal etki gösterdiğini, çörtük, nane, okaliptus, ardıç ve zakkum ekstraktlarının küflerin gelişimlerini %26-%100 oranlarında engellediğini, sarmaşık ve ısırgan ekstraktlarının ise daha düşük oranlarda engelleme gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Anason uçucu yağının (*Pimpinella anisum* L) *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* ve *A. parasiticus* üzerine antifungal etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, farklı konsantrasyonlarda anason yağının, *A. alternata*, *A. niger* ve *A. parasiticus*'un miselyum gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Anason uçucu yağından en çok etkilenen türün *A.s parasiticus* olduğu, bunu *A. niger* ve *A. alternata*'nın izlediği belirtilmiş ve sonuç olarak anason uçucu yağının tek başına kullanılması durumunda gıdaların raf ömrünü koruyabileceği rapor edilmiştir (Özcan ve Chalchat 2006).

*Pimpinella anisum* (anason), *Peumus boldus* (boldus), *Mentha piperita* (nane), *Origanum vulgare* (mercanköşk) ve *Minthostachys verticillata* esansiyel yağlarının *Aspergillus*

türlerine (*A. parasiticus*'un 2 suşu ve *A. flavus*'un 2 suşu) karşı inhibitör etkilerinin incelendiği bir araştırma sonucunda anason ve boldus esansiyel yağlarının en yüksek antifungal aktiviteyi gösterdiği; anason, boldus ve mercanköşk esansiyel yağlarının AFB<sub>1</sub> oluşumunu tamamen inhibe ettiği, biber ve nane esansiyel yağlarının ise etkinliği incelenen tüm konsantrasyonlarda AFB<sub>1</sub> oluşumunu %85-90 oranında inhibe ettikleri bildirilmiştir (Bluma ve ark. 2008).

Carmo ve ark. (2008) bazı *Aspergillus* türlerinin (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus* ve *A. niger*) gelişiminin inhibe edilmesinde, *Origanum vulgare* L. esansiyel yağının etkisini inceledikleri bir çalışmada, esansiyel yağın, test edilen tüm küflere karşı güçlü bir inhibitör etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) 20-80 µL/mL arasında olduğu, küf gelişimlerinin 40-80 µL/mL konsantrasyonlarda tamamen inhibe edildiğini belirtmişlerdir.

Kekik, adaçayı ve defnenin metanol ekstraktının 11 maya türüne (*Candida krusei*, *C. clus*, *Rhodotorula rubra*, *C. albicans* 10039, *C. tropicalis*, *C. glabrata* 70164, *C. parasitosis*, *C. insane*, *C. rhodotonla*, *C. holmii* ve *C. glabrata* 13b) karşı antimikotik etkinliğinin *in vitro* olarak araştırıldığı bir çalışmada (Ünver ve ark. 2008), kekik ekstraktının araştırılan tüm mayalara karşı oldukça yüksek bir antimikotik etkinlik gösterdiği, defne ekstraktının 40 ppm düzeyinde *C. tropicalis*'e karşı kekiğe benzer düzeyde bir etkinlik gösterdiği fakat adaçayında herhangi bir antimikotik etkinlik görülmediği bildirilmiştir.

Bazı araştırmacılar, ekstraktların antifungal etkisinin, uçucu yağlarınkine göre düşük olmasının, ekstraktın içerdiği etken madde miktarı, stabilitesi ve etki seviyesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Ekstrakt içeriğinin bazı fungusların beslenmesi için iyi bir besin kaynağı olmasıyla da teşvik edici etkinin ortaya çıkabildiği, bazı bitki ekstraktlarının bazı mikroorganizmaların gelişmesini engellediği, diğer bazı mikroorganizmalar üzerinde hiçbir etki yapmadığı ve hatta gelişimlerini teşvik ettiği bildirilmiştir (Singh ve ark. 1980, Çakır ve Yeğen 1991, Boyraz ve Özcan 1997).



#### 2.4.1. *Origanum onites*'in antimikrobiyal etkinliği

Türkiye, zengin bir bitki örtüsüne sahip olup, pek çok *Origanum* türü halk arasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. *Origanum* cinsi Türkiye'de 23 tür 32 takson, dünyada 41 tür 52 taksonla temsil edilir. *Origanum onites* Türkiye'de ticareti yapılan türler arasında en çok ihracatı gerçekleştirilen türdür. Ülkemizde Ege ve Akdeniz Bölgelerinde doğal olarak yetişir. Halk arasında bilyalı kekik, taş kekik, peynir kekiği, İzmir kekiği gibi yöresel adlarla bilinen *O. onites*, doğal floramızın bir ürünü olmasının yanı sıra kültür bitkisi olarak yetiştirilen tek ticari *Origanum* türüdür. Yaygın bir kullanıma sahip olan ve ekonomik açıdan önemli olan bu bitki, halk arasında yemeklerde baharat olarak ve çeşitli şekillerde hastalıkların tedavisinde kullanılır. Uçucu yağı ile yapılan çalışmalarda analjezik etkisi tespit edilmiştir. Yüksek miktarda fenol içermesi nedeni ile antibakteriyel, antispazmodik ve antiseptik etkileri bilinmektedir (Davis 1982, Başer ve ark. 1993, Özhatay ve ark. 1997, Oflaz ve ark. 2002).

Akgül ve Kıvanç (1988), pH değeri 3,5 ve 5,5 olan kültür ortamında gıda kaynaklı 9 küf türüne karşı 10 çeşit Türk baharatı, kekik esansiyel yağı, timol ve karvakrolün inhibitör etkisini araştırmışlardır. Mukayese için sodyum klorür, sorbik asit ve sodyum benzoat ile kekik ve sodyum klorür kombinasyonunu aynı şartlarda denemişler ve araştırılan baharatlardan yalnızca kekiğin % 1,0, % 1,5 ve % 2,0 konsantrasyonlarının tüm küflere karşı etkili olduğu belirtilirken % 8'lik sodyum klorürün kekikten daha düşük etkinlik gösterdiği belirtilmiştir. Kekik esansiyel yağı, timol ve karvakrolün %0,025 ve %0,05 konsantrasyonlarında, aynı konsantrasyonda etkisi denenen sorbik asitten daha yüksek bir inhibitör etki göstererek, tüm küflerin gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Kekik ve sodyum klorürün kombine bir biçimde uygulanması sonucunda sinerjik bir antifungal etkinin olduğu bildirilmiştir.

Sokovic ve ark. (2002) Yunanistan'da yetişen *O. onites*, *Satureja thymbra*, *Salvia fruticosa* (Yunan adaçayı), ve *Salvia pomifera* subsp. *calycina* esansiyel yağları ile bunların komponentleri olan karvakrol, kafur ve 1,8-cineolenin gıda zehirlenmelerine neden olan, bitki, hayvan ve insan patojeni 13 küf türü üzerine antifungal etkinliklerini araştırmışlardır. Yağların test edilen tüm küf türlerine karşı farklı derecelerde inhibisyon etkilerinin olduğunu belirlemişlerdir. En düşük etkiyi adaçayı gösterirken, karvakrol bileşenini içeren *O. onites* ve *S. thymbra* esansiyel yağları en yüksek inhibitör etkiyi gösterdiği bildirilmiştir. Etkinliği

araştırılan komponentler içerisinde en düşük antifungal aktiviteyi 1,8-cineole gösterirken karvakrolün en yüksek antifungal aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

*Thymus* ve *Origanum* sp. türü bitkilerin en önemli bileşeni olan karvakrol bileşiğinden antifungal olarak yararlanılabileceği belirtilmiştir (Romero-Martinez ve ark. 2007).

Kekik (*O. onites*) uçucu yağının bazı et ürünlerinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin incelendiği bir araştırmada (Ekici ve ark. 2008), kontrol ve 250 ppm'lik uçucu yağ uygulamalarına göre 500 ve 1000 ppm'lik uçucu yağ uygulamalarının, mikrobiyolojik özelliklerde yaklaşık olarak 1-2 kob/g logaritmik bir azalma sağladığı belirtilmiştir.

#### **2.4.2. *Satureja hortensis*'in antimikrobiyal etkinliği**

*Lamiaceae* familyasında bulunan *Satureja* cinsi Türkiye'de 5'i endemik 15 türle temsil edilmektedir. *Satureja hortensis*, halk arasında zahter, sater, çibriska gibi isimlerle anılmaktadır (Davis 1982, Boyraz ve Özcan 1997, Özhatay ve Atay 1997).

Boyraz ve Özcan (1997) *S. hortensis* ekstraktı ve uçucu yağının *Alternaria solani*, *Colletotrichum coccodes*, *Fusarium oxysporium melonis* ve *Rhizoctonia solani* fungusları üzerine antifungal etkinliğini *in vitro* bir çalışma ile belirlemişlerdir. Ekstraktı 1 mL/100 mL ve 2 mL/100 mL besiyeri dozunda, uçucu yağı ise 0,1 mL/petri ve 0,2 mL/petri dozunda uygulamışlardır. *S. hortensis* ekstraktı ve uçucu yağının, test edilen tüm funguslarda misel gelişimini inhibe ettiğini belirlemişlerdir. Aynı araştırma kapsamında antifungal etkinliği araştırılan kapari ekstraktının ise, *A. solani* ve *C. coccodes*'e karşı antifungal etkinlik göstermediği, misel gelişimlerini kontrole göre belli oranlarda arttırdığı belirtilmiştir.

Boyraz ve Özcan (2006) *S. hortensis* ekstraktının *Alternaria mali* Roberts ve *Botrytis cinerea* Pers. gelişimine etkisini inceledikleri bir çalışmada, *S. hortensis* ekstraktının uygulanan tüm dozlarda (%0,5, %1 ve %2) %100 inhibisyon etkinliği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Omidbeygi ve ark. (2007) kekik, zahter ve karanfil esansiyel yağlarının 0, 50, 200, 350 ve 500 ppm konsantrasyonlarda *A. flavus* üzerine, sıvı besiyeri ve domates salçasında  $25 \pm 0,5$  °C'de 2 ay depolama sonucundaki antifungal etkinliklerini incelemişlerdir. Etkinliği

test edilen tüm esansiyel yağların *A. flavus* gelişimini inhibe edebildiği, kekiğin en yüksek inhibitör etkinliği 350 ppm konsantrasyonda, zahterin ise 500 ppm konsantrasyonda gösterdikleri bildirilmiştir. Domates salçasında yürütülen çalışmada ise, esansiyel yağların inhibitör etkinliklerinin kültür besiyerindekinden daha düşük olduğu belirtilmiştir.

Dikbaş ve ark. (2008) *S. hortensis* esansiyel yağı ve metanol ekstraktının *A. flavus* üzerine antifungal aktivitesini araştırdıkları bir çalışma sonucunda, esansiyel yağın ekstrakta göre inhibisyon zonu ve minimum inhibisyon konsantrasyonu bakımından daha güçlü bir antifungal aktivite gösterdiğini ve *S. hortensis* esansiyel yağının çevre dostu bir botanik fungusit olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Razzaghi-Abyaneh ve ark. (2008) *S. hortensis* uçucu yağının *A. parasiticus* NRRL 2999 suşunun AFB<sub>1</sub> ve AFG<sub>1</sub> üretme kabiliyeti üzerine etkisini incelemişler, uçucu yağın bileşiminde bulunan karvakrol ve timol bileşenlerinin fungal gelişimi ve aflatoksin oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir.

#### **2.4.3. *Capsicum annuum*'un antimikrobiyal etkinliği**

Güney Amerika kökenli bir bitki olan *Capsicum annuum*'un, içerdiği kapsaisin adı verilen alkaloidin antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Xing ve ark. 2006).

Dorantes ve ark. (2000) tarafından yapılan bir araştırmada, *C. annuum*'un fenilpropanoidleri olarak kapsaisin, dihidrokapsaisin, sinamik asit, *m*-kumarik asit, ve *o*-kumarik asit tanımlanmış ve *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium* ve *Bacillus cereus* üzerinde ki inhibitör etkinin sinamik asit ile *m*-kumarik asitten kaynaklandığı tespit edilmiştir.

Iorizzi ve ark. (2002) *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum* çekirdeklerinden elde edilen, capsicoside E, capsicoside F, capsicoside G ve oligoglikozitler olarak adlandırılan furostanol saponinlerin bazı maya (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kloeckera apiculata*, *Candida albicans*, *Hanseniaspora osmophila*, *H. vineae*, *H. uvarum* ve *H. guilliermondii*) türlerine karşı yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Careaga ve ark. (2003) *C. annuum* ekstraktının *S. typhimurium* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine inhibitör etkisini inceledikleri bir çalışmada, test mikroorganizmalarını sığır eti kıymasına ve farklı konsantrasyonlarda ekstrakt ilave ederek 7°C'de 7 gün süre ile depolamışlardır. *C. annuum* ekstraktının bakteriyel gelişimi engellediği bildirilirken, *Salmonella typhimurium*'un gelişiminin engellenmesi için gerekli olan minimum inhibisyon konsantrasyonunun 1,5 mL/100g et olduğu bildirilmiştir. *Pseudomonas aeruginosa* içinse 0,3 mL/100 g ekstrakt konsantrasyonunun bakteriyostatik etki gösterdiği, 3 mL/100 g ekstrakt konsantrasyonunun ise bakteriyosidal etki gösterdiği bildirilmiştir.

Acero-Ortega ve ark. (2005) 10 farklı *C. annuum* çeşidinin fenilpropanoidleri ile yaptıkları bir çalışmada, her bir çeşidin bileşiminde bulunan L-fenilalanin, t-sinamik asit, *o*-coumaric asit, *m*-coumaric asit, ferulik asit, kafeik asit ve kapsaisini HPLC ile analiz etmişler ve 10 çeşit ekstraktın 3'ünde antibakteriyal etkinlik tespit etmişlerdir. En yüksek inhibitör etkiyi, yüksek oranda sinamik asit ve kafeik asit içeren çeşidin gösterdiğini bildirmişlerdir.

Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yetişen *Melissa officinalis* (oğul otu), *Mentha piperita* (nane), *Laurus nobilis* (defne), *Rhus coriaria* (sumak), *Dianthus coryophyllum* (karanfil çiçeği), *Piper nigrum* (karabiber), *C. annuum* (acı kırmızı biber), *Juniperus oxycedrus* (katran ardıcı), *Erica arborea* (funda), *Colutea arborescens* (yabani sinameki) ve *Cuminum cyminum* (kimyon) baharatlarının etanol ekstraktlarında yapılan bir çalışmada (Ertürk 2006); *M. piperita*, *L. nobilis* *J. oxycedrus* etanol ekstraktları minimum inhibisyon konsantrasyonu olan 5 mg/mL düzeyinde, 3 Gram-pozitif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) ve 2 Gram-negatif (*Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*) bakteri ile *Candida albicans* ve *Aspergillus niger* üzerinde test edilmiştir. *P. nigrum* ve *E. arborea* ekstraktlarına karşı en hassas bakteri *P.aeruginosa* olarak belirtilirken *L. nobilis*, *D. coryophyllum*, *J. oxycedrus* ve *C. arborescens* ekstraktları *Candida albicans* ve *Aspergillus niger*'e, standart antifungal bir madde olan nistatine göre en yüksek inhibitör etkiyi gösterdikleri belirtilmiştir.

*Piper nigrum* (%1) ve *C. annuum* (%2) kombinasyonunun, modifiye ambalajlı soslerde mikrobiyal gelişimi inhibe ettiği belirlenmiştir (Martinez ve ark. 2006).

#### 2.4.4. *Olea europaea* 'nın antimikrobiyal etkinliği

Zeytin yaprağı, içerdiği fenolik maddeler nedeniyle son yıllarda önemi artan bir üründür. Zeytin yaprağındaki etken fenolik madde olan oleuropein ile bir diğer önemli fenolik madde olan hidroksitirosol, başta gıda ve ilaç sanayi olmak üzere çok farklı kullanım alanları olan, yeni kullanım alanları araştırılan maddelerdir. Zeytin yaprağı ülkemizde bolca bulunmasına karşın konu ile ilgili araştırmaların sınırlı olması, yeterince değerlendirilememesine neden olmaktadır (Erbay ve İçier 2008).

Zeytin yaprağının tıbbi etkisi ilk kez 1854 yılında ateş düşürücü olarak rapor edilmiş olup sonraları antihipertansif ve antibakteriyel etkileri belirtilmiştir. Zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşiklerin oleuropein, luteolin, luteolin-7-glukozit, apigenin, apigenin-7-glukozit, hidroksityrosol, klorojenik asit, *p*-kumarik asit ve rutin olup, bu bileşiklerin mikroorganizmaların gelişimi üzerine geciktirici ve engelleyici etkileri olduğu, zeytin yaprağı ekstraktının antioksidan nitelikte olduğu ve gıda sanayinde antifungal madde olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Pieroni ve ark. 1996, Ryan ve Robards 1998, Karagözler ve ark. 2005, Korukluoğlu ve ark. 2008).

*Olea europaea* L.'den elde edilen alifatik aldehitler (hegzanal, nonanal, (E)-2-hegzanal, (E)-2-heptenal, (E)-2-oktenal, (E)-2-nonenal) ile *Trichophyton mentagrophytes* ve *Microsporium canis* <1,9-125  $\mu\text{g/mL}$  düzeyinde engellenirken, *Candida* türlerine karşı bir inhibitör etkinin olmadığı belirtilmiştir (Batinelli ve ark. 2006).

Zeytin yaprağının antifungal aktivitesi üzerine yapılan bir diğer araştırmada (Korukluoğlu ve ark. 2006) su, etanol, aseton ve etil asetat ekstraktlarının mayalar (*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces uvarum*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia fructicola* ve *Kloeckera apiculata*) zerine etkisi disk difüzyon metodu ile incelenmiş ve sulu ekstrakt hariç diğer tüm ekstraktların çeşitli derecelerde antifungal etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Minimum inhibisyon konsantrasyonu 10-28  $\mu\text{g/mL}$ , fungusidal konsantrasyon 20-48  $\mu\text{g/mL}$  ve inhibisyon zonu çapının ise 1,5-9,3 mm arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının su ve aseton, metanol, etil asetat gibi organik çözücülerden elde edilen ekstraktlarla 30 kf suşuna (*Alternaria alternata*, *Aspergillus*

*chevalieri*, *A. chrysogenum*, *A. elegans*, *A. flavus* (3 suş), *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger* (2 suş), *A. oryzae*, *A. parasiticus* (4 suş), *A. tamari*, *A. versicolor*, *A. wentii*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Mucor racemosus*, *Neurospora crassa*, *Penicillium verrucosum*, *P. citrinum*, *P. echinulatum*, *P. griseofulvum*, *P. italicum*, *P. roqueforti* and *Rhizopus oligosporus*) karşı antifungal etkinlikleri araştırmışlardır. Sulu ekstraktın 10 küfün gelişimini tamamen inhibe ettiğini, aseton ve metanol ekstraktlarının 8, dietil eter ekstraktının da 7 küfün gelişimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. İnhibisyon zonu çaplarının 7-21 mm arasında değiştiği ve en dirençli küfün *A. parasiticus*'un test edilen 4 suşu olduğu, en zayıf küfün ise *A.ventii* olduğunu belirtmişlerdir (Korukluoğlu ve ark. 2008).

## **2.5. Laktik Asit Bakterilerinin Antimikrobiyal Etkinliği**

Aflatoksijenik küflerin ve aflatoksinlerin gıdalardan uzaklaştırılmasında, fiziksel ve kimyasal uygulamaların yanı sıra, biyolojik yöntemlerin üzerinde de durulmaktadır. Aflatoksinlerin ve bunları üreten küflerin bazı mikroorganizmalar tarafından inhibe edildiği çeşitli araştırmacılar tarafından belirlenmiştir. Bu biyolojik kontrol ajanları arasında, endüstriyel açıdan önemli olan, çeşitli gıdaların üretiminde ve olgunlaştırılmasında rol oynayan laktik asit bakterileri önemli bir yer tutmaktadır (Kabak ve Var 2003).

Laktik asit bakterileri, düşük oksidasyon/redüksiyon (O/R) potansiyeline sahip gıdalarda, parçalanmış proteinli ürünlerde ve karbonhidratlarca zengin gıdaların mikrobiyotalarında baskın olarak bulunurlar (Lopez-Diaz ve ark. 2000). Bu bakteriler asitlendirici yetenekleri ile yalnızca gıdaları bozulmalardan korumalarıyla değil, aynı zamanda fermente gıda ürünlerinin tekstür, tat ve aroma gelişimlerine ve sağlıklı beslenme konusunda katkı sağlamalarıyla da gıda endüstrisinde oldukça önemlidirler (Vuyst ve ark. 2003).

Eski çağlardan beri fermentasyon, gıdaların muhafazasına yönelik olarak yapılan bir uygulama olmuştur. Fermentasyon; gıdaların tat, aroma ve besleyici özelliklerinde çeşitli değişiklikler meydana getiren, patojen bakteri ve gıdaları bozan mikroorganizmaların kontrol altına alınmasında oldukça etkili olan ekonomik bir yöntemdir (Holzapfel 2002, Yasmine 2002). Yapılan araştırmalarda laktik asit bakterileri tarafından laktik fermente ürünlerde oluşturulan organik asitlerin, düşük moleküllü, sıcaklığa dayanıklı metabolitler ve protein yapısında olan inhibitör maddeler ile besin maddelerinin tükenmesi ve mikrobiyal yarışın tek ve/veya kombine etkisi ile çeşitli bakteriler ve küfler üzerinde inhibitör etki yaptığı, toksin

oluşumunu etkileyen en önemli biyolojik kontrol ajanları olduğu bildirilmiştir (Holzapfel 1997, Kabak ve Var 2003). Son yıllarda tüketicilerin doğal ve katkısız gıdalara gösterdikleri talep artışı dolayısıyla, laktik asit bakterileri potansiyel gıda koruyucusu olarak önemini sürdürmektedir.

Gıda ve yemlerde bulunan mikotoksinler; özellikle laktik asit bakterileri ile fermentasyon işlemlerini artırmak yoluyla biyolojik olarak parçalanabilir, toksisitesi azaltılabilir veya transforme edilebilir (Gümüş ve Coşkun 2008).

Gıda üretiminde starter olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksijenik küflere karşı inhibitör etki gösterdiği de çeşitli araştırmacılarca saptanmıştır (Luchese ve ark. 1992, El-Nezami ve ark. 1998).

Gourama (1997) laktik asit bakterilerinin antimikotik etkileri nedeniyle, laktik asit bakterilerinin veya metabolitlerinin gıdalarda küf gelişimini ve mikotoksin oluşumunu engellemede doğal koruyucu madde olarak kullanılma potansiyeli olduğunu belirtmiştir.

Laktik asit fermentasyonu ile tüketime hazır hale getirilen bir ürün olan zeytine, fermentasyon başlangıcında starter kültür olarak ilave edilen *Lb. plantarum*'un bazı suşlarının da çeşitli ortamlarda *Aspergillus parasiticus*'un bazı suşlarını veya aflatoksin üretimlerini inhibe ettiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Gourama ve Bullerman 1995, Onilude ve ark. 2005).

Magnusson ve ark. (2003) farklı kaynaklardan izole ettikleri 1200'den fazla laktik asit bakterisinin antifungal etkinliklerini araştırmışlardır. İzole edilen laktik asit bakterilerinin yaklaşık olarak % 10'u *Aspergillus fumigatus*'a karşı inhibitör aktivite gösterirken, % 4 kadarı da güçlü bir aktivite göstermiştir. İnhibitör aktivitesi araştırılan suşların birçoğu *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *Penicillium commune* ve *Fusarium sporotrichioides*'e karşı güçlü bir aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Pek çok suşun inhibitör etkinliğinin depolama sonrasında azaldığı da bildirilmiştir. Araştırmacılar, inhibitör etkinliğin yalnızca laktik veya asetik asit üretimine bağlı olmadığını, antifungal etkinliğin kompleks bir yapısı olduğunu belirtmişlerdir.

Lavermicocca ve ark. (2000) *Lactobacillus plantarum* 21B tarafından üretilen metabolitlerden olan phenyllactic asit ve 4-hydroxy-phenyllactic asidin çeşitli küf türlerine karşı antifungal

aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Özellikle fermente gıdaların üretiminde rol alan bazı laktik asit bakterilerinin ürettiği phenyllactic asit ve 4-hydroxy-phenyllactic'in gıdaların kalite özelliklerinin korunmasında ve muhafazasında etkili olduğu tespit edilmiştir (Valerio ve ark 2004).

Croci ve ark. (1995), laktik asit bakterilerinin sentetik bir besiyerinde *A. parasiticus* NRRL 2999 suşunun aflatoksin oluşturması üzerine etkisini incelemişlerdir. *Lactobacillus casei* ve *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*'in aflatoksin miktarını azaltırken, aynı zamanda aflatoksini metabolize ettiğini ve hidrosillenmiş türevlerine dönüştürerek toksisitesini düşürdüğünü saptamışlardır.

Onilude ve ark. (2005) laktik asit bakterilerinin, aflatoksijenik küfler üzerine inhibitör etkinliklerini incelemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada, yöresel fermente tahıl lapasından 6 adet laktik asit bakterisi (*Lactobacillus fermentum* OYB, *Lb. fermentum* RS2, *Lb. plantarum* MW, *Lb. plantarum* YO, *Lb. brevis* WS3 ve *Lactococcus* spp. RS3) ve çeşitli gıdalardan da 6 adet aflatoksin üretme yeteneğinde olan *Aspergillus* türü küfleri izole etmişlerdir. Küf izolatlarının 2 tanesini Aflatoksin B<sub>1</sub> ve G üreten *A. parasiticus* C2 ve *A. parasiticus* AF7 olarak tanımlamışlarken, 4 tanesinin yalnızca Aflatoksin B<sub>1</sub> üretebilen *A. flavus* M1, *A. flavus* B4, *A. flavus* B5 ve *A. flavus* C6 olarak tanımlamışlardır. İzole edilen laktik asit bakterilerinin her birinin aflatoksijenik *Aspergillus* türlerine karşı inhibitör etkilerinin olduğunu, en yüksek inhibitör etkiyi *Lb. plantarum* YO'nun gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nijerya'ya özgü bazı fermente gıda ve içeceklerde yapılan bir çalışmada, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. lactis* ve *Lb. plantarum*'un ürettikleri bakteriyosinlerin antimikrobiyal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Ogunshe ve ark. 2007).

Tuma ve ark. (2007) Edam peynirinden izole ettikleri 322 adet *Lactobacillus* suşunun *Fusarium proliferatum* M 5689 küfüne karşı antifungal etkinliklerini incelemişlerdir. İzole edilen suşların yaklaşık olarak %21'inin antifungal etkili olduğunu bildirmişlerdir.



## 2.6. Baharat ve Ekstraktlarının Laktik Asit Bakterileri Üzerine İnhibitör Etkileri

Zaika ve ark. (1983) kekiğin, Zaika ve Kissenger (1984) ise karabiberin laktik asit bakterileri üzerine zayıf inhibitör etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Ancak pek çok baharatın laktik asit üretimine etkisi genellikle teşvik edici olarak bildirilmiştir (Karapınar ve Aktuğ 1986).

Kıvanç ve ark. (1991), sıvı besiyerinde %0,5, %1,0 ve %2,0 konsantrasyonlarda baharat olarak uygulanan kimyonun, *Lb. plantarum* ve *Leuconostoc mesenteroides*'in gelişimini ve asit üretimini teşvik ettiğini, uçucu yağının ise yüksek konsantrasyonlarda (300-600 ppm) *Lb. plantarum*'un gelişimi ve asit üretimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Oregano ve esansiyel yağının her iki kültürün gelişimini inhibe ettiğini, oregano baharatının ise *Lb. plantarum*'un asit üretimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir.

Sağdıç ve ark. (2003) bazı bitki ekstraktlarının *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkilerini inceledikleri bir çalışmada, *Coriandrum sativum* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Cerasus mahaleb* (L.) Mill, *Sinapis arvensis* L., *Capsicum annuum* L., *Rosa* spp. ve *Sesamum indicum* L. ekstraktlarının *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkilerinin bulunmadığı, *Melissa officinalis* L., *Cuminum cyminum* L., *Helichrysum compactum* Boiss, *Humulus lupulus* L., *Laurus nobilis* L., *Myrtus communis* L., *Origanum vulgare* L., *Salvia fruticosa* subsp. *hintum*, *Rhus coriaria* ve *Thymbra spicata* ekstraktlarının ise *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkilerinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Ekstraktların laktik asit bakterilerine patojenlerden daha az etkili olduğu, bununda fermentasyon ve sindirim sistemi açısından olumlu bir etki olduğu belirtilmiştir (Sağdıç ve ark. 2003, Arıcı ve ark. 2005, Sağdıç ve ark. 2005 ).

Do ve ark. (2004) bazı tıbbi bitkilerin su ekstraktlarının *Lb. plantarum* üzerine etkisini inceledikleri bir çalışmada, *Terminalia chebula*, *Rubus coreanus miquel* ve *Caesalpinia sapan* bitki ekstraktlarının *Lb. plantarum*'u inhibe ettiğini belirlemişlerdir.

Çon ve ark. (1998) kekik, yenibahar, kimyon, nane, sirmo ve karabiber uçucu yağlarını, aralarında *Lb. plantarum*'un da olduğu bazı bakterilere karşı antimikrobiyal aktivite açısından test etmişlerdir. 32°C'de 48 saatlik inkübasyon sonucunda en yüksek antimikrobiyal etkiye sahip uçucu yağın kekiğe ait olduğu, kekik, yenibahar, kimyon, nane ve sirmo uçucu

yağlarının *Lb. plantarum* üzerinde inhibitör etki gösterdikleri, inhibisyon zon çaplarının 0,5-1,0 mm olduğu belirtilmiştir.

*Artemisia princeps* var. *orientalis* ekstraktının *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, ekstraktın *Lb. plantarum* üzerine herhangi bir inhibitör etkisinin olmadığı tespit edilmiştir (Yuna ve ark. 2008).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Araştırmada materyal olarak kullanılan zeytin çeşitleri, ham siyah zeytin ve salamura siyah zeytin olmak üzere iki farklı çeşit olup, Gemlik'te bir üreticiden temin edilmiştir. Her iki deneme için yaklaşık 40'ar kg zeytin kullanılmış olup, ham zeytinler iki ayrı kasada, salamura zeytinler ise plastik bidonlar içerisinde laboratuara getirilmiş ve denemelerde kullanılıncaya kadar buzdolabında (+4°C) muhafaza edilmişlerdir.

Bitki ekstraktı eldesi için kullanılan kekik türlerinden *Origanum onites* L., Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden, *Satureja hortensis* L. İskenderun'da faaliyet gösteren Alper Baharat'tan, kırmızı biber ekstraktı (*Capsicum annuum* L.) Maya Gıda'dan ve zeytin yaprağı (*Olea europaea* L.) ekstraktı da Kale Natürel Bitkisel Ürünler Gıda Kozmetik ve Tarım Ürünleri Firması'ndan sağlanmıştır.

*Aspergillus parasiticus*'un iki suşu (NRRL 465 ve NRRL 2999) Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nün kültür koleksiyonundan, *Lactobacillus plantarum* ise Erciyes Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden temin edilmiştir.

HPLC için uygun kalitede metanol, su ve % 65'lik nitrik asit Merck (Almanya), asetonitril Lab – Scan Analytical Sciences (Polonya)'dan temin edilmiştir.

Bu çalışma, Namık Kemal Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü'nün laboratuvarlarında yürütülmüştür.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1 Ekstraksiyon

Araştırmada kullanılan kekik türleri olan *O. onites* (İzmir Kekığı) ve *S. hortensis* (zahter)'in ekstraktları, Soxhlet metodu kullanılarak saf etanol ekstraksiyonu ile çıkartılmıştır. Bu amaçla, bitkiler öğütücüde öğütüldükten sonra ekstraksiyon kartuşuna 20 g örnek tartılmış ve kartuşun ağzı pamuk ile kapatılarak Soxhlet cihazına yerleştirilmiştir. Soxhlet cihazının 250 mL'lik ekstrakt toplama balonu, içerisine 125 mL saf etanol konularak cihaza yerleştirilmiştir. Ekstraksiyon işlemi 10 saat süre ile uygulanmış olup, elde edilen ham ekstraktlardan etanolün uzaklaştırılması için Rotary evaporatörde 80°C'de evaporasyon işlemi uygulanmıştır (Anonim 1987, Cemeroglu 2007). Ekstraktlar, cam deney tüpleri içerisinde +4°C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. Küf kültürlerinin çoğaltılması

Küfler araştırma süresince iki ayda bir yatık PDA (Potato Dextrose agar – Merck, Almanya) besiyerinde yenilenecek, elde edilen kültürler +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Küf sporlarının eldesi için yatık agarda gelişen küfler üzerine 9 mL steril serum fizyolojik ilave edilmiş ve tüp karıştırıcıda karıştırılmıştır. Bu şekilde hazırlanan spor süspansiyonu denemelerde kullanılmıştır.

### 3.2.3. *Lactobacillus plantarum*'un çoğaltılması

MRS broth (Merck, Almanya) besiyerinde muhafaza edilen *Lb. plantarum*, denemelerde kullanılmadan önce MRS broth besiyerinde çoğaltılmıştır. Cam deney tüplerine 10'ar mL MRS broth konularak steril edilmiş ve tüplerin içerisine aseptik şartlarda 0,1 mL *Lb. plantarum* ilave edilerek 3 gün 32°C'de inkübe edildikten sonra denemelerde kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

### 3.2.4. Bitki ekstraktlarının (*in vitro*) *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi amacıyla, yalnız bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı+potasyum sorbat kombinasyonları uygulanmıştır. MRS Agar (Lactobacillus Agar Acc. to De Man, Rogosa and Sharpe – Merck, Almanya) besiyerine yayma plak yöntemiyle 0,1 mL *Lb. plantarum* kültürü inoküle edilmiş ve Drigalski Spatülü ile tüm petri yüzeyine yayılmıştır. Petrilerin kurumaması takiben, her bir petri yüzeyinde 3 adet 5 mm çapında kuyular açılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan petrilere, bitki ekstraktları ile 1/1 oranında hazırlanmış olan bitki ekstraktı + potasyum sorbat kombinasyonlarının ilavesi 3 noktaya 10, 20 ve 50 µL olacak şekilde ilave edilmiş ve 32°C’de inkübasyona bırakılmıştır. 3. gün sonunda ekstraktların inhibe edici etkileri, inhibisyon zonu çapları ölçülerek belirlenmiştir. Ölçümlerde 5 mm’lik kuyu çapları da dikkate alınmıştır. Araştırma 3 tekrür 2 paralel olarak yürütülmüştür (Reinheimer 1990, Aureli ve ark. 1992, İlçim ve ark. 1998).

### 3.2.5. Bitki ekstraktlarının (*in vitro*) *Aspergillus parasiticus* üzerine inhibitör etkilerinin belirlenmesi

Bitki ekstraktlarının antifungal etkilerinin belirlenmesinde agar difüzyon metodu uygulanmıştır. Araştırma kapsamında bitki ekstraktları tek başlarına ve %0,05 bitki ekstraktı ile %0,05 potasyum sorbat karışımı şeklinde uygulanmıştır. Her bir yüzde oranı tek bir erleni ifade edecek şekilde; içerisinde %1, %2 oranında *Origanum onites*, %1, %2 oranında *Satureja hortensis*, %1, %2, %3 *Capsicum annuum*, %1, %2, %3, %5 oranında *Olea europaea* ekstraktları, %0,05 potasyum sorbat + %0,05 *O. onites*, %0,05 potasyum sorbat + %0,05 *S. hortensis*, %0,05 potasyum sorbat + %0,05 *C. annuum* ve %0,05 potasyum sorbat + %0,05 *O. europaea* karışımlarının bulunduğu, ayrı ayrı erlenlerdeki 60’ar mL’lik steril PDA besiyerleri petri plaklarına dökülmüştür. Her bir petriye tek bir küf suşu olmak üzere, 3 noktaya 10’ar µL *Aspergillus parasiticus* NRRL 465 ve *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 ekimi yapılmıştır. 25°C’de inkübasyona bırakılan petrilere 3, 5, 7 ve 10. günlerde gelişen küf kolonilerinin çapları ölçülerek küf gelişimi incelenmiştir. Gelişmeyi engelleyici etki, koloni çapının kontrol grubundaki küf çapına oranlanmasıyla hesaplanmıştır. % Engelleme oranları,

$$E = [(K-M)/K] \times 100$$

formülüne göre hesaplanmıştır (Deans ve Svoboda 1990). Bu formüle göre,

E= Engelleme oranı (%)

K= Kontrol petrisindeki koloni çapı (mm)

M= Muameleli petrideki koloni çapı (mm)

Hesaplama sonucunda, gelişmenin tamamen engellendiği durumlarda %100, kontrol petrisiyle aynı çapta gelişim gözlemlendiğinde %0 engelleme oranı belirtilirken, kontrol petrisindekinden daha büyük çapta gelişim gözlemlendiğinde ise teşvik edici etkinin olduğu belirtilmiştir (Benjilali ve ark. 1984, Boyraz ve Özcan 1997, Yiğit 2002).

Bu çalışmadan elde edilen bulgular çerçevesinde denemelerde kullanılacak ekstrakt konsantrasyonları belirlenmiştir. Araştırma 3 tekrür, 2 paralel olarak yürütülmüştür.

### **3.2.6. Starter kültür hazırlama**

Yağsız süt tozundan %10 kuru maddeli çözelti hazırlanıp üzerine % 1 oranında *Lb. plantarum* kültürü ilave edilip inkübasyona bırakılmıştır. pH değeri 5-5,5 arasında bir değere ulaştığında +4 °C sıcaklıkta soğuk muhafazaya alınmıştır.

### **3.2.7. Zeytin fermentasyonu denemesi**

Denemelerde 250 mL'lik konserve kavanozları kullanılmış olup, her bir kavanoza yaklaşık 200 g olacak şekilde ham zeytin tartılmıştır. Hazırlanmış olan % 4,5 NaCl içeren salamuraya % 1 laktik starter kültür ilave edilmiştir. Her bir kavanoza farklı konsantrasyonlarda tek bir ekstrakt ilave edilmiştir. Potasyum sorbat ile ekstrakt kombinasyonlarının denendiği kavanozlarda ise ekstrakt ve potasyum sorbat %0,05 oranlarında ilave edilmiştir. Ekstraktların salamura sıvısı içerisinde dağılması sağlanmıştır. Kavanozlara zeytinlerin yüzeyini kaplayacak biçimde yaklaşık 150 mL, içerisinde ekstrakt ve starter kültür bulunan salamura ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan kavanozlara 1'er mL küf sporu süspansiyonundan inokülasyon yapılmıştır. Negatif kontrol olarak starter yanında sadece küf sporu inoküle edilmiş, pozitif kontrolde ise starter yanında %0,1 oranında potasyum sorbat ilave edilmiştir. Kontrol grubunda ise salamurada yalnızca starter kültür yer almıştır. Örneklerin numaralandırılmasında, her bir örneğe ilave edilen ekstrakt cinsi, konsantrasyonu ve küf suşu dikkate alınmış olup, örnekler Çizelge 3.1.'de ki gibi numaralandırılmıştır. Her bir kavanoz bir örneği temsil etmektedir ve deneme 3 tekrür, 2 paralel olacak şekilde yürütülmüştür.

**Çizelge 3.1.** Zeytinlere uygulanan muamelelere göre örneklerin numaralandırılması

muamele	örnek no
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	1
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	2
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	3
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	4
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	5
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	7
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	8
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	9
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	10
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	11
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	12
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	13
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	14
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	15
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	16
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	17
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	18
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	19
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	20
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	21
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	22
(Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	23
(Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	24
(Negatif kontrol) <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	25
(Negatif kontrol) <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	26
Kontrol (Ekstrakt, potasyum sorbat ve <i>A. parasiticus</i> yok)	27

### 3.2.8. Fizikokimyasal Analizler

#### 3.2.8.1. Suda çözüdür kurumadde tayini

Ham ve fermentasyonu tamamlanmış zeytinlerde kuru madde analizi için el tipi bir refraktometre (Atago, HSR-500, Brix 0-90%, hand refractometer, Japan) kullanılmıştır. Refraktometrenin prizmasına, zeytinin meyve eti hafifçe kesilerek çıkarılan sıvı damlatılmış ve kurumadde değeri okunmuştur (Cemeroğlu 2007).

#### 3.2.8.2. pH değeri tayini

Ham zeytinlerin, fermentasyonu tamamlanmış zeytinlerin ve fermentasyon süresince salamuranın pH değeri pH-metre (Hanna Instruments pH 211 microprocessor pH meter) ile belirlenmiştir.

#### 3.2.8.3. Tuz analizi

Fermentasyonu tamamlanmış zeytinlerde tuz miktarı TS 774 Sofralık Zeytin Standardı'na göre belirlenmiştir (Anonim 2003). Bu amaçla, çekirdekleri çıkarılıp ezilerek homojen hale getirilen zeytin örneğinden erlen içerisine 5 g tartılmış ve 100 mL saf su ilave edilerek 30-40 dk kaynatılmıştır. Oda sıcaklığında 6 saat bekletildikten sonra 100mL'lik ölçü balonuna süzölmüş ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Balon içeriği çalkalanarak, çözülden 2 mL alınmış ve üzerine 50 mL saf su, birkaç damla potasyum kromat çözeltisi ilave edilerek gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) ile sabit kiremit kırmızısı renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Tuz miktarı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır,

$$\%tuz = V \times 58,5 \times N / n$$

V= harcanan  $\text{AgNO}_3$  miktarı (mL)

N=  $\text{AgNO}_3$  normalitesi

n= örnek miktarı (g)

Fermentasyon süresince salamuradaki tuz miktarı bome areometresi ile ölçölmüştür.



#### **3.2.8.4. Şeker analizi**

Ham ve fermentasyonu tamamlanmış zeytinlerde toplam şeker miktarı Lane-Eynon metoduyla belirlenmiştir (Cemeroğlu 2007). Bu amaçla, blendırda parçalanarak homojen hale getirilen zeytin örneğinden 5 g tartılmış ve 250 mL'lik ölçü balonuna aktarılmıştır. Üzerine Carez I ve Carez II çözeltileri ilave edilerek süzölmüştür. Berrak filtrattan 50 mL alınıp 100 mL'lik ölçü balonuna aktarılarak üzerine %25'lik HCL'den 6 mL eklenmiştir. Su banyosunda 67-70°C arasında 5 dk inversiyona uğratarak hızla soğutulmuştur. 4 N NaOH ile nötralize edilmiş ve ölçü balonu saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti bir bürete alınmıştır. Bir erlen içerisinde, Fehling I (5 mL) ve Fehling II (5 mL) çözeltileri ilave edilerek kaynatılmıştır. Kaynama başladığında metilen mavisi ilave edilerek, büretteki çözelti ile kiremit kırmızısı renk elde edilinceye kadar titre edilmiştir. Toplam şeker miktarı (%) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır,

$$\% \text{ toplam şeker} = 100 \times K \times \text{seyreltme miktarı} / V$$

K= faktör

V= harcanan sarfiyat (mL)

#### **3.2.9. Mikrobiyolojik Analizler**

##### **3.2.9.1. Laktik asit bakterisi sayısının belirlenmesi**

Fermentasyon başlangıcında ve fermentasyon süresince laktik asit bakterilerinin (LAB) sayımı MRS Agar besiyerinde yapılmıştır. Örneklerden hazırlanan dilüsyonlardan petrilere 0,1 mL ilave edilerek yüzeye ekim yöntemi yapılmıştır. Petri kutuları  $30 \pm 1$  °C'de 3 gün inkübe edilmiş, gelişen koloniler sayılmış ve sonuçlar dilüsyon katsayıları ile çarpılmıştır (Baumgart ve ark. 1993).

##### **3.2.9.2. Küf sayısının belirlenmesi**

Küf sayımı için Potato Dextrose agar (PDA) kullanılmıştır. PDA otoklavda steril edildikten sonra % 10'luk steril tartarik asit ile pH'sı  $3,5 \pm 0,1$ 'e ayarlanmış ve yüzey ekim yöntemiyle ekim yapılmıştır. Ekim yapılan plaklar 25 °C'de 5-7 gün inkübasyona bırakılmış ve inkübasyondan sonra koloniler sayılarak küf sayısı bulunmuştur (Koburger ve Marth 1984).

### 3.2.10. Fermente Siyah Zeytin Denemesi

Gemlik tipi zeytinler, her bir kavanoza 150 g olacak şekilde tartılmıştır. Denemede kullanılan ekstrakt miktarları %2 *O. onites*, %2 *S. hortensis*, %3 *C. annuum*, %5 *O. europaea* ile %0,05 ekstrakt ve %0,05 potasyum sorbat şeklinde belirlenmiştir. Kavanozlara ilave edilecek ekstraktların her bir zeytin tanesiyle temasını sağlayabilmek için 40 mL'lik %8 NaCl içeren salamura içerisinde dağılmaları sağlanmıştır. Salamuralar kavanozlara ilave edildikten sonra 0,1 mL küf sporu süspansiyonundan ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece küf inoküle edilmiş, pozitif kontrolde ise %0,1 oranında potasyum sorbat ilave edilmiştir. Kontrol grubunda ise yalnızca salamura sıvısı yer almıştır. Aynı küf suşunu içeren örnekler kapaklı plastik saklama kapları içerisine yerleştirilmiştir. Nem sağlamak amacıyla, %97 bağıl nem sağlayan doygun potasyum sülfat ( $K_2SO_4$ ) çözeltisi hazırlanmıştır (Rockland 1960). Hazırlanan çözelti kaplara, kavanozlar kapların içerisinde yüzmeyecek şekilde konulmuştur. Kavanozlar kapaksız, kaplar ise kapakları kapatılarak +4°C (buzdolabı) ve +25°C (inkübatör) de 15 ve 30 gün boyunca muhafaza edilmişlerdir. Her bir kavanoz bir örneği temsil etmiş ve deneme 3 tekrerrür, 2 paralel olacak şekilde yürütülmüştür. 15. ve 30. günün sonunda aflatoksin analizleri yapılmıştır. Şekil 3.1.'de denemeye ait örnekler görülmektedir.



Şekil 3.1. Fermente siyah zeytin denemesine ait örnekler

### 3.2.11. Aflatoksin Analizi

Aflatoksin analizi AOAC (2000)'nin 999.07 nolu metod kullanılarak HPLC ile yapılmıştır. HPLC (Shimadzu – HPLC 10Avp, Japonya) cihazında aflatoksin analizi için şu koşullarda çalışılmıştır;

- HPLC kolonu: C18
- Dedektör: RF-10AXL floresan dedektör
- mobil faz: su, asetonitril, metanol [ 6+2+3 ( v+v+v ) ]  
132 mg KBr + 385 µL %65 HNO<sub>3</sub>
- akış hızı: 1mL/dk

Geri kazanım oranı %97 olarak belirlenmiştir. Aflatoksin belirlenebilirlik limiti (LOQ - Limit of Quantification) 0,01 ppb'dir.

#### **PBS (Fosfat Tamponlu Tuz) Çözeltisinin hazırlanması**

Potasyum dihidrojen fosfat (Merck, Almanya) 0,2 g, 0,2 g potasyum klorür (Merck, Almanya), 1,16 g di-sodyum hidrojen fosfat dodecahydrate (Merck, Almanya) ve 8 g sodyum klorür (Merck, Almanya) 0,9 L distile suda (Merck, Almanya) çözündürülmüştür. 0,1 mol/L HCl (Merck, Almanya) veya 0,1 mol/L NaOH (Merck, Almanya) kullanılarak pH 7,4'e ayarlanmıştır. Distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

#### **3.2.11.1. Ekstraksiyon ve filtrasyon**

Aflatoksin analizi için alınan zeytin örneklerinin çekirdekleri çıkarılmış ve ardından 25 g meyve eti tartılarak parçalayıcıya aktarılmıştır. Her bir örneğin üzerine 125 mL ekstraksiyon solventi metanol -saf su (80:20) karışımı ile 2 g NaCl ilave edilerek parçalayıcı yaklaşık 3 dk maksimum hızda çalıştırılarak, örneğin parçalanması ve karışması sağlanmıştır. Parçalayıcıdan çıkan ekstrakt Whatman No.1 filtre kağıdından süzölmüştür.

### **3.2.11.2. İmmünoaffiniti kolon safhası**

Filtratın 5 mL'si erlenmayere aktarılarak üzerine 5 mL PBS çözeltisi ilave edilmiş ve iyice karışması sağlanmıştır. Bu karışım 10 mL'lik enjektöre aktarılmıştır. Enjektörün ucuna immünoaffiniti kolon (R – Biopharm Rhone Ltd., İskoçya) takılıp karışım, 1 damla/saniye sabit hızla kolondan geçirilmiştir. Bu işlemi takiben kolondan 2 kez yaklaşık 2 damla/saniye sabit hızla 10 mL saf su geçirilerek kolonun yıkanması sağlanmıştır.

### **3.2.11.3. Elüsyon**

Kolona 1 mL metanol aktarılıp yerçekimi ile vialde akması sağlanmıştır. Ardından 1 mL saf su kolondan benzer şekilde geçirilmiştir. Vialde toplanan eluat yeterince berrak olmadığı için tek kullanımlık, steril, 0,45 µm'lik porlara sahip enjektör ucu filtresi (Sartorius - Almanya) kullanılmıştır. Böylelikle vialde toplam 2 mL hacimli, berrak görünümlü eluat elde edilmiştir. Vialler HPLC cihazına alınarak, örneklerde aflatoksin tayini yapılmıştır.

### **3.2.12. İstatistiksel analiz**

Araştırmadan elde edilen pH analiz sonuçları SPSS paket programı ile istatistiksel analize tabi tutulmuştur. Örnekler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmış, önemli bulunan varyasyon kaynakları Tukey çoklu karşılaştırma testine tabi tutulmuştur.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Bu araŐtırma kapsamında, sofralık siyah zeytinlerde aflatoksijenik kűf geliŐimi ve aflatoksin oluŐumunun belirlenmesi amacıyla iki farklı deneme yapılmıŐtır. İlk denemede ham zeytinler, dűŐük tuzlu (%4,5) salamuralarda, laktik starter kűltűr ve deĐiŐik oranlarda bitki ekstraktları ve potasyum sorbat ile muamele edilmiŐ ve ۆrneklerin yarısı *A. parasiticus* NRRL 465 ile, diĐer yarısı ise *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inokűle edilerek fermentasyona bırakılmıŐtır. Fermentasyon sűresince tuz oranı kontrol edilerek %4,5 seviyesinde kalması saĐlanmıŐtır. Bunun yanı sıra kűf geliŐimi, laktik asit bakterilerinin geliŐimi ve pH deĐiŐimi kontrol edilmiŐtir.

İkinci denemede ise yalnızca salamura kullanılarak fermentasyonu tamamlanmıŐ ve satıŐa sunulmuŐ olan fermente siyah zeytinler kullanılmıŐtır. İlk denemede olduğu gibi zeytinlere, deĐiŐik oranlarda bitki ekstraktları ve potasyum sorbat ilave edilmiŐ ve ۆrneklerin yarısı *A. parasiticus* NRRL 465 ile, diğer yarısı ise *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inokűle edilerek %97 nem iğeren ortamlarda farklı sıcaklıklarda (+4°C ve +25°C) 15 ve 30 gűn boyunca muhafaza edilmiŐlerdir.

#### 4.1. Ham Zeytinlerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

Deneme materyali olarak yaklaşık 40 kg ham zeytin kullanılmıştır. 2 kasa olarak alınan zeytinlerden analiz için, kasaların farklı yerlerinden rasgele 3 kez yaklaşık olarak 200'er g örnek alınarak analizler yapılmıştır. Ham zeytin danelerinde kurumadde, toplam şeker ve pH analiz sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Araştırmada kullanılan Gemlik çeşidi ham siyah zeytinin bazı fizikokimyasal analiz sonuçları

Kurumadde (%)	Toplam şeker (%)	pH
30±1	3,57±0,01	5,04±0,03

Ham zeytinlerin kurumadde değeri %30±1, toplam şeker miktarı %3,57±0,01 ve pH değeri de 5,04±0,03 olarak bulunmuştur.

Ham zeytinlerde belirlenen kurumadde değeri Arıcı ve Aktan (1997) ile Tetik (2001)'in belirtmiş oldukları değerlere benzer, Akçay ve ark. (2000), Karaman ve ark. (2006) ile Türk ve ark. (2000)'nın belirtmiş oldukları değerlerden düşük tespit edilmiştir.

Ham zeytinlerde tespit edilen toplam şeker miktarı Barut (2000) ve Tetik (2001)'in belirtmiş oldukları değerler ile benzer bulunmuşken, Türk ve ark. (2000)'nın belirtmiş oldukları değerden yüksek bulunmuştur.

Ham zeytinlerde belirlenen pH değeri Karaman ve ark. (2006) ile Türk ve ark. (2000)'nın belirtmiş oldukları değerler ile benzer bulunmuşken, Akçay ve ark. (2000) ile Barut (2000)'un belirtmiş oldukları değerlerden düşük bulunmuştur.

Bu farklılıkların; yetiştirilme şartlarındaki ve zeytin çeşitleri arasındaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

#### 4.2. Bitki Ekstraktlarının (*in vitro*) *Lactobacillus plantarum* Üzerine İnhibitör Etkilerinin Belirlenmesi

Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının, MRS agar besiyerinde, *Lactobacillus plantarum* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonu çapları (5 mm'lik ekstrakt çapı ile birlikte) Çizelge 4.2.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.2.** Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının, *Lactobacillus plantarum* üzerinde oluşturdukları inhibisyon zonu çapları (mm)

muamele	miktar (µL)	3.gün
<i>O. onites</i>	10	6,33±0,5
<i>O. onites</i>	20	7,33±0,5
<i>O. onites</i>	50	10,00±0,0
1/1 <i>O. onites</i> / K-sorbat*	10	6,33±0,5
1/1 <i>O. onites</i> / K-sorbat*	20	7,33±0,5
1/1 <i>O. onites</i> / K-sorbat*	50	9,33±0,5
<i>S. hortensis</i>	10	6,67±0,5
<i>S. hortensis</i>	20	9,33±0,5
<i>S. hortensis</i>	50	13,67±0,5
1/1 <i>S. hortensis</i> / K-sorbat*	10	6,33±0,5
1/1 <i>S. hortensis</i> / K-sorbat*	20	8,33±0,5
1/1 <i>S. hortensis</i> / K-sorbat*	50	9,67±0,5
<i>C. annuum</i>	10	5,00±0,5
<i>C. annuum</i>	20	5,14±0,5
<i>C. annuum</i>	50	5,30±0,5
1/1 <i>C. annuum</i> / K-sorbat*	10	5,00±0,2
1/1 <i>C. annuum</i> / K-sorbat*	20	5,10±0,2
1/1 <i>C. annuum</i> / K-sorbat*	50	5,18±0,0
<i>O. europaea</i>	10	5,00±0,3
<i>O. europaea</i>	20	5,00±0,5
<i>O. europaea</i>	50	5,13±0,5
1/1 <i>O. europaea</i> / K-sorbat*	10	5,00±0,3
1/1 <i>O. europaea</i> / K-sorbat*	20	5,00±0,3
1/1 <i>O. europaea</i> / K-sorbat*	50	5,10±0,5

\*: 1 birim ekstrakt + 1 birim potasyum sorbat + 1 birim steril saf su

Araştırmada kullanılan bitki ekstraktları seyreltilmeden kullanılmış olup, bitki ekstraktı + potasyum sorbat kombinasyonlarında, potasyum sorbatın ekstrakt içerisinde çözünmesini kolaylaştırmak amacıyla, aynı miktarda steril saf su ile homojen bir karışım oluşturacak biçimde karıştırılmışlardır.



Çizelge 4.2’de görüldüğü gibi, 3 günlük inkübasyon süresi boyunca hem bitki ekstraktlarının hem de K-sorbatlı karışımlarının *Lb. plantarum* üzerinde inhibisyon zonu oluşturdıkları görülmektedir. En yüksek inhibitör etkinliği *S. hortensis* ekstraktının gösterdiği, bunu *O. onites*, *C. annuum*, ve *O. europaea* ekstraktlarının izlediği görülmektedir.

*O. onites* ekstraktının en düşük inhibisyon etkisi 10 µL’lik uygulama sonucunda 6,33±0,5 mm zon oluşumuyla gerçekleşmiştir. Uygulama miktarı arttıkça zon çapının arttığı, 20 µL’lik uygulama ile 7,33±0,5 mm zon çapı olduğu, en yüksek inhibisyon zon çapının ise, 50 µL’lik uygulama sonucunda 10,00±0,0 mm zon oluşumuyla gerçekleştiği görülmektedir.

*O. onites*/K-sorbat (1/1) kombinasyonunun uygulanan her 3 dozda oluşturdıkları inhibisyon zon çapları incelendiğinde, en düşük zon çapının 10 µL’lik uygulama sonucunda oluşan 6,33±0,5 mm’lik zon çapı olduğu görülmektedir. Uygulama dozuna bağlı olarak zon çapı değerleri artmış olup 20 µL’lik uygulama sonucunda 7,33±0,5 mm, 50 µL’lik uygulama sonucunda ise 9,33±0,5 mm düzeyinde zon çapı olduğu görülmektedir.

Araştırmada en etkili ekstraktın *S. hortensis* ekstraktı olduğu belirlenmiş olup 10 µL’lik uygulama sonucunda 6,67±0,5 mm zon çapı oluşturduğu, 20 µL’lik uygulama sonucunda 9,33±0,5 mm ve 50 µL’lik uygulama sonucunda 13,67±0,5mm zon çapı oluşturduğu görülmektedir.

*S. hortensis*/K-sorbat (1/1) kombinasyonu, 10 µL’lik uygulama sonucunda 6,33±0,5 mm zon çapı oluşturmuştur. Uygulama dozu arttıkça zon çapları artmış ve 20 µL’lik uygulama sonucunda 8,33±0,5 mm, 50 µL’lik uygulama sonucunda ise 9,67±0,5 mm zon çapı oluşturmuştur.

*C. annuum* ekstraktı inkübasyonun 3. gününde 10 µL’lik uygulama sonucunda inhibisyon zonu oluşturmadığı, 20 µL’lik uygulama sonucunda 5,14±0,5 mm, 50 µL’lik uygulama sonucunda 5,30±0,5 mm zon çapı oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu inhibisyon etkisi çok düşük düzeyde olup, ihmal edilebilecek düzeydedir.

*C. annuum*/K-sorbat (1/1) kombinasyonu, 10 µL’lik uygulama sonucunda inhibisyon zonu oluşturmadığı, 20 µL’lik uygulama sonucunda 5,10±0,2 mm, 50 µL’lik uygulama sonucunda

5,18±0,0 mm zon çapı oluşturduğu görülmektedir. Ancak bu ölçümde, ihmal edilebilecek düzeydedir.

*O. europaea* ekstraktı 10 ve 20 µL'lik uygulamalar sonucunda, *Lb. plantarum* üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür. 50 µL'lik uygulama sonucunda ölçülen zon çapı 5,13±0,5 mm olarak tespit edilmiş ve *O. europaea* ekstraktı, *Lb. plantarum*'a karşı inhibisyon etkisi en düşük olan ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

*O. europaea*/K-sorbat (1/1) uygulaması ise, tüm uygulamalar içinde en düşük etkinliğe sahip uygulama olarak belirlenmiş olup, 10 ve 20 µL'lik uygulamalar sonucunda *Lb. plantarum* üzerine inhibisyon etkisinin olmadığı görülmüştür. 50 µL'lik uygulama sonucunda ise 5,10±0,5 mm çapında zon oluşturduğu belirlenmiştir. Ancak bu inhibisyon etkisi de çok düşük olup, ihmal edilebilecek düzeydedir.

Etkinliği incelenen ekstraktlar ile K-sorbatlı karışımlarının uygulama dozları arttıkça inhibisyon zon çapı değerlerinin de arttığı görülmektedir. Uygulanan doz artışına bağlı olarak inhibisyon zon çapı değerlerinin artması Çon ve ark. (1998)'nin araştırma bulguları ile paralellik göstermektedir.

Kekik türlerinde gözlenen inhibitör etkinlik Çon ve ark. (1998) ile Kıvanç ve ark. (1991)'nin araştırma bulguları ile benzerlik göstermektedir.

*C. annuum* ekstraktında görülen inhibisyon etkinliğinin, Sağdıç ve ark. (2003)'nin bildirdikleri etki ile benzer olduğu tespit edilmiştir.

Zaika ve ark. (1983) kekiğin, Zaika ve Kissenger (1984) ise karabiberin laktik asit bakterileri üzerine zayıf inhibitör etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir. Ancak pek çok baharatın laktik asit üretimine etkisi genellikle teşvik edici olarak bildirilmiştir (Karapınar ve Aktuğ 1986). Ekstraktların laktik asit bakterilerine patojenlerden daha az etkili olduğu, bununda fermentasyonda ve sindirim sistemi açısından düşünüldüğünde olumlu bir etki olduğu düşünülmektedir (Sağdıç ve ark. 2003, Arıcı ve ark. 2005, Sağdıç ve ark. 2005 ).

### 4.3. Bitki Ekstraktlarının (*in vitro*) Antifungal Etkinliği

Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının, küflerin gelişimini engelleme oranları Çizelge 4.3.'de verilmiştir.

*Origanum onites* ve *Satureja hortensis* bitki ekstraktlarının %1 ve %2'lik dozlarının, oldukça yüksek bir antifungal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Her iki ekstraktın da inkübasyon süresi boyunca, %1 ve %2'lik dozlarda, her iki suşun da gelişimini %100 engelledikleri belirlenmiştir. Bu sonuçlar Boyraz ve Özcan (1997), Fan ve Chen (1999), Martinez-Lozano ve ark. (2000), Boyraz ve Özcan (2006)'ın araştırma bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Kekik ekstraktlarının *A. parasiticus*'a karşı gösterdiği yüksek inhibitör etkinliğin, ekstraktların bileşiminde bulunan karvakrol bileşiğinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Romero-Martinez ve ark. 2007).

*Capsicum annuum* (%1, %2 ve %3) ile *Olea europaea* (%1, %2, %3 ve %5) ekstraktlarının etkileri birbirine benzer bulunmuştur. Her iki ekstraktın da, denenen tüm dozlarda, *A. parasiticus* NRRL 465 ve *A. parasiticus* NRRL 2999'a karşı herhangi bir antifungal etki göstermedikleri, aksine misel gelişimlerini kontrol örneklerine göre arttırdıkları ve bu teşvik edici etkinin inkübasyon süresince devam ettiği belirlenmiştir. Farklı ekstraktların antifungal etkinliğinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan bazı çalışmalarda, bu sonuca benzer bulgulara rastlanmıştır (Boyraz ve Özcan 1997). Literatür araştırmaları esnasında, *C. annuum* ekstraktının antifungal etkinliğine yönelik çalışmalardan ziyade, antibakteriyel etkinliğine yönelik olarak yapılan çalışmaların yoğun olduğu görülmüştür (Careaga ve ark. 2003). *O. europaea* ekstraktı ile ilgili elde edilen bulgular Korukluoğlu ve ark. (2008)'nın çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

Bitki ekstraktı (%0,05) + potasyum sorbat (%0,05) kombinasyonlarının da, her iki suşun gelişimlerini, inkübasyon süresi boyunca %100 engelledikleri tespit edilmiştir. Antifungal etkinliği araştırılan *Capsicum annuum* ekstraktı ile *Olea europaea* ekstraktlarının antifungal etkilerinin tespit edilememiş olmasına rağmen, çok düşük dozlarda potasyum sorbat ile birlikte denendiklerinde antifungal etkinin tespit edilmiş olması, bu etkinin potasyum sorbatın antifungal özelliğinden kaynaklandığını ortaya koymaktadır.

**Çizelge 4.3.** Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktı + K-sorbat kombinasyonlarının antifungal etkileri (% engelleme)

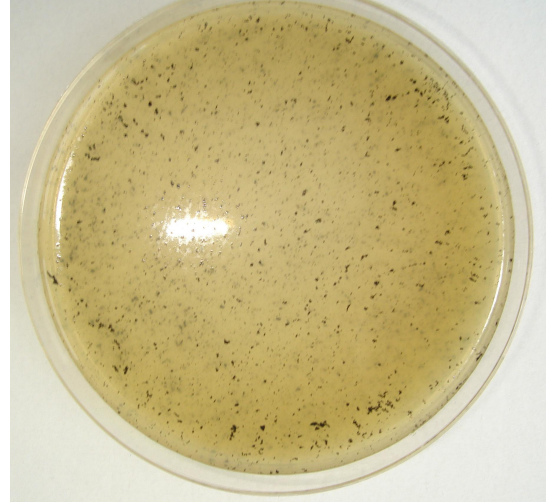
küf	gün	<i>O. onites</i>			<i>S. hortensis</i>			<i>C. annuum</i>				<i>O. oleuropaea</i>				
		%1	%2	K <sup>1</sup>	%1	%2	K <sup>2</sup>	%1	%2	%3	K <sup>3</sup>	%1	%2	%3	%5	K <sup>4</sup>
<i>A.parasiticus</i> NRRL 465	3	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	5	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	7	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	10	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
<i>A.parasiticus</i> NRRL 2999	3	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	5	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	7	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100
	10	%100	%100	%100	%100	%100	%100	T	T	T	%100	T	T	T	T	%100

K<sup>1</sup>: %0,05 *O. onites* + %0,05 K-sorbat  
K<sup>2</sup>: %0,05 *S. hortensis* + %0,05 K-sorbat  
K<sup>3</sup>: %0,05 *C. annuum* + %0,05 K-sorbat  
K<sup>4</sup>: %0,05 *O. europeae* + %0,05 K-sorbat  
T: küf gelişimini teşvik edici etki

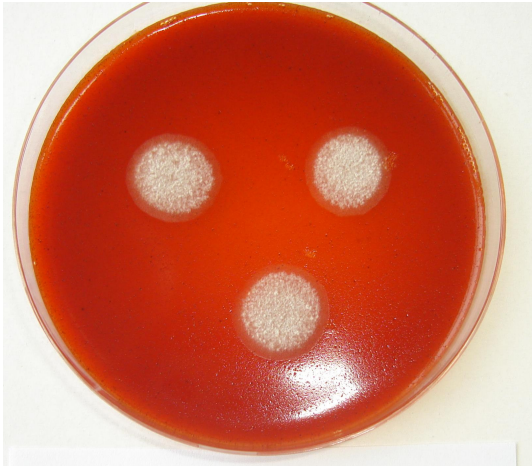
Şekil 4.1.'de farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının petri plaklarında, *A. parasiticus* NRRL 465 ve *A. parasiticus* NRRL 2999 üzerine etkisi (*in vitro*) görülmektedir.



(a) %1 *O.onites* 3.gün (*A. parasiticus* NRRL 465)



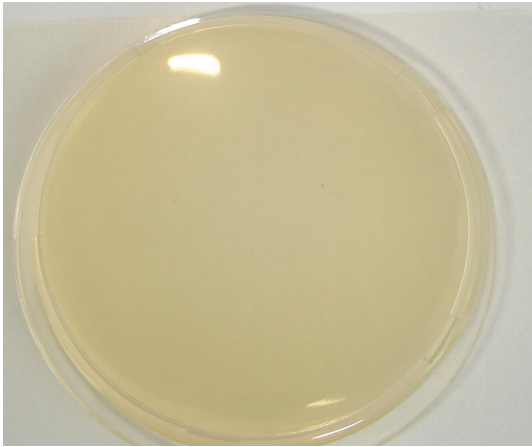
(b) %1 *S. hortensis* 3.gün (*A. parasiticus* NRRL 465)



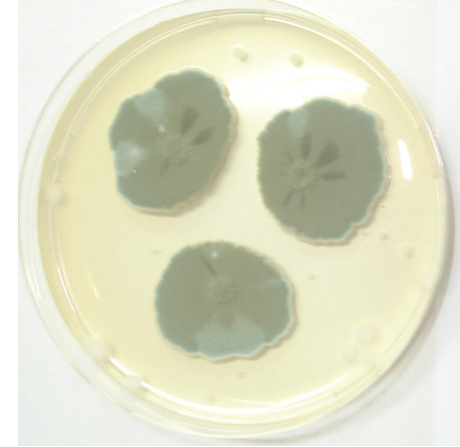
(c) %3 *C. annuum* 3.gün (*A. parasiticus* NRRL 2999)



(d) %5 *O.europaea* 3.gün (*A. parasiticus* NRRL2999)



(e) %0,05 *O.europaea* + %0,05 K-sorbat  
3. gün (*A. parasiticus* NRRL 465)



(f) Kontrol – 3.gün (*A. parasiticus* NRRL 2999)

**Şekil 4.1.** Farklı konsantrasyonlardaki bitki ekstraktlarının *A. parasiticus* NRRL 465 ve *A. parasiticus* NRRL 2999 üzerine etkisi (*in vitro*)

#### 4.4. Fermentasyon Süresince pH Değerlerinde Meydana Gelen Değişiklikler

Fermentasyon süresince zeytin örneklerinin pH değerlerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Fermentasyon başlangıcında salamuranın tuz oranı %4,5 olarak ayarlanmış ve fermentasyon süresince örneklerde, haftalık tuz kontrolü yapılarak bu oran %4,5'da sabit tutulmaya çalışılmıştır.

Fermentasyonun başlangıcında, içerisinde yalnızca laktik starter kültür bulunan salamuranın pH değeri ölçülmüş ve pH 6,21 olarak belirlenmiştir. Her bir örneğin hazırlanmasında bu salamura kullanılmıştır. Çizelge 4.3.'den görüldüğü gibi, fermentasyonun ilk haftasında örneklerin pH değerleri incelendiğinde, en düşük değer pH 5,32±0,01 ile 20. örneğe ait olduğu, en yüksek değer ise pH 6,00±0,01 ile 16. örneğe ait olduğu görülmektedir. İkinci haftada örneklerin pH değerlerinde azalma gözlenmiş olup, en düşük değer pH 4,54±0,01 ile 20. örnekte olduğu belirlenirken, en yüksek değer pH 5,40±0,01 ile 12. örnekte olduğu belirlenmiştir. Üçüncü haftada genel olarak örneklerin pH değerlerinde azalma gözlenirken 3., 17. ve 18. örneklerin pH değerlerinde artış gözlenmiştir. En düşük değer pH 4,23±0,01 ile 24. örnekte, en yüksek değer ise pH 5,31±0,01 ile 6. örnekte belirlenmiştir. Dördüncü haftada 19. ve 20. örneklerin pH değerlerinde artış gözlenirken, diğer örneklerin pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri 3,90±0,01 ile 27. örnek olan kontrol grubuna ait olurken, en yüksek pH değerinin 5,11±0,01 ile 11. ve 12. örneklere ait olduğu belirlenmiştir. Beşinci haftada 18. örneğin pH değeri değişmezken 17. ve 27. örneğin pH değerlerinde artış gözlenmiş, diğer örneklerin pH değerlerinde ise düşüş gözlenmiştir. Beşinci haftada en düşük pH değeri 3,91±0,01 ile 23. örnekte görülürken, en yüksek pH değeri 5,01±0,01 ile 11. örnekte görülmüştür. Altıncı haftada 14. örnek ile 27. örnek olan kontrol grubunun pH değerleri değişmemişken, 17., 19., 20., 23., 24., 25. ve 26. örneklerin pH değerlerinde artış, diğer örneklerin pH değerlerinde ise ani düşüşler görülmüştür. En düşük pH değeri pH 3,83±0,01 ile 9. örnekte, en yüksek pH değeri ise pH 4,79±0,01 ile 17. örnekte görülmüştür. Yedinci haftada 5. ve 11. örneklerin pH değerlerinde değişim gözlenmezken, 3., 4., 10., 12., 21., 22., 25. ve 26. örneklerin pH değerlerinde düşüş, diğer örneklerde ise artış gözlenmiştir. En düşük pH değeri 3,87±0,01 ile 9. örnekte, en yüksek pH değeri ise pH 4,87±0,01 ile 17. örnekte gözlenmiştir.

**Çizelge 4.4.** Fermentasyon süresince örneklerdeki pH değişimleri

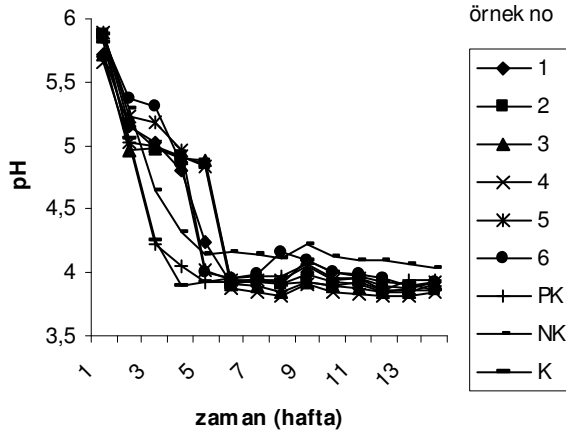
Örnek no*	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta	9. hafta	10. hafta	11. hafta	12. hafta	13. hafta	14. hafta
1	5,71±0,00	5,15±0,01	5,02±0,01	4,80±0,01	4,24±0,01	3,91±0,01	3,96±0,00	3,91±0,01	3,99±0,01	3,93±0,01	3,91±0,01	3,85±0,00	3,87±0,00	3,92±0,00
2	5,88±0,00	5,17±0,01	4,98±0,01	4,91±0,01	4,86±0,01	3,91±0,01	3,94±0,00	3,91±0,01	3,93±0,01	3,89±0,01	3,92±0,01	3,86±0,01	3,86±0,01	3,86±0,00
3	5,71±0,00	4,96±0,01	4,98±0,01	4,90±0,01	4,88±0,01	3,91±0,01	3,89±0,00	3,85±0,01	3,92±0,01	3,89±0,01	3,88±0,01	3,85±0,01	3,85±0,01	3,91±0,00
4	5,66±0,01	5,03±0,01	5,00±0,01	4,92±0,01	4,83±0,01	3,87±0,01	3,84±0,00	3,82±0,01	3,91±0,01	3,84±0,01	3,83±0,01	3,82±0,01	3,82±0,01	3,84±0,00
5	5,89±0,01	5,23±0,01	5,19±0,01	4,97±0,01	4,02±0,01	3,94±0,01	3,94±0,01	3,94±0,01	4,05±0,01	3,94±0,01	3,96±0,01	3,90±0,01	3,88±0,01	3,92±0,01
6	5,85±0,01	5,37±0,01	5,31±0,01	4,86±0,01	4,01±0,01	3,96±0,01	3,98±0,01	4,16±0,01	4,10±0,01	4,00±0,01	3,98±0,01	3,95±0,01	3,90±0,00	3,93±0,01
7	5,82±0,01	5,22±0,01	5,18±0,01	5,01±0,01	4,91±0,01	3,94±0,01	3,97±0,01	4,08±0,01	4,06±0,01	3,93±0,01	4,01±0,01	3,96±0,01	3,90±0,01	3,93±0,01
8	5,82±0,01	5,20±0,01	5,09±0,01	5,03±0,01	4,91±0,01	3,93±0,01	3,94±0,01	3,91±0,01	4,02±0,01	3,87±0,01	3,95±0,01	3,93±0,01	3,90±0,01	3,92±0,01
9	5,91±0,01	5,04±0,01	4,96±0,01	4,90±0,01	4,83±0,01	3,83±0,01	3,87±0,01	3,86±0,01	3,95±0,01	3,87±0,01	3,88±0,01	3,87±0,01	3,83±0,01	3,89±0,01
10	5,67±0,01	4,99±0,01	4,86±0,01	4,81±0,01	4,79±0,01	3,92±0,01	3,90±0,01	3,85±0,01	3,91±0,01	3,88±0,01	3,89±0,01	3,89±0,01	3,87±0,01	3,90±0,01
11	5,98±0,01	5,37±0,01	5,24±0,01	5,11±0,01	5,01±0,01	3,94±0,01	3,94±0,01	3,92±0,01	4,02±0,01	3,95±0,01	3,94±0,01	3,92±0,01	3,89±0,01	3,92±0,01
12	5,87±0,01	5,40±0,01	5,24±0,01	5,11±0,01	5,00±0,01	3,90±0,01	3,89±0,01	3,87±0,01	4,02±0,01	3,82±0,01	3,89±0,01	3,86±0,01	3,81±0,01	3,85±0,01
13	5,87±0,01	5,09±0,01	4,81±0,01	4,42±0,01	4,27±0,01	3,89±0,01	3,96±0,01	3,88±0,01	4,03±0,01	3,89±0,01	3,88±0,01	3,86±0,01	3,78±0,01	3,86±0,01
14	5,87±0,01	5,11±0,01	4,87±0,01	4,71±0,01	4,56±0,01	4,56±0,01	4,60±0,01	4,54±0,01	4,59±0,01	4,53±0,01	4,54±0,01	4,54±0,01	4,50±0,01	4,53±0,01
15	5,87±0,01	5,21±0,01	4,63±0,01	4,05±0,01	4,01±0,01	3,91±0,01	4,01±0,01	3,96±0,01	4,10±0,01	4,00±0,01	3,95±0,01	3,95±0,01	3,86±0,01	3,90±0,01
16	6,00±0,01	5,25±0,01	4,51±0,01	4,02±0,01	3,98±0,01	3,91±0,01	3,99±0,01	3,97±0,01	4,10±0,01	3,93±0,01	3,93±0,01	3,92±0,01	3,92±0,01	3,90±0,00
17	5,47±0,01	4,61±0,01	4,78±0,01	4,75±0,01	4,76±0,01	4,79±0,01	4,87±0,01	4,84±0,01	4,82±0,01	4,55±0,01	4,76±0,01	4,72±0,01	4,71±0,01	4,74±0,01
18	5,49±0,01	4,65±0,01	4,73±0,01	4,72±0,01	4,72±0,01	4,62±0,01	4,73±0,01	4,77±0,01	4,84±0,01	4,66±0,01	4,73±0,01	4,73±0,01	4,67±0,01	4,70±0,01
19	5,38±0,01	4,63±0,01	4,61±0,01	4,62±0,01	4,61±0,01	4,67±0,01	4,74±0,01	4,67±0,01	4,81±0,01	4,71±0,01	4,69±0,01	4,67±0,01	4,64±0,01	4,63±0,01
20	5,32±0,01	4,54±0,01	4,52±0,01	4,53±0,01	4,51±0,01	4,67±0,01	4,74±0,01	4,72±0,01	4,80±0,01	4,69±0,01	4,72±0,01	4,72±0,01	4,69±0,01	4,70±0,01
21	5,87±0,01	5,31±0,01	5,12±0,01	5,02±0,01	4,90±0,01	4,12±0,01	4,06±0,01	4,07±0,01	4,29±0,01	4,13±0,01	4,10±0,01	4,08±0,01	3,99±0,01	3,96±0,01
22	5,85±0,01	5,27±0,01	5,11±0,01	4,81±0,01	4,66±0,01	4,02±0,01	4,01±0,01	3,99±0,01	4,09±0,01	3,97±0,01	3,97±0,01	3,94±0,01	3,92±0,01	3,93±0,01
23	5,85±0,01	5,01±0,01	4,24±0,01	4,04±0,01	3,91±0,01	3,98±0,01	4,00±0,01	3,97±0,01	4,13±0,01	4,02±0,01	4,00±0,01	3,96±0,01	4,03±0,01	4,00±0,01
24	5,88±0,01	5,02±0,01	4,23±0,01	4,05±0,01	3,93±0,01	3,95±0,01	3,97±0,01	3,97±0,01	4,06±0,01	3,96±0,01	3,95±0,01	3,86±0,01	3,94±0,01	3,94±0,01
25	5,88±0,01	5,33±0,01	4,54±0,01	4,23±0,01	4,10±0,01	4,12±0,01	4,11±0,01	4,06±0,01	4,16±0,01	4,03±0,01	4,05±0,01	4,08±0,01	4,04±0,01	4,01±0,01
26	5,88±0,01	5,29±0,01	4,65±0,01	4,31±0,01	4,15±0,01	4,16±0,01	4,14±0,01	4,12±0,01	4,22±0,01	4,13±0,01	4,10±0,01	4,10±0,01	4,06±0,01	4,04±0,01
27	5,81±0,01	5,05±0,01	4,25±0,01	3,90±0,01	3,92±0,01	3,92±0,01	3,93±0,01	3,91±0,01	4,10±0,01	4,01±0,01	3,97±0,01	3,92±0,01	3,91±0,01	3,86±0,01

\*: 1: *O. onites* ekstraktı %1 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 2: *O. onites* ekstraktı %1 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 3: *O. onites* ekstraktı %2 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 4: *O. onites* ekstraktı %2 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 5: *O. onites* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 6: *O. onites* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 7: *S. hortensis* ekstraktı %1 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 8: *S. hortensis* ekstraktı %1 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 9: *S. hortensis* ekstraktı %2 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 10: *S. hortensis* ekstraktı %2 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 11: *S. hortensis* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 12: *S. hortensis* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 13: *C. annum* ekstraktı %3 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 14: *C. annum* ekstraktı %3 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 15: *C. annum* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 16: *C. annum* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 17: *O. europaea* ekstraktı %3 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 18: *O. europaea* ekstraktı %3 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 19: *O. europaea* ekstraktı %5 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 20: *O. europaea* ekstraktı %5 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 21: *O. europaea* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 22: *O. europaea* ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 23: (Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve *A. parasiticus* NRRL 465, 24: (Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve *A. parasiticus* NRRL 2999, 25: (Negatif kontrol) *A. parasiticus* NRRL 465, 26: (Negatif kontrol) *A. parasiticus* NRRL 2999, 27: Kontrol (Ekstrakt, potasyum sorbat ve *A. parasiticus* yok)

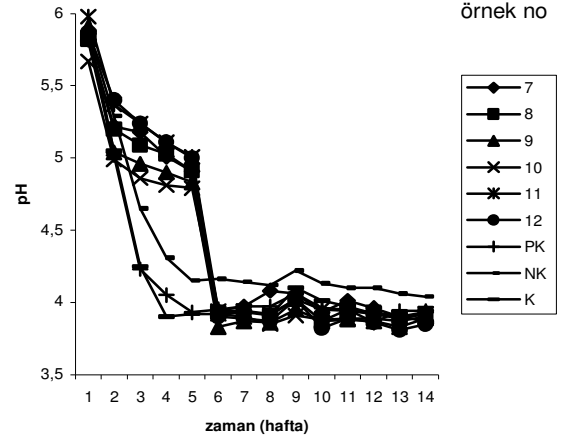
Sekizinci haftada 5. ve 24. örneklerin pH değerlerinde değişim gözlenmezken, 6., 7., 18. ve 21. örneklerin pH değerlerinde artış, diğer örneklerin pH değerlerinde ise düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,82\pm 0,01$  ile 4. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,84\pm 0,01$  ile 17. örnekte gözlenmiştir. Dokuzuncu hafta pH sonuçları incelendiğinde ise; 6., 7. ve 17. örneklerin pH değerlerinde düşüş gözlenirken, diğer örneklerin pH değerlerinde artış gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,91\pm 0,01$  ile 4. ve 10. örneklerde gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,84\pm 0,01$  ile 18. örnekte gözlenmiştir. Onuncu haftaya gelindiğinde ise; tüm örneklerin pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,82\pm 0,01$  ile 12. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,71$  ile 19. örnekte gözlenmiştir. On birinci haftada 16. ve 22. örneklerin pH değerleri bir önceki hafta ile aynı kalırken, 2., 5., 7., 8., 9., 10., 12., 14., 17., 18., 20. ve 25. örneklerin pH değerleri artarken, diğer örneklerin pH değerlerinde düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,83\pm 0,01$  ile 4. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,76\pm 0,01$  ile 17. örnekte gözlenmiştir. On ikinci haftada 10., 14., 15., 18., 20. ve 26. örneklerin pH değerleri değişmemişken, 25. örneğin pH değerinde artış, diğer örneklerin pH değerlerinde ise düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,82\pm 0,01$  ile 4. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,73\pm 0,01$  ile 18. örnekte gözlenmiştir. On üçüncü haftada 2., 3., 4. ve 16. örneklerin pH değerleri değişmemişken, 1., 23. ve 24. örneklerin pH değerlerinde artış, diğer örneklerin pH değerlerinde ise düşüş gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,81\pm 0,01$  ile 12. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,71\pm 0,01$  ile 17. örnekte gözlenmiştir. Fermantasyonun son haftası olan on dördüncü haftada ise; 2. ve 24. örneklerin pH değerleri değişmemişken, 16., 19., 21., 23., 25., 26. ve 27. örneklerin pH değerlerinde düşüş, diğer örneklerde ise artış gözlenmiştir. En düşük pH değeri pH  $3,84\pm 0,00$  ile 4. örnekte gözlenirken, en yüksek pH değeri pH  $4,74\pm 0,01$  ile 17. örnekte gözlenmiştir.

Fermentasyon süresince örneklerin pH değerlerindeki değişimlerin, muamele farklılıkları gözetilerek, kullanılan ekstrakt türüne göre değişimleri Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

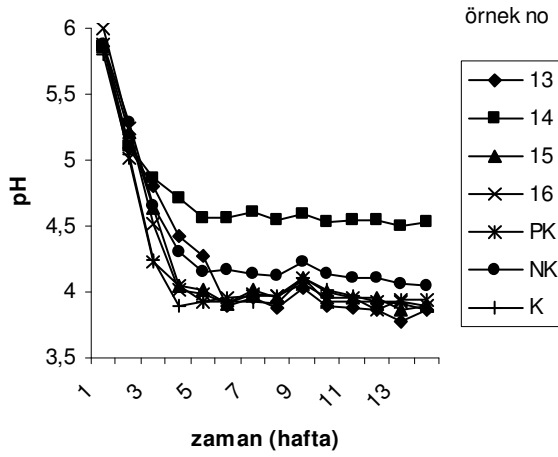




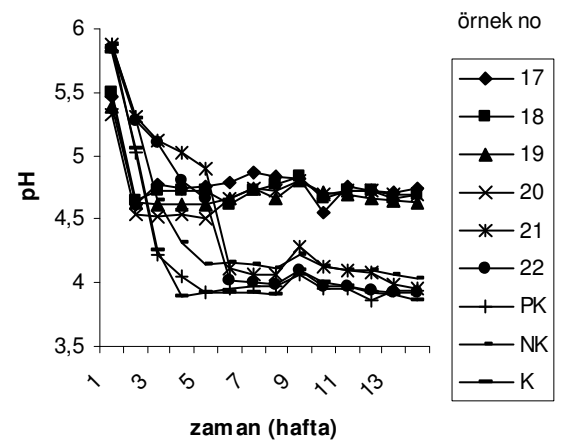
(a)



(b)



(c)



(d)

**Şekil 4.2.** Fermentasyon süresince salamuralardaki pH değişimleri (a: *O.onites* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, b: *S.hortensis* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, c: *C. annuum* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, d: *O. europaea* ekstraktı ile muamele edilen örnekler) PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, K: Kontrol

Şekil 4.2. (a) 'da yer alan *Origanum onites* ekstraktı ile muamele edilen zeytin örnekleri incelendiğinde; 1., 5. ve 6. örneklerin pH değerlerinde beşinci haftada ani bir düşüş gözlenmişken, 2., 3. ve 4. örneklerin pH değerlerinin altıncı haftada benzer bir düşüş gösterdikleri görülmektedir. Sekizinci haftada ise 5. örneğin pH değeri değişmezken 1., 2., 3., ve 4. örneklerin pH değerleri düşmüş, 6. örneğin pH değeri ise yükselmiştir. Fermentasyonun son haftasında ise pH değerlerinin birbirine yakın oldukları görülmektedir. Fermentasyonun 6. haftasına kadar pH değerlerinin kontrol gruplarına göre yüksek olduğu, 6. haftada ise kontrol gruplarına yakın pH değerlerinde oldukları görülmektedir.

Şekil 4.2. (b)'de gösterilen *Satureja hortensis* ekstraktı ile muamele edilen zeytin örnekleri incelendiğinde ise; örneklerdeki pH değeri değişimlerinin birbiri ile uyumlu oldukları görülmektedir. Fermentasyonun 6. haftasına kadar yüksek seyreden pH değerlerinin 6. haftada ani bir düşüşle, kontrol gruplarının pH değerleri ile yakın değerlerde oldukları görülmektedir.

Şekil 4.2. (c)'de yer alan *Capsicum annuum* ekstraktı ile muamele edilen zeytin örnekleri incelendiğinde; 13., 15. ve 16. örneklerin pH değişimlerinde çok büyük farklılıklar görülmezken, 14. örneğin pH değerinin dördüncü haftadan itibaren diğer örneklerinkine göre yüksek kaldığı görülmektedir.

Şekil 4.2. (d) incelendiğinde, *Olea europaea* ekstraktı ile muamele edilen zeytin örneklerinden K-sorbitatlı örnekler haricindekilerin pH değerlerinin oldukça yüksek olduğu ve fermentasyonu bu yüksek pH değerleriyle tamamladıkları görülmektedir. Bu örneklerde %3 ve %5 gibi yüksek oranlarda kullanılmış olan *Olea europaea* ekstraktı nedeniyle fermentasyonda istenmeyen mikroorganizmaların gelişmiş olabileceği ve bunların da fermentasyonu geciktirmiş olabileceği düşünülmektedir.

Kontrol grubu örneklere ait pH değişim eğrileri incelendiğinde ise; kontrol grubu örneklerde ki pH değişimlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. pH değerlerinin ilk dört hafta boyunca düştüğü, dokuzuncu haftaya kadar ise pH değerlerinde önemli bir değişim olmadığı, dokuzuncu haftada bir miktar yükselen pH değerlerinin onuncu haftada tekrar düştüğü ve fermentasyonun sonuna kadar önemli bir değişim olmadığı görülmektedir. Bu sebeptendir ki, kontrol grupları dışında kalan diğer örneklere ait eğrilerde gözlenen farklılıkların, örneklere ilave edilen ekstraktlardan kaynaklanmış olduğu düşünülmektedir.

Örneklerin pH değerlerindeki farklılıkları belirlemek amacıyla varyans analizi yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.5, Çizelge 4.6. ve Çizelge 4.7’de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Birinci haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnek	26	2,411	0,09	1029,064**
hata	54	0,005	0,00009	
Genel	80	2,416	-	-

\*\* p<0,01 düzeyinde önemli

**Çizelge 4.6.** Yedinci haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnek	26	7,683	,295	3278,701**
hata	54	0,004867	0,00009	-
Genel	80	7,688	-	-

\*\* p<0,01 düzeyinde önemli

**Çizelge 4.7.** On dördüncü haftada örneklerin pH değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynağı	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	Kareler Ortalaması	F Değeri
Örnek	26	6,959	,268	3010,991**
hata	54	0,0048	0,000088	-
Genel	80	6,964	-	-

\*\* p<0,01 düzeyinde önemli

Varyans analiz sonuçlarına göre birinci, yedinci ve on dördüncü haftalarda örneklerin pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (p<0,01). Bu sonuçlar, örnekler arasındaki muamele farklılıklarının önemli olduğunu göstermektedir. Farklılıkların belirlenmesi amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi yapılmış ve sonuçları Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da verilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, birinci haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları

örnek	sonuçlar
16	A
11	A
9	B
5	B C
2	B C
24	C
25	C
26	C
12	C D
13	C D
14	C D
15	C D
21	C D
6	D
22	D
23	D
7	E
8	E
27	E
1	F
3	F
10	G
4	G
18	H
17	H
19	I
20	J

Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, farklı harflerle gösterilen örnek ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir. pH değerlerinin örnekler arası farklılıkları incelendiğinde birinci haftada; 16. ile 11. örnekler, 9., 5. ve 2. örnekler, 5., 2., 24., 25., 26. örnekler, 5., 2., 24., 25., 26. 12., 13., 14., 15. ve 21. örnekler, 12., 13., 14., 15., 21., 6., 22., 23. örnekler, 7., 8., 27. örnekler, 1. ve 3. örnekler, 4. ve 10. örnekler, 18. ve 17. örnekler 19. ve 20. örnekler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 7. haftada 19., 20., 18. örnekler, 15., 22., 23., 16. örnekler, 23., 16., 6. örnekler, 16., 6., 7., 24. örnekler 6., 7., 24., 1., 13. örnekler 7., 24., 1., 13., 2. örnekler 1., 13., 2., 11., 5., 8. örnekler 2., 11., 5., 8., 27. örnekler 10., 3., 12. örnekler 3., 12. örnekler 3., 12., 9. örnekler ve 9., 4. örnekler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur. 14. haftada 18., 20. örnekler, 25., 23. örnekler, 21., 24. örnekler, 24., 22., 6., 7., 8., 1., 11., 5., 3. örnekler, 22., 6., 7., 8., 1., 11., 5., 3., 16. örnekler, 8., 1., 11., 5., 3., 16., 10., 15. örnekler, 3., 16., 10., 15., 9. örnekler, 2., 13., 27., 12., 4. örnekler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

**Çizelge 4.9.** Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, yedinci haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları

örnek	sonuçlar
17	A
19	B
20	B
18	B
14	C
26	D
25	E
21	F
15	G
22	G
23	G H
16	G H I
6	H I J
7	I J K
24	I J K
1	J K L
13	J K L
2	K L M
11	L M
5	L M
8	L M
27	M
10	N
3	N O
12	N O
9	O P
4	P

Yedinci haftada örneklerin pH değerleri arasındaki farklılıklar incelendiğinde; 19., 20.,18. örnekler 15., 22., 23., 16. örnekler 23., 16., 6. örnekler 16., 6., 7., 24. örnekler 6., 7., 24., 1., 13. örnekler 7., 24., 1., 13., 2. örnekler 1., 13., 2., 11., 5., 8. örnekler 2., 11., 5., 8., 27. örnekler 10., 3., 12. örnekler 3., 12., 9. örnekler ve 9., 4. örnekler arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

**Çizelge 4.10.** Tukey çoklu karşılaştırma testine göre, 14. haftada örnek ortalamalarının (ikili) karşılaştırma sonuçları

örnek	sonuçlar
17	A
18	B
20	B
19	C
14	D
26	E
25	F
23	F
21	G
24	G H
22	H I
6	H I
7	H I
8	H I J
1	H I J
11	H I J
5	H I J
3	H I J K
16	I J K
10	J K
15	J K
9	K
2	L
13	L
27	L
12	L
4	L

On dördüncü haftada ise; 18., 20. örnekler 25., 23. örnekler 21., 24. örnekler 24., 22., 6., 7., 8., 1., 11., 5., 3. örnekler 22., 6., 7., 8., 1., 11., 5., 3., 16. örnekler 8., 1., 11., 5., 3., 16., 10., 15. örnekler 3., 16., 10., 15., 9. örnekler 2., 13., 27., 12., 4. örneklerin pH değerleri arasında ki fark önemsiz bulunmuştur.

#### 4.5. Fermentasyon Süresince Laktik Asit Bakterileri Sayılarındaki Değişim

Zeytin fermentasyonu süresince, örnek salamuralarında laktik asit bakterilerinin sayısının belirlenmesi amacıyla mikrobiyolojik analizler yapılmıştır ve sonuçlar Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Başlangıçta tüm örneklerdeki laktik asit bakterilerinin sayısı  $6,11 \pm 0,03$  log kob/mL olarak belirlenmiştir. Denemede laktik starter kültür kullanılması sebebiyle başlangıçtaki laktik asit bakterilerinin sayısı, spontan fermentasyonla yapılan zeytinlere göre yüksektir. Nitekim Zeytin ve ark. (2008) laktik starter kültür kullanılmadan yaptıkları bir zeytin denemesinde, fermentasyonun ilk üç haftasında laktik asit bakterisine rastlanmadığını bildirmişlerdir.

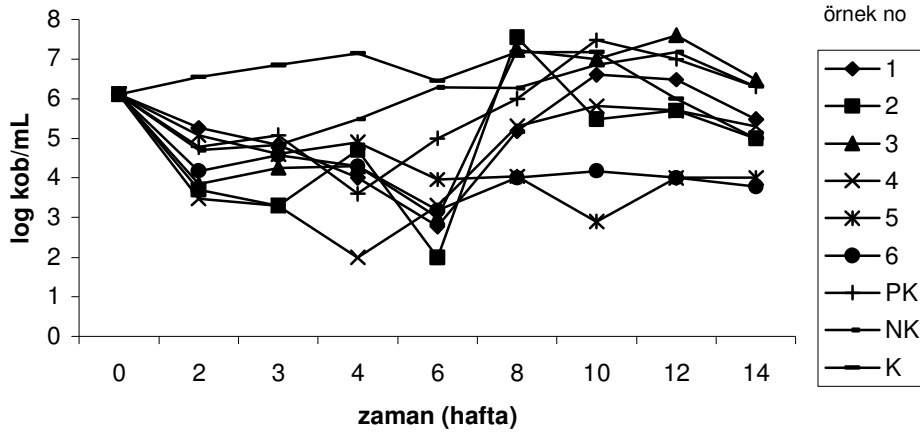
Fermentasyonun ikinci haftasında kontrol grubu hariç diğer örneklerde, laktik asit bakterisi sayıları düşmeye başlamıştır ve en düşük sayı  $3,30 \pm 0,04$  log kob/mL ile 10. örnekte, en yüksek sayı ise  $6,54 \pm 0,01$  log kob/mL ile 27. örnekte yani kontrol grubunda gözlenmiştir. 27. örnek olan kontrol grubunda laktik asit bakterisi sayısının yüksek çıkmasının sebebi olarak, bu örnekte küf inokülasyonunun yapılmamış olması ve ekstrakt ya da potasyum sorbat gibi herhangi bir gelişimi engelleyici maddenin kullanılmaması düşünülmektedir. Üçüncü hafta sayımları incelendiğinde ise; en düşük sayının  $3,30 \pm 0,24$  log kob/mL ile 2. ve 4. örneklerde olduğu, en yüksek sayının ise  $6,85 \pm 0,06$  log kob/mL ile yine 27. örnekte olduğu görülmektedir. Dördüncü haftada en düşük sayının  $2,00 \pm 0,04$  log kob/mL ile 4., 10. ve 12. örneklerde olduğu, en yüksek sayının ise  $7,15 \pm 0,03$  log kob/mL ile 27. örnekte olduğu görülmektedir. Altıncı haftada ise en düşük sayının  $2,00 \pm 0,04$  log kob/mL ile 2. örnekte olduğu, en yüksek sayının ise  $6,53 \pm 0,01$  log kob/mL ile 15. örnekte olduğu, bunun hemen ardından  $6,45 \pm 0,02$  log kob/mL ile 27. örneğin geldiği görülmektedir. Sekizinci haftada en düşük sayının  $4,00 \pm 0,04$  log kob/mL ile 6. örnekte olduğu, en yüksek sayının ise  $8,18 \pm 0,03$  log kob/mL ile 16. örnekte olduğu görülmektedir. Onuncu haftada en düşük sayının  $2,90 \pm 0,05$  log kob/mL ile 5. örnekte olduğu, en yüksek sayının ise  $7,88 \pm 0,01$  log kob/mL ile 22. örnekte olduğu görülmektedir. On ikinci haftada en düşük değer  $4,00 \pm 0,04$  log kob/mL olup 5., 6. ve 20. örneklerde gözlenmiştir. En yüksek değer ise,  $7,60 \pm 0,11$  log kob/mL olup 3. örnekte gözlenmiştir. Fermentasyonun son haftası olan on dördüncü haftada ise, en düşük değer  $3,00 \pm 0,04$  log kob/mL ile 14. örnekte tespit edilmişken, en yüksek değer  $7,18 \pm 0,03$  log kob/mL ile 25. örnekte tespit edilmiştir.

**Çizelge 4.11.** Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim (log kob/mL)

Örnek	başlangıç	2. hafta	3. hafta	4. hafta	6. hafta	8. hafta	10. hafta	12. hafta	14. hafta
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	5,26±0,03	4,84±0,07	4,00±0,04	2,78±0,07	5,18±0,03	6,60±0,11	6,48±0,15	5,48±0,15
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,70±0,09	3,30±0,24	4,70±0,09	2,00±0,04	7,55±0,01	5,48±0,15	5,70±0,09	5,00±0,04
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	3,84±0,06	4,26±0,02	4,30±0,04	3,00±0,04	7,23±0,03	7,00±0,04	7,60±0,11	6,48±0,15
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,48±0,15	3,30±0,24	2,00±0,04	3,30±0,04	5,30±0,24	5,81±0,01	5,70±0,11	5,30±0,24
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	5,08±0,04	4,60±0,11	4,90±0,05	3,96±0,05	4,04±0,04	2,90±0,05	4,00±0,04	4,00±0,04
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,18±0,03	4,57±0,01	4,30±0,04	3,18±0,03	4,00±0,04	4,18±0,03	4,00±0,04	3,78±0,07
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,48±0,15	4,48±0,15	4,48±0,15	3,48±0,15	6,30±0,24	6,53±0,01	6,48±0,15	5,00±0,04
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,60±0,11	3,84±0,06	4,40±0,01	3,23±0,03	6,70±0,09	6,70±0,01	5,00±0,04	4,90±0,05
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	3,48±0,15	5,30±0,24	5,50±0,01	5,49±0,01	7,55±0,01	7,18±0,03	6,04±0,04	6,00±0,04
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,30±0,04	4,48±0,15	2,00±0,04	2,30±0,04	6,23±0,03	6,20±0,03	6,40±0,02	5,30±0,24
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,48±0,15	4,60±0,11	4,48±0,15	5,30±0,24	6,40±0,02	6,90±0,05	6,70±0,09	6,48±0,15
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,57±0,01	4,53±0,01	2,00±0,04	5,00±0,04	6,85±0,06	5,90±0,05	5,70±0,09	5,30±0,24
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,66±0,01	3,70±0,09	3,18±0,03	3,30±0,24	4,70±0,09	4,00±0,04	5,89±0,00	3,30±0,24
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,48±0,15	3,84±0,06	2,70±0,09	4,99±0,00	4,60±0,11	4,00±0,04	5,20±0,03	3,00±0,04
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,70±0,09	4,48±0,15	4,30±0,04	6,53±0,01	7,04±0,04	6,48±0,15	7,30±0,24	5,30±0,24
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,78±0,08	4,54±0,01	5,70±0,09	3,30±0,24	8,18±0,03	7,60±0,11	6,78±0,07	6,48±0,15
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,40±0,01	5,18±0,03	5,18±0,03	4,23±0,03	5,79±0,09	4,60±0,11	5,48±0,15	4,60±0,11
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	3,48±0,15	3,95±0,05	4,84±0,07	5,00±0,04	5,00±0,04	5,00±0,04	5,30±0,24	5,00±0,04
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,20±0,03	5,13±0,00	5,08±0,04	2,85±0,06	5,78±0,07	4,60±0,11	5,67±0,01	4,00±0,04
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,84±0,07	5,02±0,00	3,60±0,11	4,00±0,04	6,40±0,02	5,48±0,15	4,00±0,04	4,00±0,04
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,63±0,01	5,11±0,03	3,70±0,09	4,00±0,04	7,04±0,04	6,78±0,07	6,70±0,09	6,48±0,15
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,38±0,02	3,70±0,09	4,57±0,01	4,08±0,04	7,00±0,04	7,88±0,01	6,85±0,06	5,79±0,09
(Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	5,30±0,04	5,49±0,01	5,48±0,15	6,26±0,02	6,00±0,04	7,18±0,03	6,78±0,07	6,48±0,15
(Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,78±0,07	5,08±0,04	3,60±0,11	5,00±0,04	6,00±0,04	7,48±0,15	7,00±0,54	6,30±0,24
(Negatif kontrol) <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,11±0,03	4,78±0,07	5,40±0,02	6,30±0,24	7,18±0,03	6,00±0,04	7,45±0,02	7,00±0,54	7,18±0,03
(Negatif kontrol) <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	6,11±0,03	4,70±0,09	4,84±0,07	5,48±0,15	6,28±0,02	6,26±0,02	6,85±0,06	7,18±0,03	6,30±0,24
Kontrol (Ekstrakt, potasyum sorbat ve <i>A. parasiticus</i> yok)	6,11±0,03	6,54±0,01	6,85±0,06	7,15±0,03	6,45±0,02	7,18±0,03	7,18±0,03	6,00±0,04	5,00±0,04

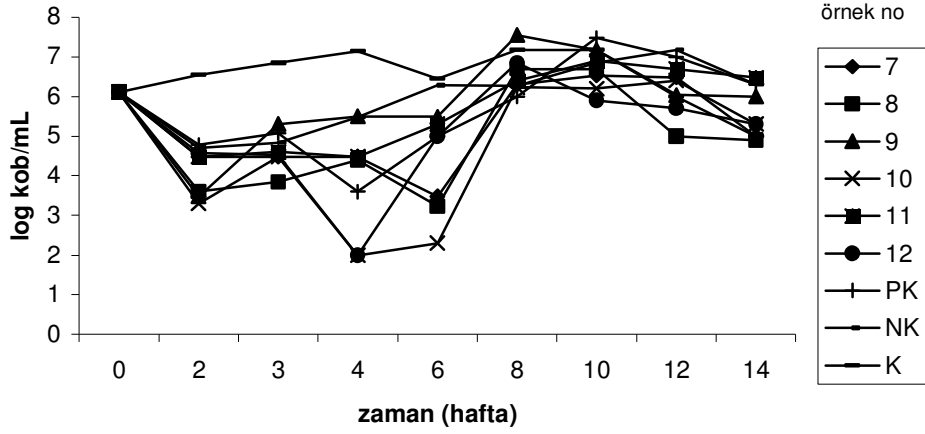


Fermentasyon süresince örneklerin laktik asit bakterileri sayılarındaki değişimlerin, muamele farklılıkları gözetilerek, kullanılan ekstrakt türüne göre değişimleri Şekil 4.3 (i) ve Şekil 4.3 (ii)'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara bakılarak, örneklere ilave edilen ekstraktların laktik asit bakterilerinin gelişimini engellediği düşünülebilir. Nitekim Borcaklı ve Özay (2000)'ın herhangi bir inhibe edici madde kullanmadan yalnızca laktik starter kültür kullanarak yaptıkları bir zeytin fermentasyonu denemesinde, laktik asit bakterilerinin sayısında zamana bağlı olarak genel bir artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Çizelge 4.11. ile Şekil 4.3(i) ve Şekil 4.3(ii)'de görüldüğü gibi laktik asit bakterilerinin sayısında zamanla azalmalar olmuşsa da, fermentasyonun son haftasında elde edilen değerler, Tunç ve ark. (2000)'nın laktik starter kültür kullanılmadan fermentasyonunu tamamlamış zeytinlerde yaptıkları analiz sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Bu da; salamuralarda her ne kadar ekstrakt gibi laktik asit bakterilerinin gelişimini engelleyici maddeler ile küfler olsa da, laktik asit bakterilerinin salamuralarda geliştiğini göstermektedir.

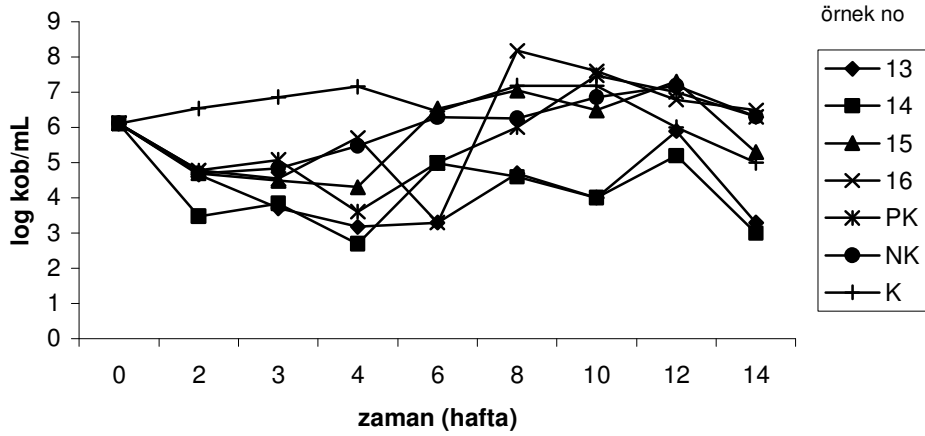


(a)

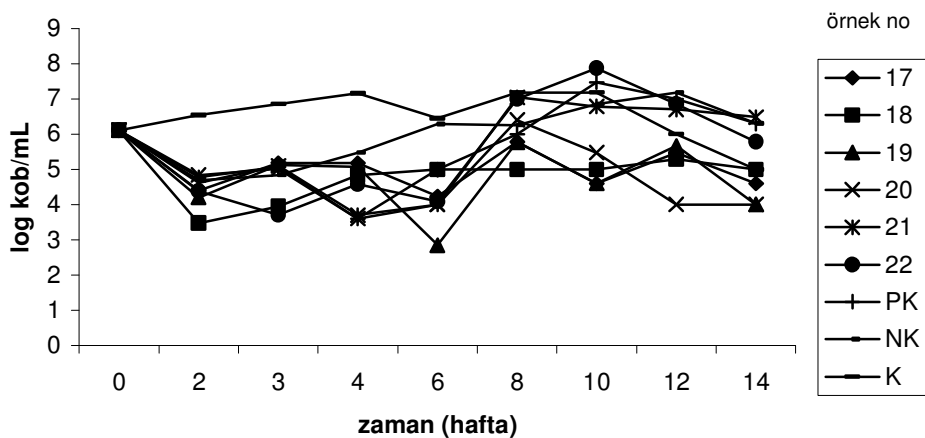
Şekil 4.3 (i). Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim (a: *O.onites* ekstraktı ile muamele edilen örnekler) PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, K: Kontrol



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.3 (ii). Fermentasyon süresince laktik asit bakterileri sayılarındaki değişim (b: *S.hortensis* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, c: *C. annuum* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, d: *O. europaeae* ekstraktı ile muamele edilen örnekler) PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, K: Kontrol

#### 4.6. Fermentasyon Süresince Küf Sayılarındaki Değişim

Fermentasyon süresince örneklerin küf sayılarındaki değişim Çizelge 4.12’de verilmiştir.

**Çizelge 4.12.** Fermentasyon süresince örneklerin küf sayılarındaki değişim (log kob/mL)

Örnek	0. hafta	6. hafta	8. hafta	10. hafta
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	4,50±0,4	2,85±0,3	1,28±0,04
<i>O. onites</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	4,90±0,4	3,12±0,4	1,43±0,04
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	4,13±0,3	2,10±0,2	-
<i>O. onites</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	-	-	-
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	2,12±0,4	-	-
<i>O. onites</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	2,23±0,4	1,30±0,2	-
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	3,40±0,1	2,24±0,0	1,16±0,4
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	3,24±0,2	2,10±0,4	1,10±0,4
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	2,78±0,7	1,76±0,1	-
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %2 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	2,00±0,4	1,12±0,1	-
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	3,15±0,3	1,85±0,3	-
<i>S. hortensis</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	2,80±0,2	1,17±0,1	-
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,0	7,40±0,4	7,57±0,1	7,83±0,1
<i>C. annuum</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,2	7,93±0,3	8,10±0,1	8,21±0,1
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,2	3,14±0,4	2,00±0,2	-
<i>C. annuum</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	3,20±0,3	1,97±0,3	-
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,3	7,34±0,1	7,45±0,1	7,53±0,3
<i>O. europaea</i> ekstraktı %3 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,2	8,10±0,4	8,21±0,1	8,30±0,1
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,1	7,56±0,1	7,95±0,4	8,23±0,5
<i>O. europaea</i> ekstraktı %5 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,0	8,12±0,2	8,30±0,1	8,72±0,1
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 465	6,85±0,2	3,00±0,4	1,80±0,0	-
<i>O. europaea</i> ekstraktı %0,05 + potasyum sorbat %0,05 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,1	3,10±0,3	2,00±0,8	-
(Pozitif kontrol) Potasyum sorbat %0,1 ve <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,3	5,80±0,4	5,48±0,8	4,17±0,3
(Negatif kontrol) <i>A. parasiticus</i> NRRL 2999	7,51±0,3	8,13±0,2	8,40±0,2	8,82±0,2

Çizelge 4.12 ile Şekil 4.4(i) ve Şekil 4.4(ii) incelendiğinde, sıfırıncı haftadaki küf sayılarının *A. parasiticus* NRRL 465 ile inoküle edilen örneklerde 6,85±0,06 log kob/mL, *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilen örneklerde ise 7,51±0,01 log kob/mL olduğu görülmektedir.

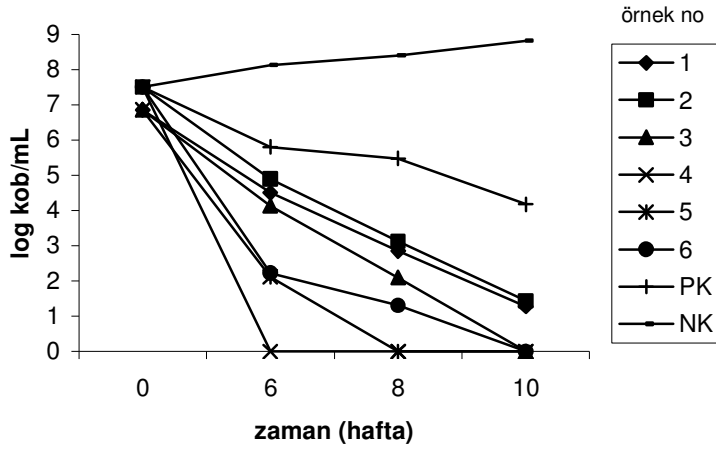
Altıncı haftada, *O. onites*, *S. hortensis* ile muamele edilen ilk 12 örnek ve içerisinde %1 oranında potasyum sorbat bulunan, 24 numara ile gösterilmiş olan pozitif kontrol grubuna ait örneklerin küf sayılarında genel bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların, yapılan *in*

*vitro* çalışmanın sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. *O. onites* ve *S. hortensis* bitki ekstraktlarının fermentasyon süresince küf gelişimini azalttığı, hatta bazı örneklerde tamamen inhibe ettiği tespit edilmiştir.

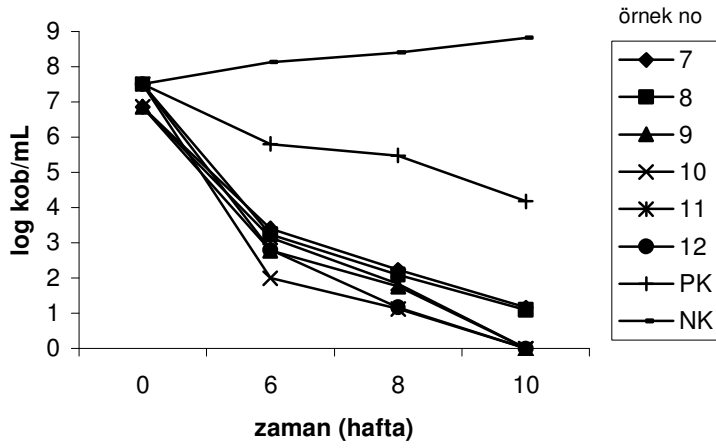
*C. annuum* (%3) ekstraktı ile muamele edilmiş olan 13 ve 14 numaralı örnekler ile, *O. europaea* (%3, %5) ekstraktı ile muamele edilmiş olan 17, 18, 19 ve 20 numaralı örneklerde ise küf gelişimi belirlenmiştir. Ancak küf gelişiminin, 26 numara ile gösterilmiş olan, içerisinde herhangi bir inhibe edici madde bulunmayan, yalnızca *A. parasiticus* inoküle edilmiş olan negatif kontrol grubundan düşük olduğu tespit edilmiştir.

Bitki ekstraktları ve potasyum sorbat ile beraber muamele edilmiş örnekler olan 5 ve 6 (bitki ekstraktı ve *O. onites*), 11 ve 12 (bitki ekstraktı ve *S. hortensis*), 15 ve 16 (bitki ekstraktı ve *C. annuum*), 21 ve 22 (bitki ekstraktı ve *O. europaea*) numaralı örneklerde küf gelişiminin 10. haftaya gelindiğinde tamamen inhibe edilmiş olduğu belirlenmiştir.

Bu sonucun, örneklere ilave edilen ekstrakt ve potasyum sorbattan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gourama ve Bullerman (1988), Yiğit ve Korukluoğlu (2007) potasyum sorbatın küf gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Fan ve Chen (1999), Martinez-Lozano ve ark. (2000) bazı bitki ekstraktlarının *A. parasiticus* gelişimini engellediğini bildirmişlerdir. Denemede kullanılan zeytinlerin sağlam zeytinler olması nedeniyle, zeytinlerde küf gelişiminin zayıf olduğu da söylenebilir. Nitekim Weidenbörner (2001), zeytinlerde küf gelişiminin, küfün meyve eti içerisine girişi ile başladığını, Mahjoub ve Bullerman (1987b) ile Tantaoui-Elaraki ve Mannioui (1996) ise, zeytinin dış yüzeyinde bulunan zarın, küflere karşı zeytini koruyucu bir özellik gösterdiğini belirtmişlerdir.

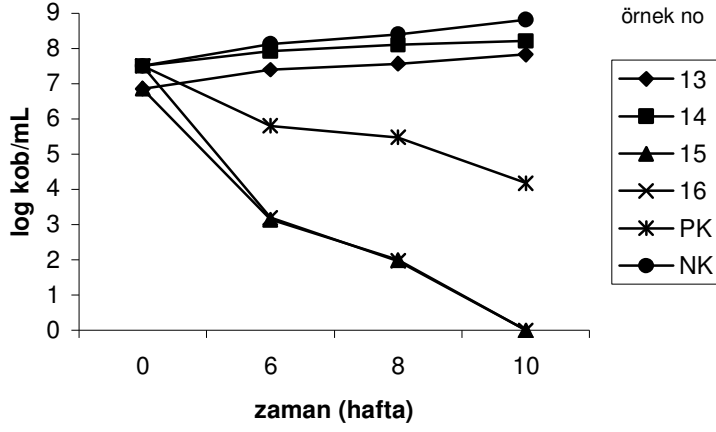


(a)

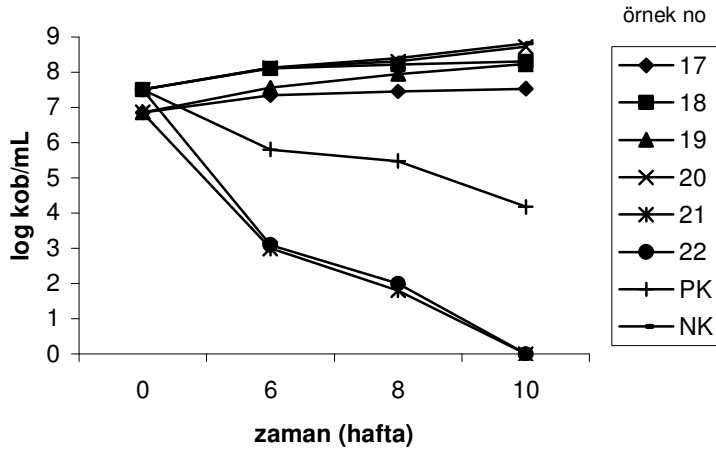


(b)

Şekil 4.4 (i). Fermentasyon süresince küf sayılarındaki değişim (a: *O.onites* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, b: *S.hortensis* ekstraktı ile muamele edilen örnekler) PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, K: Kontrol



(c)



(d)

**Şekil 4.4 (ii).** Fermentasyon süresince küf sayılarındaki değişim (c: *C. annuum* ekstraktı ile muamele edilen örnekler, d: *O. europeae* ekstraktı ile muamele edilen örnekler) PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, K: Kontrol

#### 4.7. Fermentasyon Sonrası Zeytinlerin Bazı Fizikokimyasal Özellikleri

Fermentasyon denemesi sonunda, kontrol grubu zeytinlerde yapılan kurumadde, pH, tuz ve toplam şeker analiz sonuçları Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

**Çizelge 4.13.** Fermentasyon sonunda zeytinlerin bazı fizikokimyasal analiz sonuçları

<b>Kurumadde (%)</b>	<b>Tuz (%)</b>	<b>Toplam şeker (%)</b>	<b>pH</b>
51±1	2,04±0,04	1,04±0,01	4,4±0,02

Fermente zeytinlerde kurumadde değeri %51±1, tuz %2,04±0,04 , toplam şeker %1,04±0,01 ve pH 4,4±0,02 olarak bulunmuştur.

Fermente zeytinlerde bulunan kurumadde değeri Akçay ve ark. (2000) ile Arıcı ve Aktan (1997)'in belirlemiş oldukları değerler ile benzerlik göstermektedir.

Literatür araştırması yapılırken, fermente zeytin danelerinde tuz analizinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Araştırmalarda tuz analizlerinin yalnızca salamurada yapıldığı tespit edilmiştir.

Fermente zeytinlerde belirlenmiş olan toplam şeker miktarı Tetik (2001)'in belirttiği değerler ile benzer tespit edilmiştir.

Fermente zeytinlerin pH değeri, Akçay ve ark. (2000) ile Arıcı ve Aktan (1997)'in belirlemiş oldukları değerler ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

Arıcı ve Aktan (1997)'in belirttiğine göre; fermentasyon sırasında zeytin daneleri ve salamura arasındaki madde alışverişi nedeniyle, salamurada bulunan tuz, zeytin danelerinin içerisine girerken, danelerden de su çıkmaktadır. Bu madde alışverişi nedeniyle salamura zeytin danelerinin kurumadde miktarı, ham zeytin danelerine oranla daha yüksek çıkmıştır. Örneklere starter kültür ilavesi yapıldığından, pH düşüşü daha kısa sürede gerçekleşmiş ve fermentasyon kolaylaşmıştır. Fermentasyonda rol alan mikroorganizmalar ortamda ki şekeri

besin kaynağı olarak kullandıklarından, fermentasyon sonunda şeker miktarında azalma olduğu belirlenmiştir.

#### **4.8. Aflatoksin Analiz Sonuçları**

Bu araştırma kapsamında, sofralık siyah zeytinlerde aflatoksijenik küf gelişimi ve aflatoksin oluşumunun belirlenmesi amacıyla iki farklı deneme yapılmıştır. Her iki denemeye ait örneklerle aflatoksin analizi yapılmış ve sonuçlar örneklerin tümünde belirlenebilirlik limitinin (LOQ-Limit of Quantification) altında kaldığından, aflatoksin raporlanmamıştır. Elde edilen sonuçlara ait HPLC analiz grafikleri Ek 1’de verilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar, Türk Gıda Mevzuatı’nda belirtilen, aflatoksin limit değerleri ile ilgili yasal düzenlemeler ile uyum sağlamaktadır (Anonim 2008). Sonuçların, bazı araştırmacıların yapmış olduğu benzer çalışmalarla da uyum içinde olduğu görülmektedir. Araştırma bulguları, Ghitakou ve ark. (2006)’nın yapmış olduğu çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Eltem (1996), Mahjoub ve Bullerman (1987b), Mahjoub (1985) sağlam ve zedelenmiş taze zeytinlerin aflatoksin üreticisi küflerle bulaşık olmalarına rağmen zeytinlerde aflatoksin oluşmadığını, aflatoksinlerin hasarlı zeytinlerde oluştuğunu bildirmişlerdir. Leontopoulos ve ark. (2003) ise, hasarlı zeytinlerde AFB<sub>1</sub> oluştuğunu tespit etmişler fakat bunun risk oluşturacak düzeyde olmadığını ve zeytinlerin risk oluşturacak düzeyde aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olmadığını belirtmişlerdir. Araştırma kapsamında kullanılan zeytinler, sağlam zeytinler olup, elde edilen sonuçların literatürle paralellik gösterdiği görülmektedir. Sağlam zeytinlerin aflatoksin üreticisi küflerle bulaşık olmalarına rağmen aflatoksin içermemeleri, Mahjoub ve Bullerman (1987b) ile Tantaoui-Elaraki ve Mannioui (1996)’nin belirttikleri gibi, zeytinin dış yüzeyinde bulunan zarın, küflere karşı zeytini koruyucu bir özellik gösterdiği şeklinde açıklanabilir. Nitekim Weidenbörner (2001), zeytinlerde küf gelişiminin, küfün meyve eti içerisine girişi ile başladığını, bunu misel gelişimi ve mikotoksin oluşumunun izlediğini belirtmiştir. Bunun yanı sıra, Leontopoulos ve ark. (2003)’nin belirtmiş olduğu gibi, zeytinin aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olmadığı da düşünülmektedir. Araştırma sonucunda, yukarıda bahsedilen her iki fikri de destekleyici olarak elde edilen bir başka bulgu da; bitki ekstraktı ve potasyum sorbat içermeyen, küf inokülasyonu yapılmış olan kontrol grubunda dahi aflatoksin tespit edilememiş olmasıdır.



Yapılan *in vitro* çalışmalar sonucunda, *C. annuum* ve *O. europaea* ekstraktlarının küf gelişimini teşvik ettiğinin belirlenmesine rağmen, bu örneklerde dahi aflatoksine rastlanmamış olması, zeytinin aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olmadığı görüşünü desteklemektedir.

Çalışmada laktik starter kültür kullanılmış olmasının da küf gelişimi ve aflatoksin oluşumu üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. El-Nezami ve ark. (1998), Gourama (1997), Luchese ve ark. (1992) gıda üretiminde starter olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin aflatoksijenik küflere karşı inhibitör etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Zeytine, fermentasyon başlangıcında starter kültür olarak ilave edilen *Lb. plantarum*'un bazı suşlarının da çeşitli ortamlarda *A. parasiticus*'un bazı suşlarını veya aflatoksin üretimlerini inhibe ettiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Gourama ve Bullerman 1995, Onilude ve ark. 2005). Laktik asit bakterilerinin inhibitör etkilerinin ürettikleri bazı metabolitlerden kaynaklandığı belirtilmektedir. Lavermicocca ve ark. (2000) ile [Ogunshe](#) ve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışmalar bu sonucu desteklemektedir.

Araştırma bulguları literatür ile karşılaştırıldığında genel olarak bir paralellik gözlenmesine rağmen bazı araştırmacıların sonuçları ile farklılık gösterdiği görülmektedir. Sanz-Perez ve ark. (1973) *A. flavus* ve *A. parasiticus* türlerinin zeytinde de gelişebildiğini ve aflatoksin oluşturabildiğini belirtilmiştir. Sonuçlar arasındaki bu farklılığın, zeytinlerin fiziksel durumundan ya da analiz yönteminden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada, bitki ekstraktlarının (*Origanum onites*, *Satureja hortensis*, *Capsicum annuum* ve *Olea europaea*) farklı konsantrasyonlarının ve potasyum sorbatın sofralık siyah zeytinlerde küf gelişimi ve aflatoksin oluşumuna etkileri incelenmiştir. Araştırmada materyal olarak salamura siyah zeytinin seçilmesinde; zeytinin yaygın olarak tüketilen bir gıda olması ve üretim aşamasında en fazla küflenen gıdalarımızdan biri olması dikkate alınmıştır.

Araştırma kapsamında iki farklı deneme yapılmıştır. İlk denemede ham zeytinler bitki ekstraktları ve/veya potasyum sorbat, *Lb. plantarum* içeren salamuralarda, *A. parasiticus* NRRL 465 veya *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilerek fermente edilmişlerdir. Fermentasyon tamamlandıktan sonra HPLC tekniği kullanılarak aflatoksin analizi yapılmıştır.

Ham zeytinlerin ortalama kurumadde, toplam şeker ve pH değerleri sırasıyla  $30\pm 1$ ,  $3,57\pm 0,01$  ve  $5,04\pm 0,03$  olarak tespit edilmiştir.

Bitki ekstraktlarının tek başlarına ve potasyum sorbat ile birlikte *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkileri (*in vitro*) inhibisyon zon çapları ölçülerek belirlenmiştir. Ekstraktların *Lb. plantarum* üzerine inhibitör etkileri *S. hortensis* > *O. onites* > *C. annuum* > *O. europaea* olarak tespit edilmişken, *C. annuum* ve *O. europaea* ekstraktlarının inhibisyon etkileri ihmal edilebilir düzeyde bulunmuştur.

Bitki ekstraktları ve bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarının antifungal etkinliği (*in vitro*) belirlenmiştir. *O. onites*, *S. hortensis* ve bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarının test funguslarının gelişimini %100 oranında engellediği, *C. annuum* ve *O. europaea* küf gelişimlerini teşvik ettikleri belirlenmiştir. Genel olarak, denemede kullanılan her iki küfün bitki ekstraktlarına karşı göstermiş oldukları dirençler arasında bir paralellik tespit edilmiştir.

Fermentasyon 14 hafta sürmüştür. Fermentasyonun ilk haftasında örneklerin pH değerleri pH  $5,32\pm 0,01$  ile pH  $6,00\pm 0,01$  arasında değişmiştir. Fermentasyon süresinin yarısı olan 7. haftada örneklerin pH değerlerinin  $3,87\pm 0,01$  ile pH  $4,87\pm 0,01$  arasında değiştiği, son haftada ise pH  $3,84\pm 0,00$  ile pH  $4,74\pm 0,01$  arasında değiştiği tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel

analizler sonucunda örneklerin pH değerleri arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $p < 0,01$ ).

Fermentasyon süresince örneklerde, muamele farklılıklarına bağlı olarak, laktik asit bakterilerinin sayısında azalma ve artış gözlenmiş olup, fermentasyon sonunda en düşük laktik asit bakterisi sayılarının ( $3,00 \pm 0,04$  -  $3,30 \pm 0,24$  log kob/mL) *C. annuum* ekstraktı ile muamele edilen örneklerde, en yüksek değer ise  $7,18 \pm 0,03$  log kob/mL ile negatif kontrol grubuna ait örnekte bulunduğu tespit edilmiştir.

Fermentasyon başlangıcındaki küf sayılarının *A. parasiticus* NRRL 465 ile inoküle edilen örneklerde  $6,85 \pm 0,06$  log kob/mL, *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilen örneklerde ise  $7,51 \pm 0,01$  log kob/mL olduğu belirlenmiştir. *O. onites*, *S. hortensis* ekstraktları ile muamele edilmiş örnekler ile bitki ekstraktı + potasyum sorbat içeren örneklerin küf sayılarının, fermentasyon süresince azaldığı belirlenmiştir.

Fermentasyonun tamamlanmasının ardından, kontrol grubu zeytinlerde yapılan kurumadde, tuz, toplam şeker ve pH analizleri sonucunda zeytinlerde ortalama olarak  $\% 51 \pm 1$  kurumadde,  $\% 2,04 \pm 0,04$  tuz,  $\% 1,04 \pm 0,01$  toplam şeker tespit edilmişken pH değeri de ortalama pH  $4,4 \pm 0,02$  olarak belirlenmiştir.

İkinci denemede, fermente zeytinlere bitki ekstraktları ve/veya potasyum sorbat ilave edilerek *A. parasiticus* NRRL 465 veya *A. parasiticus* NRRL 2999 ile inoküle edilmişler ve  $\% 97$  nispi nemde, farklı sıcaklıklarda ( $+4^{\circ}\text{C}$  ve  $+25^{\circ}\text{C}$ ), 15 ve 30 gün süreyle depolanmışlardır. Örneklerde 15. ve 30. günlerde aflatoksin analizi yapılmıştır.

Araştırma kapsamında gerçekleştirilen aflatoksin analiz sonuçları, belirlenebilirlik limitinin (LOQ-Limit of Quantitation) altında kaldığından, aflatoksin sonuçları raporlanmamıştır.

Araştırma sonucunda elde edilen bulgular çerçevesinde; sofralık siyah zeytin fermentasyonunda starter kültür kullanımının, küf gelişimini sınırlandırdığı düşünülmektedir. Bunun yanı sıra, yapılan *in vitro* çalışma ile antifungal etkinliği belirlenmiş olan *O. onites* ve *S. hortensis* ekstraktları ile araştırmada kullanılan bitki ekstraktlarının potasyum sorbatlı kombinasyonlarının küf gelişimini inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonucun, ülkemizde yaygın olarak ve ilkel tekniklerle yapılan salamura zeytinciliği açısından önemli olabileceği, özellikle

salamura havuzlarının yüzeyinde oluşan ve kefeke adı verilen küf tabakasının oluşumunun engellenmesi ve toksin riskinin minimize edilebilmesi açısından önemli olduğu düşünülmektedir. *O. onites* ve *S. hortensis* bitkilerinin ülkemizde yaygın olarak bulunması, tat ve aroma açısından zeytine uyum sağlamış olması, kimyasal koruyuculara alternatif olarak kullanılma potansiyeli oluşturmaktadır. Bitki ekstraktlarının endüstriyel ölçekte kullanımı ile ilgili araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Zeytin örneklerine aflatoksijenik küf inoküle edilmiş olmasına rağmen araştırma sonucunda örneklerde aflatoksin tespit edilememiş olmasının, zeytinin aflatoksin oluşumu için uygun bir substrat olmadığı, kullanılan zeytinlerin fiziksel hasarlara uğramamış sağlam nitelikli zeytinler olması nedeniyle zeytin kabuğunun, küflerin meyve eti içerisine girişini engelleyerek toksin oluşumunu engellediği düşünülmektedir. Bu nedenle; zeytinlerin hasattan başlanarak üretimin son aşamasına kadarki süreç içerisinde, fiziksel hasara neden olabilecek etkilerden kaçınılmasının önemi anlaşılmaktadır. Fiziksel hasara uğramış (ezik, çürük, zedeli, hastalıklı, haşere tahribatı görmüş) danelerin sağlam danelerden ayrılması küf kontaminasyonunu engelleyebilmek açısından önemlidir. Bunun yanı sıra hasat, taşıma ve depolama aşamalarında sıcaklık ve nem değerlerinin kontrol edilerek küf gelişimini engelleyici tedbirler alınmalıdır. Depolarda hava sirkülasyonu sağlanması, zeytinler yükseltisi az ve hava sirkülasyonuna izin veren delikli kasalarda depolanmaları küf gelişimini engelleyebilecek uygulamalar olarak önerilmektedir. Zeytin fermentasyonunun yapıldığı beton havuzların yada polietilen kapların hava almayacak biçimde kapatılması, aerob şartlarda gelişen mikroorganizmalar olan küflerin gelişiminin engellenmesi açısından önem arz etmektedir. Zeytinlerin tüketiciye ulaşıncaya kadar geçen süre içerisinde hijyen kurallarına uyulması, işletmelerde gıda güvenliği sistemlerinin uygulamaya geçirilmesi ile küf gelişimine bağlı olarak oluşabilecek ekonomik kayıplar ve ortaya çıkabilecek sağlık sorunları da önlenmiş olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Acero-Ortega C, Dorantes-Alvarez L, Hernandez-Sanchez H, Gutierrez-Lopez G, Aparicio G, Jaramillo-Flores M E (2005). Evaluation of phenylpropanoids in ten *Capsicum annuum* L. varieties and their inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* Murray, Webb and Swann Scott A. Food Sci. Technol. Int., 11: 5- 10.
- Akçay M E, Dağlıoğlu F, Atansay F (2000). Farklı ekolojilerde yetiştirilen Gemlik zeytin çeşidinde kalite kriterleri üzerine araştırmalar. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 366-371, Bursa.
- Akgül A, Kıvanç M (1988). Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some foodborne fungi. Int. J. Food Microbiol., 6: 263-268.
- Akgül A (1993). Baharat Bilimi ve Teknolojisi. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No:15, 451 s, Ankara.
- Aktan N, Kalkan H (1999). Sofralık Zeytin Teknolojisi, Ege Üniversitesi, 120 s, İzmir.
- Ale M (1994). Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. Lett. in Appl. Microbiol., 19: 110-113.
- Alzokery N S, Nakahara K (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. International J. Food Microbiol., 80:223-230.
- Anonim, (1987). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. International Union Pure and Applied Chemistry Division Commission on Oils, Fats and Derivatives.
- Anonim (2003). Sofralık Zeytin Standardı. Türk Standartları Enstitüsü, 774, Ankara.
- Anonim (2008). Gıda Maddelerindeki Bulaşanların Maksimum limitleri Hakkında Tebliğ, Tebliğ No: 2008/26. <http://www.kkgm.gov.tr/TGK/Tebliğ/2008-26.html> (erişim tarihi, 16.12.2008)
- AOAC (2000). Aflatoxins B1 and total aflatoxin in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder. Immunoaffinity Column Method (Method Nr. 999.07). J. AOAC Int., 83, 320-340.
- Arıcı Ö, Aktan N (1997). Memecik ve Uslu siyah zeytin çeşitlerine uygulanan farklı salamura yöntemlerinin duyu ve kimyasal bileşim üzerine etkileri. Gıda, 22: 147-154.
- Arıcı M (2001). Isolierung von Schimmelpilzen und deren Bestimmung, sowie Mykotoxinanalysen aus türkischen Feigen, Erdnüssen und Oliven. Ernährung, 25: 157-160.
- Arıcı M, Aluç M, Dağlıoğlu O, Dağlıoğlu F (2005). Salamura siyah zeytinlerde aflatoxin kirliliği. Türkiye’de Mikotoksin Çalışmaları. II. Ulusal Mikotoksin Sempozyumu Bildiriler Kitabı, 34-39, İstanbul.
- Arıcı M, Sağdıç O, Geçgel Ü (2005). Antibacterial Effect of Turkish Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Oils. Grasas y Aceites, 56 (4): 259-262.
- Asehrou A, Mohieddine S, Faid M, Serhrouchni M (1997). Use of antifungal principles from garlic for the inhibition of yeasts and moulds in fermenting green olives. Grasas Y Aceites, 48: 68-73.
- Aureli P, Costantini A, Zolea S (1992). Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monogytogenes*. J. Food Protect., 55: 344-348.
- Barut E (2000). Bursa ilinin değişik yörelerinde yetiştirilen “Gemlik” zeytin çeşidinde meyvelerin kimyasal bileşimleri üzerine bir araştırma. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 361-365, Bursa.
- Başer K H C, Özek T, Tümen G, Sezik E (1993). Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* Species with commercial importance, J. Essent. Oil Res., 5: 619-623.
- Bata A, Lasztity R (1999). Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. Trends in Food Sci. Technol., 10: 223-228.

- Batinelli L, Daniele C, Cristiani M, Bisignano G, Laija A, Mazzanti G (2006). In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. *Phytomedicine*, 13: 558-563.
- Baumgart J (1993). *Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln*. Behr's Verlag, Hamburg.
- Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan T (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15: 169-172.
- Baydar H. (2005). *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları No: 51, 221s, Isparta.
- Begum F, Samajpati N (2000). Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. *Naturwissenschaften*, 87:275-277.
- Benjilali B, Tantadui-Elaraki A, Ayadi A, Ihlal M (1984). Method to study antimicrobial effects of essential oils: application to the antifungal activity of six Moroccan essences. *J. Food Protect.*, 47: 748-752.
- Betina V (1989). *Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier Publishing, 437 s, Amsterdam.
- Billing J, Sherman P (1998). Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like It Hot. *The Quarterly Review of Biology*. Volume 73, No: 1. The University of Chicago Press, <http://www.jstor.org/pss/3036683> (erişim tarihi, 10.09.2008).
- Bluma R, Amaiden M R, Daghero J, Etcheverry M (2008). Control of *Aspergillus* section Flavi growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *J. Appl. Microbiol.*, 105: 203-214.
- Borcaklı M, Özay G (2000). Üç değişik sıcaklıkta havalandırılmalı siyah zeytin fermantasyonu. *Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu*, 163-171, Bursa.
- Boyraz N, Özcan M (1997). Bitki patojeni funguslara bazı yerli baharat ekstrakt ve uçucu yağlarının antifungal etkileri. *Gıda*, 22: 457-462.
- Boyraz N, Koçak R (2006). Bazı Bitki Ekstraktlarının *In Vitro* Antifungal Etkileri. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20: 82-87.
- Boyraz N, Özcan M (2006). Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *Int. J. Food Microbiol.*, 107: 238 – 242.
- Careaga M, Fernandez E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo M E, Hernandez-Sanchez H (2003). Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. *Int. J. Food Microbiol.*, 83: 331– 335.
- Carmo E S, Lima E O, Souza E L (2008). The Potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) Essential Oil in Inhibiting the Growth of Some Food-Related *Aspergillus* Species. *Braz. J. Microbiol*, 39(2):362-367.
- Cemeroğlu B (2007). *Gıda Analizleri*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No:34, Ankara.
- Ceylan E, Fung D Y C (2004). Antimicrobial activity of spices. *J. Rapid Methods and Automation in Microbiol.*, 12: 1-55.
- Ciegler A, Lillehoj E B, Peterson R E, Hall H H (1966). Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.*, 14: 934-939.
- Croci L, Toti L, Pasqualle S D, Miraglia M, Brera C (1995). Lactic acid bacteria influence in variability of production and biotransformation of aflatoxins from *Aspergillus parasiticus*. *Rivista di Scienza Dell Alimentazione*, 24: 59-66.
- Çakır C, Yeğen O (1991). Antalya ve Çevresindeki Bazı Bitkilerin ve Uçucu Yağlarının Fungitoksik Potansiyellerinin Araştırılması. VI. Türkiye Fitopatoloji Kongresi Bildirileri, ss. 213-218.

- Çon A H, Ayar A, Gökalp H Y (1998). Bazı baharat uçucu yağlarının çeşitli bakterilere karşı antimikrobiyal etkisi. *Gıda*, 23: 171-175.
- Davis P H (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol.7, Edinburgh University Press, 322 s, Edinburgh.
- Daradimos E, Markaki P, Koupparis M (2000). Evaluation and validation of two fluometric HPLC methods for the determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in olive oil. *Food Addit. Contam.* 17: 63-65.
- Deans S G, Svoboda K P (1990). The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour Fragrance J.*, 5: 187-190.
- Delen N (2000). Avrupa Birliği'ne girerken Türkiye'de tarım ilacı kullanımı ve bu kullanımın zeytinciliğimiz açısından değerlendirilmesi. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 3-8, Bursa.
- Desphande S S (2002). Fungal Toxins. *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Hyderabad, India, 387-445.
- Dikbaş N, Kotan R, Dadaşoğlu F, Şahin F (2008). Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol *Satureja hortensis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 124: 179-182.
- Do JR, Kang SN, Kim KJ, Jo JH, Lee SW (2004). Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic contents in the water extract of medicinal plants. *Food Sci. and Biotechnol.*, 13: 640-645.
- Dorantes L, Colmenero R, Hernandez H, Mota L, Jaramillo M E, Fernandez E, Solano C (2000). Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by *Capsicum annum* extracts. *Int. J. Food Microbiol.*, 57: 125-128.
- Dorman H J D, Deans S G (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316
- Ekici L, Öztürk İ, Sağıdıç O, Yetim H (2008). Kekik uçucu yağı ilavesinin kuşbaşı etler ve bonfilenin bazı özelliklerine etkisi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 37, 557-560, Erzurum.
- El-Nezami H, Kankanpa P, Salminen S, Ahokas J (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>. *Food and Chem. Toxicol.*, 36: 321-326.
- Eltem R, Öner M (1995). Mold flora on naturel black olives in brine. *Turkish Journal of Biology*, 19: 11-17.
- Eltem R (1996). Growth and aflatoxin B<sub>1</sub> production on olives olive paste by moulds isolated from Turkish-style naturel black olives in brine. *Int. J. Food Microbiol.*, 32: 217-223.
- Erbay Z, İçier F (2008). Zeytin yaprağının (*Olea europaea* L.) kuruma kinetiğinin incelenmesi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 37, 283-284, Erzurum.
- Erturk Ö (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61: 275-278.
- Fan J J, Chen J H (1999). Inhibition of aflatoxin-producing fungi by Welsh onion extracts. *J. Food Protect.*, 62: 414-417.
- Fernandez G A, Diez F M J, Adams M R (1997). *Table Olives Production and Processing*. Chapman & Hall, London.
- Ghitakou S, Koutras K, Kanellou E, Markaki P (2006). Study of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A production by natural microflora and *Aspergillus parasiticus* in black and green olives of Greek origin. *Food Microbiol.*, 23: 612-621.
- Goldblatt L A, Dollear F G (1977). *Detoxification of Contaminated Crops: Mycotoxins in Human and Animal Health*. Rodricks J V, Hesseltine C W, Mehlman M A. (Eds.). Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois, 139-150.

- Gourama H, Bullerman L B (1988), Effects of potassium sorbate and natamycin on growth and penicillic acid production by *Aspergillus ochraceus*. J. Food Protect., 51: 139-144.
- Gourama H, Bullerman L B (1995). Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J. Food Protect., 58:1249–1256.
- Gourama H (1997). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. Lebensm.Wiss. Technol., 30: 279-283.
- Göçmen D, Korukluoğlu M, Uylaşer V, Gürbüz O, Yıldırım A Şahin İ (2000). Salamura zeytinlerde bozulma etmeni küfler. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 467-472, Bursa.
- Gümüş T, Arıcı M (2005). Zeytinde mikotoksin problemi. Hasad Gıda, 242:20-23.
- Gümüş T, Coşkun F (2008). Gıda güvenliğinde fermentasyonun önemi. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 37, 1069-1072, Erzurum.
- Holzapfel W H (1997). Use of starter cultures in fermentation on a household scale. Food Control, 8: 241-258.
- Holzapfel W H (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing contries. Int. J. Food Microbiol., 75: 197-212.
- Iorizzi M, Lanzotti V, Ranalli G, De Marino S, Zollo F (2002). Antimicrobial furostanol saponins from the seeds of *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. J. Agric. Food Chem., 50: 4310-4316.
- İlçim A, Dığrak M, Bağcı E (1998). The investigation of antimicrobial effect of some plant extract. Turkish J. of Biology, 22: 119-125.
- Kabak B, Var I (2003). Laktik asit bakterilerinin mikotoksin oluşturan küfler ve mikotoksin oluşumu üzerine etkileri. Bilimsel Gıda, 4: 23-27.
- Karaca H, Yemiş O (2008). Mikotoksin Kontaminasyonu: Zeytin ve Ürünlerinde Toksin Riski. I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi Bildiri Kitabı, 174-182, Edremit-Balikesir.
- Karagözler A A, Aktaş D, Uygun M, Kavas C, Kırgil A (2005). Zeytin (*Olea europaea* L.) yaprağının antioksidan özelliklerinin incelenmesi. XIX. Ulusal Kimya Kongresi BKP113, Kuşadası.
- Karaman B, Yılmaz N, Tamer C E, Uylaşer V, Çopur Ö U (2006). Bursa yöresinde yetiştirilen zeytinlerin bileşimleri üzerine bir araştırma. Hasad Gıda, 248: 18-22.
- Karapınar M, Aktuğ Ş E (1986). Baharatların laktik asit bakterilerinin üremesi ve laktik asit oluşturması üzerine inhibitif ve stimülatif etkileri. E.Ü. Müh. Fak. Dergisi, Seri:B Gıda Müh., 4: 79-87.
- Kılıç O (1984). Çabuk yöntemle sofralık siyah zeytin üretimi. Gıda, 9: 163-165.
- Kıvanç M, Akgül A, Doğan A (1991). Inhibitory and stimulatory effects of cumin, oregano and their essential oils on growth and acid production of *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides*. Int. J. Food Microbiol., 13: 81-85.
- Koburger, J.A. ve Marth E.H., 1984. Yeast and moulds. Compendium of Methods Fort he Microbiological Examination of Food (APHA), Ed: M.L. Speck, 197-201, Washington.
- Korukluoğlu M, Gürbüz O, Uylaşer V, Yıldırım A, Şahin İ (2000). Gemlik tipi zeytinlerde mikotoksin kirliliğinin araştırılması. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 214-219, Bursa.
- Korukluoğlu M, Sahan Y, Yiğit A, Karakaş R (2006). Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye Region of Turkey. Ann. Microbiol., 56: 359-362.
- Korukluoğlu M, Sahan Y, Yiğit A (2008). Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. J. Food Safety, 28: 76-87.



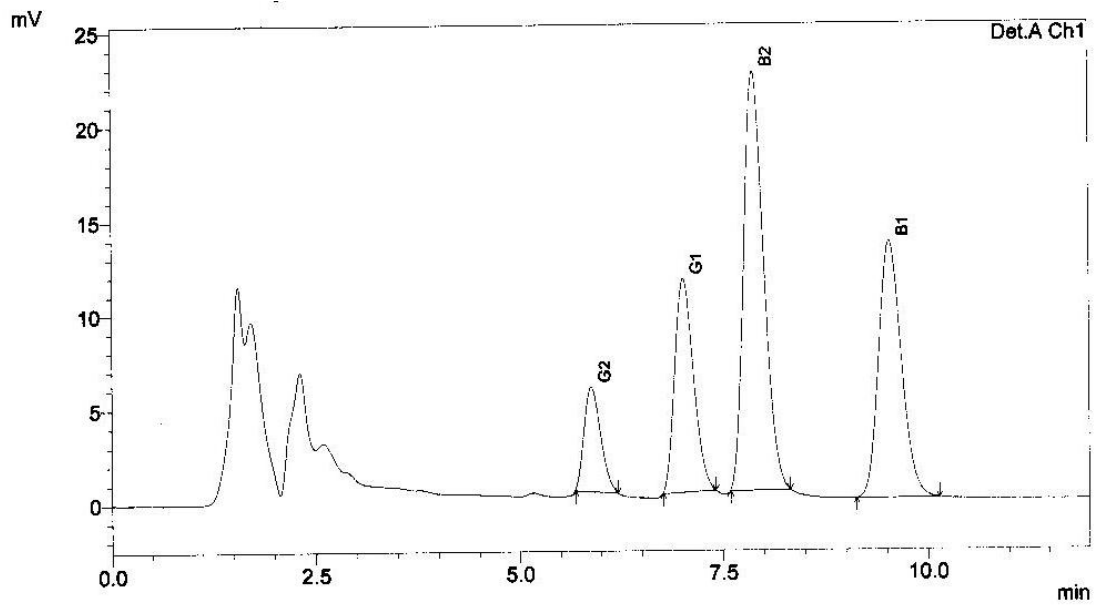
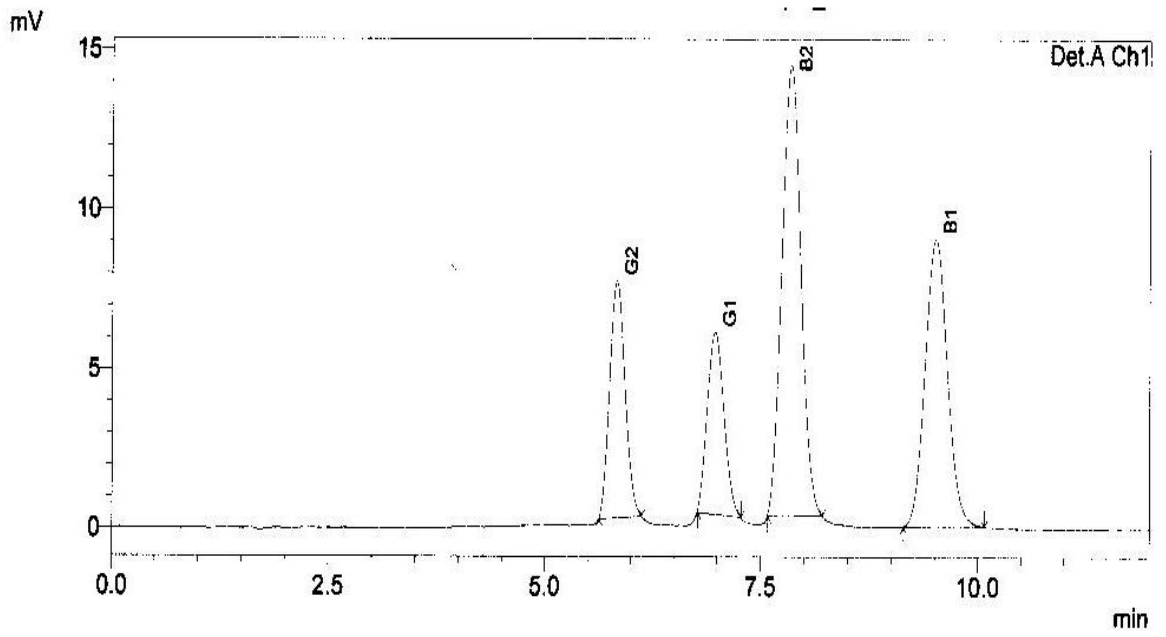
- Kotzekidou P, Giannakidis P, Boulamatsis A (2008). Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *Lebensm. Wiss. Technol., Food Science and Technology*, 41: 119-127.
- Koyuncu İ, Yıldırım İ, Duranoğlu S (2008). Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal özellikleri. Türkiye 10. Gıda Kongresi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayın No: 37, 913-916, Erzurum.
- Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 4084-4090.
- Leontopoulos D, Sifaka A, Markaki P (2003). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.*, 20: 119-126.
- Lopez-Diaz T M, Alonso C, Roman C, Garcia-Lopez M L, Moreno B (2000). Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol.*, 17: 23-32.
- Luchese R H, Martins J F, Harrigan W F (1992). Aflatoxin production in a meat mix model system in the presence of *Pediococcus* and *Lactobacillus*. *J. Food Protect.*, 55: 583-587.
- Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 219: 129-135.
- Mahjoub A (1985), Mould growth and aflatoxin production on olives and olive product. *Diss. Abs. In., B.*, 46: 1760.
- Mahjoub A, Bullerman L B (1987a). Effects of nutrients and inhibitors in olives on aflatoxigenic molds. *J. Food Protect.*, 50: 959-963.
- Mahjoub A, Bullerman L B (1987b), Mould growth and aflatoxin production on whole olives and olive pastes. *Sci. Aliments.*, 7(4): 629-636.
- Marino M, Bersani C, Comi G (1999). Antimicrobial activity of the essential oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *J. Food Protect.*, 62:1017-1023.
- Marsilio V, Seghetti L, Iannucci E, Russi F, Lanza B, Felicioni M (2005). Use of a lactic acid bacteria starter culture during green olive (*Olea europaea* L cv Ascolana tenera) processing. *J. Sci. Food and Agric.*, 85: 1084-1090.
- Martinez-Lozano S J, Garcia S, Heredia N, Villarreal-Rivera L, Garcia-Padilla C A (2000). Antifungal activity of extract of *Sargassum filipendula*. *Phyton-Int. J. Exp. Botany*, 66: 179-182.
- Martinez L, Cilla I, Beltran J A, Roncales P (2006). Effect of *Capsicum annuum* (red sweet and cayenne) and *Piper nigrum* (black and white) pepper powders on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *J. Food Sci.*, 71: S48-S53.
- Montes-Belmont R, Carvajal M (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their components. *J. Food Protect.*, 61: 616-619.
- Northolt M D, Frisvad J C, Samson R A (1996). Occurrence of food-borne fungi and factors for growth. In: Introduction to food-borne fungi. Eds. Somson R A, Hoekstra E S, Frisvad J C, Filtenborg O. CBS, 3740 AG BAARN, The Netherlands, 243-250.
- Oflaz S, Kürkçüoğlu M, Başer K H C (2002). *Origanum Onites* ve *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* üzerinde farmakognozi araştırmalar. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, s: 252-258, Eskişehir, <http://documents.anadolu.edu.tr/bihat/e-kitap/soflazpdf.pdf> (erişim tarihi, 10.10.2008)

- Ogunshe A A O, Omotoso M A, Adeyeye J A (2007). In vitro antimicrobial characteristics of bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains from Nigerian indigenous fermented foods. *African J. Biotechnol.*, 6: 445-453.
- Omidbeygi M, Barzegar M, Hamidi Z, Naghdibadi H (2007). **Antifungal** activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control*, 18: 1518-1523.
- Onilude A A, Fagade O E, Bello M M, Fadahunsi I F (2005). Inhibition of aflatoxin-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *African J. Biotechnol.*, 4: 1404-1408.
- Özcan M (2005). Effect of spice hydrosols on the growth of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 strain. *J. Medi. Food*, 8(2): 275-278.
- Özcan M M, Chalchat J C (2006). Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Ann. Microbiol.*, 56: 353-358.
- Özçelik S, Sağdıç O, Dığrak M, Özçelik N (2003). Gıda ve yemlerde mikotoksin oluşumunun önlenmesi ve eliminasyonu.. *Ulusal Mikotoksin Sempozyumu*, 139-145, İstanbul.
- Özhatay N, Koyuncu M, Atay S, Byfield A (1997). Türkiye'nin Doğal Tıbbi Bitkilerinin Ticareti Hakkında Bir Çalışma. *Doğal Hayatı Koruma Derneği*, İstanbul, 9-11.
- Özhatay N, Atay S (1997). Kekik in Trade in Turkey. *Food and Agriculture Organisation*, [http://www.fao.org/forestry/docrep/wfcxi/publi/PDF/V3E\\_T15.PDF](http://www.fao.org/forestry/docrep/wfcxi/publi/PDF/V3E_T15.PDF) (erişim tarihi: 03.01.2009).
- Özkaya Ş, Temiz A (2003). Aflatoksinler: kimyasal yapıları, toksisiteleri ve detoksifikasyonları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(1): 1-21. [www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101.pdf](http://www.mikrobiyoloji.org/pdf/702030101.pdf) (erişim tarihi, 11.10.2008).
- Panizzi L, Flamini G, Cioni P L, Morelli I (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Lamiaceae*. *J. Ethnopharmacol.*, 39: 167-170.
- Pederson C S (1979). *Microbiology of food fermentations*. AVI Publishing Com. Inc., Connecticut, 384 s.
- Pieroni A, Heimler D, Piethers L, Van Poel B, Vlietinck A J (1996). In vitro anti-complementary activity of flavonoids from olive leaves. *Pharmazie*, 51: 765-768.
- Pinto M M, Gonzalez E, Rossi M H, Felicio J D, Medina C S, Fernandes M J B, Simoni I C (2001). Activity of the aqueous extract from *Polymnia sonchifolia* leaves on growth and production of aflatoxin B1 by *Aspergillus flavus*. *Brazilian J. Microbiol.*, 32: 127-129.
- Rajkumar V, Berwal J S (2003). Inhibitory effect of clove (*Eugenia caryophyllus*) on toxigenic molds. *J. Food Sci. Technol.-Mysore*, 40: 416-418.
- Reinheimer J A, Demkow M R, Candiotti M C (1990). Inhibition of Coliform Bacteria by Lactic Cultures. *The Aust. J. Dairy Technol.*, May: 5-9.
- Rhajaoui M, Oumzil H, Lyagoubi M, Benjouad A, Elyachioui M (2003). Effect of *Zygothymum gaetulum* extracts on some pathogenic fungal growth. *J. Mycologie Medicale*, 13: 193-198.
- Rasooli I, Owlia P (2005). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: 2851-2856.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee M B, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S (2008). Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International J. Food Microbiol.*, 123: 228-233.
- Rockland L B (1960). Saturated Salt Solutions for Static Control of Relative Humidity between 5° and 40°C. *Analytical Chemistry* 32. 1375 p.

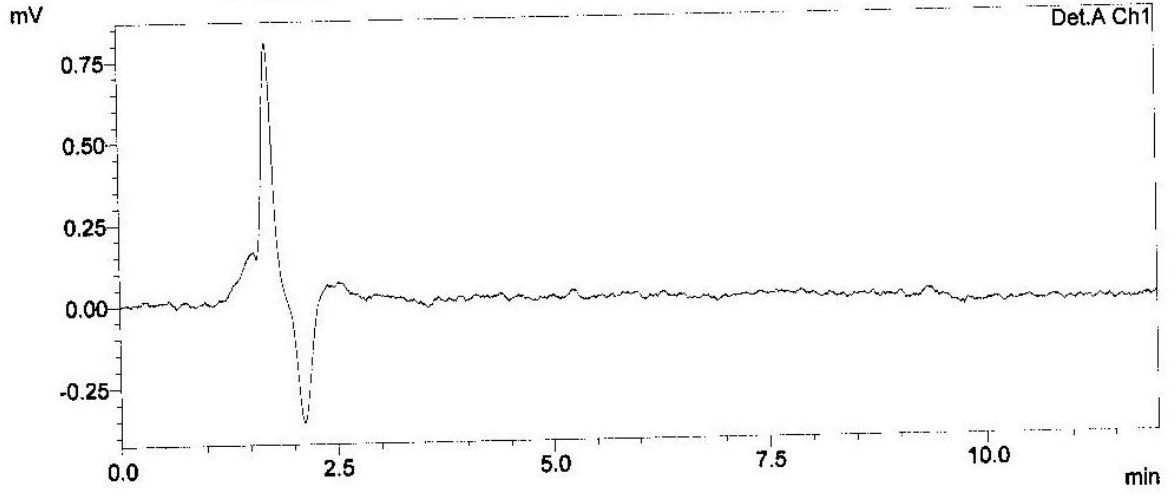
- Romero-Martinez D, Guillen F, Valverde JM, Bailen G, Zapata P, Serrano M, Castillo S, Valero D (2007). Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *Int. J. Food Microbiol.*, 115: 144-148.
- Ryan D, Robards K (1998). Phenolic Compounds in Olives, *Analyst*, 123.
- Sağdıç O, Karahan A G, Özcan M, Özkan G (2003). Note: Effect of Some Spice Extracts on Bacterial Inhibition. *Food Sci. Tech. Int.*, 9: 353-358.
- Sağdıç O, Yaşar S, Kısıoğlu A N (2005). Antibacterial Effects of Single or Combined plant Extracts. *Annals Microbiol.*, 55: 67-71
- Saija A, Uccella N (2001). Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *Trends in Food Sci. Technol.*, 11: 357-363.
- Sanchez E, Heredia N, García S (2005). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *Int. J. Food Microbiol.*, 98: 271-279.
- Sanz-Perez B, Palacios-Asenjo P, Tormo-Iguacel S, Lopez-Lorenzo P (1973). Aflatoxin in some Spanish foods. *Annales de Bromatologia*, 25: 297-319.
- Savaş E, Uylaşer V (2007). Zeytinin besin bileşenleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Dünya Gıda*, 2007(08): 77-82.
- Singh A K, Dikshit A, Sharma M L, Dixit S N (1980). Fungitoxic Activity of Some Essential Oils. *Econ. Bot.*, 34:186-190.
- Sokovic M, Tzakou O, Pitarokili D, Couladis M (2002). Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece. *Nahrung-Food*, 46: 317-320.
- Şahin İ, Kılıç O, Korukluoğlu M, Uylaşer V (1996). Siyah zeytin salamurasında oluşan zarda (kefeke) küf florasının araştırılması. U.Ü. Araştırma Fonu İşletme Müdürlüğü, Proje No: 94/44, Bursa.
- Şahin İ, Başoğlu F, Korukluoğlu M, Göçmen D (1999). Salamura siyah zeytin üzerinde rastlanan küfler ve mikotoksin riskleri. *Biyoteknoloji Dergisi*, 22: 1-8.
- Tanılgan K, Özcan M M, Ünver A (2007). Physical and chemical characteristics of five Turkish olive (*Olea europea* L.) varieties and their oils. *Grasas y Aceites*, 58: 142-147.
- Tantaoui-Elaraki A, Mannioui A (1996). Antifungal treatment trial of Greek style black olives. *Microbiol. Alim. Nutr.*, 14: 5-14.
- Tetik H D (2001). Sofralık Zeytin İşleme Teknikleri. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü. Yayın No: 53, 94 s, İzmir.
- Topal Ş, Aran N, Pembeci C (1999). Türkiye'nin Tarımsal Mikroflorasının Mikotoksin Profilleri. *Gıda*, 24: 129-137.
- Tuma S, Vogensen F K, Plockova M, Chumchalova J (2007). Isolation of antifungally active lactobacilli from Edam cheese. *Acta Alimentaria*, 36: 405-414.
- Tunail N (2000). Funguslar ve mikotoksinler. Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü yayını. Sim Matbaası, 522 s, Ankara, <http://www.orklab.net/mikrobiyoloji/210010320.pdf> (erişim tarihi, 11.10.2008).
- Tunç B, Tümer N, İlhan S (2000). Fermantasyonunu tamamlamış gemlik tipi zeytinlerin vakumlu ambalajlanmasında şişme olayının geciktirilmesi üzerine araştırmalar. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 200-206, Bursa.
- Türk R, Özen H, Akan S (2000). Gemlik ve Ayvalık zeytin çeşitlerinin dondurularak muhafazasında fiziksel ve kimyasal değişimler. Türkiye 1. Zeytincilik Sempozyumu, 185-193, Bursa.
- Türker İ (1974). Asit Fermentasyonları. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın No: 577, 182 s, Ankara.

- Ünver A, Arslan D, Çetinkaya Z, Özcan M M (2008). Antimycotic activity of methanol extracts of sage (*Salvia officinalis* L.), Laurel (*Laurus Nobilis* L.) and Thyme (*Thymbra spicata* L.). *J. Essential Oil Bearing Plants*, 11: 90-95.
- Vargas-Arispuro I, Reyes-Baez R, Rivera-Castaneda G, Martinez-Tellez M A, Rivero-Espejel I (2005). Antifungal lignans from the creosotebush (*Larrea tridentata*). *Industrial Crops and Products*, 22: 101-107.
- Valerio F, Lavermicocca P, Pascale M, Visconti A (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 233: 289-295.
- Vuyst L D, Zamfir M, Mozzi F, Adriany T, Marshall V, Degeest B, Vaningelgem F (2003). Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *Int. Dairy J.*, 13: 707-717.
- Weidenböchner M (2001). *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer, Berlin, New York.
- Xing F B, Cheng G X, Yi K K (2006). Study on the antimicrobial activities of the capsaicin microcapsules. *J. Applied Polymer Sci.*, 102: 1318-1321.
- Yasmine M (2002). Impact of small fermentation technology on food safety in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.*, 75: 213-229.
- Yiğit A (2002). Gıdalarda küf gelişimini engelleyen K-sorbat, NaCl ve pH'nın etkisinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa.
- Yigit A, Korukluoglu M (2007), The effect of potassium sorbate, NaCl and pH on the growth of food spoilage fungi. *Ann. Microbiol.*, 57:209-215.
- Yuna W K, Jeongb J H, Kimc H J (2008). The influence of the growth season on the antimicrobial and antioxidative activity in *Artemisia princeps* var. *orientalis*. *Industrial Crops and Products*, 27: 69-74.
- Zaika L L, Kissinger J C, Wasserman A E (1983). Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *J. Food Sci.*, 48: 1455-1459.
- Zaika L L, Kissinger J C (1984). Fermentation enhancement by spices: identification of active component. *J. Food Sci.*, 49: 5-9.
- Zeytin M A, Arslan D, Özcan M (2008). Domat, Edremit ve Gemlik zeytin çeşitlerinin fizikokimyasal, mikrobiyolojik ve duyuşal özellikleri üzerine farklı işleme metodlarının etkisi. I. Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi Bildiri Kitabı, 74-81, Edremit-Balıkesir.

**EK 1.**



Standartlara ait HPLC kromatogramları



Örneğe ait HPLC kromatogramı

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanma, gerçekleştirme ve değerlendirme aşamaları boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren Saygıdeğer hocam Prof. Dr. Muhammet ARICI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenimim süresince bana, sağlamış olduğu doktora bursu ile destek olup, çalışmalarına odaklanmamı sağlayan TÜBİTAK-BİDEB kurumuna ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmam esnasında ve tez yazım aşamamda karşılaştığım her sorunda yardım ve desteklerini esirgemeyen Saygıdeğer hocam Yrd. Doç. Dr. Tuncay GÜMÜŞ 'e teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel analizlerimin gerçekleştirilmesinde yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Eser Kemal GÜRCAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında, başından sonuna kadar bana destek olan, yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili arkadaşlarım Mehmet ÇELİKTAŞ ve Araş. Gör. Gülnaz ÇELİKYURT'a teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim süresince bana destek olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Şafak YILDIRIM

Şubat 2009

## ÖZGEÇMİŞ

1980 Bursa doğumluyum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Bursa'da tamamladım. 1999 yılında önlisans öğrenimime başladığım Uludağ Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu Gıda Teknolojisi programından 2001 yılında mezun oldum ve aynı yıl Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği bölümünde lisans öğrenimime başladım. 2004 yılında lisans öğrenimimi tamamladım. 2004 – 2006 yılları arasında çeşitli gıda firmalarında gıda mühendisi olarak görev yaptım. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı'nda başladığım doktora öğrenimime Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde devam ettim.