

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ZEYTİNDE SİTRİNİN OLUŞUMUNA SICAKLIK,
SÜRE VE TUZ KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Gülçin ŞİŞMANOĞLU

Anabilim Dalı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

Programı : GIDA MÜHENDİSLİĞİ

MAYIS 2003

**ZEYTİNDE SİTRİNİN OLUŞUMUNA SICAKLIK,
SÜRE VE TUZ KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Gıda Müh. Gülçin ŞİŞMANOĞLU
506001400**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 5 Mayıs 2003
Tezin Savunulduğu Tarih : 28 Mayıs 2003**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Dilek HEPERKAN
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Muammer UĞUR (İ.Ü.)
Prof.Dr. Dilek BOYACIOĞLU (İ.T.Ü.)**

MAYIS 2003

ÖNSÖZ

Sofralık zeytin üretiminde dünyada ilk sıralarda yer alan ülkemiz aynı başarıyı ihracatta gösterememektedir. Bu durum diğer ülkelerin tercih ettiği özelliklere sahip standart kalitede üretim yapılamamasından kaynaklanmaktadır. Küçük ölçekteki zeytin işletmelerimizde teknolojik yetersizlikler nedeniyle klasik üretim yöntemleri uygulanmaktadır. Üretimdeki hatalar sonucunda, salamura yüzeyinde küf tabakası oluşmaktadır. Bu tabakada bulunan toksijenik küfler ise insan ve hayvan sağlığı üzerine olumsuz etkileri bulunan mikotoksinleri oluşturabilmektedir. Bu riskin elimine edilebilmesi için küf gelişiminde ve mikotoksin oluşumunda etkili parametreler kontrol altında tutulmalıdır. Bu nedenle bu çalışmada, zeytinde sitrinin oluşumu üzerine sıcaklık, süre ve tuz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir.

Bu tezin hazırlanması sırasında, çalışmamı yönlendiren değerli hocam Sayın Dilek HEPERKAN'a ve her zaman yanımda olan aileme teşekkür ediyorum.

Mayıs 2003

Gülçin ŞİŞMANOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1. Zeytin Üretimi	3
2.1.1. Zeytinin tanımı	3
2.1.2. Zeytinin tarihçesi	3
2.1.3. Zeytinin sistematigi	3
2.1.4. Zeytin üretimine ayrılan alan	4
2.1.5. Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimi	6
2.1.6. Dünyada zeytin ihracatı	8
2.1.7. Dünyada zeytin ithalatı	9
2.1.8. Sofralık zeytin üretim yöntemleri	9
2.1.8.1 İspanyol tipi yeşil zeytin üretimi	10
2.1.8.2 Kaliforniya tipi konserve siyah zeytin üretimi	10
2.1.8.3 Grek tipi natürel siyah zeytin üretimi	11
2.1.9 Fermentasyon esnasında mikrobiyolojik ve kimyasal değişiklikler	11
2.1.9.1 Yeşil zeytin fermentasyonu	11
2.1.9.2 Konserve zeytin fermentasyonu	13
2.1.9.3 Natürel siyah zeytin fermentasyonu	13
2.1.10 Ham zeytinin bileşimi	14
2.1.11. Türk tipi salamurada natürel siyah zeytin üretimi	16
2.1.12 Zeytinin işlenmesi sonucu elde edilen ürünler	17
2.1.12.1 Zeytin yağı	17
2.1.12.2 Zeytin ezmesi	18
2.1.13. Zeytinlerde bozulma ve öneriler	18
2.2. Küf Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu	19
2.2.1 Mikotoksinlerin oluşumunda etkili faktörlerin kontrolü	21
2.2.1.1 Su aktivitesi	21
2.2.1.2 Sıcaklık	21
2.2.1.3 Atmosfer	21
2.2.1.4 Substrat	22
2.2.2 Zeytinde küf ve mikotoksin oluşumu	22
2.3. Mikotoksinler İle İlgili Yasal Düzenlemeler	23
2.4. <i>Penicillium citrinum</i> ’un Özellikleri	23
2.5. Sitrinin (Citrinin)’in Özellikleri	25
2.5.1. Sitrinin üreten küfler	27

2.5.2. Sitrinin'in izole edildiği gıdalar	27
2.5.2.1. Bitkisel kaynaklı gıdalar	27
2.5.2.2. Hayvansal kaynaklı gıdalar	28
2.5.3. Sitrinin'in toksisitesi	29
2.5.3.1. Kanserojenite	30
2.5.3.2. Mutajenite	31
2.5.3.3. Nefrotoksisite	31
2.5.4. Sitrinin'in detoksifikasyonu	31
3. MATERYAL VE METOT	34
3.1. Materyal	34
3.2. Metot	34
3.2.1. Spor süspansiyonunun hazırlanması	35
3.2.2. Kavanozların hazırlanması	36
3.2.3. Zeytinlerin aşılınması	36
3.2.4. Zeytinde ve salamurada mikrobiyolojik analizler	36
3.2.5. Zeytinde kimyasal analizler	37
3.2.5.1. Nem tayini	37
3.2.5.2. Yağ tayini	37
3.2.5.3. Protein tayini	38
3.2.5.4. Kül tayini	38
3.2.5.5. pH tayini	38
3.2.5.6. Tuz tayini	38
3.2.6. Zeytinde ve salamurada mikotoksin analizleri	39
3.2.7. Sitrinin miktarının hesaplanması	40
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	41
4.1. Küf Sayımları	41
4.1.1. +4°C de depolanan zeytinlerde küf sayımı	41
4.1.2. 30°C de inkübe edilen zeytin ve salamurada küf sayımı	41
4.2. Kimyasal Analizler	43
4.3. Mikotoksin Analizleri	44
4.3.1. Zeytinde farklı sıcaklıklarda yapılan mikotoksin analizleri	44
4.3.2. 30°C de yapılan mikotoksin analizleri	46
4.3.2.1. Zeytinde 30°C de yapılan mikotoksin analizleri	48
4.3.2.2. Salamurada 30°C de yapılan mikotoksin analizleri	50
4.3.2.3. Zeytin ve salamurada yapılan mikotoksin analizlerinin karşılaştırılması	53
5. SONUÇLAR	55
KAYNAKLAR	57
EKLER	62
ÖZGEÇMİŞ	63

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Zeytin üretimine ayrılan alan (Ha).....	5
Tablo 2.2. Zeytin verimi (Hg/Ha).....	6
Tablo 2.3. Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimi (Ton).....	7
Tablo 2.4. Dünyada zeytin ihracatı (Ton).....	8
Tablo 2.5. Dünyada zeytin ithalatı (Ton).....	9
Tablo 2.6. Zeytinin bileşimi.....	15
Tablo 4.1. Zeytinde +4°C de <i>P. citrinum</i> küfünün gelişmesi (cfu/g).....	41
Tablo 4.2. Zeytinde 30°C de <i>P. citrinum</i> küfünün gelişmesi (cfu/g).....	42
Tablo 4.3. Salamurada 30°C de <i>P. citrinum</i> küfünün gelişmesi (cfu/ml).....	42
Tablo 4.4. Konserve zeytinin bileşimi.....	43
Tablo 4.5. Salamurada pH ölçümü.....	43
Tablo 4.6. Zeytinde farklı sıcaklık derecelerinde sitrinin oluşumu (ppm).....	44
Tablo 4.7. Saf su ve farklı salamuralar içinde bulunan zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu (ppm).....	48
Tablo 4.8. Saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada 30°C de sitrinin oluşumu (ppm).....	51
Tablo A.1. Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi.....	62
Tablo A.2. Duncan’ın çoklu aralık testi.....	62

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Zeytin ağacının görünümü..... 4
Şekil 2.2.	Zeytin meyvesinin görünümü..... 4
Şekil 2.3.	Türk tipi natürel siyah zeytin üretimi akış şeması..... 16
Şekil 2.4.	MEA ve CYA besî ortamında <i>P. citrinum</i> 'un görünümü..... 24
Şekil 2.5.	Sitrinin'in yapısal formülü..... 25
Şekil 4.1.	Zeytinde 20°C de sitrinin oluşumu..... 45
Şekil 4.2.	Zeytinde 25°C de sitrinin oluşumu..... 45
Şekil 4.3.	Zeytinde 30°C de sitrinin oluşumu..... 46
Şekil 4.4.	Farklı sıcaklıklarda sitrinin oluşumu..... 47
Şekil 4.5.	Saf su içerisinde bulunan zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu..... 49
Şekil 4.6.	%6 NaCl içeren salamura içindeki zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu..... 49
Şekil 4.7.	Saf su ve %6 NaCl içeren zeytinde 30°C de sitrinin oluşumu..... 50
Şekil 4.8.	Saf suda 30°C de sitrinin oluşumu..... 51
Şekil 4.9.	%6 NaCl içeren salamurada 30°C de sitrinin oluşumu..... 52
Şekil 4.10.	Saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada 30°C de sitrinin oluşumu. 52
Şekil 4.11.	Saf su içeren koşullarda 30°C de sitrinin oluşumu..... 53
Şekil 4.12.	%6 NaCl içeren koşullarda 30°C de sitrinin oluşumu..... 54

ZEYTİNDE SİTRİNİN OLUŞUMUNA SICAKLIK, SÜRE VE TUZ KONSANTRASYONUNUN ETKİSİ

ÖZET

Zeytin, Türkiye ve dünyada çeşitli şekillerde tüketilen önemli tarımsal ürünlerden biridir. Üretilen zeytinin %15'i sofralık olarak, %85'i yağ üretimi için kullanılmaktadır. Özellikle üretici ülkelerin ekonomisinde önemli role sahiptir. İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye bu pazarda en önemli zeytin üreticileridir.

Türkiye'nin zeytin üretiminde dördüncü sırada, ihracatta son sıralarda yer alması dikkat çekmektedir. Bu durumun en önemli nedeni, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması ve buna bağlı olarak standart bir üretimin gerçekleştirilememesidir. Teknolojik yeniliklerin takip edilmemesi, diğer ülkelerin tüketim tercihlerine uygun üretimin gerçekleştirilmemesi, zeytinde acılığa neden olan oleuropein'in tam olarak uzaklaştırılamaması, zeytindeki tuz miktarının fazla olması ve üretim hataları nedeniyle salamura yüzeyinde oluşan küf tabakası diğer nedenlerdir.

Yüzeyde gelişen toksijenik küfler, mikotoksin adı verilen sekonder metabolitleri üretebilirler. Mikotoksinler; insan ve hayvan sağlığı üzerine kanserojenik, teratojenik, mutajenik, nefrotoksik ve hepatotoksik etkilere neden olmaktadır.

Çalışmada materyal olarak çekirdeksiz, konserve siyah zeytin kullanılmıştır. Zeytinlerde *Penicillium citrinum* tarafından sitrinin oluşumu üzerine sıcaklık, süre ve tuz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir.

Zeytinler, *P. citrinum* ile 10^6 spor/ml olacak şekilde aşılanmıştır. +4°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C de 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresince belli aralıklarla sitrinin analizi yapılmıştır.

+4°C ve 35°C sıcaklık değerlerinde sitrinin oluşumu tespit edilmemiştir. 20°C, 25°C ve 30°C de inkübe edilen zeytinlerde ise sitrinin'in oluştuğu ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. Zeytinde sitrinin oluşum miktarının, 30°C de daha yüksek değerlerde olduğu bulunmuştur. Bu nedenle çalışmanın ikinci aşamasında bu sıcaklık değeri seçilmiştir.

Yapılan istatistiksel analizde, sıcaklıklar arasındaki fark $P \leq 0,05$ olasılık düzeyinde önemli bulunmuştur. Duncan'ın Çoklu Aralık Testi'nde ise 20°C de elde edilen verilerin 25°C ve 30°C de belirlenen miktarlardan önemli bir şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca, 25°C ve 30°C arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan metot ile sitrinin'in geri kazanım oranının belirlenmesi amacıyla 200 µg/kg (ppb) sitrinin standardı zeytin örneklerine eklenmiştir. Sitrinin'in geri kazanımı %76,3 olarak belirlenmiştir.

P. citrinum gelişimi üzerine %6 ve %9 NaCl konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. %6 ve %9 NaCl içeren zeytin ve salamurada küf gelişimi 60 gün süresince izlenmiştir. Küf sayımı, hazırlanan dilüsyonlardan Dichloran-Bengal-Chloramphenicol Agar (DRBC) üzerine yayma plak yöntemiyle yapılmıştır. Petriler 25°C’de 5 gün inkübe edilmiştir. Yapılan sayımlarda, tuz konsantrasyonunun küf sayısında önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında, küf ile aşıl原因an zeytinler saf su, %6 NaCl ve %9 NaCl içeren salamura içinde 30°C sıcaklıkta 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon esnasında belli aralıklarla sitrinin analizi yapılmıştır.

Artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak sitrinin oluşumu azalmıştır. %9 NaCl konsantrasyonunda ise zeytinde sitrinin oluşumunun olmadığı belirlenmiştir. Saf su ve %6 NaCl içeren salamurada belirlenen sitrinin miktarının, zeytindekinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

INFLUENCE OF TEMPERATURE, TIME AND SALT CONCENTRATION ON CITRININ PRODUCTION IN OLIVE

SUMMARY

Olive consumed in various forms is one of the most important agricultural products in Turkey and in the world. 15% of the olive produced is consumed as table olive and 85% of it is used for oliveoil production. Especially, it has an important role for the economy of the producer countries. Spain, Italy, Greece and Turkey are the most important olive producers in this market.

Although Turkey is the fourth country in the world in the olive production, it has not the same success in the exportation of it. The most important reason of the low export amounts is non-standard quality in olives because most of the manufactures are small. The others are lack in applying current technology, unsatisfaction of consumer preferences in importing countries, the rancid flavor caused by inexact removal of oleuropein, high salt concentrations and the mould layer formation on the surface of the pickles as a result of the mistakes in the production.

During the growth of the toxigenic moulds, some seconder metabolites called mycotoxins can be produced. Mycotoxins may have carcinogenic, teratogenic, mutagenic, nephrotoxic and hepatotoxic effects on human and animal health.

In this study, pitted black olive was used. Influence of temperature, time and salt concentration on citrinin production by *Penicillium citrinum* in olive was investigated.

Olives were inoculated with *P. citrinum* at the amount of 10^6 spore/ml. Then they were incubated for 30 days at +4°C, 20°C, 25°C, 30°C and 35°C. During the incubation, citrinin detection was made periodically.

Citrinin formation was not detected at +4°C and 35°C. Citrinin formed at 20°C, 25°C and 30°C and increased depending on the time. Citrinin formation in olive was found to have high values at 30°C. Therefore, this temperature was chosen in the second stage of this study.

Statistical evaluation of results showed that there was significant difference between three temperatures ($P \leq 0,05$). Difference was analyzed by comparing the mean values using Duncan's Multiple Range Test. 20°C was found to be different from both 25°C and 30°C. Statistically, there was not an important difference between 25°C and 30°C.

In order to determine the recovery percentage of citrinin by the method used in this study, olive samples were spiked at 200 µg/kg (ppb) citrinin standard solution. The recovery of citrinin was found to be 76,3%.

Effect of 6% and 9% salt concentration on *P. citrinum* growth was investigated further. Mould count carried out in olive and pickle samples in the 30th and 60th day of the incubation. For counting of moulds, appropriate dilutions were made and Spreading Method to Dichloran-Bengal-Chloramphenicol Agar (DRBC) was used. Then the samples were incubated for 5 days at 25°C. It was found that salt concentration has no significant influence on the number of moulds.

In the second stage of the study, olives inoculated with *P. citrinum* were incubated in distilled water and pickles containing 6% and 9% NaCl for 30 days at 30°C. During the incubation, citrinin analysis was performed periodically.

Depending on the increasing salt concentration, formation of citrinin decreased. It was not detected in the 9% NaCl concentration. Citrinin amount determined in distilled water and pickle which contains 6% NaCl was found to be higher than in olives.

1. GİRİŞ

Zeytin, insanların ilk tanıdığı tarımsal ürünlerden birisidir. Besleyici özellikleri nedeni ile kahvaltı, yemek ve salatalarda değişik şekillerde tüketilen bir gıda maddesidir. Başlangıçta evlerde küçük çapta yapılan üretimlerin yerini, zamanla zeytin endüstrisi almıştır.

Türkiye dünya zeytin üretiminde, 2002 verilerine göre İspanya, İtalya ve Yunanistan ile birlikte ilk sıraları paylaşmaktadır. Ancak ihracat miktarlarına bakıldığında Türkiye'nin son sıralarda yer aldığı görülmektedir (Anon., 2002b). Bunun en önemli nedenleri; zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması sonucunda standart üretimin yapılamaması, teknolojiye yeniliklerin takip edilmemesi ve diğer ülkelerin tüketim tercihlerine uygun üretimin gerçekleştirilmemesidir (Oral ve Heperkan, 1999).

Klasik yöntemle üretilen zeytinler, yüksek tuz konsantrasyonlu salamuralarda (>%10), 6-8 ay süreyle fermentasyona bırakılmaktadır (Aktan ve Kalkan, 2000). Bu süre içerisinde zeytin tanklarının yüzeyinde küf oluşumu gözlenmektedir (Oral ve Heperkan, 1999). Küf oluşumu zeytinlerde bozulmalara ve buna bağlı olarak ekonomik kayıplara, küflerin oluşturduğu mikotoksinler ise insanlarda hastalıklara neden olmaktadır. Küf kontaminasyonunda ve mikotoksin oluşumunda, çevresel faktörler etkilidir. Bu faktörlerin etkisinin bilinmesi, sağlık risklerinin ve ekonomik kayıpların azaltılabilmesi açısından faydalıdır.

Literatürde zeytin üretimi esnasında salamura yüzeyinde başta *Penicillium* olmak üzere *Aspergillus* ve *Rhizopus* türlerinin bulunduğu belirtilmiştir (Fernandez ve diğ., 1997). Oral ve Heperkan (1999) zeytinde yaptıkları çalışmada *Penicillium* cinsi küflerin toksin oluşturduğunu belirlemişlerdir. Korukluoğlu ve diğ. (2000) Gemlik tipi zeytinlerde mikotoksinlerin mevcudiyetini incelemiş ve 21 zeytin örneğinden sadece bir örneğin sitrinin içerdiğini tespit etmişlerdir. Meriç ve Heperkan (2001) İstanbul'da piyasadan temin ettikleri 42 zeytin örneğinin %80'inde sitrinin (73-375 ppb) varlığını belirlemişlerdir.

Yapılan alışmada, *Penicillium citrinum* kültürü ile aşılanan zeytinlerde sitrinin oluşumu üzerine sıcaklık, depolama süresi ve tuz konsantrasyonu gibi faktörlerin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu faktörlerin kontrolü ile zeytin üretimi esnasında, kf gelişiminin ve mikotoksin oluşumunun belli ölçüde de olsa azaltılabileceği düşünülmüştür. Bu alışma ile hem ülke ekonomisine hem de literatüre katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Zeytin Üretimi

2.1.1 Zeytinin tanımı

Sofralık zeytin, kültüre alınmış zeytin ağacı 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 işlemine tabi tutularak veya tutulmadan elde edilen mamüldür (TS-774, 1993).

2.1.2 Zeytinin tarihçesi

Zeytin, buğday ve şarap gibi insanların ilk tanıdığı ürünlerdendir. Zeytinin ana vatanı Anadolu olup, 5000 yıl önce Akdeniz'e yayılmıştır. Dünyada yetiştirilen en eski ağaçlar arasında zeytin ağacı bilinmektedir. Afrika ve Güney Avrupa'nın Akdeniz sahillerine yayılmıştır. Daha sonra Yunanistan ve Roma'ya ulaşmıştır. Birkaç yüzyıl öncesinde de Kuzey ve Güney Amerika, Japonya ve Avusturalya'ya yayılmıştır (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.3 Zeytinin sistematigi

Zeytin *Oleaceae* ailesinin *Olea* cinsinin *Olea europaea sativa* türündendir. Zeytin ağaçları; kışları ılık ve yağmurlu (sıcaklığın en çok -8°C ye düştüğü), ilkbahar ve sonbaharı serin ve yağışlı, yazları ise kurak olan (sıcaklığın en fazla 40°C ye yükseldiği) deniz kenarları çevresinde yetişmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Meyveler, renkleri yeşilden siyaha değişen çeşitli olgunluk dönemlerinde hasat edilmektedir ve oleuropein içeriğinden kaynaklanan doğal acılığı uzaklaştırmak ve duyuşal özellikleri geliştirmek amacı ile farklı şekillerde işlenmektedir (Lund ve diğ., 2000). Şekil 2.1’de zeytin ağacı ve Şekil 2.2’de zeytin meyvesinin görünümü verilmiştir (Anon., 2002a).



Şekil 2.1. Zeytin ağacının görünümü (Anon., 2002a).



Şekil 2.2. Zeytin meyvesinin görünümü (Anon., 2002a).

2.1.4 Zeytin üretimine ayrılan alan

Zeytin ağacının yetişmesi için gerekli olan ekolojik ve klimatolojik özelliklerin tamamına Akdeniz bölgesi sahiptir. Dünya zeytin varlığının %96’sı Akdeniz bölgesinde bulunmaktadır (Aktan ve Kalkan, 2000). Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimine ayrılan alan Tablo 2.1.’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Zeytin üretimine ayrılan alan (Ha) (Anon., 2002b).

Ülkeler	Yıllar			
	1999	2000	2001	2002
A.B.D.	14,285	14,570	14,600	14,600
Arjantin	27,000	29,000	29,000	29,000
Fransa	13,386	15,617	15,908	16,000
İspanya	2,200,000	2,300,000	2,300,000	2,300,000
İsrail	16,000	17,000	17,000	17,000
İtalya	1,128,266	1,136,627	1,142,579	1,145,000
Meksiko	4,469	4,327	4,625	4,500
Mısır	43,669	45,513	47,519	49,868
Peru	3,909	6,418	6,995	6,500
Portekiz	319,532	358,470	420,000	450,000
Suriye	469,857	477,993	488,957	498,981
Tunus	1,500,000	1,387,240	1,377,700	1,377,700
Türkiye	580,286	594,072	599,400	570,000
Yunanistan	757,600	765,151	767,144	765,000

Tablo 2.1.'de görüldüğü gibi zeytin üretimine en fazla alanı İspanya ayırmaktadır. İspanya'yı Tunus, İtalya, Yunanistan ve Türkiye takip etmektedir.

Türkiye'de sahile dikey veya paralel dağlarda bol miktarda yabani zeytin ağacı olduğu belirtilmektedir. Bunların diplerinden çıkan köklü yan dallar zeytin fidanı olarak değerlendirilebilir. Türkiye'de günümüzde orman özelliğini kaybetmiş ve başka ürünlerin yetişmesi için elverişli olmayan alanlar zeytin üretiminde kullanılabilir. Yabani zeytinlerden bu amaçla yararlanılabilir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Dünyada ve Türkiye'de hektar başına elde edilen verim Tablo 2.2.'de gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Zeytin verimi (Hg/Ha) (Anon., 2002b).

Ülkeler	Yıllar			
	1999	2000	2001	2002
A.B.D.	92,083	32,944	83,260	55,925
Arjantin	31,481	32,759	32,759	32,759
Fransa	12,400	11,981	11,350	13,750
İspanya	15,728	21,495	29,479	21,913
İsrail	14,500	32,941	15,294	15,294
İtalya	33,371	24,819	25,330	22,707
Meksiko	21,851	21,465	35,278	35,556
Mısır	65,740	61,904	61,850	63,811
Peru	29,117	46,779	46,379	47,025
Portekiz	10,421	7,253	6,452	7,111
Suriye	8,524	18,119	10,164	20,021
Tunus	7,500	8,110	3,992	1,089
Türkiye	10,009	30,299	10,010	26,316
Yunanistan	28,994	29,717	29,322	31,373

Tablo 2.2’de verilen zeytin üretiminde hektar başına elde edilen verime bakıldığında Mısır ve A.B.D.’nin ön sıralarda yer aldığı görülmektedir. Türkiye’de ise elde edilen verim düşüktür.

2.1.5 Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimi

En önemli fermente gıdalardan biri olan zeytin, birçok ülkede üretilmektedir. Tablo 2.3’te görüldüğü gibi üretimde İspanya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye ilk sıraları paylaşmaktadır.

Tablo 2.3. Dünyada ve Türkiye’de zeytin üretimi (Ton) (Anon., 2002b).

Ülkeler	Yıllar			
	1999	2000	2001	2002
A.B.D.	131,540	48,000	121,560	81,650
Arjantin	85,000	95,000	95,000	95,000
Fransa	16,599	18,711	18,056	22,000
İspanya	3,460,100	4,943,800	6,780,200	5,040,100
İsrail	23,200	56,000	26,000	26,000
İtalya	3,765,100	2,821,000	2,894,097	2,600,000
Meksiko	9,765	9,288	16,316	16,000
Mısır	287,080	281,745	293,903	318,339
Peru	11,382	30,023	32,442	30,566
Portekiz	333,000	260,000	271,000	320,000
Suriye	400,509	866,052	496,952	998,988
Tunus	1,125,000	1,125,000	550,000	150,000
Türkiye	580,809	1,800,000	600,000	1,500,000
Yunanistan	2,196,615	2,273,836	2,249,430	2,400,000

Türkiye’de zeytin üretim miktarı 1999 yılında 580,809 ton iken, 2002 yılında bu değer 1,500,000 tona yükselerek 2,6 kat artış göstermiştir. Dünya zeytin üretiminde ise Türkiye dördüncü sırada yer almaktadır.

İspanya, dünya zeytin üretiminin yaklaşık yarısına sahip olarak, bu pazarda en büyük payı olan ülkedir. Üretici ülkeler çeşitliliği artırma yoluna giderek, uluslararası ticarette pay almak istemektedirler. İspanya son yıllarda natürel siyah zeytin ve konserve siyah-olgun zeytin üretimine, Yunanistan salamura natürel siyah zeytin üretiminin yanında yeşil zeytin üretimine başlamıştır. Zeytin üretim ve saklama yöntemlerindeki bilimsel çalışmalar, üretim miktarlarının artırılmasına olanak sağlamaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

Zeytin tipine göre üretim incelendiğinde, siyah zeytinin önemli bir kısmını natürel siyah zeytinler oluşturmaktadır. Değişken renkli zeytinlerin büyük çoğunluğunu ise Kaliforniya tipi zeytinler oluşturmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

2.1.6 Dünyada zeytin ihracatı

Türkiye’de ve dünyada zeytin ihracatı Tablo 2.4’te verilmektedir.

Tablo 2.4. Dünyada zeytin ihracatı (Ton) (Anon., 2002b).

Ülkeler	Yıllar			
	1998	1999	2000	2001
Fransa	216	430	476	237
İspanya	7,069	5,018	5,054	6,992
İtalya	416	576	719	835
Mısır	10	0	0	34
Peru	49	6	64	76
Portekiz	165	47	193	131
Suriye	1,393	1,154	874	874
Tunus	240	34	0	0
Türkiye	81	12	0	91
Yunanistan	10,137	8,455	8,968	7,664

Türkiye’de ihracat miktarı 1998 yılında 81 ton, 2001’de 91 ton’dur. İhracatta yaklaşık olarak 1,1’lik bir artış görülmekte, ancak dünyadaki ihracat miktarlarına bakılacak olursa çok geride olduğumuz görülmektedir.

Türkiye’nin zeytin üretiminde dördüncü sırada, ihracatta ise son sıralarda yer alması dikkat çekici bir durumdur. Bunun en büyük nedeni, zeytin işletmelerimizin çoğunun küçük ölçekte olması sonucunda standart üretimin yapılamaması, teknolojiye yeniliklerin takip edilmemesi ve diğer ülkelerin tüketim tercihlerine uygun üretimin gerçekleştirilmemesidir (Oral ve Heperkan, 1999).

Zeytin çeşitlerine göre ihracatçı ülkeler değişmektedir. İspanya, Arjantin, Yunanistan ve Maroko yeşil zeytin, Yunanistan, Maroko ve Türkiye natürel siyah zeytin, İspanya ve Maroko değişken renkli zeytin ihracatı yapmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

2.1.7 Dünyada zeytin ithalatı

Zeytin ithal eden ülkeler Tablo 2.5’te gösterilmiştir.

Tablo 2.5. Dünyada zeytin ithalatı (Ton) (Anon.,2002b).

Ülkeler	Yıllar			
	1998	1999	2000	2001
A.B.D.	11,533	5,159	2,948	11,891
Fransa	1,393	1,377	1,615	1,442
İspanya	3	115	304	150
İtalya	2,415	2,039	2,146	2,058
Portekiz	4,817	438	1,920	1,398
Romanya	12,270	12,107	-	-
Tunus	3	2	0	0
Türkiye	2	0	0	0
Yunanistan	72	70	66	14

Tablo 2.5’te görüldüğü gibi A.B.D., İtalya, Fransa ve Portekiz en çok zeytin ithalatı yapan ülkelerdir.

İthal edilen zeytin türleri ülkelere göre farklılık göstermektedir. A.B.D., İtalya ve Fransa’da İspanyol tipi salamuralanmış yeşil zeytin, Bulgaristan ve Romanya’da ise Grek tipi salamuralanmış natürel siyah zeytin ithalatı yapılmaktadır. İtalya ve A.B.D., ayrıca değişken renkli zeytin ithalatçılarıdır (Fernandez ve diğ., 1997).

2.1.8 Sofralık zeytin üretim yöntemleri

Uluslararası ticarete, sofralık zeytin üretiminde kullanılan üç yöntem önem taşımaktadır (Wood, 1998);

- 1- Salamurada işlem görmüş (İspanyol veya Sevillian tipi) yeşil zeytin
- 2- Salamurada işlem görmüş (Kaliforniya tipi) siyah zeytin
- 3- Salamurada natürel (Grek tipi) siyah zeytin.

Zeytinler, kullanılan üretim yöntemine bağlı olarak farklı olgunluk zamanlarında hasat edilmektedir. İlk iki yöntemde, zeytinin aromatik maddelerinden biri olan

oleuropein'in neden olduğu acılık alkali muamelesi ile giderilmektedir. Grek tipi zeytin üretiminde ise, meyveler doğrudan salamura içerisine konulmakta ve acılık kısmen uzaklaşmaktadır. Bu nedenle, zeytinler meyvemsi bir tada ve acımsı bir lezzete sahiptir (Luh ve Woodroof, 1988; Wood, 1998; Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.8.1 İspanyol tipi yeşil zeytin üretimi

İspanyol tipi yeşil zeytin üretiminde, zeytinler yeşil ile saman sarısı arasında renge ulaştığında toplanmaktadır. %1,3-2,6 NaOH solüsyonu içeren silindirik ya da küresel polyester ve fiber glass tanklarda, oleuropein'i hidrolize etmek için 5-7 saat bekletilmektedir (Lund ve diğ., 2000). Bu işlem ile acı bir glikozid olan oleuropein, glukoz ve aglikon'a indirgenir. Bunlarda elenoik asit ve β -3,4-dihidroksi-feniletıl gibi basit moleküllere parçalanmaktadır (Robinson, 2000).

Alkali etin 2/3'üne temas ettiğinde işleme son verilmekte ve zeytinler defalarca su ile yıkanmaktadır. Muamele tankının altından alkali boşaltılmadan önce, yukarıdan çeşme suyu verilmeye başlanmaktadır. Böylece zeytinlerin oksidasyon ile kararması önlenmiş olur (Aktan ve Kalkan, 2000). Yıkama işlemiyle, oleuropein ve onun hidroliz ürünleri, diğır polifenoller ve bazı fermente olabilir şekerler uzaklaştırılmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Zeytinler esas olarak laktik asit bakterileri tarafından gerçekleştirilen fermentasyona izin vermek için, %5-6 NaCl içeren salamuraya konulmaktadır. Zeytinler, bir sonraki işleme kadar aynı salamurada bekletilebilir. Tuz konsantrasyonu %8'e çıkarıldıktan sonra satılmaktadır. Bu yeşil zeytinler, tam olarak fermente olduklarında, "İspanyol tipi yeşil zeytin" olarak bilinmektedir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.8.2 Kaliforniya tipi konserve siyah zeytin üretimi

Kaliforniya tipi siyah zeytin üretiminde, salamurada depolanan veya taze zeytinler kullanılabilir (Wood, 1998). Zeytinlerin rengi sarımsak-yeşil ile pembe arasında değişmektedir (Lund ve diğ., 2000). Zeytinler, çeşide ve alkali uygulaması öncesinde depolanma süresine bağılı olarak %0,5-1,5 NaOH solüsyonu ile kısa süreli olarak üç kez işlem görmektedir. Alkali, meyvenin tamamına temas ettiğinde işleme son verilmekte ve alkali uzaklaştırılmaktadır. Zeytinler yıkanmak suretiyle alkaliden

tamamen arındırılmaktadır. Bu yöntemde, zeytinler hava ile temas etmekte ve oksidasyon ile kararma gerçekleşmektedir (Wood, 1998).

Siyah renk stabilizasyonu, demir içeren tuzların ilavesi ile sağlanmaktadır. Zeytinler, %2,5-5 NaCl içeren salamura solüsyonu ile konservelemekte ve sterilize edilmektedir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.8.3 Grek tipi natürel siyah zeytin üretimi

Grek tipi natürel siyah zeytin, renkleri mor ile siyah arasında değişen zeytinlerden hazırlanmaktadır. Yıkama işlemi sonrasında tank içerisine konulur ve üzerine %8-10 NaCl içeren salamura ilave edilmektedir (Lund ve diğ., 2000).

Zeytinler doğal fermentasyona maruz kalmaktadır. Fermentasyon zeytinlerde veya tanklarda bulunan mikroorganizmalar ile gerçekleşmektedir. Fermentasyonda, özellikle mayalar önemli rol oynamaktadır. Salamura ise fermente olabilir karbonhidratları içerdiği için, laktik asit bakterilerinin gelişimini teşvik eden bir ortam sağlamaktadır (Wood, 1998).

Ticari üretimlerde, zeytinler starter kültür ile inoküle edilmez. Prosesler, çevresel faktörlerin (tuz, sıcaklık, taze zeytinde mikroorganizma mevcudiyetine ve ekipman üzerindeki mikroflora) kombinasyonuna dayanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

2.1.9 Fermentasyon esnasında mikrobiyolojik ve kimyasal değişiklikler

2.1.9.1 Yeşil zeytin fermentasyonu

Yeşil zeytinlerin fermentasyonunda, dominant role sahip olan laktik asit bakterileri etkilidir. Alkali uygulamasını ve yıkamayı takiben zeytinler, fermentasyon esnasında NaCl konsantrasyonu %5-6 olacak şekilde salamuralandırılmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Zeytindeki şekerler, vitaminler ve aminoasitler osmosis ile salamura solüsyonu içerisine geçmektedir. Salamura yavaş yavaş laktik fermentasyonu oluşturan mikroorganizmaların gelişimi için uygun bir besi ortamına dönüştürülmektedir (Robinson, 2000).

Fermentasyonun ilk aşamalarında; Gr (-) çubuklar, Enterobacteriaceae (koliformlar) ve *Bacillus* spp. dominant haldedir. Bunlar zeytinlerden, tanklardan ve yıkama

suyundan kaynaklanan kontaminantlardır. Bu aşamada Enterobacteriaceae ve *Aeromonas* spp. tarafından gaz oluşumu (CO₂, H₂) gözlenmektedir (Lund ve diğ., 2000). Bozulma etkeni olan bu bakteriler, laktik asit bakterileri tarafından asit üretimine bağlı olarak hızla ortadan kaybolmaktadır (Robinson, 2000). Fermentasyon ilerledikçe, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* spp. türleri görülür ve fermentasyonun ikinci aşamasında *Lactobacillus plantarum* ve daha az miktarda *Lactobacillus delbrückii* ortama hakim olmaktadır (Lund ve diğ., 2000). Fermentasyonun ilk aşaması pH 6 ya düşünceye kadar devam etmektedir (Wood, 1998).

Fermentasyonun ikinci aşaması 12-15 gün sürebilir ve pH ideal olarak 4,0'ın altında bir değere düşmelidir. Bu pH düşüşü, fermente olabilir şeker konsantrasyonuna ve zeytinde işleme esnasında oluşan organik asit tuzlarından dolayı tamponlanma kapasitesine bağlıdır. İlginç bir şekilde salatalık fermentasyonunun tersine zeytin fermentasyonunda *pediococci*'ler, *leuconostoc* ve *lactobacil*'lerden önce gözlenebilir. Bu olay, tuz konsantrasyonundan ya da polifenollere dirençten dolayı gerçekleşebilir (Lund ve diğ., 2000).

Fermentasyonun üçüncü aşaması, substrat tükenene kadar devam etmektedir. Yaklaşık olarak 25 gün sürmektedir. *Lactobacillus* türleri (özellikle *Lb. plantarum*) dominant haldedir ve maya florası ile birlikte yaşamaktadır. *Lb. plantarum*, gelişmesi için vitamin ve aminoasitlere ihtiyaç duymaktadır. Bazı mayalar ortama B vitaminleri sentezlemektedir. Fermentatif mayalar, fermente olabilir şekerlerin önemli bir kısmını kullanmaktadır. Bunların etanol, etilasetat ve asetaldehit gibi metabolitleri, ürünün karakteristik duyuşal özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Oksidatif mayalar, yüzeysel filmler olarak bulunabilirler. Bunlar laktik asidi okside ettiği, pH'ı yükselttiği ve bu suretle *Clostridium* spp. tarafından kötü koku oluşumu ile bozulmaya neden olduklarından anaerobik koşulların sağlanması ile düşük miktarlarda tutulmalıdır. Oksidatif mayaların baskılanması, salamura yüzeyinin plastik filmlerle kaplanması ile gerçekleştirilebilir. Fermentasyonun sonunda, muhtemel *Propionibacterium* (pH'ın artmasına ve koku oluşumu ile bozulmaya neden olabilir) gelişiminin baskılanması için, tuz konsantrasyonu %8'e yükseltilir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.9.2 Konserve zeytin fermentasyonu

Konserve siyah zeytinlere, meyve yüzeyinde tamamen kararmanın sağlanması ve etli kısımda stabil siyah renk oluşumu için, tipik olarak alkali oksidasyonu uygulanmaktadır. Bu oksidasyon işlemi hasat sonrasında hemen uygulanabileceği gibi, meyveler salamura içerisinde depolanarak oksidasyon öncesinde fermentasyona uğratılabilir. Salamura içerisinde depolama esnasında hava enjeksiyonu ile oksidasyonun gelişmesi sağlanabilir. Salamuranın tuz konsantrasyonuna ve fenol seviyesindeki genetiksel farklılıklara bağlı olarak, mayalar ve laktik asit bakterileri fermentasyonda baskın halde bulunabilirler. Oksidasyon uygulaması öncesinde, laktik asit fermentasyonu ile tam bir koruma sağlanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Karartma işlemi için meyveler tekrar eden bir şekilde sodyum hidroksit solüsyonu (%1-2) ve içerisine basınç altında hava enjekte edilmiş olan su ile muamele edilmektedir. Genellikle bu işlemler 3 ila 5 kez uygulama ile başarılmaktadır. Fenolik bileşiklerin alkali oksidasyonu ile meyve yüzeyinde ve etli kısımda tam bir kararma sağlanmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Renk oluşumu, orthodifenoller ve kafeik asitten polimer oluşumuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Oksidasyon hızı, alkalilik miktarındaki artışa bağlı olarak artmaktadır. Oluşan renk stabil olmayıp, renkteki bozulmaların önlenmesi için demirli glukonat ya da laktat solüsyonları eklenmektedir. Demir renk üzerine etkisinin yanı sıra, kalsiyum gibi olgun zeytin tekstürünün korunmasında rol oynamaktadır (Robinson, 2000).

Sodyum hidroksit solüsyonu, pH 8'e düşene kadar zeytinlerin yıkanması ile uzaklaştırılmaktadır. Bu işlemler sonrasında zeytinler, tenekelere ya da cam kavanozlara %1,5 tuz içeren salamura ile yerleştirilir ve sterilize edilirler (Lund ve diğ., 2000).

2.1.9.3 Natürel siyah zeytin fermentasyonu

Natürel siyah zeytinler, %8-10 tuz konsantrasyonuna sahip salamura içerisine konulmaktadır. Alkali işlemi uygulanmadığından çözünebilir bileşenlerin meyve yüzeyine difüzyonu yavaş olmaktadır. Bu nedenle fermentasyon prosesinde yavaştır (Lund ve diğ., 2000).

İlk günlerde Gr (-) bakteriler bulunur, ancak 1-2 hafta sonra yok olmaktadır. Bu fermentasyonda, mayalar baskındır ve 10-25 gün sonra sayıları maksimuma ulaşmaktadır. Fermentatif mayalar arasında *Saccharomyces oleaginosus* ve *Hansenula anomala*, oksidatif mayalar arasında *Torulopsis candida*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida diddensii* ve *Pichia membranaefaciens*'in oksidatif türleri yer almaktadır. Ancak *Pediococcus*, *Leuconostoc* ve ileri dönemlerde *Lactobacillus* türleri gelişmekte ve asit üretmektedirler (Lund ve diğ., 2000).

Fermentasyon ürünleri arasında; laktik asit, asetik asit, etanol, etilasetat, asetaldehit, aseton, n-propanol, 2-metil-propanol ve 2-metil-butanol bulunmaktadır. Bu tip fermentasyonda, aşırı CO₂'yi uzaklaştırmak ve gaz kabarcıklarının oluşumu ile meyvelerde oluşabilecek kırıksıklığı önlemek için havalandırma işlemi uygulanabilir. Sonuç olarak bu fermentasyonda yeşil zeytinlere göre daha fazla miktarda çözünmüş oksijen bulunmaktadır ve bu da oksidatif mayaların gelişmesinde etkindir (Lund ve diğ., 2000).

Asit konsantrasyonu %0,3-0,5 arasında değiştiği halde, son pH 4,3-4,5 arasındadır. Bu nedenle, fermentasyonun sonunda tam bir korumanın sağlanabilmesi için, tuz konsantrasyonu %8-10'a yükseltilmelidir (Lund ve diğ., 2000).

2.1.10 Ham zeytinin bileşimi

Zeytin, çekirdekli ve etli bir meyvedir. Etli kısım ve çekirdek oranı çeşide bağlı olarak değişmektedir. Ağırlığın %76-80'ini meyvenin etli kısmı ve %20-24'ünü çekirdek (endocarp) oluşturmaktadır. Zeytinin bileşimi Tablo 2.6'da gösterilmiştir.

Tablo 2.6. Zeytinin bileşimi (Aktan ve Kalkan, 2000).

Bileşen	Miktar (%)
Su	35-42
Yağ	25-38
Ham Protein	1,9-2,5
Ham Selüloz	1,7-2,0
Kül (Mineral madde)	6-9
Karbonhidratlar (glukoz ve diğerleri)	2,8-6,2
Polifenoller	<1
Aromatik Maddeler	<1
Renk Maddeleri	<1
Enzimler	<1
Alkaloidler	<1
Pektinler	<1

Fermente olabilir şekerler olarak, glukoz (meyvenin etli kısmının %1-3'ü), fruktoz (%0,2-1,1) ve az miktarda sukroz ve mannitol içermektedir. Sitrik, okzalik asit ve malik asit, meyvenin etli kısım ağırlığının %0,5-1'ini oluşturmaktadır (Lund ve diğ., 2000).

Fenolik bileşikleri, çoğunlukla *ortho*-difenol bileşikleri ve bunların glikozidleri oluşturmaktadır. Bu bileşikler, özellikle laktik asit bakterilerine karşı antimikrobiyal özellik gösterdiğinden fermentasyonda önemli role sahiptir. Fenolik bileşikler ayrıca, olgunlaşma esnasında renk gelişiminde ve salamura içerisinde olgun zeytinlerin hazırlanması için uygulanan karartma işlemlerinde önemlidir (Lund ve diğ., 2000).

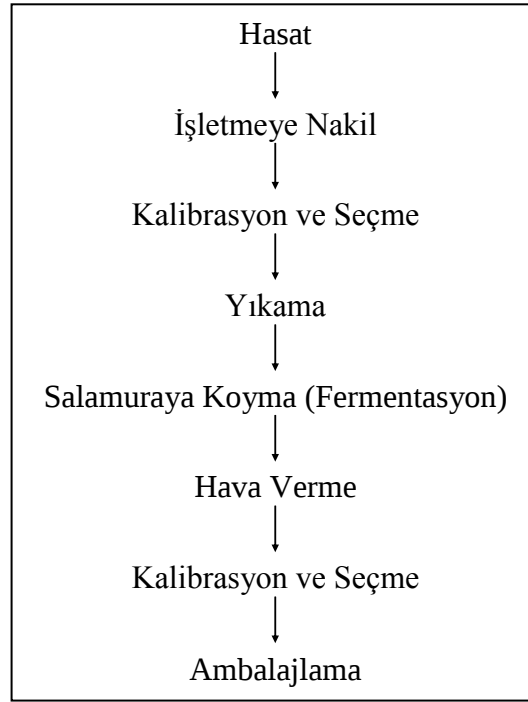
Alkali ile işlem görmemiş zeytinler, bir glikozid olan oleuropein içerikleri nedeniyle çok acı bir lezzete sahiptir. Oleuropein'in, alkali ile hidrolizi sonucunda giderilen acılık, alkalinin uzaklaştırılması sonrasında tekrar oluşmaz (Luh ve Woodroof, 1988).

Antosiyanin'ler zeytinde bulunan en önemli pigmentlerdir. Bunlar; siyanidin-3-glikozid, siyanidin-3-rutinozid, siyanidin trioizid ve siyanidin-3-soforosid olarak belirtilmiştir. Antosiyanin'ler zeytinin gelişimi esnasında maksimum seviyeye

ulaşıncaya kadar hızla artar, zeytin aşırı olgunlaştığında azalır. Pigment oluşumunda, ışığın etkisi önemlidir. Işıktaki gelişen meyvelerde, karanlıktakilere göre 10 kat daha fazla antosiyanin bulunmuştur (Luh ve Woodroof, 1988).

2.1.11 Türk tipi salamura natürel siyah zeytin üretimi

Türk tipi salamura natürel siyah zeytin üretimi Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Türk tipi natürel siyah zeytin üretimi akış şeması (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zeytinler, renkleri kıızıdan siyaha dönme aşamasında ve yüzeyde kırışıklıklar meydana gelmeden önce hasat edilmelidir. Hasat edilen zeytinler, delikli plastik kasalar içerisinde işletmeye nakledilmelidir. İşletmeye gelen zeytinler öncelikle elenirler, sonra bozuk, çürük taneler ve yabancı maddeler ayıklanmak suretiyle uzaklaştırılır (Aktan ve Kalkan, 2000).

Ayıklama sonrasında yıkanarak toz, toprak ve mikroorganizma yükünden arındırılan zeytinler fermentasyon tanklarına alınmaktadır. Tankın içerisine salamura ilave edilir. Laktik asit bakterilerinin en iyi şekilde çalışması için gereken optimum tuz konsantrasyonu %6-8 olarak belirtilmiştir. Bu nedenle salamura tuz konsantrasyonu en çok %9 oranında olmalıdır. Aksi halde laktik asit bakterileri haricinde asetik asit, alkol ve kötü koku üreten tüm mikroorganizmalar faaliyet gösterebilir ve ortamda baskın olabilirler (Aktan ve Kalkan, 2000).

Tanklara hava verildiğinde fermentasyon hızlandırılmakta ve tat gelişimi çabuk oluşmaktadır. %6-8 tuz konsantrasyonu ile fermentasyona başlayıp, pH, sıcaklık ve tuz konsantrasyonu kontrolü düzenli olarak yapıldığında arzu edilen tat oluşumu için gereken süre 3 aya indirilebilir. Yüksek tuz konsantrasyonunda gerçekleştirilen fermentasyonda ise zeytinlerin tatlanma süresi 6-8 ay sürmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Fermentasyon sonrasında salamuradan çıkarılan zeytinler havalandırılır ve oksidasyon ile siyah renk oluşumu sağlanır. Kararan zeytinlere, tekrar kalibrasyon ve seçme işlemi uygulanır. Yaralı, ezik ve açık renkli zeytinler ayrıldıktan sonra , zeytinler boyutlarına göre sınıflandırılıp ambalajlanırlar (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zeytinler salamurasız olarak açıkta veya naylon torbalarda piyasaya sunulacaksa, zeytinlere salamura içerisinde iken sodyum benzoat (%0,05-0,1) ilave edilerek tuz oranı % 9-10 seviyesine getirilmelidir. Zeytinler, salamura içerisinde tenekelerde veya cam kavanozlarda pastörizasyon sonrasında piyasaya sunulacaklarsa, koruyucu madde ilavesine gerek yoktur. Salamura tuz konsantrasyonunun en çok %7 olması gerektiği belirtilmiştir (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.12 Zeytinin işlenmesi sonucu elde edilen ürünler

Bu meyvenin % 15 i sofralık zeytin olarak, % 85 i yağ üretiminde kullanılmaktadır (Robinson, 2000). Yumuşamaya başlayan zeytinler ise zeytin ezmesine dönüştürülerek değerlendirilmektedir.

2.1.12.1 Zeytin yağı

Yağ üretimi için yetiştirilen zeytinlerden natürel, rafine ve riviera olmak üzere 3 farklı çeşitte zeytinyağı üretilmektedir. En değerlisi olan natürel zeytin yağ, zeytinden soğuk presle ayrılan ilk yağdır. Rafine zeytin yağ, natürel zeytin yağın rafine edilmesi ile elde edilmektedir. Daha açık renkte ve kokusu daha hafiftir. Riviera çeşidi ise, natürel ve rafine zeytinyağının karışımıdır (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.12.2 Zeytin ezmesi

Salamurada üretilen zeytinlerin fermentasyonu tamamlandığında, yumuşamaya başlayanlar ve kalibre dışında kalanlar zeytin ezmesine işlenmek üzere ayrılmaktadır. Palperlerde zeytinlerin çekirdek ve kabukları ayrılır, ezilerek püre haline getirilir. Kavanoz, teneke kutu veya alüminyum–plastik tüplere doldurulduktan sonra 75-80°C de 30 dakika pastörize edilmektedir. Yağ sızdırmasını önlemek amacıyla emülgatörler, koruyucu olarakta sodyum benzoat ve potasyum sorbat ilave edilmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

2.1.13 Zeytinlerde bozulma ve öneriler

Zeytinlerin olgun veya aşırı olgun hasat edilmesi sonucunda, işlenen zeytinlerin dokuları gevşek olmaktadır. Yağ asitlerinin oksidasyonu nedeniyle oluşan yüksek asitlik, acılık ve ağır bir tat meydana getirmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Bu problemin önlenmesi için zeytinler, renkleri kıızıldan siyaha dönme aşamasında ve kırışıklıklar oluşmadan hasat edilmelidir. Arzu edilen siyah renk, fermentasyon aşamasında zaman zaman verilecek hava ile sağlanabilir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Ham meyve üzerinde bulunan ve bozulma etkeni olan birçok mikroorganizma, yıkama işlemi ile uzaklaştırılmaktadır. Geri kalan mikroflora Gr(-) bakteriler, mayalar ve laktik asit bakterilerinden oluşmaktadır (Fernandez ve diğ., 1997).

Fermentasyon döneminde salamura yüzeyinde oluşan filmde, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* cinsi küfler ve maya tespit edilmiştir (Oral ve Heperkan, 1999).

Zeytinde, Gr(-) basiller ve mayaların gaz kabarcığı oluşturması sonucunda balık gözü (fisheye) bozulması görülmektedir. Meyvede, et ile kabuk arasında CO₂ birikmesi sonucunda kabarcık oluşmaktadır. Meyvenin etli kısmında yumuşama ve kabuğun ayrılması ile karakterize edilmektedir (Wood, 1998; Aktan ve Kalkan, 2000).

Kabarcık oluşumunu önlemek için üretim esnasında aseptik çalışılmalı ve fermentasyon işlemine dikkat edilmelidir. Salmurada kullanılan suyun bakteriyolojik yükü kontrol edilmeli, kullanılan kap ve aletler temiz olmalı ve belirli aralıklarla temizlenmelidir. Ayrıca tuz ve salamura tankları mikrobiyal bulaşmalardan korunmalıdır. Fermentasyonda ise yararlı mikroorganizmaların gelişimini teşvik, zararlı mikroorganizmaların gelişimini ise inhibe eden ortamlar sağlanmalıdır. Burada pH kontrolü en önemli faktörlerden biridir pH 4,5 ve daha düşük değerlerde Gr(-) basillerin gelişimi büyük ölçüde inhibe edilmektedir (Aktan ve Kalkan, 2000).

Zapatera bozulması, zeytinlerde kötü koku oluşumu ile karakterize edilmektedir. Başlangıçta peynirimsi koku olarak tanımlanırken, sonra keskin bir kötü koku şeklinde tanımlanmaktadır. Bu bozulma, laktik asit fermentasyonunun salamura pH'ı 4,5'in altında bir değere düşmeden önce sonlanması ile gerçekleşmektedir. pH 4,5'in altında, zapatera bozulması olmamaktadır. Bozulma esnasında pH artmakta, laktik ve asetik asit metabolizmasından çeşitli bileşikler oluşmaktadır. Bu organik asitlerin arasında başta propiyonik asit olmak üzere bütirik, süksinik, formik, valerik, kaproik ve kaprilik asit yer almaktadır. Bütirik ve diğer uçucu asitler, keskin kötü kokudan sorumlu tutulmaktadır. *Propionibacterium* ve bazı *Clostridium* türleri, zapatera bozulması etkeni olarak görülmektedir. Bu bozulma asitlendirme ya da starter kültür ile inokülasyon uygulanarak  nlenebilir (Wood, 1998).

2.2. K f Gelişimi ve Mikotoksin Oluşumu

Mikroorganizmalar, tarımsal ürünlerde ve çeşitli gıda maddelerinde doğal flora olarak bulunmaktadır ya da bu ürünlere sonradan bulaşmaktadır. Bu mikroorganizmalar içerisinde küfler, endüstriyel olarak kullanıldıklarından ayrı bir öneme sahiptir. Ancak gelişmeleri için uygun olan koşullarda, gıdalarda bozulmaya

ve ürettikleri toksik metabolitlerle insan ve hayvanlarda hastalıklara neden olmaktadır (Taydaş ve Aşkın, 1995; Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Küfler tarafından canlı bir dokunun istilasına "mikosiz", oluşturulan sekonder metabolite "mikotoksin" ve bu mikotoksinlerin neden olduğu hastalıklara ise "mikotoksikoz" adı verilmektedir (Taydaş ve Aşkın, 1995; Karadeniz ve Ekşi, 2002). Mikotoksikoz; teratojenite, kanserojenite ve bağışıklık sistemi üzerine olumsuz etkileri içermektedir (Wijnands ve Leusden, 2000).

Mikotoksin oluşumu, logaritmik fazın sonunda ya da duraklama fazının başlangıcında olmaktadır. Mikotoksinler yapısal olarak, düşük molekül ağırlıklı (< 700) kompleks organik bileşiklerdir ve kumarin, steroid gibi farklı kimyasal gruplarda bulunabilirler (Weidenböner, 2001). Küfler tarafından üretilen birincil metabolitler, gelişim için esansiyeldir. İkincil metabolitler ise hücre materyallerinin sentezi ve mikroorganizmaların gelişmesi ile direkt bağlantılı değildir (Robinson, 2000). İnsanların gıda zincirinde bulunan mikotoksijenik küfler daha çok *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* türleridir.

Mikotoksinler üzerine çalışmalar, 1960'lı yıllarda en toksik metabolit olarak bilinen aflatoksinlerin bulunması ile başlamıştır (Taydaş ve Aşkın, 1995; Robinson, 2000). Daha sonra patulin, okratoksinler, penisillik asit, sitrinin, sterigmatosistin, zeralenon ve alternaria toksini olmak üzere birçok mikotoksin üzerine araştırmalar yapılmıştır (Karadeniz ve Ekşi, 2002). Gıdalarda $\mu\text{g/kg}$ ve mg/kg arasında değişen konsantrasyonlarda bulunabilmektedirler.

Mikotoksinler küfler tarafından üretilen doğal ürünlerdir. Biyolojik aktiviteleri, omurgalılara karşı toksisitedir. Bazı mikotoksinler insektisidal, antimikrobiyal ve fitotoksik etki gösterir. Ürünlere mikotoksin kontaminasyonu tarlada, hasat sonrasında ya da depolama esnasında olabilir. Önemli ekonomik kayıpların yanı sıra insan ve hayvan sağlığı için tehdit oluşturmaktadırlar (Robinson, 2000). Düşük kalitede yem tüketimi nedeni ile hayvanlar, insanlara göre mikotoksinlere daha fazla maruz kalmaktadır (Weidenböner, 2001).

Gıdalarda küf gelişiminin olması, daima mikotoksin oluşumu ile sonuçlanmamaktadır. Aynı şekilde görsel olarak küf gelişiminin olmaması, mikotoksinlerin oluşmadığı anlamına gelmez (Vries, 1997).

Mikotoksinlerin toksik etkileri, akut ve kronik olmak üzere iki kategoriye ayrılabilir. Akut etkiler, sıklıkla ölümcül hastalıkları içermektedir. Kronik etkiler ise kilo kaybı, bağışıklık sisteminde zayıflama, kanser, süt hayvanlarında süt üretiminde azalma olarak belirtilmektedir (Robinson, 2000).

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).

2.2.1 Mikotoksinlerin oluşumunda etkili faktörlerin kontrolü

Gıdalarda küflerin gelişimi ve mikotoksin üretiminde; nem, su aktivitesi (a_w), sıcaklık, substrat bileşimi, pH, rekabetçi küf ve mikroorganizma gelişimi ve bitki üzerindeki stres (kuraklık, mekanik hasat ekipmanlarının, böcek ve dolunun tohumda neden olduğu zarar) etkilidir (Robinson, 2000). Bu faktörlerden en önemlileri sıcaklık, su aktivitesi (a_w) ve substrat bileşimidir. Bu parametrelerin küf gelişimi ve toksin birikimi üzerine etkisinin bilinmesi, bozulma ve bulaşmaların önlenmesi için faydalı olabilir (Comerio ve diğ., 1998; Abramson ve diğ., 1999a).

2.2.1.1 Su aktivitesi

Her küf türü, gelişmesi için farklı minimum su aktivitesi (a_w) değerine ihtiyaç duymaktadır. Mikotoksin oluşumunda da su aktivitesi (a_w) değeri etkilidir. Artan nem içeriği ve su aktivitesine (a_w) bağlı olarak mikotoksin oluşumu artmaktadır. Tahıllarda %20-25 arasında nem içeriği bulunduğunda maksimum miktarda mikotoksin üretilmektedir. Bu nedenle nem miktarının; tahıllarda %13'ten az, yüksek yağ içerikli tohumlarda ise %7 olması gerektiği belirtilmiştir (Weidenbörner, 2001).

2.2.1.2 Sıcaklık

+4°C nin altındaki sıcaklık değerlerinde mikotoksin oluşumu önlenabilir (Weidenbörner, 2001).

2.2.1.3 Atmosfer

Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumu, düşük O₂ konsantrasyonu (< %1) ve yüksek konsantrasyonlarda CO₂ ile inhibe edilmektedir. Yüksek konsantrasyonlu CO₂'nin, yüksek konsantrasyonda N₂ ve düşük konsantrasyonda O₂ uygulamasından daha etkili olduğu belirlenmiştir. Özel gaz kompozisyonlarına toleransı, sıcaklık ve su aktivitesi (a_w) etkilemektedir (Weidenbörner, 2001). %15'in üzerindeki konsantrasyonlarda CO₂'nin, *Aspergillus* ve *Penicillium* türlerinin gelişimini inhibe ettiği bildirilmiştir (Arora, 1991).

2.2.1.4 Substrat

Mikotoksin oluşumunu; karbonhidratlar (glukoz, sakkaroz...), belli aminoasitler (asparagin, glycin...) ve yağ asitleri arttırmaktadır. Bitkisel ürünler yüksek karbonhidrat içerikleri nedeniyle mikotoksin kontaminasyonunda hayvansal ürünlere göre daha büyük risk taşımaktadır. Hayvansal ürünlerden ise özellikle süt riskli gruptadır (Weidenbörner, 2001).

2.2.2 Zeytinde küf ve mikotoksin oluşumu

Üretilen sofralık zeytinlerde depolama, paketlenme ve dağıtım esnasında uygun olmayan koşullara bağlı olarak, küflerinde aralarında bulunduğu birçok mikroorganizma bozulmaya neden olabilir (Fernandez ve diğ., 1997). Zeytinlerde küf gelişimi, küfün meyve eti içerisine girişi ile başlamaktadır. Bunu misel gelişimi ve mikotoksin oluşumu takip etmektedir (Weidenbörner, 2001).

Zeytin ve zeytin ürünlerinden *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraeus* ve birçok *Penicillium* türü izole edilmiştir (Gourama ve Bullerman, 1988).

Salamura siyah zeytinlerde yapılan bir çalışmada, salamuralardan 63 küf suşu izole edilmiştir. Bunlar *Penicillium aurantiogriseum*, *P. camambertii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. funiculosum*,

P. glandicola, *P. griseofulvum*, *P. islandicum*, *P. oxalicum*, *P. roquefortii*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* olarak bildirilmiştir (Meriç ve Heperkan, 2001).

Siyah zeytinde mikotoksinlerden; sitrinin, penisillik asit, aflatoksin B₁ / B₂ / G₁ (aflatoxin), okratoksin A (ochratoxin A), sterigmatosistin (sterigmatocystin), patulin, luteoskrin (luteoscrin) ve siklopiasonik asit (cyclopiaconic acid) tespit edilmiştir (Oral ve Heperkan, 1999). Ayrıca altenuene, alternariol, alternariol metil eter ve tenuazonik asit belirlenmiştir (Weidenbörner, 2001).

Maroko'da üretilen Grek tipi siyah zeytinlerden 17 küf türü izole edilmiştir. Bunlardan 8 tanesi *A. flavus*, 7 tanesi *A. petrakii* ve 2 tanesi *A. ochraceus*'tur. *A. ochraceus* ve *A. petrakii* türleri okratoksin, penisillik asit, patulin ve sitrinin oluşumu açısından incelenmiştir. Çalışmada okratoksin, patulin ve sitrinin'in oluşturulmadığı belirlenmiştir (Gourama ve Bullerman, 1988).

Gemlik tipi zeytinlerde mikotoksin içeriğinin araştırıldığı bir çalışmada, 21 örnekten sadece bir tanesinde sitrinin bulunmuştur (Korukluoğlu ve diğ., 2000).

Meriç ve Heperkan (2001) İstanbul'da piyasadan temin ettikleri 42 zeytin örneğinin %80'inde sitrinin (73-375 ppb) varlığını belirlemişlerdir.

2.3 Mikotoksinler İle ilgili Yasal Düzenlemeler

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde aflatoksinler için kabul edilebilir en yüksek değer 0,01 ppm olarak bildirilmiştir. Meyve sularında bulunabilen patulin için ise kabul edilebilir en yüksek değer 0,05 ppm'dir. Yönetmelikte sitrinin ile ilgili bilgi yoktur (İ.T.O., 1998).

Ayrıca işlenmemiş tahıl tanelerinde bulunabilen okratoksin A için kabul edilebilir en yüksek değer 5 µg/kg olarak belirtilmiştir (Anon., 2003).

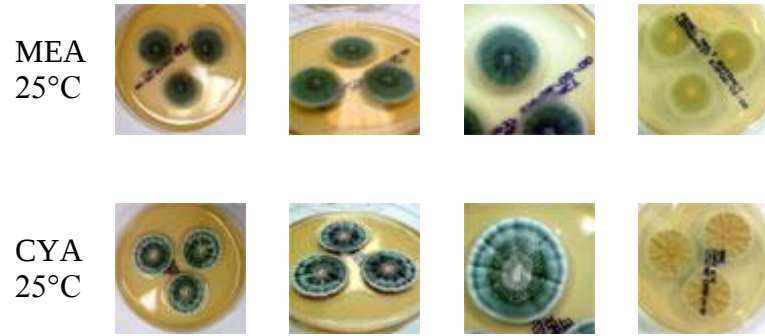
2.4 *Penicillium citrinum*'un Özellikleri

Penicillium citrinum, mezofilik özellikte bir küf olup, minimum 5°C, maksimum 37°C civarında ve optimum 26-30°C sıcaklık değerlerinde gelişebilmektedir. 25°C

de gelişim için gerekli minimum a_w değeri 0,80-0,84 olarak belirtilmiştir. pH 2 ila 10 arasındaki ortamlarda gelişme gösterebilir (Pitt ve Hocking, 1997).

Penicillium citrinum, hiflerden oluşmaktadır. Bu hifler, konidiaları taşıyan 3-5 adet metula (metulae) içermektedir (Samson ve diğ., 1996; Pitt ve Hocking, 1997).

CYA (Czapek Agar)'da oluşan koloniler 25-30 mm, MEA (Malt Ekstrak Agar)'da oluşan koloniler 14-18 mm çapındadır (Pitt ve Hocking, 1997). *P. citrinum*'un MEA ve CYA besi ortamlarında gelişimi Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Anon., 2000).



Şekil 2.4. MEA ve CYA besi ortamlarında *P. citrinum*'un görünümü (Anon., 2000).

Penicillium citrinum, toksijenik özellikte bir kültür ve sitrinin toksinini oluşturmaktadır (Frank, 1992; Samson ve diğ., 1996; Sweeney ve Dobson, 1998). *P. citrinum*'un sitrinin oluşturabileceği optimum sıcaklık derecesi 30°C olarak belirtilmiştir (Comerio ve diğ., 1998).

P. citrinum kserofilik (xerophilic) bir küf olup, düşük su aktivitelerinde dahi gelişebilmektedir. *P. citrinum* a_w 0,775 değerinde gelişme göstermiş, ancak a_w 0,800 ve daha düşük değerlerde sitrinin oluşumu gözlenmemiştir. Sitrinin oluşumu için gerekli minimum a_w değeri olarak 0,810 bildirilmiştir (Comerio ve diğ., 1998). Ekmek üzerinde sitrinin oluşumu için gerekli a_w değeri minimum 0,80, optimum 0,92 olarak belirtilmiştir (Weidenbömer, 2001).

Küf miselleri uygun olmayan depolama koşullarında gelişmektedir. Logaritmik fazın sonunda ya da duraklama fazının başlangıcında, depolanan gıda ve yemler tarafından tedarik edilen uygun besinsel koşullar altında ve yeterli su aktivitesi (a_w) ile sıcaklık mevcudiyetinde sekonder metabolit olan sitrinin oluşmaktadır. Gelişimin

önlenebilmesi sıcaklık ve su aktivitesi gibi parametrelerin kontrol altında tutulması ile sağlanabilir (Frank, 1992).

Arpalarda sitrinin oluşumu üzerine su aktivitesi ve depolama süresinin etkisinin incelendiği bir çalışmada süreye bağlı olarak *Penicillium* kontaminasyonunun arttığı belirtilmiştir (Abramson ve diğ., 1999a).

Süt ürünleri, sebze ve meyvelerden izole edilen laktik asit bakterileri antifungal ve antimikotoksijenik aktiviteleri açısından incelenmiştir. Test edilen 420 izolattan 2 tanesinin *P. citrinum*'a karşı geniş inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu 2 izolat *Lactobacillus casei* olarak tanımlanmıştır (Gourama, 1997).

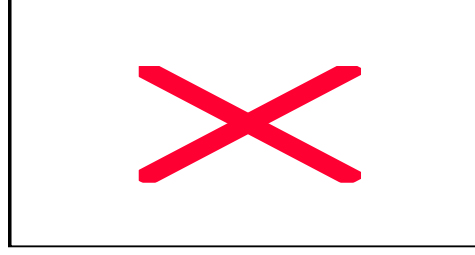
Penicillium citrinum'un gelişimi üzerine öjenol ve timol'ün etkisi incelenmiştir. Sıvı besi ortamında, öjenol tam bir inhibisyon sağlamış, timol ise sadece gelişim oranını etkilemiştir (Vázquez ve diğ., 2001).

2.5 Sitrinin (Citrinin)'in Özellikleri

Sitrinin, 1931 yılında doğal antibiyotik maddeler üzerine yapılan bir çalışmada *P. citrinum* kültüründen izole edilmiştir (Frank, 1992). *Penicillium* ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilen sekonder bir metabolit olup, gıdalara sıklıkla kontamine olmaktadır (Krejci ve diğ., 1996).

Kuvvetli antibakteriyel etkisi nedeni ile bir antibiyotik olarak incelenmiştir. Ancak toksisite çalışmaları bu sekonder metabolitin, hayvanlarda böbrek kanallarında hasara neden olan bir nefrotoksin olarak rol oynadığını göstermiştir (Comerio ve diğ., 1998). Bu nedenle bir antibiyotik olarak asla kullanılmamıştır.

Sitrinin'in yapısal formülü Şekil 2.5'te görülmektedir. Molekül formülü $C_{13}H_{14}O_5$, molekül ağırlığı 250,25 gr ve erime noktası 170-173°C dir. Sarı renkli, kristal halde ve kokusuzdur (Frank,1992). Seyreltik alkali (sodyum hidroksit, sodyum karbonat, sodyum bikarbonat ve sodyum asetat) ve polar organik solventler (etanol, dioxane, aseton, benzen ve kloroform) ile çözünmektedir (Frank, 1992; Miller ve Trenholm, 1994).



Şekil 2.5. Sitrinin'in yapısal formülü.

Sitrinin, kimyasal olarak bir quinone metil olarak formüle edilmiştir (Fouler ve diğ., 1994). Sitrinin'in X-ışını ile ilk analizi, hücre içi iki hidrojen bağı ile *p*-quinone metil olabileceğini göstermiştir. Son olarak, alternatif *o*-quinone metil yapısı da tanımlanmıştır (Miller ve Trenholm, 1994). Ayrıca bu mikotoksinin poliketit bir yapıya sahip olduğu da belirtilmektedir (Trivedi ve diğ., 1993).

Yüzde 95 etanol ya da n-hekzan çözgeni içerisinde ısıya dayanıklıdır. Asit ve alkali solüsyonlarda stabil değildir (Fouler ve diğ., 1994). Sitrinin'in 1:1 ve 1:2 bakır (II)-sitrinin şelatları oluşturma özelliğinde olduğu belirtilmektedir (Miller ve Trenholm, 1994). Bu stabil şelat komplekslerinin oluşumunun önlenmesi için ekstraksiyon dikkatli bir şekilde dizayn edilmelidir (Sinha ve Bhatnagar, 1998). Sitrinin'in mikrobiyal aktivitesinin sistein mevcudiyetinde inaktif olduğu belirtilmektedir (Fouler ve diğ., 1994; Miller ve Trenholm, 1994).

Sitrinin muhtemel böbrek toksini olup, gıda ve yemlerde doğal kontaminant olarak bulunmaktadır (Kitabatake ve diğ., 1991; Trivedi ve diğ., 1992). Tüm türlerde yapılan testlerde, sitrinin'in böbrek işlevlerini bozduğu belirlenmiştir. Bu nedenle insanlarda Balkan Endemik Nefropati (BEN) ve Japonya'da "sarı pirinç" (yellow rice) sendromuna neden olan bir ajan olarak ilişkilendirilmektedir (Comerio ve diğ., 1998).

BEN, ilk olarak Bulgaristan'da 1950'lerde tanımlanan kronik böbrek rahatsızlığıdır. Günümüzde Bulgaristan dışında Romanya ve Yugoslavya'da rastlanmaktadır. Bu bölgedeki insanların %12'si bu hastalıktan şikayetçidir. Ölüm oranı %40 civarında belirtilmiştir. Böbrek işlevlerinde ileri derecede bozulma olur. En önemli semptom, idrar yolunda tümör oluşumudur. Kanallarda dejenerasyon ve hücre aralarındaki bağ

dokunun artması (fibrosis) olarak karakterize edilmektedir. Hastalık 5-10 yıl içerisinde yavaş bir şekilde gelişmektedir (Weidenbörner, 2001).

Sarı pirinç sendromu ise 1891 yılında Japonya’da tanımlanmıştır. Küflü, parlatılmamış sarı pirinçlerin köpek, tavşan ve guinea domuzlarında merkezi sinir sisteminde felce neden olduğu ölümcül bir hastalık olarak belirlenmiştir. 1910 yılında Japonya’da sarı pirinç satışı yasaklanmıştır (Doyle ve diğ., 1997).

Sitrinin, bazı küfler tarafından okratoksin A ile birlikte üretilmektedir (Wilson ve diğ., 1976). Bu iki mikotoksin, toksikoloji ve patolojide benzerlikler göstermektedir (Vrabcheva ve diğ., 2000). Sitrinin ve okratoksin A sinerjistik etki göstermektedir. Bu nedenle teratojenite ve kanserojenite üzerine yapılan çalışmalarda birlikte test edilmektedirler. Test hayvanlarında iki mikotoksininde teratojen ve nefrotoksin özellik gösterdiği belirtilmektedir (Abramson ve diğ., 1999b; Trucksess ve Pohland, 2000).

2.5.1 Sitrinin üreten küfler

Penicillium aurantiogriseum, *P. canescens*, *P. chrysogenum*, *P. citreoviride*, *P. citrinum*, *P. claviforme*, *P. expansum*, *P. fellutanum*, *P. hirsutum*, *P. implicatum*, *P. jensenii*, *P. lividum*, *P. notatum*, *P. palitans*, *P. steckii*, *P. velutinum*, *P. verrucosum*, *P. viridicatum* sitrinin üreten küfler olarak belirtilmektedir (Hald ve Krogh, 1973; Frisvad, 1981; Frisvad ve diğ., 1983; Hald ve diğ., 1983; Miller ve Trenholm, 1994; Sweeney ve Dobson, 1998).

Sitrinin’in ayrıca *Aspergillus niveus* ve *A. terreus* tarafından da üretildiği bildirilmiştir (Hald ve Krogh, 1973).

Sitrinin, bazen diğer mikotoksinler ile birlikte üretilmektedir. *P. expansum*’un sitrinin ve patulin’i, *P. viridicatum*’un sitrinin ve okratoksin A’yı birlikte ürettiği belirtilmiştir (Frisvad, 1981). Son çalışmalarda *Penicillium* cinsleri arasında *P. verrucosum*’un sitrinin ve okratoksin A üreten tek küf olduğu bildirilmiştir (Miller ve Trenholm, 1994).

A. niger ve *Trichoderma viride* mevcudiyetinde, *P. citrinum* tarafından sitrinin üretimi olumsuz etkilenmektedir (Frank, 1992).

2.5.2 Sitrinin'in izole edildiği gıdalar

2.5.2.1 Bitkisel kaynaklı gıdalar

Sitrinin buğday, arpa, çavdar, yulaf, mısır, soya fasulyesi, pirinç, küflenmiş ekmek, meyve, kuru yemiş, yağlı tohumlar ve yem tahıllardan izole edilmiştir (Hald ve Krogh, 1973; Frank, 1992; Pitt ve Hocking, 1997; Comerio ve diğ., 1998; Begum ve Bhatnagar, 2000; Shu ve Lin, 2002).

Kahverengi çürüklere sahip elmalarda, patulin ile birlikte sitrinin de belirlenmiştir (Martins ve diğ., 2002). Fakat elma suyu ve diğer elma ürünlerinde gözlenmemiştir. Bu durumun sitrinin'in stabil yapıda olmamasından kaynaklandığı belirtilmektedir (Frank, 1992).

Orta Asya'da pirincin *Monascus ruber* ile fermentasyonu sonucu angkak adı verilen kırmızı, sarı ve turuncu gıda boyası elde edilmektedir. Angkak boyasının 50 mg/kg sitrinin içerdiği belirlenmiştir. Almanya'da vejeteryanlar için üretilen sosis tipi ürünlerde kullanıldığı saptanmıştır (Wild, 2000).

Abrunhosa ve diğ. (2001) şarap üretiminde kullanılan üzümelerde sitrinin oluşumunu araştırmış ve *P. expansum*'un 51 suşundan sadece bir tanesinin üzümde sitrinin oluşturduğunu belirlemiştir. Diğer üzüm ürünlerinde ise sitrinin belirlenmemiştir. Bu durum sitrinin'in üretilmemiş olmasından ya da stabil yapıda olmamasından kaynaklanabilir.

Kakao ve kahve çekirdeklerinde sitrinin üreten küfler gelişmekte, ancak mikotoksin sentezi olmamaktadır. Kafein'in *P. citrinum* tarafından sitrinin sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Güney Afrika'da biralara mikotoksin içeriği üzerine yapılan bir çalışmada, sitrinin'in mayşeleme aşamasında yıkıldığı ve bu nedenle biralarda sitrinin bulunmadığı belirlenmiştir (Odhav ve Naicker, 2002).

Ülkemizde zeytinle ilgili yapılan çalışmalarda; Oral ve Heperkan (1999) *P. citrinum*'un zeytinde sitrinin oluşturabildiğini tespit etmişlerdir. Korukluoğlu ve diğ. (2000) Gemlik tipi zeytinlerde mikotoksinlerin mevcudiyetini incelemişlerdir. 21 zeytin örneğinden, sadece bir örneğin sitrinin içerdiği belirtilmiştir. Meriç ve

Heperkan (2001) İstanbul’da piyasadan temin ettikleri 42 zeytin örneğinin %80’inde sitrinin (73-375 ppb) varlığını belirlemişlerdir.

Bitkisel kaynaklı gıdalarda sitrinin’in mevcudiyeti, yetersiz depolama koşullarından kaynaklanmaktadır.

2.5.2.2 Hayvansal kaynaklı gıdalar

Fermente ve kürlenmiş etler, jambon, sucuk ve peynirden izole edilmiştir (Pitt ve Hocking, 1997).

İngiltere’de 19 küflü peynirde yapılan araştırmada, 15’inin 50 ppb’e kadar sitrinin içerdiği belirlenmiştir. Difüzyon nedeniyle, peynirin içerisinde yüzeyine göre daha fazla bulunmaktadır (Frank, 1992).

Kümes hayvanlarının vücudunda mikotoksin birikimini ve yumurtalarının mikotoksin içeriğini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada, hayvanlara 6 hafta süreyle 100 ppb sitrinin içeren yem verilmiştir. Hayvanların vücudunun ve yumurtanın sarısının 10 ppb, beyazının 6 ppb sitrinin içerdiği tespit edilmiştir (Frank, 1992).

Mikotoksinler, hayvansal ürünler içerisinde iki farklı yolla bulunabilmektedir. Birincisi, ürün küflenmeye başlar ve toksin ürünün içerisinde difüze olur. İkincisi ise, mikotoksin içeren yemlerden kaynaklanmaktadır. Mikotoksinler hayvan organizmasından dışkıyla ya da idrarla, süt hayvanlarında süt ile ve kümes hayvanlarında yumurta ile dışarı atılınca kadar depolanmaktadır (Frank, 1992).

2.5.3 Sitrinin’in toksisitesi

Sitrinin, diğer mikotoksinler gibi beslenme ile alınan doza bağlı olarak akut ya da kronik rahatsızlıklara neden olabilmektedir. Doğal olarak kontamine olmuş olan hububatlarda sitrinin konsantrasyonu, kronik rahatsızlıklara neden olabilecek düzeyde bulunmuştur. Kronik sitrinin toksikozisinde hedef organ böbrektir (Hald ve Krogh, 1973).

Sitrinin toksisitesinin derecesi şiddetliden orta şiddette toksige doğru sınıflandırılmaktadır (Frank, 1992). Sitrinin toksisitesinde en sık gözlenen durum

vücut ağırlığında kayıptır. Test guinea domuzları genelde belirti gözlenmeksizin ölü olarak bulunmuştur (Thacker ve diğ., 1977). Sprague-dawley sıçanlarının kullanıldığı çalışmada gebeliğin 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ya da 15. günlerinde tek bir dozda 35 mg/kg sitrinin verilmiştir. Uygulamadan 2 gün sonra kilo kaybı gözlenmiştir (Reddy ve diğ., 1982). Vücut ağırlığındaki azalmanın, su tüketimindeki artışa ve böbrekteki dejenerasyona bağlı olarak gerçekleştiği belirtilmektedir (Robinson, 2000).

Ağız yolu ile alındığında LD₅₀ değeri vücut ağırlığı üzerinden sıçanlarda 50 mg/kg, farelerde 112 mg/kg, hamstırlarda 67 mg/kg ve guinea domuzlarında 43 mg/kg olarak belirlenmiştir (Frank, 1992). Ayrıca ördeklerde 57 mg/kg, tavuklarda 95 mg/kg, tavşanlarda 134 mg/kg olarak belirlenmiştir (Trucksess ve Pohland, 2000). LD₅₀ değeri, hayvan türü, cinsiyet ve çalışmayı yürütenin izlediği yol gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Pfohl-Leszkowicz ve diğ., 2002).

Sitrinin'in hücresel düzeyde etkisi, mitokondride birikim ve elektron taşıma sisteminde kesinti olarak karakterize edilmektedir. DNA, RNA ve protein sentezinde inhibisyona neden olmaktadır (Frank, 1992; Sabater-Vilar ve diğ., 1999).

Tüm türlerde yapılan testlerde, sitrinin'in böbrek işlevlerini bozduğu belirlenmiştir. Bu nedenle insanlarda "Balkan Endemik Nefropati (BEN)" ve Japonya'da "sarı pirinç" (yellow rice) sendromundan sorumlu tutulmaktadır (Krejci ve diğ., 1996; Comerio ve diğ., 1998; Sabater-Vilar ve diğ., 1999). Ayrıca kan basıncında azalma, emesis ve diare'ye neden olduğu belirtilmektedir. Emesis ve diare ise elektrolit dengesinin bozulmasına neden olmaktadır (Krejci ve diğ., 1996).

Sitrinin, okratoksin A ile birlikte sinerjistik etki göstermektedir. Bu iki mikotoksin, eritrosit oluşum mekanizmasında tahribata ve buna bağlı olarak kanda kırmızı hücre sayısında azalmaya neden olmaktadır. Serum billirubin miktarını arttırdığı ve kemik iliği hücrelerinde zayıflamaya neden olduğu belirtilmektedir. Aşırı billirubin, karaciğerde fazla yüklenmeye neden olarak hemolitik sarılık ve kansızlık oluşturabilmektedir. Toksin uygulanmış farelerde, karaciğerde hasar oluşumuna bağlı olarak yağ asitleri oksitlenmemiş ve plazmada yağ asidi miktarı artmıştır. Sonuç olarak okratoksin A ve sitrinin'in muhtemel hepatotoksik ajanlar olabileceği belirtilmektedir (Gupta ve diğ., 1984).

2.5.3.1 Kanserojenite

200 mg/kg dozunda sitrinin tüketildiğinde kanserojen etki gözlenmemiştir (Frank, 1992; Pfohl-Leszkowicz ve diğ., 2002). Fisher 344 erkek sıçanlarda 80 hafta süre ile 1g/kg sitrinin içeren diyet uygulanmıştır. İşlem uygulanan hayvanların böbreklerinde tümör oluşumu gözlenmiştir. Ancak bu tümörler tehlikesiz, temiz urlar olarak sınıflandırılmıştır (Wijnands ve Leusden, 2000).

Okratoksin A uygulanan 20 fareden 6'sında, okratoksin A ve sitrinin'in birlikte uygulandığı 18 fareden 10'unda tümör oluşumu tespit edilmiştir. Bu nedenle sitrinin'in, okratoksin A ile birlikte ilave toksik etki gösterdiği belirtilmektedir (Wijnands ve Leusden, 2000).

2.5.3.2 Mutajenite

Sitrinin'in mutajenitesi ve genotoksisitesi tartışmalı durumda olup, kısa dönemli mutajenite testi negatif olarak belirtilmiştir (Sabater-Vilar ve diğ., 1999; Shu ve Lin, 2002).

2.5.3.3 Nefrotoksisite

Vücut ağırlığı üzerinden 20-50 mg/kg arasında değişen dozlarda; fare, sıçan, guinea domuzu, köpek ve tavşanlarda böbrekte hasara neden olduğu belirtilmiştir (Frank, 1992).

Nefrotoksik mikotoksinler olan sitrinin ve okratoksin A'nın toksisitesi HeLa hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Sitrinin, okratoksin A'dan daha az toksik bulunmuştur (Kitabatake ve diğ., 1993).

Bebek hemstırların böbrek hücrelerinin kullanıldığı çalışmada, hücrelerin yakınlıklarındaki değişikliklerin yanı sıra mikroskopta morfolojik değişiklikler belirlenmiştir. Düz ve uzun olan hücreler, sitrinin'in etkisi ile kabarık ve yuvarlak şekle dönüşmüştür. Sitrinin zarlar içerisine nüfuz edebilmekte ve mitokondriye etki edebilmektedir. Ayrıca mitokondriye Ca^{+2} iyonlarının intikalinin toplam kapasitesinde ve hızında doza bağlı olarak azalmaya neden olmaktadır (Wijnands ve Leusden, 2000).

2.5.4 Sitrinin'in detoksifikasyonu

Ekonomik kayıpların yanı sıra insan sağılığı için ciddi tehlikelere neden olabilen mikotoksinlerin detoksifikasyonu büyük önem taşımaktadır (Fouler ve diğ., 1994). Fiziksel, kimyasal ve biyolojik işlemler uygulanabilir. Uygulanan işlemler ucuz ve basit olmalı, birçok mikotoksine karşı etkili olmalıdır. Ayrıca indirgenme sonrasında yeni bir toksik metabolit oluşmamalıdır. Gıdanın besinsel ve lezzet özelliklerinde kayba neden olmamalıdır (Weidenbörner, 2001).

Fiziksel işlemler; temizleme, yıkama, öğütme, ısıl işlem ve radyasyon uygulamalarını içermektedir. Yöntemin verimliliği kontaminasyonun derecesine, üründe mikotoksinlerin dağılımına bağılı olarak değişmektedir (Weidenbörner, 2001). Öğütmenin sitrinin üzerine etkisi yoktur. Çünkü mısır ununun 10-98 µg/kg oranında sitrinin içerdiği belirlenmiştir (Chelkowski, 1991; Weidenbörner, 2001).

Sitrinin ısıya karşı hassas bir mikotoksin olduğundan ısıl işlem ile detoksifiye edilebilmektedir. Ancak detoksifikasyonda sıcaklık koşullarının yanı sıra nem içeriği de büyük öneme sahiptir (Kitabatake ve diğ., 1991).

Nem içeriği azaldıkça, sitrinin detoksifikasyonu için gereken sıcaklık değeri daha yüksek olmaktadır. Kuru ve nemli koşullarda 140 ve 175°C lerde detoksifikasyon sağlanabilmektedir. Sulu koşullarda 140°C de ısıl işlem sonucunda, sitrinin'den daha toksik bir bileşik olan sitrinin H1'in oluştuğı gözlenmiştir (Trivedi ve diğ., 1992; Trivedi ve diğ., 1993).

Sitrinin, depolanan ürünlerde stabil değildir. Artan su aktivitesi ile parçalanma oranının arttığı bulunmuştur (Frank, 1992). Ayrıca uzun süreli olarak ışık ve ısıya maruz kaldığında stabil değildir (Weidenbörner, 2001).

Gama ve X ışını uygulamaları, küf sporlarında mutasyona neden olabilmektedir. Uygulamalar daima mikotoksin oluşumunda azalma ile sonuçlanmıştır (Arora, 1991). Meyvelerin mikotoksin içerikleri üzerine radyasyonun etkisinin incelendiğı bir çalışmada 1,5-3,5 kGy dozunda radyasyon uygulanmıştır. Artan radyasyon dozuna bağılı olarak, küf sayısı ve mikotoksin oluşumunda azalma gözlenmiştir. 5 kGy dozunda ise mikotoksin belirlenmemiştir (Aziz ve Loutfy, 2002).

Kimyasal işlemlerin çoğu mikotoksinler üzerine sınırlı etki göstermektedir. Etkililikleri işleme sıcaklığı ve substratın nem içeriğinden etkilenmektedir. Hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit ya da sodyum bisülfid gibi farklı kimyasallar kullanılabilir. Ancak bu bileşenler ürünün güvenilirliğini etkileyebildiği için pratikte kullanılamamaktadır (Weidenbörner, 2001).

Hidrojen peroksit ve ısıt işlemin, sitrinin detoksifikasyonu üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma yapılmıştır. Hidrojen peroksitin, oda sıcaklığında sitrinin'i detoksifiye ettiği ve hidrojen peroksit ile muamele edilmiş sitrinin'in ısıtılması sonucunda ilave toksik bileşenlerin oluşmadığı belirtilmiştir (Fouler ve diğ., 1994).

Biyolojik işlemler ise küf inhibitörlerinin ya da muhtemel mikotoksin bağlayıcı ajanların ilavesi gibi yöntemleri içermektedir (Weidenbörner, 2001).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Bu çalışmada çekirdeksiz, konserve edilmiş, 2200 gramlık teneke kutularda siyah zeytinler kullanılmıştır.

Zeytinlerin aşılmasında kullanılan *Penicillium citrinum* (CBS-92,1205) Hollanda'daki Kültür Koleksiyonu Merkezi'nden (CBS) tedarik edilmiştir. Küf kültürleri analizler esnasında kullanılıncaya kadar saf kültür halinde yatık Malt Ekstrak Agarda (MEA-Merck-1,05398) +4°C'de muhafaza edilmiştir. *Penicillium* türleri; oda sıcaklığında canlı kalabilirler, ancak mayt enfeksiyonları tehlikesini elimine edebilmek için buzdolabı sıcaklıklarında depolanması tavsiye edilmektedir (Robinson, 2000).

Mikrobiyolojik analizler için kullanılan Dikloran-Bengal-Kloramfenikol Agar (DRBC-CM727) ve peptonlu su (L37) Oxoid firmasından temin edilmiştir.

Araştırmada kullanılan sitrinin standartı (Sigma, C-1017) ithalatçı bir firmadan sağlanmıştır.

Sitrinin miktarının belirlenmesinde, Merck firmasına ait 5721 silikagel G-60, 20x20 cm hazır plakalar kullanılmıştır.

3.2 Metot

Çalışmada kullanılan steril zeytinler, mikroorganizma ve mikotoksin varlığı bakımından test edilip, olumlu sonuçlar alındıktan sonra *Penicillium citrinum* ile aşılmıştır. +4 °C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C de 30 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 6., 8., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde, zeytinler analize alınarak sitrinin oluşumu incelenmiştir. Analizler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın ikinci aşamasında küf ile aşıl原因an zeytinler, saf su, %6 NaCl ve %9 NaCl içeren salamura içinde 30°C sıcaklıkta 30 gün süre ile depolanmıştır. Zeytinlerin

farklı sıcaklık derecelerinde inkübasyonu süresince yapılan mikotoksin analizlerinde sitrinin oluşum miktarının 30°C de en yüksek olduğu belirlendiğinden, bu sıcaklık değeri seçilmiştir. Örnekler belli aralıklarla analize alınarak sitrinin oluşumu incelenmiştir.

3.2.1 Spor süspansiyonunun hazırlanması

+4°C’de muhafaza edilen *P. citrinum* stok kültürlerinden yatık Malt Ekstrak Agar’a (MEA) aşılınmış ve 25°C’de 7 gün süre ile inkübe edilmiştir. Her bir tüpe 5 ml peptonlu su ilave edilerek steril bir öze ile agar yüzeyi kazınmış ve küf sporları sıvıya geçirilmiştir. Tüpler, tüp karıştırıcıda homojenize edildikten sonra aseptik koşullarda steril bir erlene aktarılmıştır. Elde edilen spor süspansiyonu tekrar homojenize edildikten sonra 0,1 ml çözelti steril pipet kullanılarak Thoma lamına aktarılmıştır. Mikroskop altında x40 objektif kullanılarak küf sporları sayılmış ve 10⁶ spor/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

MEA ve peptonlu su bileşimleri aşağıda verilmiştir.

Malt Ekstrak Agar (MEA-Merck-1,05398) :

Agar	20 g
Glukoz	20 g
Malt ekstrak	20 g
Pepton	1 g
Distile su	1 litre

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 48 g tartılarak 1 lt distile su ile çözülmüştür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra, otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrasında tüpler eğimli bir şekilde yerleştirilmiş ve MEA’nın katılaşması beklenmiştir.

Peptonlu su (Oxoid-L37) :

Pepton	10,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Di potasyum hidrojen fosfat	9,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1,5 g
Distile su	1 litre

Bileşimi verilen Oxoid firmasına ait besiyerinden 25 g tartılarak 1 lt distile su ile çözülmüştür. Tüplere 9 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Tüpler otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiştir.

3.2.2 Kavanozların hazırlanması

Aşılama işleminde kullanılacak kavanozlar, kuru sterilizatörde 160°C de 2 saat sterilize edilmiştir.

3.2.3 Zeytinlerin aşılınması

Steril kavanozlar içerisine tartılan zeytinlerin üzerine, hazırlanan spor süspansiyonundan 10⁶ spor/ml olacak şekilde aseptik koşullarda ilave edilmiştir. Çalışmada küf sporları sayım sonucuna göre 50 gr zeytin örneğinin üzerine 3 ml spor süspansiyonundan aşılınmıştır. Daha sonra zeytinler 4°C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C de 30 gün inkübe edilmiştir.

Zeytinde sitrinin oluşum miktarının 30°C de en yüksek değerlerde olduğu belirlendiğinden, çalışmanın ikinci aşamasında 30°C sıcaklıkta farklı ortamlar hazırlanarak uygulamalara devam edilmiştir. Zeytinler, spor süspansiyonu ile aşılandıktan sonra üzerine 100 ml saf su, 100 ml %6 NaCl ve 100 ml %9 NaCl içeren salamura ilave edilmiştir. Küf sporlarının homojen bir şekilde dağılımının sağlanması amacıyla kavanozlar hafifçe çalkalanmıştır. Kavanozların ağzı sıkıca kapatıldıktan sonra 30 günlük inkübasyon uygulanmıştır.

3.2.4 Zeytinde ve salamurada mikrobiyolojik analizler

+4°C de depolanan zeytinde *P. citrinum*’un gelişmesi 60 gün boyunca izlenmiştir.

%6 ve %9 NaCl konsantrasyonunun zeytinde ve salamurada küf gelişimi üzerine etkisini belirlemek amacıyla küf sayımları, inkübasyonun 30. ve 60. günlerinde yapılmıştır. Sayımlar 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Küf sayımları için steril koşullar altında stomacher torbasına 10 g zeytin örneği tartılmıştır. Üzerine %0,05 Tween80 içeren peptonlu sudan 90 ml ilave edilmiş ve stomacherde yüksek devirde 2 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Daha sonra içerisinde %0,05 Tween80 içeren peptonlu sudan 9 ml bulunan tüpler kullanılarak uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır. Önceden hazırlanmış olan Dikloran-Bengal-Kloramfenikol Agar (DRBC) besi ortamına 0,1 ml aktararak drigalski ile yayma

plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 25°C de 5 gün inkübe edildikten sonra sayımlar yapılmıştır.

Salamuralarda yapılan küf sayımında ise, steril koşullarda salamuraadan 1 ml alınmış ve 9 ml Tween 80'li peptonlu su ile uygun dilüsyonlar hazırlanmıştır. Uygun dilüsyonlardan DRBC besi ortamına 0,1 ml aktararak drigalski ile yayma plak yöntemiyle ekim yapılmıştır. Petriler 25°C de 5 gün inkübe edildikten sonra sayımlar yapılmıştır.

DRBC'nin bileşimi aşağıda verilmiştir.

Dikloran-Bengal-Kloramfenikol Agar (DRBC-Oxoid-CM727)

Pepton	5,0 g
Glukoz	10,0 g
Potasyum dihidrojen fosfat	1,0 g
Magnezyum sülfat	0,5 g
Dikloran	0,002 g
Rose Bengal	0,025 g
Agar	15,0 g
Distile su	1 litre

Yukarıda bileşimi verilen hazır besiyerinden 15,75 g tartılarak, 500ml distile su ile çözülmüştür. Agar eriyene kadar kaynar su banyosunda tutulmuştur. Otoklavda 121°C de 15 dakika sterilize edildikten sonra, aseptik şartlarda petrilere dökülmüştür.

3.2.5 Zeytinde kimyasal analizler

3.2.5.1 Nem tayini

Nem miktarı AOAC (1990)'nin 925.40 no.lu metoduna göre tayin edilmiştir.

3.2.5.2 Yağ tayini

Yağ miktarı, AOAC (1990)'nin 948.22 no.lu metoduna göre Soxhelet yöntemiyle tayin edilmiştir. Zeytin örnekleri, 16 saat süreyle hekzan ile ekstrakte edilmiştir. Hekzan döner buharlaştırıcıyla uçurulduktan sonra tartım yapılmış ve üründeki yağ miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5.3 Protein tayini

Protein tayini, AOAC (1990)'nin 950.48 no.lu metoduna göre Kjeldahl yöntemiyle protein tayin cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ancak, yöntemde kullanılan katalizörler, bakır sülfat ve potasyum sülfat olarak modifiye edilmiştir. 420°C'de 30 dakika süre ile yakılan örnekler destile edilmiş ve daha sonra da hidroklorik asit ile titre edilerek sarfiyat bulunmuştur. Sarfiyattan yola çıkılarak azot miktarı, bulunan değerin zeytin için olan çevirme faktörü ile çarpılmasıyla da protein miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5.4 Kül tayini

Kül miktarı tayininde, örnekler 550°C'deki fırında karbon kalıntıları görülmeyinceye ve sabit tartıma ulaşınca kadar yakılmıştır. Elde edilen kül tartılarak miktar tayini yapılmıştır (TSE, 1987).

3.2.5.5 pH tayini

pH ölçümü, pH metre kullanılarak yapılmıştır. Ölçümlerden önce pH metre kalibrasyonu yapılmıştır.

3.2.5.6 Tuz tayini

Tuz tayini için salamuralardan 1 ml alınarak sulandırılmış, %10'luk K₂CrO₄ indikatörlüğünde 0.1 N AgNO₃ ile titre edilmiştir (Fernandez ve diğ., 1997). Zeytinler ise 5 gr tartılıp üzerine 100 ml saf su ilave edilmiş ve ağzı kapatılarak su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Soğuduktan sonra kaba filtre kağıdından süzülerek, süzüntüden 10 ml alınarak yine %10'luk K₂CrO₄ indikatörlüğünde 0.1 N AgNO₃ ile titre edilmiştir. Sonuç NaCl cinsinden % tuz miktarı olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Tuz} = \frac{V \times E \times 100}{M}$$

V: Harcanan 0.1 N AgNO₃ miktarı, ml

E: 0.00585 (1 ml 0.1 N AgNO₃, 0.005844 g NaCl'ye eşdeğerdir.)

M: Titre edilen örneğin gerçek miktarı, g.

3.2.6 Zeytinde ve salamurada mikotoksin analizleri

Penicillium citrinum sporları ile aşılanarak inkübe edilen zeytinden 25 g alınmıştır. Üzerine 180 ml asetonitril, 20 ml %4'lük potasyum klorür ve 2 ml %20'lik sülfirik asit ilave edilerek, Waring marka blender ile yüksek hızda, 2 dakika süre ile parçalanmıştır. Salamura ise doğrudan 25 ml olarak analize alınmıştır. Karışım Whatman No 4 filtre kağıdından süzölmüş (Comerio ve diğ.,1998) ve üzerine 50 ml hekzan eklenerek çalkalayıcıda 15 dakika süre ile çalkalanmıştır . Bu sayede yağın hekzana geçmesi sağlanmıştır.

Ekstrakt ayırma hunisine aktarıldığında, üstte kalan fazda hekzan olup, bu tabaka atılmıştır. Toksin alt fazda tutunmuştur. Bu fazdan 100 ml alınarak 500 ml'lik ayırma hunisine aktarılmıştır. Üzerine 50 ml kloroform ve 25 ml saf su ilave edilerek ekstrakte edilmiştir (Comerio ve diğ., 1998). Elde edilen ekstrakt beherde toplanarak, su banyosunda kuruluğa kadar uçurulmuştur. Kuru ekstrakt 1 ml kloroform ile tüpe aktarılmış ve azot gazı altında kloroform uçurulmuştur.

Çalışmada kullanılan Silicagel G-60 plakalar etanolle hazırlanan % 10'luk glikolik asitte 2 dakika bekletildikten sonra 110°C de 10 dakika kurutulmuştur. Plakalar soğuduktan sonra damlatma işlemine geçilmiştir. Kuru ekstrakt 200 µl kloroform ile çözülmüş ve plaka üzerine mikro pipet kullanılarak damlatılmıştır. Damlatma işlemi sırasında noktalarda fazla dağılma olmamasına özen gösterilmiştir. Daha sonra plaka yürütücü çözeltilinin bulunduğu tank içerisine yerleştirilmiştir. Yürütme işleminde toluen:etil asetat:kloroform:%90'lık formik asit (70:50:50:20) kullanılmıştır. Yürütme işlemi sonrasında plaka kurutulmuş ve 10-15 saniye amonyak buharına tutulmuştur. Sitrinin miktarı, 366 nm UV ışığın altında örnekle standartın göz ile karşılaştırılması suretiyle belirlenmiştir (Martins ve diğ., 2002). Miktar belirlenirken aynı Rf değerine sahip olmaları dikkate alınmaktadır.

Plakaların üzerine damlatma işlemi, alttan 2 cm mesafe bırakılarak, 1,5 cm aralıklarla gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada plakaların metanolle hazırlanmış olan %10'luk okzalik asitte 2 dakika bekletilmesi ve 110°C de 10 dakika kurutularak kullanılması denenmiştir. Ancak yürütme işlemi esnasında kuyruk oluşumu gözlenmiştir.

3.2.7 Sitrinin miktarının hesaplanması

Sitrinin miktarının hesaplanmasında aşağıdaki formülden yararlanılmıştır:

$$\text{Sitrinin } \mu\text{g/kg} = \frac{S \times Y \times V}{W \times Z}$$

S: Plakada örnekle eşit floresans veren sitrinin standartının miktarı (μl)

Y: Sitrinin standartının konsantrasyonu (μg/ml)

V: Kuru ekstraktı çözmek için kullanılan çözücü miktarı (μl)

W: Son ekstraktta bulunan örnek miktarı (g)

Z: Plakada sitrinin standartına eşit floresans veren örnek miktarı (μl)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Küf Sayımları

4.1.1 +4°C de depolanan zeytinlerde küf sayısı

Saf su içerisinde bulunan steril zeytin örnekleri 10^6 spor/ml *P. citrinum* kültürü ile aşılandıktan sonra +4°C de depolanmış ve küfün gelişmesi 60 gün boyunca izlenmiştir. Küfün gelişmesine ait bulgular Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Zeytinde +4°C de *P. citrinum* küfünün gelişmesi (cfu/g).

Süre (gün)	<i>P. citrinum</i> sayısı (cfu/g)*
Başlangıç	3×10^6
45. gün	3×10^5
60.gün	3×10^5

*: İki tekrarın ortalaması.

Zeytinde küf gelişimi, 45. günde görsel olarak tespit edilmemiştir. 60.günde ise küf gelişmesi görsel olarak izlenmiş, ancak sayısında bir artış belirlenmemiştir.

Literatürde de *P. citrinum*’um gelişebilmesi için gereken minimum sıcaklık değeri +5 °C olarak belirtilmektedir (Pitt ve Hocking, 1997). Bulgumuzun literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür.

4.1.2 30°C de inkübe edilen zeytin ve salamurada küf sayısı

%6 ve %9 NaCl içeren salamuralarda bulunan steril zeytin örnekleri 10^6 spor/ml *P. citrinum* kültürü ile aşılandıktan sonra 30°C de inkübe edilmiş ve küfün gelişmesi 60 gün boyunca izlenmiştir. Küfün gelişmesine ait bulgular Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Zeytinde 30°C de *P. citrinum* küfünün gelişmesi (cfu/g).

Süre (gün)	Tuz Konsantrasyonu*	
	%6 NaCl	%9 NaCl
Başlangıç	3×10^6	3×10^6
30. gün	3×10^6	3×10^5
60. gün	3×10^7	4×10^7

*: İki tekrarın ortalaması.

Tablo 4.2’de verilen bulgular incelendiğinde %6 NaCl içeren salamurada bulunan zeytin örneklerinde küf sayısının 30. günde değişmediği, 60. günde hafif bir artış gösterdiği görülmektedir. %9 NaCl içeren salamurada bulunan zeytin örneklerinde küf sayısı 30. günde hafif bir azalma göstermiş, 60. günde ise tekrar artmıştır.

Penicillium citrinum’un %6 ve %9 NaCl içeren salamuralarda gelişiminin incelenmesi amacıyla steril salamura örneklerine 10^6 spor/ml olacak şekilde *P. citrinum* küfü aşılanmış ve küfün gelişimi 60 gün boyunca izlenmiştir. Küfün gelişmesine ait bulgular Tablo 4.3’te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Salamurada 30°C de *P. citrinum* küfünün gelişmesi (cfu/ml).

Süre (gün)	Tuz Konsantrasyonu*	
	%6 NaCl	%9 NaCl
Başlangıç	3×10^6	3×10^6
30. gün	4×10^5	2×10^5
60. gün	5×10^4	3×10^5

*: İki tekrarın ortalaması.

Tablo 4.3 incelendiğinde %6 ve %9 NaCl içeren salamura örneklerinde küf sayısının, 30. ve 60. günlerde yaklaşık olarak aynı miktarda kaldığı görülmektedir.

Zeytin ve salamurada yapılan küf sayımlarında, tuz konsantrasyonunun *P. citrinum*’un gelişmesi üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bulgularımız, Oral ve Heperkan’ın (1999) sonuçları ile uyushmaktadır.

4.2 Kimyasal Analizler

Çalışmada kullanılan konserve siyah zeytinin bileşimini belirlemek amacıyla yapılan kimyasal analizler Tablo 4.4'te görülmektedir.

Tablo 4.4. Konserve zeytinin bileşimi.

Zeytinin Bileşimi	Miktar (%)
Nem	79,1
Yağ	16,8
Protein	1,3
Kül	1,3
pH	6±0,2
Tuz	1,06
Karbonhidrat	1,5

Çalışmanın ikinci aşamasında zeytinler, %6 ve %9 NaCl içeren salamuralarda inkübe edildiğinden zeytinlerin son tuz konsantrasyonlarına da bakılmıştır. %6 NaCl içeren salamura içerisinde bulunan zeytinlerde tuz konsantrasyonu %4,4, %9 NaCl içeren salamura içerisinde bulunan zeytin örneklerinde ise %6,3 olarak tespit edilmiştir.

İçerisinde zeytin örnekleri bulunan saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada yapılan pH ölçümleri Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Salamurada pH ölçümü.

Depolama süresi (gün)	pH ölçümleri*	
	Saf su	%6 NaCl
6	6,52	6,28
8	6,47	6,17
10	6,45	6,26
15	5,87	6,31
20	5,72	6,40
25	5,64	6,48
30	5,84	6,42

*: İki tekrarın ortalaması.

4.3 Mikotoksin Analizleri

4.3.1 Zeytinde farklı sıcaklıklarda yapılan mikotoksin analizleri

Zeytinler *Penicillium citrinum* küfö ile aşılandıktan sonra +4 °C, 20°C, 25°C, 30°C ve 35°C sıcaklık değerlerinde 30 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun 6., 8., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde sitrinin oluşumu incelenmiştir. Sitrinin oluşumuna ait bulgular Tablo 4.6’da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Zeytinde farklı sıcaklık derecelerinde sitrinin oluşumu (ppm).

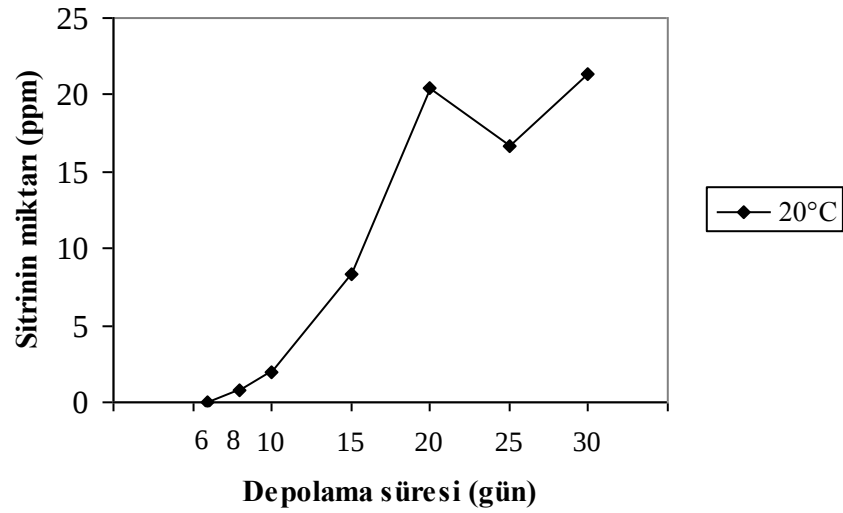
Depolama süresi (gün)	Sitrinin miktarı (ppm)*				
	4°C	20°C	25°C	30°C	35°C
6	0	0,0	0,8	5,4	0
8	0	0,8	4,5	6,6	0
10	0	2,0	10,0	10,8	0
15	0	8,3	15,8	17,1	0
20	0	20,4	29,2	32,5	0
25	0	16,7	27,5	26,7	0
30	0	21,3	35,5	41,7	İz

*: Üç tekrarın ortalaması.

Tablo 4.6’da görüldüğü gibi +4°C de depolanan zeytinlerde, küf gelişmesi ve sitrinin oluşumu belirlenmemiştir. Literatürde de *Penicillium citrinum*’un gelişebilmesi için gereken minimum sıcaklık değeri +5°C olarak belirtilmiştir (Pitt ve Hocking, 1997). Bulgumuzun literatür verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. 35°C de inkübe edilen zeytin örneklerinde ise 25 gün süresince sitrinin’in oluşmadığı, 30. günde iz miktarda oluştuğu tespit edilmiştir. Literatürde sitrinin oluşumu ile ilgili 30°C dışında bir bilgiye rastlanmamıştır.

Çalışmada kullanılan metot ile sitrinin’in geri kazanım oranının belirlenmesi amacıyla 200 ppb sitrinin, zeytin örneklerine eklenmiştir. Bu zeytin örneklerinde yapılan analizde, ortalama sitrinin miktarı 152,5 ppb olarak belirlenmiştir. Buna göre sitrinin’in ortalama geri kazanım değeri %76,3 olarak hesaplanmıştır.

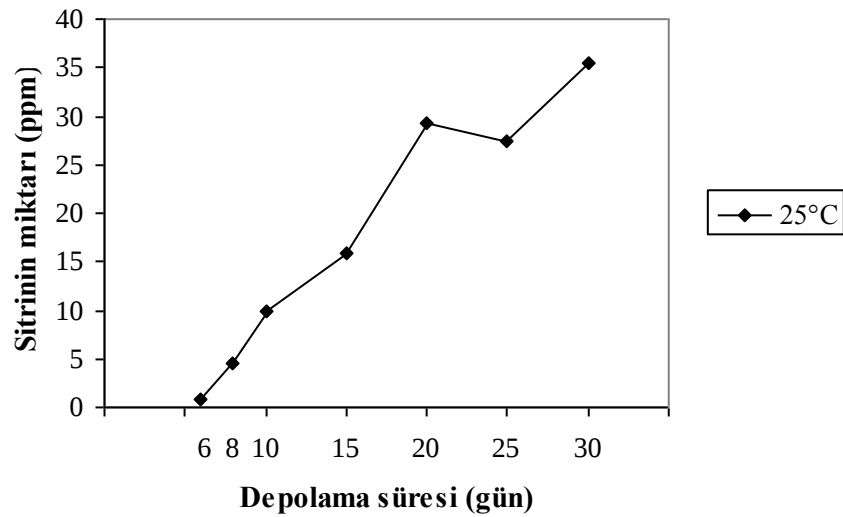
20°C de inkübe edilen zeytin örneklerinde sitrinin oluşumu Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. Zeytinde 20°C de sitrinin oluşumu

20°C de inkübe edilen zeytinlerde sitrinin oluşumunun, 8. günde 0,8 ppm olduğu ve depolamanın 20. gününe kadar sitrinin miktarının artarak 20,4 ppm değerine ulaştığı tespit edilmiştir. Sitrinin miktarının 25.günde 16,7 ppm'e düştüğü, ancak 30. günde tekrar artış gösterdiği belirlenmiştir.

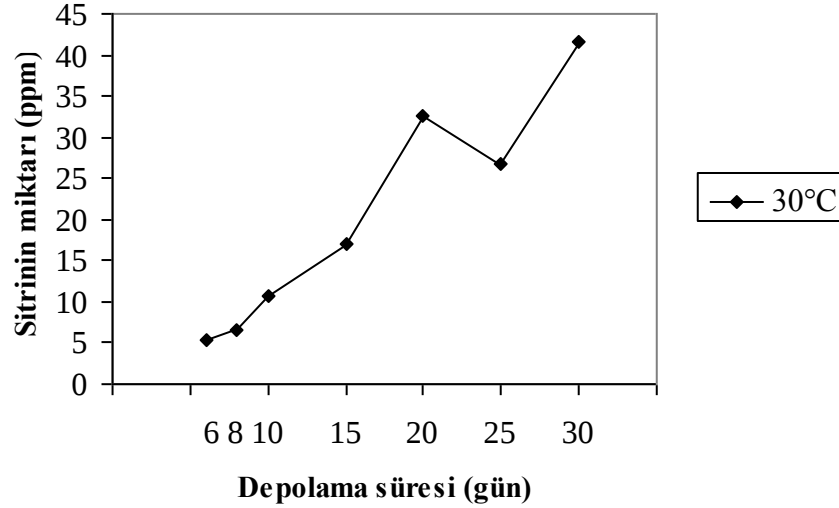
25°C de inkübe edilen zeytin örneklerinde sitrinin oluşumu Şekil 4.2'de görülmektedir.



Şekil 4.2. Zeytinde 25°C de sitrinin oluşumu.

Zeytinlerin 25°C de inkübasyonunun 6. gününde 0,8 ppm olarak tespit edilen sitrinin miktarı zamana bağlı olarak artarak, 20. günde 27,5 ppm değerine ulaşmıştır. 25. günde hafif bir azalma gösterdiği, 30. günde ise 35,5 ppm olarak 20. günde belirlenen miktarın üzerinde bir değere çıktığı gözlenmiştir.

30°C de inkübe edilen zeytin örneklerinde sitrinin oluşumu Şekil 4.3’de görülmektedir.

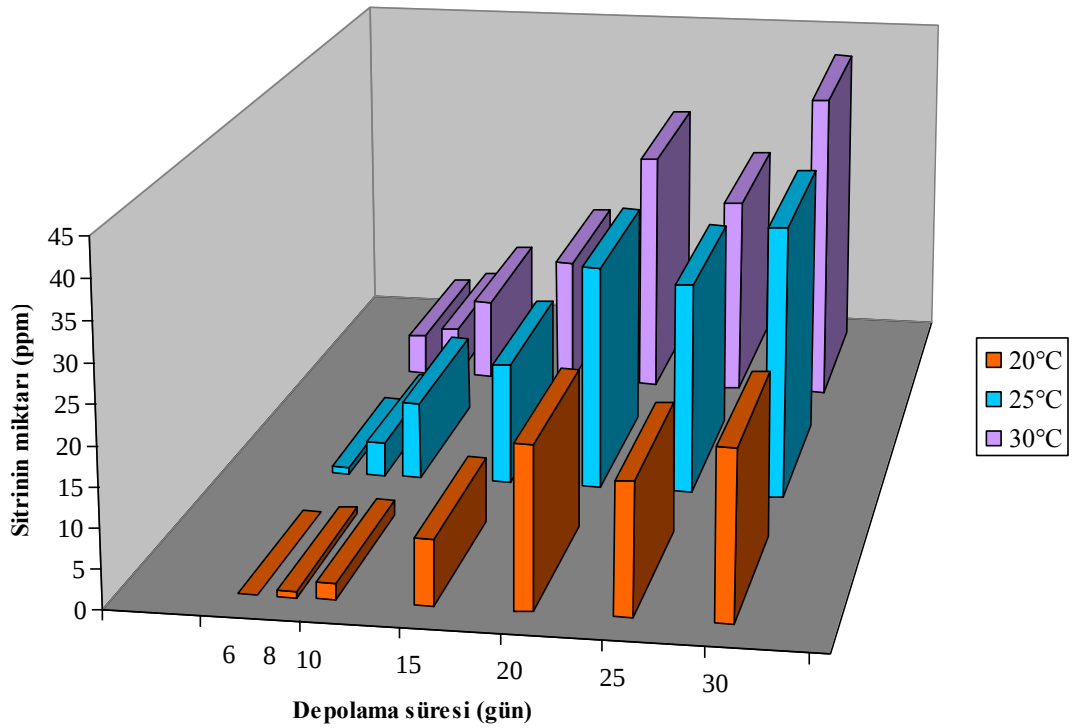


Şekil 4.3. Zeytinde 30°C de sitrinin oluşumu.

30°C de yapılan analizlerde, 6. günde 5,4 ppm olan sitrinin miktarı 20. günde 32,5 ppm’e artmış, 25. günde ise 26,7 ppm değerine düşmüştür. 20°C ve 25°C deki gibi 30°C sıcaklık değerinde de depolamanın 30. gününde sitrinin miktarı tekrar artış göstermiştir. 30. günde belirlenen sitrinin miktarı 41,7 ppm’dir.

4.3.2 30°C de yapılan mikotoksin analizleri

20°C, 25°C ve 30°C de 30 gün inkübe edilen zeytin örneklerinde oluşan sitrinin miktarları Şekil 4.4’te karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.4. Farklı sıcaklıklarda sitrinin oluşumu.

Zeytinde farklı sıcaklıklarda 30 gün inkübasyon süresince oluşan sitrinin miktarlarının karşılaştırıldığı Şekil 4.4 incelendiğinde, 30°C de elde edilen değerlerin daha yüksek olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizde $P \leq 0,05$ olasılık düzeyinde, sıcaklıklar arasındaki farkın önemli olduğu belirlenmiştir (Ek A. Tablo A.1.). Duncan'ın Çoklu Aralık Testi'nde ise 20°C de elde edilen verilerin, 25°C ve 30°C de belirlenen miktarlardan önemli bir şekilde farklı olduğu bulunmuştur. Ayrıca 25°C ve 30°C arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir (Ek A. Tablo A.2.).

Bulgularımız farklı sıcaklıkta inkübe edilen aşılınmış zeytin örneklerinde sitrinin miktarının sıcaklık yükseldikçe arttığını, 30°C de en yüksek değere ulaştığını göstermiştir. Literatürde de sitrinin oluşumu için gerekli olan optimum sıcaklık değerinin 30°C olduğu bildirilmektedir (Frank, 1992; Comerio ve diğ., 1998). Çalışmada elde edilen değerin bu açıdan da literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Literatürde aflatoksin oluşumu için gerekli optimum sıcaklık değeri 24-28°C arasında, okratoksin A oluşumu için ise 30°C olarak belirtilmektedir (Karadeniz ve Ekşi, 2002).

Tablo 4.6'nın incelenmesi ile görüldüğü gibi zeytinde en yüksek sitrinin miktarına 30°C de ulaşılmış olduğundan çalışmanın ikinci aşaması bu sıcaklık derecesinde gerçekleştirilmiştir.

4.3.2.1 Zeytinde 30°C de yapılan mikotoksin analizleri

P. citrinum ile aşılanan zeytinler saf su, %6 NaCl ve %9 NaCl içeren salamura içinde 30°C sıcaklıkta 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 6., 8., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde mikotoksin analizi yapılarak, bu koşulların zeytinde sitrinin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Saf su, %6 NaCl ve %9 NaCl içeren salamura içinde bulunan zeytinlerde belirlenen sitrinin miktarları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

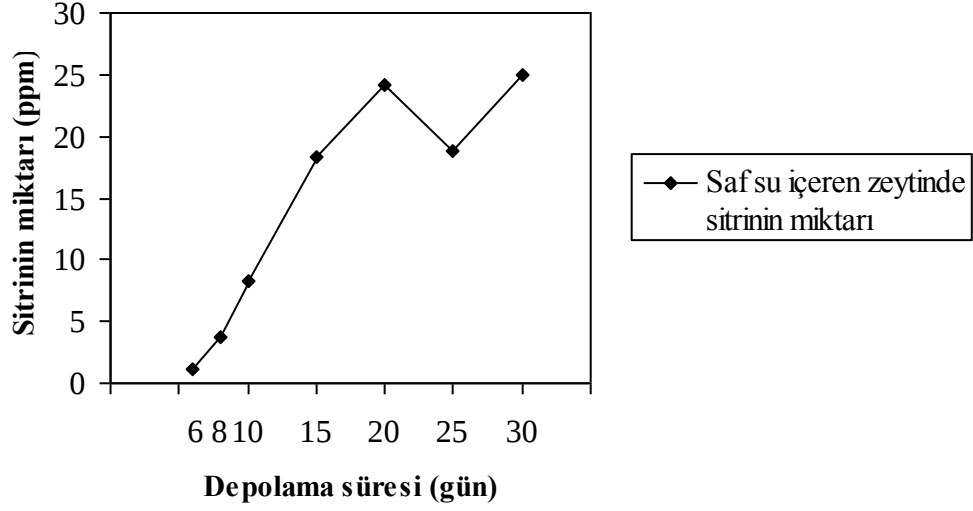
Tablo 4.7. Saf su ve farklı salamuralar içinde bulunan zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu (ppm).

Depolama süresi (gün)	Sitrinin miktarı (ppm)*		
	Saf su	%6 NaCl	%9 NaCl
6	1,2	0	0
8	3,7	0	0
10	8,3	iz	0
15	18,3	0,04	0
20	24,2	0,1	0
25	18,8	0,2	0
30	25,0	0,16	0

*: Üç tekrarın ortalaması.

Tablo 4.7'de verilen bulgular incelendiğinde saf su içerisinde bulunan zeytinde sitrinin miktarının zamana bağlı olarak artış gösterdiği, %6 NaCl içeren zeytinde ise sitrinin oluşumunun 10. günde iz miktarda olduğu ve 30 günlük depolama süresince maksimum 0,2 ppm değerine ulaştığı belirlenmiştir. Ayrıca %9 NaCl içeren salamurada bulunan zeytinlerde ise 30 gün süresince sitrinin oluşumu belirlenmemiştir.

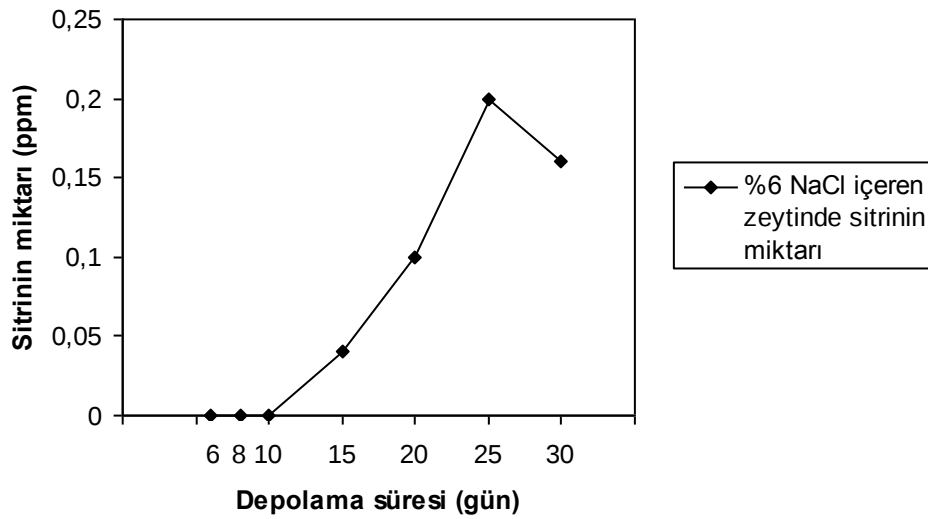
Saf su içerisinde bulunan zeytinlerin 30°C de 30 günlük inkübasyonu süresince sitrinin oluşumu Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. Saf su içerisinde bulunan zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu.

Saf su içerisinde bulunan zeytinde sitrinin miktarının 6. günde 1,2 ppm olduğu, 20 gün süresince bu değerin artarak 24,2 ppm'e ulaştığı görülmektedir. 25. günde 18,8 ppm'e azalan sitrinin miktarının, 30. günde 25 ppm'e arttığı belirlenmiştir.

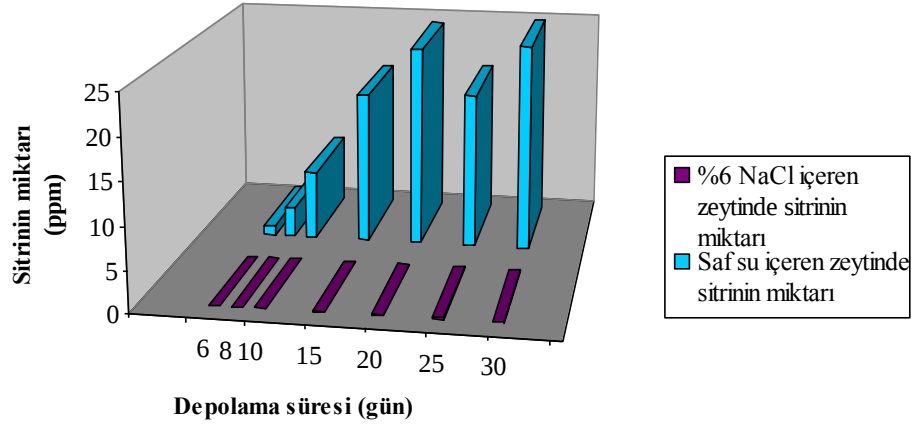
%6 NaCl içeren salamura içerisinde bulunan zeytinlerin 30°C de 30 günlük inkübasyonu süresince sitrinin oluşumu Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6. %6 NaCl içeren salamura içindeki zeytinlerde 30°C de sitrinin oluşumu.

%6 NaCl içeren salamura içerisindeki zeytinlerde 10. günde iz miktarda sitrinin oluşumu gözlenirken, 15. günde 0,04 ppm değeri elde edilmiştir. Depolamanın 25. gününde 0,2 ppm olarak belirlenen sitrinin miktarı, 30. günde de önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Saf su içerisinde ve %6 NaCl içeren salamurada bulunan zeytin örneklerinde yapılan sitrinin analizlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.7. Saf su ve %6 NaCl içeren zeytinde 30°C de sitrinin oluşumu.

Şekil 4.7 incelendiğinde %6 NaCl içeren salamura içindeki zeytinlerde sitrinin oluşum miktarının, saf su içinde bulunan zeytinlerdekilere göre önemli ölçüde az olduğu görülmektedir. Ayrıca Tablo 4.7’de görüldüğü gibi yükselen tuz konsantrasyonuna (%9 NaCl) bağlı olarak sitrinin’in oluşmadığı belirlenmiştir.

%6 ve %9 NaCl içeren salamura içerisinde bulunan aşılanmış zeytin örneklerinin 30°C de 30 gün süre ile inkübe edilmesi sonucunda elde edilen bulgularımız, artan tuz konsantrasyonu ile zeytinde sitrinin oluşumunda azalma sağlandığını göstermiştir.

4.3.2.2 Salamurada 30°C de yapılan mikotoksin analizleri

30°C de 30 günlük inkübasyon süresince zeytinlerin içinde bulunduğu saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada sitrinin oluşumu incelenmiştir. %9 NaCl içeren salamurada bulunan zeytinde sitrinin oluşumu tespit edilmediğinden, bu salamurada sitrinin analizi yapılmamıştır. Saf su ve %6 NaCl içeren salamurada, 30 günlük inkübasyon süresince belirlenen sitrinin miktarları Tablo 4.8’de gösterilmiştir.

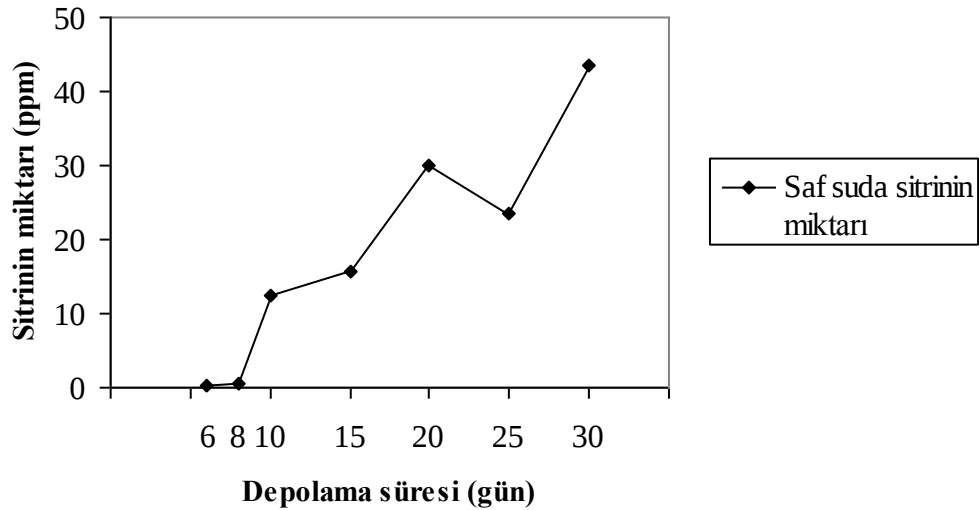
Tablo 4.8. Saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada 30°C de sitrinin oluşumu (ppm).

Depolama süresi (gün)	Sitrinin miktarı (ppm)*	
	Saf su	%6 NaCl
6	0,2	0
8	0,6	0
10	12,5	0
15	15,8	0
20	30,0	0,16
25	23,4	0,37
30	43,4	0,21

*: Üç tekrarın ortalaması.

Tablo 4.8 incelendiğinde 30°C de 30 günlük inkübasyon süresince sitrinin'in, saf suda zamana bağlı olarak artış gösterdiği, %6 NaCl içeren salamurada ise saf suda elde edilen değerlere göre önemli bir azalmanın olduğu görülmektedir.

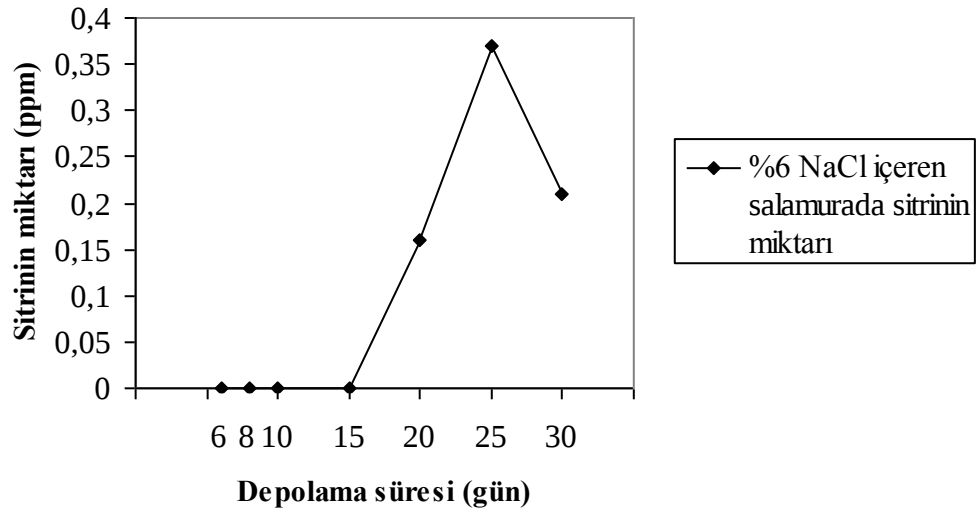
30°C de inkübe edilen zeytinlerin içinde bulunduğu saf suda sitrinin oluşumu Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.8. Saf suda 30°C de sitrinin oluşumu.

30°C de inkübasyonun 6. gününde saf suda 0,2 ppm olan sitrinin miktarı zamanla artış göstererek, 20. günde 30 ppm değerine ulaşmıştır. 25. günde azalan sitrinin miktarı, 30. günde 43,4 ppm değerine yükselmiştir.

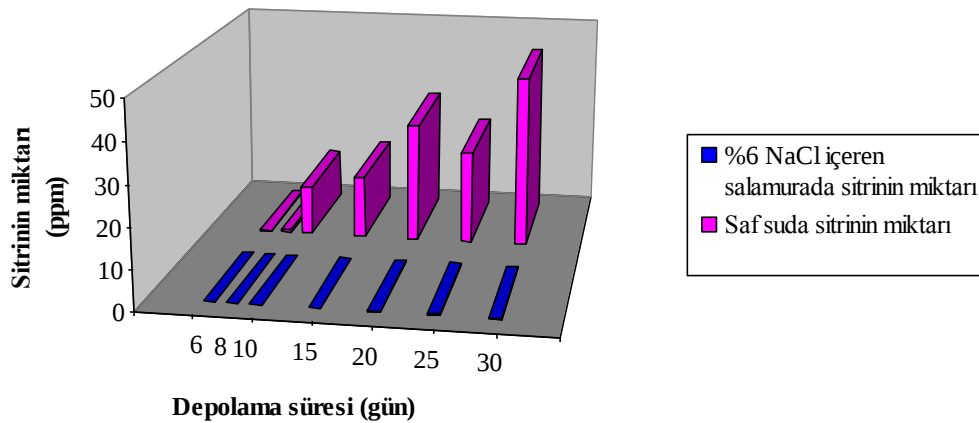
30°C de inkübe edilen zeytinlerin içinde bulunduğu %6 NaCl içeren salamura da sitrinin oluşumu Şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9. %6 NaCl içeren salamura da 30°C de sitrinin oluşumu.

%6 NaCl içeren salamura da 15 günlük inkübasyon süresince sitrinin oluşumu belirlenmemiş, inkübasyonun 20., 25. ve 30. günlerde yapılan analizlerde ise miktarın maksimum 0,37 ppm değerine yükseldiği belirlenmiştir.

İçerisinde zeytin örneklerinin bulunduğu saf suda ve %6 NaCl içeren salamura da yapılan sitrinin analizlerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da karşılaştırılmaktadır.

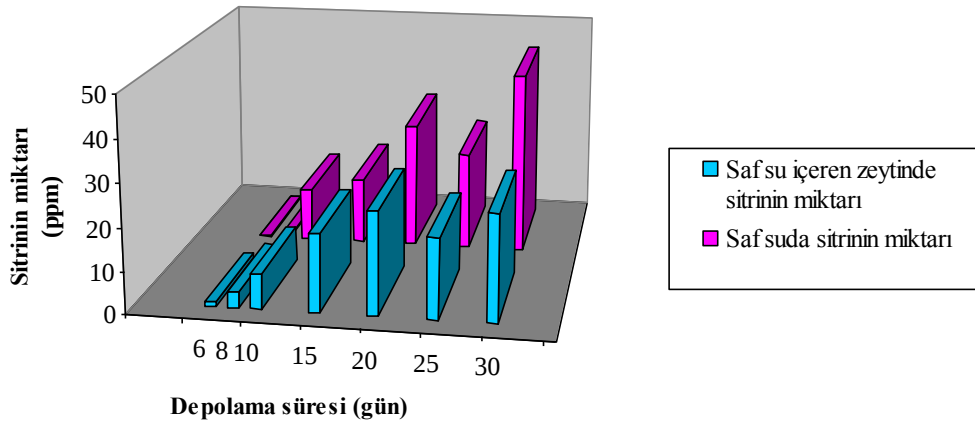


Şekil 4.10. Saf suda ve %6 NaCl içeren salamura da 30°C de sitrinin oluşumu.

Şekil 4.10 incelendiğinde %6 NaCl içeren salamurada belirlenen sitrinin miktarlarının, saf suda tespit edilen değerlere göre önemli ölçüde az olduğu görülmektedir.

4.3.2.3 Zeytin ve salamurada yapılan mikotoksin analizlerinin karşılaştırılması

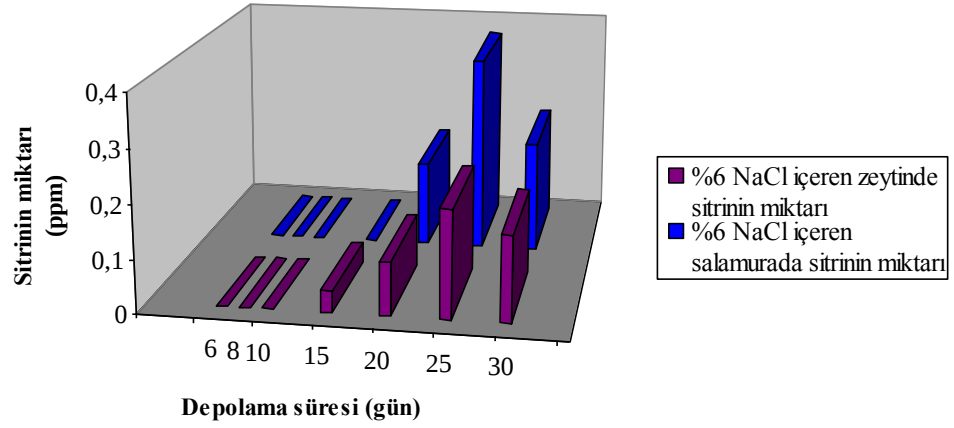
Saf su içerisinde bulunan zeytin örneklerinde ve bu ortamda bulunan saf suda yapılan sitrinin analizlerinden elde edilen bulgular Şekil 4.11’de karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.11. Saf su içeren koşullarda 30°C de sitrinin oluşumu.

Şekil 4.11 incelendiğinde saf su içerisinde bulunan zeytin örneklerinde ve bu saf suda yapılan sitrinin analizlerinde, saf suda zeytine göre daha fazla miktarlarda sitrinin bulunduğu görülmektedir.

%6 NaCl içeren salamura içerisinde bulunan zeytin örneklerinde ve bu ortamda bulunan salamurada yapılan sitrinin analizlerinden elde edilen bulgular Şekil 4.12’de karşılaştırılmaktadır.



Şekil 4.12. %6 NaCl içeren koşullarda 30°C de sitrinin oluşumu.

Şekil 4.12'nin incelenmesi ile görüldüğü gibi %6 NaCl içeren salamuranın bulunduğu koşullarda da salamura içerisinde bulunan sitrinin miktarı, zeytinde belirlenen miktardan daha fazladır.

Bulgularımız içerisinde zeytin örnekleri bulunan saf suda ve %6 NaCl içeren salamurada tespit edilen sitrinin değerlerinin, bu koşullarda bulunan zeytinlerde oluşan sitrinin miktarlarından daha yüksek olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇLAR

Çalışmada 10^6 spor/ml olacak şekilde *Penicillium citrinum* ile aşılanan steril zeytinler $+4^{\circ}\text{C}$, 20°C , 25°C , 30°C ve 35°C de 30 gün süre ile inkübe edilerek, zeytinde sitrinin oluşumu incelenmiştir. İnkübasyonun 6., 8., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde yapılan sitrinin analizlerinde $+4^{\circ}\text{C}$ ve 35°C sıcaklık değerlerinde sitrinin oluşumu tespit edilmemiştir. 20°C , 25°C ve 30°C de inkübe edilen zeytinlerde ise sitrinin'in oluştuğu ve zamana bağlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir. 30°C de inkübe edilen zeytinlerde oluşan sitrinin miktarı, diğer sıcaklık derecelerinde belirlenen miktarlardan daha yüksektir. Literatürde de sitrinin oluşumu için gerekli olan optimum sıcaklık değerinin 30°C olduğu bildirilmektedir (Frank, 1992; Comerio ve diğ., 1998).

$+4^{\circ}\text{C}$ de depolanan zeytinlerde *P. citrinum*'un gelişmesi 60 gün boyunca izlendiğinde, küf gelişiminin 60. günden itibaren görsel olarak oluştuğu ancak sayısal artışın olmadığı belirlenmiştir. Literatürde de *P. citrinum*'un gelişebilmesi için gereken minimum sıcaklık değeri $+5^{\circ}\text{C}$ olarak belirtilmiştir (Pitt ve Hocking, 1997).

P. citrinum'un gelişmesi üzerine tuz konsantrasyonunun etkisi incelenmiştir. %6 ve %9 NaCl içeren zeytin ve salamurada yapılan küf sayımlarında, tuz konsantrasyonunun *P. citrinum*'un gelişmesi üzerine etkisi olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuç, Oral ve Heperkan'ın (1999) bulguları ile uyusmaktadır.

Çalışmanın ikinci aşamasında küf ile aşılanan zeytinler, saf su, %6 NaCl ve %9 NaCl içeren salamura içinde 30°C sıcaklıkta 30 gün süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun 6., 8., 10., 15., 20., 25. ve 30. günlerinde yapılan sitrinin analizlerinde, tuz konsantrasyonunun zeytin ve salamurada sitrinin oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. %6 NaCl içeren zeytin ve salamurada sitrinin oluşumu, saf su içeren koşullara göre önemli miktarda azalmıştır. %9 NaCl konsantrasyonunda ise zeytinde sitrinin oluşumunun olmadığı belirlenmiştir.

Saf su içeren koşullarda zeytinde ve bu ortamda bulunan saf suda yapılan sitrinin analizlerinde, sitrinin miktarlarının saf suda zeytindekine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

%6 NaCl içeren salamuranın bulunduğu koşullarda da salamurada belirlenen sitrinin miktarları, zeytinde tespit edilen değerlerden daha yüksektir.

Çalışmanın; ilk aşamasında elde edilen bulgulara göre %6 ve %9 NaCl konsantrasyonunun zeytinde *P. citrinum*'un gelişimini etkilemediği, ikinci aşamasında elde edilen verilerden ise %6 ve %9 NaCl konsantrasyonunun zeytinde sitrinin oluşumunda azalma sağladığı sonucu çıkartılabilir.

Zeytinde küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun önlenmesi için üretim esnasında sıcaklık ve tuz konsantrasyonu gibi faktörler dikkate alınmalıdır. Klasik yöntemle zeytin üretiminin yerini modern yöntemler almalıdır. Zeytinin hasatından, işlenip tüketilinceye kadar geçen sürede küf gelişimini önleyici koşullar sağlanmalı ve üreticiler bu konuda bilinçlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Abramson D. and Clear R.M.**, 1996. A Convenient Method for Assessing Mycotoxin Production in Cultures of Aspergilli and Penicillia, *Journal of Food Protection*, **59**(6), 642-644.
- Abramson D., Hulasare R., White N.D.G., Jayas D.S. and Marquardt R.R.**, 1999a. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content, *Journ. of Stored Products Research*, **35**, 297-305.
- Abramson D., Usleber E. and Märtlbauer E.**, 1999b. Rapid Determination of Citrinin in Corn by Fluorescence Liquid Chromatography and Enzyme Immunoassay, *Journal of AOAC Intern.*, **82**(6), 1353-1355.
- Abrunhosa L., Paterson R.R.M., Kozakiewicz Z., Lima N. and Venancio A.**, 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes, *Letters in Applied Microbiology*, **32** (4), 240-242..
- Aktan N. ve Kalkan H.**, 2000. Sofralık Zeytin Teknolojisi, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir.
- Anonymous**, 2000. www.dehs.umn.edu/iaq/fungus/penicillium/citrinum.html
- Anonymous**, 2002a. www.fosfa.org/resources/res_seeds_olive.pdf.
- Anonymous**, 2002b. www.fao.org/inpho/vlibrary
- Anonymous**, 2003. www.lfra.co.uk/eman/fsheet3.htm
- AOAC**, 1990. Invert Sugar in Sugars and Sirups: method 923.09, Ch. 44, in *Official Methods of Analysis*, pp.1016-1017, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- Arora D.K.**, 1991. Handbook of Applied Mycology, M. Dekker, New York.
- Aziz N.H. and Moussa L.A.A.**, 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits, *Food Control*, **13**(4-5), 281-288.
- Betina V.**, 1993. Chromatography of Mycotoxins (techniques and applications), Elsevier Science Publishers-Amsterdam, London, New York, Tokyo.
- Begum F. and Samajpati N.**, 2000. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds, *Naturwissenschaften*, **87**, 275-277.
- Chelkowski J.**, 1991. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying Storage, pp. 529-572, Elsevier, Amsterdam.

- Comerio R., Pinto V.E.F. and Vaamonde G.**, 1998. Influence of water activity on *Penicillium citrinum* growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat, *International Journal of Food Microbiology*, **42**, 219-223.
- Doyle M.P., Beuchat L.R. and Montville T.J.**, 1997. Food Microbiology: fundamentals and frontiers, pp.406-415, ASM Press, Washington
- Egmond H.P. and Paulsch W.E.**, 1986. Determination of Mycotoxins, *Pure & App. Chem.*, **58**(2), 315-326.
- Fernandez G.A., Diez F.M.J. and Adans M.R.**, 1997. Table Olives Production and Processing, Chapman & Hall, London
- Fouler S.G., Trivedi A.B. and Kitabatake N.**, 1994. Detoxification of Citrinin and Ochratoxin A by Hydrogen Peroxide, *Journal of AOAC Intern.*, **77**(3), 631-636
- Frank H.K.**, 1992. Citrinin, *Z. Ernährungswiss*, **31**, 164-177.
- Frisvad J.C.**, 1981. Physiological Criteria and Mycotoxin Production as Aids in Identification of Common Asymmetric Penicillia, *Applied and Environmental Microbiology*, **41**, 568-579.
- Frisvad J.C. and Filtenborg O.**, 1983. Classification of Terverticillate Penicillia Based on Profiles of Mycotoxins and Other Secondary Metabolites, *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(6), 1301-1310.
- Gourama H. and Bullerman L.B.**, 1988. Mycotoxin production by molds isolated from Greek-style' black olives, *International Journal of Food Microbiology*, **1**, 81-90.
- Gourama H.**, 1997. Inhibition of Growth and Mycotoxin Production of *Penicillium* by *Lactobacillus* Species, *Lebensmittel*, **30**(3), 279-283.
- Gupta M., Sasmal D., Gupta S.D. and Bagchi G.K.**, 1984. He Patotoxic Effects of Ochratoxin A and Citrinin in Mice, *Ind. J. Pharmac.*, **16**, 238-240.
- Hald B. and Krogh P.**, 1973. Analysis and Chemical Confirmation of Citrinin in Barley, *Journal. of The AOAC*, **56**(6), 1440-1443.
- Hald B., Christensen D.H. and Krogh P.**, 1983. Naturel Occurrence of Mycotoxin Viomellein in Barley and The Associated Quinone-Producing Penicillia, *Applied and Environmental Microbiology*, **46**(6), 1311-1317.
- İ.T.O.**, 1998. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği.
- Karadeniz F. ve Ekşi A.**, 2002. Gıdalarda Mikotoksin Oluşumu ve Azaltılması, *Gıda*, (Temmuz-Ağustos).
- Kitabatake N., Trivedi A.B. and Doi E.**, 1991. Thermal Decomposition and Detoxification of Citrinin under Various Moisture Conditions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39**(12), 2240-2244.
- Kitabatake N., Doi E. and Trivedi A.B.**, 1993. Toxicity evaluation of The mycotoxins, citrinin and och A, using several animal cell lines, *Comparative Pharmacology and Toxicology*, **105**(3), 429-433.

- Korukluoğlu M., Gürbüz O., Uylaşer V., Yıldırım A. ve Şahin İ.**, 2000. Gemlik Tipi Zeytinlerde Mikotoksin Kirliliğinin Araştırılması, *Türkiye 1. Zeytin Sempozyumu*, Uludağ Üniversitesi, Bursa, 6-9 Haziran, 473-479.
- Kpodo K., Serensen A.K. and Jakobsen M.**, 1996. The occurrence of mycotoxins in fermented maize products, *Food Chemistry*, **56**(2), 147-153.
- Krejci M.E., Bretz N.S. and Koechel D.A.**, 1996. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]_{plasma}, *Toxicology*, **106**, 167-177.
- Krogh P.**, 1987. Mycotoxins in Food, pp. 24-187, Academic Press, Inc..
- Luh B.S. and Woodroof J.G.**, 1988. Commercial Vegetable Processing, 2nd ed., pp. 480-491, AVI book, van Nostrand Reinhold, New York.
- Lund B.M., Baird-Parker T.C. and Gould G.W.**, 2000. The Microbiological Safety and Quality of Food 1, pp. 696-701, Aspen Publishers, Gaithersburg..
- Martins M.L., Gimeno A., Martins H.M. and Bernardo F.**, 2002. Co-occurrence of patulin and citrinin in Portuguese apples with rotten spots, *Food Additives and Contaminants*, **19**(6), 568-574.
- Meriç B. ve Heperkan D.**, 2001. Penicillium cinsi bazı küflerin mikotoksin oluşturma özelliklerinin zeytinde incelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Miller J.D. and Trenholm H.L.**, 1994. Compounds other Than Aflatoxin, pp. 263-265, Eagan Press, St. Paul, MN, USA
- Odhav B. and Naicker V.**, 2002. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers, *Food Additives and Contaminants*, **19**(1), 55-61.
- Oral J. ve Heperkan D.**, 1999. *Lactobacillus Plantarum*'un Penicillium Mikotoksinlerine Etkisinin Zeytinde İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Pfohl-Leszkowicz A., Petkova-Bocharova T., Chernozemsky I.N. and Castegnaro M.**, 2002. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins, *Food Additives and Contaminants*, **19**(3), 282-302.
- Pitt J.I. and Hocking A.O.**, 1997. Fungi and Food Spoilage, 2th ed, pp. 252-255, Academic Press, Sydney.
- Reddy R.V., Mayura K., Hayes A.W. and Berndt W.O.**, 1982. Embryocidal, teratogenic and fetotoxic effects of citrinin in rats, *Toxicology*, **25**(2-3), 151-160
- Robinson R.K.**, 2000. Encyclopedia of Food Microbiology, Academic Press, UK.
- Sabater-Vilar M., Maas R.R.M. and Fink-Gremmels J.**, 1999. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination, *Mutation Research*, **444**, 7-16.

- Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O.**, 1996. Introduction to Food-Borne Fungi, 5th ed., pp. 140-141, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Sweeney M. and Dobson A.D.W.**, 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology*, **43**, 141-158.
- Shu P.Y. and Lin C.H.**, 2002. Simple and Sensitive Determination of Citrinin *Monascus* by GC-Selected Ion Monitoring Mass Spectrometry, *Analytical Sciences*, **18**, 283- 287.
- Sinha K.K. and Bhatnagar D.**, 1998. Mycotoxins in Agriculture and Food Safety, pp. 139-148, Marcel Dekker, New York.
- Taydaş E.E. ve Aşkın O.**, 1995. Kırmızı Biberlerde Aflatoksin Oluşumu, *Gıda*, **20**(1), 3-8.
- Thacker H.L., Carlton W.W. and Sansing G.A.**, 1977. Citrinin mycotoxicosis in the guinea-pig, *Food and Cosmetics Toxicology*, **15**(6), 553-561.
- Trucksess M. W.**, 2000. Committee on Natural Toxins, *Journal of AOAC Intern.*, **83**(2), 442-448.
- Trucksess M. W. and Pohland A.E.**, 2000. Mycotoxin Protocols, pp. 195-203, Totowa, N.J:Humana Press.
- Trivedi A., Doi E. and Kitabatake N.**, 1992. Cytotoxicity of Citrinin Heated at Temperatures above 100°C, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**(3), 423-426.
- Trivedi A.B., Hirota M., Doi E. and Kitabatake N.**, 1993. Formation of New Toxic Compound, Citrinin H1, from Citrinin on Mild Heating in Water, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2167-2171.
- TS-774**, 1993. Sofralık Zeytin Standardı, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- TS 2131**, 1987. Baharat-Toplam Kül Miktarı Tayini, *Türk Standartları Enstitüsü*, Ankara.
- Vázquez B., Fente C., Franco C.M., Vázquez M.J. and Cepeda A.**, 2001. Inhibitory effect of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese, *International Journal of Food Microbiology*, **67**, 157-163.
- Vrabcheva T., Usleber E., Dietrich and Mártlbauer E.**, 2000. Co-occurrence of Ochratoxin A and Citrinin in Cereals from Bulgarian Villages with a History of Balkan Endemic Nephropathy, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 2483-2488.
- Vries J.D.**, 1997. Food Safety and Toxicity, pp. 25-29, Boca Raton: CRC Press.
- Weidenbörner M.**, 2001. Encyclopedia of Food Mycotoxins, Springer, Berlin, New York.
- Wilson D.M., Tabor W.H. and Trucksess M.W.**, 1976. Screening Method for Detection of Aflatoxin, Ochratoxin, Zeralenone, Penicillic Acid, and Citrinin, *Journal of The AOAC*, **59**(1), 125-127.

- Wild, D.**, 2000. Red mould rice (angkak). Analysis and detection in meat products, *Fleischwirtschaft*, **80**(10), 91-93.
- Wood B.J.B.**, 1998. Microbiology of Fermented Foods, 2nd ed., pp.59-67, Blackie Academic and Professional, UK.
- Wijnands L.M. and Leusden F.M.**, 2000. An overview of adverse health effects caused by mycotoxins and bioassays for their detection, *Ruksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu*, **RIVM Report-257852004**.

EK A: İSTATİSTİK HESAP TABLOLARI

Tablo A.1. Farklı sıcaklık dereceleri için varyans analizi

V.K.	S.D.	S.S.	M.S.	F _o
Sıcaklık	2	394,5	197,3	23,2
Süre	6	2656,1	442,7	
Hata	12	101,6	8,5	
Toplam	20	3152,2		

α : 0,05

Tablo A.2. Duncan'ın çoklu aralık testi

Sıcaklık	Ortalamalar
20°C	9,93 _b
25°C	17,61 _a
30°C	20,11 _a

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul’da doğmuştur. 1995 yılında Fatih Kız Lisesi’nden mezun olmuştur. Lisans öğrenimini Trakya Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde fakülte ikincisi olarak tamamladıktan sonra 2000 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü’nde Yüksek Lisans çalışmasına başlamıştır.