

**GEMLİK ÇEŞİDİ SİYAH SOFRALIK ZEYTİNLERİN DOĞAL
FERMANTASYONLARINDA YER ALAN MAYALARIN VE
TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF YEASTS AND THEIR
TECHNOLOGICAL PROPERTIES IN NATURAL
FERMENTATIONS OF GEMLIK CULTIVAR BLACK TABLE
OLIVES**

GAMZE NUR MÜJDECİ

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2012

GEMLİK ÇEŞİDİ SİYAH SOFRALIK ZEYTİNLERİN DOĞAL FERMANTASYONLARINDA YER ALAN MAYALARIN VE TEKNOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Gamze Nur Müjdeci

ÖZ

Bu araştırmada ilk olarak; Manisa/Akhisar ve Bursa/İznik yörelerinde yetişen Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarında bulunan maya ve laktik asit bakteri popülasyonlarındaki değişimler incelenmiştir. Çalışmada her iki yöreye ait zeytinler ile bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşları, API ID 32C (bioMérieux, Fransa) sistemi ve ek bazı tanımlama testleri uygulanarak tanımlanmışlar, daha sonra bu suşlardan bazıları RFLP-PZR yöntemi ve dizi analizi ile doğrulanmışlardır. Araştırmada izole edilen toplam 100 maya izolatinin 74 tanesi kesin olarak tanımlanabilmiştir. Tanımlanabilen suşların; *Candida*, *Kloeckera*, *Aerobasidium*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Clavispora*, *Zygosaccharomyces* ve *Saccharomyces* cinslerine ait oldukları belirlenmiştir. Çalışmada; bazı maya suşlarının sofralık zeytin üretimi açısından önemli olabilecek belirli teknolojik özellikleri de incelenmiş ve bu amaçla farklı sıcaklıklarda, düşük pH değerlerinde, yüksek tuz derişimlerinde gelişebilme, asetik asit ve hidrojen sülfür üretme, çeşitli şekerleri fermente ve asimile edebilme, oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme, sitrik asiti kullanabilme, katalaz, killer, proteolitik, lipolitik ve pektolitik aktivite testleri yapılmış ve suşların enzim profilleri de araştırılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda, sofralık zeytin üretiminde destek starter olarak kullanılabileceği düşünülen *C. hellenica* türüne ait AZ-1, AF1-6, AF28-4, AF84-1, suşları ile *P. anomala*; BZ-1, BZ-4, BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2, BF63-2 suşlarının; 10-37°C' ler arasında gelişebildikleri, pH 2.5, %16 tuz derişimi ve %0.5 zeytin yaprağı özütü içeren ortamda bulunan fenolik bileşenlere karşı dayanıklı oldukları saptanmıştır. Ayrıca bu suşların; β -glukosidaz, katalaz, lipolitik ve killer aktivitelerine sahip oldukları, sitrik asiti asimile edebildikleri ve zeytinde bulunan başlıca şekerleri de fermente edebildikleri belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Zeytin, Gemlik zeytini, endojen maya, doğal fermantasyon, tanımlama, teknolojik özellik, RFLP-PZR.

Danışman: Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü.

INVESTIGATION OF YEASTS AND THEIR TECHNOLOGICAL PROPERTIES IN NATURAL FERMENTATION OF GEMLIK CULTIVAR BLACK TABLE OLIVES

Gamze Nur Müjdecı

ABSTRACT

In this research, firstly, the variations of the lactic acid bacteria and yeast populations of Gemlik cultivar olives which were grown in Manisa/Akhisar and Bursa/Iznik regions, were investigated. In the study, the yeasts isolated from olives belong to both regions and from their fermentation media were identified with API ID 32C (bioMérieux, Fransa) system and some additional identification tests. Then, some of the strains were confirmed by RFLP-PCR and sequence analysis. Seventy four out of 100 yeasts, isolated in the study could be identified. It was determined that the strains which could be identified were belong to the genera; *Candida*, *Kloeckera*, *Aerobasidium*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Clavispora*, *Zygosaccharomyces* and *Saccharomyces*. In the study, various technological properties of some yeast strains, which could be important for black table olive production, were also determined and for this purpose, growth at different temperatures, low pH and high salt concentrations, acetic acid and hydrogen sulphide productions, assimilation and fermentation of various sugars, utilization of oleuropein as an energy and carbon source, utilization of citric acid, catalase, killer, proteolytic, lipolytic and pectolytic activities were searched. Additionally, enzymatic profiles of determined yeast strains were also investigated. As a result; *C. hellenica* AZ-1, AF1-6, AF28-4, AF84-1 strains and *P. anomala* BZ-1, BZ-4, BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2, BF63-2 strains, which it was thought that they have potential to be used as adjunct starter culture in olive production, were found to grow between 10-37°C, resistant to pH 2.5, 16% NaCl concentration and to phenolic compounds in the medium containing 0.5% olive leaf extract. Additionally, it was determined that these strains have β -glucosidase, catalase, lipolytic and killer activities and they have ability to assimilate citric acid and also ferment major sugars found in olives.

Key words: Olive, Gemlik olive, endogenic yeast, natural fermentation, identification, technological characteristic, RFLP-PCR

Advisor: Prof. Dr. Z. Yeşim zbaş, Hacettepe University, Food Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile beni yönlendiren ve her zaman yakın ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Z. Yeşim Özbaş' a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Araştırmayı 010D12602004 no.lu proje ile destekleyen Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne,

Fabrikada çalışma olanağı sağlayan, zeytin örneklerini temin ederek destek olan; Antgıda A.Ş.-Fora Zeytinleri Firması' na, üretim mühendisleri Reyhan Kabahasan ve Osman Akbulut' a ve Antgıda A.Ş.-Fora Zeytinleri Firması çalışanlarına,

Çalışma sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Dr. Şule Şenses Ergül'e

Maya izolatlarının moleküler esaslı tekniklerle tanımlanmaları sırasındaki bana sağladıkları imkanlardan dolayı İspanya/Ciudad Real/ Castilla La Mancha Üniversitesi Gıda Bilimi Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Dr. Maria Arevalo Villena ve Dr. Sheila Romo Sanchez' e

Çalışma'ya zeytin yaprağı ekstraktı temin ederek katkıda bulunan Kale Naturel Bitkisel Ürün Gıda Kozmetik ve Tarım Ürünleri'ne,

Tezimin başından sonuna kadar sürekli yardım, destek ve güç aldığım sevgili eşim Emre Kara'ya, hayatımın her aşamasında olduğu gibi tez çalışmam sırasında da beni yalnız bırakmayan, yakın ilgileri, sonsuz sevgileri ve güvenleri ile beni her zaman destekleyen babam Bekir Müjdecı, annem Mübeccel Müjdecı, kardeşim A. Gafur Müjdecı' ye, çalışmam sırasında verdiği destekle dostluğunu hiçbir zaman esirgemeyen Bengi Özkahraman'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	5
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Materyal	28
3.1.1. Zeytin örnekleri.....	28
3.1.2. Maya suşları	28
3.1.3. Maya tanımlama sistemi.....	28
3.1.4. API-ZYM test sistemi	29
3.1.5. Besiyerleri ve dilüsyon sıvısı	29
3.1.6. Araştırmada kullanılan tampon, boya ve diğer çözeltiler	31
3.1.7. Kesim enzimleri	32
3.1.8. Moleküler tanımlamada kullanılan ısı döngü cihazı ve yatay elektroforez sistemi	32
3.1.9. Jel görüntüleme sistemi.....	33
3.2. Metot	33
3.2.1 Doğal fermantasyon yolu ile sofralık zeytin üretimi ve numune alımı	33
3.2.2. Zeytin Örneklerine Uygulanan Bazı Kimyasal Analizler	34
3.2.3. Fabrikada zeytin örneklerine uygulanan bazı analizler	34
3.2.4. Mikrobiyolojik analizler.....	35
3.2.4.1. Laktik Asit Bakterisi sayımı	35

3.2.4.2. Maya sayımı ve izolasyonu	35
3.2.5. Maya izolatlarının API ID 32C sistemi ile tanımlanmaları	36
3.2.6. Maya izolatlarının uygulanan ek testlerle tanımlanmaları	36
3.2.6.1. Sıvı besiyerinde gelişme	37
3.2.6.2. Mikroskopik morfoloji	37
3.2.6.3. Makroskopik morfoloji	37
3.2.6.4. Glukoz fermantasyonu	38
3.2.6.5. Üre hidrolizi	38
3.2.6.6. Nitrat asimilasyonu	38
3.2.6.7. 37°C' de gelişme	39
3.2.6.8. Yüksek şeker derişimlerinde gelişme	39
3.2.6.9. Asetik aseti tolere edebilme	40
3.2.6.10. Pseudohif oluşturma	40
3.2.6.11. Askospor oluşturma	40
3.2.7. Maya izolatlarının moleküler esaslı yöntemlerle tanımlanmaları	41
3.2.7.1. DNA izolasyonu	41
3.2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
3.2.7.3. Kesim parçası uzunluk çeşitliliği	43
3.2.7.4. Dizi analizi	44
3.2.8. Maya suşlarının zeytincilik açısından önemli bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi	44
3.2.8.1. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme	45
3.2.8.2. Düşük pH değerlerinde gelişebilme	45
3.2.8.3. Yüksek tuz derişiminde gelişebilme	45
3.2.8.4. Asetik asit üretimi	46
3.2.8.5. Hidrojen sülfür üretimi	46
3.2.8.6. Lipolitik aktivitenin belirlenmesi	46
3.2.8.7. Çeşitli şekerlerin fermantasyon ve asimilasyonları	47
3.2.8.8. Enzim profillerinin belirlenmesi	47
3.2.8.9. Oleuropeini kullanma	48
3.2.8.10. Sitrik asiti kullanma	49
3.2.8.11. Katalaz aktivitesi	49
3.2.8.12. Killer aktivite	50

3.2.8.13. Proteolitik aktivite	50
3.2.8.14. Pektolitik aktivite	51
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	52
4.1. Zeytin örneklerine ait bazı kimyasal analiz sonuçları	52
4.2. Zeytin örneklerindeki Laktik Asit Bakteri sayılarının belirlenmesine ilişkin sonuçlar	56
4.3. Zeytin örneklerindeki maya sayılarının belirlenmesine ilişkin sonuçlar.....	60
4.4. Maya izolatlarının tanımlanmalarına ilişkin sonuçlar	64
4.5. Tanımlamaları yapılan maya izolatlarının ait oldukları cins özelliklerine ilişkin değerlendirme sonuçları.....	85
4.5.1. <i>Candida</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları.....	85
4.5.2. <i>Pichia</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları	92
4.5.3. <i>Kloeckera</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları	94
4.5.5. <i>Saccharomyces</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları.....	97
4.5.7. <i>Zygosaccharomyces</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları	100
4.5.8. <i>Debaryomyces</i> cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları	101
4.5.10. <i>Aerobasidium</i> cinsi izolatlara ait değerlendirme sonuçları	102
4.6. Maya suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar ...	103
4.6.1. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar	104
4.6.2. Farklı pH değerlerinde gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar.....	108
4.6.3. Yüksek tuz derişiminde gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar	112
4.6.4. Asetik asit üretme özelliğinin incelendiği analizlere ilişkin sonuçlar	116
4.6.5. Hidrojen sülfür üretme özelliğinin incelendiği analizlere ilişkin sonuçlar ...	117
4.6.6. Lipolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	120
4.6.7. Çeşitli şekerleri fermente ve asimile edebilme analizlerine ilişkin sonuçlar	122
4.6.8. Enzim profillerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	130
4.6.9. Oleuropeini kullanabilme analizlerine ilişkin sonuçlar	137

4.6.10. Sitrik asiti kullanabilme özelliklerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	138
4.6.11. Katalaz aktivitesinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar.....	142
4.6.12. Killer aktivite ve killer toksine duyarlılık analizlerine ilişkin sonuçlar	143
4.6.13. Proteolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	147
4.6.14. Pektolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar	148
5. SONUÇ	150
KAYNAKLAR.....	157
EK 1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ	166
EK 2. ARAŞTIRMADA KULLANILAN TAMPON, BOYA VE DİĞER ÇÖZELTİLER.....	172
EK 3. MOHR YÖNTEMİ İLE TUZ MİKTARININ HESAPLANMASI	175
EK 4. LAKTİK ASİT CİNSİNDEN SERBEST ASİTLİK MİKTARININ HESAPLANMASI	176
EK 5. MAYA KÜLTÜRLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ.....	177
EK 6. MAYA İZOLATLARININ RFLP-PZR KESİM PROFİLLERİNE İLİŞKİN BAZI SONUÇLAR	182
EK 7. MAYA SUŞLARINA AİT BAZI ENZİM PROFİLİ TEST SONUÇLARI.....	187
EK 8. BAZI MAYA SUŞLARINA AİT BIGGY AGARDA GÖZLENEN H ₂ S ÜRETME ÖZELLİKLERİ.....	188
ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

Şekil 2.1. Oleuropein'in yapısal formülü	7
Şekil 2.2. Oleuropeinin enzim ve alkali uygulaması ile hidrolizi	8
Şekil 2.3. İspanyol tipi sofralık zeytin üretim akım şeması	10
Şekil 2.4. Kaliforniya tipi sofralık zeytin üretim akım şeması	11
Şekil 2.5. Doğal fermente sofralık zeytin üretim akım şeması	12
Şekil 3.1. Gemlik tipi siyah zeytinden doğal fermente sofralık zeytin üretimi	34
Şekil EK 5.1. <i>C. hellenica</i> 'nın mikroskopik morfolojisi	177
Şekil EK 5.4. <i>K. apiculata</i> 'nın mikroskopik morfolojisi	178
Şekil EK 5.5. <i>C. pelliculosa</i> 'nın mikroskopik morfolojisi	179
Şekil EK 5.6. <i>P. anomala</i> 'nın askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi	179
Şekil EK 5.7. <i>S. cerevisiae</i> 'ni askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi ...	180
Şekil EK 5.8. <i>C. pelliculosa</i> 'nın askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi	180
Şekil EK 5.9. <i>D.hansenii</i> 'nin askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi	181
Şekil EK 5.10. <i>A. pullulans</i> 'in pseudohif besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (PDA, 25°C-18 gün, X40)	181
Şekil EK 6.1 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	182
Şekil EK 6.2 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	182
Şekil EK 6.3 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	183
Şekil EK 6.4 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	183
Şekil EK 6.5 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	184
Şekil EK 6.6 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	184
Şekil EK 6.7 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	185
Şekil EK 6.8 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	185

Şekil EK 6.9 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	186
Şekil EK 6.10 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri.....	186
Şekil EK 7.1 API-ZYM ile belirlenen enzim profillerinde gözlenen renk reaksiyonları.	187
Şekil EK 7.2. Maya suşlarının H ₂ S üretme özelliklerine ilişkin bazı sonuçlar.....	188



Çizelge 2.1. Doğal fermente sofralık zeytin fermantasyonunda yer alan mayaların bazı teknolojik özellikleri	17
Çizelge 4.1. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca tuz, serbest asitlik ve pH değerlerinin değişimleri	53
Çizelge 4.2. İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca tuz, serbest asitlik ve pH değerlerinin değişimleri	54
Çizelge 4.3. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytininin doğal fermantasyonu boyunca LAB sayısındaki değişim	57
Çizelge 4.4. İznik yöresine ait Gemlik zeytininin doğal fermantasyonu boyunca LAB sayısındaki değişim	58
Çizelge 4.5. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytininin doğal fermantasyonu boyunca maya sayısındaki değişim	61
Çizelge 4.6. İznik yöresine ait Gemlik zeytininin doğal fermantasyonu boyunca maya sayısındaki değişim	62
Çizelge 4.7. Akhisar ve İznik Gemlik zeytinleri ile bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türleri ve izolat sayıları	66
Çizelge 4.8. Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerinin API ID 32C asimilasyon test sonuçları*	67
Çizelge 4.9. İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerinin API ID 32C asimilasyon test sonuçları.....	68
Çizelge 4.10. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya izolatlarının API ID 32C test sistemi ile belirlenen tanımlama sonuç, düzey ve yüzdeleri ile ek testler birlikte belirlenen tanımlama sonuçları.....	69
Çizelge 4.11. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya izolatlarının API ID 32C test sistemi ile belirlenen tanımlama sonuç, düzey ve yüzdeleri ile ek testler birlikte belirlenen tanımlama sonuçları.....	71
Çizelge 4.12. Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerine uygulanan bazı ek tanımlama testlerinin sonuçları	73
Çizelge 4.13. İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerine uygulanan bazı ek tanımlama testlerinin sonuçları.....	74

Çizelge 4.14. API ID32C ve ek testlerle tanımlanan Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya izolatlarının moleküler doğrulama ile birlikte kesin tanımlama sonuçları	77
Çizelge 4.15 API ID32C ve ek testlerle tanımlanan İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya izolatlarının moleküler doğrulama ile birlikte kesin tanımlama sonuçları	78
Çizelge 4.16. RFLP-PZR yöntemi ile doğrulanan maya izolatlarının <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i> ve <i>HpaII</i> enzimleri ile elde edilen kesim profilleri.....	79
Çizelge 4.17. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişebilmelerine ilişkin sonuçlar	106
Çizelge 4.18. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişebilmelerine ilişkin sonuçlar	107
Çizelge 4.19. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının düşük pH değerlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları	110
Çizelge 4.20. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının düşük pH değerlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları.....	111
Çizelge 4.21. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının yüksek tuz derişimlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları	114
Çizelge 4.22. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının yüksek tuz derişimlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları	115
Çizelge 4.23. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının H ₂ S üretme özelliklerine ilişkin test sonuçları.....	118
Çizelge 4.24. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının H ₂ S üretme özelliklerine ilişkin test sonuçları.....	119
Çizelge 4.25. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının şeker fermantasyonu özelliklerine ilişkin test sonuçları	123
Çizelge 4.26. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının şeker fermantasyonu özelliklerine ilişkin test sonuçları.....	124
Çizelge 4.28. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ID 32C asimilasyon test sonuçları	128
Çizelge 4.28. Devam ediyor.....	129
Çizelge 4.29. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ZYM enzim profillerine ilişkin sonuçlar.....	131

Çizelge 4.31. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının sitrik asit asimilasyonu testlerine ilişkin sonuçlar.....	139
Çizelge 4.32. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının sitrik asit asimilasyonu testlerine ilişkin sonuçlar	140
Çizelge 4.33. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının killer aktivitelerine göre fenotiplendirilmeleri	144
Çizelge 4.34. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının killer aktivitelerine göre fenotiplendirilmeleri	145



1. GİRİŞ

Fermente sebzeler arasında sofralık zeytin üretiminin uluslararası gıda pazarında önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Son beş yılda alınan verilere göre, dünyada yıllık sofralık zeytin üretiminin 2 milyon ton olduğu, bunun 1.4 milyon tonunun Avrupa Birliği ülkeleri tarafından üretildiği belirtilmektedir. Dünyada sofralık zeytin üreten Avrupa Birliği ülkelerinin başında İspanya' nın geldiği, bunu Yunanistan ve İtalya' nın izlediği ifade edilmektedir. Avrupa Birliği ülkeleri dışında Türkiye, Mısır, Suriye, Arjantin ve Fas'ın da dünyada önemli sofralık zeytin üreticileri arasında yer aldıkları belirtilmektedir. Türkiye' de yıllık üretilen sofralık zeytinin, dünya piyasasındaki zeytin üretiminin %16.4' ünü kapsadığı rapor edilmektedir (Botta and Cocolin, 2012).

Türkiye'de, mevcut tarım alanlarının %2.7' sini zeytinliklerin oluşturduğu, yetiştirilen zeytinlerin %20' sinin sofralık olarak değerlendirildikleri bilinmektedir (Güceyü ve Başoğlu, 2010). Ülkemizde sofralık zeytin olarak tüketilen ve en geniş yayılım alanına sahip olan türümüzün Tirilye, Kaplık ve Kıvırcık Kara olarak da bilinen "Gemlik" çeşidi olduğu ve bu türün Marmara, Ege, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinde yetiştirilebildiği belirtilmektedir (Kayahan ve Tekin, 2006; Tokuşoğlu ve Alçitepe, 2010; Özlü, 2011).

Zeytin meyvesinin, oleuropein gibi acılığa neden olan fenolik bileşenler, düşük derişimde şeker ve yüksek miktarda yağ içerdiği, bu nedenle de doğrudan tüketilemediği bilinmektedir (Garcia et. al. 2005). Zeytin sofralık ve yağlık olmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir. Dünyada ticari öneme sahip Kaliforniya, İspanyol ve Yunan olmak üzere üç tip sofralık zeytin üretim yöntemi bulunmaktadır. Yunan tipi üretim yöntemi; doğal fermente sofralık zeytin üretim yöntemi olarak da bilinmektedir (Tofalo et. al., 2012).

İspanyol ve Kaliforniya tipi sofralık zeytin üretiminde oleuropeinin neden olduğu acılık, alkali uygulaması ile giderilmektedir. İspanyol tipi sofralık zeytin üretiminde bir fermantasyon basamağı yer alırken, Kaliforniya tipi sofralık zeytin üretiminde yalnızca alkali uygulaması bulunmaktadır (Gómez et. al., 2006).

Ülkemizde yaygın olarak doğal fermente sofralık zeytin üretiminin yapıldığı bilinmektedir. Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde alkali uygulaması yer almakta ve acılığın-acılık fermantasyonla giderilmektedir. Fermantasyon boyunca fenolik bileşenlerin bir kısmının salamuraya geçtiği, bir kısmının ise fermantasyon ortamında yer alan mayalar tarafından parçalandığı belirtilmektedir (Rejano et. al., 2010).

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde fermantasyondan sorumlu mikroorganizmaların Laktik Asit Bakterileri (LAB) ve mayalar oldukları bilinmektedir. Fermantasyon başlangıcında ortamda LAB' nin baskın oldukları ve laktik asit üreterek ortam pH' sını düşürdükleri belirtilmektedir. Fermantasyonun ilerleyen günlerinde ise; düşük pH ve salamuraya geçen fenolik bileşenler nedeni ile LAB' nin inhibe oldukları ve ortamda mayaların baskın hale gelerek fermantasyonu tamamladıkları bilinmektedir (Aponte et al., 2011). Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde mayaların çeşitli lezzet bileşenleri ve öncüllerini üreterek, zeytinlerin organoleptik özelliklerinin oluşmasına önemli ölçüde katkıda bulundukları belirtilmektedir (Alves et al., 2012).

Yapılan çeşitli araştırmalarda mayaların, sofralık zeytin üretiminde olumlu ve olumsuz rollerinin bulunduğu rapor edilmektedir. Bu mikroorganizmaların zeytinde bulunan pektin ve proteinleri parçalayarak yumuşamaya, CO₂ üreterek "gaz cebi" oluşumuna neden oldukları-olabildikleri, H₂S üreterek kötü kokuya sebep olabildikleri ve salamurada zar oluşumuna neden olabildikleri belirtilmektedir (Hernandez et al., 2007; Arroyo-López et. al., 2008; Bevilacqua et al., 2009; Bautista-Gallego et al., 2010).

Mayaların doğal fermente sofralık zeytin üretimi boyunca prosese önemli katkılarının da bulunduğu ifade edilmektedir. Mayaların yüksek tuz derişimlerine, düşük pH değerlerine ve fenolik bileşenlere dayanıklı olmaları nedeniyle, fermantasyon boyunca canlılıklarını sürdürebildikleri bilinmektedir. Mayaların belirlenen en önemli özelliklerinden birinin oleuropeini parçalayarak, acılığı giderebilmeleri olduğu ifade edilmektedir (Psani and Kotzekidou, 2006). Mayaların zeytin üretimi açısından sahip oldukları bir diğer olumlu özelliğin ise; lipolitik ve katalaz aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Lipolitik aktivite sonucunda mayaların

çeşitli lezzet bileşenlerini oluşturarak zeytinin kendisine özgü tat ve koku oluşumuna katkı sağladıkları rapor edilmektedir (Rodriguez-Gómez et. al., 2010). Katalaz aktivitesi ile ise, zeytinde bulunan doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesinin önlenerek peroksit oluşumunun önüne geçildiği ifade edilmektedir (Bautista-Gallego et. al., 2011).

Mayaların sofralık zeytin üretimi açısından belirlenen diğer bir istenen özelliklerinin ise; zeytinde bulunan şekerleri ve organik asitleri asimile edebilme yeteneği olarak bilinmektedir. Organik asit asimilasyonunun salamura pH' sının düşmesine ve aroma öncüllerinin oluşmasına, şeker asimilasyonunun ise; salamuradaki besin miktarını arttırarak LAB gelişimine destek sağladığı bilinmektedir. Mayaların çeşitli B kompleks vitaminleri üreterek de LAB' ni destekledikleri belirtilmektedir (Silva et al., 2011). Zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen bazı maya suşlarının killer aktiviteye sahip oldukları da belirtilmektedir. Killer aktiviteye sahip olan mayaların biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri ve zeytin üretiminde koruyucu katkı maddelerinin kullanılmasını sınırlandırabilecekleri ifade edilmektedir (Hernandez et. al., 2007)..

Yapılan bu çalışmada ilk olarak; Manisa' nın Akhisar ve Bursa' nın İznik yörelerinde yetişen Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca ortamdaki LAB ve maya popülasyonlarındaki değişimin incelenmesi ve endojen maya floralarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, örneklerden izole edilen maya suşlarının hızlı yarı otomatik API ID 32C (bioMérieux, Fransa) sistemi ve bu sistemi tamamlayıcı olarak uygulanan bazı ek tanımlama testleri ve Kesim Parçası Uzunluk Çeşitliliği-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFL-PZR) yöntemleri kullanılarak tanımlanmaları planlanmıştır. Bunun yanı sıra iki farklı yöreye ait olan Gemlik zeytinlerinin maya floraları arasında fark olup olmadığının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Araştırmada tanımlanabilen maya izolatlarından, zeytin fermantasyonunda olumlu role sahip oldukları bilinen türlere ait suşların, zeytin üretimi açısından önemli olabilecek bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi de planlanmıştır. Bu şekilde ülkemizde, sofralık zeytin üretiminde büyük bir paya sahip olan Gemlik zeytinlerinin kontrollü fermantasyon ile üretiminde destek starter olarak

kullanılabilme potansiyeline sahip olan yerel maya suşlarının belirlenmesi de hedeflenmiştir.



2. LİTERATÜR ÖZETİ

Zeytin; *Oleaceae* familyasına ait, *Olea* cinsi, her mevsim yeşil olan yaklaşık 35 tür ağacın ortak ismi olarak bilinmekte ve özellikle, *Olea europaea* türü için kullanılmaktadır. Zeytin ağacının meyvesi etli ve tek çekirdekli olmakla birlikte, perikarp ve endokarp olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Perikarpın ise, epikarp (zar) ve mezokarp (pulp) olmak üzere iki kısımdan oluştuğu belirtilmektedir. Tohum, çekirdeğin içinde olup, koyu gri renkli sert bir kabukla çevrilidir (Boskou, 2006; Kailis and Haris, 2007). Genel olarak, zeytin meyvesinin ağırlığının 2-12 g olduğu; bu ağırlığın %65-83' ünü perikarp, %13-30' unu ise endokarp kısmının oluşturduğu ifade edilmektedir. Perikarpın mumsu bir tabaka ile örtülü olup, bu tabakanın zeytinin olgunlaşması sırasında açık yeşilden siyah renge döndüğü bilinmektedir (Boskou, 2006).

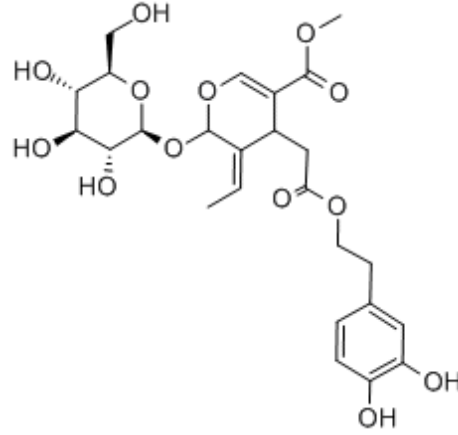
Zeytin meyvesi %70' den fazla "bitkisel su" içermektedir. Meyvenin sahip olduğu bileşenlerin oranları ortalama; %50 su, %1.6 protein, %22 yağ, %19 karbonhidrat, %5.8 selüloz ve %1.5 mineral maddeler olarak verilmektedir (Boskou, 2006). Bu bileşenlerin miktarlarının zeytinin olgunluk derecesine, yetiştirilme şartlarına ve çevresel etmenlere göre farklılıklar gösterebildiği belirtilmektedir. Zeytin meyvesinde bulunan diğer önemli bileşenlerin pektin, organik asitler, pigmentler ve fenolik maddeler olduğu ifade edilmektedir (Boskou, 2006). Sitrik, okzalik, malonik, fumarik, tartarik, laktik, asetik ve trikarbalik asit gibi organik asitlerin zeytinin etli kısmında bulunduğu bilinmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010). Zeytinin etli kısmında yer alan başlıca şekerlerin ise; glukoz ve fruktoz oldukları, bazı çeşitlerde ise sakkaroz, mannoz ve galaktozun da bulunduğu ifade edilmektedir. Meyvenin; oleuropein, luteolin, verbaskosit, dimetil oleuropein, elenolik asit, rutin, tirosol ve hidroksitirosol başta olmak üzere yaklaşık 40 çeşit fenolik bileşen içerdiği ve bu fenolik bileşenlerin yüksek oranda antioksidan aktivite gösterdikleri belirtilmektedir. Söz konusu fenolik bileşenlerden oleuropeinin, zeytine acı tadını verdiği bilinmektedir. Zeytinin etli kısmında bulunan belli başlı minerallerin ise; kalsiyum (Ca), demir (Fe), potasyum (K), fosfor (P), bakır (Cu), mangan (Mn) ve magnezyum (Mg) olduğu belirtilmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010).

Dünyada Akdeniz havzası iklim özellikleri gösteren yaklaşık 40 ülkede zeytin üretiminin yapıldığı ifade edilmektedir (Özkaya vd., 2010; Rejano et al., 2010). Dünyada sofralık zeytin üretiminde İspanya başta olmak üzere bazı Avrupa Birliği ülkeleri, Türkiye, Fas, Suriye, Yunanistan, Mısır, Amerika Birleşik Devletleri-ABD ve Arjantin'in önemli ülkeler arasında yer aldıkları bilinmektedir (Özkaya vd, 2010; Rejano et al., 2010). Türkiye'nin, dünyada zeytin üretici ülkeler arasında dördüncü sırada yer aldığı ifade edilmektedir (Yurtsever, 2006; Öztürk vd., 2009).

Türkiye'de; Ege, Akdeniz, Marmara, Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu olmak üzere beş ayrı bölgede zeytin üretimi gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde, en geniş dağılıma sahip olan zeytin türü Gemlik zeytini olmakla birlikte, Edremit, Ayvalık, Domat, Memecik, Memeli, İzmir sofralık, Çilli, Çelebi ve Uslu varyetelerinin Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yetişen başlıca zeytin türlerini oluşturduğu bilinmektedir (Özilbey, 2011). Marmara bölgesinin tipik zeytin çeşidi olan Gemlik zeytini bölgedeki zeytin varlığının %80' ini oluşturmaktadır. Kabuğunun ince ve etine yapışık, et kalınlığının fazla, çekirdeğinin küçük, yuvarlakça ve üstü pürüzsüz oluşu ve aromatik olması dolayısıyla, Gemlik tipi zeytinden yüksek kaliteli sofralık zeytin üretilbildiği bilinmektedir. Bu zeytinin, Bursa-Gemlik yöresinin yanı sıra, Orhangazi, Mudanya ve İzmit yörelerinde de yetiştirildiği belirtilmektedir (Tokuşoğlu, 2010). Gemlik zeytinin kalite özelliklerine göre; jumbo, süper, hususi, ekstra, elit, lüks, duble ve yağlık olarak sınıflandırıldığı ifade edilmektedir. 1 kg' daki dane adedi jumbo zeytinde; 200-230, süper zeytinde; 240-260, hususi zeytinde; 270-290, ekstra zeytinde; 300-330, elit zeytinde; 330-350, lüks zeytinde; 360-380 ve duble zeytinde; 390-410 olarak değişmektedir. Gemlik zeytininde et/çekirdek oranının; 6/1 veya 7/1' e, yağ oranının ise; %25-28' e ulaştığı belirtilmektedir (Güceyü ve Başoğlu, 2010).

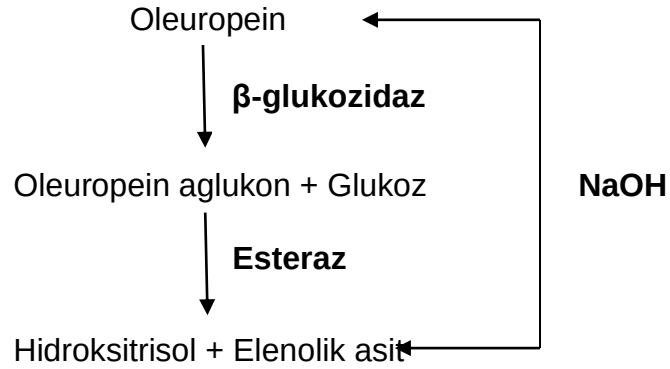
Zeytin, hasat edildikten sonra tüketilemeyen nadir meyvelerden biri olarak bilinmektedir (Uylaşer ve Şahin, 2004; Garcia et al., 2005). Çünkü; içeriğindeki fenolik bir bileşen olan oleuropein (Şekil 2.1) zeytine acılık vermekte, bu nedenle de zeytinin tüketilebilmesi için bu bileşenin giderilmesi gerekmektedir (Uylaşer ve Şahin, 2004., Garcia et al., 2005; Bautista-Gallego et al., 2010; Alves et al., 2012). Yapılan çalışmalar, başlangıçta oleuropeinin zeytin meyve ağırlığının %14' ünü oluşturduğunu ve miktarının zeytinin büyüme döneminde arttığını, olgunlaşma

döneminde ise giderek azalarak meyve ağırlığının %2' sine düştüğünü ortaya koymaktadır (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Bu bileşenin; suda çözünebilen fenolik glukozit yapısında olup, sofralık zeytin üretimi sırasında salamura suyuna ya da başka bir sıvı faza geçebildiği ifade edilmektedir.



Şekil 2.1. Oleuropein'in yapısal formülü (Yıldız ve Uylaşer, 2011)

Oleuropeinin neden olduğu acılık, alkali uygulaması ile ortadan kaldırılabilirdiği gibi, enzim ile muamele edilerek ve fermentasyon işlemi ile de giderilebilmektedir (Aponte et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2010, Alves et al., 2012; Tofalo et al., 2012). Oleuropeini parçalayan enzimin β -glukozidaz olduğu bilinmektedir. β -glukozidaz enziminin oleuropeini glukoz ve oleuropein aglukona parçaladığı, daha sonra ise esteraz enzimi etkisi ile hidroksitrisol ve elenolik asitin oluştuğu ifade edilmektedir (Yıldız ve Uylaşer, 2011) Alkali uygulaması ile acılık giderme işleminde ise; oleuropeinin parçalanarak tek aşamada hidroksitrisol ve elenolik asitin oluştuğu bilinmektedir. Oleuropeinin zeytin meyvesinde bulunmasının yanı sıra, zeytin yaprağında, zeytinyağında zeytinyağı üretimi sırasında ortaya çıkan atıklarda da bulunduğu ifade edilmektedir (Yıldız ve Uylaşer, 2011; Boskou, 2006). Ticari olarak üretilen oleuropeinin ana kaynağının zeytin yaprağı olduğu bilinmektedir. Oleuropeinin enzim ve alkali uygulaması ile hidrolizi şematik olarak Şekil 2.2.'de gösterilmektedir (Yıldız ve Uylaşer, 2011)



Şekil 2.2. Oleuropeinin enzim ve alkali uygulaması ile hidrolizi

Uluslararası Zeytinyağı Konseyi (IOOC)' nin verilerine göre (2004), 2010/2011 döneminde, dünyada yaklaşık olarak 2 266 500 ton sofralık zeytin üretimi gerçekleştirilmiştir (Hurtado et al., 2012). IOCC' nin "sofralık zeytin" tanımına göre zeytinler, hacmine, şekline, et/çekirdek oranına, et kalınlığına, tadına, sertliğine ve çekirdeğinden ayrılma kolaylığına göre seçilmektedirler. Aynı kaynakta sofralık zeytinlerin genel olarak renklerine ve işleme şekillerine göre sınıflandırıldıkları belirtilmektedir. Zeytinler işleme şekillerine göre; a) işlenmiş zeytinler, b) doğal zeytinler, c) oksidasyon ile karartılmış zeytinler, d) kurutulmuş zeytinler, e) özel zeytinler olarak sınıflandırılmaktadır (Hurtado et al., 2012). Türk Gıda Kodeksi Sofralık Zeytin Tebliği' ne göre ise; sofralık zeytinler ham zeytin danelerinin olgunluk derecelerine, işleme şekillerine ve piyasaya sunuş şekillerine göre sınıflandırılmaktadırlar (<http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2008-24.html>) .

Dünya ticaretinde önem kazanmış olan üç farklı sofralık zeytin çeşidi olduğu bilinmektedir. Bunlar; İspanyol tipi, Kaliforniya tipi ve doğal fermente salamura sofralık zeytin olarak sıralanabilmektedir (Bautista-Gallego et al., 2010; Valencic et al., 2010, Tofalo et al., 2012). İspanyol tipi yeşil zeytinin üretiminde; maksimum büyüme seviyesine ulaşmış dane yeşil zeytinler kullanılmaktadır (Gómez et al., 2006). Bu tip üretimde, zeytinlerin hasat sonrasında seçilip sınıflandırıldıktan sonra, oleuropeini uzaklaştırıp acılığı gidermek için zeytin varyetesine ve olgunluk derecesine bağlı olarak, 6-15 saat %1.8-2.5 (g/L)' lik alkali (NaOH çözeltisi) uygulamasına tabi tutulduğu belirtilmektedir (Gómez et al., 2006; Aponte et al, 2011). Uygulamada alkali çözeltisinin, zeytin meyvelerinin tamamını kapatması

sağlanmaktadır. Alkali çözeltisini uzaklaştırmak için ise; zeytinlerin önce birkaç kere yıkandığı, daha sonra ise; %6-10 oranında tuz içeren salamurada 20-22°C' de bir fermantasyon işleminin gerçekleştirildiği ifade edilmektedir. Yıkama işleminin zeytindeki alkaliyi uzaklaştırmasının yanı sıra fermantasyon aşaması için geçerli olan şekeri de açığa çıkardığı bilinmektedir (Rejano et al., 2010). Fermantasyon işlemi yaklaşık 1.5-2 ay sürmektedir (Gómez et al., 2006). Fermantasyon boyunca salamurada çok çeşitli ve değişken mikroorganizmaların yer aldıkları belirtilmektedir. İspanyol tipi yeşil zeytinin üretiminde; fermantasyondan asıl sorumlu mikroorganizmaların; laktik asit bakterileri (LAB) olduğu belirlenmiştir (Hurtado et al., 2008; Aponte et al., 2011). Fermantasyonun başlangıcında ortamda, alkaliyi tolere edebilen mikroorganizmaların yer alarak ortam pH' sını düşürdükleri; daha sonra ise bu mikroorganizmaların inhibe olarak laktobasillerin gelişimlerinin desteklendiğini ortaya konulmuştur (Rejano et al. 2010). Bunun yanı sıra laktobasillerin salamuradaki sayılarının logaritmik olarak artış gösterdiği de ifade edilmektedir. İspanyol tipi sofralık zeytin fermantasyonunda *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus pentosus* türlerinin önemli rol oynadıkları ve homolaktik fermantasyon ile ortam pH' sını 4.5' e düşürdükleri belirtilmektedir (Rejano et al. 2010). İspanyol tipi sofralık zeytin üretiminde fermantasyon aşamasının, son ürünlerdeki tat ve kokunun oluşumundan sorumlu en önemli işlem basamağı olduğu ifade edilmektedir. Bu tip üretimde, fermantasyon işleminden sonra zeytinlerin seçilerek büyüklüklerine göre sınıflandırıldığı belirtilmektedir. İspanyol tipi sofralık zeytin üretime ait akım şeması Şekil 2.3' de yer almaktadır.

Kaliforniya tipi siyah zeytin üretiminde dane sarı-yeşil zeytin kullanılmakta, acılık giderme ve siyahlaştırma işlemi ise alkali uygulaması ile gerçekleştirilmektedir. Ülkemizde Kaliforniya tipi siyah zeytin üretimi için Memecik çeşidi zeytinin kullanıldığı ifade edilmektedir (Tokuşoğlu, 2010). Bu tip zeytin üretiminde, alkali uygulaması sırasında %0.5-2.0 oranında NaOH çözeltisinin kullanıldığı belirtilmektedir. Zeytinler kısa sürelerle, üç defa NaOH ile muamele edilmekte ve her kostik uygulamasından sonra salamura pH' sı 7-8 olana kadar zeytinler saf suda ya da seyreltik tuzlu suda bekletilmektedirler. Birinci alkali uygulamasında kostik oranının %2, ikinci uygulamada %1.0-1.5, üçüncü uygulamada ise; %0.5-

1.0 olduğu ve işlem süresinin yaklaşık; 5-9 gün sürdüğü ifade edilmektedir (Tokuşoğlu, 2010).



Şekil 2.3. İspanyol tipi sofralık zeytin üretim akım şeması

Suda bekletme işlemi sırasında ise, sisteme hava girişi yapılarak zeytinin siyahlaştırılmasının sağlandığı da belirtilmektedir. Son yıkama suyuna hidroklorik asit (HCl) eklenerek ortam pH' sının 7-8' e ayarlanmasının kolaylaştırıldığı bilinmektedir. Ancak, ortama asit ilave edilmesinin zeytinin renginin açılmasına neden olduğu, zeytinin kendine özgü siyah rengine ulaşması için ortama demir glukonat ve demir laktat ilave edildiği de rapor edilmektedir. Kaliforniya tipi siyah zeytin üretiminde fermantasyon işleminin bulunmadığı; ürünün konservelenerek ısıl işlemle ve salamura suyuna eklenen laktik asit, asetik asit, sodyum benzoat, ve sorbat gibi çeşitli koruyucu maddelerle korunduğu bilinmektedir. Salamuradaki tuz oranının ortalama %2.5, en fazla %3 olduğu bilinmektedir. Kaliforniya tipi sofralık zeytin üretimine ait akım şeması Şekil 2.4' de yer almaktadır (Tokuşoğlu, 2010)



Şekil 2.4. Kaliforniya tipi sofralık zeytin üretim akım şeması

Doğal fermente salamura sofralık siyah zeytin üretiminde ise, zeytinler elle toplanarak yıkama işlemine tabi tutulmaktadır. Yıkama işleminden sonra ise içerisinde, %8-10 oranında tuz içeren salamura suyu bulunan tanklarda, hava ile temasları kesilerek, doğal fermentasyona bırakılmaktadırlar. Fermentasyon işleminin, zeytin çeşidi ve fermentasyon ortamına bağlı olarak yaklaşık, 3-9 ay sürdüğü ve bu süreçte acılığın yavaş yavaş ve kısmen giderildiği belirtilmektedir. Son üründe ise bir miktar acı tadın varlığını koruduğu bilinmektedir. Fermentasyon işlemi tamamlandıktan sonra sofralık zeytine özgü siyah rengin oluşması için 2-3 gün havalandırma işleminin uygulandığı; bazen de %0.1' lik demir glukonat ya da laktat ilave edilerek koyu siyah rengin sağlandığı ifade edilmektedir. Son aşamada ise zeytinlerin %8 oranında tuz içeren taze salamura ile birlikte paketlenmeleri belirtilmektedir (Rejano et al, 2010). Doğal fermente sofralık zeytin üretimine ait akım şeması Şekil 2.5' de yer almaktadır (Rejano et al, 2010). Doğal fermente

salamura siyah zeytin üretiminin, dünyadaki sofralık zeytin üretiminin; %30' unu kapsamakta olduğu ve yaygın olarak Yunanistan' da üretilmekle beraber Türkiye, Suriye, Ürdün, Lübnan ve Kıbrıs' ta bu tip üretimin yapıldığı rapor edilmektedir (Rejano et al, 2010).



Şekil 2.5. Doğal fermente sofralık zeytin üretim akım şeması

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde fermantasyon basamağının, zeytine özgü organoleptik özelliklerin oluşması ve ortam pH' sının düşerek istenmeyen mikroorganizmaların üremelerinin önlenmesi açısından önemli olduğu bilinmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalara göre, doğal fermente sofralık salamura siyah zeytin üretiminde, fermantasyon aşamasında ortamda bulunan mikroorganizmalar çeşitlilik göstermektedirler (Kotzekidou, 1997; Panagou et al., 2002; Coton et al., 2006; Hernandez et al., 2007; Arroyo-López et al., 2008; Hurtado et al, 2008; Pereira et al., 2008.; Bautista-Gallego et al., 2010; Romo-Sanches et al., 2010; Abriouel et al., 2011; Aponte et al., 2011; Alves et al., 2012). Bu mikroorganizmalardan biri olan mayaların, fermantasyon boyunca aktivitelerini sürdürdükleri; bunun yanı sıra fermantasyonunun ilk aşamalarında *Bacillus* ve *Clostridium* türlerinin de baskın oldukları belirlenmiştir (Alves et al., 2012). LAB' nin fermantasyon ortamındaki varlıklarının, salamuraadaki tuz derişimine ve kullanılan zeytin varyetesinin polifenol içeriklerine göre farklılık gösterebildiği de ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalara göre, öncelikli olarak *Leuconostoc mesenteroides* ve *Pediococcus cerevisiae* türleri, sonrasında ise *L. plantarum* ve *Lactobacillus brevis* türleri fermantasyonda yer almaktadırlar (Kotzekidou, 1997,

Kanavouras et al., 2005). Ürünün son pH' ı 3.8-4.0' e ulaştığında ise, fermentasyon ortamında mayaların baskın hale geldikleri belirtilmektedir. Mayaların zeytinin doğal fermentasyonu sırasında kritik bir role sahip oldukları bilinmektedir. Bunun nedeninin, laktik asit üretimi sonucu ortam pH' sının düşmesi ve salamurada bulunan toksik fenolik bileşenler nedeni ile LAB' nin inhibe olması olarak açıklanmaktadır (Mucilli et al., 2011).

Mayaların yüzyıllar boyu fermente ekmek, peynir, zeytin, şarap, bira ve turşu gibi gıda maddelerinin üretimlerinde önemli bir yere sahip oldukları bilinmektedir. Mayalar içerisinde, son ürünün kalitesini olumlu yönde etkileyen türler “teknolojik flora”, olumsuz yönde etkileyen türler ise; “bozucu flora” olarak adlandırılmaktadırlar. Endüstride, ekmek, peynir, şarap ve bira gibi bazı fermente gıdaların üretiminde seçilmiş teknolojik suşların starter kültür olarak kullanıldıkları bilinirken, sofralık zeytin ve turşu gibi fermente gıdaların üretiminde endojen floradan yararlanıldığı, ve fermentasyon işleminin doğal olarak, kendiliğinden gerçekleştiği bilinmektedir (Coton et al., 2006). Gıda maddesine herhangi bir teknolojik suş ilave edilmeden, çevre koşullarına ve gıdanın bileşimine bağlı olarak baskın hale gelen ve canlılıklarını sürdürebilen endojen suşların gerçekleştirmiş oldukları fermentasyon işlemine “doğal fermentasyon” adı verilmektedir.

Tüm canlı hücrelerin, gereksinimlerini sağlamaları için enerjiye ihtiyaçları olduğu ve oksijenli ortamda organik molekülleri Adenozin Tri Fosfat (ATP)' ye dönüştürerek enerji ürettikleri bilinmektedir. Oksijenin olmadığı ortamlarda ise glikolizden sonra fermentasyon işlemi gerçekleşerek, ATP üretilmektedir (Dickinson and Kruckeberg, 2006).

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde, laktik ve alkolik fermentasyonların gerçekleştiği ifade edilmektedir (Randazzo et al., 2010). Laktik asit fermentasyonunun başta laktobasiller olmak üzere *Leuconostoc* ve *Pediococcus* cinslerinde yer alan LAB' i tarafından gerçekleştirildiği belirtilmektedir. LAB' nin türüne bağlı olarak laktik asit fermentasyonunu homofermantatif ve/veya heterofermantatif olarak gerçekleştirdiği bilinmektedir (Tokuşoğlu, 2010). Homofermantatif laktik asit fermentasyonunda son ürün olarak sadece laktik asit, heterofermantatif laktik asit fermentasyonunda ise laktik asitin yanısıra etil alkol,

asetik asit, formik asit ve karbondioksit meydana gelmektedir. Sofralık zeytin fermantasyonunun sonrasında salamurada bulunan başlıca metabolik ürünlerin sitrik, tartarik, malik, süksinik, laktik ve asetik asit oldukları ve bu ürünlerin ortam pH' sını düşürdükleri belirtilmektedir (Tassaou et al., 2002).

Yapılan çeşitli çalışmalarda, farklı doğal fermente sofralık zeytin çeşitlerinden değişik türlerde mayalar izole edildiği rapor edilmektedir (Kotzekidou, 1997; Panagou et al., 2002; Hernandez et al., 2007; Arroyo-López et al., 2008; Hurtado et al., 2008; Pereira et al., 2008.; Coton et al., 2006; Bautista-Gallego et al., 2010; Romo-Sanches et al., 2010; Abriouel et al., 2011; Aponte et al., 2011; Alves et al., 2012). Fermantasyon ortamına ait endojen maya florasının; zeytin meyvesine, kullanılan suya, salamuraya, ortam pH' sına, zeytin dokusundan salamuraya geçen besin miktarına, zeytin yüzeyinin yapısına, salamuradaki fenolik bileşenler ve organik asitler gibi antimikrobiyel maddelerin miktarına, sıcaklığa, fermantasyon tanklarına/havuzlarına ve genel olarak kullanılan alet ve ekipmanlara bağlı olarak değişiklik gösterebildiği ifade edilmektedir (Rejano et al., 2010; Tassaou et al., 2002).

Mucilli et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, hasat edilen yeşil zeytinler 10 L kapasitedeki fermantasyon kaplarında %8 oranında tuz içeren salamura ile birlikte, 20°C' de doğal fermantasyona bırakılmışlardır. Araştırmada; fermantasyonun 7, 15, 30, 60, 90, 120, 150 ve 180. günlerinde salamura örnekleri alınmış ve maya izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, izole edilen mayalar Kesim Parçası Uzunluğu Çeşitliliği-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RFLP-PZR), dizi analizi ve Denature Jel Elektroforezi-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (DGGE-PZR) yöntemleri kullanılarak tanımlanmışlardır. Tanımlama sonucunda fermantasyon ortamında, *Saccharomyces cerevisiae*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Candida diddensiae* ve *Issatchenkia orientalis* türü mayaların yer aldıkları belirlenmiştir.

Alves et al. (2012) tarafından yapılan başka bir çalışmaya göre, Manzanilla türüne ait yeşil zeytinler el ile toplanmış ve fabrika ortamında, %6-12' lik salamura içeren iki ayrı tankta, oda sıcaklığında, 52 gün boyunca doğal fermantasyona bırakılmışlardır. Çalışmada; fermantasyon boyunca aseptik koşullar altında tanklardan örneklerin alındığı ve laboratuvara gönderildikleri daha sonra ise maya

sayımı, izolasyonu ve RFLP-PZR yöntemi kullanılarak tanımlamaların yapıldığı belirtilmiştir. Gerçekleştirilen tanımlamalar sonucunda, 108 izolatın %59.6' sının *Zygorhynchus mrakii*, %11.9' unun *S. cerevisiae* ve %9.2' sinin ise *Cytheromyces matritensis* olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada tanımlanan diğer maya türlerinin ise; *Aureobasidium pullulans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensiae*, *Candida oleophila* ve *Rhodotorula mucilaginosa* oldukları saptanmıştır.

Arroyo-López et al. (2006) tarafından yapılan bir başka araştırmada ise; siyah zeytinler aerobik ve anaerobik koşullar altında, farklı tanklarda fermantasyona bırakılmışlar ve 16. güne kadar her gün tanklardan salamura örnekleri alınmıştır. Yapılan çalışmada, elde edilen toplam 25 adet maya izolatı biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanılarak tanımlanmışlardır. Aerobik koşullar altında gerçekleştirilen fermantasyon ortamından alınan salamura örneklerinde; *Geotrichum candidum*, *C. boidinii*, *Hanseniaspora guilliermondii* ve *Rhodotorula glutinis* türlerinin; anaerobik koşullar altında gerçekleştirilen fermantasyon ortamından alınan salamura örneklerinde ise; *S. cerevisiae*, *C. boidinii*, *H. guilliermondii*, *R. glutinis*, *Dekkera bruxellensis* ve *Rhodotorula graminis* türlerinin izole edildikleri belirtilmiştir.

2008 yılında İspanya' da yapılan bir çalışmada; ülkeye özgü zeytinlerin doğal fermantasyonlarının ilk 3.5 ayı boyunca her 3-4 günde bir; daha sonra ise 35-40 günde bir fermantasyon ortamından örneklerin alındığı ve bu örneklerin mikrobiyel popülasyonlarının incelendiği ifade edilmiştir (Hurtado et al, 2008). Alınan örneklerdeki mayaların tanımlanmalarının ise; RFLP-PZR yöntemi kullanılarak yapıldığı belirtilmiştir. Buna göre yapılan çalışmada zeytin örneklerinden izole edilen mayaların; *C. diddensiae*, *C. boidinii*, *Pichia kluyveri*, *Candida membranifaciens*, *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens*, *R. glutinis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia minuta*, *Candida aasei*, *C. parapsilosis* türlerine ait oldukları bildirilmiştir.

Romo-Sanchez et al. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, İspanya' nın Castilla La Mancha bölgesinde bulunan 10 üreticiden Arbequina ve Cornicabra varyetelerine ait tane zeytin ve zeytin numunelerinin alındığı ve alınan numunelerden maya izolasyonu ve tanımlamalarının yapıldığı ifade edilmiştir. Elde

edilen 108 adet izolatın RFLP-PZR yöntemi kullanılarak tanımlandıkları belirtilmiştir. Yapılan söz konusu çalışmaya göre tane zeytin ve zeytin ezmesi örneklerinden *Pichia carribica*, *Pichia mississippiensis*, *C. diddensiae*, *Lachancea thermotolerans*, *Kluyveromyces thermotolerans*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Pichia holstii*, *S. cerevisiae*, *Saccharomyces rosinii*, *Torulaspora delbrueckii*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Candida thermophila* türlerinin izole edildikleri rapor edilmiştir.

Yapılan bazı çalışmalara göre, sofralık zeytinden sıklıkla izole edilen maya türleri; *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *C. boidinii*, *D. hansenii*, *R. glutinis* ve *S. cerevisiae* olarak sıralanmaktadır (Rodriguez-Gómez et al., 2010; Tofalo et al., 2012). Bu türler arasında *P. anomala*'nın hemen hemen bütün zeytin çeşitlerinden izole edildiği ifade edilmektedir (Tofalo et al., 2012). Bu türün zeytin fermantasyonunda başlıca maya olarak yer almasının yanı sıra, üründe gaz oluşumuna ve yumuşamaya da neden olduğu belirtilmektedir. Ayrıca bu türün *S. cerevisiae* türü ile birlikte siyah zeytinlerin doğal fermantasyonları sırasında "alambrado" bozulmasına neden olduğu ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra, *P. anomala* türlerinin killer toksin üretebildikleri için sofralık zeytin üretiminde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri, biyoaktif antioksidan maddeler ürettikleri için ise, zeytinyağı bileşenlerinin oksidasyonunu engelledikleri ve insan sağlığına yarar sağladıkları da belirtilmektedir (Tofalo et al., 2012).

R. glutinis, zeytinde yumuşamaya neden olan pembe renkli bir maya türü olarak tanımlanmaktadır. Bu türün zeytinin yüzeyinden sıklıkla izole edilebileceği ve fermantasyon için gerekli olan bileşenleri zeytinden salamurağa geçişini sağlayabileceği düşünülmektedir (Hurtdao et al., 2008). Zeytin fermantasyon ortamlarında rastlanan *P. membranifaciens* türünün ise, esteraz enzimi aktivitesine sahip olduğu ve bu özelliği ile de sofralık zeytine özgü tat ve koku maddelerinin oluşmasına yardımcı olduğu bilinmektedir. Bu türün ayrıca, killer özellik taşıyabildiği ve katalaz aktivitesine sahip olduğu, B-kompleks vitaminler üreterek LAB' nin gelişimini desteklediği ve ozmofilik bir tür olması nedeni ile de fermantasyon boyunca zeytin salamurasında canlılığını sürdürebildiği belirlenmiştir. Zeytin fermantasyonlarında sıkça rastlanan *S. cerevisiae*'nin ise, lipaz aktivitesine sahip olduğu, katalaz enzimi üreterek zeytinde acılaşmayı

önlediği, antimikrobiyel aktiviteye sahip olduğu ve B-kompleks vitaminleri ürettiği yapılan bazı çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Silva et al., 2011).

Sofralık zeytin üretiminde mayaların istenen; son ürünün organoleptik özelliklerini olumlu yönde etkileyen rollerinin olduğu gibi, istenmeyen; ürün kalitesini olumsuz yönde etkileyen rollerinin de olduğu bilinmektedir. Çizelge 2.1 'de sofralık zeytinlerin doğal fermantasyonlarında yer alan mayaların istenen ve istenmeyen bazı teknolojik özellikleri verilmektedir (Hernandez et al., 2007; Arroyo- López et al., 2008; Bevilacqua et al., 2009; Bautista-Gallego et al., 2010, Tassaou et al., 2002). Günümüzde mayaların sofralık zeytin üretimine etkileri ile ilgili halen bilinmeyen bir çok nokta mevcut olup, bu konudaki çalışmalar günümüzde de yoğun olarak devam etmektedir.

Çizelge 2.1. Doğal fermente sofralık zeytin fermantasyonunda yer alan mayaların bazı teknolojik özellikleri

İstenen teknolojik özellikler	İstenmeyen teknolojik özellikler
Lipolitik aktivite	Polisakkaritleri parçalama
Katalaz aktivitesi	Gaz oluşturma
Killer aktivite	Zar oluşturma
LAB' nin gelişimini destekleme	
Antimikrobiyel aktivite	
Oleuropeini parçalayabilme	
Yüksek tuz derişimine dayanıklılık	
Antioksidan madde üretme özelliği	

Mayaların olumsuz etkilerinin hem sofralık zeytinin üretimi esnasında, hem de bu zeytinlerin paketlenmelerinin sonrasında ortaya çıkabildiği belirtilmektedir (Arroyo- López, 2008; Bautista-Gallego et al., 2010). Bu mikroorganizmaların olumsuz etkilerini önlemek için üretim esnasında laktik asit ilavesi, pH ve tuz derişiminin

kontrol altında tutulması; paketlenmiş ürüne koruyucu katkı maddelerinin ilavesi ve ısıtma işlemi gibi uygulamalar yapılmaktadır (Hernandez et al., 2007).

Zeytindeki tuz oranı salamura ile denge halindeyken %8 'in üzerine çıktığında mayaların gelişmeleri için uygun bir ortam oluşmakta ve mayalar laktik asit bakterilerine karşı baskın hale gelmektedirler (Yurtsever, 2006; Tassaou et al., 2002). Ayrıca alkali uygulamasının yapılmadığı doğal fermente sofralık zeytin üretiminde ise, zeytinde bulunan fenolik bileşenlerin LAB' ni inhibe ettikleri belirlenmiştir (Bautista-Gallego et al., 2010). Mayaların baskın hale geldiği bu gibi durumlarda, düşük laktik asit üretiminin gerçekleşebildiği ve bu nedenle de zeytinin karakteristik tadının oluşmadığı ve raf ömrünün kısaldığı ifade edilmektedir (Panagou et al., 2002). Maya sayısının; 7 log (kob/mL)' nin üzerine ulaştığında ise; CO₂ üretiminin arttığı ve bunun da zeytinin parçalanmasına neden olduğu belirtilmektedir (Tassaou et al., 2002). *S. cerevisiae*, *S. kluyveri* ve *P. anomala* türlerinin gaz oluşumuna neden olabildikleri bilinmektedir (Hernandez et al., 2007). CO₂ üretiminin, paketlenmiş sofralık zeytinlerde sızıntıya, salamura suyunda bulanıklığa, kötü tat ve kokuya neden olduğu ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Yapılan bir çalışmada *S. cerevisiae* ve *P. anomala* türlerinin CO₂ gazı üreterek, paketlenmiş zeytinde bozulmaya neden oldukları belirlenmiştir. Zeytinlerde bozulmaya neden olan mayaların patojen özellikte olmadıkları bilinmektedir (Arroyo-López et al., 2008).

Mayaların bir diğer istenmeyen özelliklerinin ise; polisakkarolitik aktiviteleri olduğu belirtilmektedir. Mayaların pektinolitik enzimler, pektin metilesteraz, ve poligalakturanaz gibi çeşitli enzimler üreterek zeytinin hücre duvarındaki polisakkaritleri parçaladıkları ve zeytinde yumuşamaya neden oldukları bilinmektedir (Tassaou et al., 2002). Zeytinlerde sıkça rastlanan *Rhodotorulla minuta* ve *D. hansenii* türlerinin polisakkarolitik özellikleri, yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Ayrıca *R. glutinis*, *R. minuta*, *Rhodotorula rubra* türlerinin salamura suyunda zar oluşturabildikleri ve poligalakturanaz enzimleri üreterek yumuşamaya neden olabildikleri de ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Silva et al., (2011) tarafından yapılan bir çalışmada zeytinin doğal fermantasyonu sırasında salamuradan belli aralıklarla izole ettikleri *P. membranifaciens*, *C. oleophila*, *S. cerevisiae*, *Pichia fermentas*, *C. boidinii*, *T. delbrueckii* ve *Candida citrea* türlerinin

pektinaz enzimi üretmediklerini ve bu nedenle de zeytinlerde yumuşamaya neden olmadıklarını belirlemişlerdir. Boutisto-Gallego et al., (2010) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise; İspanya' ya özgü Aloreña, Gordal ve Manzanilla varyetelerine ait zeytin örneklerinden izole edilen *C. diddensiae*, *P. membranifaciens*, *D. hansenii*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Kly. lactis*, *Candida sorbosivorans*, *H. guilliermondii*, *W. anomalus*, *Candida thaimueangensis* ve *C. boidinii* türlerinin hiçbirinde ksilinaz aktivitesi tespit edilemediği rapor edilmiştir. İtalya' da yapılan bir çalışmada, Bella Di Cerignola varyetesinden izole edilen *C. famata*, *C. guilliermondii* ve *R. mucilaginosa* türlerinin tamamının düşük pektolitik aktiviteye sahip oldukları fakat hiçbirisinin ksilinaz enzimi üretmediği belirlenmiştir (Bevilacqua et al., 2009).

Yapılan çeşitli çalışmalar, mayaların zeytin fermantasyonunda kritik bir rol oynadıklarını ve bir çok olumlu etkilerinin olduğunu ortaya koymaktadır (Psani and Kotzekidou, 2006; Arroyo-López et al., 2008; Alves et al., 2012). Bu olumlu etkiler arasında; mayaların zeytinin tat, koku ve yapı oluşumuna önemli katkıları, antioksidan ve antimikrobiyel özellikteki bazı maddeleri sentezleyebilmeleri oleuropeini parçalamaları, fermantasyonda yer almaları, killer aktivite gösterebilmeleri, laktik asit bakterilerinin gelişimlerini olumlu yönde etkilemeleri yer almaktadır.

Mayaların zeytin fermantasyonu sonucunda asetik asit, süksinik asit, formik asit, etanol, metanol ve düşük miktarda asetaldehit ürettikleri düşünülmektedir (Hernandez et al., 2007; Arroyo-López et al., 2008; Alves et al., 2012). Bu bileşenlerin zeytinin tat, koku ve yapı oluşumlarında önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Mayaların sahip oldukları esteraz ve lipaz aktivitelerinin aroma bileşenlerinin oluşumu açısından önemli bir teknolojik özellik olduğu vurgulanmaktadır (Silva et al., 2011). Bazı mayalardaki yüksek lipaz aktivitesinin ise, oksidasyona neden olabildiği ve bunun sonucunda ise; acılaştırmanın meydana gelip zeytinin organoleptik özelliklerinin olumsuz etkilendiği belirtilmektedir (Tassou et al., 2002). Hernandez et al., (2007) tarafından mayaların lipaz ve esteraz aktiviteleri ile ilgili yapılan bir çalışmada, yeşil sofralık zeytinden izole edilmiş türlerin çoğunda, esteraz aktivitesi belirlenirken sadece birkaçında lipaz aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Rodriguez-Gómez et al. (2010) tarafından yapılan bir

çalışmada ise; *C. boidinii*' nin yüksek lipaz aktivitesine sahip olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca zeytin fermantasyon ortamlarında sıklıkla rastlanan; *T. delbrueckii* ve *D. hansenii* türlerinin lipolitik aktiviteye sahip oldukları da belirtilmektedir (Psani and Kotzekidou, 2006).

Portekiz' de yapılan bir başka çalışmada ise, doğal fermente sofralık zeytin salamurasından belirli aralıklarla izole edilen maya suşlarının lipaz ve esteraz aktiviteleri incelenmiş ve *P. membranaefaciens*, *C. oleophila*, *P. fermentas* ve *C. citrea* türlerinin esteraz aktivitesine; *S. cerevisiae* türünün ise lipaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Silva et al., 2011).

Rodriguez-Gómez et al. (2010) tarafından yapılan başka bir araştırmada İspanya' ya özgü; Hojiblanca ve Manzanilla zeytin varyetelerinin üç ay süren fermantasyonları sırasında izole edilen maya suşları tanımlanmış ve tanımlanan maya suşlarının lipolitik aktiviteleri araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada, izole edilen *S. cerevisiae*, *C. boidinii*, *P. galeiformis* ve *P. membranifaciens* türleri arasında *C. boidinii*' nin yüksek lipolitik aktiviteye sahip olduğu, *P. membranifaciens*' in ise düşük lipolitik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Yapılan bir başka çalışmada ise, İspanya' ya özgü Aloreña, Gordal, Manzanilla varyetelerine ait siyah zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *W. anomalus*, *C. sorbosivorans* ve *C. boidinii* türlerinin lipolitik aktiviteye, *C. diddensiae*, *P. membranaefaciens*, *D. hansenii*, *C. tropicalis*, *P. galeiformis*, *W. anomalus*, *C. thaimueangensis* ve *C. boidinii* türlerinin ise; esteraz aktivitesine sahip oldukları belirtilmektedir (Bautisto-Gallego et al., 2011). İtalya' da 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise; Bella Di Cerignola varyetesine ait zeytinlerin fermantasyonlarının 4, 14, 21, 28 ve 35. günlerinde alınan zeytin örneklerinden izole edilen *C. famata*, *C. guilliermondii* ve *R. mucilaginosa* türlerinin lipolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (Bevilacqua et al., 2009).

Sofralık zeytinlerden izole edilen bazı mayaların antioksidan özellikteki biyoaktif bileşenleri sentezleyebildikleri ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Bazı *Saccharomyces* ve *Candida* türlerinin antioksidan özellikteki karotenoid, tokoferol, sitrik asit ve glutatyon ürettikleri bildirilmektedir. Bu antioksidan maddelerin zeytinin

bozulmasını engelledikleri bilindiği gibi, insan sağlığına olumlu etkileri de vurgulanmaktadır.

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde, zeytinde acılığa neden olan oleuropein maddesinin alkali uygulaması ile değil, salamura da yer alan mikroorganizmaların ürettikleri enzimlerle parçalandığı belirtilmektedir. Bu nedenle, mayaların zeytinde acılığa neden olan oleuropeini hidrolize edebilme özellikleri önem kazanmaktadır. Ayrıca, oleuropeinin fermantasyonda yer alan LAB' nin gelişimini engellediği, böyle bir durumda ise yeterli laktik asit üretiminin engellenerek, salamura asitliğinin güvenli düzeye ulaşmadığı ifade edilmektedir. Oleuropeinin hidrolizinin ortam pH' sına ve mikroorganizmaların β -glukozidaz aktivitesine bağlı olarak değişebildiği bilinmektedir (Psani and Kotzekidou, 2006).

Psani and Kotzekidou (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, izole edilen 15 *D. hansenii* ve 32 *T. delbrueckii* suşunun tamamının, %0,1 derişimindeki oleuropeini hidrolize edebildikleri bildirilmiştir. Silva et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin salamurasından izole edilen *C. oleophila* türünün %0.1 derişimindeki oleuropeini parçalayabilme özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Oleuropeini parçalayan enzimin β -glukosidaz enzimi olduğu bilinmektedir. Boutisto-Gallego et al. (2011) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ise; *C. diddensiae*, *W. anomalous*, *Debaryomyces etchelsii*, *Kly. lactis*, *C. sorbosivorans*, *H. guilliermondii* türlerinin, β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları belirtilmiştir.

Doğal sofralık zeytin fermantasyonunda LAB' nin önemli bir yere sahip oldukları bilinmektedir. Özellikle fermantasyonun ilk aşamalarında zeytinlerin uzun süreli muhafazası için, LAB' nin fermantasyonda yer alarak laktik asit üretmeleri ve ortam pH' sını düşürmeleri gerekmektedir. Yapılan son çalışmalar mayaların, bazı sofralık zeytin tiplerinin üretimleri sırasında laktik asit bakterilerinin gelişmelerini arttırdıklarını göstermektedir. Bazı maya türlerinin vitamin, aminoasit ve pürinleri sentezleyerek, kompleks karbonhidratları parçalayarak laktik asit bakterileri için optimum gelişme ortamı sağladıkları ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Tsapatsaris and Kotzekidou (2004) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; 48 saat öncesinde *D. hansenii* ile inokule edilmiş zeytin salamurasında, *L. plantarum* gelişiminin arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak da

laktik asit miktarında hafif bir artış olduğu belirtilmektedir. Mayaların B-kompleks vitaminleri, amino asitler ve pürinler üreterek LAB' nin gelişmeleri ve üremeleri için gerekli bileşenleri sağladıkları ve bir çok maya türünün B vitamini üretebildiği ifade edilmektedir. Silva et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, *P. membranefaciens* türünün; B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9 ve B12 vitaminlerini, *C. oleophila* türünün; B1, B2, B3, B5, B6 ve B9 vitaminlerini, *S. cerevisiae* türünün; B2, B3, B6 ve B9 vitaminlerini, *P. fermentas* türünün ise; B2, B5 ve B8 vitaminlerini sentezleyebildikleri belirlenmiştir.

Bazı maya türlerinin sahip oldukları killer aktivite nedeni ile, biyokontrol ajanı olarak kullanılmaları önerilmektedir (İzgü et al., 2006). Killer aktiviteye sahip olan mayalar (K+) toksik özellikte proteinler ve glukoproteinler üretmektedirler. Bu toksinler, duyarlı maya ve bakteriler için öldürücü etki göstermektedirler (Psani and Kotzekidou, 2006). Killer aktivitenin *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Ustilago*, *Cryptococcus*, *Metschnikowia*, *Williopsis*, *Kluyveromyces* ve *Zygosaccharomyces* cinsleri arasında yaygın bir özellik olduğu ifade edilmektedir (İzgü et al., 2006). Killer suşların kendi ürettikleri killer toksinlere karşı dayanıklı oldukları, fakat diğer killer toksinlere karşı duyarlı olabilecekleri bilinmektedir. Önceki yıllarda mayaların, gösterdikleri killer ve killer toksine dayanıklılık özelliklerine göre, 11 farklı grupta (K1-K11) sınıflandırıldıkları belirtilmektedir (İzgü et. a., 2006). Killer toksinlerin bu toksinlere duyarlı hücreler üzerine farklı etkilerinin olduğu düşünülmektedir. Bunlardan bir tanesinin; killer toksinlerin hücre duvarının ana bileşenlerinden biri olan β -1,3-glukan sentezini engellediği ve sitoplazmik membrandan iyon çıkışına sebep olduğu şeklinde açıklanmaktadır. Bazı durumlarda ise, killer toksinlerin DNA sentezini ve tomurcuklanma döngüsünü durdıkları ya da hücreleri G1 fazında bıraktıkları ifade edilmektedir. Endüstride killer özellik taşıyan maya suşlarının, istenmeyen ve bozulmaya neden olan suşlar ile mücadele etmek amaçlı olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (İzgü et al., 2006). Bazı suşlarının killer özellikte oldukları belirlenen *D. hansenii*, *P. anomala*, *Kluyveromyces marxianus*, *P. guilliermondii* ve *P. membranaefaciens* gibi türlerin sofralık zeytin üretiminde biyokontrol ajanı olarak kullanılması ile, tuz ve koruyucu madde kullanımının azalacağı ve LAB gelişiminin destekleneceği öne sürülmektedir (Hernandez et al., 2007; Arroyo-López et al., 2008). Hernandez et al. (2007) tarafından Portekiz' de yapılan bir

çalışmada; yedi farklı üreticiden alınan, alkali uygulanmadan üretilmiş sofralık yeşil zeytinlerden izole edilen, 74 maya suşunun killer aktivitelerinin farklı pH (3.5-8.5) ve tuz (%5-8) derişimlerinde test edildiği ifade edilmiştir. Yapılan bu araştırmada killer aktiviteye sahip mayalara duyarlı oldukları bilinen; *S. cerevisiae* EX33, EX73R ve MNN9 suşları ile, killer aktiviteye sahip oldukları bilinen *S. cerevisiae* JCR2, EX85, GY-2-3a ve *Williopsis saturnus* HM22 suşlarının referans olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Denenen farklı pH değerlerinde en yüksek killer aktiviteye *Debaryomyces* suşlarının, en düşük killer aktiviteye ise; *Candida* suşlarının sahip oldukları belirlenmiştir. Test edilen farklı tuz derişimlerinde ise; *Debaryomyces* suşlarının denenen tüm derişimlerde killer aktivite gösterebildikleri ortaya konulmuştur. Silva et al. (2011) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; *C. oleophila*, *P. membranafaciens*, *P. fermentas* ve *S. cerevisiae* türlerinin killer aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir.

Doğal zeytin fermantasyonlarında, mayaların yüksek tuz derişimlerine dayanıklılıklarının, istenen bir diğer olumlu özellik olduğu ifade edilmektedir. Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde salamuradaki tuz yüzdesinin ortalama %8-12 arasında olduğu bilinmektedir. Silva et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin örneklerinden izole edilen *C. oleophila*, *P. membranafaciens*, *P. fermentas*, *C. boidini* ve *T. delbrueckii* türlerinin %10' luk tuz derişimine dayanıklı oldukları belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada yüksek tuz derişiminin mayaların gelişmelerini desteklerken, LAB' nin gelişmelerini engellediği, bu nedenle elde edilen sofralık zeytinin asitliklerinin yeterince gelişemediği ifade edilmiştir.

Bazı mayaların sahip oldukları antimikrobiyel aktivitenin zeytinlerde bozulmalara neden olan bakteriler ile patojen bakterilerin gelişmelerini engellediği belirtilmektedir. Antimikrobiyel aktivitenin mayalarda suşa bağlı bir özellik olduğu da ifade edilmektedir (Silva et al., 2011).

Silva et al. (2011) tarafından Portekiz' de yapılan bir çalışmada, zeytinlerin doğal fermantasyon ortamından, çeşitli günlerde alınan salamura örneklerinden izole edilen mayaların antimikrobiyel aktiviteleri incelenmiştir. İzole edilen *P. membranafaciens*, *C. oleophila*, *S. cerevisiae*, *P. fermentas*, *C. boidinii*, *T. delbrueckii*, *C. citrea* suşlarından; *P. membranafaciens* türünün *Listeria*

monocytogenes (ATCC 7644) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) suşlarını; *C. oleophila* türünün *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 25923) ve *Staphylococcus enteridis* (ATCC 13076) suşlarını, *S. cerevisiae* türünün *Esherichia coli* (ATCC 25922), *L. monocytogenes* (ATCC 7644), *S. aureus* (ATCC 25923) suşlarını, *P. fermentas* türünün *S. aureus* (ATCC 25923) ve *Staphylococcus enteridis* (ATCC 13076) suşlarını, *C. boidini* türünün *L. monocytogenes* (ATCC 7644) ve *S. enteridis* (ATCC 13076) suşlarını, *T. delbrueckii* türünün *L. monocytogenes* (ATCC 7644) ve *S. aureus* (ATCC 25923) suşlarını, *Candida citrea* türünün ise; *L. monocytogenes* (ATCC 7644) ve *S. enteridis* (ATCC 13076) suşlarını inhibe ettikleri belirlenmiştir.

Sofralık zeytin üretiminde fermantasyona katılan mayaların katalaz aktivitelerinin pozitif olmasının, istenen bir diğer teknolojik özellik olduğu düşünülmektedir. Katalaz enziminin zeytinde yer alan doymamış yağ asitlerinin oksitlenmelerini engellediği ve peroksit oluşumunun önüne geçtiği ifade edilmektedir (Boutisto-Gallego et al., 2010). *C. oleophila*, *P. membranifaciens*, *P. fermentas*, *S. cerevisiae*, *C. boidini*, *C. citrea* ve *T. delbrueckii* türlerinin katalaz pozitif oldukları belirlenmiştir (Bevilacqua et. al., 2009). Boutisto-Gallego et al. (2010) tarafından İspanya' da gerçekleştirilen bir araştırmada Aloreña, Gordal ve Manzanilla türlerine ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından salamura örneklerinin alındığı ve bu örneklerden *S. cerevisiae*, *C. diddensiae*, *P. membranifaciens*, *Zygsacc. mrakii*, *D. hansenii*, *C. tropicalis*, *P. galeiformis*, *W. anomalus* ve *C. boidinii* türlerinin izole edildiği belirtilmiştir. Bu izole edilen türlerden *P. membranifaciens* ve *C. boidini* türlerinde katalaz enziminin varlığı doğrulanırken, *P. galeiformis*, *W. anomalus*, *D. etchellsii*, *H. guilliermondii* ve *C. tropicalis* türlerinde de katalaz aktivitesi olduğu belirlenmiştir. 2009 yılında yapılan bir çalışmada ise İtalya' ya özgü Bela Di Cerignola zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından fermantasyonun 7, 14, 21, 28 ve 35. günlerinde alınan zeytin ve salamura örneklerinden izole edilen *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa* ve *R. mucilaginosa* türlerinin tamamında, katalaz aktivitesi belirlenmiştir (Bevilacqua et al., 2009).

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde seçilmiş bir starter kültür kullanılmadığı, fermantasyonun LAB ve mayaların yardımıyla spontan olarak gerçekleştiği

bilinmektedir. Ancak son zamanlarda, sofralık zeytin üretiminde starter kültür kullanımına ilişkin ilgi ve eğilim artmaktadır. Bu şekilde standart bir ürün elde edilerek, zeytinde çeşitli bozulmalar sonucu meydana gelecek ekonomik kayıpların da önlenebileceği düşünülmektedir. Doğal zeytin fermantasyonunun ilk aşamalarında ortamda LAB' nin baskın oldukları ve bunların laktik asit üreterek ortam pH' sını düşürdükleri, daha sonra ise ortamda mayaların baskın hale gelerek fermantasyonu tamamladıkları ve son ürünün organoleptik özelliklerine katkı sağladıkları bilinmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Bu nedenle mayaların doğal fermente sofralık zeytin üretiminde destek starter olarak kullanılabilme potansiyellerinin araştırılması gerektiği düşünülmektedir. Bu bağlamda, destek starter olarak kullanılabilecek mayaların tür ve suş düzeylerinde tanımlanabilmelerinin de büyük önem taşıdığı ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2008).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda mayaların genotipik olarak tanımlanmalarının daha güvenilir sonuçlar verdiği ortaya koyulmaktadır. Genotipik tanımlamanın kromozomal ve ekstrakromozomal DNA analizlerini içerdiği ve fenotipik karakterizasyona dayanan geleneksel yöntemlere göre de bir çok üstünlüklerinin olduğu ifade edilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007). Doksanlı yıllardan beri, moleküler tanımlama metotların mayaların tanımlanmaları için de geliştirildiği ve kullanıldığı bilinmektedir. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) dayanan yöntemlerin kültürel yöntemlere oranla daha hassas ve çabuk sonuçlar verdiği ifade edilmektedir. Bu yöntem çeşitli tekniklerle birlikte tanımlama amaçlı kullanılabilmektedir. Bunlar; 1) Özel bir primer ile birlikte PZR kullanarak cins ve tür düzeyinde tanımlama, 2) Multipleks PZR, 3) PZR uygulaması ve daha sonra Southern blot uygulaması, 4) PZR uygulaması ve daha sonra amplikonların kesim enzimleri kullanılarak analizi; RFLP-PZR 5) Nested PZR, 6) Gerçek zamanlı (real-time) PZR, 7) PCR ve daha sonra dizi analizi, olarak sıralanabilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007).

Mayaların tanımlanmalarında kullanılan moleküler esaslı yöntemlerden biri Kromozomal Uzunluk Çeşitliliği (Chromosomal Length Polymorphism) olarak bilinmektedir. Bu yöntemin bir çok maya türünün genomlarının organizasyonları hakkında temel bilgiler verdiği ileri sürülmektedir. Bu yöntem kullanılarak tür, hatta

suş düzeyinde profillerin elde edildiği, elde edilen bu profillerin karşılaştırılması ile ise *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ve *Zygosaccharomyces* cinslerine ait türlerin belirlenebildiği; bunun yanı sıra *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* ve *Kluyveromyces* cinslerine ait türler arasındaki telemorf ve anamorf ilişkilerinin belirlendiği ifade edilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007).

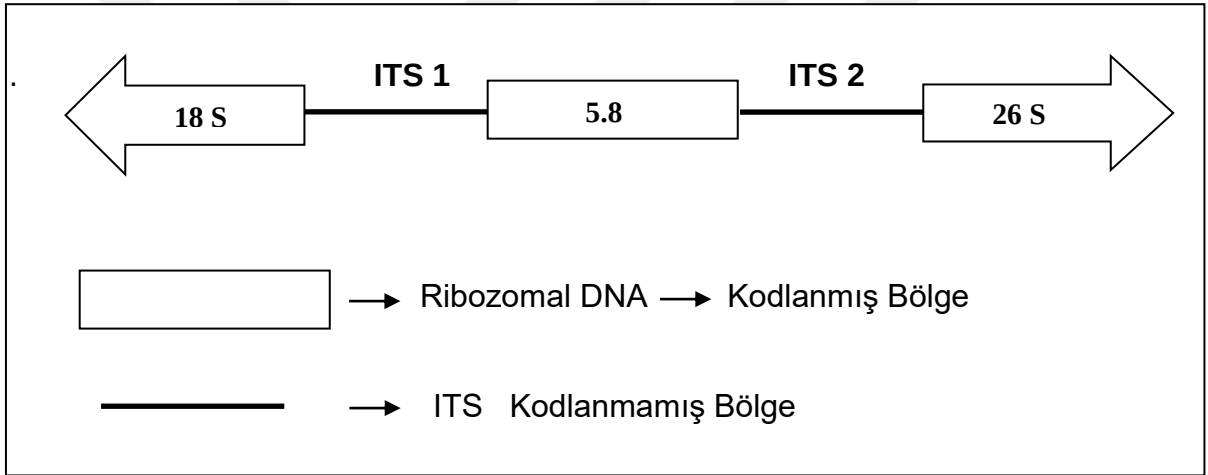
Mayaların mitokondriyal DNA boyutları arasında yüksek düzeyde farklılıklar olduğu ve bu boyutun 6 ile 25 µm arasında değişebildiği ifade edilmektedir. Bir çok maya türünde, mitokondriyal genomun dairesel bir topolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Mitokondriyal DNA polimorfizim (mtDNA) yönteminin, mayaların tanımlanmaları için kullanılan bir diğer moleküler esaslı yöntem olduğu belirtilmektedir. Uzun zaman önce, mitokondriyal DNA' nın izolasyonunda yaşanan zorluklar nedeni ile, bu yöntemin uygulamasında bazı problemlerin yaşandığı ifade edilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007). Ancak 1990 yılında Querol ve arkadaşlarının bu yöntemeye dayanan daha hızlı bir metot geliştirmeleri; 2001 senesinde ise, López ve arkadaşlarının geliştirilen bu yöntemi modifiye etmeleri ile günümüzde ön izolasyon ve saflaştırma işlemi yapmadan mtDNA' nın analizi mümkün olmuştur. Bu yöntemin çekirdek DNA' sı (nDNA) ve mtDNA arasındaki GC miktarı farklılığına dayandığı ifade edilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007).

Mayaların tanımlanmasında PZR ile birlikte kullanılan bir diğer yöntemin ise RFLP yöntemi olduğu ifade edilmektedir. Söz konusu yöntem, PZR ile çoğaltılmış hedef DNA parçasının endonükleaz enzimleri kullanılarak kesim profillerinin incelenmesine dayanmaktadır. Kesim parçaları arasındaki benzerlik derecesinin türler arasındaki korelasyonu ifade ettiği belirtilmektedir. Bu yöntemin, *Candida* ve *Cryptococcus* türlerini ayırmak için başarı ile kullanıldığı bilinmektedir. RFLP-PZR yöntemin, ITS1 (Internal Transcribed Spacer) ve ITS2 kalıtlararası ara bölgeleri içeren ribozomal DNA ve kodlanmış 5.8 rRNA geni kullanılarak uygulandığı belirtilmektedir. 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 ve 26S rDNA' nın genomik organizasyonları Şekil 2.6' da verilmektedir (Alcoba-Florez et al., 2007).

18S rDNA' yı çoğaltabilmek için; NS1, NS2, NS3, NS4, NS5, NS6, NS7 ve NS8 primerleri kullanılabildiği ve bu bölgeyi hedefleyen *Ava*I, *Taq*I, *Hha*I, *Cfo*I gibi kesim enzimlerinin kullanılabildiği ifade edilmektedir (Karasu-Yalçın vd., 2010). Bu

tanımlama yönteminde aynı türe ait farklı suşların aynı kesim profilini gösterdikleri, dolayısıyla RFLP-PZR, yöntemi ile tür düzeyinde bir tanımlama yapılabildiği ifade edilmektedir (Karasu-Yalçın vd., 2010). Rodriguez-Gómez et al. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, zeytin örneklerinden izole edilen maya suşları 5.8S-ITS bölgesine RFLP-PZR yöntemi uygulanarak tanımlanmışlardır. Uygulamada, ITS1 ve ITS4 primerleri ile *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* ve *ScrFI* kesim enzimlerinin kullanıldığı ifade edilmiştir. Söz konusu çalışmada; RFLP-PZR yöntemi ile *S. cerevisiae*, *C. boidinii*, *P. galeiformis* ve *P. membranifaciens* türlerinin tanımlanabildiği ifade edilmiştir.

Şekil 2.6. 18S rDNA, ITS1, 5.8S rDNA, ITS2 ve 26S rDNA' nın genomik organizasyonları



Moleküler esaslı tanımlama yöntemlerinden bir diğeri olan; rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) yöntemi ise, genellikle 10 nükleotitten oluşan tek çeşit kısa bir primer kullanılarak uygulanan, PZR yöntemine dayanmaktadır (Alcoba-Florez et al., 2007). Bu yöntemde, bağlanma sıcaklığı düşük (35-39°C) tutulduğu için kullanılan primerin hedef DNA' nın spesifik olmayan rastgele bölgelerine bağlanarak, bağlanma noktasından itibaren çoğaltılmış ampikonlar oluşturduğu ifade edilmektedir. Elde edilen farklı sayı ve boyuttaki PZR ürünlerinin elektroforez yöntemi ile görüntülenebildiği ve bu işlemin sonucunda da tür, bazen de suş düzeyinde farklılık gösteren bant profilleri elde edilebildiği belirtilmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Zeytin örnekleri

Çalışmada kullanılan zeytin örnekleri; Türkiye'nin zeytincilik açısından öne çıkan bir bölgesi olan Edremit-Havran' da, doğal fermente sofralık zeytin üretimi de gerçekleştiren Fora Zeytin-Antgıda A.Ş. ait üretim tesisinden sağlanmıştır. Bu amaçla, firma tarafından alımı gerçekleştirilen, 2010 hasat dönemine ait Manisa'nın Akhisar ve Bursa'nın İznik yörelerinde yetişen Gemlik çeşidi zeytinler çalışmamız için ayrılan iki ayrı havuzda sofralık zeytin üretmek üzere doğal fermantasyona bırakılmışlardır. Fermantasyon boyunca belli aralıklarla havuzlardan salamura ile birlikte zeytin örnekleri alınmış ve analiz için uygun şartlarda laboratuvara gönderilmişlerdir.

3.1.2. Maya suşları

Çalışmada, doğal fermente sofralık zeytin üretimi açısından önemli bir teknolojik özellik olarak kabul edilen killer aktivite deneylerinde kontrol kültürleri olarak; *S. cerevisiae* NCYC 232 (killer suş, K1), *S. cerevisiae* NCYC 738 (killer suş, K2) ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 (duyarlı suş) suşları kullanılmışlardır. Çalışmada kullanılan bu suşlar, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanmışlardır.

3.1.3. Maya tanımlama sistemi

Zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının tanımlanmaları amacı ile, API ID 32C (bioMérieux, Fransa) sistemi kullanılmıştır. Bu sistem, içerisine farklı karbon kaynaklarının emdirildiği; biri negatif kontrol olmak üzere 32 kuyucuktan oluşan mikro ölçekli bir asimilasyon test sistemidir (BioMérieux, 2006). Test sonuçlarının değerlendirilmesi, sistemin önerdiği şekilde kuyucuklara aşılana maya kültürünün karbon kaynaklarını kullanarak üremesi sonucunda oluşturduğu bulanıklık ve renk değişiminin otomatik bir sistemde

incelenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Aşılamları yapılan kitlerin değerlendirilmeleri için; mini API analiz cihazı ve bu sistem için geliştirilmiş olan Apilab Plus bilgisayar programı (bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır.

3.1.4. API-ZYM test sistemi

Araştırmada incelenecek olan maya izolatlarının enzim profillerinin saptanabilmesi amacı ile, API-ZYM test sisteminden (bioMérieux, Fransa) yararlanılmıştır. Bu sistem; içerisine farklı substratlar emdirilmiş, biri negatif kontrol olmak üzere 20 kuyucuktan oluşan ve 19 farklı enzim aktivitesinin belirlenebildiği mikro ölçekli bir sistemdir (BioMerieux, 2011).

3.1.5. Besiyerleri ve dilüsyon sıvısı

Çalışma sırasında, zeytinlerin doğal fermantasyonları boyunca alınan örneklerden maya izolasyonu ve sayımı amacı ile; Yeast Extract Peptone Dextrose Chloramphenicol (YEPDC, LabM) agar kullanılmıştır (Hurtado et al., 2008, Romo-Sanchez et al., 2010). Araştırmada zeytinlerin doğal fermantasyonları boyunca ortamdaki Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) sayılarını belirlemek için ise; Man, Rogosa and Sharpe (MRS, Fluka) agar besiyerinden yararlanılmıştır (Idoui et al., 2009; Aponte et al., 2010). Deneylerde, maya ve LAB' nin sayımları ve izolasyonları sırasında dilüsyon sıvısı olarak, %0.85 (w/v) derişiminde serum fizyolojik kullanılmıştır (Deák and Beuchat, 1996; Hurtado et al., 2008).

Araştırma sırasında zeytin ve salamura örneklerinden izole edilen mayaların saf stok kültürlerinin elde edilebilmesi amacıyla; Yeast Extract Malt Extract (YM) agar besiyerinden yararlanılmıştır (Psani and Kotzekidou, 2006).

Maya izolatlarının tanımlanmaları ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi sırasında da çeşitli besiyerlerinden yararlanılmıştır. Maya kültürlerinin, sıvı besiyerinde gelişme ve mikroskopik morfoloji özelliklerinin incelenebilmesi amacı ile; YM broth besiyeri kullanılmıştır.

Her iki yöreye ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca elde edilen maya izolatlarının koloni morfolojileri ve farklı sıcaklıklarda gelişme özellikleri, Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde incelenmiştir. İzole edilen kültürlerin asetik asit içeren ortamlarda gelişebilme özellikleri; %0.5 ve %1 (v/v) oranlarında asetik asit içeren Malt Asetik Agar (MAA) besiyerinde test edilmiştir. Maya izolatlarının yüksek derişimde şeker içeren ortamda gelişebilme özellikleri ise; Malt Extract Yeast Extract %50 Glucose (MY50G) ve Malt Extract Yeast Extract %60 Glucose (MY60G) agar besiyerleri kullanılarak belirlenmiştir. Maya suşlarının glukozu fermente edebilme yetenekleri; %2 (w/v) şeker içeren Durhamlı besiyeri; nitrata asimile etme yetenekleri ise; Yeast Carbon Base (YCB, Difco) agar besiyeri kullanılarak test edilmiştir. İzole edilen mayaların tanımlanması amacı ile kullanılan bir diğer test olan; üre hidrolizi analizini gerçekleştirmek amacı ile, Rapid Urea Broth besiyerinden faydalanılmıştır. Kültürlerin askospor oluşturma özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ise; Gorodkova agar ve McClary Acetate agar besiyerleri; pseudohif oluşturma yeteneklerinin belirlenebilmesi amacı ile ise; Potato Dextrose Agar (PDA, LABM, İngiltere) besiyeri kullanılmıştır (Deák and Beuchat,1996; Yarrow, 2000).

İzole edilen bazı maya kültürlerinin moleküler esaslı teknikler kullanılarak tanımlanmalarından önce Lizin agar besiyeri kullanılarak *Saccharomyces* cinsine ait olan mayaların doğrulanmaları gerçekleştirilmiştir. Mayaların moleküler genotiplendirilmelerinin yapıldığı deneylerde maya kültürlerinin aktifleştirilmeleri ve DNA izolasyonlarının yapılabilmesi amacı ile, YM broth besiyeri kullanılmıştır.

Maya izolatlarının doğal fermente sofralık zeytin üretimi açısından önemli bazı teknolojik özelliklerinin incelendiği deneylerde, kültürlerin aktifleştirilmeleri amacıyla; YM broth ve YM agar besiyerlerinden yararlanılmıştır. Mayaların düşük sıcaklıklarda, düşük pH değerlerinde ve yüksek tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile analize uygun olarak hazırlanmış YM broth besiyerinden yararlanılmıştır. Kültürlerin pektolitik aktiviteleri %0.5 (w/v) oranında narenciye pektini (Balmumcu, Ankara) içeren Yeast Nitrogen Base-Narenciye Pektini (YNB-NP) agar besiyerinde; proteolitik aktiviteleri %10' luk (w/v) Milk agar besiyerinde; katalaz aktiviteleri ise; YM agar besiyerinde belirlenmiştir. Maya suşlarının killer aktivite ve killer toksinlere duyarlılık/dayanıklılık testleri; %0.003

(w/v) metilen mavisi içeren YEPD-MB agar besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Maya kültürlerinin farklı şekerleri fermente edebilme özellikleri; %2 (w/v) şeker içeren Durham' lı fermantasyon besiyerlerinde belirlenmiştir. İzolatların asetik asit üretme özelliklerini belirlemek amacıyla %0.5 (w/v) CaCO_3 içeren YEPD agar besiyeri; zeytinyağını hidrolize edebilme özelliklerini belirlemek amacıyla %5 (v/v) zeytinyağı içeren Gorodkova agar besiyeri; tribütirini hidrolize edebilme özelliklerini belirlemek amacıyla ise; Tributyrin agar (TBA) besiyeri kullanılmıştır. Maya izolatlarının sitrik asiti kullanma testleri; Yeast Nitrogen Base (YNB) agar besiyerinde gerçekleştirilmiştir. Kültürlerin oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme testleri; %0.5 ve %1.5 (w/v) zeytin yaprağı özütü (Kale Naturel, Edremit) içeren YNB-ZY agar besiyeri kullanılarak yapılmıştır. İzolatların H_2S üretimlerinin incelenmesinde ise; Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast (BIGGY) agar besiyeri kullanılmıştır.

EK-1' de araştırmada kullanılan tüm besiyerlerinin bileşimleri ve hazırlanışları yer almaktadır.

3.1.6. Araştırmada kullanılan tampon, boya ve diğer çözeltiler

Araştırmada, maya izolatlarının moleküler esaslı tekniklerle karakterizasyonları sırasında çeşitli çözeltilerden yararlanılmıştır. Maya kültürlerinin DNA izolasyonları sırasında, santrifüjlendirilerek çöktürülmüş ve YM broth besiyerinden ayrılmış maya hücrelerini yıkamak amacı ile Tampon I çözeltisi kullanılmıştır. Maya suşlarının hücre duvarını parçalayarak DNA' yı hücre dışına çıkarmak amacı ile ise; Zymolias 60000 enzimi (Amsbio, İngiltere) kullanılmıştır. Hücrelerden nükleik asitlerin ekstraksiyonu, Tampon II çözeltisi ile gerçekleştirilmiştir. Ortamda bulunan proteinleri bağlamak amacıyla %10' luk (w/v) Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) çözeltisi; SDS ile bağlanan proteinleri çöktürüp uzaklaştırmak amacı ile ise de; 5 M potasyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. DNA' nın su moleküllerini bağlamasını önlenmesi ve çöktürülmesi için ise; izopropanol ve %70' lik etil alkol çözeltilerinden yararlanılmıştır. Elde edilen DNA' lar Tris/EDTA (TE) tamponunda çözülmüşlerdir. Tampon I çözeltisinin hazırlanması sırasında; 0.9 M Sorbitol, 0.1 M EDTA (pH 7.5); Tampon II çözeltisinin hazırlanması sırasında; 50 mM Tris (pH 7.4) ve 20 mM EDTA; TE tamponunun hazırlanması sırasında ise; 10 mM Tris (pH 7.4) ve 1 mM

EDTA (pH 8.0) çözeltileri kullanılmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında ve elektroforez tankında örneklerin yürütülmesi sırasında; 1.0X TBE tamponu kullanılmıştır. Çalışmada, agaroz jel içerisindeki DNA' nın boyanması amacı ile; 50 mM derişimindeki etidyum bromür çözeltisi ve elektroforez işleminde örneklerin jele yüklenmesi için 10X jel yükleme tamponu kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan tampon, boya ve diğer çözeltilerin bileşimleri ile hazırlanışları, EK-2' de verilmektedir.

Laboratuvara salamura içerisinde gelen zeytin örneklerindeki tuz ve titrasyon asitliği miktarlarının tayininde, titrimetrik yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu amaçla, tuz miktarı tayininde titrasyon çözeltisi olarak, 0.1 N AgNO₃, indikatör olarak; %5' lik K₂CrO₄ çözeltisi, titrasyon asitliği tayininde ise; titrasyon çözeltisi olarak, 0.1 N NaOH ve indikatör olarak ise; fenolftalein çözeltisi kullanılmıştır.

3.1.7. Kesim enzimleri

Araştırmada izole edilen mayaların RFLP-PZR yöntemi ile moleküler tanımlanmaları sırasında, *Saccharomyces* cinsi dışındaki mayalar için *CfoI*, *Hinfi*, *HaeIII* kesim enzimleri, *Saccharomyces* cinsindeki mayaların tanımlanmaları için ise *CfoI*, *Hinfi*, *HaeIII* ve *HpaII* kesim enzimlerinden yararlanılmıştır (Fernandez-Gonzalez et al., 2000).

3.1.8. Moleküler tanımlamada kullanılan ısı döngü cihazı ve yatay elektroforez sistemi

Çalışmada kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yönteminin uygulanışında, DNA parçalarının çoğaltılabilmesi amacı ile, Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) marka (ABD) bir ısı döngü cihazı kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünlerinin görüntülenmesi; EC Apparatus marka (ABD) yatay elektroforez tankları (Mini-Sub Cell GT) ve güç kaynağı (EC Apparatus EC 105) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1.9. Jel görüntüleme sistemi

Elektroforez yöntemi kullanılarak agaroz jelde yürütülen DNA parçaları, Syngene Bio Imaging (Birleşik Krallık) marka bir jel görüntüleme cihazı kullanılarak görüntülenmiştir.

3.2. Metot

3.2.1 Doğal fermantasyon yolu ile sofralık zeytin üretimi ve numune alımı

Çalışmada kullanılacak olan Gemlik tipi zeytinlerin fabrikaya alımları; hasadı takiben, Manisa' nın Akhisar ve Bursa' nın İznik yörelerinden sırasıyla; Ekim 2010 ve Kasım 2010 tarihlerinde gerçekleştirilmiştir. Fabrikada alımı gerçekleştirilen zeytinlerin doğal fermantasyon yöntemi ile sofralık zeytine işlenmelerinde izlenen yol, Şekil 3.1.' de verilmektedir. Şekil 3.1' de görülebileceği gibi; zeytinler kalibrasyon ve yıkama gibi ön işlemler uygulandıktan sonra, aynı gün içerisinde, fabrikada bu çalışma için ayrılan Akhisar yöresine ait zeytinler için 15 ton, İznik yöresine ait zeytinler için ise 9 tonluk beton havuzlara alınmışlardır. Daha sonra havuzlara %10-12 (w/v) derişiminde NaCl içeren salamura eklenmiş ve baskı taşları ile kapatılmışlardır.

Fabrikada, Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri yaklaşık yedi ay, İznik yöresine ait zeytinler ise; yaklaşık altı ay boyunca doğal fermantasyona bırakılmışlardır. Fermantasyon boyunca salamura sirkülasyonu gerçekleştirilmiştir. Fermantasyon süreçlerinin izlenmesi, fabrikada yapılan bazı rutin laboratuvar testleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışma için, laboratuvara ilk olarak yıkanmamış ham zeytin örnekleri gönderilmiştir. Daha sonra ise zeytin örnekleri belirli zaman aralıklarında; ilk ay boyunca haftada bir, ikinci ay boyunca iki haftada bir ve daha sonra fermantasyon boyunca ayda bir aseptik koşullar altında salamurası ile birlikte paralel olarak alınarak, 1000' er gramlık vakumlu olarak kapatılmış ambalajlarda laboratuvara gönderilmişlerdir.



Şekil 3.1. Gemlik tipi siyah zeytinden doğal fermente sofralık zeytin üretimi

3.2.2. Zeytin Örneklerine Uygulanan Bazı Kimyasal Analizler

Fermentasyon boyunca belirli zaman aralıklarında salamura ile birlikte alınan zeytin örneklerinde tuz, pH ve serbest asitlik analizleri yapılmıştır. Tuz tayini titrimetrik olarak Mohr yöntemi kullanılarak yapılmış, serbest asitlik tayini ise laktik asit cinsinden belirlenmiştir (Dokuzlu, 2004).

3.2.3. Fabrikada zeytin örneklerine uygulanan bazı analizler

Fabrikada, fermentasyon boyunca belirli aralıklarla deneme havuzlarından, zeytin ve salamura numuneleri alınarak; tuz (%), pH, CaCl_2 kalıntısı (%) ve invert şeker analizleri gibi bazı kimyasal analizler ile; ortalama kalibrasyon, yumuşaklık (%),

renk, patlak/ezik tane (%), kabuk ayrılması (%) ve böcek zararı (Dacus vb.) (%) gibi bazı fiziksel analizlerin yapıldığı belirtilmiştir.

Fabrikaya ham zeytin kabulü sırasında ise; ortalama kalibrasyon, yumuşaklık (%), renk, böcek zararı (Dacus vb.) (%), yabancı varyete (%), mantar (%), çürük tane (%), don zararı (%), dolu zararı (%) ve kıvrıkcık tane (%) analizlerinin yapıldığı ifade edilmiştir.

3.2.4. Mikrobiyolojik analizler

3.2.4.1. Laktik Asit Bakterisi sayımı

Laboratuvara getirilen zeytin örneklerinden, aseptik koşullara dikkat edilerek, 15 g zeytin, 10 g salamura olmak üzere toplam 25 g alınarak steril Stomacher torbalarına konulmuş, daha sonra 225 mL steril %0.85' lik serum fizyolojik eklenerek, torbalarının dışından zeytinler el ile parçalanmış ve homojenizasyonları sağlanmıştır. Böylece zeytinin yüzeyindeki mikrofloranın, dilüsyon sıvısına geçmesi sağlanmıştır. Zeytin örneklerindeki toplam LAB sayısının belirlenmesi amacıyla, hazırlanan uygun dilüsyonlardan %0.1 Tween 80 içeren MRS agar besiyerlerine dökme plaka plaka yöntemi ile ekimler yapılmış ve inoküle edilen besiyerleri, 37°C' de 48-72 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Petri' lerde üreme gözlenen kültürler incelenerek, 30-300 arasında koloni içeren kültürlerde sayımlar yapılmıştır.

3.2.4.2. Maya sayımı ve izolasyonu

Zeytin örneklerinden maya sayımı ve izolasyonu amacıyla, Bölüm 3.2.4.1' de belirtildiği gibi hazırlanarak homojenize edilen örneklerden, %0.85 serum fizyolojik içeren dilüsyon ortamlarında uygun seyreltiler hazırlanarak, bu dilüsyonlardan YEPDC agar besiyerlerine yüzeye sürme yöntemi ile ekimler yapılmıştır. 28°C' de 2-4 gün inkübasyona bırakılan Petri' ler incelenerek, 30-300 arasında koloni sayısı gözlenen kültürlerde sayımlar yapılmıştır. Sayımın yanı sıra, çalışılan zeytin örneğinden elde edilen kültürlerdeki farklı makroskopik morfolojiye sahip maya kolonilerinin her birinden rastgele en az bir koloni seçilerek, tüplerde yatık olarak

hazırlanmış YM agar besiyerlerine ekimler yapılmış ve saf kültürler elde edilmiştir. Elde edilen saf kültürler daha sonra yapılacak analizler için 4°C' de, buzdolabında saklanmıştır.

3.2.5. Maya izolatlarının API ID 32C sistemi ile tanımlanmaları

Çalışılan zeytinler ve bu zeytinlerin doğal fermantasyonları sırasında izole edilen mayaların tanımlanabilmeleri amacı ile, Bölüm 3.1.3' de belirtilen API ID 32C (bioMérieux, Fransa) tanımlama sisteminden yararlanılmıştır. Sistemin kullanılmasında ilk olarak YM broth besiyerinde aktive edilen saf maya kültürleri, YM agar besiyerinde 28°C 'de 24 saat geliştirilmişlerdir. Daha sonra, bu kültürlerden bir veya birkaç koloni alınarak, 2 mL' lik steril damıtık su ortamlarına aktarılmış ve sistem tarafından önerilen 2±0.1 McFarland' lık bulanıklığa sahip süspansiyonlar elde edilmiştir. Maya süspansiyonlarının bulanıklıklarını ölçmek amacı ile bir densimat cihazı (bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Yaklaşık olarak aynı hücre derişimine sahip bu maya süspansiyonlarından 250 µL alınarak kit ile birlikte verilen hazır C ortamına aktarmalar yapılmış ve çözelti otomatik pipet yardımı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Hazırlanan bu ortamdan, API ID 32C kitinde yer alan 32 kuyucuktan her birine otomatik pipet yardımı ile 135 µL' lik aşılamlar gerçekleştirilmiş ve kitler 28°C' de 48 saat inkübe edilmişlerdir. Kitlerde, inkübasyon sonucunda, üreme gerçekleşen kuyucuklarda bulanıklıklar gözlenmiş ve test sonuçları kitlerin, Apilab Plus bilgisayar programını içeren mini API analiz cihazında (bioMérieux, Fransa) otomatik olarak okutulması ile elde edilmiştir.

3.2.6. Maya izolatlarının uygulanan ek testlerle tanımlanmaları

Araştırmada API ID 32C tanımlama sistemi kapsamında uygulanan asimilasyon testlerinin yanı sıra, maya izolatlarının tanımlanmaları amacıyla literatürde yapılması önerilen bazı ek tanımlama testleri de gerçekleştirilmiştir. (Deák and Beuchať, 1996; Yarrow, 2000). Uygulanan bu ek biyokimyasal testler ile mayaların API ID 32C sistemi ile saptanamayan telemorf formlarının belirlenmesi ve bu sistem ile cins düzeyinde tanımlanabilen bazı kültürlerin türlerinin saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca API ID 32C sistemi ile kesin olarak tanımlanamayan bazı

izolatlar, yine sistemin önerdiği bazı ek testler yardımı ile kesin olarak tanımlanabilmişlerdir.

Çalışmada ek tanımlama testleri olarak; makroskopik ve mikroskopik morfoloji, sıvı besiyerinde gelişme özellikleri, glukoz fermantasyonu, üre hidrolizi, nitrat asimilasyonu, 37°C' de gelişme, %50 ve %60 (w/v) glukoz içeren besiyerlerinde gelişme, %0.5 ve %1 (v/v) asetik asit içeren ortamlarda gelişme, pseudohif ve askospor oluşumları gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.1. Sıvı besiyerinde gelişme

Maya izolatlarının sıvı besiyerinde gelişme özelliklerinin belirlenmesinde; YM broth besiyeri kullanılmıştır. Ekimi gerçekleştirilen kültürler 28°C' de 24 saat inkübe edilmiş ve kültürlerin sıvı besiyerinde gelişme özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla kültürlerin halka, tırmanan ve parçalı zar oluşturma ile bulanıklık, çökelti ve köpük oluşturma, asılı partikül oluşturma özellikleri değerlendirilmiştir (Yarrow, 2000).

3.2.6.2. Mikroskopik morfoloji

Mayaların mikroskopik morfolojileri YM broth besiyerinde 24-48 saat geliştirilen kültürlerden preparatlar hazırlanarak belirlenmiştir. Mikroskopik olarak incelenen kültürlerde, izolatların tomurcuklanma veya bölünme ile çoğalma özellikleri, hücre şekilleri (küresel, elipsoidal, oval, vb.) ve bir arada bulunma özellikleri incelenmiştir (Harrigan, 1998; Yarrow, 2000; Kurtzman et al., 2003).

3.2.6.3. Makroskopik morfoloji

Maya kültürlerinin makroskopik morfolojilerinin incelenmesi amacı ile YM broth besiyerinde aktifleştirilen saf kültürler, MEA besiyerlerine tek koloni düşürme tekniği ile ekilmiş, ekimi gerçekleştirilen Petriyer 28°C' de 4 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda oluşan koloniler, koloni çapı, rengi, çapı, kenar yapısı, parlaklığı, kuruluğu, tepeden ve yandan görünümüleri açısından incelemeye alınmışlardır (Kurtzman et al., 2003; Temiz, 1996).

3.2.6.4. Glukoz fermantasyonu

Maya izolatlarının glukoz fermantasyonlarının değerlendirilmeleri %2 (w/v) glukoz içeren durham tüplü şeker fermantasyonu besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Aşılama yapılan besiyerleri 28°C' de 28 gün inkübasyona bırakılmışlar ve süre sonunda durham tüplerinde gaz oluşumu açısından değerlendirilmiştir. Durham tüpünde gaz oluşturan kültürler pozitif, oluşturmamayanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Kurtzman et al., 2003).

3.2.6.5. Üre hidrolizi

Maya taksonomisi açısından oldukça önemli bir test olan üreyi hidrolize etme yeteneğinin, bazidiomiset ve askomiset mayaları birbirinden ayırt etmek için kullanıldığı bilinmektedir (Deák and Beuchat, 1996; Yarrow, 2000). Çalışılan maya izolatlarının üre hidrolizi yetenekleri; YM agar besiyerinde uygun koşullarda geliştirilen maya kültürlerinin, tüplerde hazırlanmış olan 0.5 mL hacmindeki; Rapid Urea broth besiyerlerine yoğun olarak aşılınmaları ile belirlenmiştir. Ekimi gerçekleştirilen kültürler, 37°C' de 4-24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda koyu pembe renk oluşumu gözlenen kültürler üre hidrolizi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Deák and Beuchat, 1996; Yarrow, 2000; Kurtzman et al., 2003).

3.2.6.6. Nitrat asimilasyonu

Mayaların çoğunlukla bir çok azot kaynağını kullanabildikleri, ancak genel olarak mayaların nitrat asimilasyonu analizlerinde nitrat, nitrit, etilamin, hidroklorid, L-lizin, imidazol, glukozamin, keratin ve keratinin gibi azot kaynaklarının kullanıldığı bilinmektedir (Yarrow, 2000). Araştırmada, mayaların nitratı asimile edebilme özelliklerinin incelenmesi amacı ile nitrojen kaynağı olarak nitrat kullanılmış ve YCB agar besiyerinden yararlanılmıştır. Kültürlerin ekimleri "oxonografik" yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla YM broth besiyerinde uygun koşullarda aktive edilen saf kültürler YM agar besiyerine aşılınmış maya kültürleri, 2mL' lik saf su içeren tüplere 2 McFarland' lık bulanıklık elde edilecek şekilde süspanse edilmiştir. Süspanse edilen kültürler YCB agar besiyerlerine 0.5 mL

hacminde, dökme plak tekniği ile ekilmişlerdir. Ortamlar katılaştıktan sonra besiyeri yüzeylerine, nitrat kaynağı olarak; potasyum nitrat partikülleri, pozitif kontrol olarak ise; pepton partikülleri konulmuştur. Kùltürlerin 25°C' de 2-4 günlük inkübasyonlarının sonunda, nitrat kaynağı etrafında üreme gözlenen kùltürlerin pozitif reaksiyon verdikleri kabul edilmiştir (Deák and Beuchat, 1996; Yarrow, 2000).

3.2.6.7. 37°C' de gelişme

Maya izolatlarının tanımlanmaları amacı ile 37°C' de gelişme testi de uygulanmıştır. Genel olarak mayaların optimum gelişme sıcaklıklarının 20-25°C arasında olduğu, mezofilik mayaların yanı sıra 4-15°C sıcaklık aralığında gelişebilen psikrofilik türlerin ve 30-37°C arasında gelişebilen bazı türlerin de olduğu belirtilmektedir (Yarrow, 2000). Mayaların 37°C' de gelişme özelliklerinin incelendiği denemelerde MEA besiyerine ekimi gerçekleştirilen kùltürler 37°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kùltürler pozitif olarak değerlendirilmişlerdir (Yarrow, 2000).

3.2.6.8. Yüksek şeker derişimlerinde gelişme

Bir çok maya türünün bakterileri inhibe edebilecek kadar yüksek şeker konsantrasyonlarında gelişebildikleri belirtilmektedir. Yüksek oranda şeker ve tuz içeren gıdalardan izole edilen mayaların yüksek ozmotik basınca dayanıklı oldukları ifade edilmektedir. Bir çok maya türünün %40' a kadar olan şeker içeren ortamlarda gelişebildikleri, ancak birkaç türün %50-70 oranında şeker içeren ortamlarda gelişebildikleri belirtilmektedir (Deák and Beuchat, 1996; Yarrow, 2000). Maya suşlarının yüksek derişimde şeker içeren ortamlarda gelişme özelliklerinin incelenmesi amacıyla %50 ve %60 (w/v) glukoz içeren MY50G ve MY60G agar besiyerlerine ekimleri yapılmış ve ekimi gerçekleştirilen kùltürler 28°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonunda mayalar üreme durumlarına göre değerlendirilmişlerdir (Yarrow, 2000).

3.2.6.9. Asetik aseti tolere edebilme

Maya izolatlarının asetik asiti tolere edebilme yeteneklerinin, onların tanımlanmaları için önemli bir özellik olduğu belirtilmektedir (Yarrow, 2000). Maya izolatlarının %0.5 ve %1 (v/v) asetik asit içeren ortamlarda gelişebilme özelliklerinin incelenmesi amacıyla, YM broth besiyerinde canlandırılmış maya izolatları MAA besiyerine çizgi ekim yöntemi ile paralel olarak ekilmiş ve 28°C' de 7 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda gelişebilen kültürlerin asetik asidi tolere edebildikleri kaydedilmiştir (Yarrow, 2000).

3.2.6.10. Pseudohif oluşturma

Mayaların tek hücreli olmalarına rağmen, bazı suşlarının gerçek hif ya da pseudohif oluşturdıkları bilinmektedir (Deak and Beuchat 1996). Maya suşlarının pseudohif oluşturma özellikleri Dalmau plate yöntemine göre belirlenmiştir (Yarrow, 2000). Bu amaçla kültürler yöntemin önerdiği şekilde Petri'lerdeki PDA besiyerlerine ekilmiş ve 25°C' de 7-18 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon boyunca belli aralıklarla kültürler mikroskop altında incelenerek pseudohif oluşturma özellikleri değerlendirilmiştir.

3.2.6.11. Askospor oluşturma

İzole edilen mayaların anamorf ve telemorf formlarının ayırt edilebilmesi amacı ile uygulanan askospor oluşturma testinde; yatık Gorodkova agar ve McClary Acetate agar besiyerlerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla YM broth besiyerinde aktiveleştirilen kültürlerden söz konusu besiyerlerine ekimler yapılmış ve 25°C' de 3 hafta inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda gelişen kültürlerden preparat hazırlanarak, spor boyama uygulanmış ve kültürlerin askospor oluşturma yetenekleri mikroskop altında incelenmiştir (Yarrow, 2000).

Çalışmada mayaların tanımlanmaları için gerçekleştirilen bazı testlerde elde edilen kültürlerin mikroskop görüntülerinin fotoğrafları, bölümümüzde bulunan Olympus marka BH2-241402 model (Japonya) mikroskop ve buna adapte edilmiş olan C-7070 model (Olympus) bir fotoğraf makinesi ile çekilmişlerdir.

3.2.7. Maya izolatlarının moleküler esaslı yöntemlerle tanımlanmaları

Çalışma sırasında izole edilen ve canlılıklarını sürdürebilen maya kültürlerinin moleküler esaslı yöntemlerle tanımlanmaları; İspanya Castilla La Mancha Üniversitesi, Gıda Bilimi Bölümü, Biyoteknoloji Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla maya suşlarının DNA izolasyonları gerçekleştirildikten sonra elde edilen DNA' lara RFLP-PZR yöntemi uygulanmıştır.

3.2.7.1. DNA izolasyonu

Maya kültürlerinin DNA izolasyonları Querol et al. (1992) tarafından önerilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Maya kültürlerinden DNA izolasyonu amacı ile; YM broth besiyerinde 30°C' de 48 saat aktive edilen kültürler kullanılmıştır. Bu amaçla ilk olarak, YM broth besiyerinde geliştirilmiş olan maya kültürleri tek kullanımlık santrifüj tüplerine alınarak, bir santrifüjde (5415 C model Eppendorf, İspanya) 10 000 rpm' de 2 dakika santrifüjlenmişlerdir. Santrifüjleme işlemi sonunda üstte kalan sıvı kısım mikropipet yardımı ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır. Daha sonra steril tüp içerisindeki maya peleti üzerine 1,5 mL saf su eklenerek bir karıştırıcıda karıştırılmış ve karışımın tamamı steril bir Eppendorf tüpüne alınmıştır. Eppendorf tüpleri içerisindeki karışım 10 000 rpm' de 2 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz dikkatlice ayrılmıştır. Daha sonra, Eppendorf içerisinde kalan pellet üzerine 500 µL tampon 1 çözeltisi (0,9 M sorbitol, 0.1 M EDTA, pH 7.5) ilave edilmiş ve karışım mikropipet yardımıyla dikkatlice karıştırılmıştır. Tüpteki çözelti üzerine 30 µL Zymolyase 60000 enzimi (Seikagaku Biobusiness, Japonya) ilave edilip, bir termomikserde (Eppendorf, İspanya) 37°C' de 20 dakika bekletilerek hücre duvarının parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra termomikserden alınan karışım 10 000 rpm' de 2 dakika santrifüjlenmiş ve üst faz pellet ile karıştırmadan mikropipet ile ayrılarak, atılmıştır. Eppendorf içerisindeki pellet üzerine, hücre zarını parçalamak için, 500 µL tampon 2 çözeltisi (50 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilmiş ve karışım mikropipet yardımıyla dikkatlice karıştırılmıştır. Daha sonra proteinleri bağlamak amacıyla bu karışım üzerine 13 µL %10' luk SDS eklenmiş ve termomikserde, 65°C' de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında, proteinleri çöktürmek için buzdolabı soğukluğunda bekletilen 200 µL potasyum asetat ilave edilmiş ve

dondurucuda 5 dakika bekletilmiş böylece SDS' in çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra karışım, 12 000 rpm' de 10 dakika tamamen berrak hale gelene kadar santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonunda Eppendorf tüpünde oluşan ve hücre nükleik asitlerini içeren üst faz dikkatlice, alt faz ile karıştırılmadan alınarak, yeni steril Eppendorf tüplere aktarılmıştır. Hücre nükleik asitlerini içeren karışım içerisine, RNA' nın parçalanabilmesi amacı ile, 0,4 mL karışımda 3 µL olacak şekilde RNase enzimi (10 mg/mL, Sigma, Almanya) eklenmiş ve karışım termomikserde 37°C' de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışım içerisindeki suyu bağlamak için 600 µL izopropanol ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra Eppendorf tüpü 12 000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenerek nükleik asitlerin tüpün dip kısmında toplanmaları sağlanmıştır. Üst faz dikkatli şekilde mikropipetle atıldıktan sonra çökelti, 500 µL %70' lik etanol içerisinde tekrar çözölmüş ve 12 000 rpm' de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüjleme işlemi sonrasında üst faz dikkatlice mikropipet yardımı ile atılmıştır. Etanolü tamamen uzaklaştırmak için Eppendorf tüpler yoğunlaştırıcıda 20 dakika bekletilmiş, sonrasında dipte kalan DNA, 50 µL TE tamponu içerisinde tekrar çözölmüştür. Gerçekleştirilen işlemler sonunda elde edilen DNA çözeltisi, kullanılıncaya kadar -20°C' de saklanmıştır.

3.2.7.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İncelenecek maya izolatlarının RFLP-PZR yöntemi ile genotiplendirilmeleri Fernandez-Gonzalez et al. (2000)' e göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem esas olarak; izole edilen maya DNA' larına PZR işlemi uygulanarak, hedeflenen bölgenin çoğaltılması ve elde edilen PZR ürünlerinin kesim enzimleri ile maya türüne özgü bölgelerden kesilmesi aşamalarından oluşmaktadır.

İzole edilen maya DNA' larının amplifikasyonları, Bölüm 3.1.8' de belirtilen ısı döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA' ların çoğaltılmaları amacı ile ITS1 ve ITS4 primerleri kullanılmıştır. Yöntemin uygulanmasında 1µL hedef maya DNA' sı, toplam 50 µL hacmindeki reaksiyon ortamında çoğaltılmıştır. Amplifikasyon amacı ile kullanılan PZR reaksiyon ortamının bileşimi; 0.25 µL Taq DNA polymerase (5U/µL, Biotools, İspanya), 5 µL deoxynucleotide triphosphate mix (dNTP mix, Biotools, İspanya), 10X PZR reaksiyon tamponu (Standard

reaction buffer; 75 mM Tris HCl (pH 9.0), 2 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 20 mM (NH₄)₂ SO₄ (Biotools, İspanya), 0.5 µM ITS1 primeri (Biotools, İspanya) ve 0.5 µM ITS4 primeri (Biotools, İspanya)'dır.

Çalışmada kullanılan; ITS1 ve ITS4 primerlerinin dizileri aşağıda verilmektedir:

ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

Çoğaltma işlemi sırasında kullanılan PZR programı şu basamaklardan oluşmaktadır; 95°C' de 5 dakika başlangıç denatürasyon aşaması, 95°C' de 30 saniye denatürasyon, 52°C' de 1 dakika bağlanma ve 72°C' de 1 dakika uzama aşamaları ve 72°C' de 7 dakika son uzama aşaması. Bu aşamalardan başlangıç denatürasyon ve son uzama aşamaları 1' er kez denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları ise 40 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.3. Kesim parçası uzunluk çeşitliliği

İncelenecek maya izolatlarının RFLP-PZR yöntemi ile genotiplendirilmeleri Fernandez-Gonzalez et al. (2000)' e göre gerçekleştirilmiştir. Yöntem esas olarak; izole edilen maya DNA'larına PZR işlemi uygulanarak, hedeflenen bölgenin çoğaltılması ve elde edilen PZR ürünlerinin kesim enzimleri ile maya türüne özgü bölgelerden kesilmesi aşamalarından oluşmaktadır.

RFLP yönteminde, amplifikasyon işlemi sonucunda elde edilen PZR ürününün; 12 µL' lik reaksiyon ortamında kesim enzimi ile kesilmesi sağlanmıştır. Bu amaçla her bir reaksiyon ortamı için 8 µL amplikon, reaksiyon ortamına aktarılmıştır.

Çalışmada kullanılan reaksiyon ortamının bileşimi; 0.25 µL kesim enzimi ve bu enzime özel olarak kullanılan belirli derişimdeki tampon (2.0 µL) (Roche, Almanya) ve 9,75 µL ultra saf sudan oluşmaktadır. Çalışmada; *HaeIII*, *CfoI*, *HinfI* ve *HpaII* (Roche, Almanya) kesim enzimleri kullanılmıştır. Deneyin uygulanışında, 8 µL amplikon içeren 20 µL' lik reaksiyon ortamının 37°C' de 7 saat termomikserde inkübe edilmesi ile enzim reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlanmıştır. İnkübasyon

süresi sonunda, kesim enzimleri ile elde edilen DNA bantlarının ayrılabilmesi amacıyla; elektroforez sisteminde %2.0 (w/v) agaroz jelde yürütme işlemi uygulanmıştır. Elektroforez işlemi sonrasında ayrılan DNA bantlarının oluşturdukları profiller, Syngene Bio Imaging (Birleşik Krallık) marka bir görüntüleme sistemi yardımı ile görüntülenmiştir (Fernandez-Gonzalez et al., 2000). Elde edilen bant profilleri www.yeast-id.com adresinde yer alan mayaların kesim profilleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir (<http://www.yeast-id.com>)

3.2.7.4. Dizi analizi

Çalışmada RFLP-PZR yöntemi ile kesin olarak tanımlanamayan üç maya izolatına dizi analizi uygulattırılmıştır. Dizi analizi hizmet alımı şeklinde, A.M.G Bilim Parkı Vakfı, Genetik Birimi'nde, (Unidad de Genómica A.M.G Fundación Parque Científico, Madrid) yaptırılmıştır. Dizi analizi için "ABI 3730x1 automatic sequencer" (Applied Biosystems) ve "Thermo Sequenase dyeterminator cycle-sequencing premixture kit" (Amersham Life Science) kullanılmış olup, her iki programdan alınan sonuçlar BLAST programı kullanılarak karşılaştırılmışlardır (Altschul et al., 1997).

3.2.8. Maya suşlarının zeytincilik açısından önemli bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi

Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca ortamda kalabilen ve literatürde zeytin üretiminde starter kültür ve/veya destek kültür olarak kullanılabilme potansiyeli taşıdıkları ifade edilen bazı maya izolatlarının teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla, tanımlanabilen izolatlar arasından, iki farklı bölgeden alınan *Debaryomyces*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Aerobasidium* ve *Clavispora* olmak üzere 6 cinse ait 54 adet maya suşu seçilmiştir.

Belirlenen bu izolatlar zeytin üretimi açısından önemli olabilecek bazı teknolojik özelliklerinin değerlendirilebilmesi amacıyla ile incelemeye alınmışlardır. Teknolojik karakterizasyonları yapılacak olan maya suşlarının farklı sıcaklık ve pH değerlerinde, yüksek tuz derişimlerinde gelişebilme, asetik asit ve H₂S üretimi, tribütirin ve zeytinyağını hidrolize edebilme ve çeşitli şekerleri fermente edebilme

yetenekleri araştırılmıştır. Bunun yanı sıra incelenen suşların enzim profilleri, oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme yetenekleri, sitrik asiti kullanma kapasiteleri, katalaz aktiviteleri, ve killer toksinlere duyarlılık ile proteolitik ve pektolitik aktiviteleri de incelenmiştir.

3.2.8.1. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme

Farklı sıcaklık derecelerinin mayaların gelişmeleri üzerine etkilerinin test edildiği bu deneylerde, fermantasyon periyodundaki (Ekim-Haziran) ortalama ortam sıcaklığının (20°C) altında ve üstündeki sıcaklık dereceleri denenmiş böylece geniş bir sıcaklık aralığında maya izolatlarının gelişebilme özelliklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 24-48 saatlik, hazırlanmış aktif kültürlerden YM broth besiyerlerine ekimler yapılmış ve kültürler 10°C, 15°C ve 37°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Ekilen besiyerleri belirli aralıklarla gelişme durumları açısından değerlendirilmişler ve üreme gözlenen kültürler, pozitif olarak değerlendirilmişlerdir (Bevilacqua et. al., 2009; Psani and Kotzekidou, 2006). Çalışmada kontrol olarak 28°C kullanılmıştır.

3.2.8.2. Düşük pH değerlerinde gelişebilme

Çalışmada maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişebilme özelliklerinin incelendiği deneyler, pH' ı 2.5, 3.5 ve 4.5' e ayarlanan YM broth besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Denemelerde kontrol olarak, pH' ı 6.2 olan YM broth besiyeri kullanılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlar ve süre sonunda kültürlerdeki gelişme durumu değerlendirilmiştir (Psani ve Kotzekidou, 2006).

3.2.8.3. Yüksek tuz derişiminde gelişebilme

Maya kültürlerinin yüksek tuz derişiminde gelişebilme özellikleri; %14, %16, %18 oranlarında NaCl (w/v) içeren YM broth besiyerleri kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla hazırlanan ortamlara ekimleri yapılan aktif kültürler, 28°C' de 10 gün

inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kültürler pozitif olarak değerlendirilmişlerdir (Psani ve Kotzekidou, 2006).

3.2.8.4. Asetik asit üretimi

Maya izolatlarının asetik asit üretme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile %0.5 (w/v) CaCO₃ içeren YEPD agar besiyerleri kullanılmıştır. YM broth besiyerinde aktifleştirilen saf kültürler YEPD-CaCO₃ besiyerlerine paralel olarak çizgi ekim yöntemi ile ekilmişlerdir. Ekim yapılan Petri kutuları 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kültürlerin etrafında asetik asit üretimine bağlı olarak oluşabilecek, berrak zon oluşumları incelenmiştir (Kurtzman et al., 2003).

3.2.8.5. Hidrojen sülfür üretimi

Maya izolatlarının H₂S üretme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile BIGGY agar besiyeri kullanılmıştır. İlk olarak; 24 saatlik aktif kültürlerin besiyerlerine paralel olarak çizgi ekim yöntemi ile ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 28°C' de 5 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kültürler oluşturdıkları renklere göre gruplandırılarak elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Yöntemde, kültürlerin H₂S üretme miktarlarının, besiyerindeki koloni renklerinin koyuluğuna paralel olarak arttığı kabul edilmektedir. Buna bağlı olarak üretilen H₂S miktarına göre kültürler 1: beyaz, 2: krem, 3: açık kahverengi, 4: kahverengi, 5: koyu kahverengi, 6: siyah olarak gruplandırılmışlardır (Aponte et al., 2010).

3.2.8.6. Lipolitik aktivitenin belirlenmesi

İncelenen maya izolatlarının lipolitik aktivitelerinin değerlendirilmesinde iki ayrı testten yararlanılmıştır. Bunlar; zeytinyağı ve tribütirin hidrolizi deneyleridir.

Maya izolatlarının zeytinyağını hidrolize etme özelliklerinin incelendiği denemeler, %5 (v/v) oranında zeytinyağı içeren Gorodkova agar besiyeri (pH 7.5) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygun şekilde aktifleştirilen maya kültürleri çizgi ekim yöntemi

ile paralel olarak Gorodkova agar besiyerlerine ekilmişler ve ekimi yapılan petri kutuları 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kültürlerle 10 mL doymuş bakır sülfat çözeltisi eklenmiş, 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Daha sonra kültür üzerindeki fazla bakır sülfat çözeltisi uzaklaştırılmış, kültürler 1 saat buzdolabında bekletilmişlerdir. Süre sonunda, kültürler etraflarında mavi zon oluşumu açısından değerlendirilmişlerdir. Etraflarında mavi zon oluşturan kültürlerin zeytinyağını hidrolizi yetenekleri pozitif olarak kabul edilmiştir (Marquina et al., 1992; Psani and Kotzekidou, 2006).

Maya kültürlerinin tribütirin hidrolizi özelliklerinin belirlendiği denemeler Tributyrin agar (TBA) besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. YM broth besiyerinde 28°C' de 24 saat aktive edilen maya kültürleri çizgi ekim yöntemi ile paralel olarak TBA besiyerlerine ekilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri, 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda koloni çevrelerindeki berrak zon oluşumları değerlendirilmiştir (Harrigan, 1998; Psani ve Kotzekidou, 2006).

3.2.8.7. Çeşitli şekerlerin fermantasyon ve asimilasyonları

Zeytin meyvesi bileşiminde ağırlıklı olarak bulunan şekerlerin arasında glukoz, fruktoz ve sakkarozun yer aldığı bilinmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010). Bu nedenle incelenen mayaların çeşitli şekerleri fermente edebilme özelliklerinin incelendiği deneylerde glukoz, fruktoz ve sakkaroz kullanılmıştır. Şeker fermantasyonu testleri, %2 (w/v) şeker içeren Durham' ı YM broth besiyerinde gerçekleştirilmiştir. 24 saatlik aktif maya kültürleri ile aşıl原因 besiyerleri, 28°C' de 28 gün inkübasyona bırakılmışlar ve bu süre boyunca gaz oluşumu açısından değerlendirilmişlerdir (Yarrow, 2000). İzolatların çeşitli şekerleri asimile etme özelliklerinin belirlenmesinde ise; API ID 32C sonuçlarından yararlanılmıştır.

3.2.8.8. Enzim profillerinin belirlenmesi

Mayaların enzim profillerinin değerlendirilmesi daha önce Bölüm 3.1.4' de verilen sistem ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla aktive edilen maya izolatları ilk olarak, YM agar besiyerinde 28°C' de 24 saat geliştirilmişlerdir. Daha sonra, geliştirilen saf kültürlerden steril damıtık su ortamlarına aktarmalar yapılmış bir densimat cihazı

(bioMérieux, Fransa) kullanılarak, sistemin önerdiği 5-6 McFarland'lık bulanıklığa sahip maya süspansiyonları elde edilmiştir. Elde edilen kültür süspansiyonları, sistemin önerdiği şekilde, kitteki her bir hücreye 65 µL olacak şekilde aşılanmıştır. Aşılama yapılan API Zym kitleri (bioMérieux, Fransa), 37°C' de 4-4.5 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon süresi sonunda her bir kuyucuğa kit ile hazır olarak verilen; ZYM A ve ZYM B çözeltilerinden (bioMérieux, Fransa), önce ZYM A sonra ise ZYM B çözeltisi olacak şekilde eklenerek, oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmişlerdir. Fast Blue BB' den kaynaklanabilecek sarı rengin önlenmesi amacı ile sistemin önerdiği şekilde; test kitleri 1000 W'lık bir ışık kaynağı altında yaklaşık 10 saniye bekletilmişlerdir. Daha sonra kuyucuklarda oluşan renkler tonlarına bağlı olarak, test kitleri ile birlikte verilen renk değerlendirme çizelgesine göre yorumlanmışlardır. Buna göre kuyucuklarda oluşan renkler, 0-5 arasında derecelendirilmişlerdir; 0: negatif reaksiyonu, 5: en yüksek miktardaki pozitif reaksiyonu, 1, 2, 3 ve 4 ise; zayıf ve orta düzeydeki reaksiyonu ifade etmektedir. Kite göre 3, 4 ve 5 olarak derecelendirilen reaksiyonların pozitif olarak değerlendirilebilmektedir (BioMérieux, 2011).

Mikroorganizmaların enzim profillerinin API ZYM sistemi ile incelendiği bazı çalışmalarda, yapılan derecelendirmenin kullanılan substrat miktarı ile ilişkilendirildiği görülmektedir (Nascimento and Martinez-Rossi, 2001). Bu çalışmalarda; 1>5 nmol, 2>10 nmol, 3>20 nmol, 4>30 nmol ve 5>40 nmol ve üzerine karşılık gelen substratın mikroorganizmalar tarafından kullanıldığı şeklinde ifade edilmektedir.

3.2.8.9. Oleuropeini kullanma

Yapılan çalışmalar zeytin yaprağı ekstraktında başta oleuropein olmak üzere hidroksitirosol, luteolin, apigenin, kafeik asit, rutin ve kateşin gibi fenolik bileşenlerin yer aldığı bilinmektedir (Çakmak vd., 2012). Literatürde zeytin yaprağı ekstraktının fazla oranda oleuropein içerdiği, öyle ki, zeytin ekstraktının çoğunlukla oleuropein olarak tanımlandığı belirtilmektedir (Lalas et. al., 2011). İncelenen maya izolatlarının oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme özelliklerinin araştırıldığı denemeler, %0.5 ve %1.5 (w/v) oranında zeytin yaprağı

ekstraktı içeren YNB-ZY agar besiyerinde gerçekleştirilmiştir (Psani ve Kotzekidou, 2006).

Deneylerde ilk olarak, YM broth besiyerinde 28°C' de 24 saat inkübasyon ile aktiveleştirilen maya kültürlerinin çizgi ekim yöntemi ile paralel olarak besiyerine ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan besiyerleri 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde gelişebilen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2.8.10. Sitrik asiti kullanma

Sitrik asitin, zeytin meyvesinde bulunan en önemli ve başlıca organik asitlerden biri olduğu bilinmektedir (Ergönül ve Tokuşoğlu, 2010). Bu nedenle incelenen maya izolatlarının sitrik asiti kullanabilmeleri sofralık zeytin üretimi açısından önemli bir teknolojik özellik olarak değerlendirilmektedir. Maya izolatlarının sitrik asiti kullanabilme özelliklerinin belirlenmesi amacı ile YNB agar besiyeri kullanılmıştır. Aktif maya kültürleri YNB agar besiyerine “oksonografik” yöntem kullanılarak ekilmiştir. Katı, kültür içeren ortamlar üzerine, sitrik asit ve pozitif kontrol amaçlı; glukoz partikülleri eklenmiştir. Ortamların 28°C' de 2-4 günlük inkübasyonlarının sonunda sitrik asit etrafında üreme gözlenen kültürlerin pozitif reaksiyon verdikleri kabul edilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

3.2.8.11. Katalaz aktivitesi

Katalaz enziminin yağ asitlerinin oksitlenmesini engelleyerek peroksit oluşumunun önüne geçtiği bilinmektedir. Bu nedenle, mayaların katalaz aktivitesi sofralık zeytin üretimi açısından önemli bir teknolojik özellik olarak kabul edilebilmektedir. İncelenen maya suşlarının katalaz aktivitelerinin incelendiği deneyler, YM agar besiyerine ekimleri yapılmış maya kültürleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak, YM broth besiyerinde 28°C' de 48 saat inkübe edilerek aktiveleştirilen saf kültürler, YM agar besiyerlerine aşılanmışlar ve 28°C' de 24-48 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Süre sonunda kültürlerin üzerine %3 (v/v)' lük H₂O₂ damlatılmış ve kültürlerden gaz çıkışı incelenmiştir. Gaz çıkışı gözlenen kültürler katalaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Bautista-Gallego et al., 2011)

3.2.8.12. Killer aktivite

Araştırmada izole edilen maya suşlarının killer aktivitelerinin belirlenmesi amacı ile agar difüzyon yöntemi kullanılmıştır (Özçelik vd., 1996) Bu amaçla, Ankara Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan sağlanan; *S. cerevisiae* NCYC 232 (killer suş, K1), *S. cerevisiae* NCYC 738 (killer suş, K2) ve *S. cerevisiae* NCYC 1006 (duyarlı suş), suşları referans suşlar olarak kullanılmışlardır. Bu amaçla YM agar besiyerinde birkaç kez pasaj yapılarak 28°C aktifleştirilen duyarlı suş; 45°C' deki 100 mL %0.003 (w/v) metilen mavisi içeren ve 0.1 M sitrat-fosfat tamponu ile pH' ı 4.5' a ayarlanan YEPD-MB agar besiyerine yaklaşık olarak; 4×10^5 kob/100mL olacak şekilde aşılınmış ve kültür içeren ortam iyice karıştırılarak steril bir petri kutularına aktarılmıştır. Daha sonra kültür içeren besiyerlerinin uygun koşullarda katılaşmaları sağlanmıştır. YM agar besiyerinde birkaç kez pasaj yapılarak aktifleştirilen killer suşlar referans olarak kullanılmış ve maya izolatları ile birlikte paralel olarak yaklaşık 1 cm boyunda çizgi ekim yöntemi ile ekilmişlerdir. 20°C' de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda inhibasyon zonu oluşturan kültürler "Killer" olarak değerlendirilmişlerdir (Özçelik ve Dönmez, 1993; Özçelik vd, 1996; Hernandez et al., 2008).

Çalışmanın bir diğer aşamasında maya suşlarının K1 ve K2 killer toksinlerine karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Bu amaçla, killler aktivitenin incelenmesinde kullanılan yöntemle aynı yol incelenmiş ancak duyarlı suş olarak çalışmada izole edilen maya suşları kullanılmıştır. Ekimi gerçekleştirilen besiyerleri 20°C' de 72 saat inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda killer mayalar etrafında zon oluşumuna neden olan kültürler "Duyarlı" olarak değerlendirilmişlerdir. (Özçelik vd, 1996; Hernandez et al., 2008).

3.2.8.13. Proteolitik aktivite

Araştırmada incelenen maya izolatlarının proteolitik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla, ilk olarak YM broth besiyerinde aktifleştirilen maya kültürlerinin %10' luk Milk agar besiyerine paralel olarak çizgi yöntemi ile ekimleri gerçekleştirilmiştir. Ekim yapılan Petri kutuları 28°C' de 14 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda üreme gözlenen kültürlerde çizgi boyunca üreyen

kolonilerin etrafındaki proteolitik aktiviteye baēlı olarak geliēebilecek, berrak zon oluēumları incelenmiētir. Zon oluēturan kùltùrler pozitif olarak deēerlendirilmiēlerdir (Harrigan, 1998; Idoui et al., 2009).

3.2.8.14. Pektolitik aktivite

İncelemeye alınan maya suēlarının pektolitik aktivitelerinin belirlenebilmesi amacıyla, %0.5 (w/v) oranında naranciye pektini (Balmumcu, Ankara) iēeren YNB-NP agar kullanılmıētır. Deneyin gerēekleētirilmesinde; YM broth besiyerinde uygun Şekilde aktifleētirilen maya kùltùrleri, ēizgi ekim yōntemi ile paralel olarak YNB-NP agar besiyerlerine ekilmiēler, ardından Petri' ler 28°C' de 7 gùn inkùbasyona bırakılmıēlardır. İnkùbasyon sùresi sonunda besiyerlerinde ürediēi gözlenen maya suēları pektolitik aktivite aēısından pozitif olarak kabul edilmiēlerdir (Marquina et al., 1992).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Yapılan araştırmada ilk olarak, Manisa' nın Akhisar ve Bursa' nın İznik yörelerine ait Gemlik zeytinleri ile bunların doğal fermantasyonları boyunca, belirli günlerde salamura ile birlikte aseptik koşullarda alınan örneklerde pH, tuz ve serbest asitlik tayinleri yapılmıştır. Daha sonra, bu örneklerdeki LAB sayıları belirlenmiş ve maya floraları incelenmiştir. Her iki yöreye ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarındaki endojen maya floralarının belirlenebilmesi amacı ile ilk olarak, laboratuvara gelen örneklerden izole edilen mayaların makroskopik ve mikroskopik morfolojileri incelenmiş ve elde edilen sonuçlara göre, farklı makroskopik özellikler gösteren koloniler izole edilerek saflaştırılmışlardır. Çalışmanın daha sonraki aşamalarında ise, elde edilen saf kültürler API ID 32C (bioMérieux, Fransa) sistemi, bu sistemi destekleyici olarak uygulanan ek bazı tanımlama testleri ve moleküler esaslı yöntemlerle tanımlanmışlardır. Araştırmanın son aşamasında ise; tanımlanmaları gerçekleştirilen endojen maya suşlarının, doğal fermente sofralık zeytin üretimi açısından önemli olabilecek bazı teknolojik özellikleri incelenmiştir.

4.1. Zeytin örneklerine ait bazı kimyasal analiz sonuçları

Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinlerinin fermantasyonları boyunca salamura ile birlikte alınan örnekler uygun koşullar altında laboratuvara gönderilmiş ve bu örneklerde pH, tuz (g NaCl/100 mL salamura) ve laktik asit (g laktik asit/100 mL salamura) cinsinden serbest asitlik tayinleri yapılmıştır. Deneyler paralel olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen değerlerin standart sapmalarının hesaplanması amacıyla SPSS 17.0.1 programı kullanılarak %95 güven aralığında tek yönlü varyans analizi yapılmıştır (Kalaycı, 2008). Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' de doğal fermantasyon ortamlarından alınan zeytin ve salamura örneklerine ait bazı kimyasal analiz sonuçları görülmektedir.

Bu sonuçlara göre; Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca, salamuradaki tuz oranının; %8.19-16.75 (w/v) arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Salamuradaki laktik asit cinsinden serbest asitlik miktarının (%; w/v) ise; fermantasyon başlangıcında %0.25 (w/v) iken fermantasyon süresince arttığı ve fermantasyon sonunda %1.49' a yükseldiği bulunmuştur. Serbest asitlik miktarındaki artışa bağlı olarak, salamura pH' sı

fermantasyon boyunca düşmüştür. Buna göre, fermentasyon başlangıcında salamura pH' sı 5.0 iken fermentasyon sonunda bu değer, 4.53' e düşmüştür.

İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin fermentasyonları boyunca salamuradaki tuz oranının %6.28-80 (w/v) arasında değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 4.2). Laktik asit cinsinden serbest asitlik miktarı (w/v) fermentasyonun başlangıcında %0.21 olarak belirlenirken fermentasyon boyunca artış göstermiş ve fermentasyon sonunda; %0.77 ye yükselmiştir. Salamura pH' sı ise, serbest asitlik artışına bağlı olarak fermentasyon boyunca, pH 5.12' den pH 4.58 'e düşmüştür.

Çizelge 4.1. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermentasyonları boyunca tuz, serbest asitlik ve pH değerlerinin değişimleri

Fermentasyon günü	Tuz (g NaCl/100 mL)	Serbest asitlik (g laktik asit/100mL)	pH
0	8.72±0.18	0.25±0.06	5.00±0.01
1	9.14±0.66	0.20±0.00	4.92±0.01
7	8.19±0.26	0.49±0.00	4.85±0.00
14	11.70±0.00	0.52±0.04	4.69±0.01
21	11.70±0.00	0.60±0.01	4.56±0.00
28	11.50±0.70	0.73±0.04	4.55±0.00
46	11.83±0.21	0.72±0.03	4.53±0.01
60	16.75±0.00	0.73±0.01	4.54±0.00
84	16.75±0.05	1.12±0.04	4.65±0.01
112	16.67±0.00	1.23±0.00	4.64±0.01
138	15.63±0.02	1.22±0.02	4.60±0.00
164	14.40±0.00	1.16±0.02	4.58±0.00
192	15.30±0.01	1.47±0.01	4.60±0.00
211	15.20±0.00	1.49±0.00	4.53±0.01

Literatürde çeşitli zeytin türlerine ait fermentasyon ortamlarından alınan örneklerin pH' larının belirlendiği bazı araştırmalar yer almaktadır. Campaniello et al. (2005) tarafından İtalya' da yapılan bir çalışmada, ülkeye özgü Bella di Cerignolo zeytinlerinin doğal fermentasyona bırakıldıkları ve belirli günlerde fermentasyon ortamlarından örnekler alındığı belirtilmektedir. Çalışmada alınan örneklerin pH değerlerinin ölçüldüğü ve fermentasyon boyunca bu değerlerin yaklaşık pH 5.0 dolaylarında kaldığı ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2. İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca tuz, serbest asitlik ve pH değerlerinin değişimleri

Fermantasyon günü	Tuz (g NaCl/100 mL)	Serbest asitlik (g laktik asit/100mL)	pH
0	6.28±0.08	0.21±0.00	5.12±0.04
1	7.68±0.52	0.20±0.00	5.06±0.02
5	9.14±0.06	0.27±0.00	4.80±0.01
18	10.30±0.08	0.35±0.01	4.90±0.01
27	13.55±0.03	0.53±0.01	4.57±0.00
46	12.00±0.14	0.68±0.01	4.55±0.02
63	14.61±0.01	0.66±0.01	4.60±0.01
91	14.10±0.28	0.84±0.01	4.60±0.01
117	14.80±0.00	0.77±0.00	4.58±0.00
143	14.19±0.01	0.85±0.00	4.60±0.01
172	14.60±0.00	0.77±0.01	4.58±0.00

Kumral et al. (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, İznik yöresine ait Gemlik çeşidi zeytinlerin doğal olarak sürdürülen fermantasyon ortamlarından örneklerin alındığı ve bu örneklerde pH, tuz ve titrasyon asitliği tayinlerinin yapıldığı ifade edilmektedir. Buna göre zeytinlerin doğal fermantasyonlarının ilk 20 gününde ortam pH' sının 7.3' den 5.2' ye düştüğü, daha sonraki 100 gün boyunca ise ortam pH' sında önemli bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada fermantasyon sonunda örneklerdeki toplam titrasyon asitliğinin ise, laktik asit cinsinden %0.42 olarak saptandığı rapor edilmiştir.

İtalya' da yapılan bir çalışmada; Taggiasca çeşidine ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından 6 ay boyunca örneklerin alındığı ve bu örneklerde pH, titrasyon asitliği ve tuz tayinlerinin yapıldığı ifade edilmektedir. Çalışmada, fermantasyon sonunda ortam pH' sının 4.9' a; tuz miktarının %9' a ve titrasyon asitliğinin ise %0.20' ye ulaştığı rapor edilmektedir (Amelio and DeMuro, 2000).

Idoui et al. (2009) tarafından Fas' da yapılan bir diğer araştırmada, Jijel' in Doğu ve Güneydoğu bölgelerinden farklı doğal fermente sofralık zeytin örneklerinin toplandığı ve bu zeytinlerin pH' larının ölçüldüğü ve bu değerlerin pH 5.24 ile 5.80 arasında değiştiği belirtilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, Aydın ve Denizli illerinde bulunan çeşitli zeytin üreticileri ve evlerden toplanan 16 zeytin örneğinde tuz, pH ve serbest asitlik tayinlerinin yapıldığı ve incelenen zeytin örneklerinin pH değerlerinin; pH 2.81-4.84, asitlik derecelerinin; %0.20-2.12 ve tuz derişimlerinin ise; %0.18–10.82 arasında belirlendiğı ifade edilmiştir (Karasu, 2006).

Tassou et al. (2002) tarafından Yunanistan’ da yapılan bir çalışmada ise, Conservolea zeytinlerinin %4, %6 ve %8 oranlarında tuz içeren salamuralarda 25°C ve 18°C’de 190 gün fermentasyona bırakıldıkları ve belirli günlerde örnekler alınarak pH ve titrasyon asitliği ölçümlerinin yapıldığı belirtilmektedir. Her koşulda fermentasyonun ilk günlerinde ortam pH’ sının hızlı bir şekilde düştüğü rapor edilmiştir. Araştırmada; 25°C’ de ve %6 ile %8 tuz içeren salamura örneklerindeki son pH değerlerinin sırasıyla; 3.8 ve 3.9 olduğu; aynı sıcaklıkta ve %4 tuz derişimindeki salamura örneğinin son pH’ının ise; 4.4 olduğu belirtilmiştir. Çalışmada salamuranın serbest asitlik değerinin D- ve L-laktik asit cinsinden belirlendiğı ve bu değerlerin 25°C’de ve %4 tuz derişiminde sırasıyla; %0.7 ve %0.4 olarak belirlendiğı de ifade edilmiştir.

Kumral (2005) tarafından yapılan bir doktora çalışmasında, Gemlik zeytininin *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum* kültürlerinin tekli veya kokteyl starter olarak kullanıldığı doğal fermentasyon ortamlarından örneklerin alındığı ve bu örneklerde pH, serbest asitlik ve tuz tayinlerinin yapıldığı belirtilmektedir. Çalışmada örneklerin tuz derişimlerinin en yüksek; %15 olduğu serbest asitlik derecelerinin ise; %0.277-0.750 arasında değıştiğı rapor edilmiştir.

Türk Gıda Kodeksi 2008/24 numaralı Sofralık Zeytin Tebliğı’ nde ısılsız işlemsiz doğal fermente siyah zeytinde tuz (NaCl) oranının en az; %4 (m/v) olması gerektiğı belirtilirken, pH ve serbest asitlik miktarı ile ilgili herhangi bir sınırlamaya yer verilmemiştir (<http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2008-24.html>).

Çalışma sonuçlarına göre; Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin pH’ sının doğal fermentasyon işlemi sonunda; 4.53’ e düştüğü, laktik asit miktarlarının; %1.49’ a yükseldiğı, tuz miktarları ise; %8.19-16.75 arasında değıştiğı belirlenmiştir. İznik

yöresine ait Gemlik zeytinlerinin pH' sının ise doğal fermantasyon sonunda 4.58'e düştüğü, laktik asit miktarının; %0.77' ye yükseldiği ve tuz miktarının ise; fermantasyon boyunca, %6.28-14.80 arasında değiştiği belirlenmiştir. Çalışmada iki ayrı yöreye ait Gemlik zeytinlerinin fermantasyonları boyunca ölçülen pH değerlerinin birbirlerine yakın oldukları gözlemlenmiştir. Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde laktik asit üretimine bağlı olarak pH düşüşünün zeytinin raf ömrünün arttırılmasında ve zeytine özgü duysal özelliklerin oluşmasında büyük öneme sahip olduğu bilindiği için, çalışmada elde edilen verilerin bu genel eğilime uydukları saptanmıştır.

4.2. Zeytin örneklerindeki Laktik Asit Bakteri sayılarının belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Çalışmanın bu aşamasında, Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca belirli günlerde alınan zeytin örneklerindeki Laktik Asit Bakteri (LAB) sayıları belirlenmiştir. Laboratuvara gelen örneklerdeki LAB sayısını belirlemek amacı ile %0.1 Tween 80 içeren MRS agar besiyeri kullanılmıştır. Denemelerde ekimler dökme plak yöntemi ile paralel olarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen sayım sonuçları arasındaki standart sapmanın belirlenmesi için SPSS 17.0.1 programı kullanılarak %95 güven aralığında tek yönlü varyans analizi yapılmıştır (Kalaycı, 2008). Örneklerdeki LAB sayılarına ilişkin sonuçlar sırasıyla; Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4' de verilmektedir.

Çizelge 4.3' de Akhisar yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyonları boyunca LAB sayılarının değişimi verilmektedir. Çizelgede de görüldüğü gibi, fermantasyonun başlangıcındaki LAB sayısı; 4.11 ± 0.04 log (kob/g)'dır. Fermantasyonun 7. gününden itibaren LAB sayısının arttığı görülmektedir. Bu değer fermantasyonun 60. gününe kadar yaklaşık 3 logaritmik birim artarak; 7.10 ± 0.01 log (kob/g)'a yükselmiştir. Fermantasyonun 60. gününden sonra ise, LAB sayısı bir miktar düşmüş ve fermantasyonun son gününde ise; 6.27 ± 0.04 log (kob/g) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.4'de İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları süresince LAB sayısındaki değişim verilmektedir. Çizelgede de görüldüğü gibi,

fermantasyon başlangıcında ortamdaki LAB sayısı $5.32 \pm 0.02 \log(\text{kob/g})$ 'dır. LAB sayısı fermentasyonun 1. ve 5. günlerinde bir miktar düşmekle birlikte fermentasyonun 18. gününde yaklaşık 2 logaritmik birimlik artış göstererek $7.33 \pm 0.00 \log(\text{kob/g})$ 'a ulaşmıştır. Fermentasyonun 18. günden itibaren ortamdaki LAB sayısında bir miktar düşme gözlenmiş ve fermentasyon sonunda bu sayı; $5.87 \pm 0.02 \log(\text{kob/g})$ olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermentasyonları boyunca LAB sayısındaki değişim

Fermentasyon Süresi (gün)	LAB sayısı log (kob/g)
0	4.11 ± 0.00
1	3.69 ± 0.01
7	6.34 ± 0.03
14	5.47 ± 0.13
21	6.06 ± 0.00
28	6.93 ± 0.02
46	6.58 ± 0.01
60	7.10 ± 0.01
84	6.33 ± 0.01
112	6.09 ± 0.07
138	5.71 ± 0.02
164	5.45 ± 0.02
192	6.05 ± 0.02
211	6.27 ± 0.04

Literatürde zeytin fermentasyonları ile ilgili olarak yapılan çeşitli çalışmalarda, ortamdaki LAB sayılarının değişimleri de incelenmiştir. Nychas et al. (2002) tarafından Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, Conservola türüne ait siyah zeytinlerin, %6 oranında tuz içeren salamura içerisinde doğal fermentasyona bırakıldıkları ve fermentasyon boyunca belirli günlerde salamura örneklerinin alınarak LAB sayılarının belirlendiği ifade edilmektedir. Çalışmada, fermentasyon başlangıcında ortamdaki LAB sayısının; $2.0 \log(\text{kob/mL})$ olduğu, fermentasyon boyunca ise bu sayının artarak fermentasyonun son gününde (56. günde) yaklaşık $5.0 \log(\text{kob/mL})$ 'a yükseldiği belirtilmektedir.

Çizelge 4.4. İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca LAB sayısındaki değişim

Fermantasyon Süresi (gün)	LAB sayısı log (kob/g)
0	5.32±0.02
1	4.39±0.02
5	4.45±0.02
18	7.33±0.00
27	6.37±0.01
46	6.04±0.00
63	6.38±0.11
91	5.80±0.02
117	5.78±0.00
143	5.60±0.02
172	5.87±0.02

Hurtado et al. (2009) tarafından İspanya’da yapılan bir çalışmada, Arbequina tipi zeytinlerin %5 ve %10 tuz derişimlerinde salamura içeren tanklarda 20°C’de doğal fermantasyona bırakıldıkları ve çalışmada ilk olarak fermantasyonun 0, 2 ve 5. günlerinde, daha sonra ise her 7 günde bir salamura örneklerinin analiz için alındığı belirtilmiştir. Araştırmada, tankların ilk bir metresinden alınan örneklerde ilk 14 gün LAB sayılamadığı, 15. günde ise bu seviyeden alınan örneklerde LAB sayısının 10 kob/mL olarak belirlendiği ifade edilmektedir. Fermantasyonun 20. ve 30. günlerinden itibaren LAB sayısının arttığı, 40. günde ise bu sayının; 7 log (kob/mL)’ye ulaştığı belirtilmektedir. Çalışmada fermantasyon tanklarının derin kısımlarında ise; LAB gelişiminin geciktiği, fermantasyonun 60. ve 240. günleri arasında tankların her seviyesinde LAB sayısının aynı olduğu rapor edilmiştir. Fermantasyonun son günündeki LAB sayısının ise yaklaşık; 7.5 log (kob/mL)’ye ulaştığı belirtilmiştir.

Idoui et al. (2009) tarafından Fas’da yapılan bir diğer çalışmada, iki farklı bölgeden rastgele toplanan doğal fermente zeytin örneklerindeki LAB sayılarının belirlendiği ve bu sayının 1.20×10^7 ile 8.00×10^7 kob/g arasında değiştiği belirtilmiştir.

Nisiotou et al. (2010) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, Conservolea türüne ait siyah zeytinlerin %6 tuz içeren salamurada doğal fermantasyona bırakıldıkları ve fermantasyonun 0, 2, 4, 6, 8, 10, 13, 17, 20, 27 ve 35. günlerinde örnekler alınarak LAB sayılarının belirlendiği ifade edilmiştir. Çalışmada LAB sayısının ilk 5 günde artarak 7.5 log (kob/mL)' ye ulaştığı, fermantasyonun son gününe kadar ise bu değerin; 6.0 log (kob/mL)' ye düştüğü rapor edilmiştir.

Campaniello et al. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, Bella di Cerignolo tipi zeytinlerin İspanyol tipi ve doğal olmak üzere iki farklı şekilde fermantasyona bırakıldıkları ve bu zeytinlerdeki LAB sayısını belirlemek üzere her iki fermantasyon ortamından da 0, 8, 17, 31 ve 80. günlerde örnekler alındığı belirtilmiştir. Çalışmada LAB sayısının doğal fermente zeytinler için en çok 7.49 log (kob/mL)'ye; İspanyol tipi zeytinler için ise; 7.78 log (kob/mL)' ye çıktığı ifade edilmiştir.

Sarıkaya vd. (2008) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise; Ankara piyasasından toplanan zeytin örneklerinde LAB sayısının belirlendiği ve bu sayının 8.1×10^1 - 9.1×10^5 kob/mL arasında değiştiği belirtilmiştir.

Hurtado et al. (2009) tarafından İspanya'da yapılan bir diğer çalışmada ise; Arbequina zeytinlerinin, %5 ve %10' luk salamura içeren tanklarda 20°C'de doğal fermantasyona bırakıldıkları ve fermantasyon boyunca 7 günde bir alınan örneklerdeki LAB sayılarının en çok 6-7 log (kob/mL)' ye ulaştığı rapor edilmiştir.

Zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarında yer alan mikroorganizmaların çeşitlilik gösterdiği ve genel olarak *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, LAB, mayalar ve küflerin fermantasyon ortamlarında yer aldıkları bilinmektedir (Tassou et al., 2002). Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde fermantasyondan sorumlu asıl mikroorganizmaların ise, LAB ve mayalar olduğu belirtilmektedir (Hurtado et al., 2012). Fermantasyonda yer alan LAB' nin laktik asit üreterek ortam pH' sını 4' e kadar düşürebildikleri, böylece bozulmaya neden olan mikroorganizmaları yok ederek zeytinin raf ömrünü arttırdıkları bilinmektedir. Aynı zamanda, LAB' nin doğal fermente sofralık zeytine özgü duyuşsal özelliklerin kazanılmasına da yardımcı oldukları ifade edilmektedir (Hurtado et al., 2012). LAB' nin fermantasyon

başlangıcında ortamda baskın oldukları, ilerleyen aşamalarda ise yüksek tuz derişimi, salamuraya geçen fenolik bileşenler ve düşük pH nedeni ile sayılarının azaldığı bilinmektedir.

Bu çalışmada, Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları süresince izlenen LAB sayısının ikinci aya kadar yükselerek; 7.10 ± 0.01 log (kob/g)'a ulaştığı, ikinci aydan sonra ise, bu sayının yaklaşık bir logaritmik birim azaldığı; İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerin doğal fermantasyonları süresince incelenen LAB sayısının ise daha hızlı bir artış göstererek, henüz 18. günde en yüksek değere ulaştığı (7.33 ± 0.00 log (kob/g)) daha sonra ise bir miktar düşerek fermantasyon sonunda sayıda yaklaşık; 2.5 logaritmik birim azalma olduğu belirlenmiştir. Her iki yöreye ait Gemlik zeytinlerin fermantasyon ortamlarında yer alan LAB sayılarının literatürde verilen benzer çalışmalardaki sonuçlar ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

4.3. Zeytin örneklerindeki maya sayılarının belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Çalışmanın bu aşamasında, Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinleri ile bunların doğal fermantasyonları süresince salamura ile birlikte alınan zeytin örneklerindeki maya sayıları belirlenmiş ve bu örneklerden çeşitli maya suşları izole edilmiştir. Çalışmada toplam maya sayısı; YEPDC agar besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Denemelerde besiyerlerine ekimler paralel olarak, yüzeye sürme yöntemi ile gerçekleştirilmiş ve elde edilen sayım sonuçlarının standart sapmalarının belirlenmesi amacıyla sonuçlara, SPSS 17.0.1 programı kullanılarak %95 güven aralığında tek yönlü varyans analizi uygulanmıştır (Kalaycı, 2008). Akhisar ve İznik Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca ortamdaki maya sayılarındaki değişim sırasıyla; Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.5 incelendiğinde, Akhisar yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyonları sırasında ortamda saptanan maya sayısının fermantasyonun başında; 4.11 ± 0.01 log (kob/g) olduğu bulunmuştur. Bu değer fermantasyonun ilerleyen günlerinde; 7. ve 14. günde bir miktar arttığı, sonraki 15 gün içerisinde bir miktar düşme gösterdiği, ancak 46. günden sonra artmaya başladığı belirlenmiştir. Yaklaşık 7 ay süren fermantasyon süresince en yüksek maya sayısına (5.67 ± 0.05 log (kob/g))

fermantasyonun 3. ayına yaklaşırken ulaşılmış olup, izleyen aylarda yakın değerler elde edilmiştir. Fermentasyon sonunda ise, maya sayısında yaklaşık 2 logaritmik birimlik bir düşme belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermentasyonları boyunca maya sayısındaki değişim

Fermentasyon Süresi (gün)	Maya sayısı log (kob/g)
0	4.11±0.01
1	4.09±0.02
7	4.53±0.03
14	4.53±0.00
21	3.60±0.00
28	3,63±0.05
46	4.78±0.00
60	5.60±0.00
84	5.67±0.05
112	5.21±0.01
138	5.29±0.02
164	5.41±0.02
192	5.42±0.03
211	3.60±0.00

Çizelge 4.6 incelendiğinde ise; İznik yöresine ait zeytinlerin doğal fermentasyonları sırasında ortamda saptanan maya sayısının fermentasyonun başında 3.61±0.02 log (kob/g) olduğu bulunmuştur. Fermentasyonun ilk haftasında bu değer çok fazla değişmediği daha sonraki 2 hafta bir miktar arttığı, 46. günde bir miktar düşme gösterdiği, daha sonraki 1 ay boyunca artarak fermentasyonun 4. ayında; 5.98±0.02 log (kob/g) değerine ulaştığı belirlenmiştir. Fermentasyonun sonunda ise, maya sayısının en yüksek değerine (6.05±0.02 log (kob/g)) ulaştığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca maya sayısındaki değişim

Fermantasyon Süresi (gün)	Maya sayısı log (kob/g)
0	3.61±0.02
1	3.61±0.02
5	3.93±0.01
18	4.56±0.04
27	5.03±0.03
46	4.49±0.02
63	5.41±0.02
91	5.19±0.06
117	5.98±0.02
143	4.99±0.13
172	6.05±0.02

Akhisar yöresine ait zeytinlerin fermantasyon başlangıcındaki maya sayısının (4.11 ± 0.01 log (kob/g)) İznik yöresine ait zeytin fermantasyonun ilk günündeki maya sayısından (3.61 ± 0.02 log (kob/g)) daha yüksek olduğu ve fermantasyon boyunca maya sayılarındaki değişimlerin de farklı oldukları belirlenmiştir. İki farklı yöreye ait Gemlik zeytinlerdeki maya popülasyonları arasında belirlenen bu farkın, zeytinlerin bileşimi, zeytinlerin yetiştirildiği toprak florası, iklim, toplama ve hasat sonrası taşıma sırasında bulaşan maya florası ve fermantasyon ortamlarındaki rekabetçi flora farklılığı gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, doğal fermente sofralık zeytinlerin fermantasyon ortamlarındaki maya sayılarının maksimum 10^4 - 10^6 kob/mL'ye ulaştığı ifade edilmektedir (Nychas et. al., 2002; Arroyo-López et. al., 2006; Coton et. al., 2006; Hurtado et al., 2008; Romo-Sanches et al., 2010). Araştırmamızda Akhisar zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamında yer alan maya sayısının fermantasyon sonunda yaklaşık; 10^5 kob/g' a; İznik zeytinlerinin fermantasyon ortamında yer alan maya sayısının ise yaklaşık; 10^6 kob/g' a kadar yükseldiği belirlenmiştir.

Nychas et. al. (2002) tarafından Yunanistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada, Conservola türüne ait zeytinlerin doğal fermantasyonları boyunca belirli günlerde

örneklerin alındığı ve bu örneklerdeki maya sayılarının belirlendiği ifade edilmektedir. Çalışmada fermantasyon başlangıcında ortamdaki maya sayısının ortalama; 3.6 log (kob/mL) olduğu, bu sayının fermantasyon boyunca azaldığı ve fermantasyonun son gününde ise yaklaşık; 1.0 log (kob/mL) olduğu rapor edilmiştir (Nychas et. al., 2002).

Hurtado et al. (2009) tarafından İspanya’da yapılan bir çalışmada ise; “Mas dels Frares” bölgesinden toplanan farklı olgunluk derecelerindeki zeytinlerin farklı tuz derişimlerinde (%5 ve %10) salamura içeren altı farklı tankta, 20°C’ de doğal fermantasyona bırakıldıkları ve fermantasyonun 0, 2 ve 5. günlerinde, daha sonra ise her 7 günde bir salamura örneklerinin alındığı ifade edilmiştir. Çalışmada fermantasyonun, LAB sayısı 10^7 kob/mL ye çıktığında (56. günde) sonlandırıldığı ve örneklerdeki maya sayısının belirlendiği rapor edilmiştir. Fermantasyon başlangıcında tüm fermantasyon ortamlarındaki maya sayılarının 10^3 kob/mL olduğu, fermantasyon sonunda ise bu değerin, 10^6 - 10^7 kob/mL’ ye yükseldiği belirtilmiştir.

İspanya’da yapılan bir diğer çalışmada, bu ülkeye özgü Alorena tipi yeşil zeytinlerin üç farklı ortamda fermantasyona bırakıldıkları belirtilmiştir (Abriouel et al., 2011). Bunlardan bir tanesinin 10°C’de (soğuk fermantasyon), %9-11 oranında tuz içeren salamura ortamı, bir diğerinin 150 L’ lik havuzlarda oda sıcaklığında %8-10 oranında tuz içeren salamura ortamı ve sonuncusunun ise 1500 L’ lik tanklarda %6 oranında tuz ve %0.8 oranında asetik asit içeren salamura ortamı olduğu ifade edilmiştir. Çalışma boyunca her üç fermantasyon ortamından salamura örneklerinin alındığı ve bu örneklerdeki maya sayılarının başlangıçta yaklaşık 10^1 - 10^2 (kob/mL) olduğu, soğuk fermantasyon ve oda sıcaklığında gerçekleşen fermantasyon ortamlarında bir ay sonra maya sayılarının en yüksek düzeye (10^3 - 10^5 kob/mL) ulaştığı ifade edilmiştir. Tankta yapılan fermantasyonda ise; birinci aya kadar maya sayısının yüksek olduğu, birinci aydan üçüncü aya kadar sayıda bir düşme yaşandığı, üçüncü ayda ise en yüksek değer olarak belirtilen yaklaşık; 10^7 kob/mL’ ye ulaşıldığı belirtilmiştir.

Bautista-Gallego et al. (2011) tarafından İspanya’da yapılan bir başka araştırmada ise, doğal fermantasyon ile ülkeye özgü Alorena, Gordal ve Manzanilla

varyetelerine ait zeytinler kullanılarak üretim yapılan iki farklı fabrikadan salamura örneklerinin fermantasyonun ilk yedi gününde, 7. ve 21. günleri arasında ve 35. ve 100. günlerinde alındığı ve örneklerdeki maya sayılarının belirlendiği ifade edilmiştir. Bu çalışmada fermantasyonun başlangıcında Aloreña, Gordal ve Manzanilla zeytinlerinin salamuralarındaki maya sayılarının sırasıyla; 2.75×10^3 , 1.18×10^4 ve 2.57×10^4 kob/mL oldukları belirlenmiştir. Her üç zeytin türüne ait fermantasyon ortamlarında 10-21. günler arasında maya sayılarının en yüksek değere ulaştıkları ($\sim 10^5$ kob/mL), 100. günden sonra ise sayıların, 10^4 kob/mL' nin altına düştüğü belirtilmiştir.

Portekiz'de yapılan bir çalışmada ise, Manzanilla türü zeytinlerin %6-12 oranında tuz içeren iki farklı fermantasyon ortamında, oda sıcaklığında, 52 gün boyunca doğal fermantasyona bırakıldıkları ve fermantasyon boyunca salamura örneklerinin alınarak maya sayımının gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Her iki fermantasyon ortamında da başlangıçta maya sayılarının; 4.9-5.0 log (kob/mL) olduğu daha sonra ise; 6.0-6.5 log (kob/mL)'ye ulaştığı belirtilmiştir (Alves et. al., 2012).

Yapılan bu çalışmada, her iki yöreye ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları sırasında ortamdaki maya sayılarının, yaklaşık 1×10^3 - 1×10^6 kob/g arasında değiştiği belirlenmiştir. Bu değerlerin daha önce yapılan benzer çalışmalarda elde edilen sonuçlara yakın oldukları görülmektedir. Akhisar ve İznik yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarındaki maya sayıları arasındaki farklılığın ise; başlangıçtaki maya popülasyonu, ortamdaki rekabetçi flora, zeytinlerin hasat edildiği bölgelerin coğrafi farklılıkları gibi nedenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

4.4. Maya izolatlarının tanımlanmalarına ilişkin sonuçlar

Çalışmada Akhisar ve İznik bölgesi Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından farklı zamanlarda izole edilen maya suşlarının tanımlanmaları amacıyla ilk olarak API ID 32C tanımlama sistemi ve Bölüm 3.2.6'da belirtilen ek tanımlama testleri kullanılmıştır. Maya izolatlarının tanımlanmaları amacıyla uygulanan ek testler makroskopik koloni morfolojisi,

mikroskopik morfoloji, sıvı besiyerinde gelişme, glukoz fermantasyonu, üre hidrolizi, nitrat asimilasyonu, yüksek derişimlerde glukoz içeren besiyerlerinde gelişme, 37°C' de gelişme, %0.5 ve %1 asetik asit içeren besiyerlerinde gelişme, pseudohif ve askospor oluşumudur. Bazı suşlar için RFLP-PZR yöntemi ve dizi analizi kullanılarak tanımlama doğrulaması yapılmıştır. Maya suşlarının moleküler tiplendirilmelerinden önce *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer aldıkları saptanan izolatlar, lizin besiyeri kullanılarak yeniden doğrulanmışlardır.

Akhisar ve İznik Gemlik zeytinleri ile yapılan çalışmada izole edilen toplam 100 izolattan 74' ü kesin olarak tanımlanabilmiştir. Akhisar-Gemlik zeytinleri ile yapılan çalışmada toplam 60 izolat elde edilmiş olup bunlardan 20 tanesi daha sonra yapılan pasajlarda canlandırılammış ve 40 izolat ile çalışılmıştır. İznik-Gemlik zeytinleri için ise; toplam 40 izolattan 6' sı ileriki canlandırılmalarda kaybedilmiş olup, çalışmaya 34 izolat ile devam edilmiştir. Araştırmada kesin olarak tanımlanabilen maya izolatlarının türleri ve sayıları Çizelge 4.7' de yer almaktadır.

Çizelge 4.7' nin incelenmesinden de görüleceği gibi; Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilip canlandırılabilen 40 izolatın hepsi tür düzeyinde kesin olarak tanımlanabilmişlerdir. Tanımlanabilen maya türlerinin 7 ayrı cinse ait oldukları saptanmıştır. Tanımlanan bu izolatların *C. membranifaciens* (1), *C. lusitaniae* (1), *Cry. laurentii* (1), *C. mycetangi* (1), *A. pullulans* (2), *C. famata* (14), *D. hansenii* (4), *K. apiculata* (2), *C. pelliculosa* (1), *R. glutinis* (2), *S. cerevisiae* (4) ve *C. hellenica* (7) türlerine ait suşlar oldukları belirlenmiştir.

İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından ise, 40 izolat elde edilmiş, bunların 6 tanesi yapılan pasajlarda canlandırılammış, 34 tanesi ise tür düzeyinde kesin olarak tanımlanabilmiştir. Tanımlanabilen maya türlerinin 5 ayrı cinse ait oldukları belirlenmiştir. Bu izolatların; *C. lusitaniae* (2), *Clv. lusitaniae* (1), *Cry. saitoi* (1), *C. famata* (8), *P. anomala* (9), *C. pelliculosa* (11), *P. holstii* (1) ve *Zyg. mrakii* (1) türlerine ait oldukları saptanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Akhisar ve İznik Gemlik zeytinleri ile bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türleri ve izolat sayıları

Maya Türleri	Akhisar Gemlik zeytini izolat sayısı	İznik Gemlik zeytini izolat sayısı
<i>Candida membranifaciens</i>	1	-
<i>Candida lusitaniae</i>	1	2
<i>Clavispora lusitaniae</i>	-	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	1	-
<i>Cryptococcus saitoi</i>	-	1
<i>Candida mycetangi</i>	1	-
<i>Aerobasidium pullulans</i>	2	-
<i>Candida famata</i>	14	8
<i>Debaryomyces hansenii</i>	4	-
<i>Kloeckera apiculata</i>	2	-
<i>Pichia anomala</i>	-	9
<i>Candida pelliculosa</i>	1	11
<i>Pichia holstii</i>	-	1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	2	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4	-
<i>Candida hellenica</i>	7	-
<i>Zygosaccharomyces mrakii</i>	-	1

API ID 32C sistemi ile maya izolatlarının tanımlamaları sırasında elde edilen asimilasyon test sonuçları Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da yer almaktadır.

Yapılan deneyler sırasında aynı türe ait maya izolatları, API ID 32C sisteminin özelliklerine bağlı olarak farklı düzeylerde tanımlanabilmişlerdir. Bu düzey farklılıkları, suşların bazı substratları kullanımı açısından değişken özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Ergül, 2009). Her iki yöreye ait Gemlik zeytinleri ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen izolatların, API ID 32C sistemi ile tanımlama sonuçları, düzeyleri, yüzdeleri ve ek tanımla testleri ile birlikte elde edilen tanımlama sonuçları, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de gösterilmektedir

Çizelge 4.8. Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerinin API ID 32C asimilasyon test sonuçları*

Substrat	Maya türü	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>K. apiculata</i>	<i>A. pullulans</i> ^a	<i>R. glutinis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Cry. laurentii</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. hellenica</i> ^b
Galaktoz	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Aktidion	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
N-asetil-Glukozamin	+	+	+	-	+	-	-	+	+	d	d
DL-Laktat	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
L-Arabinoz	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Selobiyoz	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Rafinoz	d	d	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Maltoz	d	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2-Keto-Glukonat	+	+	+	-	+	+	-	+	-	d	d
α-Metil-D-Glukozid	+	+	+	+	-	+	d	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Sorbitol	d	d	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+
Riboz	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-
Gliserin	d	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Ramnoz	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
Palatinoz	+	+	-	+	+	+	-	+	+	d	d
Eritritol	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Melebiyoz	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Glukuronat	d	d	-	-	+	-	d	+	-	+	+
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	d
Glukonat	d	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Levulinat	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorboz	d	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Glukozamin	d	d	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(*): Aynı türe ait suşların asimilasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. (+): Substrat kullanımı pozitif. (-): Substrat kullanımı negatif. d: değişken. ^a: API ID 32C sistemi ile; *Cry. albidus*, dizi analizi ile; *A. pullulans* olarak tanımlanmıştır. ^b: API ID 32C sistemi ile; *C. pelliculosa*, RFLP-PZR yöntemi ile; *C. hellenica* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.9. İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerinin API ID 32C asimilasyon test sonuçları*

Substrat	<i>Maya türü</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>Clv. lusitaniae</i>	<i>P. holstii</i>	<i>Cry. saitoi</i> ^a	<i>C. lusitaniae</i>	<i>Zyg. mrakii</i> ^b
Galaktoz	+	d	d	+	+	-	+	+	
Aktidion	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	
N-asetil-Glukozamin	d	-	-	+	+	-	+	+	
DL-Laktat	d	+	+	-	-	-	-	-	
L-Arabinoz	d	-	-	+	+	+	+	-	
Selobiyoz	+	d	d	+	+	+	+	+	
Rafinoz	+	+	+	-	-	+	-	+	
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	
2-Keto-Glukonat	d	-	-	-	-	+	-	+	
α-Metil-D-Glukozid	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	-	
D-Ksiloz	d	+	+	+	+	+	+	-	
Riboz	d	-	-	+	+	-	+	+	
Gliserin	d	+	+	+	+	-	+	-	
Ramnoz	-	-	-	+	+	+	+	-	
Palatinoz	+	+	+	+	+	+	+	-	
Eritritol	+	+	+	+	-	-	+	+	
Melebiyoz	d	-	-	-	-	-	-	-	
Glukuronat	d	-	-	-	+	+	-	-	
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	
Glukonat	d	d	d	+	-	+	+	-	
Levulinat	d	-	-	-	-	-	-	-	
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorboz	d	-	-	+	+	-	+	-	
Glukozamin	d	-	-	+	+	-	+	-	
Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	

(*): Aynı türe ait suşların asimilasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. (+): Substrat kullanımı pozitif. (-): Substrat kullanımı negatif. d: değişken ^a: API ID 32C sistemi ile, *Cry. albidus*, dizi analizi ile; *Cry. saitoi* olarak tanımlanmıştır. ^b: API ID 32C sistemi ile; *S. klüberii* RFLP-PZR yöntemi ile *Zyg. mrakii* olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.10. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya izolatlarının API ID 32C test sistemi ile belirlenen tanımlama sonuç, düzey ve yüzdeleri ile ek testler birlikte belirlenen tanımlama sonuçları

İzolat No.	Tanımlama Sonucu	Tanımlama Düzeyi	Tanımlama Yüzdesi (%)	API ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu
AZ-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AZ-4	<i>K.apis/apiculata</i>	Mükemmel	99.9	<i>K. apiculata</i>
AZ-6	<i>Cry. laurentii</i>	Şüpheli	97.7	<i>Cry. laurentii</i>
AF0-2	<i>R. glutinis</i>	Cins düzeyinde çok iyi tanımlama	78.0	<i>R. glutinis</i>
AF1-2	<i>C. pelliculosa</i>	İyi	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF1-4	<i>R. glutinis</i>	İyi	98.5	<i>R. glutinis</i>
AF1-5	<i>Cry. laurentii</i>	Şüpheli	97.7	<i>Cry. laurentii</i>
AF1-6	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF28-2	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>D. hansenii</i>
AF28-3	<i>S. cerevisiae</i>	Kabul edilebilir düzeyde tanımlama	98.5	<i>S. cerevisiae</i>
AF28-4	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF46-1	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
AF46-2	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.8	<i>C. famata</i>
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	Şüpheli	99.9	<i>Cry. laurentii</i>
AF46-4	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>	Düşük düzeyde tanımlama	56.6	<i>Zygosaccharomyces spp.</i>
AF46-5	<i>C. pelliculosa</i>	Çok iyi	99.8	<i>C. pelliculosa</i>
AF46-6	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF60-1	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.6	<i>C. famata</i>
AF60-2	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.6	<i>C. famata</i>
AF60-3	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>D. hansenii</i>

Çizelge 4.10. Devam ediyor.

İzolat No.	Tanımlama Sonucu	Tanımlama Düzeyi	Tanımlama Yüzdesi (%)	API ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu
AF60-4	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
AF60-5	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.1	<i>C. famata</i>
AF60-6	<i>C. lusitaniae</i>	İyi	96.7	<i>C. lusitaniae</i>
AF84-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF84-2	<i>S.cerevisiae</i>	Düşük düzeyde tanımlama	75.4	<i>S.cerevisiae</i>
AF112-1	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
AF112-2	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.6	<i>C. famata</i>
AF138-1	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.3	<i>C. famata</i>
AF138-2	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
AF138-3	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.8	<i>C. famata</i>
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	Cins düzeyinde iyi tanımlama	80.9	<i>C. membranifaciens</i>
AF164-2	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
AF164-3*	-	-	-	-
AF164-4	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. famata</i>
AF191-1	<i>S.cerevisiae</i>	İyi	98.5	<i>S. cerevisiae</i>
AF191-2*	-	-	-	-
AF191-3*	-	-	-	-
AF211-1	<i>C. famata</i>	Şüpheli	99.9	<i>D. hansenii</i>
AF211-2	<i>C. pelliculosa</i>	Şüpheli	54.0	<i>C. pelliculosa</i>
AF211-4	<i>S. cerevisiae</i>	İyi	98.5	<i>S. cerevisiae</i>

A: Akhisar-Gemlik zeytinlerden izole edilen maya izolatları. Z: Zeytin izolatları. F(gün): 0 Fermantasyon izolatları. *: Moleküler yöntemlerle tanımlanmışlardır.

Çizelge 4.11. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya izolatlarının API ID 32C test sistemi ile belirlenen tanımlama sonuç, düzey ve yüzdeleri ile ek testler birlikte belirlenen tanımlama sonuçları

İzolat No.	Tanımlama Sonucu	Tanımlama Düzeyi	Tanımlama Yüzdesi (%)	API ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu
BZ-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BZ-2	<i>C. famata</i>	Cins düzeyinde iyi tanımlama	73.1	<i>C. famata</i>
BZ-4	<i>C. pelliculosa</i>	Çok iyi	99.9	<i>P. anomala</i>
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF0-2	<i>Cry. albidus</i>	Mükemmel	99.9	<i>Cry. albidus</i>
BF0-3	<i>C. lusitaniae</i>	İyi	96.7	<i>C. lusitaniae</i>
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF0-5	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF1-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF1-2	<i>C. lusitaniae</i>	İyi	96.7	<i>Clv. lusitaniae</i>
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF1-4	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF5-1	<i>C. lusitaniae</i>	İyi	96.7	<i>C. lusitaniae</i>
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF18-2	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF18-3	<i>C. silvicola</i>	Şüpheli	92.3	<i>P. holstii</i>
BF18-4	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.8	<i>C. famata</i>
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF27-3	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF27-4	<i>S. klüberii</i>	Düşük düzeyde tanımlama	59.2	<i>S. klüberii</i>
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF46-2	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF63-1	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. famata</i>
BF63-2	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>P. anomala</i>
BF63-3	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>

Çizelge 4.11. Devam ediyor.

İzolat No.	Tanımlama Sonucu	ID 32C Tanımlama Düzeyi	ID 32C Tanımlama Yüzdesi (%)	API ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu
BF91-2	<i>C. famata</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. famata</i>
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	Mükemmel	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF117-1	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. famata</i>
BF143-1	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.8	<i>C. famata</i>
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. pelliculosa</i>
BF172-3	<i>C. famata</i>	Çok iyi	99.9	<i>C. famata</i>

B:İznik-Gemlik zeytinlerden izole edilen maya izolatları. Z: Zeytin izolatları. F(gün): 0
Fermantasyon izolatları. *: Moleküler yöntemlerle tanımlanmışlardır.

Çizelgelerin incelenmesinden de görülebileceği gibi; API ID 32C ile tanımlanan izolatlarının tanımlama yüzdeleri, Akhisar-Gemlik zeytini ile çalışıldığında elde edilen izolatlar için; %54-99.9, İznik-Gemlik zeytini ile çalışıldığında elde edilen izolatlar için ise; %59.2-99.9 arasında değişmektedir.

Bu çalışmada API ID 32C sisteminin yanısıra uygulanan ek testlere ilişkin sonuçlar; Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13' de yer almaktadır.

Akhisar yöresine ait ham Gemlik zeytinlerinden izole edilen izolatlardan 3 tanesi (AZ-1, AZ-4, AZ-6) API ID 32C sistemi ve ek testler ile tanımlanabilmişlerdir. Bu suşlardan AZ-1 izolatı mükemmel düzeyde; *C. pelliculosa* olarak, AZ-4 izolatı yine mükemmel düzeyde; *K. apis/apiculata* ve AZ-6 izolatı ise şüpheli düzeyde *Cry. laurentii* olarak tanımlanabilmişlerdir. API ID 32C tanımlama sistemi ile *K. apis/apiculata* olarak tanımlanan AZ-4 izolatının hangi türe ait olduğunun belirlenebilmesi için Apilab Plus programının da önerdiği şekilde 37°C'de gelişme testi uygulanmış ve bu izolat kesin olarak; *K. apiculata* olarak tanımlanmıştır (Bkz. Çizelge 4.10).

Çizelge 4.12. Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerine uygulanan bazı ek tanımlama testlerinin sonuçları(*):

Ek Tanımlama Testleri	Maya Türleri	<i>C. famata</i>	<i>C. hellenica</i> ^a	<i>A. pullulans</i> ^b	<i>C. membranifaciens</i>	<i>Cry. laurentii</i>	<i>K. apiculata</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>D. hansenii</i>
Glukoz Fermantasyonu	d	+	-	+	+	+	+	+	+	+	d
Üre Hidrolizi	-	-	+	-	+	-	d	-	-	-	-
Nitrat Asimilasyonu	-	+	-	-	-	d	-	+	-	-	-
%50 Glukoz İçeren Ortamda Gelişme	d	+	+	+	-	+	d	+	-	d	d
%60 Glukoz İçeren Ortamda Gelişme	d	d	+	+	-	d	-	d	-	d	d
37°C' de Gelişme	d	+	-	-	+	d	+	+	+	+	d
%0.5 Asetik Asit İçeren Ortamda Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%1 Asetik Asit İçeren Ortamda Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Askospor Oluşumu	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-	-
Pseudohif Oluşumu	-	d	+	-	-	d	d	+	+	+	-

(*): Aynı türe ait suşların asimilasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. (+): Pozitif sonuç. (-): Negatif sonuç. d: değişken. ^a: API ID 32C sistemi ile; *C. pelliculosa*, RFLP-PZR yöntemi ile; *C. hellenica* olarak tanımlanmıştır. ^b: API ID 32C sistemi ile, *Cry. albidus*, dizi analizi ile; *A. pullulans* olarak tanımlanmıştır.

Araştırmada, Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından yaklaşık 7 ay boyunca izole edilen maya suşlarından; beşi mükemmel (AF1-6, AF28-4, AF46-6, AF84-1, AF164-2), biri iyi (AF1-2), biri çok iyi (AF46-5) ve biri şüpheli (AF211-2) düzeyde olmak üzere 8 tanesi, *C. pelliculosa*, biri şüpheli (AF211-1), sekizi çok iyi ve altısı mükemmel (AF28-2, AF46-1, AF60-3, AF60-4, AF112-1, AF138-2) düzeyde olmak üzere 15 tanesi; *C. famata* olarak tanımlanmışlardır. Ayrıca, izolatlardan biri cins düzeyinde çok iyi (AF0-2), biri iyi (AF1-4) düzeyde olmak üzere 2 tanesinin; *R. glutinis*, tümü şüpheli düzeyde olmak üzere 3 tanesinin *Cry. laurentii* (AZ-6, AF1-5, AF46-3b), biri kabul edilebilir düzeyde (AF28-3), biri düşük düzeyde (AF191-1), ikisi ise iyi düzeyde (AF191-1, AF211-4) olmak üzere 3 tanesinin ise *S. cerevisiae* türlerine ait oldukları

belirlenmiştir. Akhisar-Gemlik zeytinlerinin fermantasyonları boyunca tek olarak izole edilen *C. lusitaniae* (AF60-6), *C. membranifaciens* (AF164-1) ve *Zygosaccharomyces spp.* (AF46-4) izolatları ise sırasıyla; iyi, cins düzeyinde iyi ve düşük düzeylerde tanımlanabilmişlerdir.

Çizelge 4.13. İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya türlerine uygulanan bazı ek tanımlama testlerinin sonuçları(*):

Ek Tanımlama Testleri	Maya Türleri							
	<i>C. famata</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>P. holstii</i>	<i>Cry. saitoi</i> ^a	<i>Zyg. mrakii</i> ^b	<i>P. anomala</i>	<i>Clv. lusitaniae</i>
Glukoz Fermantasyonu	d	+	+	+	-	+	+	+
Üre Hidrolizi	-	-	-	-	+	-	-	-
Nitrat Asimilasyonu	-	+	-	+	+	-	+	-
%50 Glukoz İçeren Ortamda Gelişme	d	+	-	-	-	+	+	-
%60 Glukoz İçeren Ortamda Gelişme	d	d	-	*	-	+	d	-
37°C' de Gelişme	d	+	+	-	-	-	+	+
%0.5 Asetik Asit İçeren Ortamda Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-
%1 Asetik Asit İçeren Ortamda Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-
Askospor Oluşumu	-	-	-	+	-	+	+	+
Pseudohif Oluşumu	-	+	+	+	-	-	+	+

(*): Aynı türe ait suşların asimilasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. (+): Pozitif sonuç. (-): Negatif sonuç. d: değişken ^a: API ID 32C ile *Cry. albidus*, dizi analizi ile *Cry. saitoi* olarak tanımlanmıştır. ^b: API ID 32C ile *S. kluyverii*, RFLP-PZR yöntemi ile *Zyg. mrakii* olarak tanımlanmıştır.

Akhisar-Gemlik zeytinlerinin fermantasyon ortamlarından izole edilen üç adet izolat (AF28-2, AF60-3, AF211-1) API ID 32C sistemi ile önce *C. famata* olarak tanımlanmış, daha sonra yapılan ek testler ile askospor oluşturdıkları belirlendiği için (Bkz. Şekil EK 5.9) *D. hansenii* olarak tanımlanmışlardır.

Araştırmada, Akhisar-Gemlik zeytinlerinin fermantasyon ortamlarından elde edilen 3 izolat ise (AF164-3, AF191-2, AF191-3) API ID 32C sistemi ve ek tanı testleri ile tanımlanamamışlardır.

Çalışmada, İznik yöresine ait ham Gemlik zeytinlerinden izole edilen izolatlardan 4 tanesi (BZ-1, BZ-2, BZ-4 ve BZ-5) API ID 32C tanımlama sistemi ve ek tanımlama testleri kullanılarak tür düzeyinde tanımlanabilmişlerdir. Bu suşlardan BZ-1 izolatı mükemmel düzeyde; *C. pelliculosa*, BZ-2 izolatı cins düzeyinde iyi olarak *C. famata*, BZ-4 izolatı çok iyi düzeyde, *C. pelliculosa* ve BZ-5 izolatı ise mükemmel düzeyde *C. pelliculosa* olarak tanımlanabilmişlerdir. Bu türlerden API ID 32C tanımlama sistemi ile *C. pelliculosa* olarak tanımlanan BZ-1 ve BZ-4 izolatlarının ek testlerle askospor oluşturdıkları belirlenmiş ve *P. anomala* türüne ait oldukları saptanmıştır. (Bkz. Çizelge 4.11).

İznik Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından yaklaşık 6 ay boyunca izole edilen maya suşlarının API ID 32C tanımlama sistemi ile tanımlanmalarının sonucunda; ikisi çok iyi (BF143-2, BF172-1) on beşi mükemmel düzeyde olmak üzere 17 tanesinin *C. pelliculosa*, beşi çok iyi (BF18-4, BF63-1, BF117-1, BF143-1, BF172-3), ikisi mükemmel (BF63-3, BF91-2) düzeyde olmak üzere 7 tanesinin *C. famata*, hepsi iyi düzeyde olmak üzere 3 tanesinin *C. lusitaniae* (BF0-3, BF1-2, BF5-1) türlerine ait oldukları saptanmıştır. Ayrıca birer tane izole edilen *Cry. albidus* (BF0-2), *C. silvicola* (BF18-3) ve *S. kluyveri* (BF27-4) suşları ise bu sistem ile sırasıyla; mükemmel, şüpheli ve düşük düzeylerde tanımlanabilmişlerdir.

İznik Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen 7 adet izolat (BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2 ve BF63-2) API ID 32C kiti ile *C. pelliculosa* olarak tanımlanmış ancak ek testler ile askospor oluşturdıkları belirlenmiş (Bkz. Şekil EK 5. 6) ve *P. anomala* türüne ait oldukları saptanmıştır. Ayrıca, API ID 32C sistemi ile *C. lusitaniae* olarak tanımlanan BF1-2 suşunun askospor oluşturduğu ve *Clv. lusitaniae* türüne ait olduğu, *C. silvicola* olarak tanımlanan BF18-3 suşunun yine askospor oluşturduğu ve *P. holstii* türüne ait olduğu saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.11).

Tanımlamanın bir sonraki aşamasında bazı maya suşlarının RFLP-PZR yöntemi ve dizi analizi ile moleküler doğrulanmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak lizin besiyeri kullanılarak API ID 32C ile *S. cerevisiae* olarak tanımlanan maya izolatlarının *Saccharomyces* cinsine ait olup olmadıkları yeniden doğrulanmıştır. İnceleme sonucunda AF28-3, AF84-2, AF191-1, AF211-4 ve BF27-4 suşlarının *Saccharomyces* cinsine ait oldukları doğrulanmıştır. RFLP-PZR yönteminde ilk olarak; incelenecek olan maya suşlarının hedef DNA bölgeleri ITS1 ve ITS4 primer çifti kullanılarak çoğaltılmıştır. Elde edilen ampikonlar *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* kesim enzimleri ile, *Saccharomyces* cinsine ait olan izolatlar için ise, bu enzimlere ek olarak *HpaII* enziminden de yararlanarak tür düzeyinde genotiplendirilmişlerdir.

İncelenen bazı maya izolatlarına uygulanan moleküler doğrulama sonuçları Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15' de, *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* ve *HpaII* kesim enzimlerinin kullanıldığı, RFLP-PZR uygulaması sonucunda elde edilen, bazı maya suşlarına ait parça profillerine ilişkin görüntüler ise EK 6'da (Şekil EK 6.1-6.10) verilmektedir.

Çizelge 4.14 incelendiğinde görülebileceği gibi; Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen toplam 40 izolattan 27'si izolat moleküler yöntemlerle doğrulanabilmiş, 13 izolat ise DNA izolasyonu gerçekleştirilemediği için moleküler tanı yöntemleri ile doğrulanamamışlardır.

API ID 32C ve ek tanımlama testleri ile *C. pelliculosa* olarak tanımlanmış olan maya izolatlarından 7 tanesi (AZ-1, AF1-2, AF1-6, AF28-4, AF46-5, AF46-6, AF84-1) RFLP-PZR yöntemi ile doğrulanmaları (Bkz. Şekil Ek 6.2, 6.3, 6.7) sonucunda *C. hellenica* olarak tanımlanmışlardır. API ID 32C sistemi ile *Zygosaccharomyces* cinsine ait olduğu belirlenen AF46-4 izolatının RFLP-PZR ile doğrulanması sonucunda ise; bu suşun; *D. hansenii* türüne ait olduğu saptanmıştır. Bu izolat askospor oluşturduğu için; *C. famata* olarak tanımlanmıştır.

API ID 32C ve ek tanımlama testleri ile tanımlanamayan AF164-3, AF191-2 ve AF191-3 izolatları RFLP-PZR yöntemi ile sırasıyla; *C. mycetangi*, *D. hansenii* ve *C. famata* olarak tanımlanmışlardır (Bkz. Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. API ID32C ve ek testlerle tanımlanan Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya izolatlarının moleküler doğrulama ile birlikte kesin tanımlama sonuçları

İzolat No.	ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu	RFLP-PCR Tanımlama Sonucu	Kesin Tanımlama Sonucu
AZ-1	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AZ-4	<i>K. apiculata</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>K. apiculata</i> ^b
AZ-6	<i>Cry. Laurentii</i>	<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i>
AF1-2	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF1-5	<i>Cry. laurentii</i>	-	<i>A. pullulans</i> ^c
AF1-6	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>
AF28-3	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
AF28-4	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF46-4	<i>Zygosaccharomyces</i> <i>spp.</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF46-5	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF46-6	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF60-1	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF60-2	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF84-1	<i>C. pelliculosa</i>	<i>Z. hellenicus</i>	<i>C. hellenica</i> ^a
AF84-2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
AF112-2	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF138-2	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF138-3	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>C. membranifaciens</i>
AF164-3	-	<i>C. mycetangi</i>	<i>C. mycetangi</i>
AF164-4	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF191-2	-	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>
AF191-3	-	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^d
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>D. hansenii</i>
AF211-2	<i>C. pelliculosa</i>	-	<i>K. apiculata</i> ^c
AF211-4	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>

(^a): Telemorfu; *Z. hellenicus*. (^b): Telemorfu; *H. uvarum*. (^c): Dizi analizi sonucunda tanımlanmıştır. (^d): Telemorfu; *D. hansenii*.

Çizelge 4.15 API ID32C ve ek testlerle tanımlanan İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya izolatlarının moleküler doğrulama ile birlikte kesin tanımlama sonuçları

İzolat No.	ID 32C ve Ek Testler ile Tanımlama Sonucu	RFLP-PCR Tanımlama Sonucu	Kesin Tanımlama Sonucu
BZ-1	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BZ-2	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^a
BF0-2	<i>Cry. albidus</i>	-	<i>Cryptococcus saitoi</i> ^b
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c
BF0-5	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF1-1	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c
BF1-4	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c
BF18-2	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF18-4	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^a
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c
BF27-3	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF27-4	<i>S. kluyveri</i>	<i>Zyg. mrakii</i>	<i>Zyg. mrakii</i>
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c
BF46-2	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF63-2	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>
BF91-2	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^a
BF117-1	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i> ^a
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i> ^c

(^a): Telemorfu; *D. hansenii*. (^b): Dizi analizi sonucunda tanımlanmıştır. (^c): Telemorfu; *P. anomala*

İznik-Gemlik zeytinlerinin ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen 20 adet izolat moleküler yöntemler ile doğrulanabilmişler, 14 izolat ise DNA izolasyonları gerçekleştirilemediği için doğrulanamamışlardır (Çizelge 4.15).

API ID 32C ve ek tanımlama testleri ile *S. kluyveri* olarak tanımlanmış olan bu izolatlardan BF27-4 suşunun RFLP-PZR yöntemi ile *Zyg. mrakii* türüne ait olduğu

belirlenmiştir. Diğer 19 izolatın RFLP-PZR sonuçlarının ise; API ID 32C ve ek tanımlama testlerinin sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.15).

Çizelge 4.16’de RFLP-PZR ile doğrulaması yapılan maya izolatlarının *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* ve *HpaII* enzimleri ile elde edilen DNA kesim parçası profilleri yer almaktadır. Çizelge 4.16 incelendiğinde görüleceği gibi; *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*) türüne ait olan izolatların amplikon büyüklükleri 650 bç olarak belirlenmiştir. Bu türe ait izolatlardan elde edilen amplikonların *CfoI* enzimi ile kesimi sonucunda parça büyüklüğü 575 bç, *HaeIII* enzimi ile kesimi sonucunda ise parça büyüklüğü; 600 bç olan birer adet DNA bandı elde edilmiş, *HinfI* enzimi ile kesimi sonucunda ise parça büyüklükleri; 320 bç olan iki adet DNA bandı elde edilmiştir (Bkz. Şekil Ek 6.1, 6.2, 6.4, 6.5, 6.8, 6.10).

Çizelge 4.16. RFLP-PZR yöntemi ile doğrulanan maya izolatlarının *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* ve *HpaII* enzimleri ile elde edilen DNA kesim parçası profilleri

Amplikon (bç)	Kesim Parçası Uzunluğu (bç)				Tanımlama Sonucu
	<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinfI</i>	<i>HpaII</i>	
650	575	600	320+320	-	<i>P. anomala</i>
650	300+300+50	420+150+90	325+325	-	<i>D. hansenii</i>
650	325+325	625	350+170+130	-	<i>Z. hellenicus</i>
850	375+325+150	325+250+ 170+125	375+365+ 110	725+125	<i>S. cerevisiae</i>
630	295+295	420+130+80	315+315	-	<i>C. membranifaciens</i>
600	290+290+20	400+125+75	300+300	-	<i>C. mycetangi</i>
650	290+280+80	-	300+190+ 130	-	<i>Zyg. mrakii</i>

D. hansenii (anamorfu; *C. famata*) suşlarının amplikon büyüklüğünün 650 bç olduğu, bu amplikonun *CfoI* enzimi ile kesimi sonucunda iki adet 300 bç, bir adet 50 bç büyüklüğünde üç DNA bandı, *HaeIII* enzimi ile kesimi sonucunda büyüklükleri yaklaşık; 90-420 bç arasında değişen üç adet DNA bandı, *HinfI* enzimi ile kesimi sonucunda ise büyüklükleri 325 bç olan iki adet DNA bandı olduğu saptanmıştır (Şekil Ek 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6). Çizelge 4.16’da da

görülebileceği gibi; *Z. hellenicus* (anamorfu; *C. hellenica*) suşlarının amplikon büyüklüğünün 650 bp olduğu, *CfoI* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık 325 bp olan iki adet, *HaeIII* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklüğü yaklaşık 625 bp olan bir adet, *HinfI* kesim enzimi uygulaması sonucunda ise büyüklükleri yaklaşık; 130-350 bp arasında değişen üç adet DNA bandından oluşan bir profile sahip oldukları bulunmuştur (Şekil EK 6.2, 6.3, 6.7).

Çizelge 4.16' da da görüldüğü gibi; *Saccharomyces* cinsine ait oldukları belirlenen türler için diğer kesim enzimlerinin yanı sıra *HpaII* kesim enzimi de kullanılmıştır. Deneylerde; *S. cerevisiae* türüne ait suşların PZR amplikon büyüklükleri 850 bp olarak belirlenmiştir. *S. cerevisiae* suşlarının *CfoI* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık; 150-375 bp arasında olan üç adet, *HaeIII* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık; 125-325 bp arasında olan dört adet, *HinfI* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık 110-375 bp arasında değişen üç adet ve *HpaII* kesim enzimi uygulaması sonucunda ise büyüklükleri yaklaşık; 125 ve 725 bp olan iki adet DNA bandından oluşan bir profile sahip oldukları saptanmıştır.

C. membranifaciens suşunun (AF164-1) DNA amplikon büyüklüğünün 630 bp olduğu belirlenmiştir. Bu türe ait amplikonun *CfoI* enzimi ile kesimi sonucunda parça büyüklükleri 295 bp olan iki adet, *HaeIII* enzimi ile kesimi sonucunda parça büyüklükleri yaklaşık; 80-420 bp arasında olan üç adet, *HinfI* enzimi ile kesimi sonucunda ise parça büyüklükleri 315 bp olan iki adet DNA bandı elde edilmiştir (Bkz. Şekil EK 6.9).

Yapılan çalışmada *C. mycetangi* (AF164-3) suşunun DNA amplikon büyüklüğünün yaklaşık 600 bp olduğu, bu türün *CfoI* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık 20-290 bp arasında olan üç adet, *HaeIII* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklüğü yaklaşık 75-400 bp arasında olan üç adet, *HinfI* kesim enzimi uygulaması sonucunda ise büyüklükleri yaklaşık 300 bp olan iki adet DNA bandından oluşan bir profile sahip olduğu saptanmıştır (Bkz. Şekil Ek 6.6).

Araştırmada *Zyg. mrakii* türünün PZR ile çoğaltılmış DNA bölgesinin amplicon büyüklüğünün 650 bp olduğu bunun *CfoI* kesim enzimi uygulaması sonucunda büyüklükleri yaklaşık 80-290 bp arasında olan üç adet, *HinfI* kesim enzimi uygulaması sonucunda ise büyüklükleri yaklaşık; 130-300 bp arasında olan üç adet DNA bandından oluşan bir profile sahip olduğu saptanmıştır. *Zyg. mrakii* izolatının *HaeIII* kesim enzimi uygulaması sonucunda oluşan DNA parça profili elde edilememiştir.

Araştırmada, API ID 32C sistemi ile; şüpheli düzeyde; *Cry. laurentii* ve *C. pelliculosa* olarak tanımlanan AF1-5 ve AF211-2 suşları ile mükemmel düzeyde; *Cry. albidus* olarak tanımlanan BF0-2 suşu, RFLP-PZR yöntemi ile doğrulanamamıştır. Bu üç maya izolatının kesin olarak tanımlanmaları amacıyla A.M.G Bilim Parkı Vakfı, Genetik Birimi, Madrid (*Unidad de Genómica A.M.G Fundación Parque Científico, Madrid*)’ de dizi analizleri yaptırılmıştır. Bu amaçla maya izolatlarından elde edilen DNA’ lar PZR ile NL1 ve NL4 primer çifti kullanılarak çoğaltılmış ve saflaştırılmışlardır. Elde edilen ampliconların dizi analizleri sonucunda BF0-2 izolatı NL1 primeri için %98, NL4 primeri için %96 benzerlikte *Cryptococcus saitoi*, AF1-5 izolatı NL1 primeri için %95, NL4 primeri için %97 benzerlikte *A. pullulans*, AF211-2 izolatı ise NL1 primeri için %92 benzerlikte *H. uvarum* olarak tanımlanmışlardır.

Bu çalışmanın tanımlama kısmında elde edilen bulgular genel olarak incelendiğinde; her iki yöreye ait zeytinler ve bunların fermantasyon ortamlarından ortak olarak; *C. famata*, *C. pelliculosa* ve *C. lusitaniae* türlerinin izole edildiği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.7). İzole edilen diğer türlerin ise farklı oldukları görülmektedir. *C. membranifaciens*, *Cry. laurentii*, *C. mycetangi*, *A. pullulans*, *D. hansenii*, *K. apiculata*, *R. glutinis*, *S. cerevisiae* ve *C. hellenica* türleri sadece Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilirken, *Clv. lusitaniae*, *Cry. saitoi*, *P. anomala*, *P. holstii* ve *Zyg. mrakii* türlerinin ise sadece; İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından elde edildikleri belirlenmiştir.

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. hellenica* suşları fermantasyonun ilk 3 ayı boyunca

ortamda bulunmuşlardır. *D. hansenii* (anamorf formu; *C. famata*) suşlarının ise fermantasyon boyunca izole edilebildikleri belirlenmiştir. *S. cerevisiae* suşları ilk olarak fermantasyonun birinci ayında, hem de, fermantasyonun son gününde izole edilebilmiştir. Genel olarak *S. cerevisiae* türünün yüksek tuz derişimlerine dayanıklı olmadıkları bilinmektedir. Bu nedenle bu suşların fermantasyonun son günlerine kadar kadar canlı kalıp izole edilebilen bu suşun sonuçlarımız açısından ilgi çekici olduğu düşünülmektedir. Fermantasyon ortamlarından genellikle fermantasyon başında ve ortalarında izole edilebilen *K. apiculata* suşları bizim çalışmamızda 7 ay sonra da izole edilebilmiştir. Fermantasyon başında ham zeytinden izole edilmiş olan *K. apiculata* suşu (AZ-4) daha sonra bir kere de fermantasyonun son gününde de (AF211-2) izole edilebilmiştir. Başlangıçta yine zeytin örneklerinden izole edilen *A. pullulans* suşları ise fermantasyonun ilk günlerinde de izole edildikten sonra ortamdan tekrar izole edilememiştir.

İzmit yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *P. anomala*, *C. pelliculosa* ve *C. famata* türlerinin fermantasyon boyunca ortamda var oldukları saptanmıştır. *C. lusitaniae* ve *Clv. lusitaniae* suşlarının fermantasyonun ilk haftası salamuradan izole edilebildikleri daha sonra ise izole edilemediği belirlenmiştir. Çizelge 4.11 incelendiğinde de görülebileceği gibi *Cry. saitoi*, *P. holstii* ve *Zyg. mrakii* suşlarının ise ortamda ender bulunan türler oldukları görülmüş ve fermantasyon boyunca bir kere izole edilebilmişlerdir. Doğal fermantasyon boyunca canlılıklarını koruyabilen suşların salamuradaki tuz derişimine, fenolik bileşenlere, organik asitlere, salamura pH'ına ve ortamdaki rekabetçi floraya karşı dayanıklı oldukları düşünülmektedir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen endojen mayaların tanımlanmaları amacı ile çeşitli yöntemlerin kullanıldığı bilinmektedir (Arroyo-Lopez et al., 2006; Kotzekidou, 1997; Pereira et al., 2008; Abriouel et al., 2011; Bautista-Gallego et al., 2011; Tofalo et al., 2012). Bu yöntemler arasında sıklıkla kullanılan tanı metodunun moleküler bir tanımlama yöntemi olan RFLP-PZR olduğu görülmektedir. Bunun dışında, çeşitli biyokimyasal testler ile tanımlama (Kotzekidou, 1997; Arroyo-López et al., 2006; Pereira et al., 2008), Nested PZR (Abriouel et al., 2011), gerçek zamanlı PZR (Tofalo et al.,

2012), dizi analizi (Bautista-Gallego et al., 2011) yöntemlerinin de zeytinden izole edilen mayaların tanımlanmaları amacı ile kullanıldıkları ifade edilmektedir.

Zeytinden izole edilen mayaların RFLP-PZR yöntemi ile tanımlanmaları amacı ile çeşitli kesim enzimlerinden faydalandığı bilinmektedir. Hurtado et al. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada zeytinden izole edilen mayaların tanımlanabilmeleri amacı ile RFLP-PZR yönteminin kullanıldığı ve bu yöntemde *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* kesim enzimlerinden yararlanıldığı belirtilmiştir.

Arroyo-López et al. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada ise zeytinden elde edilen maya izolatlarının RFLP-PZR yöntemi ile tanımlanmaları amacı ile *CfoI*, *HaeIII*, *ScrFI* ve *HinfI* kesim enzimlerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Genel olarak, sofralık zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya izolatlarının RFLP-PZR yöntemiyle tanımlanmaları amacı ile *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI* kesim enzimlerinin sıklıkla kullanıldıkları görülmektedir (Romo-Sanchez et al., 2010; Bautista-Gallego et al., 2011; Silva et al., 2011; Alves et al., 2012).

Çalışmamızda izole edilen mayaların RFLP-PZR yöntemi ile tanımlanmaları sırasında *Saccharomyces* cinsi dışındaki izolatlar için *CfoI*, *HaeIII* ve *HinfI*; *Saccharomyces* türleri için ise bu enzimlere ek olarak; *HpaII* kesim enziminden de yararlanılmıştır (Bkz. Çizelge 4.16).

Albayram (2007) tarafından yapılan bir yüksek lisans tezinde, Samsun piyasasından toplanan 16 zeytin örneğinden maya izolasyonu ve tanımlamasının yapıldığı belirtilmiştir. İzole edilen mayaların tanımlamalarının çeşitli biyokimyasal testler kullanılarak gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Yapılan testler sonucunda *C. apicola* (1), *C. diddensiae* (3), *C. membranifaciens* (7), *C. oleophila* (1), *C. rugosa* (2), *Candida versatilis* (1), *Candida zeylanoides* (4), *D. hansenii* (1), *P. anomala* (38) suşlarının izole edildikleri bildirilmiştir.

2008 yılında Portekiz’de yapılan bir çalışmada ise; marketlerden toplanan Galega varyetesine ait doğal fermente sofralık zeytinlerden izole edilen mayaların API 20C sistemi ile tanımlandıkları ve tanımlama sonucunda; 10 *Candida boidinii*, 1 adet *C.*

famata, 6 adet *C. glabrata*, 12 adet *C. krusei*, 1 adet *C. utilis*, ve 3 adet *Geotrichum penicillatum* suşunun izole edildiği belirtilmiştir (Pereira et al., 2008).

Kotzekidou (1997) tarafından Yunanistan'da gerçekleştirilmiş olan bir başka çalışmada, doğal fermente sofralık zeytin üretimi yapan dokuz ayrı fabrikadan zeytin örneklerinin toplandığı ve bu zeytin örneklerinden izole edilen mayaların karbon asimilasyon testleri ile tanımlandıkları ifade edilmiştir. Bu çalışmada tanımlanan mayaların büyük bir kısmının (%55) *T. delbrueckii* suşları olduğu; geri kalan türlerin ise *D. hansenii*, *Cry. laurentii*, *Cry. albidus*, *Dekkera bruxellensis*, *Sporobolomyces roseus*, *Bullera variabilis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *P. farinose* ve *P. membranifaciens* türlerine ait oldukları ifade edilmiştir.

Abriouel et al. (2011) tarafından İspanya'da yapılan bir diğer çalışmada ise, %9-11 oranında tuz içeren salamura içerisinde 10°C'de fermantasyona (soğuk fermantasyon) bırakılan zeytinlerden (I); %8-10 oranında tuz içeren salamura ile birlikte oda sıcaklığında fermantasyona bırakılan zeytinlerden (II) ve %6 tuz ile birlikte %0.8 asetik asit içeren salamura ile birlikte fermantasyona bırakılan zeytinlerden (III) örneklerin alındığı ve bu örneklerden izole edilen mayaların DGGE-PZR yöntemi ile tanımlandıkları belirtilmektedir. Tanımlama sonucunda ilk fermantasyon ortamından *P. membranifaciens*, *P. minuta*, *S. cerevisiae*, *C. diddensiae*, *C. famata* ve *D. hansenii* türlerinin; ikinci fermantasyon ortamından; *P. manshurica*, *S. cerevisiae*, *C. cf. apicola*, *Zygosaccharomyces bailii* ve *P. galeiformis* türlerinin; üçüncü fermantasyon ortamından ise; *P. manshurica*, *P. galeiformis* ve *A. pullulans* türlerinin izole edildiği ifade edilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen başlıca maya türlerinin *C. tropicalis*, *C. parapsilopsis*, *C. rugosa*, *C. boidinii*, *C. diddensiae*, *C. oleophila*, *C. glabrata*, *C. cf. apicola*, *C. membranifaciens*, *C. krusei*, *P. anomala*, *P. membranifaciens*, *P. farinose*, *P. galeiformis*, *P. guilliermondii*, *P. manshurica*, *P. kluyveri*, *P. minuta*, *D. etchellsii*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *Kly. lactis*, *Bullera variabilis*, *Cry. albidus*, *Cry. laurentii*, *Dekkera bruxellensis*, *Sporobolomyces roseus*, *T. delbrueckii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *K. marxianus*, *A. pullulans*, *Cyteromyces matritensis*, *R. glutinis* ve *R. mucilaginosa* oldukları belirtilmektedir. (Kotzekidou, 1997; Albayram, 2007; Pereira et al., 2008;

Romo-Sachez et al., 2010; Abriouel et al., 2011; Bautista-Gallego et al., 2011; Silva et al., 2011; Alves et al., 2012)

4.5. Tanımlamaları yapılan maya izolatlarının ait oldukları cins özelliklerine ilişkin değerlendirme sonuçları

4.5.1. *Candida* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Candida cinsi içerisinde yer alan mayaların mikroskop altındaki hücre şekillerinin küresel, elipsoidal ya da silindirik oldukları ve üçgen şeklinde veya yarım ay pozisyonlarında yer aldıkları bilinmektedir. Bu cinse ait mayaların bazı türlerinin pseudohif veya gerçek hif oluşturdukları ifade edilmektedir. *Candida* cinsine ait mayaların bazı türlerinin şekerleri fermente edebildikleri, sıvı besiyerinde zar oluşturdukları, inositolü asimile edebildikleri ve jelatini hidrolize edebildikleri belirtilmektedir. Bu cinse ait maya türlerinin üreaz enzimi ve nişasta benzeri hücre dışı bileşenleri üretemedikleri ifade edilmektedir (Meyer et al., 1999).

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinden ve bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilerek tanımlanabilen 40 adet maya izolatından 25 tanesinin *Candida* cinsine ait oldukları görülmektedir. *Candida* cinsine ait bu mayalardan 7 tanesinin *C. hellenica*, 14 tanesinin *C. famata*, bir tanesinin *C. mycetangi*, bir tanesinin *C. membranifaciens* ve bir tanesinin de *C. lusitaniae* türlerine ait oldukları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinden ve bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamından izole edilerek tanımlanabilen 34 adet maya izolatından ise 20 tanesinin; *Candida* cinsine ait oldukları görülmektedir. *Candida* cinsine ait bu mayalardan 8 tanesinin *C. famata*, 11 tanesinin *C. pelliculosa* ve bir tanesinin de *C. lusitaniae* türlerine ait oldukları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

C. famata suşlarının mikroskopik morfolojilerinin; küresel ya da kısa-oval şeklinde olduğu, hücrelerin tek başına, diploid ya da kısa zincirler halinde konumlandıkları ifade edilmektedir. Bu türlerin sıvı besiyerinde çökelti oluşturdukları bazı suşlarının halka, düzgün ya da buruşuk, kuru zar oluşturdukları belirtilmektedir (Meyer et al.,

1999). Çalışmada her iki yöreye ait zeytin örnekleri ve bunların doğal fermentasyon ortamlarından izole edilen *C. famata* hücrelerinin küresel ya da kısa oval yapıda oldukları, bazı suşların monopolar ya da dipolar tomurcuk oluşturdıkları, bazı suşların tek, bazı suşların diploid bazı, suşların ise kısa zincirler halinde konumlandıkları gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil EK 5.3). Çalışmada izole edilen *C. famata* suşlarının YM broth besiyerinde gelişme özelliklerinin çeşitlilik gösterdiği görülmektedir. İzole edilen bazı suşlar sıvı besiyerinde dipte çökelti, bulanıklık ve parçalı zar (AF46-1, AF46-2, AF138-2, BF18-4, BF63-3); bazı suşlar dipte çökelti, kenarları tırmanan zar ve bulanıklık (AF112-1, AF112-2, AF138-1, AF60-4, BF91-2); bazı suşların sadece dipte çökelti (AF60-2, BZ-2, AF60-5, BF172-3); bazı suşların ise buruşuk zar ve dipte çökelti (AF60-1, AF138-3, AF164-4, AF191-3, BF63-1, BF117-1, BF143-1) oluşturdıkları belirlenmiştir. Zeytin örneklerinden izole edilen *C. famata* suşlarının mikroskopik ve sıvı besiyerinde gelişme özelliklerinin, maya tanımlama anahtarında yer alan özellikler ile uyduğu görülmektedir (Meyer et al., 1999).

C. famata suşlarının katı besiyerinde oluşturdıkları kolonilerin grimsi beyaz ya da sarımsı renkte, yumuşak, parlak veya mat, düzgün ya da buruşuk özellikte oldukları belirtilmektedir. Genel olarak bu türlerin pseudohif oluşturmadıkları fakat yer yer zayıf ya da iyi gelişmiş pseudomiselyum oluşturdıkları ifade edilmektedir (Meyer et al., 1999). Araştırmada izole edilen *C. famata* suşlarının MEA besiyerinde buruşuk, kenarları tırtıklı ve mat (AF60-1, AF60-2, AF138-3, BZ-2, BF63-3, BF63-1, BF117-1, BF143-1); buruşuk, kenarları dalgalı ve mat (AF112-1, AF112-2, AF138-1, AF60-4, BF91-2); yuvarlak, kenarları dalgalı ve parlak (AF46-1, AF46-2, AF138-2, BF172-3); yuvarlak kenarları düz ve parlak (AF60-5, AF164-4, AF191-3, BF18-4) koloniler oluşturdıkları gözlemlenmiştir. İzole edilen suşların hiçbirinin pseudohif oluşturmadıkları belirlenmiştir. Her iki yöreye ait zeytin örneklerinden de izole edilen *C. famata* suşlarının makroskopik ve pseudohif oluşturma özelliklerinin, maya tanımlama kaynaklarında yer alan özellikler ile uyumluluk gösterdiği görülmektedir. Bu türlerin anamorf formda oldukları ve askospor oluşturmadıkları bilinmektedir. *C. famata* suşlarının maksimum gelişme sıcaklıklarının 31-35°C olduğu ve 37°C'de gelişemedikleri bilinmektedir. Bu türe ait suşların bir kısmının glukozu fermente edebildiği, hiçbirinin nitratı asimile edemediği ifade edilmektedir (Meyer et al., 1999). Çalışmada yapılan ek

tanımlama testleri sonucunda bu türe ait bazı suşlarının glukozu fermente edebildikleri (AF60-5, AF164-4, AF191-3, BF18-4) hiçbir suşın üreyi hidrolize edemediği; hiçbir suşın nitratı asimile edemediği; tüm suşlarının %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildiği fakat bazı suşlarının %60 glukoz içeren besiyerinde gelişebildikleri (AF60-5, AF164-4, AF191-3, BF18-4), izole edilen suşların hiçbirinin 37°C'de ve %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren besiyerinde gelişemedikleri ve askospor oluşturmadıkları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.12 ve 4.13). Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu sonuçların karşılaştırma yapılan tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Nakase et al., 1999).

C. famata suşlarının genel olarak; peynir, süt, yoğurt, dondurma gibi süt ürünlerinden, şeftali ve kayısı suları, üzüm suyu, elma suyu, mısır, domates, nar, incir, portakal gibi meyve-sebze ve bunlarının ürünlerinden, arpa ve pirinç birası, şıra, şarap, turşu, çeşitli fermente et ürünleri zeytin, koji, ekmek gibi fermente gıdalardan, biftek, balık, tavuk, yumurta ve deniz ürünlerinden izole edildikleri belirtilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen 7 suşın *C. hellenica* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *C. hellenica* suşlarının mikroskopik morfolojilerinin ovoidal, uzun ovoidal ya da silindirik olduğu bilinmektedir. *C. hellenica* suşlarının sıvı besiyerinde çökelti, kalın buruşuk ya da adacık şeklinde zar oluşturdıkları belirtilmektedir. Bu suşların katı besiyerinde beyaz ya da krem renkte, yumuşak, parlak veya mat, düzgün ya da nadiren buruşuk özellikte oldukları ifade edilmektedir (Smith and Szuki, 1999). *C. hellenica* suşlarının bazılarının uzun demetler halinde pseudohif oluşturdıkları belirtilmektedir.

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytin örneklerinin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. hellenica* suşlarının mikroskopik görüntülerinin ovoidal olduğu ve hücrelerinin tek tek ya da zincir şeklinde görüntü verdikleri saptanmıştır (Şekil Ek 5.1). Söz konusu izolatların YM broth besiyerinde dipte çökelti ve bulanıklık; oluşturdıkları gözlemlenmiştir. İzole edilen *C. hellenica* izolatlarının MEA besiyerinde krem, yumuşak, parlak veya mat, düzgün koloniler

oluşturdukları; söz konusu suşların bazılarının pseudohif oluşturdukları belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen *C. hellenica* suşlarının mikroskopik, makroskopik, sıvı besiyerinde gelişme ve pseudohif oluşturma özelliklerinin, kullanılan maya tanımlama anahtarında yer alan özellikler ile uyduğu görülmektedir (Smith and Szuki, 1999).

Çalışmada izole edilen *C. hellenica* izolatlarının anamorf formda oldukları ve askospor oluşturmadıkları gözlemlenmiştir. *C. hellenica* suşlarının 37°C' de gelişemedikleri, glukozu fermente edebildikleri ve %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildikleri belirtilmektedir. Bu türe ait suşların hiçbirinin nitratı asimile edemediği ve %60 glukoz içeren besiyerinde gelişemedikleri ifade edilmektedir (Smith and Szuki, 1999). Çizelge 4.12' de de görüleceği gibi ek tanımlama testleri sonucunda bu türe ait tüm suşlarının glukozu fermente edebildikleri ve nitratı asimile edebildikleri; hiçbir suşunun üreyi hidrolize edemediği; tüm suşlarının %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildiği fakat bazılarının (AF1-2, AF84-1) %60 glukoz içeren besiyerinde de gelişebildiği; izole edilen suşların hiçbirinin 37°C' de, %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren besiyerinde gelişemedikleri ve askospor oluşturmadıkları belirlenmiştir. Literatürde, *C. hellenica* suşlarının şarap şirasından, zeytinden ve düşük pH değerine sahip gıdalardan izole edildiği belirtilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Çalışmada elde edilen *Candida* cinsine ait izolatlardan 12 tanesinin *C. pelliculosa* türüne ait oldukları görülmektedir. Bu türe ait suşların mikroskopik morfolojilerinin küresel ya da eliptik olduğu; hücrelerin tek başına, diploid ya da küçük kümeler halinde konumlandıkları ifade edilmektedir (Hansen and Kurtzman, 1999). Çalışmada her iki yöreye ait zeytin örnekleri ve bu örneklerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. pelliculosa* hücrelerinin küresel ya da eliptik oldukları, bazı suşların monopolar tomurcuk oluşturdıkları, bazı suşların tek bazı suşların diploid bazı suşların ise küme halinde konumlandıkları gözlemlenmiştir (Bkz. Şekil EK 5.5). Çalışmada izole edilen *C. pelliculosa* suşlarının sıvı besiyerinde gelişme özelliklerinin çeşitlilik gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen bazı suşlar sıvı besiyerinde ortalı ya da tırmanan zar oluşturdıkları belirlenmiştir.

C. pelliculosa suşlarının katı besiyerinde oluşturdıkları kolonilerin beyaz ya da donuk beyaz, tereyağımsı, parlak ve düzgün ya da tebeşir gibi ve mat oldukları belirtilmektedir. *C. pelliculosa* suşlarının bazılarının pseudohif oluşturdıkları ve 37°C'de gelişebildikleri; tamamının ise glukozu fermente edebildikleri ve nitrati asimile edebildikleri bilinmektedir. Bu türe ait suşların askospor oluşturmadıkları belirtilmektedir (Hansen and Kurtzman, 1999). Çalışmada izole edilen *C. pelliculosa* suşlarının MEA besiyerinde yuvarlak, parlak, düzgün ve yapışkan koloniler oluşturdıkları gözlemlenmiştir. İzole edilen suşların pseudohif oluşturdıkları, 37°C' de gelişebildikleri, glukozu fermente edebildikleri, nitrati asimile edebildikleri belirlenmiştir. İzole edilen tüm *C. pelliculosa* suşlarının %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildikleri fakat bazılarının (BF1-3, BF27-5, BF91-1) %60 glukoz içeren besiyerinde de üreyebildikleri ve hiçbirinin %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren besiyerinde gelişemedikleri ve askospor oluşturmadıkları bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.12 ve 4.13). Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu sonuçların tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları belirlenmiştir (Hansen and Kurtzman, 1999).

C. pelliculosa suşlarının üzüm, elma, zeytin, mısır ve salatadan, şarap, bira, turşu gibi fermente ürünlerden, reçel, kurutulmuş meyve ve şekerlemelerden, peynir ve yoğurttan, balık ve kabuklu deniz ürünlerinden izole edildikleri ifade edilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen bir (AF164-2), İznik yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen iki izolatın (BF0-3, BF5-1); *C. lusitaniae* türüne ait oldukları saptanmıştır. *C. lusitaniae* suşlarının mikroskobik morfolojilerinin yarı küresel, ovoidal veya uzun ovoidal oldukları, hücrelerin tek, çift halinde ya da kısa zincir şeklinde konumlandığı bilinmektedir. *C. lusitaniae* türlerinin sıvı besiyerinde çökelti oluşturdıkları belirtilmektedir. Bu suşların katı besiyerinde beyaz ya da krem renkte, parlak veya mat özellikle koloniler oluşturdıkları ifade edilmektedir. *C. lusitaniae* suşlarının pseudohif oluşturdıkları belirtilmektedir. Bu çalışmada *C. lusitaniae* suşlarının mikroskobik görüntülerinin ovoidal olduğu ve hücrelerinin tek tek konumlandığı görülmüştür. Söz konusu izolatların YM broth besiyerinde dipte çökelti oluşturdıkları gözlemlenmiştir. Çalışmada izole edilen *C. lusitaniae*

suşlarının MEA besiyeride krem, yumuşak, parlak, düzgün koloniler oluşturdıkları; söz konusu suşların pseudohif oluşturmadıkları belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen *C. lusitaniae* suşlarının mikroskobik, makroskobik, sıvı besiyerinde gelişme özelliklerinin, maya tanımlama kaynaklarında yer alan özellikler ile uyduğu; pseudohif oluşturma özelliğinin ise farklılık gösterdiği görülmektedir (Hansen and Kurtzman, 1999).

C. lusitaniae izolatlarının anamorf formda oldukları ve askospor oluşturmadıkları bilinmektedir. Genel olarak, *C. lusitaniae* suşlarının 37°C'de gelişebildikleri, glukozu fermente edebildikleri ve %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildikleri belirtilmektedir. Bu türe ait suşların hiçbirinin nitratı asimile edemediği de ifade edilmektedir (Lachance and Phaff, 1999). Çalışmada yapılan ek tanımlama testleri sonucunda bu türe ait tüm suşlarının glukozu fermente edebildikleri ve hiçbir suşunun üreyi hidrolize edemediği, nitratı asimile edemediği; tüm suşların %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildiği fakat %60 glukoz içeren besiyerinde gelişemediği; izole edilen suşların hiçbirinin 37°C'de, %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren besiyerlerinde gelişemedikleri ve askospor oluşturmadıkları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.12 ve 4.13). Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu sonuçların genel olarak tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda; *C. lusitaniae* suşlarının portakal, çeşitli meyve suları, malt ve fermente süt ürünlerinden izole edildiği belirtilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Meyer et al. (1999)'un maya tanımlama anahtarında *C. membranifaciens* suşlarının mikroskobik morfolojilerinin oval, hücrelerin tek başına ya da kümeler halinde gözlemlendikleri ifade edilmektedir. Bu suşların koloni morfolojilerinin aerobik koşullar altında tebeşir yapısında, mat, kuru ve bazen de buruşuk olduğu belirtilmektedir. *C. membranifaciens* suşlarının pseudohif oluşturabildikleri, %50 glukoz içeren ortamda gelişebildikleri ve glukozu fermente edebildikleri; bazı suşlarının 37°C'de gelişebildikleri; hiçbir suşın nitratı asimile edemediği bilinmektedir.

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytin örneklerinin doğal fermentasyon ortamlarından izole edilen tek *C. membranifaciens* suşunun (AF164-1) hücrelerinin

oval yapıda oldukları ve üst üste küme halinde konumlandıkları gözlemlenmiştir. Bu suşun YM broth besiyerinde dipte çökelti, bulanıklık ve düzgün kenarları tırmanan zar oluşturduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda incelenen *C. membranifaciens* suşunun glukozu fermente edebildiği, 37°C’de, %50 ve %60 glukoz içeren ortamda gelişebildiği; ancak pseudohif ve askospor oluşturmadığı, %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamda gelişemediği ve nitratı asimile edemediği belirlenmiştir. İzole edilen *C. membranifaciens* suşunun mikroskopik ve makroskopik özellikleri ile birlikte çeşitli biyokimyasal test sonuçlarının maya tanımlama anahtarında yer alan özellikler ile uyduğu görülmektedir (Meyer et al., 1999). *C. membranifaciens* suşlarının; salata, zeytin, kakao, turşu, mayonez, un, ekmek, ekşi hamur, peynir, süt, şeker, et, balık gibi ürünlerden izole edildiği rapor edilmektedir (Deak and Beuchat, 1996).

Literatürde zeytin ve zeytin fermantasyonları ile ilgili çeşitli araştırmalar incelendiğinde; doğal fermente sofralık zeytin örneklerinden *Candida* cinsine ait çeşitli türlerin izole edildiği görülmektedir. Yapılan bir çalışmada süpermarketlerden toplanan doğal fermente sofralık zeytin ve salamura örneklerinden maya izolasyonu yapıldığı ve zeytin örneklerinden izole edilen maya suşlarının %93.75’ inin *Candida* cinsine ait olduğu; bunların da %6.25’ inin ise *C. famata* türü içerisinde yer aldığı ifade edilmektedir (Pereira et al., 2008).

İspanya’da yapılan bir çalışmada “Mas d’en Pou” cinsi zeytinlerinin fermantasyon ortamlarından yapılan örnekleme son gününde (244. gün) izole edilen 120 izolattan 41 tanesinin *C. membranifaciens* türüne ait olduğu ifade edilmiştir (Hurtado et al., 2008).

İtalya’da yapılan başka bir çalışmada, ülkeye özgü Bella di Cerignolo zeytinlerinin A ve B olmak üzere aynı koşullara sahip iki ayrı havuzda doğal fermantasyona bırakıldıkları ve 0, 8, 17, 31 ve 80. günlerde örnekler alınarak maya izolasyonunun gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Fermantasyonun 0. gününde her iki havuzdan da %50 oranında; 8-17. günlerde A havuzundan %33.3 oranında B havuzundan %28.6 oranında; fermantasyonun 31. gününde A havuzundan %50, B havuzundan %66.7 oranlarında; 80. gününde ise yalnızca B havuzundan %83.3 oranında *C. pelliculosa* suşlarının izole edildiği ifade edilmektedir (Campaniello et al., 2005).

Marquina et al. (1992) tarafından yapılan bir çalışmada ise, Portekiz'in çeşitli bölgelerinden, geleneksel yöntemlerle üretilen ev yapımı zeytinlerin salamura örneklerinin toplandığı ve bunlardan maya izolasyonlarının gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Çalışmada 15 ayrı maya türünün ve 25 ayrı suşun izole edildiği, elde edilen suşlardan 14 tanesinin ise *C. hellenica* türüne ait olduğu rapor edilmektedir.

Bevilacqua et al. (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada; İtalya'ya özgü bir zeytin çeşidi olan Bela di Cerignola zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamından alınan zeytin ve salamura örneklerinden maya izole edildiği ve izole edilen mayaların tanımlandıkları; tanımlanan 64 izolattan 31' inin *C. famata*, 7' sinin ise *C. pelliculosa* türlerine ait olduğu rapor edilmiştir.

4.5.2. *Pichia* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Pichia cinsi içerisinde yer alan mayaların bazı türlerinin pseudohif veya gerçek hif ve askospor oluşturdıkları bilinmektedir. *Pichia* cinsine ait mayaların bazı türlerinin şekerleri fermente ettikleri, sıvı besiyerinde zar oluşturdıkları, jelatini hidrolize ettikleri, nitrati asimile ettikleri; sadece bir türünün inositolü asimile ettiği; bu cinse ait hiçbir türün ise üreaz enzimi ve nişasta benzeri hücre dışı bileşenleri üretmedikleri ifade edilmektedir (Kurtzman, 1999).

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ile çalışıldığında hiç *Pichia* cinsi maya izole edilemezken, İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamından izole edilerek tanımlanabilen 34 adet maya izolatından 10 tanesinin *Pichia* cinsine ait oldukları belirlenmiştir. *Pichia* cinsine ait bu mayalardan bir tanesinin *P. holstii* (anamorfu; *C. silvicola*, BF18-3), 9 tanesinin ise *P. anomala* türlerine ait oldukları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.11).

P. holstii suşlarının mikroskopik morfolojilerinin elips şeklinde olduğu; hücrelerin tek, çift ya da küme halinde gözlemlendikleri bilinmektedir (Kurtzman, 1999). Bu suşların sıvı besiyerinde zar oluşturdıkları belirtilmektedir. *P. holstii* suşlarının katı besiyerinde beyaz ve yapışkan özellikte koloni oluşturdıkları, pseudohif ve gerçek hif oluşturdıkları, askospor oluşturdıkları, glukozu fermente edebildikleri ve

nitratı asimile edebildikleri ifade edilmektedir. *P. holstii* suşlarının bazılarının ise 37°C'de gelişebildikleri bilinmektedir (Kurtzman, 1999). Çalışmada İznik yöresine ait zeytin örneklerinin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *P. holstii* suşunun mikroskopik görüntüsünün elips şeklinde olduğu ve hücrelerinin tek tek konumlandığı görülmüştür. Söz konusu izolatin YM broth besiyerinde 48 saat sonra zar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Fermantasyon ortamından izole edilen *P. holstii* izolatinın MEA besiyerinde beyaz renkli, kenarları düzgün, yapışkan özellikte, mat koloniler oluşturduğu; söz konusu suşun pseudohif de oluşturduğu belirlenmiştir. Çalışmada izole edilen *P. holstii* suşunun mikroskopik, makraskobik, sıvı besiyerinde gelişme ve pseudohif oluşturma özelliğinin, ilgili maya tanımlama anahtarında yer alan özellikler ile uyduğu görülmektedir.

Çalışmada izole edilen *P. holstii* izolatinın telemorf formda olduğu ve askospor oluşturduğu görülmektedir. Bu suşun glukozu fermente edebildiği, nitratı asimile edebildiği ancak 37°C' de, %50 ve %60 glukoz içeren besiyerinde, %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren ortamlarda gelişemediği ve üreyi hidrolize edemediği belirlenmiştir. Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu bulguların genel olarak tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyum içerisinde olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.13) (Hansen and Kurtzman, 1999).

İznik yöresine ait zeytinler ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen izolatların 9 tanesinin *P. anomala* türüne ait oldukları belirlenmiştir. Bu türe ait genel özellikler ve çalışmada elde edilen fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları Bölüm 4.5.1.'de verilmektedir. Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu sonuçların (Bkz. Şekil EK 5.6) tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Hansen and Kurtzman, 1999).

P. anomala türünün genellikle üzüm, elma, portakal, ananas, muz, kivi, papaya gibi meyvelerden, çeşitli meyve sularından, mısır ve salatadan, şarap, bira, turşu gibi fermente ürünlerden, zeytin, kakao ve kahveden, un ve buğdaydan, reçel, kurutulmuş meyve ve şekerlemelerden, peynir ve yoğurttan, balık ve kabuklu deniz ürünlerinden izole edildikleri ifade edilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Bunların yanı sıra, *Pichia* cinsi mayaların zeytin fermantasyon ortamlarından da sıklıkla izole edildikleri çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur (Hurtado et al., 2008; Marquina et al., 1992). Hurtado et al. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada yöreye özgü zeytinlerin fermantasyon ortamlarından çeşitli günlerde örneklerin alındığı ve maya izolasyonlarının gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Bu çalışmaya göre fermantasyonun 28. gününde 1 adet, 55. gününde ise 2 adet *P. anomala* suşunun izole edildiği ifade edilmiştir.

Portekiz'de yapılan başka bir çalışmada ise; ev yapımı zeytinlerden izole edilmiş olan maya suşlarından 53 tanesinin *P. anomala* türüne ait olduğu rapor edilmektedir (Marquina et al., 1992).

4.5.3. *Kloeckera* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Kloeckera cinsi içerisinde yer alan mayaların pseudohif oluşturdıkları fakat gerçek hif oluşturmadıkları bilinmektedir. *Kloeckera* cinsine ait mayaların türlerinin şekerleri fermente ettikleri ancak sıvı besiyerinde zar oluşturmadıkları, inositolü ve nitratı asimile edemedikleri, üreaz enzimi ve nişasta benzeri hücre dışı bileşenleri üretemedikleri ve jelatini hidrolize edemedikleri belirtilmektedir (Kurtzman, 1999).

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamından izole edilerek tanımlanabilen 40 adet maya izolatından 2 tanesinin (AZ-4, AF211-2) *K. apiculata* türüne ait oldukları tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

K. apiculata türüne ait suşların hücre şekillerinin apiküllo, küresel ya da oval oldukları, hücrelerin mikroskopta tek tek ya da çift halinde görüldükleri; sıvı besiyerinde çökelti oluşturdıkları ifade edilmektedir. *K. apiculata* suşlarının katı besiyerinde oluşturdıkları kolonilerin beyaz ya da krem renkli, parlak ve hafif bombeli oldukları, bazı suşların pseudohif oluşturdıkları belirtilmektedir. *K. apiculata* türüne ait suşların glukozu fermente edebildikleri, nitratı asimile edemedikleri ve 37°C' de gelişemedikleri de belirtilmektedir (Smith, 1999).

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytin örnekleri ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *K. apiculata* suşlarının mikroskopik görüntülerinin

küresel oldukları ve hücrelerinin tek tek gözlemlendiği belirlenmiştir. Söz konusu izolatların YM broth besiyerinde çökelti oluşturdıkları gözlemlenmiştir. İzole edilen *K. apiculata* izolatlarının MEA besiyerinde krem renkli, parlak, kenarları düzgün, bombeli koloniler oluşturdıkları; söz konusu suşların bir tanesinin (AF211-2) pseudohif oluşturduğu belirlenmiştir. İzole edilen *K. apiculata* suşlarının mikroskopik, makroskopik, sıvı besiyerinde gelişme ve pseudohif oluşturma özelliklerinin, maya tanımlama anahtarında yer alan özellikler ile uyduğu görülmektedir (Smith, 1999).

Yapılan ek tanımlama testlerinde; incelenen *K. apiculata* izolatlarının anamorf formda oldukları ve askospor oluşturmadıkları belirlenmiştir. İzole edilen suşların glukozu fermente edebildikleri ve %50 glukoz içeren besiyerinde gelişebildikleri ancak nitratı asimile edemedikleri, 37°C'de, %60 glukoz içeren besiyerinde, %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren besiyerlerinde gelişemedikleri ve üreyi hidrolize edemedikleri belirlenmiştir. Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen bu sonuçların (Bkz. Çizelge 4.12) genel olarak Smith'in tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Smith, 1999). *K. apiculata* türlerinin elma suyu, üzüm, şıra, şarap, bira, çeşitli meyve suları gibi ürünlerden izole edildikleri belirtilmiştir (Şenses-Ergül, 2009; Deak, 2008).

4.5.4. *Rhodotorula* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Rhodotorula cinsi içerisinde yer alan mayaların bazı türlerinin pseudohif ya da gerçek hif ve askospor oluşturdıkları bilinmektedir. Bu cinse ait bazı türlerin malt agarda kırmızı ya da sarı renk maddeleri oluşturdıkları belirtilmektedir. *Rhodotorula* cinsine ait mayaların bazı türlerinin genellikle inositolü asimile edemedikleri; inositolü kullandıkları durumlarda ise D-glukoranatı kullanamadıkları bilinmektedir. Bu cinse ait mayaların şekerleri fermente edemedikleri, üreyi hidrolize edebildikleri ve ksiloz enzimine sahip olmadıkları belirtilmektedir (Fell and Statzell-Tallmen, 1999a).

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamından izole edilerek tanımlanabilen 40 adet maya izolatından 2 tanesinin (AF0-2, AF1-4) *Rhodotorulla* cinsine ait oldukları ve bunların her ikisinin de *R. glutinis* oldukları

belirlenmiştir. İznik yöresine ait Gemlik zeytinleri ile yapılan deneylerde ise *Rhodotorula* cinsi maya izole edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

R. glutinis türünün *R. glutinis* var. *glutinis* ve *R. glutinis* var. *dairenensis* olmak üzere iki varyeteden oluştuğu bilinmektedir (Fell and Statzell-Tallmen, 1999a). Bu türe ait hücrelerin oval ya da küresel yapıda oldukları; sıvı besiyerinde yüzeyde halka, dipte çökelti oluşturdukları, bir ay sonra ise halka renginin turuncu, pembe ya da somon rengine döndüğü belirtilmektedir. *Rhodotorulla* türlerinin katı besiyerinde oluşturdukları kolonilerin açık kırmızı ile somon rengi arasında, bazen de açık turuncu renkte oldukları, yüzeylerinin düzgün ya da buruşuk olabildiği, kolonilerin düzgün ya da bombeli olabildiği belirtilmektedir. *R. glutinis* suşlarının bazılarının pseudohif oluşturdukları ancak hiçbirinin şekerleri fermente edemedikleri bilinmektedir. Bu suşların nitratı asimile edebildikleri, 37°C' de gelişebildikleri, üreaz enzimi üretebildikleri fakat %50 glukoz içeren ortamda gelişemedikleri de ifade edilmektedir (Fell and Statzell-Tallmen, 1999a).

Çalışmada izole edilen *R. glutinis* hücrelerinin mikroskopta oval yapıda oldukları gözlemlenmiştir. AF0-2 ve AF1-4 suşlarının YM broth besiyerinde dipte pembe renkli çökelti oluşturdukları, MEA besiyerinde ise; turuncu-pembe renkli, kenarları düzgün, parlak, yuvarlak ve yapışkan koloniler oluşturdukları gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda incelenen *R. glutinis* suşlarının glukozu fermente edemedikleri, 37°C' de, %50 ve %60 glukoz içeren ortamlarda gelişebildikleri, pseudohif ve askospor oluşturmadıkları, %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamlarda ise gelişemedikleri bunun yanı sıra üreyi hidrolize ve nitratı asimile edebildikleri belirlenmiştir. Fermantasyon ortamından izole edilen *R. glutinis* suşlarının mikroskopik ve makroskopik özellikleri ile birlikte incelenen biyokimyasal test sonuçlarının karşılaştırma yapılan maya tanımlama kaynağında yer alan özellikler ile uyduğu ancak bu izolatin %50 ve %60 glukoz içeren ortamda gelişebilme test sonuçlarının tanımlama anahtarı ile uyuşmadığı görülmektedir (Fell and Statzell-Tallmen, 1999a).

R. glutinis türünün genellikle elma, üzüm, şeftali ve tropikal meyvelerden, meyve sularından, mısır ve salatadan, malt ve biradan, şıra ve şaraptan, buğday unu ve

hamurdan, tavuk, biftek, balık ve çeşitli deniz ürünlerinden izole edildikleri ifade edilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

İspanya'da yapılan bir çalışmada zeytinlerin fermantasyon ortamlarından örneklerin alındığı ve tanımlama amacıyla maya izolasyonlarının gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Çalışmaya göre fermantasyonun 4 gününde izole edilen 119 maya izolatının 20 tanesinin *R. glutinis* türüne ait olduğu rapor edilmektedir (Hurtado et al., 2008).

İspanya'da yapılan bir diğer çalışmada ise; %4 tuz ve %0.3 asetik asit içeren aerobik ve anaerobik ortamlarda fermente edilen siyah zeytinlerden izole edilen mayaların tanımlandığı ve aerobik fermantasyon ortamından izole edilen izolatların %8' inin; anerobik fermantasyon ortamından izole edilen izolatların ise %9' unun *R. glutinis* türüne ait olduğu ifade edilmiştir (Arroyo-López et al., 2006).

4.5.5. *Saccharomyces* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Kurtzman'ın tanımlama anahtarına göre; *Saccharomyces* cinsi mayaların genel olarak çok yönlü tomurcuk oluşturdıkları, gerçek hif oluşturmadıkları fakat bazı suşlarının pseudohif oluşturdıkları, askospor oluşturalabildikleri, şekerleri fermente edebildikleri, nitratı ve inositolü asimile edemedikleri, sıvı besiyerinde zar, hücre dışı nişasta benzeri bileşenler oluşturmadıkları ve üreyi hidroliz edemedikleri belirtilmektedir (Vaughan-Martini and Martini, 1999).

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamından izole edilerek tanımlanabilen 40 adet maya izolatından 4 tanesinin (AF28-3, AF84-2, AF191-1, AF211-4) *S. cerevisiae* türüne ait oldukları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.7).

S. cerevisiae türüne ait hücrelerin oval ya da küresel yapıda oldukları ve küçük kümeler halinde konumlandıkları; katı besiyerinde oluşturdıkları kolonilerin açık krem rengi oldukları, yüzeylerinin düzgün ve krem si olduğu belirtilmektedir. *S. cerevisiae* suşlarının pseudohif oluşturmadıkları, glukozu fermente edebildikleri,

askospor oluşturabildikleri, bazı suşlarının 37°C' de gelişebildikleri ve nitratı asimile edemedikleri bilinmektedir (Vaughan-Martini and Martini, 1999).

Doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen, YM broth besiyerinde geliştirilen *S. cerevisiae* hücresinin mikroskop incelemesinde küresel oldukları ve kümeler halinde bulundukları, YM broth besiyerinde geliştirildiklerinde dipte çökelti oluşturdukları ve MEA besiyerinde oluşturdukları kolonilerinin krem renkli, kenarları düzgün ve hafif bombeli oldukları belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen bu dört *S. cerevisiae* izolatının glukozu fermente edebildikleri, 37°C' de gelişebildikleri, %50 glukoz içeren ortamda gelişebilme ve pseudohif oluşurma özelliklerinin ise değişkenlik gösterdiği, askospor oluşturdukları, %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamda gelişemedikleri, üreyi hidrolize ve nitratı asimile edemedikleri belirlenmiştir. Akhisar-Gemlik zeytinlerinin fermantasyon ortamlarından izole edilen *S. cerevisiae* suşlarının mikroskobik ve makroskobik özellikleri ile birlikte biyokimyasal test sonuçlarının, karşılaştırma yapılan maya tanımlama kaynağında yer alan özellikler ile uyuştuğu görölmektedir (Vaughan-Martini and Martini, 1999).

S. cerevisiae suşlarının gıdalardan yaygın olarak izole edildikleri bilinmektedir (Deak and Beuchat, 1996). Bu türe ait suşların üzüm elma, vişne, portakal ve tropikal meyvelerden, meyve sularından, biradan, şıra ve şaraptan, zeytinden, kakao, salata ve geleneksel gıdalardan, buğday unu, hamur ve ekmekten, bal, şekerlenmiş meyveler ve çeşitli şekerlemelerden, yoğurt, kefir, peynir ve dondurmadan ve mısır unundan izole edildikleri ifade edilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

Yapılan bir çalışmada fermente siyah zeytinlerden izole edilen mayaların %28' inin *S. cerevisiae* türüne ait olduğu ifade edilmektedir (Arroyo-López et al., 2006). Rodriguez-Gómez et al. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada ise; Hojiblanca ve Manzanilla türlerine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarındaki baskın maya türlerinden birinin *S. cerevisiae* olduğu belirtilmiştir.

4.5.6. *Cryptococcus* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Cryptococcus cinsine ait türlerin hücre şekillerinin ovoidal ya da uzun olduğu; vejetatif tomurcuklanmanın çoklu ya da polar tomurcuklanma ile gerçekleştiği, bazı suşlarının pseudohif ya da gerçek hif oluşturdıkları ifade edilmektedir. Bu mayaların askospor oluşturmadıkları; katı besiyerinde beyaz ya da krem koloniler oluşturdıkları, bazı suşlarının kırmızı, sarı ya da kahverengi pigmentler ürettikleri bilinmektedir. *Cryptococcus* cinsine ait bütün türlerin D-glukuronat kullandıkları; birçok türün nişasta sentezleyebildikleri; nişasta sentezleyemeyen türlerin ise inositolü kullanabildikleri belirtilmektedir. Bu cinse ait türlerin fermantasyon yeteneklerinin olmadığı ve üreaz reaksiyonlarının pozitif oldukları ifade edilmektedir (Fell and Statzell-Tallman, 1999b).

Çalışmada Akhisar-Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları süresince 46. günde *Cry. laurentii* (AF46-3), İznik-Gemlik zeytinlerinin fermantasyonlarının başlangıcında ise *Cry. saitoi* türleri izole edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.7 ve Çizelge 4.15). İzole edilen *Cryptococcus* cinsine ait türlerden biri olan *Cry. laurentii*'nin genel olarak küresel ya eliptik olduğu, tek tek, çift halinde ya da üç-dört hücrelik zincirler halinde konumlandığı, sıvı besiyerinde ince bir halka ve dipte çökelti oluşturduğu; katı besiyerinde krem, sarımsı, pembemsi ya da turuncu renkli, düzgün yüzeyli, parlak bazen de donuk koloniler oluşturdıkları; pseudomisel oluşturmadıkları; %50 glukoz içeren ortamda ve 37°C' de gelişemedikleri, nitratı asimile edemedikleri ve şekerleri fermente edemedikleri belirtilmektedir (Fell and Statzell-Tallman, 1999b).

Akhisar yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen tek *Cry. laurentii* izolatının YM broth besiyerinde gelişen hücrelerinin küresel ve tübüler olduğu; aynı besiyerinde bulanıklık, dipte çökelti ve 48 saat sonra parçalı zar oluşturduğu; MEA besiyerinde oluşturduğu kolonilerin ise pembemsi renkte, düzgün kenarlı ve parlak olduğu belirlenmiştir. Bu türün üreyi hidrolize edebildiği ancak 37°C' de, %50 ve %60 glukoz içeren, %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamlarda gelişemediği; nitratı asimile edemediği, glukozu fermente edemediği, pseudohif ve askospor oluşturmadiğı belirlenmiştir.

Cry. laurentii suşlarının genel olarak; elma, şeftali, portakal ve tropikal meyvelerden, mısır, kabak ve salatadan, üzüm, şıra ve şaraptan, buğday unundan, köy peyniri ve tereyağdan, et ve balık gibi gıdalardan izole edildikleri belirtilmektedir (Deak and Beuchat, 1996).

Genel olarak *Cry. saitoi* türünün koloni morfolojilerinin krem renkli, kenarları düzgün ve kaygan olduğu, glukozu fermente edemedikleri, %50 glukoz içeren ortamlarda gelişemedikleri, üreyi hidrolize edebildikleri, pseudohif ve askospor oluşturmadığı belirtilmiştir (<http://www.cbs.knaw.nl/collections>).

İznic yöresine ait Gemlik zeytinlerinin fermantasyon ortamından izole edilen *Cry. saitoi* izolatının YM broth besiyerinde gelişen hücrelerinin mikroskop altındaki görüntüsünün oval olduğu, aynı besiyerinde bulanıklık ve dipte çökelti oluşturduğu, MEA besiyerinde oluşturduğu kolonilerin ise krem renkli, düzgün kenarlı ve parlak olduğu belirlenmiştir. *Cry. saitoi* suşunu üreyi hidrolize edebildiği, nitratı asimile edebildiği ancak 37°C’ de, %50 ve %60 glukoz içeren, %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamlarda gelişemediği, glukozu fermente edemediği, pseudohif ve askospor oluşturmadığı belirlenmiştir. Fermantasyon ortamından izole edilen *Cry. saitoi* suşlarının mikroskopik ve makroskopik özellikleri ile birlikte incelenen biyokimyasal test sonuçlarının maya kaynaklarında yer alan özellikler ile uyuştugu görülmektedir (<http://www.cbs.knaw.nl/collections>). Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde zeytin örneklerinden *Cry. saitoi* suşunun izole edildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

4.5.7. *Zygosaccharomyces* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Zygosaccharomyces cinsi içerisinde yer alan mayaların genel olarak; vegetatif çok yönlü tomurcuklanma ile üredikleri, bazı suşlarının pseudohif oluşturdukları fakat gerçek hif oluşturamadıkları, düzgün, küresel ya da eliptik askospor oluşturabildikleri bilinmektedir. Bu cinse ait türlerin şekerleri fermente edebildikleri, nitratı ve inositolü asimile edemedikleri, sıvı besiyerinde zar, hücre dışı nişasta benzeri bileşenler oluşturmadıkları ve üreyi hidrolize edemedikleri belirtilmiştir (Kurtzman, 1999).

Bu çalışmada İznik yöresine ait zeytinlerin doğal fermentasyonları sırasında bir adet *Zyg. mrakii* (BF27-4) türü izole edilmiştir. Bu türe ait suşların mikroskopik görüntülerinin genel olarak küresel ya da eliptik olduğu, hürelerinin tek tek ya da çiftler halinde konumlandığı belirtilmektedir (Kurtzman, 1999). *Zyg. mrakii* türlerinin katı besiyerinde kaygan ve beyaz renkli koloniler oluşturdıkları, sıvı besiyerinde ise zar oluşturmadıkları bilinmektedir. Bu türlerin bazı suşlarının zayıf pseudohif oluşturdıkları ancak gerçek hif oluşturmadıkları, tüm suşlarının ise küresel ve düzgün askosporlar oluşturdıkları belirtilmektedir. *Zyg. mrakii* türüne ait glukozu fermente edebildikleri bilinmektedir. Ancak bu suşların 37°C' de gelişemedikleri ve nitratı asimile edemedikleri de ifade edilmektedir.

Çalışmada izole edilen *Zyg. mrakii* türünün (BF27-4) hücre şekillerinin küresel olduğu ve hücrelerinin tek tek gözlemlendiği; MEA besiyerinde kenarları düzgün, mat ve beyaz renkli koloniler oluşturdıkları, YM broth besiyerinde ise; dipte çökelti ve hafif bulanıklık oluşturdıkları saptanmıştır. Söz konusu izolatin glukozu fermente edebildiği, %50 ve %60 glukoz içeren ortamlarda gelişebildiği ve askospor oluşturabildiği belirlenmiştir. *Zyg. mrakii* izolatının %0.5 ve %1.0 asetik asit içeren ortamlarda gelişemediği, pseudohif oluşturmadiğı, 37°C'de gelişemediği ve nitratı asimile edemediği gözlemlenmiştir. Zeytin örneklerinden izole edilen *Zyg. mrakii* suşlarının mikroskopik ve makroskopik özellikleri ile birlikte incelenen biyokimyasal test sonuçlarının ilgili maya tanımlama kaynağında yer alan özellikler ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir.

4.5.8. *Debaryomyces* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme sonuçları

Debaryomyces cinsine ait türlerde vejetatif tomurcuklanmanın çoklu tomurcuklanma ile gerçekleştiği, suşlarının pseudohif oluşturdıkları ancak gerçek hif oluşturmadıkları ifade edilmektedir. Bu mayaların askospor oluşturdıkları; bazı türlerinin şekerleri fermente edebildikleri, nitratı asimile edemedikleri, bazı türlerinin sıvı besiyerinde zar oluşturdıkları, hücre dışı nişasta benzeri bileşenler üretmedikleri, inositolü asimile ve üreyi hidrolize edemedikleri bilinmektedir (Nakase et al., 1999)

Akhisar yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen suşlardan 4 tanesinin (AF28-2, AF60-3, AF191-2, AF211-1) *D. hansenii* türüne ait oldukları belirlenmiştir. Bu türe ait genel özellikler ve çalışmada elde edilen fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları Bölüm 4.5.1’de verilmektedir. Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen sonuçların tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Nakase et al., 1999).

D. hansenii suşlarının genel olarak; peynir, süt, yoğurt, dondurma gibi süt ürünlerinden, şeftali ve kayısı suları, üzüm suyu, elma suyu, mısır, domates, nar, incir, portakal gibi meyve-sebze ve bunlarının ürünlerinden, arpa ve pirinç birası, şıra, şarap, turşu, çeşitli fermente et ürünleri zeytin, koji, ekmek gibi fermente gıdalardan, biftek, balık, tavuk, yumurta ve deniz ürünlerinden izole edildikleri belirtilmiştir (Deak and Beuchat, 1996).

4.5.9. *Clavispora* cinsi maya izolatlarına ait değerlendirme

Clavispora cinsi içerisinde yer alan mayaların bazı türlerinin askospor ve pseudohif oluşturdukları ancak gerçek hif oluşturamadıkları bilinmektedir. Bu cinse ait mayaların şekerleri fermente edebildikleri, nitratı asimile edemedikleri, sıvı besiyerinde zar oluşturmadıkları, inositolü asimile ve üreyi hidrolize edemedikleri bilinmektedir (Lachance and Phaff, 1999).

İznik yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen izolatların 1 tanesinin (BF1-2) *Clv. lusitaniae* türüne ait olduğu belirlenmiştir. *Clv. lusitaniae* türünün askospor oluşturduğu ve *C. lusitaniae* türününün telemorfu olduğu bilinmektedir. Bu türe ait genel özellikler ve çalışmada elde edilen fiziksel ve biyokimyasal test sonuçları Bölüm 4.5.1’de verilmektedir. Ek tanımlama testleri sonucunda elde edilen sonuçların tanı anahtarında yer alan test sonuçları ile uyumlu oldukları görülmektedir (Lachance and Phaff, 1999).

4.5.10. *Aerobasidium* cinsi izolatlara ait değerlendirme sonuçları

Araştırmada Akhisar yöresine ait zeytinler ile yapılan çalışmada iki adet *A. pullulans* suşu izole edilmiştir (AZ-6, AF1-5).

A. pullulans türleri maya benzeri mikroorganizmalar olarak bilinmektedir. Ürettikleri hücre dışı polisakkaritlerin gıda ve eczacılık endüstrisinde yaygın olarak kullanıldığı ifade edilmektedir (Zheng et al., 2008; Yatmaz ve Turhan, 2012). *A. pullulans* türlerinin yaygın olarak pullulan ve melamin ürettikleri belirtilmektedir (Zheng et al., 2008). Pullulanın gıda endüstrisinde çeşitli gıda formülasyonlarında ve kaplama materyali olarak kullanıldığı ifade edilmektedir (Yatmaz ve Turhan, 2012).

Çalışmada izole edilen *A. pullulans* türlerinin mikroskop altındaki hücre şekillerinin genel olarak küresel olduğu, tek tek konumlandıkları (Bkz. Şekil EK 5.2), YM broth besiyerinde hafif bulanıklık ve dipte çökelti oluşturdıkları, MEA besiyerinde krem renkli, düzgün yüzeyli, parlak koloniler oluşturdıkları belirlenmiştir. *A. pullulans* türlerinin oluşturdıkları kolonilerin 7-10. günden itibaren buzdolabı sıcaklığında, siyah renkli, misel yapıda hücre dışı polisakkaritler ürettikleri ve ilerleyen günlerde renklerinin tamamen siyahlaşarak sert bir plaka haline dönüştükleri gözlemlenmiştir. Bu türlerin; pseudomisel oluşturdıkları (Bkz. Şekil EK 5.10), %50 ve %60 glukoz içeren ortamlarda gelişebildikleri, 37°C' de gelişemedikleri, nitratı asimile edemedikleri ve glukozu fermente edemedikleri belirlenmiştir. Ayrıca bu suşların; üreyi hidrolize edebildikleri ancak %0.5 ve %1 asetik asit içeren ortamlarda gelişemedikleri, nitratı asimile edemedikleri ve askospor oluşturmadıkları belirlenmiştir.

A. pullulans türüne ait suşların daha önce çeşitli zeytin örneklerinden izole edildikleri belirtilmiştir (Deak and Beuchat, 1996). Yapılan bir çalışmada; doğal fermente siyah zeytinlerden izole edilen mayalar RFLP-PZR yöntemi ile tanımlanmış ve elde edilen izolatların %10' unun *A. pullulans* türüne ait oldukları ifade edilmiştir (Nisiotou et al., 2010).

4.6. Maya suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Çalışmada; Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik çeşidi zeytinler ve bunların doğal fermantasyonları ortamlarındaki maya floralarının belirlenmesinin ardından, izole edilen belirli maya suşlarının sofralık zeytin üretimi açısından önemli bazı teknolojik özellikleri de belirlenmiştir. Literatür araştırması sonucunda sofralık

zeytin üretiminde destek starter olarak kullanılabileceği tespit edilen ve fermantasyon süresince ortamda uzun süre canlılığını sürdürebilen maya suşları, teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla seçilmişlerdir.

Bu amaçla yapılan pasajlar ile canlandırılabilen ve Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinden izole edilen 4 adet *D. hansenii* (AF28-2, AF60-3, AF191-2, AF211-1), 13 adet *C. famata* (AF46-1, AF46-2, AF60-1, AF60-2, AF60-4, AF60-5, AF112-1, AF112-2, AF138-1, AF138-2, AF138-3, AF164-4, AF191-3), 7 adet *C. hellenica* (AZ-1, AF1-2, AF1-6, AF28-4, AF46-5, AF46-6, AF84-1), 1 adet *K. apiculata* (AF211-2), 1 adet *A. pullulans* (AZ-6), 1 adet *C. membranifaciens* (AF164-1) ve 1 adet *Cry. laurentii* (AF46-3) suşu olmak üzere toplam 28 suşun teknolojik özellikleri incelenmiştir.

İznik yöresine ait Gemlik zeytini ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarından ise yapılan pasajlarla canlandırılabilen 9 adet *P. anomala* (BZ-1, BZ-4, BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2, BF63-2), 11 adet *C. pelliculosa* (BZ-5, BF0-4, BF1-3, BF5-2, BF27-1, BF27-5, BF46-3, BF91-1, BF91-3, BF143-2, BF172-1), 1 adet *C. lusitaniae* (BF1-2) ve 5 adet *C. famata* (BZ-2, BF18-4, BF63-1, BF91-2, BF143-1) olmak üzere toplam 26 suşun teknolojik özellikleri belirlenmiştir.

Maya suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile uygulanan testler arasında; farklı sıcaklıklarda gelişebilme, düşük pH değerlerinde gelişebilme, yüksek tuz derişimlerinde gelişebilme, asetik asit üretme, hidrojen sülfür üretme, lipolitik aktivite, çeşitli şekerleri fermente ve asimile edebilme, enzim profillerinin belirlenmesi, oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme, sitrik asiti kullanabilme, katalaz aktivitesi, killer aktivite, proteolitik aktivite ve pektolitik aktivite testleri yer almaktadır.

4.6.1. Farklı sıcaklıklarda gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar

Sofralık zeytin fermantasyonunda önemli bir parametre olan sıcaklığın maya gelişimi üzerine etkilerinin incelendiği denemelerde, fabrikadaki koşullar dikkate alınarak sıcaklık dereceleri seçilmiş ve denenmiştir. Uygun koşullarda aktifleştirilen

maya suşları, YM broth besiyerinde 10°C, 15°C ve 37°C sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmışlardır. Böylece maya suşlarının geniş bir sıcaklık aralığındaki gelişebilme özelliklerinin incelenmesi hedeflenmiştir. İnkübasyon sonunda besiyerinde üreme gözlenebilen kültürler pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kontrol sıcaklığı olarak ise; 28°C kullanılmıştır. Maya suşlarının denenen sıcaklık derecelerindeki gelişebilme özellikleri ile ilgili sonuçlar, Çizelge 4.17 ve Çizelge 4.18’ de yer almaktadır.

Çizelgeler incelendiğinde de görüleceği gibi; incelenen tüm maya suşları 15°C ve 28°C’de gelişebilmişlerdir.

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilmiş olan *A. pullulans* (AZ-6) ve *C. membranifaciens* (AF164-1) suşları 10°C ve 37°C’de gelişememiş, ancak diğer sıcaklık derecelerinde üreyebilmişlerdir. Ayrıca, bazı *D. hansenii* (AF28-2, AF60-3, AF211-1) ve *C. famata* (AF46-1, AF46-2, AF60-1, AF60-2, AF60-4, AF112-1, AF112-2, AF138-1, AF138-2, AF138-3, AF191-3) suşlarının da 37°C’ de gelişemedikleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.17).

Çizelge 4.18 incelendiğinde de görüleceği gibi; İznik yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *Clv. lusitaniae* (BF1-2) suşu dışında tüm suşların 10°C’de gelişebildikleri saptanmıştır. 37°C’de yapılan denemelerde ise 5 adet *C. famata* (BZ-2, BF18-4, BF63-1, BF91-2, BF143-1) ve *Clv. lusitaniae* (BF1-2) suşunun bu sıcaklık derecesinde gelişemediği belirlenmiştir.

Denemeler sonucunda elde edilen bulgular incelendiğinde İznik yöresine ait zeytinler ile çalışıldığında izole edilen maya suşlarının 37°C’ye kadar olan sıcaklık derecelerine daha dayanıklı oldukları görülmektedir.

Literatürde sofralık zeytinlerden izole edilen mayaların farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilme özelliklerinin incelendiği çeşitli çalışmalar yer almaktadır (Bevilacqua et al., 2009; Psani and Kotzekidou, 2006).

Çizelge 4.17. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	10°C	15°C	28°C	37°C
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	-	+	+	-
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	-
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF46-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF46-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	+	+	+	+
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF60-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF60-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	-
AF60-4	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF60-5	<i>C. famata</i>	+	+	+	+
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	+
AF112-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF112-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF138-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF138-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF138-3	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	-	+	+	-
AF164-4	<i>C. famata</i>	+	+	+	+
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	+
AF191-3	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	-
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	+	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

Çizelge 4.18. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının farklı sıcaklıklarda gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	10°C	15°C	28°C	37°C
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BZ-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	-	+	+	-
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF18-4	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF63-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	+
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF91-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF143-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	-
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

İtalya'da yapılan bir çalışmada bu ülkeye özgü bir zeytin çeşidi olan Bela di Cerignola zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından alınan zeytin ve salamura örneklerinden maya izole edildiği ve izole edilen mayaların sofralık zeytin üretimi açısından önemli sayılabilecek bazı teknolojik özelliklerinin belirlendiği

ifade edilmiştir (Bevilacqua et al., 2009). Belirlenen teknolojik özelliklerden birinin ise; mayaların farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilme özelliklerinin olduğu belirtilmektedir. İncelenen zeytin türünden izole edilen mayalardan *C. famata* türüne ait suşların büyük bir kısmının 15°C'de zayıf geliştikleri, 37°C'de ise gelişemedikleri; *C. guilliermondii* türüne ait suşların, 15°C'de gelişemedikleri ancak 37°C'de gelişebildikleri; *C. pelliculosa* türüne ait 7 suşdan sadece 1 tanesinin 15°C'de gelişebildiği, hiçbirinin 37°C'de gelişemediği, *R. mucilaginosus* türüne ait dört suştan ise yalnızca bir tanesinin 15°C'de gelişebildiği, hiçbirinin 37°C'de gelişemediği belirtilmektedir. Çalışmada kontrol sıcaklığı olarak ise; 25°C kullanıldığı ifade edilmektedir (Bevilacqua et al., 2009).

Psani and Kotzekidou (2006) tarafından yapılan başka bir araştırmada ise Yunan tipi sofralık zeytinlerden izole edilen; *D. hansenii* ve *T. delbrueckii* suşlarının sofralık zeytin üretimi açısından önemli teknolojik karakterlerden birisi olan farklı sıcaklıklarda gelişme özelliklerinin incelendiği belirtilmektedir. İncelenen suşların 15°C'de gelişebilme özelliklerinin araştırıldığı denemelerin YM Broth besiyerinde gerçekleştirildiği ve tüm suşların bu sıcaklık derecesinde gelişebildikleri ifade edilmektedir.

Bu çalışmada zeytin örneklerinden izole edilen mayaların farklı sıcaklık derecelerinde gelişebilme özelliklerinin belirlenmesi için seçilen sıcaklık değerleri, bu mayaların soğuk ve sıcak iklim özellikleri gösteren bölgelerde de destek starter kültür olarak kullanılabilme potansiyellerini araştırmak amacı ile, 10°C-37°C aralığında seçilmiştir. Çizelge 4.15 ve çizelge 4.16' da yer alan sonuçlar incelendiğinde *C. hellenica*, *Cry. laurentii*, *K. apiculata*, *P. anomala* ve *C. pelliculosa* suşlarının tamamının 10°C, 15°C, 28°C ve 37°C'de gelişebildikleri görülmektedir. Akhisar-Gemlik zeytinlerinden izole edilen 4 adet *D. hansenii* suşundan 1 tanesinin, 13 adet *C. famata* suşundan ise yalnız 2 tanesinin her üç sıcaklık derecesinde de gelişebildiği belirlenmiştir.

4.6.2. Farklı pH değerlerinde gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar

Doğal fermente sofralık zeytin üretimi sırasında ortam pH' sının LAB tarafından üretilen laktik aside bağlı olarak düştüğü bilinmektedir. Ortamdaki LAB sayısının ise

substrat miktarı, rekabetçi flora, fenolik bileşen miktarı ve sıcaklık gibi çeşitli parametrelere bağlı olarak farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (Idou et al., 2009). Yapılan çeşitli çalışmalarda zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarındaki salamura pH'ının 4.0 ile 5.0 arasında değişiklik gösterdiği belirtilmektedir (Amelio and DeMuro, 2000; Campaniello et al., 2005; Pereira et al., 2008; Idou et al., 2009). Yapılan bu çalışmada ise; her iki yöreye ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyonları boyunca salamura pH'ının yaklaşık 4.5 ile 5.0 arasında değiştiği görülmektedir.

Akhisar ve İznik yörelerine ait zeytinler ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının düşük pH derecelerinde gelişebilme özelliklerinin incelendiği denemelerde pH'ı 2.5, 3.5 ve 4.5'e ayarlanan YM broth besiyeri kullanılmıştır. Denemelerde pozitif kontrol olarak pH'ı 6.2 olan YM broth besiyerleri kullanılmıştır. Çalışmada incelenen maya suşlarının denenen farklı pH değerlerinde gelişebilme özelliklerine ilişkin sonuçlar; Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20'de verilmektedir.

Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20 incelendiğinde de görüleceği gibi, incelenen tüm izolatların pH 3.5, pH 4.5 ve kontrol pH'ı olan pH 6.2'de gelişebildikleri bulunmuştur.

Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinleri ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. hellenica* suşlarının tamamının, *A. pullulans* suşunun (AZ-6), iki adet *C. famata* suşunun (AF60-5, AF164-4) ve *K. apiculata* suşunun (AF211-2) pH 2.5'de gelişebildiği saptanmıştır. İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen suşlar arasından ise; 4 adet *C. famata* (BZ-2, BF18-4, BF91-2, BF143-1) ve *Clv. lusitaniae* (BF1-2) suşu dışındaki tüm izolatların pH 2.5'de gelişebildikleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.20).

Silva et al. (2011) tarafından Portekiz'de yapılan bir çalışmada; doğal fermente sofralık zeytinlerden izole edilen mayaların probiyotik özellikleri belirlenmiş ve bu amaçla yapılan denemelerden birinin de; düşük pH değerlerine dayanıklılık olduğu ifade edilmiştir. Deneyler sonucunda incelenen suşlardan; *P. membranifaciens*, *C.*

oleophila, *P. fermentas*, *C. boidinii*, *T. delbrueckii* suşlarının pH 2.5' de gelişebildikleri ifade edilmiştir.

Çizelge 4.19. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının düşük pH değerlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	pH 2.5	pH 3.5	pH 4.5
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	+	+	+
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	-	+	+
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF46-1	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF46-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	-	+	+
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF60-1	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF60-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	-	+	+
AF60-4	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF60-5	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF112-1	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF112-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF138-1	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF138-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF138-3	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	-	+	+
AF164-4	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	-	+	+
AF191-3	<i>C. famata</i>	-	+	+
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	-	+	+
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

Çizelge 4.20. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının düşük pH değerlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolot no.	Maya türü	pH 2.5	pH 3.5	pH 4.5
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BZ-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF1-2	<i>Clv.lusitaniae</i>	-	+	+
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF18-4	<i>C. famata</i>	-	+	+
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF63-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF91-2	<i>C. famata</i>	-	+	+
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF143-1	<i>C. famata</i>	-	+	+
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

Bevilacqua et al. (2009) tarafından İtalya' da yapılan başka bir araştırmada Bella Di Cerignola türü sofralık zeytinlerden izole edilen maya suşlarının teknolojik özellikleri ve bozucu karakterlerinin incelendiği belirtilmiştir. Bu amaçla maya suşlarının pH 4.0, 5.0 ve 9.5' da gelişme özelliklerinin de belirlendiği deneyler

yapılmıştır. Yapılan analizlerin sonucunda pH 4.0 ve 5.0' de tüm *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *R. mucilaginosa* türlerine ait suşların gelişebildikleri, pH 9.5 değerinde ise; bu suşların ancak bir kısmının gelişebildiği rapor edilmiştir.

Psani and Kotzekidou (2006) tarafından Yunanistan'da yapılan bir diğer araştırmada ise; Yunan tipi sofralık zeytinlerden izole edilen *D. hansenii* ve *T. delbrueckii* suşlarının tamamının, pH' ları 2.5, 3.5, 4.5, 5.5 ve 6.5' e ayarlanmış YM broth besiyerlerinde gelişebildikleri belirtilmiştir. Çalışmada ise izole edilen *D. hansenii* suşlarından yalnızca %14' ünün pH 2.5' de tamamının ise pH 3.5' de gelişebildiği görülmektedir.

Fermantasyon ortamlarında yer alan mayaların düşük pH' larda gelişebilme özelliklerinin hem zeytinin kendine özgü tat ve kokusunun oluşumu hem de LAB gelişiminin desteklenmesi açısından önemli olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada Akhisar ve İznik yörelerine ait zeytin ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının tamamının pH 3.5 ve 4.5' de gelişebildikleri, *C. hellenica*, *K. apiculata*, *A. pullulans* ve *P. anomala* ve *C. pelliculosa* suşlarının ise; pH 2.5' de de canlılıklarını koruyabildikleri belirlenmiştir.

Literatürde sofralık zeytin örneklerinde yapılan çalışmalarda salamura pH' sın 2.5' e kadar düştüğü belirlenen bir çalışma yer almamaktadır. Ancak mayaların probiyotik özelliklerinin incelendiği denemelerde, pH 2.5' de gelişebilme özelliği önem kazanmaktadır.

4.6.3. Yüksek tuz derişiminde gelişebilme analizlerine ilişkin sonuçlar

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde salamuraya ilave edilen tuz oranının %8-10 (w/v) arasında değiştiği, ülkemizde ise bu oran yaklaşık; %15 (w/v) olduğu, bilinmektedir (Uylaşer ve Şahin, 2004). Mayaların doğal fermente sofralık zeytin fermantasyonunda yer alabilmeleri ve canlılıklarını sürdürebilmeleri için bu tuz derişimlerine dayanıklı olmaları gerekmektedir.

Bu çalışmada, Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerin fermantasyonları boyunca salamuradaki tuz oranının; %8.19-16.75; İznik yöresine ait zeytinlerin

fermantasyonları boyunca salamuradaki tuz oranının ise; %6.28-14.80; arasında değiştiği belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1 ve 4.2). İzolatların yüksek tuz derişimlerine toleranslarının belirlendiği deneylerde incelenen maya suşları aktifleştirildikten sonra, tuz derişimleri %14, %16 ve %18'e ayarlanmış YM broth besiyerlerine ekilmişler ve 28°C'de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. Inkübasyon süresi sonunda elde edilen sonuçlar, izelge 4.21 ve izelge 4.22' de yer almaktadır.

izelgeler incelendiğinde görülebileceği gibi; yüksek tuz derişiminde gelişebilme özellikleri incelen maya suşlarının tamamı %14 ve %16 tuz derişimlerinde gelişebilmektedirler. Çizelge 4.21' de de görüldüğü gibi; Akhisar-Gemlik zeytinlerinden izole edilen *C. hellenica* (AZ-1) ve *A.pullulans* (AZ-6) suşları ile bu zeytinlerin fermentasyon ortamlarından izole edilmiş olan 5 adet *C. hellenica* (AF1-2, AF1-6, AF28-4, AF46-5, AF46-6) suşunun %18 tuz derişiminde gelişemedikleri, diğer suşların ise; bu tuz derişiminde de gelişebildikleri saptanmıştır.

Silva et al. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; Galega ve Cordovil eşidi zeytinlerin doğal fermentasyon ortamlarından alınan salamura örneklerinden izole edilen mayaların, %5 ve %10 tuz derişimlerinde gelişebilme özelliklerinin belirlendiği ifade edilmektedir. Araştırmada izole edilen tüm *P. membranifaciens*, *C. boidinii*, *T. delbrueckii*, *C. oleophila* ve *P. fermentas* suşlarının denenen tüm tuz derişimlerinde gelişebildikleri, *S. cerevisiae* ve *C. citrea* türlerinin ise; %10 tuz derişiminde gelişemedikleri rapor edilmiştir.

İtalya' da yapılan bir başka araştırmada ise, Bella Di Cerignola türü sofralık zeytinlerden izole edilen maya suşlarının %2.5, %5.0 ve %7.5 tuz derişimlerinde gelişebilme özellikleri incelenmiş ve *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *R. mucilaginosa* türlerine ait tüm suşların denenen tüm derişimlerde gelişebildikleri rapor edilmiştir (Bevilacqua et al., 2009).

Çizelge 4.21. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının yüksek tuz derişimlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	NaCl (w/v; %)		
		%14	%16	%18
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	+	+	-
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AF46-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF46-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF46-3	<i>Cry. Laurentii</i>	+	+	+
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	-
AF60-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF60-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	+	+	+
AF60-4	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF60-5	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF112-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF112-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF138-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF138-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF138-3	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	+	+	+
AF164-4	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+
AF191-3	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	+	+	+
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

Çizelge 4.22. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının yüksek tuz derişimlerinde gelişebilmelerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	NaCl (w/v; %)		
		%14	%16	%18
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+	+	-
BZ-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+	+	-
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	+	+	+
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+	+	-
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF18-4	<i>C. famata</i>	+	+	+
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF63-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+	+	-
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-
BF91-2	<i>C. famata</i>	+	+	+
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	-
BF143-1	<i>C. famata</i>	+	+	+
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

4.6.4. Asetik asit üretme özelliğinin incelendiği analizlere ilişkin sonuçlar

Çalışmada incelenen Akhisar-Gemlik ve İznik-Gemlik zeytinlerinden ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının asetik asit üretimlerine ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde; incelenen hiçbir izolatin kullanılan kültürel yöntemlere göre asetik asit üretemedikleri belirlenmiştir.

Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde fermantasyonun başlangıcında ortamda LAB' nin baskın oldukları ve zeytin meyvesinden salamuraya geçen şekerleri fermente ederek laktik asit ürettikleri bilinmektedir. Fermantasyon sırasında oluşan laktik asitin hem sofralık zeytinin raf ömrünü uzattığı hem de zeytine özgü tat ve kokunun oluşumuna yardımcı olduğu belirtilmektedir (Arroyo-López et al., 2008) Bazı durumlarda zeytinden salamuraya geçen fenolik bileşenler, yüksek tuz konsantrasyonu ve rekabetçi flora gibi nedenlerden dolayı LAB inhibe oldukları ve yeterince laktik asit üretemedikleri bilinmektedir. Böyle durumlarda mayaların ürettikleri asetik asitin salamura pH' sını düşürdüğü ve ürünün raf ömrünün uzamasına katkı sağlayabildiği de belirtilmektedir Bunun yanı sıra mayaların ürettikleri asetik asitin zeytinin tat ve kokusuna katkı sağladığı bilinmektedir (Arroyo-López et al., 2008)

Hernandez et al. (2007) tarafından zeytin örneklerindeki uçucu bileşenlerin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada; Manzanilla türüne ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından alınan salamura örneklerinden izole edilen bazı; *K. marxianus*, *C. laurentii*, *C. maris*, *C. rugosa*, *R. glutinis*, *P. guilliermondii*, *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *C. humicola*, *C. zeylanoides*, *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. galabrata*, *T. cutaneum*, *T. delbrueckii* ve *R. minuta* türlerine ait maya suşlarının 363-1164 mg/L arasında asetik asit üretebildikleri ifade edilmektedir. Söz konusu araştırmada asetik asitin yeşil zeytin aromasına etki ettiği ancak bunun pozitif bir etki olduğuna dair herhangi bir çalışmanın bulunmadığı ifade edilmektedir.

4.6.5. Hidrojen sülfür üretme özelliğinin incelendiği analizlere ilişkin sonuçlar

Yapılan çalışmada, her iki yöreye ait zeytin ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların H₂S üretmelerine ilişkin sonuçlar Çizelge 4.23 ve Çizelge 4.24'de yer almaktadır.

Çizelge 4.23' in incelenmesinden de görülebileceği gibi; Biggy agar besiyerine ekimleri yapılan maya suşlarının 28°C'de 5 günlük inkübasyonları sonucunda, Akhisar-Gemlik zeytini ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. hellenica* suşları krem rengi (2), *D. hansenii*, *Cry. laurentii*, *C. membranifaciens* ve *C. famata* suşları açık kahverengi (3), *A. pullulans* (AZ-6) ve *K. apiculata* (AF211-2) suşları ise koyu kahverengi (5) koloniler oluşturmuşlardır.

İznik-Gemlik zeytini ve bu zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarından ise; *P. anomala* suşları açık kahverengi (3) (BZ-1, BF0-5, BF1-1) ve krem (2) (BZ-4, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2, BF63-2), *C. famata* suşları açık kahverengi (3), *C. pelliculosa* suşları beyaz (1) (BZ-5, BF0-4, BF1-3), krem (2) (BF5-2, BF27-1, BF46-3, BF91-1, BF91-3, BF143-2, BF172-1) ve koyu kahverengi (5) (BF27-5), *Clv. lusitaniae* suşu (BF1-2) ise açık kahverengi (3) koloniler oluşturmuşlardır (Bkz. Çizelge 4.24).

İtalya'da yapılan bir çalışmada, beş ayrı çeşit zeytinin fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının Biggy agar besiyerinde H₂S üretme özelliklerinin incelendiği ve araştırmada izole edilen *C. parapsilosis*, *P. guilliermondi*, *P. kluyveri* suşlarının tamamının H₂S ürettikleri rapor edilmiştir (Aponte et al., 2010).

Genel olarak mayaların oluşturdukları H₂S' in kötü kokulu olması nedeniyle fermantasyon sırasında ortamda istenmeyen bir bileşen olduğu bilinmektedir. Bu nedenle de fazla miktarda H₂S üretiminin sofralık zeytin üretimi açısından olumsuz bir özellik olduğu kabul edilmektedir.

Çalışmada maya suşlarının H₂S üretme özelliklerine ilişkin test sonuçları incelendiğinde; genel olarak yüksek miktarlarda H₂S üretmedikleri görülmektedir.

Çizelge 4.23. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının H₂S üretme özelliklerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	Koloni rengi
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	Koyu kahverengi (5)
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	Açık kahverengi (3)
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	Krem(2)
AF46-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF46-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	Açık kahverengi (3)
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AF60-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF60-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	Açık kahverengi (3)
AF60-4	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF60-5	<i>C. famata</i>	Koyu kahverengi (5)
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	Krem (2)
AF112-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF112-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF138-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF138-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF138-3	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	Açık kahverengi (3)
AF164-4	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	Açık kahverengi (3)
AF191-3	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	Açık kahverengi (3)
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	Koyu kahverengi (5)

Çizelge 4.24. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının H₂S üretme özelliklerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	Koloni rengi
BZ-1	<i>P. anomala</i>	Açık kahverengi (3)
BZ-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
BZ-4	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	Beyaz (1)
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	Beyaz (1)
BF0-5	<i>P. anomala</i>	Açık kahverengi (3)
BF1-1	<i>P. anomala</i>	Açık kahverengi (3)
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	Açık kahverengi (3)
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	Beyaz (1)
BF1-4	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF18-2	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BF18-4	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF27-3	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	Koyu kahverengi (5)
BF46-2	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF63-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
BF63-2	<i>P. anomala</i>	Krem (2)
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF91-2	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF143-1	<i>C. famata</i>	Açık kahverengi (3)
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	Krem (2)

4.6.6. Lipolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinleri ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının lipolitik aktivitelerinin belirlenmesine yönelik olarak yapılan testlerde, tribütirin ve zeytinyağı hidrolizi olmak üzere iki farklı yöntemden faydalanılmıştır. Tribütirin hidrolizi denemelerinde maya izolatlarının esteraz aktiviteleri, zeytinyağı hidrolizi denemelerinde ise maya izolatlarının lipaz aktivitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada maya suşlarına uygulanan ve suşların lipolitik aktivitelerini ortaya koymaya yönelik testlerden birisi olan tribütirin hidrolizi deneylerinin sonucunda incelenen tüm izolatların pozitif sonuç verdikleri saptanmıştır. Bu durum incelenen maya suşlarının esteraz aktivitesine sahip oldukları şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşılık, incelenen maya suşlarının hiçbirinin zeytinyağını hidrolize edemedikleri de belirlenmiştir.

İtalya'da yapılan bir çalışmada; beş farklı zeytin çeşidinin fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların lipolitik aktivitelerinin de incelendiği ve bu amaçla Tween 80 ve tribütirin hidrolizi deneylerinin yapıldığı belirtilmiştir. Deneylerde izole edilen 6 *C. parapsilosis* suşundan beşinin; 4 *P. guilliermondii* suşundan ise yalnızca birinin, Tween 80 ve tribütirini hidrolize edebildikleri belirlenmiştir (Aponte et al., 2010)

Hernandez et al. (2007) tarafından İspanya'da yapılan diğer bir çalışmada ise; Manzanilla türüne ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların lipolitik aktiviteleri tribütirin ve zeytinyağı kullanılarak belirlenmiştir. Deneylerde izole edilen maya suşlarından bazı *K. marxianus*, *C. laurentii*, *Candida maris*, *C. rugosa* ve *R. glutinis* suşlarının hem tribütirin hem de zeytinyağını hidrolize edebilmeleri nedeniyle lipaz ve esteraz aktivitelerine, *P. guilliermondii*, *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *C. humicola*, *C. zeylanoides*, *Candida inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. galabrata*, *T. cutaneum*, *T. delbrueckii* ve *R. minuta* suşlarının ise; yalnızca tribütirini hidrolize etmeleri nedeniyle esteraz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Silva et al. (2011) tarafından, iki farklı zeytin çeşidinin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların lipolitik aktivitelerini belirlemeye yönelik olarak yapılan testlerde; esteraz aktivitesi için tribütirin ve lipaz aktivitesi içinse; zeytinyağı kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan deneylerin sonucunda bazı *P. membranaefaciens*, *C. oleophila*, *P. fermentans* ve *C. citrea* suşlarının esteraz aktivitesine; *S. cerevisiae* suşlarının ise lipaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Benzer konuda yapılan bir diğer çalışmada, zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından alınan zeytin ve salamura örneklerinden izole edilen mayaların esteraz aktivitelerinin incelendiği ve izole edilen 31 adet *C. famata* suşundan üç tanesi, 22 adet *C. guilliermondii* suşundan beş tanesi, 7 adet *C. pelliculosa* suşundan iki tanesinin tribütirini hidrolize ederken; izole edilen dört *R. mucilaginosus* suşundan ise hiçbirinin bu özelliğe sahip olmadıkları belirtilmiştir (Bevilacqua et al., 2009).

Romo-Sanchez et al. (2010) tarafından İspanya'da yapılan bir başka çalışmada ise; Arbequina ve Cornicabra türlerine ait çeşitli zeytin örneklerinden maya izolasyonları gerçekleştirilerek izole edilen bazı mayaların biyoteknolojik özellikleri belirlenmiştir. İzole edilen maya suşlarının lipolitik aktivitelerinin belirlendiği denemelerde; *C. diddensiae*, *P. mississippiensis*, *P. carribbica*, *T. delbrueckii*, *Z. florentinus*, *C. thermophila*, *S. cerevisiae*, *S. rosinii*, *K. thermotolerans*, *P. holstii*, *Z. fermentati* suşlarının hiç birinin lipolitik aktiviteye sahip olmadıklarının belirlendiği ifade edilmiştir.

Yağların, zeytin meyvesinin yapısında bulunan önemli temel bileşenlerden biri olduğu bilinmektedir. Zeytindeki yağ oranının zeytin çeşidine, olgunluk derecesine ve zeytinin işleme şekline göre farklılık gösterebildiği belirtilmektedir. Doğal fermente sofralık zeytinlerdeki yağ oranının ortalama; %25 olduğu ifade edilmektedir (Montano et al., 2010). Sofralık zeytine özgü organoleptik özelliklerin oluşumunda mayaların lipolitik aktivitelerinin önemli katkısının bulunduğu bilinmektedir. Yağların parçalanması sonucunda oluşan yağ asitlerinin katabolizması ile propanol ve 2-butanol gibi uçucu bileşenlerin oluştuğu

bilinmektedir. Bu bileşenlerin de sofralık zeytinin organoleptik özelliklerinin oluşmasına katkı sağladığı düşünülmektedir (Hernandez et al. 2007).

Çalışmamızda, Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytini ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen suşların tamamının esteraz aktivitelerine sahip oldukları bu nedenle de doğal fermente sofralık zeytin üretiminde kullanıldıklarında, ürünün kendisine özgü tat ve koku oluşumuna katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir.

4.6.7. Çeşitli şekerleri fermente ve asimile edebilme analizlerine ilişkin sonuçlar

Mayaların çeşitli şekerleri fermente edebilme özelliklerinin belirlendiği denemeler %2 (w/v) derişiminde şeker içeren Durham' lı fermantasyon besiyerlerinde gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla aktif maya kültürleri besiyerlerine aşılanmış ve 28°C' de 3 hafta inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi boyunca kültürler gaz oluşumu açısından değerlendirilmiştir. Denemelerde test edilen şekerler glukoz, fruktoz ve sakkaroz' dur. İncelenen maya suşlarının şeker fermantasyonu test sonuçları sırasıyla; Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26' de yer almaktadır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; Akhisar yöresine ait zeytinler ve bunların doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen yedi adet *C. hellenica* suşunun altısının (AZ-1, AF1-2, AF1-6, AF28-4, AF46-5, AF84-1) glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildikleri, (AF46-6) suşunun ise sadece fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği belirlenmiştir.

Aynı örneklerden izole edilen anamorfu *C. famata* olan 13 adet *C. famata* suşundan yalnızca 2 tanesinin (AF60-5, AF164-4) tüm şekerleri fermente edebildiği, 11 tanesinin ise denenilen hiçbir şekeri fermente edemediği, 4 adet *D. hansenii* suşundan ise 3 tanesinin (AF28-2, AF191-2, AF211-1) sadece glukozu fermente edebildiği belirlenmiştir. Zeytinden izole edilmiş olan; *A. pullulans* (AZ-6) suşunun kullanılan hiçbir şekeri fermente edemediği, *Cry. laurentii* (AF46-3) ve *C.*

membranifaciens (AF164-1) suşlarının sadece glukozu fermente edebildiği, *K. apiculata* (AF211-2) suşunun ise bütün şekerleri fermente edebildiği saptanmıştır.

Çizelge 4.25. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının şeker fermantasyonu özelliklerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	Glukoz	Fruktoz	Sakkaroz
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	-	-	-
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	+	-	-
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF46-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF46-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	+	-	-
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	-	+	+
AF60-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF60-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	-	-	-
AF60-4	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF60-5	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+
AF112-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF112-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF138-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF138-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF138-3	<i>C. famata</i>	-	-	-
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	+	-	-
AF164-4	<i>C. famata</i>	+	+	+
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	+	-	-
AF191-3	<i>C. famata</i>	+	-	-
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	+	-	-
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	+	+	+

(+): Gaz oluşumu var. (-): Gaz oluşumu yok

Çizelge 4.26. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının şeker fermantasyonu özelliklerine ilişkin test sonuçları

İzolat no.	Maya türü	Glukoz	Fruktoz	Sakkaroz
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BZ-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	+	-	-
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF18-4	<i>C. famata</i>	+	-	-
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF63-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF91-2	<i>C. famata</i>	-	-	-
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF143-1	<i>C. famata</i>	-	-	-
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+

(+): Gaz oluşumu var. (-): Gaz oluşumu yok

İznik yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. pelliculosa* ve *P. anomala* suşlarının tamamının glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildikleri, beş adet *D. hansenii* suşundan dört tanesinin (BZ-2, BF63-1, BF91-2, BF143-1) test edilen şekerleri fermente edemedikleri, bir tanesinin (BF18-4) ise;

yalnızca glukozu fermente edebildiği, *Clv. lusitaniae* (BF1-2) suşunun ise sadece glukozu fermente edebildiği bulunmuştur.

Zeytin meyvesinin etli kısmında yer alan başlıca şekerlerin glukoz ve fruktoz olduğu, çekirdeğinde ise glukoz ve az miktarda fruktozun yer aldığı bilinmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010). Bazı zeytin çeşitlerinde ise sakkaroz, mannoz ve galaktoz şekerlerinin yer aldığı belirtilmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010). Mayaların zeytin meyvesinde bulunan bu şekerleri fermente edebilmeleri salamura pH' sınırın düşmesine ve sofralık zeytinin organoleptik özelliklerinin gelişmesine katkıda bulunmaktadır (Tofalo et al., 2012). Bu nedenle mayaların şekerleri fermente edebilme özelliklerinin, sofralık zeytin üretimi açısından istenen bir biyoteknolojik özellik olduğu bilinmektedir. Ancak fermantasyon sonucunda aşırı miktarda CO₂ üretimi zeytinde "gaz cebi" oluşumuna ve bu nedenle de yumuşamaya neden olmaktadır.

Çalışmada izole edilen *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*) suşlarının tamamının, *C. hellenica* suşlarının büyük bir kısmının ve *K. apiculata* suşunun glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği bu nedenle de zeytinlerin doğal fermantasyonlarına büyük oranda katkı sağlayabilecekleri belirlenmiştir. Bunun dışında *Cry. laurentii*, *C. membranifaciens* ve beş adet *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*) suşunun sadece glukozu fermente ederek zeytin fermantasyonuna katılabileceği tespit edilmiştir.

Araştırmada maya suşlarının tanımlanması amacı ile kullanılan API ID 32C sisteminden elde edilen sonuçlar, izolatların çeşitli şekerleri asimile edebilme özelliklerinin değerlendirilmesi amacı ile de incelenmişlerdir. Çalışmada incelenen toplam 54 adet maya izolatının asimilasyon test sonuçları sırasıyla; Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28' de yer almaktadır.

Çizelge 4.27 ve Çizelge 4.28'nin incelenmesinden de görülebileceği gibi *C. famata* ve *D. hansenii* suşlarının tamamının galaktoz, sakkaroz, glukoz ve mannitolü asimile edebildikleri belirlenmiştir.

Çizelge 4.27. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ID 32C şeker asimilasyonu test sonuçları

Substrat	Maya türü														
	AZ-1	AZ-6	AF1-2	AF1-6	AF28-2	AF28-4	AF46-1	AF46-2	AF46-3	AF46-5	AF46-6	AF60-1	AF60-2	AF60-3	
Galaktoz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
DL-Laktat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
L-Arabinoz	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
Selobiyoz	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Rafinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Trehaloz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
İnositol	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Riboz	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Gliserin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
Ramnoz	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Palatinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Melebiyoz	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Melezitoz	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sorboz	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	

Çizelge 4.27. Devam ediyor.

Substrat	Maya türü															
	İzolat No.	C. famata	C. famata	C. hellenica	C. famata	C. famata	C. famata	C. famata	C. famata	C. famata	C. membranifaciens	C. famata	D. hansenii	C. famata	D. hansenii	K. apiculata
	AF60-4	AF60-5	AF84-1	AF112-1	AF112-2	AF138-1	AF138-2	AF138-3	AF164-1		AF164-4	AF191-2	AF191-3	AF211-1	AF211-2	
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Laktat	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Selobiyoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
Riboz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Gliserin	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Ramnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palatinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Melezitoz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorboz	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

(+): Üreme var. (-): Üreme yok.

Çizelge 4.28. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ID 32C şeker asimilasyonu test sonuçları

Substrat	Maya türü		İzolat No.		<i>P. anomala</i>	<i>C. famata</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. lusitanae</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>P. anomala</i>	<i>C. famata</i>
	BZ-1	BZ-2	BZ-4	BZ-5	BF0-4	BF0-5	BF1-1	BF1-2	BF1-3	BF1-4	BF5-2	BF18-2	BF18-4				
Galaktoz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+				
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
DL-Laktat	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
L-Arabinoz	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+				
Selobiyoz	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+				
Rafinoz	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+				
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Riboz	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+				
Gliserin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Ramnoz	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+				
Palatinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+				
Melezitoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Sorboz	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+				

Çizelge 4.28. Devam ediyor.

Substrat	İzolat No.	Maya türü																							
	BF27-1	BF27-3	BF27-5	BF46-2	BF46-3	BF63-1	BF63-2	BF91-1	BF91-2	BF91-3	BF143-1	BF143-2	BF172-1	C. pelliculosa	P. anomala	C. pelliculosa	P. anomala	C. pelliculosa	C. famata	C. pelliculosa	C. famata	C. pelliculosa	C. famata	C. pelliculosa	C. pelliculosa
Galaktoz	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sakkaroz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DL-Laktat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arabinoz	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Selobiyoz	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İnositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Ksiloz	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Riboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gliserin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Palatinoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eritritol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiyoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melezitoz	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorboz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

Yapılan denemelerde *C. famata* suşlarının üç tanesinin (AF138-2, AF164-4, BZ-2), DL-laktatı asimile edemedikleri kaydedilmiştir. *C. hellenica* suşlarının tamamının sakkaroz mannitol ve glukozu asimile edebildikleri belirlenirken, iki tanesinin (AF1-2, AF46-6) galaktozu ve bir tanesinin ise DL- laktatı asimile edemedikleri (AF46-5)

belirlenmiştir. *C. pelliculosa* ve *P. anomala* suşlarının tamamının glukoz, DL-laktat, mannitol ve sakkarozu asimile edebildikleri belirlenirken, üç *P. anomala* (BF18-2, BF27-3, BF63-2 ve iki *C. pelliculosa* suşunun (BF91-1 ve BF143-2) galaktozu asimile edemedikleri

kaydedilmiştir. İzole edilen *A. pullulans* (AZ-6), *Cry. laurentii* (AF46-3) ve *C. membranifaciens* (AF164-1) suşlarının galaktoz, sakkaroz, glukoz, DL-laktat ve mannitolü asimile edebildikleri belirlenmiştir.

4.6.8. Enzim profillerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytin örneklerinden izole edilen toplam 54 maya suşunun enzim profilleri API ZYM enzim kiti kullanılarak belirlenmiştir. Denemelerde Bölüm 3.2.8.8.'de belirtilen yol kullanılmış ve sonuçlar nicel olarak belirlenmiştir. Akhisar ve İznik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen izolatların enzim profillerine ilişkin değerlendirme sonuçları sırasıyla; Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30'da yer almaktadır.

Çizelge 4.29 ve Çizelge 4.30' un incelenmesinden de görülebileceği gibi; Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. hellenica*, *D. hansenii*, *C. famata*, *Cry. laurentii*, *C. membranifaciens*, *K. apiculata*, *P. anomala* *C. pelliculosa*, *C. lusitaniae* ve *A. pullulans* türlerine ait suşların tamamının esteraz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Akhisar yöresine ait zeytin ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen yedi adet *C. hellenica* suşunun 6 tanesinin (AZ-1, AF1-2, AF1-6, AF28-4, AF46-6, AF84-1), 13 adet *C. famata* suşunun 9 tanesinin, 4 adet *D. hansenii* suşundan 2 tanesinin (AF191-1, AF211-2), *A. pullulans* (AZ-6), *C. membranifaciens* (AF164-1) ve *K. apiculata* (AF211-2) suşlarının, esteraz lipaz aktivitelerine sahip oldukları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.29).

İznik yöresine ait zeytin ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen *C. pelliculosa*, *P. anomala* ve *C. lusitaniae* suşlarının tamamının esteraz lipaz aktivitesine sahip oldukları kaydedilmiştir.

Çizelge 4.29. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ZYM ile belirlenen enzim profillerine ilişkin sonuçlar

Enzim	Maya türü														
	AZ-1	AZ-6	AF1-2	AF1-6	AF28-2	AF28-4	AF46-1	AF46-2	AF46-3	AF46-5	AF46-6	AF60-1	AF60-2	AF60-3	
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Alkali fosfataz	2	0	4	2	2	2	3	1	2	4	5	2	3	2	
Esteraz (C4)	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	
Esteraz lipaz (C8)	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	2	0	1	0	
Lipaz (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Lösin arilamidaz	3	1	5	4	4	5	3	3	3	3	5	1	3	4	
Valin arilamidaz	1	1	1	1	0	2	1	0	1	1	3	0	1	0	
Sistin arilamidaz	1	0	1	1	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	
Tripsin	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-kimotripsin	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Asit fosfataz	5	2	5	5	3	4	4	4	3	5	5	4	5	3	
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	3	2	3	3	1	2	2	1	0	3	3	1	1	1	
α-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
β-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
β-glukuronidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-glukozidaz	4	2	4	4	3	5	2	1	1	4	5	4	4	3	
β-glukozidaz	4	0	4	4	0	4	0	0	1	4	4	0	0	0	
N-asetil-β-glukoaminidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	
α-mannozidaz	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	
α-fukozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Çizelge 4.29. Devam ediyor.

Enzim	Maya türü														
	<u>İzolat No.</u>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. hellenica</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. membranifaciens</i>	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>C. famata</i>	<i>D. hansenii</i>	<i>K. apiculata</i>
	AF60-4	AF60-5	AF84-1	AF112-1	AF112-2	AF138-1	AF138-2	AF138-3	AF164-1		AF164-4	AF191-2	AF191-3	AF211-1	AF211-2
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alkali fosfataz	3	2	2	5	3	2	2	1	2	2	2	3	2	3	
Esteraz (C4)	2	1	1	2	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	
Esteraz lipaz (C8)	1	1	1	1	1	1	0	0	2	0	1	1	1	1	
Lipaz (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Lösin arilamidaz	1	2	5	3	2	3	3	1	2	2	3	2	2	3	
Valin arilamidaz	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
Sistin arilamidaz	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	
Tripsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-kimotripsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Asit fosfataz	4	5	5	3	3	3	3	1	2	5	3	5	5	5	
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	2	2	3	1	1	1	1	1	1	3	1	2	2	3	
α-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
β-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
β-glukuronidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-glukozidaz	2	3	4	4	4	3	3	0	3	2	3	3	3	2	
β-glukozidaz	0	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
N-asetil-β-glukoaminidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-mannozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
α-fukozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

0:<10 nmol. 1:10 nmol. 2: 20 nmol. 3: 30 nmol. 4: 40 nmol ve üzeri

Çizelge 4.30. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının API ZYM ile belirlenen enzim profillerine ilişkin sonuçlar

Enzim	Maya türü		C. famata		P. anomala		C. pelliculosa		P. anomala		C. lusitanae		C. pelliculosa		P. anomala		C. pelliculosa		P. anomala		C. famata	
	İzolot No.		BZ-2		BZ-4		BZ-5		BF0-5		BF1-2		BF1-3		BF1-4		BF5-2		BF18-2		BF18-4	
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alkali fosfataz	4	3	1	1	2	3	1	0	2	4	2	1	2	4	2	1	4	1	4	3	1	1
Esteraz (C4)	1	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	1
Esteraz lipaz (C8)	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Lipaz (C14)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lösin arilamidaz	4	5	3	5	5	4	2	5	1	4	4	2	4	4	2	4	1	4	3	1	1	1
Valin arilamidaz	1	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
Sistin arilamidaz	1	3	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tripsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-kimotripsin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asit fosfataz	5	5	3	2	3	5	4	5	3	5	4	1	3	5	4	1	5	3	5	3	3	3
Naftol-AS-BI-fosfohidrolaz	3	3	5	1	1	3	3	1	1	3	2	1	3	2	1	3	1	3	1	3	1	1
α-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-galaktozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-glukuronidaz	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-glukozidaz	2	4	1	1	2	3	1	3	3	3	3	3	3	3	4	0	2	3	3	3	3	3
β-glukozidaz	4	4	4	4	4	4	1	2	2	4	5	0	0	4	5	0	0	4	5	0	0	0
N-asetil-β-glukoaminidaz	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-mannozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-fukozidaz	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.30. Devam ediyor.

Enzim	Maya türü													
	C. pelliculosa	P. anamola	C. pelliculosa	P. anamola	C. pelliculosa	C. famata	P. anamola	C. pelliculosa	C. famata	C. pelliculosa	C. famata	C. pelliculosa	C. pelliculosa	
	İzolat No.	BF27-1	BF27-3	BF27-5	BF46-2	BF46-3	BF63-1	BF63-2	BF91-1	BF91-2	BF91-3	BF143-1	BF143-2	BF172-1
Kontrol		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alkalın fosfataz		5	2	4	1	2	2	3	1	3	5	4	4	2
Esteraz		4	2	2	1	2	1	2	2	2	3	1	1	2
Esteraz lipaz		3	1	1	1	1	1	2	2	1	3	1	1	1
Lipaz		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0
Lusin arilamidaz		4	3	5	4	2	1	5	5	3	5	5	5	2
Valin arilamidaz		2	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	2	0
Sistin arilamidaz		2	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	2	0
Tripsin		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alfa simotripsin		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Asit fosfataz		5	5	5	3	2	2	5	4	3	4	5	5	2
Naftol-as-bi-fosfohidroliz		3	3	3	2	1	1	3	2	1	2	1	3	1
α-galaktosidaz		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-galaktosidaz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β-glukuronidaz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α-glukosidaz		4	4	5	2	5	2	1	1	3	3	4	5	5
β-glukosidaz		5	5	5	3	0	1	4	5	0	3	0	4	0
N-asetil-β-glukozaminidaz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
α-mannosidaz		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
α-fukosidaz		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0:<10 nmol. 1:10 nmol. 2: 20 nmol. 3: 30 nmol. 4: 40 nmol ve üzeri

Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinlerinin fermantasyon ortamlarından izole edilen bir adet *C. hellenica* suşunun (AF46-6), bir adet *P. anomala* suşunun (BF63-2), bir adet *C. pelliculosa* suşunun (BF143-2) ve 1 adet *C. famata* suşunun (BF143-1) lipaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir.

Mayaların sahip oldukları lipolitik aktivitenin aroma maddelerinin öncülleri olan serbest yağ asitlerinin oluşmasına, böylelikle sofralık zeytine özgü organoleptik özelliklerin kazanılmasına katkı sağladıkları belirtilmektedir (Silva et al., 2011). Bu nedenle mayaların hücre dışı lipaz, esteraz lipaz ve lipaz enzim aktivitelerine sahip olmalarının sofralık zeytin üretimi açısından önemli bir özellik olduğu bilinmektedir. Sofralık zeytinde belirlenen propanol ve 2-butanol gibi uçucu aroma bileşenlerinin serbest yağ asitlerinin katabolizması sonucunda meydana geldiği düşünülmektedir (Hernandez et. al., 2007). C₅ ve C₆ aldehydlerin, alkollerin ve bunların ilgili esterlerinin zeytinyağında çoğunlukla yer alan uçucu bileşenler oldukları ve bu bileşenlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin enzimatik olarak paçalanması sonucu oluştukları ifade edilmektedir (Sabatini and Marsilio, 2008).

Zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarında yer alan mayaların bir diğer istenen önemli özelliklerinin ise; β -glukosidaz aktivitesi olduğu bilinmektedir. Mayaların ürettikleri β -glukosidaz enziminin zeytinde acılığa neden olan fenolik bir bileşen olan oleuropeini parçaladığı belirtilmektedir (Tokuşoğlu ve Artık, 2010).

Çalışmada Akhisar yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen yedi adet *C. hellenica* suşunun tamamının orta düzeyde (4), β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, 1 adet *C. famata* (AF60-5) suşunun orta düzeyde (2), β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğu, kalan *C. famata* ve *D. hansenii* suşlarının ise, β -glukosidaz aktivitesine sahip olmadıkları bulunmuştur. İzole edilen *Cry. laurentii* (AF46-3) suşunun 1 düzeyinde β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğu, *K. apiculata* (AF211-2), *C. membranifaciens* (AF164-1) ve *A. pullulans* (AZ-6) suşlarının ise, β -glukosidaz aktivitesine sahip olmadıkları belirlenmiştir.

İznik yöresine ait Gemlik zeytin örneklerinden izole edilen *P. anomala* suşlarından iki tanesinin (BF18-2, BF27-3) yüksek düzeyde (5), altı tanesinin (BZ-1, BZ-4,

BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF63-2) orta düzeyde (4), bir tanesinin (BF46-2) 3 düzeyinde β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları, *C. pelliculosa* suşlarından üç tanesinin (BF27-1, BF27-5, BF91-1) yüksek düzeyde (5), beş tanesinin (BZ-5, BF0-4, BF5-2, BF143-2, BF172-1) orta düzeyde (4), bir tanesinin (BF91-3) 3 düzeyinde, iki tanesinin (BF1-3, BF1-4) 2 düzeyinde β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları ve bir tanesinin (BF46-3) ise, β -glukosidaz aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Aynı örneklerden izole edilmiş olan beş tane *C. famata* suşundan bir tanesinin (BZ-2) 4 düzeyinde, bir tanesinin (BF63-1) 1 düzeyinde β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları, üç tanesinin (BF18-4, BF91-2, BF143-1) ise, bu enzimi üretemedikleri tespit edilmiştir. *C. lusitaniae* (BF1-2) suşunun ise 2 düzeyinde β -glukosidaz aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Literatürde zeytin örneklerinden izole edilen çeşitli mayaların β -glukosidaz aktivitelerinin incelendiği çalışmalar yer almaktadır (Aponte et al., 2010; Romo-Sanchez et al., 2010). Aponte et al. (2010) tarafından İtalya'da yapılan bir çalışmada beş farklı zeytinin fermantasyon ortamlarından alınan örneklerden elde edilen maya izolatlarının β -glukosidaz aktivitelerinin, 4-MUG besiyeri kullanılarak incelendiği ifade edilmektedir. Araştırmada izole edilen *P. guilliermondii* suşlarının tamamının, *C. parapsilosis* suşlarından ise yalnızca bir tanesinin, β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları rapor edilmiştir.

İspanya'da yapılan başka bir çalışmada ise; Arbequina ve Cornicabra türlerine ait çeşitli zeytin örneklerinden izole edilen mayaların β -glukosidaz aktivitelerinin incelendiği belirtilmektedir (Romo-Sanchez et al., 2010). Denemelerde *Candida molischiana* ATCC 2516 suşunun da pozitif kontrol olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Araştırmada *P. carribbica*, *Z. fermentati*, *P. holstii*, *P. mississippiensis*, *Lachancea* sp. ve *K. thermotolerans* suşlarının β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları saptanmıştır.

Mayaların ürettikleri β -glukosidaz enzimi ile zeytin meyvesinde fazla miktarda bulunan oleuropeini parçalayarak elenolik asit ve hidroksitrizol gibi acı olmayan bileşenlere dönüştürdükleri bilinmektedir (Botta and Cocolin, 2012). Böylelikle mayaların hem LAB' nin gelişimini destekledikleri, hem de zeytindeki acı tadın uzaklaşmasına yardımcı oldukları belirtilmektedir. Fermantasyon ortamında β -

glukosidaz enzimi üreten mayaların varlığının alkali kullanımının önüne geçtiği, böylelikle de daha doğal bir ürün elde edilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Botta and Cocolin, 2012).

Genel olarak, bu çalışmada izole edilen *C. hellenica*, *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*), *Cry. laurentii* ve *C. lusitaniae* suşlarının β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları, *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*), *K. apiculata*, *A. pullulans* suşlarının ise, β -glukosidaz aktivitesine sahip olmadıkları belirlenmiştir. β -glukosidaz aktivitesine sahip suşların zeytindeki acılığı uzaklaştırabilecekleri ve bu açıdan önemli bir teknolojik özelliğe sahip oldukları düşünülmektedir.

4.6.9. Oleuropeini kullanabilme analizlerine ilişkin sonuçlar

Oleuropeinin zeytin meyvesinde yer alan bir fenolik bileşen olup, zeytine özgü acı tadın oluşmasından sorumlu olduğu bilinmektedir (Malik and Bradford, 2006). Bu nedenle zeytin meyvesi doğrudan tüketilememekte, içeriğindeki oleuropeinin uzaklaştırılması gerekmektedir. Oleuropeinin zeytinden çeşitli yollarla uzaklaştırılabildiği belirtilmektedir. Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde, oleuropeinin bir kısmının salamuraya geçtiği, bir kısmının ise mikroorganizmalar tarafından parçalandığı ifade edilmektedir. Mayaların oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanarak parçalamalarının, zeytindeki acılığın giderilmesine yardımcı olan önemli bir teknolojik özellik olduğu kabul edilmektedir.

Araştırmada maya izolatlarının oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, %0.5 ve %1.5 (w/v) oranında zeytin yaprağı ekstraktı içeren YNB-ZY agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyerinde karbon kaynağı olarak sadece zeytin yaprağı ekstraktı kullanılmıştır. Çizgi ekim yöntemi ile besiyerine ekimi gerçekleştirilen maya kültürleri 28°C' de 10 gün inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon süresi sonunda besiyerinde gelişebilen kültürler pozitif olarak değerlendirilmişlerdir.

Elde edilen sonuçlar, incelenen tüm maya izolatlarının %0.5 ve %1.5 oranlarında zeytin yaprağı ekstraktı içeren YNB-ZY besiyerlerinde üreyebildiklerini göstermiştir. Mikroorganizmaların oleuropeini hidrolize etmek için kullandıkları

enzimin β -glukosidaz enzimi olduğu bilinmektedir. Ayrıca, yapılan bu denemelerde incelenen maya izolatlarının zeytin yaprağında bulunan fenolik bileşenlere dayanıklılıkları da ortaya koyulduğu düşünölmektedir.

İspanya'da yapılan bir çalışmada, daha önce zeytin örneklerinden izole edilmiş ve moleküler yöntemlerle tanımlanmış 16 türe ait 32 ayrı maya izolatının aktivitesinin incelendiğı belirtilmektedir. Araştırmada bazı *C. diddensiae* ve *W. anomalus* suşlarının β -glukosidaz aktivitesine sahip olduklarının belirlendiğı rapor edilmiştir (Rodriguez-Gómez et al., 2010).

Yunan tipi sofralık zeytinden izole edilen 15 adet *D. hansenii* ve 32 adet *T. delbrueckii* suşunun oleuropeini karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilme özelliklerinin incelendiğı bir araştırmada; %0.1, %0.5, %1.0 oranlarında oleuropein içeren YNB agar besiyerinin kullanıldığı ve her iki türe ait suşların tamamının %0.1 oranında oleuropein içeren besiyerinde gelişebildikleri; *D. hansenii* suşlarının %60'ının, *T. delbrueckii* suşlarının ise %19'unun, %0.5 oranında oleuropein içeren besiyerinde gelişebildiğı, *D. hansenii* suşlarının %33'ünün, *T. delbrueckii* suşlarının ise; %9'unun %1.0 oranında oleuropein içeren besiyerinde gelişebildikleri belirlenmiştir (Psani and Kotzekidou, 2006).

4.6.10. Sitrik asiti kullanabilme özelliklerinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Çalışmada Akhisar ve İznik Gemlik zeytini ile yapılan çalışmalarda izole edilen maya suşlarının, sitrik asit asimilasyonu test sonuçları sırasıyla; Çizelge 4.31 ve 4.32'de verilmektedir.

Çizelge 4.31 incelendiğinde görölebileceğı gibi; Akhisar yöresine ait zeytinlerden izole edilen *C. hellenica* türüne ait suşların tamamı, *D. hansenii* suşlarının iki tanesi (AF191-2, AF211-1), *C. famata* suşlarının altı tanesi (AF46-1, AF60-1, AF112-2, AF138-1, AF138-2, AF138-3), *A. pullulans* (AZ-6) ve *C. membranifacies* (AF164-1) türlerine ait suşlar sitratı asimile edebilmektedirler.

Çizelge 4.31. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının sitrik asit asimilasyonu testlerine ilişkin sonuçlar

İzolât no.	Maya türü	Sitrik asit asimilasyonu
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	+
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	-
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	+
AF46-1	<i>C. famata</i>	+
AF46-2	<i>C. famata</i>	-
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	-
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	+
AF60-1	<i>C. famata</i>	+
AF60-2	<i>C. famata</i>	-
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	-
AF60-4	<i>C. famata</i>	-
AF60-5	<i>C. famata</i>	-
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+
AF112-1	<i>C. famata</i>	-
AF112-2	<i>C. famata</i>	+
AF138-1	<i>C. famata</i>	+
AF138-2	<i>C. famata</i>	+
AF138-3	<i>C. famata</i>	+
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	+
AF164-4	<i>C. famata</i>	-
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	+
AF191-3	<i>C. famata</i>	-
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	+
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	-

(+): Üreme var. (-): Üreme yok.

Çizelge 4.32. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının sitrik asit asimilasyonu testlerine ilişkin sonuçlar

İzolat no.	Maya türü	Sitrik asit asimilasyonu
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+
BZ-2	<i>C. famata</i>	-
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	-
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+
BF18-4	<i>C. famata</i>	-
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF63-1	<i>C. famata</i>	+
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF91-2	<i>C. famata</i>	-
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF143-1	<i>C. famata</i>	+
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+

(+): Üreme var. (-): Üreme yok

İznik yöresine ait zeytinlerden izole edilen *P. anomala* ve *C. pelliculosa* türlerine ait suşların tamamı ve *C. famata* suşlarının iki tanesinin (BF63-1, BF143-1) sitratı asimile edebildikleri saptanmıştır.

Sitrik asit asimilasyonu sonucunda asetat ve pirüvik asitin oluştuğu daha sonra ise bu ürünlerin pirüvat metabolizması ile laktik asit, asetik asit, asetaldehit, etanol ve diasetil gibi bileşenlere dönüştürüldüğü belirtilmektedir (Giori et. al., 2010). Az sayıda maya türünün sitratı asimile edebildiği ifade edilmektedir.

Zeytin meyvesindeki organik asit derişiminin; %0.5-1.0 arasında olduğu, bunun %0.38-0.5' ini ise sitrik asitin oluşturduğu bilinmektedir (Ergönül ve Tokuşoğlu, 2010). Sitrik asit parçalanması ile oluşan pirüvatın, LAB tarafından laktik asite dönüştürüldüğü böylece ortam pH' sının düşerek, ürün bozulmasının önüne geçilebildiği ifade edilmektedir. Ayrıca sitrik asit metabolizması sonucunda asetik asitin oluştuğu ve böylece de ortam pH' sının düştüğü de belirtilmektedir (Panagou and Tassou, 2006).

Panagou and Tassou (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, İspanyol tipi yeşil zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen *L. plantarum* ve *L. pentosus* suşlarının ayrı ayrı inokülasyonu ile 40 gün fermantasyona bırakılan zeytinlerden uçucu bileşenlerin tespiti amacı ile belirli günlerde örneklerin alındığı ve alınan bu örneklerdeki laktik asit, suksinik asit, malik asit ve asetik asit miktarlarının tespit edildiği ifade edilmektedir. Çalışmada asetik asit ve laktik asit miktarının fermantasyon boyunca arttığı, sitrik asit ve malik asit miktarının ise fermantasyonun 10. gününden itibaren azaldığı belirtilmektedir. Çalışmada mayaların sitrik asiti parçalanması sonucunda asetik asitin oluştuğu ifade edilmektedir. Mayaların pirüvat metabolizması sonucu oluşan asetaldehitin en önemli uçucu bileşenlerden biri olduğu, oluşan asetaldehit ve etanolün zeytinin organoleptik özelliklerine katkı sağlayacak ikincil bileşenlerin öncülleri oldukları belirtilmektedir (Panagou and Tassou, 2006).

Bu çalışmada izole edilen *C. hellenica*, *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*), *C. membranifacies*, *A. pullulans* ve bazı *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*) suşlarının sitrik asiti asimile edebildikleri ve bu özellikleri ile de laktik asit ve aroma öncüllerini üreterek fermantasyona katkı sağlayabildikleri belirlenmiştir.

4.6.11. Katalaz aktivitesinin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik çeşidi zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen maya suşlarının katalaz aktiviteleri incelendiğinde; maya suşlarının tamamının katalaz pozitif oldukları belirlenmiştir. Mayaların katalaz aktivitesine sahip olmalarının sofralık zeytin üretimi açısından olumlu bir teknolojik özellik olduğu bilinmektedir.

Silva et al. (2011) tarafından Portekiz’de yapılan bir çalışmada; Galega ve Cordovil çeşidi zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından alınan salamura örneklerinden izole edilen mayaların probiyotik özelliklerinin belirlenmesi sırasında, katalaz aktivitelerinin de incelendiği belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan denemeler sonucunda; *P. membranifaciens*, *C. boidinii*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* ve *C. citrea* suşlarının tamamının; 7 adet *C. oleophila* suşundan 2, 8 adet *P. fermentas* suşundan ise 7 tanesinin katalaz aktivitesine sahip olduğu belirtilmiştir.

Hernandez et al. (2007) tarafından İspanya’da yapılan bir araştırmada Manzanilla türüne ait zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından alınan salamura örneklerinden izole edilen maya suşlarının katalaz aktiviteleri de araştırılmıştır. Elde edilen test sonuçlarına göre, *K. marxianus*, *P. anomala*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii*, *C. maris*, *C. rugosa*, *C. humicola*, *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. galabrata*, *T. cutaneum*, *T. delbrueckii*, *C. laurentii*, *R. minuta* ve *R. glutinis* suşlarının katalaz aktivitesine sahip oldukları rapor edilmiştir.

Bevilacqua et al. (2009) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise; zeytinlerin doğal fermantasyon ortamından izole edilen maya suşlarının katalaz aktivitelerinin belirlendiği ve izole edilen *C. famata*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii* ve *R. mucilaginosa* türlerine ait suşların katalaz pozitif oldukları ifade edilmektedir.

Katalaz enziminin zeytinde yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellediği ve peroksit oluşumunun önüne geçtiği bilinmektedir (Arroyo-López et al., 2012). Bu araştırmada izole edilen *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*), *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*), *C. hellenica*, *Clv. lusitaniae*, *K. apiculata*, *C. membranifaciens*, *Cry. laurentii* ve *A. pullulans* türlerine ait suşların tamamının

katalaz aktivitesine sahip oldukları ve sofralık zeytin üretimi sırasında bu özelliklerinin oksidasyon ve peroksit oluşumunun önlenmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

4.6.12. Killer aktivite ve killer toksine duyarlılık analizlerine ilişkin sonuçlar

Mayaların doğal fermente sofralık zeytin üretiminde önemli olan özelliklerinden birinin de killer aktiviteleri olduğu bilinmektedir. Mayaların ürettikleri killer toksinlerin protein ya da glikoprotein yapısında oldukları ve bu toksinlerin iki ya da üç adet alt birime sahip oldukları belirtilmektedir. Killer suşların ürettikleri toksinlere dayanıklı oldukları bazı suşların ise hem killer toksin üretebildikleri hem de killer toksinlere karşı duyarlı oldukları bilinmektedir. Killer toksinlerin, duyarlı suşların pH' larını düşürüp, hücre içerisinden potasyum iyonları, ATP ve diğer hücresel bileşenlerin çıkmasına neden olarak, bu suşları inhibe ettikleri ifade edilmektedir. Bunun yanı sıra killer toksin etkisiyle hücre içerisine amino asit aktarımı ve proton pompalanmasının da durdurulduğu belirtilmektedir (Golubev, 1999).

Bu araştırmada Akhisar ve İznik yöresine ait zeytinler ile bu zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların killer aktiviteleri daha önce Bölüm 3.2.8.12' de verilen yöntemle göre incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkılarak, maya suşlarının killer aktivitelerine göre fenotiplendirilmeleri; Çizelge 4.33 ve Çizelge 4.34' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.33' de görülebileceği gibi; Akhisar yöresine ait zeytin örnekleri ile çalışıldığında, izole edilen yedi adet *C. hellenica* suşunun 3 tanesinin killer özellikte olduğu, 3 tanesinin killer-duyarlı, 1 tanesinin ise; nötral olduğu belirlenmiştir. Aynı yöreden izole edilen dört adet *D. hansenii* suşunun tamamının, 13 adet *C. famata* suşunun ise; dokuz tanesinin killer özellikte, üç tanesinin killer-duyarlı, bir tanesinin ise nötral suşlar oldukları saptanmıştır. İzole edilen *A. pullulans* (AZ-6) ve *Cry. laurentii* (AF46-3) suşlarının killer, *C. membranifaciens* suşunun ise nötral oldukları belirlenmiştir.

Çizelge 4.33. Akhisar-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının killer aktivitelerine göre fenotiplendirilmeleri

İzolât no.	Maya türü	Killer aktivite	Test edilen killer toksinlere karşı direnç		Fenotip
			K1 toksini	K2 toksini	
AZ-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	K
AZ-6	<i>A. pullulans</i>	+	+	+	K
AF1-2	<i>C. hellenica</i>	+	+	-	K-S
AF1-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	K
AF28-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	K
AF28-4	<i>C. hellenica</i>	-	+	+	N
AF46-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF46-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF46-3	<i>Cry. laurentii</i>	+	+	+	K
AF46-5	<i>C. hellenica</i>	+	+	-	K-S
AF46-6	<i>C. hellenica</i>	+	+	-	K-S
AF60-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF60-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF60-3	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	K
AF60-4	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF60-5	<i>C. famata</i>	+	-	+	K-S
AF84-1	<i>C. hellenica</i>	+	+	+	K
AF112-1	<i>C. famata</i>	+	+	-	K-S
AF112-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF138-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF138-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF138-3	<i>C. famata</i>	-	+	+	N
AF164-1	<i>C. membranifaciens</i>	-	+	+	N
AF164-4	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
AF191-2	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	K
AF191-3	<i>C. famata</i>	+	+	-	K-S
AF211-1	<i>D. hansenii</i>	+	+	+	K
AF211-2	<i>K. apiculata</i>	+	+	+	K

K: Killer. S: Duyarlı. K-S: Killer-Duyarlı. N: Nötral.

Çizelge 4.34. İznik-Gemlik zeytinlerine ait maya suşlarının killer aktivitelerine göre fenotiplendirilmeleri

İzolat no.	Maya türü	Kille aktivite	Test edilen killer		Fenotip
			toksinlere karşı direnç		
			K1 toksini	K2 toksini	
BZ-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BZ-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
BZ-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BZ-5	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF0-4	<i>C. pelliculosa</i>	-	+	+	N
BF0-5	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF1-1	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF1-2	<i>Clv. lusitaniae</i>	+	+	+	K
BF1-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF1-4	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF5-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF18-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF18-4	<i>C. famata</i>	-	+	+	N
BF27-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF27-3	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF27-5	<i>C. pelliculosa</i>	-	+	+	N
BF46-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF46-3	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF63-1	<i>C. famata</i>	-	+	+	N
BF63-2	<i>P. anomala</i>	+	+	+	K
BF91-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF91-2	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
BF91-3	<i>C. pelliculosa</i>	-	+	+	N
BF143-1	<i>C. famata</i>	+	+	+	K
BF143-2	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K
BF172-1	<i>C. pelliculosa</i>	+	+	+	K

K: Killer. S: Duyarlı. K-S: Killer-Duyarlı. N: Nötral.

Çizelge 4.34' de de belirtildiği gibi İznik yöresine ait zeytinlerden izole edilmiş olan 9 adet *P. anomala* türüne ait suşun tamamının killer olduğu, 11 adet *C. pelliculosa* suşunun sekiz tanesinin killer, üç tanesinin ise nötral suşlar oldukları belirlenmiştir. İzole edilen tek *Clv. lusitaniae* (BF1-2) suşunun ise, killer özellikte olduğu kaydedilmiştir.

Her iki yörenin maya izolatları killer özellik açısından karşılaştırıldıklarında; Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilmiş olan toplam 19 adet suşun killer, 3 tane suşun nötral özellikte oldukları, İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilmiş olan 21 suşun killer, 5 suşun ise nötral özellikte oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; her iki bölgede yetişen Gemlik zeytinlerindeki endojen maya suşları arasında killer özelliğin yaygın bir karakter olduğu düşünülmektedir.

Portekiz'de yapılan bir çalışmada doğal fermente sofralık zeytinlerden izole edilen mayaların killer toksin (mikosin) üretme özelliklerinin incelendiği belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan denemeler sonucunda *P. membranifaciens*, *C. oleophila*, *S. cerevisiae* ve *P. fermentas* suşlarının killer özellikte oldukları ifade edilmiştir (Silva et al., 2011).

Yapılan başka bir çalışmada ise; doğal fermantasyon yolu ile üretilmiş sofralık yeşil zeytinlerden izole edilmiş olan, 74 maya suşunun killer aktivitelerinin, farklı pH (3.5-8.5) ve tuz (%5-8) derişimlerinde test edildiği belirtilmektedir. Yapılan bu araştırmada duyarlı suş olarak; *S. cerevisiae* EX33, EX73R ve MNN9 suşlarının; killer suş olarak ise *S. cerevisiae* JCR2, EX85, GY-2-3a ve *Williopsis saturnus* HM22 suşlarının referans olarak kullanıldıkları ifade edilmektedir. Çalışmada izole edilmiş olan *Debaryomyces* türüne ait suşların denenen farklı pH ve tuz derişimlerinde killer aktiviteye sahip oldukları, *Candida* türüne ait suşların ise; farklı pH değerlerinde düşük killer aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur (Hernandez et al., 2007)

Killer özelliğe sahip olan mayaların sofralık zeytin üretiminde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri, böylelikle zeytinde bozulmaya neden olan mikroorganizmaların fermantasyon ortamında inhibe edebileceği belirtilmektedir

(Arroyo-López et al., 2008). Ayrıca zeytin fermantasyonunda killer mayaların kullanılması koruyucu katkı maddelerinin kullanımını azaltacağı da düşünülmektedir. Bu nedenlerle mayaların sahip oldukları killer aktivitenin zeytin üretim teknolojisi açısından önemli bir özellik olduğu üzerinde durulmaktadır.

Sahip oldukları teknolojik özellikler nedeni ile sofralık zeytin üretiminde destek starter kültür olarak kullanılabilecek mayaların killer toksinlere karşı dayanıklılıklarının da önemli bir özellik olduğu bilinmektedir. Bu mayalar killer toksin üreten rekabetçi flora tarafında inhibe edilememektedirler.

Çalışmada incelenen bazı *C. famata*, *C. hellenica* ve *C. pelliculosa*, *D. hansenii*, *A. pullulans*, *Cry. laurentii* ve *Clv. lusitaniae* suşlarının killer toksin üretebildikleri ve aynı suşların test edilen K1 ve K2 toksinlerine dayanıklı oldukları; sahip oldukları bu özellikler nedeni ile ise sofralık zeytin üretiminde biyokontrol ajanı olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir.

4.6.13. Proteolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Araştırmada iki farklı yöreye ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamlarından alınan zeytin örneklerinden izole edilen maya suşlarının proteolitik aktivitelerinin belirlendiği denemeler daha önce Bölüm 3.2.8.13' de verilen yöntem izlenerek yapılmıştır. Çalışmanın bu kısmında Akhisar ve İznik yörelerine ait Gemlik zeytinleri ile yapılan çalışmada izole edilen toplam 54 adet maya suşunun hiçbirisinin proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Literatürde çeşitli zeytin örneklerinden izole edilen mayaların proteolitik aktivitelerinin belirlendiği çalışma sayısı, sınırlıdır. İtalya'da yapılan bir çalışmada Brandofino, Castriciana, Nocellara del Belice, Passalunara ve Manzanilla olmak üzere beş ayrı çeşit zeytinin fermantasyon ortamlarından izole edilen; *P. guilliermondii*, *P. kluyveri* ve *C. parapsilosis* türlerine ait suşların hiçbirisinin proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları rapor edilmiştir (Aponte et al., 2010).

Bautista-Gallego et. al. (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise; Aloreña, Gordal ve Manzanilla türü zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen

mayaların proteolitik aktivitelerinin incelenmesi sonucunda incelenen; *P. membranifaciens*, *P. galeiformis* ve *C. thaimueangensis* türlerine ait suşların proteolitik aktiviteye sahip olduklarının belirlendiği ancak *S. cerevisiae*, *Zyg. mrakii*, *C. tropicalis*, *C. boidinii*, *D. etchellsii*, *W. anomalous*, *Candida sorbosivorans*, *T. delbrueckii*, *Hanseniaspora guilliermondii* ve *Pichia kudriavzevii* suşlarının ise proteolitik olmadıklarının bulunduğu rapor edilmiştir.

Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar sonucunda Gemlik tipi zeytinde yaklaşık %1.5 oranında protein bulunduğunu ortaya konulmuştur (Güceyü ve Başoğlu, 2010). Zeytin meyvesinde genel olarak bu oranın; %0.5-1.5 arasında değiştiği ifade edilmektedir (Montano et al., 2010; Güceyü ve Başoğlu, 2010). Mayaların sahip oldukları proteolitik aktivitenin zeytinde yumuşamaya neden olduğu bu nedenle de istenmeyen bir özellik olduğu ifade edilmektedir (Bautista-Gallego et al., 2011).

4.6.14. Pektolitik aktivitenin belirlenmesine ilişkin sonuçlar

Çalışmada Akhisar ve İznik yörelerine ait zeytin örnekleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilen toplam 54 adet maya suşunun pektolitik aktivitelerinin incelenmesi sonucunda; çalışılan tüm suşların oldukça zayıf bir pektolitik aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur.

Pektolitik enzimler olarak da bilinen pektinaz enzimlerinin, polisakkaridaz ailesine ait enzimler olduğu bilinmektedir. Bu enzimlerin sadece pektinlerin homogalakuronan (HG) ve ramnogalakuronan (RG) bölgelerine etki ettikleri belirtilmektedir. Pektinazların yüksek yapılı bitkilerin yapısında bulunduğu gibi bazı mikroorganizmalar tarafından da üretebildiği ifade edilmektedir. Mikroorganizma kaynaklı pektinazların bitki hücre duvarındaki pektini hidrolize edebilmeleri nedeni ile meyve suyu ve şarap endüstrisinde kullanıldıkları bilinmektedir (Alimardani-Theuil et. al., 2011)

Sofralık zeytin üretiminde mayaların ürettikleri pektinaz enzimlerinin, zeytinin hücre duvarındaki pektini parçalayarak yumuşamaya yol açtıkları bildirilmektedir (Arroyo-López et al., 2008). Bu nedenle mayaların pektolitik aktivitelerinin sofralık zeytin üretimi açısından istenmeyen olumsuz bir özellik olduğu bilinmektedir. Literatürde

çeşitli zeytin türlerinden izole edilen mayaların pektolitik aktivitelerinin araştırıldığı bazı çalışmalar yer almaktadır (Aponte et al., 2010, Hernandez et al., 2007).

Doğal zeytin fermantasyonundan izole edilen mayaların bazı teknolojik özelliklerinin incelendiği bir araştırmada; izole edilen maya suşlarının pektolitik aktiviteleri de incelenmiştir (Hernandez et al., 2007). Bu araştırmada, denemelerin %1.25 (w/v) elma pektini içeren YNB agar besiyerinde gerçekleştirildiği ve kültürlerin 25°C'de 10 gün inkübasyona bırakıldığı belirtilmiştir. İnkübasyon sonunda izole edilen maya suşlarından bazı *C. laurentii*, *P. guilliermondii*, *C. maris*, *K. marxianus*, *R. glutinis*, *P. anomala*, *D. hansenii*, *C. rugosa*, *C. inconspicua*, *C. parapsilosis*, *C. galabrata*, *T. delbrueckii* ve *R. minuta* suşlarının pektolitik aktiviteye sahip olduklarının bulunduğu rapor edilmiştir.

Farklı zeytin çeşitlerinin fermantasyon ortamlarından izole edilen mayaların pektolitik aktivitelerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise; *P. guilliermondii* ve *C. parapsilosis* suşlarının pektolitik aktiviteye sahip olduklarının bulunduğu ifade edilmiştir (Aponte et al., 2010).

Mayaların pektini kullanabilme özelliklerinin zeytin üretimi açısından istenmeyen bir özellik olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada pektolitik aktiviteleri araştırılan 54 adet maya izolatının, %0.5 (w/v) oranında narenciye pektini içeren YNB-NP agarda gelişebildikleri ancak bu gelişmenin oldukça zayıf olduğu belirlenmiştir.

Literatürde yapılan çalışmalarda genellikle zeytinden izole edilen mayaların pekteolitik aktivitelerinin elma pektini kullanılarak araştırıldığı belirtilmektedir. Bu nedenle izolatlarımızın pektolitik aktivitelerinin farklı pektin kaynakları kullanılarak da belirlenmesi düşünülmektedir.

5. SONUÇ

Bu araştırmada Akhisar ve İznik yörelerinde yetiştirilen Gemlik tipi siyah zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından belirli günlerde salamura ile birlikte zeytin örnekleri alınmış ve laboratuvara uygun koşullarda gelen bu örneklerde ilk olarak tuz, laktik asit cinsinden serbest asitlik ve pH tayinileri yapılmıştır. Ayrıca bu örneklerde LAB ve maya sayımları da gerçekleştirilmiştir. Zeytin örneklerinden izole edilen maya suşları API ID 32C tanımlama sistemi, ek bazı tanımlama testleri ve RFLP-PZR yöntemi kullanılarak tanımlanmışlardır. Daha sonra, tanımlanan bazı maya suşlarının teknolojik özellikleri belirlenmiştir. Bu amaçla zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarında canlılığını koruyabilen ve literatür araştırmaları sonucunda sofralık zeytin üretimi açısından olumsuz özelliklerinin olmadığı belirlenen türler seçilmiştir. Çalışmada yapılan testler sonucunda elde edilen bulgular aşağıda özetlenmektedir.

1. Akhisar yöresine ait zeytin örneklerindeki tuz miktarının fermantasyon boyunca %8.19 ile %16.75 (w/v) arasında olduğu belirlenmiştir. İznik yöresine ait zeytin örneklerindeki tuz miktarının ise; %6.28 ile %14.80 (w/v) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Her iki yöreye ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarındaki, laktik asit cinsinden serbest asitlik miktarlarının (g laktik asit/100 mL salamura) fermantasyon boyunca arttığı gözlemlenmiştir. Akhisar yöresine ait zeytin örneklerindeki serbest asitlik miktarının %0.20 ile %1.49 arasında; İznik yöresine ait zeytin örneklerindeki serbest asitlik miktarının ise; %0.20 ile %0.85 arasında değiştiği belirlenmiştir.

Fermantasyon boyunca üretilen laktik asit miktarına bağlı olarak Akhisar yöresine ait zeytinlerde fermantasyon pH' sının, İznik-Gemlik zeytinlerin pH' sına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Her iki yöreye ait zeytinlerin salamura pH' larının fermantasyon boyunca düştüğü, fermantasyon sonunda Akhisar yöresine ait zeytinlerin salamura pH' sının 4.53, İznik yöresine ait zeytinlerin salamura pH'sının ise 4.58 olduğu belirlenmiştir.

2. Akhisar yöresine ait zeytinlerin fermantasyonun başlangıcındaki LAB sayısı; 4.11 ± 0.04 log (kob/g) olarak belirlenmiştir. Fermantasyonun 7. gününden itibaren LAB sayısı yükselmeye başlamış ve bu değer fermantasyonun 60. gününe kadar yaklaşık 3.00 logaritmik birim artarak; 7.10 ± 0.01 log (kob/g) değerine ulaşmıştır. Fermantasyonun 60. gününden sonra ise, LAB sayısı bir miktar düşme göstererek fermantasyonun son gününde ise; 6.27 ± 0.04 log (kob/g) olarak belirlenmiştir.

İznik yöresine ait Gemlik zeytinlerinin fermantasyon başlangıcında ortamdaki LAB sayısı; 5.32 ± 0.02 log(kob/g) olarak belirlenmiştir. Bu sayı fermantasyonun 1. ve 5. günlerinde bir miktar düşmekle birlikte, 18. gününde yaklaşık 2 logaritmik birimlik artış göstererek 7.33 ± 0.00 log (kob/g) değerine ulaşmıştır. Fermantasyonun 18. gününden itibaren ortamdaki LAB sayısında bir miktar düşme gözlenmiş ve fermantasyon sonunda bu sayı 5.87 ± 0.02 log (kob/g) olarak belirlenmiştir.

3. Akhisar yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyonları sırasında ortamda saptanan maya sayısının fermantasyonun başında 4.11 ± 0.01 log (kob/g) olduğu bulunmuştur. Bu değer fermantasyonun ilerleyen günlerinde; 7. ve 14. günde bir miktar arttığı, sonraki 15 gün içerisinde bir miktar düşme gösterdiği, ancak 46. günden sonra artmaya başladığı belirlenmiştir. Yaklaşık 7 ay süren fermantasyon süresince en yüksek maya sayısına (5.67 ± 0.05 log (kob/g)) fermantasyonun 3. ayına yaklaşırken ulaşılmış olup, izleyen aylarda yakın sayılar elde edilmiştir. Fermantasyon sonunda ise maya sayısında yaklaşık 2 logaritmik birimlik bir düşme görülmüştür.

İznik yöresine ait zeytinlerin doğal fermantasyonları sırasında ortamda saptanan maya sayısının fermantasyonun başında 3.61 ± 0.02 log (kob/g) olduğu bulunmuştur. Fermantasyonun ilk haftasında bu değer çok fazla değişmediği daha sonraki 2 hafta bir miktar arttığı, 46. günde bir miktar düşme gösterdiği, daha sonraki 1 ay boyunca artarak 91. günde en yüksek maya sayısına (5.98 ± 0.02 log (kob/g)) ulaştığı belirlenmiştir.

4. Her iki yöreye ait zeytin örneklerinden izole edilen mayaların tanımlanmaları amacı ile API ID 32C tanımlama sistemi, ek tanımlama testleri ve bazı moleküler tanımlama yöntemleri kullanılmıştır. Buna göre izole edilen toplam 100 adet

izolattan 27 tanesi yapılan pasajlarda canlandırılmamış, 74 tanesi ise kesin olarak tanımlanabilmiştir.

Çalışmada Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerinin doğal fermantasyon ortamından *C. hellenica* (7), *C. membranifaciens* (1), *K. apiculata* (2), *A. pullulans* (2), *R. glutinis* (2), *D. hansenii* (3), *C. famata* (14), *C. lusitaniae* (1), *Cry. laurentii* (1), *S. cerevisiae* (2), *C. mycetangi* (1), *C. pelliculosa* (1) türleri izole edilmiştir. İznik yöresine ait sofralık zeytinlerin doğal fermantasyon ortamından ise *P. anomala* (9), *C. pelliculosa* (11), *C. famata* (8), *Clv. lusitaniae* (1), *C. lusitaniae* (2), *Cry. saioti* (1), *P. holstii* (1) ve *Zygo. mrakii* (1) türleri izole edilmiştir.

5. Seçilen bazı maya izolatlarının teknolojik özelliklerinin belirlemesi amacı ile ilk olarak farklı sıcaklık, düşük pH ve yüksek tuz derişimlerinde gelişebilme testleri uygulanmıştır. Denemeler sonunda tüm izolatların 15°C' de gelişebildikleri belirlenmiştir. İzole edilen maya suşlarından *C. hellenica*, *P. anomala*, *C. pelliculosa*, *Cry. laurentii* ve *K. apiculata* türlerine ait olan suşların 37°C' de de gelişebildikleri, *D. hansenii*, *C. famata*, *C. membranifaciens*, *Clv. lusitaniae* ve *A. pullulans* türlerine ait suşların ise genel olarak 37°C' de gelişemedikleri belirlenmiştir.

Maya izolatlarının düşük pH değerlerinde gelişebilme özelliklerinin incelendiği denemeler sonucunda; tüm izolatların pH 4.5' de gelişebildikleri belirlenmiştir. Her iki yöreye ait izolatlardan *C. hellenica*, *K. apiculata*, *A. pullulans*, *P. anomala* ve *C. pelliculosa* suşlarının pH 2.5 ve 3.5 değerlerinde de gelişebildikleri; *D. hansenii*, *C. famata*, *Cry. laurentii*, *C. membranifaciens* ve *Clv. lusitaniae* suşlarının ise genel olarak, pH 3.5' de gelişebildikleri ancak pH 2.5' de gelişemedikleri belirlenmiştir.

Maya suşlarının yüksek tuz derişiminde gelişebilme özelliklerinin incelendiği denemelerde yapılan testler sonucunda, test edilen tüm suşların %14 ve %16 tuz derişimlerinde gelişebildikleri gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra 20 adet *P. anomala* ve *C. pelliculosa* suşundan 11'inin, *D. hansenii* ve *C. famata* suşlarının tamamının, 7 adet *C. hellenica* suşunun 1 tanesinin, *Clv. lusitaniae*, *K. apiculata* ve *C. membranifaciens* suşlarının %18 tuz içeren besiyerlerinde gelişebildikleri belirlenmiştir.

6. Çalışmada maya izolatlarının belirlenen teknolojik özellikleri arasında asetik asit ve hidrojen sülfür üretme ve lipolitik aktivite özellikleri de yer almaktadır. Bunlar arasında asetik asit üretme ve lipolitik aktivite özelliklerinin sofralık zeytin üretiminde genel olarak istenen teknolojik özellikler arasında yer aldığı, hidrojen sülfür üretme özelliğinin ise istenmeyen teknolojik özellikler arasında yer aldığı bilinmektedir. Araştırmada incelenen maya suşlarından hiç birinin asetik asit üretmedikleri belirlenmiştir.

Maya izolatlarını H₂S üretme özelliklerinin incelendiği denemeler sonunda üç adet *C. pelliculosa* (BZ-5, BF0-4, BF1-3) suşunun H₂S üretmedikleri belirlenmiştir. *C. hellenica* ve bazı *C. pelliculosa* suşlarının ise düşük miktarlarda H₂S ürettikleri tespit edilmiştir.

Lipolitik aktiviteleri incelenen suşların tamamının esteraz aktivitesine sahip oldukları ancak hiçbirinin önemli bir lipaz aktivitesine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Mayaların sahip oldukları esteraz aktivitesinin sofralık zeytinde tat ve koku oluşumuna katkı sağlayacağı bilinmektedir.

7. Çalışmada Akhisar ve İznik yörelerine ait 54 adet maya suşunun çeşitli şekerleri fermente edebilme özelliklerinin incelendiği denemelerde glukoz, sakkaroz ve fruktoz kullanılmıştır. Denemeler sonucunda Akhisar yöresine ait Gemlik zeytinlerin doğal fermantasyon ortamlarından izole edilen 7 adet *C. hellenica* suşunun 6 tanesi tüm şekerleri fermente edebildikleri, 1 tanesinin ise sadece fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği belirlenmiştir. Aynı zeytin örneklerinden izole edilen anamorf *C. famata* olan 17 adet *D. hansenii* suşundan 4 tanesinin sadece glukozu fermente edebildiği, 2 tanesinin ise bütün şekerleri fermente edebildikleri gözlemlenmiştir. Denemelerde *K. apiculata* suşunun ise denenilen bütün şekerleri fermente edebildiği bulunmuştur.

İznik yöresine ait zeytinlerin fermantasyon ortamlarından izole edilen anamorf *C. pelliculosa* olan 20 adet *P. anomala* suşunun tamamının glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildiği; 1 adet *C. famata* ve 1 adet *Clv. lusitaniae* suşunun ise sadece glukozu fermente edebildiği saptanmıştır.

8. Maya izolatlarının enzim profillerinin incelendiği denemeler sonunda; *C. hellenica*, *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*), *Cry. laurentii*, *C. membranifaciens*, *K. apiculata*, *P. anomala* (anamorfu: *C. pelliculosa*), *C. lusitaniae* ve *A. pullulans* türlerine ait suşlarının esteraz ve esteraz lipaz aktivitelerine sahip oldukları belirlenmiştir. İzole edilen 1 adet *C. hellenica* (AF46-6) suşunun, 1 adet *P. anomala* (BF63-2) suşunun, 1 adet *C. pelliculosa* (BF143-2) suşunun ve 1 adet *C. famata* (BF143-1) suşunun lipaz aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir. Mayaların sahip oldukları lipaz, esteraz lipaz ve esteraz enzimlerinin aroma öncüllerinin oluşmasına katkı sağladığı bilinmektedir.

Mayaların enzim profillerinin belirlendiği denemelerde, zeytinde acılığa neden olan oleuropeinin parçalanmasını sağlayan β -glukosidaz aktivitesi de belirlenmiştir. Genel olarak, çalışmada izole edilen *C. hellenica*, *P. anomala* (anamorfu; *C. pelliculosa*), *Cry. laurentii* (AF46-3) ve *C. lusitaniae* (BF1-2) suşlarının β -glukosidaz aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir.

9. Maya suşlarının teknolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile oleuropein ve sitrik asiti kullanabilme özellikleri de incelenmiştir. Teknolojik özellikleri test edilen tüm maya suşlarının %0.5 ve %1.5 oranlarında oleuropein kaynağı olarak kabul edilen zeytin yaprağı ekstraktı içeren ZY-YNB besiyerlerinde gelişebildikleri belirlenmiştir.

Akhisar yöresine ait zeytinlerden izole edilen *C. hellenica* türüne ait suşların tamamının, *D. hansenii* suşlarının iki tanesinin (AF191-2, AF211-1), *C. famata* suşlarının altı tanesinin (AF46-1, AF60-1, AF112-2, AF138-1, AF138-2, AF138-3), *A. pullulans* (AZ-6) ve *C. membranifacies* (AF164-1) suşlarının sitratı asimile edebildikleri bulunmuştur. İznik yöresine ait zeytinlerden izole edilen *P. anomala* ve *C. pelliculosa* türlerine ait suşların ise tamamı ve *C. famata* suşlarının iki tanesi (BF63-1, BF143-1) sitratı asimile edebilmektedirler.

10. Mayaların sahip oldukları katalaz aktivitesinin zeytinde yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu engellediği ve peroksit oluşumunun önüne geçtiği

bilinmektedir. Katalaz aktiviteleri incelenen tüm maya suşlarının, katalaz enzimi üretebildikleri belirlenmiştir.

11. Maya izolatlarının killer aktivitelerinin belirlendiği denemeler sonucunda; Akhisar-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilmiş olan toplam 19 adet suşun killer, 3 tane suşun nötral özellikte oldukları, İznik-Gemlik zeytinleri ve bunların fermantasyon ortamlarından izole edilmiş olan 21 suşun killer, 5 suşun ise nötral özellikte oldukları belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre; her iki bölgede yetişen Gemlik zeytinlerindeki endojen maya suşları arasında killer özelliğın yaygın bir karakter olduğu düşünölmektedir.

12. Çalışmada proteolitik ve pektolitik özellikleri açısından test edilen tüm suşların zayıf pektolitik aktiviteye sahip oldukları, bunun yanı sıra maya izolatlarının hiç birisinin ise, proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir. Her iki özelliğın de zeytinde yumuşamaya neden olduğu bilinmektedir.

13. Çalışmada elde edilen sonuçlar genel olarak değeriendirildiğinde; *C. hellenica*, *Cry. laurentii*, *K. apiculata* ve *P. anomala* suşlarının 10-37 °C, *D. hansenii* ve *C. famata* suşlarının 10-28 °C, *C. membranifaciens* ve *Clv. lusitaniae* suşlarının 15-28 °C arasında gelişebildikleri belirlenmiştir. Yapılan analizler sonucunda bu suşların tamamının pH 3.5' e kadar olan asitlik derecelerine ve % 16 tuz konsantrasyonlarına dayanıklı oldukları görölmektedir. Doğal fermente sofralık zeytin üretiminde zeytinde bulunan oleuropeinin parçalanarak acılığın giderilmesi ve fenolik bileşenlere dayanıklılık da önem kazanmaktadır. Yapılan testler sonucunda incelenen tüm suşların % 0.5 zeytin yaprağı ekstraktında bulunan fenolik bileşenlere dayanıklı oldukları belirlenmiştir. *C. hellenica* ve *P. anomala* türlerinin yüksek ve orta düzeylerde, *Cry. laurentii* suşunun düşük düzeyde β-glukosidaz aktivitesine sahip oldukları, diğeri suşların ise, β-glukosidaz aktivitesine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Mayaların destek starter olarak kullanılabilmeleri için istenen bir diğeri özellik ise bu mikroorganizmaların zeytinin organoleptik özelliklerine katkı sağlayabilmeleridir. Araştırmada yapılan testler sonucunda tüm suşların lipolitik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir. Ancak sadece *C. hellenica*, *P. anomala* ve *C. pelliculosa* suşlarının zeytin meyvesinde bulunduğu ifade edilen glukoz, fruktoz ve sakkarozu fermente edebildikleri saptanmıştır. Zeytinlerin

fermantasyon ortamlarından izole edilen bazı maya türlerinin pektolitik ve proteolitik aktiviteleri nedeni ile bozulmaya neden oldukları bilinmektedir. Çalışmamızda, incelenen tüm maya suşlarının çok zayıf pektolitik aktiviteye sahip oldukları ancak hiç birinin proteolitik aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde; *C. hellenica* ve *P. anomala* cinsine ait olan izolatların β -glukosidaz aktiviteleri ve şeker fermentasyonu özellikleri nedeni ile öne çıktıkları ve nedenle de sofralık zeytin üretiminde destek starter kültür olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Bu türler arasında killer ve nötral özellikte olan suşlar ile sitrik asiti asimile edebilen suşların doğal fermentasyona katkı sağlayabilecekleri düşünülmektedir. Tüm bu incelemeler sonucunda *C. hellenica* türüne ait AZ-1, AF1-6, AF28-4, AF84-1, *P. anomala* türüne ait ise; BZ-1, BZ-4, BF0-5, BF1-1, BF1-4, BF18-2, BF27-3, BF46-2, BF63-2 izolatlarının sofralık zeytin üretiminde destek starter kültür olarak kullanılabileme potansiyellerinin bulunduğu düşünülmektedir.

14. Uluslararası literatürde, mayaların sofralık zeytin üretiminde destek starter kültür olarak kullanılmasına yönelik çalışmaların giderek arttığı görülmektedir. Ülkemiz dünyada önemli zeytin üreticileri arasında yer almasına rağmen, Türkiye’de zeytin ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Çalışmada Gemlik zeytini florasından elde edilmiş yerel bir maya koleksiyonu oluşturulmuş ve bu mayaların çeşitli teknolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Bu teknolojik özellikler dikkate alınarak, elde edilen yerel maya kültürlerinin gıda endüstri ve farklı endüstri dallarında değişik biyoproseslerde değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abriouel, H., Benomar, N., Lucas R., Galvez, A., 2011, Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives, *International Journal of Food Microbiology* 144, 487-496.
- Albayram, C., 2007, Turşu ve zeytinde gelişen mayaların izolasyonu ve identifikasyonu, Yüksek lisans tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, s. 47.
- Alcoba-Flórez, J., Arévalo-Morales, M. P., Pérez-Roth, E., Laich, F., Rivero-Pérez, B., Méndez-Álvarez, S., 2007, Yeast molecular identification and typing, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 535-546.
- Alçıtepe, E., Tokuşoğlu, Ö., 2010, Botanik bilimine göre zeytin. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 15-24.
- Alimardani-Theuil, P., Gainvors-Claise, A., Duchiron, F., 2011, Yeasts: An attractive source of pectinases-From gene expression to potential applications: A review, *Process Biochemistry*, 46, 1525-1537.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Alves, M., Goncalves, T., Quintas, C., 2012, Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations, *Food Control*, 23, 363-368.
- Amelio, M., De Muro, E., 2000, Naturally fermented black olives of Taggiasca variety (*Olea europaea* L.), *Grasas y Aceites*, 5, 429-439.
- Aponte, M., Blaiotta, G., Croce, F., Mazzaglia, A., Farina, V., Settanni, L., Moschetti, V., 2011, Use of selected autochthonous lactic acid bacteria for Spanish-style table olive fermentation, *Food Microbiology* 30, 8-16.
- Aponte, M., Ventrino, V., Blaiotta, G., Volpe, G., Farina, V., Avellone, G., 2010, Study of green Sicilian table olive fermentations through microbiological, chemical and sensory analyses, *Food Microbiology*, 27, 162-170.
- Arroyo-López, F.N., Romero-Gil, V., Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Jiménez-Díaz, R., García-García, P., Querol, A., Garrido-Fernández, A., 2012, Potential benefits of the application of yeast starters in table olive processing, *Frontiers in Microbiology*, 5, 34.

- Arroyo López, F.N., Durán Quintana, M.C., Ruiz Barba, J.L., Querol, A., Garrido Fernández, A., 2006, Use of molecular methods for the identification of Yeast associated with table olives, *Food Microbiology*, 23, 791-796.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2008, Role of yeasts in table olive production, *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189–196.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N., 2011, Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications, *International Journal of Food Microbiology*, 147, 89-96.
- Bautista-Gallego, J., Arroyo-Lopez, F. N., Duran-Quintana, M.C., Gorrido-Fernandez, A., 2010, Fermentation profiles of Manzanilla-Alorena cracked green table olives in different salt mixtures, *Food Microbiology*, 27, 403-417.
- Bevilacqua, A., Perricone, M., Cannarsi, M., Corbo, M. R., Sinigaglia, M., 2009, Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from *Bella di Cerignola* table olives, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44, 2198–2207.
- BioMérieux, 2011, API-ZYM Kullanım Kılavuzu, Fransa.
- BioMérieux, 2006, ID 32C Kullanım Kılavuzu, Fransa.
- Boskou, D., 2006, Olive Oil: Chemistry and Technology, AOCS Publishing, Hellas, pp. 13-17.
- Botta, C., Cocolin, L., 2012, Microbial dynamics and biodiversity in table olive fermentation: culture-dependent and -independent approaches, *Food Microbiology*, 3, 245.
- Campaniello, D., Bevilacqua, A., Damato, D., Corbo, M.R., Altieri, C., Sinigaglia, M., 2005, Microbial characterization of table olives processed according to Spanish and natural styles, *Food Technology and Biotechnology*, 43, 289-294.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D., 2006, Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130–135.
- Çakmak, B., Yıldız, G., Uylaşer, V., Zeytin Yaprğındaki Fenolik Bileşenler ve Zeytin Yaprğıının Değerlendirilme Olanakları, III. Ulusal Öğrenci Zeytin Kongresi, 16-18 Mayıs 2012, Aydın, Türkiye.
- Deák, T., Beuchat, L. R., 1996, Handbook of Food Spoilage Yeasts, CRC Press, USA, 210 p.

- Dickinson, R. J., Kruckeberg, A. L., 2006. Carbohydrate Metabolism. The Yeast Handbook-Yeasts in Food and Beverages, Querol, A., Fleet, G. H. (eds), Springer, Berlin, pp. 215-219.
- Dokuzlu, C., 2004, Gıda Analizleri, Marmara Kitabevi, Bursa, s. 2-10.
- Ergönül, G., Tokuşoğlu, Ö., 2010, Zeytin meyvesinde organik asitler ve diğer bileşenlerle ilişkisi. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 55-67.
- Fell, J. W., Statzell-Tallmen, A, 1999a, *Rhodororula*. The yeasts: a Taxonomic study, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterda, pp. 800-825.
- Fell, J. W., Statzell-Tallmen, A, 1999b, *Cryptococcus*. The yeasts: a Taxonomic study, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 742-750.
- Fernández-González, M., Úbeda, J., Briones, A., 2000, Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making, International Journal Food Microbiology, 59, 29-36.
- Garcia, E., Luh, B. S., Martin, H., 2005, Olives. Processing Fruits: Science and Technology, Barret, Somogyi, L.P., Ramaswamy, S. H. (eds), CRC Press, Florida, pp. 751-754.
- Golubev, W.I., 1999, Mycocins (killer toxins). The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 55–62.
- Gómez, A. H., Garcia, P., Navaro, L., 2006, Elaboration of table olives, Grasas Y Aceites, 57(1), 86-94.
- Güceyü, Ç., Başoğlu, F., 2010, Gemlik Tipi Zeytinde Kalite Normları. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 123-126.
- Harrigan, W.F., 1998, Laboratory Methods in Food Microbiology, Academic Press, London, 532 p.
- Hansen, E. C., Kurtzman, C. P., 1999, *Pichia*, The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 273-300.
- Hernández, A., Martin, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Córdoba, M. G., 2007, Identification and characterization of yeast isolated from the elaboration of seasoned green table olives, Food Microbiol., 24, 346–351.
- Hernández, A., Martin, A., Córdoba, M.G., Benito, M.J., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., 2008, Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives, International Journal of Food Microbiology, 121, 178-177.

<http://www.cbs.knaw.nl/collections>.

<http://www.gkgm.gov.tr/mevzuat/kodeks/2008-24.html>.

<http://www.yeast-id.com>.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2012, Lactic acid bacteria from fermented table olives, *Food Microbiology*, 31, 1-8.

Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., Rozès, N., 2009, Influence of fruit ripeness and salt concentration on the microbial processing of *Arbequina* table olives, *Food Microbiology*, 26, 827-833.

Hurtado, A., Reguant, C., Esteve-Zarzoso, B., Bordons, A., Rozès, N., 2008, Microbial population dynamics during the processing of *Aberquina* table olives, *Food Research International*, 41, 738–744.

Idoui, T., Boudjerda, J., Leghouchia, E., Karamb, N. E., 2009, Naturally fermented Jijelian black olives: microbiological characteristics and isolation of lactic acid bacteria, *Grasas y Aceites*, 60, 514-518.

İzgü, F., Altınbay, D., Acun, T., 2006, Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its α -1,3-glucanase activity, *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 669-676.

Kailis, S, Harris. D., 2007, Producing table olives, Landlinks Press, Australia, pp. 37-48.

Kalaycı, Ş., 2008, SPSS uygulamalı çok değişkenli istatistik teknikleri, Asil Yayın Dağıtım, İstanbul, s. 15-260.

Kanavouras, A., Gazouli, M., Tzouvelekis Leonidas, L., Petraki, C., 2005, Evaluation of black table olives in different brines, *Grasas y Aceites* 56, 106-115.

Karasu, N., 2006, Turşu ve zeytinden antagonistik ve probiyotik özellikte laktik starter kültür eldesi, Yüksek lisans tezi, Pamukkale Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, s. 32-35.

Karasu-Yalçın, S., Şenses-Ergül, Ş., Özbaş, Z. Y., 2010, Moleküler esaslı yöntemlerin gıda kaynaklı mayaların tanımlanmalarında kullanılmaları, *Gıda*, 35, 379-386.

Kayahan, M., Tekin, A., 2006, Zeytinyağı Üretim Teknolojisi, TMMOB Gıda Mühendisleri Odası, Kitaplar serisi, Ankara, 198 s.

Kotzekidou, P., 1997, Identification of yeast from black olives in rapid system microtitre plates, *Food Microbiology*, 14, 609–616.

- Kumral, A, Başoglu, F., Şahin, I., 2009, Effect of the use of different lactic starters on the microbiological and physicochemical characteristics of naturally black table olives of Gemlik cultivar, *Journal of Food Process and Preservation* 33, 651–64.
- Kumral, A., 2005, Salamura siyah zeytin üretiminde farklı tuzda ve düşük sıcaklıkta fermantasyon uygulamasının olgunlaşma ve kaliteye etkisi, Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s. 44-74.
- Kurtzman, C.P., Boekhout, T., Robert, V., Fell, J.W., Deak, T., 2003, Methods to identify yeasts, *Yeasts In Food*. Boekhout, T. and Robert, V. (eds.) CRC Press, Germany, pp. 69-121.
- Kurtzman, C. P., 1999, *Zygosacharomyces*. The yeasts: a Taxonomic study, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 424-430.
- Lachance, M. A., Phaff, H. J., 1999, *Clavispora*, The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 148-153.
- Lalas, S., Athanasiadis, V., Gortzi, O., Bounitsi, M., Giovanoudis, I., Tsaknis, J., Bogiatzis, F., 2011, Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves, *Food Chemistry*, 127, 1521-1525.
- Malik, N. S. A., Bradford, J. M., 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in “Arbequina” olives, *Scientia Horticulturae*, 110, 274-278.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, F.V., Peinado, J.M., Spencer, M., 1992, Characterization of the yeast populations in olive brines, *Letters in Applied Microbiology*, 14, 279-283.
- Meyer, S. A., Payne, R. W., Yarrow, D., 1999, *Candida*. The yeasts: a Taxonomic study, Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 454-570.
- Montano, A., Sanchez, A. H., Lopez-Lopez, A., Castro, A., Rejano, L., 2010, Chemical composition of fermented green olives: acidity, salt, moisture, fat, protein, ash, fiber, sugar, and polyphenol. The plant, production, olives and olive oil and their detailed characterization, pp. 291-300.
- Mucilli, S., Caggia, C., Randazzo, C. L., Restuccia, C., 2011, Yeast dynamics during the fermentation of brined green olives treated in the field with kaolin and Bordeaux mixture to control the olive fruit fly, *International Journal of Food Microbiology*, 148, 15-22.
- Nakase, T., Suzuki, M., Phaff, H. J., Kurtzman, C.P., 1999, *Debaryomyces*. The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam. pp. 157-167.

- Nascimento, A. M., Martinez-Rossi, N. M., 2001, 18S-rDNA sequencing, enzyme patterns and morphological characterization of *Trichophyton* isolates, *Brazil Journal Microbiology*, 32,179-186.
- Nisiotou, A.A., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., 2010, Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions, *Journal of Applied Microbiology* 108, 396-405.
- Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z., Parker, M.L., Waldron, K.W., Tassou, C.C., 2002, Microbial colonization of naturally black olives during fermentation and associated biochemical activities, *Letter of Applied Microbiology*, 34,173–7.
- Özçelik, F., Türkmen, U., Ates, S., 1996, Farklı bölgelerden izole edilen sarap mayalarının killer özelliklerinin belirlenmesi, *Turkish Journal of Biology*, 20, 241-249.
- Özçelik, F., Dönmez, S., 1993, Killer yeasts and the determination of killer characters of some yeasts, *Turkish Journal of Biology*, 17, 1-4.
- Özilbey, N., 2011, *Zeytin Çeşitlerimiz*, Filiz Matbaacılık, Ankara, s. 13.
- Özkaya, M. T., Tunalıoğlu, R., Eken, Ş., Ulaş, M., Tan, M., Danacı, A., İnan, N., Tibet, Ü., 2010, Türkiye Zeytinciliğinin sorunları ve çözüm önerileri, *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, Ocak, Ankara, 515-537.
- Öztürk, F., Yalcin, M., Diraman, H., 2009, Türkiye zeytinyagi ekonomisine genel bir bakış, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 4, 35-51.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., 2006, Changes in volatile compounds and related biochemical profiles during controlled fermentation of cv. *Conservolea* green olives, *Food Microbiology*, 23, 738-746.
- Panagou, E.Z., Tassou, C.C., Katsaboxakis, K.Z., 2002, Microbiological, physicochemical and organoleptic changes in dry-salted olives of Thassos variety stored under different modified atmospheres at 4 and 20°C, *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 635–641.
- Pereira, A., P., Pereira, J., A., Bento, A., Letícia Estevinho, M., 2008, Microbiological characterization of table olives commercialized in Portugal in respect to safety aspects, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2895–2902.
- Psani, M., Kotzekidou, P., 2006, Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation, *World J Microbiol Biotechnol*, 22, 129–1336.

- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D., 1992, Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2948-2953.
- Randazzo, C. L., Rajendram, R., Caggia, C., 2010, Lactic acid bacteria in table olive production. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, Preedy, V. R., Watson, R. R.(eds.), Elsevier, Londra, pp. 369-376.
- Rejano, L., Montano, A., Casado, F. J., Sanchez, A. H., Castro, A., 2010, Table olives; varieties and variations. The plant, production, olives and olive oil and their detailed characterization, pp. 45-50
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A., 2010, Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing, *Food Microbiology*, 27, 1-9.
- Romo-Sanches, S., Alves-Baffi, M., Arevalo-Villena, M., Ubeda-Iranzo, J., Briones-Perez, A., 2010, Yeast biodiversity of oleic ecosystems: study of their biotechnological properties, *Food Microbiology*, 27, 487-492.
- Sabatini, N., Marsilio, V., 2008, Volatile compounds in table olives (*Olea europaea* L., Nocellara del Belice cultivar), *Food Chemistry*, 107, 1522-1528.
- Sarıkaya, R., Elçin, A. E., Mutluer, B., Selvi, M., Erkoç, F., 2008, Ankara piyasasından temin edilen sofralık siyah zeytin salamuralarının mikrobiyolojik analizi, *Gıda*, 33, 117-122.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Xavier-Malcata, F., 2011, Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behaviour, *LWT Food Science and Technology*, 44, 1349-1354.
- Smith, M, 1999, *Kloeckera*, The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 580-585.
- Smith, M., Suzuki, T., 1999, *Zygoascus*. The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 424-428.
- Şenses-Ergül, Ş., 2009, Nevşehir yöresi Emir ve Kalecik Karası üzümlerinin şaraba işlenmeleri aşamalarında maya floralarının belirlenmesi ve izole edilen endojen maya suşlarının bazı teknolojik özelliklerinin araştırılması, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, s. 88.
- Tassou, C.C, Panagou, E.Z, Katsaboxakis, K.Z., 2002, Microbiological and physicochemical changes of naturally black olives fermented at different temperatures and NaCl levels in the brines, *Food Microbiology*, 19, 605–615.

- Temiz, A., 1996, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatiboğlu Yayınları, Ankara, s. 82.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Suzzi, G., Corsetti, A., 2012, Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives, *Food Control*, 23, 356-362.
- Tokuşoğlu, Ö., 2010, Gemlik Zeytini hakkında. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 35-45
- Tokuşoğlu, Ö., Alçitepe, E., 2010, Ülkemiz ve diğer yetiştirici ülkelerdeki sofralık ve yağlık zeytin çeşitleri. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 13-16.
- Tokuşoğlu, Ö., Artık, N., 2010, Zeytin Meyvesi Hakkında. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 1-12.
- Tokuşoğlu, Ö., Başoğlu, F., 2010, Sofralık zeytin üretimi. Özel Meyve: Zeytin, Tokuşoğlu, Ö. (ed), Sidas Medya, Manisa, s. 111-126.
- Tsapatsaris, S., Kotzekidou, P., 2004, Application of central composite design and response surface methodology to the fermentation of olive juice by *Lactobacillus plantarum* and *Debaryomyces hansenii*, *International Journal of Food Microbiology*, 95, 157–168.
- Uylaşer, V., Şahin, İ., 2004, Salamura siyah zeytin üretiminde geleneksel gemlik yönteminin günümüz koşullarına uyarlanması Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 18, 105-113.
- Valencic, V., Mavsar, D. B., Bucar-Miklavcic, M., Butinar, B., Cadez, N., Golob, T., Raspor, P., Mozina, S. S., 2010, The Impact of Production Technology on the Growth of Indigenous Microflora and Quality of Table Olives from Slovenian Istria, *Food Technology and Biotechnology*, 48, 404-410.
- Vaughan-Martini, A., Martini, A., 1999, *Saccharomyces*. The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam. pp. 358-370.
- Yarrow, D., 2000, Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts, The yeasts: a Taxonomic study. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 77-100.
- Yatmaz, E., Turhan, İ., 2012, Fermantasyon yoluyla pullulan üretimi ve gıda endüstrisinde kullanımı, *Gıda*, 37, 95.
- Yıldız, G., Uylaşer, V., 2011, Doğal bir antimikrobiyel: oleuropein, U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25, 131-142.

- Yurtsever, S., 2006, Siyah sofralık zeytin fermantasyonunda alkali ve enzimatik yöntemlerin mikrobiyolojik özellikler üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s. 15.
- Zheng, W., Campbell, B. S., McDougall, B. M., Seviour, R. J., 2008, effects of melanine on the accumulation of polysacharides by *Aerobasidium pullulans*, Bioresources Technology, 99, 7480-7486.



EKLER

EK 1. ARAŞTIRMADA KULLANILAN BESİYERLERİ

Yeast Extract Peptone Dextrose Chloramphenicol (YEPDC) agar

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	10.0
Pepton	20.0
Glukoz	20.0
Kloramfenikol	0.1
Agar	20.0

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözölmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

MRS broth (Fluka, Lihtenştayn, Kat no.69962) besiyeri LAB sayımı denemelerinde kullanılmıştır. 52.2 g besiyeri ve 20 g agar, 1 L damıtık su içerisinde ısıtılarak çözölmüş daha sonra 1 mL Tween 80 eklendikten sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Lysine agar

Lysine agar (Oxoid, Birleşik Krallık, Kat no.CM0191B) besiyeri *Saccharomyces* cinsi içerisinde yer almayan mayaların izolasyonu amacı ile kullanılmıştır. 66 g tartılan besiyeri 1 L damıtık su içerisinde çözöldükten sonra berraklaşınca kadar mikrodalga fırında sterilize edilmiştir. Daha sonra besiyerine %10' luk laktik asit çözeltisinden 10 mL eklenmiştir.

Yeast Extract Malt Extract (YM) Broth

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	3.0
Malt özütü	3.0
Pepton	5.0
Glukoz	10.0

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Yeast Extract Malt Extract (YM) Agar

YM broth besiyeri bileşimine 15 g agar eklenmiş ve 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüştür. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Malt Extract Agar (MEA)

Bileşim	gL ⁻¹
Malt özütü	20.0
Pepton	1.0
Glukoz	20.0
Agar	20.0

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Şeker Fermantasyonu Besiyeri

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	5.0
Glukoz	20.0

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Sakkaroz ve fruktoz şekerleri ile yapılan fermantasyon denemelerinde glukoz yerine bu şekerler kullanılmışlardır.

Malt Asetik Agar (MAA)

MAA besiyeri, MEA besiyeri hazırlanıp sterilize edildikten sonra derişimleri sırasıyla %0.5 ve %1 (v/v) olacak şekilde asetik asit eklenerek, iki farklı derişimde hazırlanmıştır.

Yeast Carbon Base agar

Yeast Carbon Base (BD Difco, ABD, Kat no.239110) besiyeri nitrat asimilasyonu denemelerinde kullanılmıştır. 11.7 g besiyeri ve 20 g agar, 1 L damıtık su içerisinde ısıtılarak çözülmüş daha sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Malt Extract Yeast Extract %50 Glucose (MY 50G) Agar

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	2.5
Malt özütü	10.0
Glukoz	500.0
Agar	10.0

Glukoz dışındaki bileşenler tartıldıktan sonra ortama, 450 mL damıtık suda ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra saf su ile ağırlığı 500 g'a tamamlanmış ve belirtilen miktarda şeker eklenmiştir. Besiyeri kaynar su banyosunda 45 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Malt Extract Yeast Extract %60 Glucose (MY 60G) Agar

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	2.5
Malt özütü	10.0
Glukoz	600.0
Agar	10.0

Glukoz dışındaki bileşenler tartıldıktan sonra ortama, 350 mL damıtık suda ısıtılarak çözülmüştür. Daha sonra saf su ile ağırlığı 400 g'a tamamlanmış ve belirtilen miktarda şeker eklenmiştir. Besiyeri kaynar su banyosunda 45 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Rapid Urea broth

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	0.100
KH ₂ PO ₄	0.091
Na ₂ HPO ₄	0.095
Üre	20.0

Belirtilen miktarlarda tartılan besiyeri bileşenleri 1 L damıtık suda çözüldükten sonra bileşime, %1 (w/v)' lik fenol kırmızısı çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edildikten sonra 0.5 mL' lik hacimlerde steril tüplere dağıtılmıştır.

Potato Dextrose Agar (PDA)

Denemelerde pseudohif oluşumunun incelenmesi amacıyla hazır PDA besiyeri (LAB M, Birlesik Krallık, Kat no. Lab98) kullanılmıştır. 39 g besiyeri 1 L damıtık su içerisinde ısıtılarak çözülmüş daha sonra otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Gorodkova Agar

Bileşim	gL ⁻¹
NaCl	5.0
Pepton	10.0
Glukoz	1.0
Agar	20.0

Maya izolatlarının askospor oluşturma ve lipaz aktivitesi özellikleri Gorodkova agar besiyeri kullanılarak belirlenmiştir. Askospor denemeleri için, bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir. Lipaz aktivitesi denemeleri için ise bileşenler 950 mL damıtık suda ısıtılarak homojenize edildikten sonra 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiş daha sonra yine 121°C' de 15 dakika sterilize edilmiş olan 50 mL steril zeytinyağı ilave edilmiştir.

McClary Acetate Agar

Bileşim	gL ⁻¹
Potasyum klorür	1.8
Maya özütü	2.5
Sodyum asetat trihidrat	2.5
Glukoz	1.0
Agar	15.0

Bileşenler belirtilen miktarlarda tartıldıktan sonra 1 L damıtık suda ısıtılarak çözülmüş ve otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

YEPD-MB agar

Maya izolatlarının killer aktivitelerinin incelendiği denemelerde YEPD-MB agar besiyerinden yararlanılmıştır. YEPD broth besiyeri bileşimine %0.003 (w/v) metilen mavisi ve 20 g agar eklenerek 1 L damıtık suda çözülmüştür. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edildikten sonra besiyeri pH' ı, steril 0.1 M sitrat fosfat tamponu ile pH 4.5' a ayarlanmıştır.

CaCO₃-YEPD agar

Maya kültürlerinin asetik asit üretimlerinin incelendiği denemelerde YEPD agar besiyeri bileşimine; %0.5 (w/v) oranında CaCO₃ eklenerek hazırlanmış CaCO₃-YEPD agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

%10' luk Milk agar

Bileşim	gL ⁻¹
Maya özütü	3.0
Pepton	5.0
Agar	15.0

Besiyeri bileşenleri belirtilen miktarlarda 900 mL damıtık su içerisinde çözüldükten sonra %10' luk rekonstitüe yağsız sütten 100 mL eklenmiştir. Besiyeri otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

Bismuth Sulfite Glucose Glycine Yeast (BIGGY) agar

Denemelerde maya izolatlarının H_2S üretme özelliklerinin incelenmesi amacıyla hazır BIGGY agar (Oxoid, Birlesik Krallık, Kat no.CM0589) besiyeri kullanılmıştır. 42 g besiyeri 1 L suda çözündürülmüş ve berraklaşana kadar mikrodalgada sterilize edilmiştir.

Yeast Nitrogen Base (YNB) broth

Mayaların sitrik asit asimilasyonu özelliklerinin belirlendiği denemeler Yeast Nitrogen Base (BD Difco, Kat no. 239210) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. 6.7 g besiyeri ve 20 g agar 1 L damıtık suda ısıtılarak çözündürülmüş ve otoklavda $121^{\circ}C$ ' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

YNB-NP agar

Mayaların pektolitik aktivite özelliklerinin belirlendiği denemeler %0.5 (w/v) oranında narenciye pektini içeren Yeast Nitrogen Base (BD Difco, Kat no. 239210) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. 6.7 g besiyerine 20 g agar ve 5 g narenciye pektini eklenmiş ve 1 L damıtık suda ısıtılarak çözündürülmüştür. Besiyerleri otoklavda $121^{\circ}C$ ' de 15 dakika sterilize edilmiştir.

YNB-ZY agar

Mayaların oleuropein asimilasyonu özelliklerinin belirlendiği denemeler %0.5 ve %1.5 (w/v) oranlarında zeytin yaprağı ekstraktı içeren Yeast Nitrogen Base (BD Difco, Kat no. 239210) besiyerinde gerçekleştirilmiştir. 6.7 g besiyerine 20 g agar ve hesaplanan miktarlarda zeytin yaprağı ekstraktı eklenmiş ve 1 L damıtık suda ısıtılarak çözündürülmüştür. Besiyerleri otoklavda $121^{\circ}C$ ' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiştir.

EK 2. ARAŞTIRMADA KULLANILAN TAMPON, BOYA VE DİĞER ÇÖZELTİLER

0.1 N NaOH çözeltisi

NaOH	4 g
Saf su	1000 mL

150°C'de 2 saat kurutulan 4 g NaOH 100 mL saf suda çözündürüldükten sonra hacmi 1000 mL'ye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti okzalik asit dihidrat ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$) çözeltisi ile titre edilerek ayarlanmıştır. Titrasyon sırasında indikatör olarak fenolftalein kullanılmıştır.

0.1 N $AgNO_3$ çözeltisi

$AgNO_3$	16.9890 g
Saf su	1000 mL

Saf $AgNO_3$, 150°C' de 2 saat etüvde bekletilmiş daha sonra oda sıcaklığına geldikten sonra 16,9890 g tartılıp 100 mL saf suda çözölmüştür. Çözelti 1 litrelik balonjojeye alınarak hacim çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti kahverengi şişede karanlıkta bekletilmiştir.

1 M Tris-HCl çözeltisi (pH 8.0)

Tris Base (Sigma T-1503)	121.14 g
DNA/RNA içermeyen deiyonize su	800 mL

Belirtilen miktarda tris-hidroklörür, 800 mL deiyonize su içerisinde çözöldükten sonra pH, derişik HCl ile 8.0' e ayarlanmış ve hacmi 1 L' ye tamamlanmıştır. Daha sonra çözelti otoklavda sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

0.5 M Na_2EDTA çözeltisi (pH 8.0)

$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ (Boheringer, 808288)	186.12 g
DNA/RNA içermeyen deiyonize su	800 mL

Belirtilen miktarda disodyum EDTA dihidrat, manyetik karıştırıcıda deiyonize su ile karıştırılmış ve hazırlanan çözeltini pH' ı, NaOH peletleri eklenerek, 8.0' e

ayarlanmıştır. Daha sonra hacim, 1 L' ye tamamlanmıştır. Çözelti otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Tampon 1 (pH 7.5)

D-Sorbitol (Sigma s-3889)	0.9 M
EDTA (Boheringer 808288)	0.1 M

Tampon 1, belirtilen miktardaki bileşenlerini içerecek şekilde hazırlandıktan sonra, pH' ı, NaOH ya da HCl peletleri eklenerek, pH 7.5' e ayarlanmıştır. Çözelti otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Tampon 2 (pH 7.4)

Tris	50 mM
EDTA (Boheringer 808288)	20 mM

Tampon 2, belirtilen miktardaki bileşenlerini içerecek şekilde hazırlandıktan sonra, pH' ı, NaOH ya da HCl peletleri eklenerek, pH 7.5' e ayarlanmıştır. Çözelti otoklavda 121°C' de 15 dakika tutularak sterilize edilmiş ve daha sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

%10 (w/v) SDS Çözeltisi (pH 7.2)

Sodyum dodesilsülfat	100 g
DNA/RNA içermeyen steril deiyonize su	900 mL

Belirtilen miktarda sodyum dodesil sülfat tartılarak, steril bir cam şişeye aktarılmış ve 900 mL DNA/RNA içermeyen, steril deiyonize su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözeltinin pH' ı, konsantre HCl eklenerek, 7.2'e ayarlanmıştır. Daha sonra hacim, 1 L' ye tamamlanmıştır. Çözelti otoklavda sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X TE Tamponu (pH 7.4)

1 M Tris-HCl (pH 8.0)	10 mL
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	2 mL
DNA/RNA içermeyen deiyonize su	800 mL

Bileşenler 800 mL deiyonize su içerisinde çözöldöktön sonra, hacim 1 L' ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tampon çözöltinin pH'sı derisik HCl ya da NaOH eklenerek 7.4 e ayarlanmış, daha sonra otoklavda sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

10X TBE Tamponu

Tris	108 g
Borik asit	55 g
0.5 M Na ₂ EDTA (pH 8.0)	40 mL
DNA/RNA içermeyen deiyonize su	900 mL

Bileşenler 900 mL deiyonize su içerisinde çözöldöktön sonra hacim balon jojede 1L' ye tamamlanmış ve hazırlanan tampon oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Jel yükleme tamponu

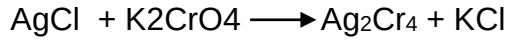
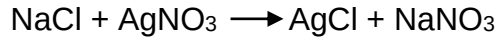
Elektroforez işlemi uygulanan agaroz jel içerisindeki DNA' nın yürütme işlemi sırasında gözlemlenebilmesi amacı ile, 10X hazır jel yükleme tamponu (A260) (Takara, Japonya) kullanılmıştır.

Etidyum bromür çözöltisi

Elektroforez işlemi uygulanan agaroz jel içerisindeki DNA' nın boyanması ve UV altında görülmesi amacı ile, hazır etidyum bromür çözöltisi (Sigma 46077, Almanya) kullanılmıştır.

EK 3. MOHR YÖNTEMİ İLE TUZ MİKTARININ HESAPLANMASI

Çalışmada laboratuvara gelen salamura içerisindeki zeytin örneklerindeki tuz tayini; Mohr yöntemine göre yapılmıştır (Dokuzlu, 2004). Denemelerde, yöntemin önerdiği şekilde hazırlanmış salamura örnekleri AgNO_3 ile titre edilmiş, indikatör olarak da K_2CrO_4 çözeltisi kullanılmıştır. Yöntem, ortamdaki klorürlerin gümüş klorür halinde çöktürülmesi ve serbest kalan gümüş iyonlarının indikatör olarak ilave edilen nötr potasyum kromat ile gümüş kromat oluşturarak tuğla kırmızısı bir renk vermesi esasına dayanmaktadır.



Çalışmada, zeytin salamura örneğinden 20 mL alınarak 250 mL'lik balon jöjeye aktarılmış ve balon jöjenin çizgisine kadar saf su ile tamamlanmıştır. İyice karıştırılarak homojenize edildikten sonra çözeltiden 20 mL alınarak bir erlene aktarılmıştır. Çözeltiye indikatör olarak 1 mL %10'luk nötr K_2CrO_4 çözeltisi eklenmiş ve 0,1N AgNO_3 çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyon sonunda örnekteki tuz miktarı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{Tuz} = V \times N \times F \times 0,0585 \times 100 / \text{Örnek miktarı}$$

V: Titrasyonda harcanan 0,1N AgNO_3 miktarı

N: AgNO_3 'ün normalitesi

F: AgNO_3 'ün faktörü

EK 4. LAKTİK ASİT CİNSİNDEN SERBEST ASİTLİK MİKTARININ HESAPLANMASI

Laboratuvara salamurası ile birlikte gelen zeytin numunelerindeki serbest asitlik tayini laktik asit cinsinden yapılmıştır (Dokuzlu, 2004). Yöntem, saf su ile seyreltilen numunenin fenolftalein indikatörü eşliğinde normalitesi belli olan NaOH ile titre edilerek, kullanılan NaOH miktarından asit miktarının hesaplanması ilkesine dayanmaktadır.

Denemelerde 10 mL salamura örneği 250 mL hacminde balon jöjeye alınmış ve balon jöje çizgisine kadar saf su eklenmiştir. İyice karıştırılarak homojenize edildikten sonra bu çözeltiden 10 mL alınmış ve erlene aktarılmıştır. Erlene 0,5 mL fenolftalein eklendikten sonra ayarlı NaOH ile titre edilmiştir. Titrasyon sonunda örnekteki laktik asit miktarı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\%Laktik\ Asit = S \times N \times F \times 0,090 \times 100 / V$$

S: Titrasyonda harcanan NaOH hacmi (mL)

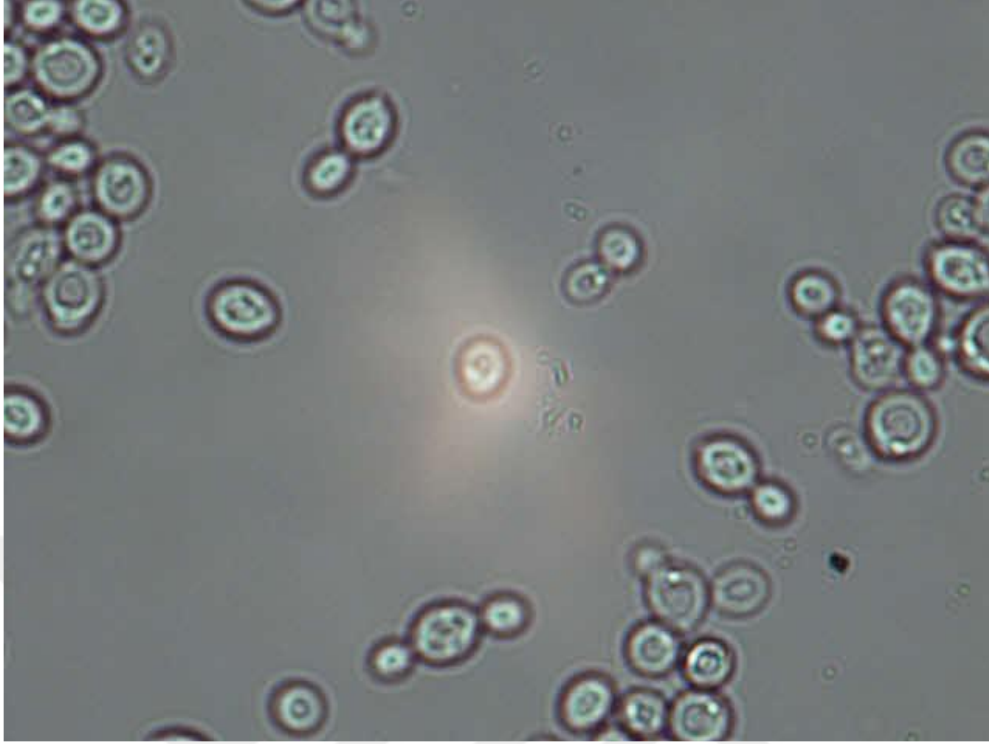
V: Deney numunesi hacmi (mL)

N: NaOH'ın Normalitesi

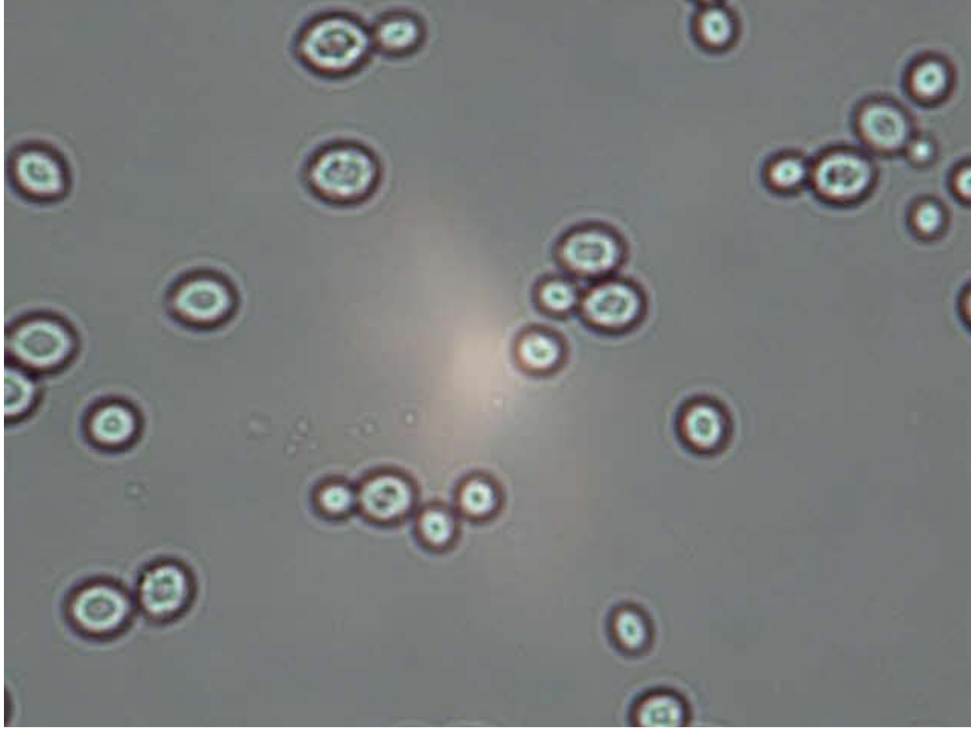
F : NaOH'ın faktörü

0,090: Laktik asitin mili eşdeğer gram

EK 5. MAYA KÜLTÜRLERİNİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ



Şekil EK 5.1. *C. hellenica*'nın mikroskopik morfolojisi (YM broth besiyeri, 28°C/48 sa., X100)



Şekil EK 5.2. *A. pullulans*'nın mikroskopik morfolojisi (YM broth besiyeri, 28°C/48 sa., X100)



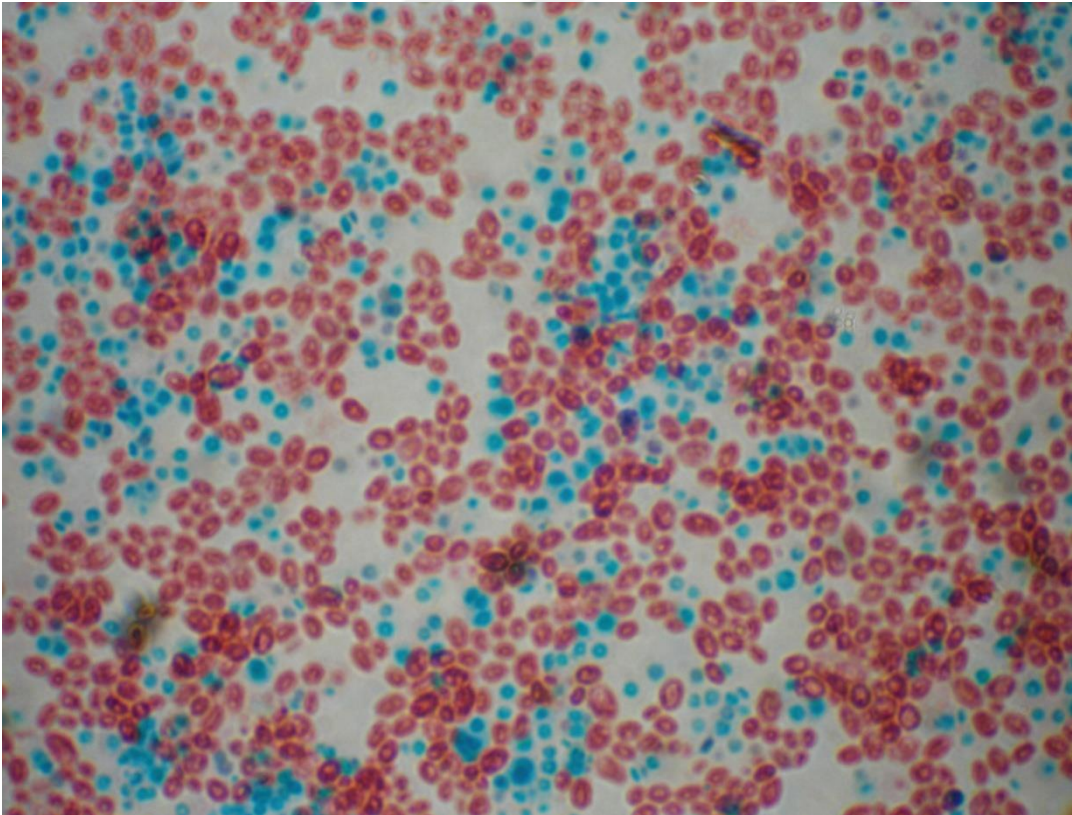
Şekil EK 5.3. *D. hansenii* (anamorfu; *C. famata*)'nın mikroskobik morfolojisi (YM broth besiyeri, 28°C/48 sa., X100)



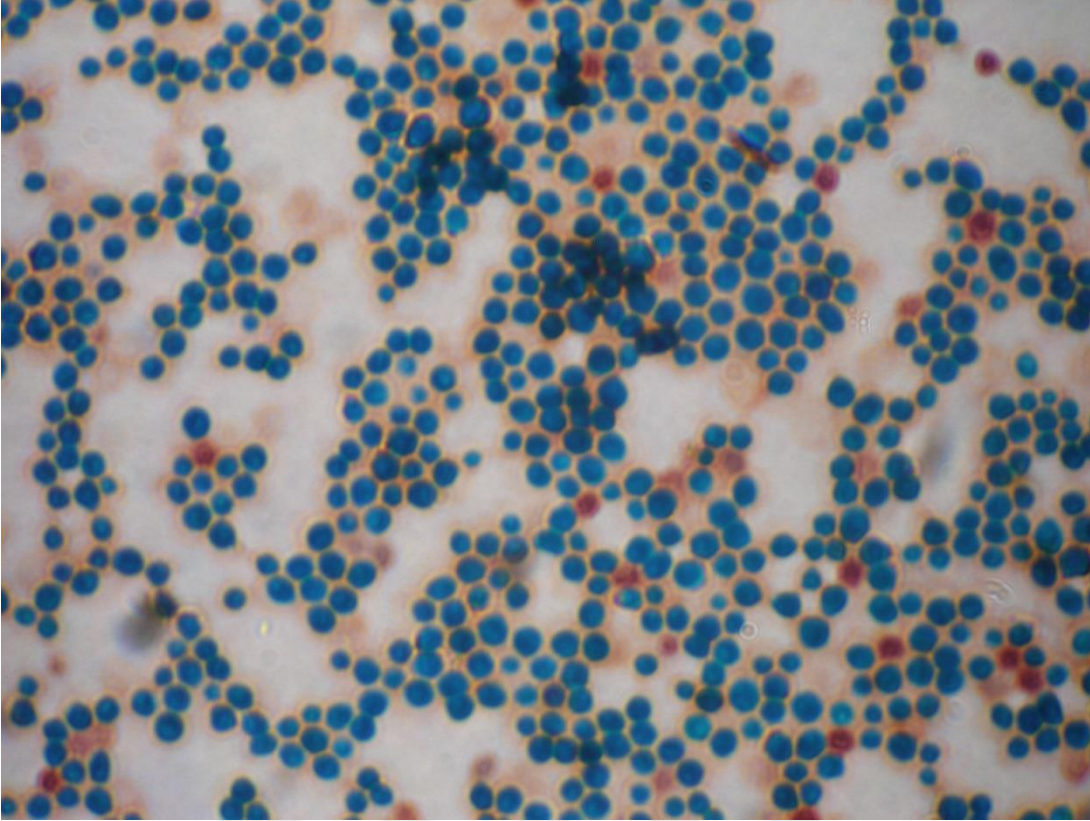
Şekil EK 5.4. *K. apiculata*'nın mikroskobik morfolojisi (YM broth besiyeri, 28°C/48 sa., X100)



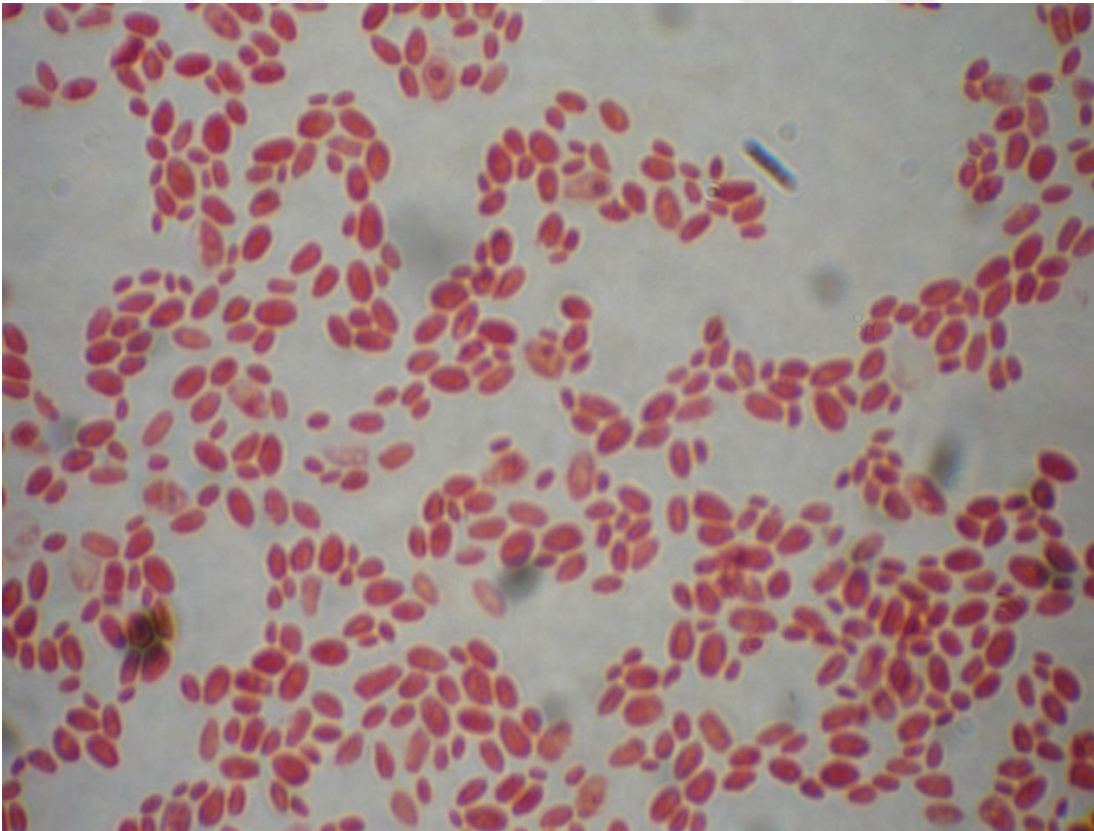
Şekil EK 5.5. *C. pelliculosa*'nın mikroskopik morfolojisi (YM broth besiyeri, 28°C/48 sa., X100)



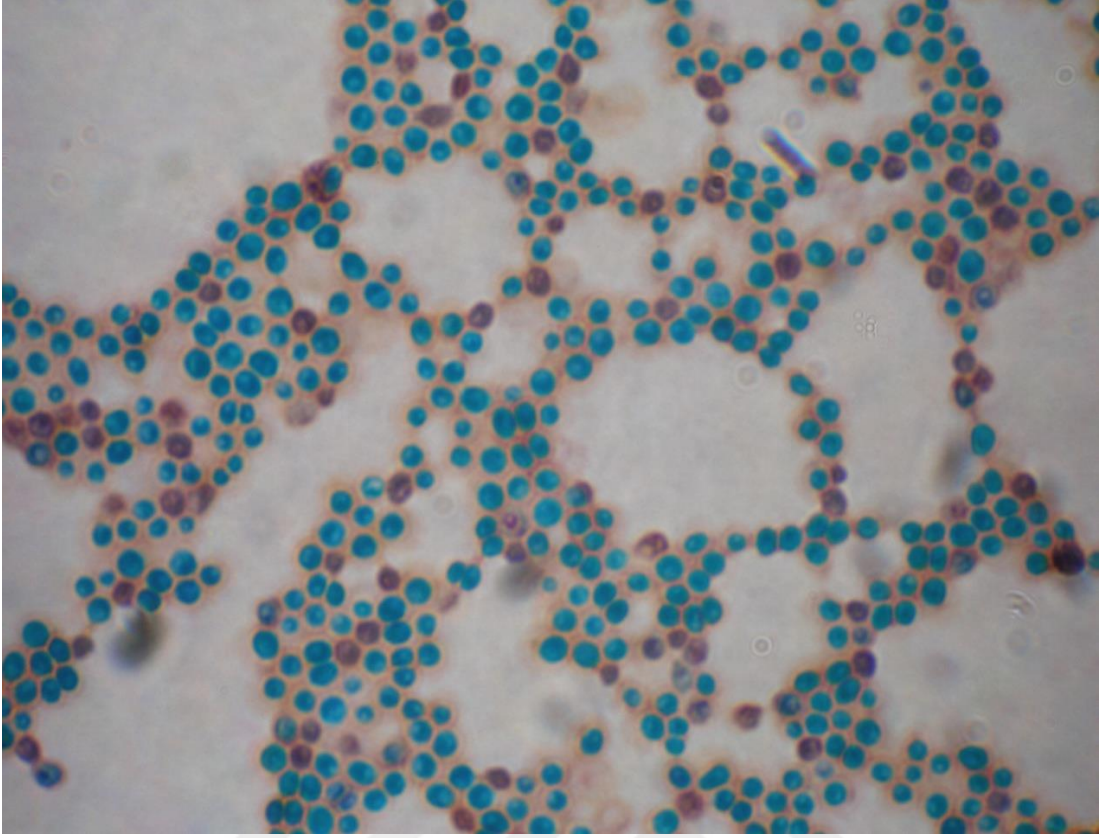
Şekil EK 5.6. *P. anomala*'nın askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (McClary Acetate Agar, 25°C/21 gün, X100)



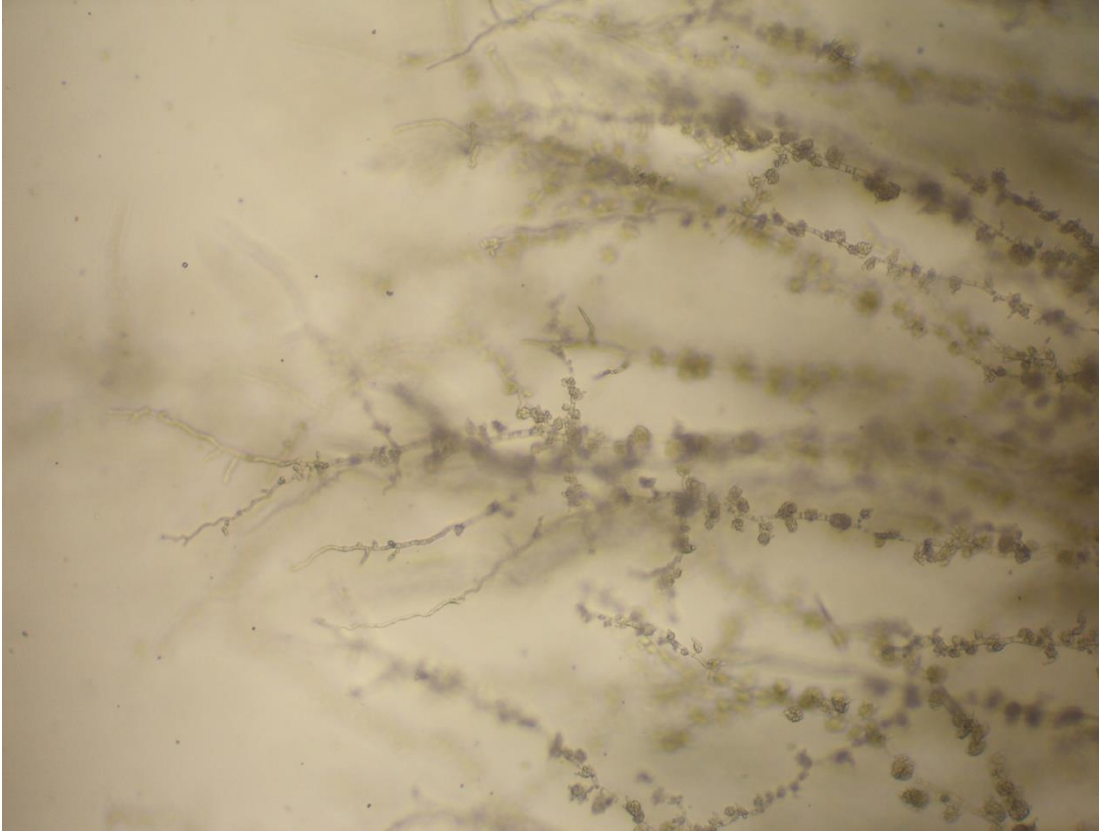
Şekil EK 5.7. *S. cerevisiae*'nı askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (McClary Acetate Agar, 25°C/21 gün, X100)



Şekil EK 5.8. *C. pelliculosa*'nın askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (McClary Acetate Agar, 25°C/21 gün, X100)

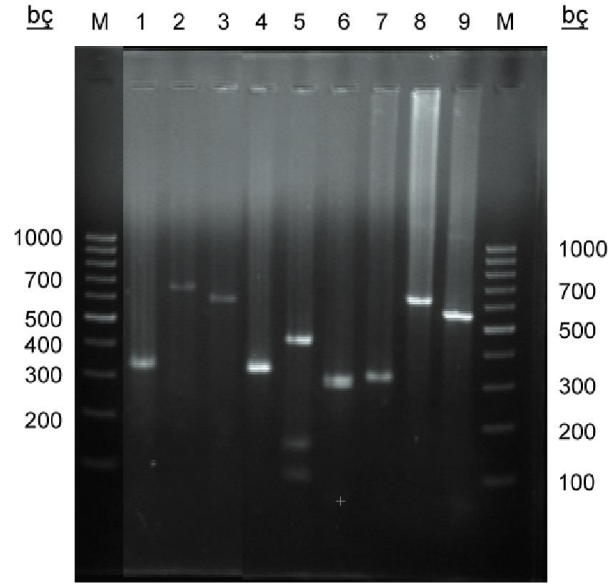


Şekil EK 5.9. *D.hansenii*'nin askospor besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (McClary Acetate Agar, 25°C/21 gün, X100)

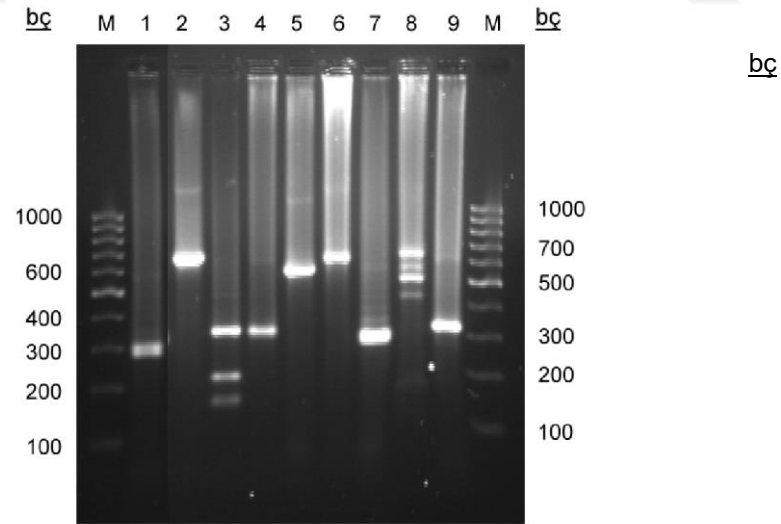


Şekil EK 5.10. *A. pullulans*'in pseudohif besiyerindeki mikroskopik morfolojisi (PDA, 25°C-18 gün, X40)

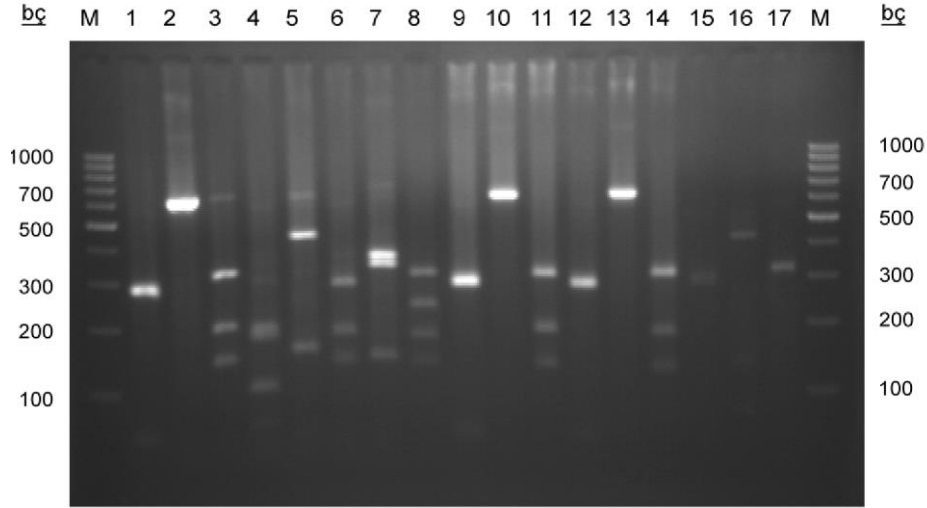
EK 6. MAYA İZOLATLARININ RFLP-PZR KESİM PROFİLLERİNE İLİŞKİN BAZI SONUÇLAR



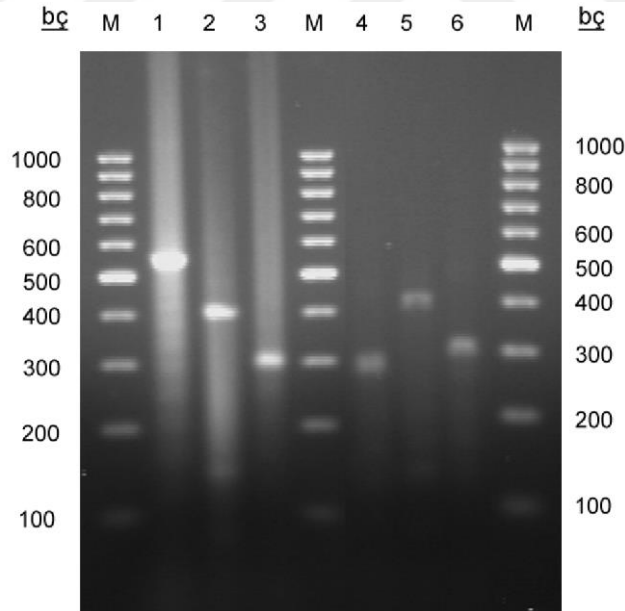
Şekil EK 6.1 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *C. pelliculosa* (BF5-2) için; 1: *HinfI*, 2: *HaeIII* kesim profili. 3: *Cfol* kesim parçası profilleri. *C. famata* (AF112-2) için; 4: *HinfI* 5: *C. HaeIII* 6: *Cfol* kesim parçası profilleri. *C. pelliculosa* (BF143-2) için; 7: *HinfI*, 8: *HaeIII*, 9: *Cfol* kesim parçası profilleri.



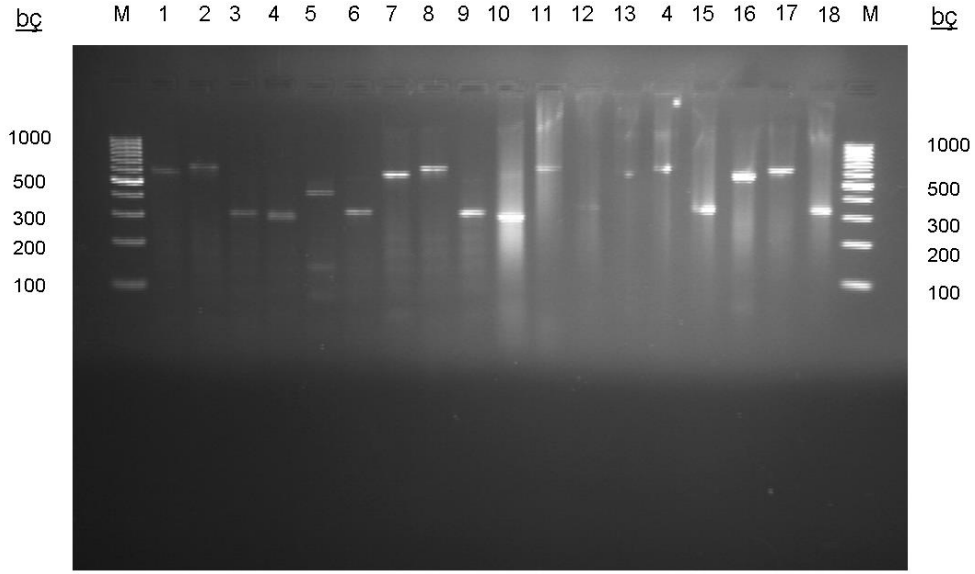
Şekil EK 6.2 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: kesim parçası 100 bç marker. *Z. hellenicus* (AZ-1) için; 1: *Cfol*, 2: *HaeIII*, 3: *HinfI* kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BF0-5) için; 4: *Cfol*, 5: *HaeIII*, 6: *HinfI* kesim parçası profilleri. *C. famata* (BF91-2) için; 7: *Cfol*, 8: *HaeIII*, 9: *HinfI* kesim parçası profilleri.



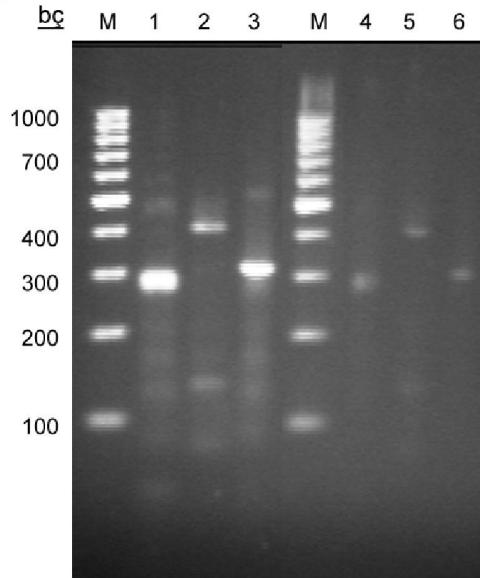
Şekil EK 6.3 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *Z. hellenicus* (AF1-2) için; 1: CfoI, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *A. pullulans* (AF1-5) için; 4: CfoI, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri. *S. cerevisiae* (AF28-3) için; 7: CfoI, 8: HaeIII, 9: CfoI kesim parçası profilleri. *Z. hellenicus* (AF28-4) için; 10: HaeIII, 11: HinfI 12: CfoI kesim parçası profilleri. *Z. hellenicus* (AF46-5) için; 13: HaeIII, 14: HinfI, 15: CfoI kesim parçası profilleri. *C. famata* (AF191-3) için; 16: HaeIII, 17: HinfI kesim parçası profilleri.



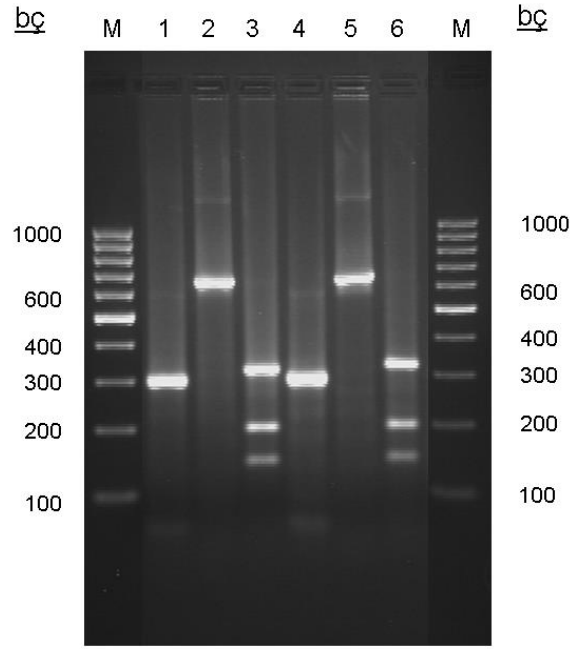
Şekil EK 6.4 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *P. anomala* (BF18-2) için; 1: CfoI, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *D. hansenii* (AF211-1) için; 4: CfoI, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri.



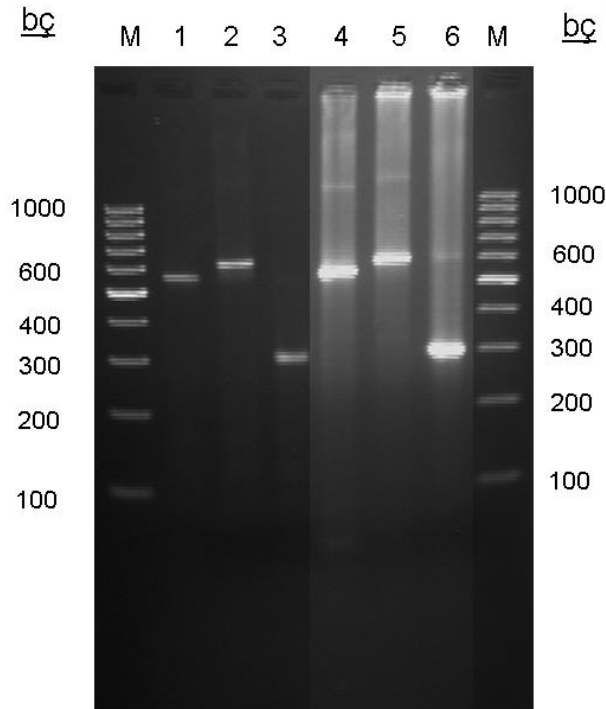
Şekil EK 6.5 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *P. anomala* (BF27-1) için; 1: Cfol 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *D. hansenii* (AF60-2) için; 4: Cfol, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BF27-3) için; 7:Cfol, 8: HaeIII, 9: HinfI kesim parçası profilleri. *D. hansenii* (BF18-1) için; 10: Cfol, 11: HaeIII, 12: HinfI kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BF46-2) için; 13: Cfol, 14: HaeIII, 15: HinfI kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BF27-5) için; 16:Cfol, 17: HaeIII, 18: HinfI kesim parçası profilleri



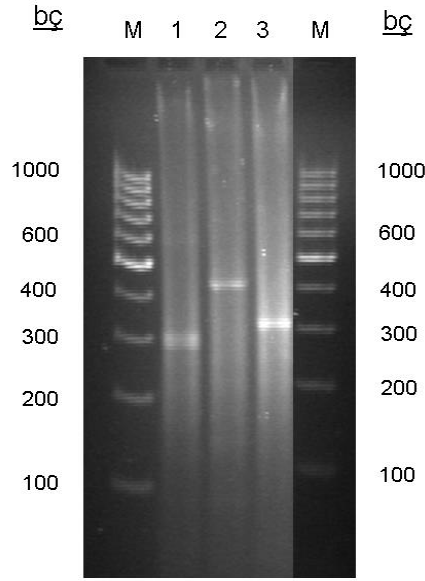
Şekil EK 6.6 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *C. myctangi* (AF164-3) için; 1: Cfol, 2:HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri *D. hansenii* (AF192-2) için; 4: Cfol, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri



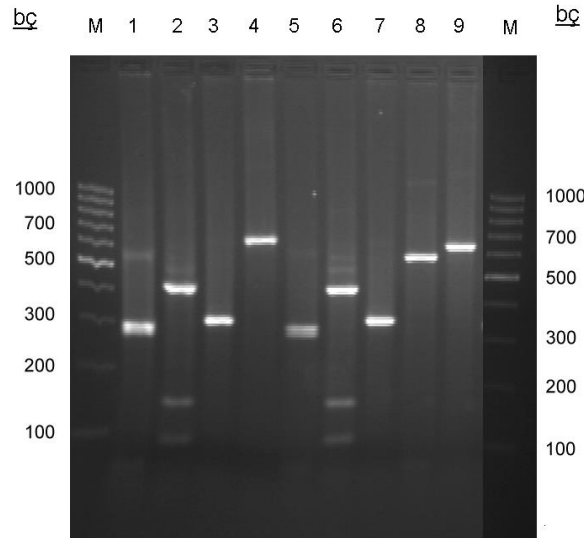
Şekil EK 6.7 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *Z. hellenicus* (AF46-6) için; 1: Cfol, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *Z. hellenicus* (AF1-6) için; 4: Cfol, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri



Şekil EK 6.8 Bazı maya suşlarının Cfol, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *P. anomala* (BF63-2) için; 1: Cfol, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BF0-4) için; 4: Cfol, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri.



Şekil EK 6.9 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *C. membranifaciens* (AF164-1) için; 1: CfoI, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri.

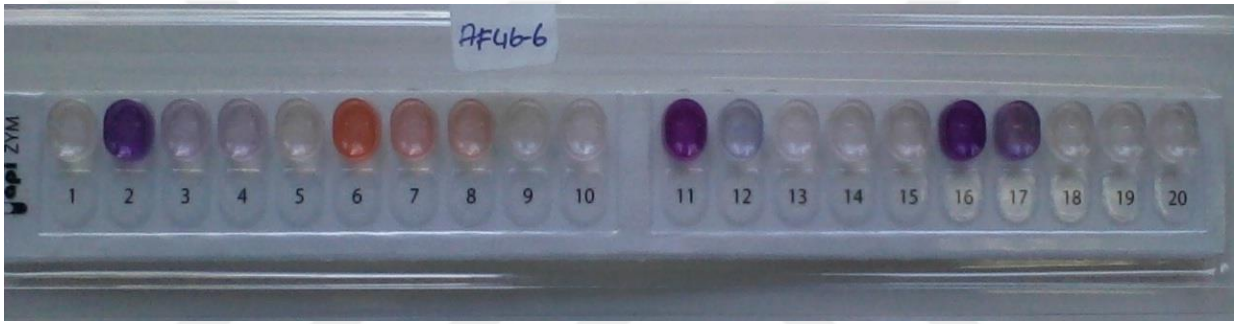


Şekil EK 6.10 Bazı maya suşlarının CfoI, HaeIII ve HinfI enzimleri ile elde edilen kesim parçası profilleri. M: 100 bç marker. *D. hansenii* (AF164-4) için; 1: CfoI, 2: HaeIII, 3: HinfI kesim parçası profilleri. *D. hansenii* (BF117-1) için, 4: CfoI, 5: HaeIII, 6: HinfI kesim parçası profilleri. *P. anomala* (BZ-1) için; 7:CfoI, 8: HaeIII., 9: kesim parçası profilleri.

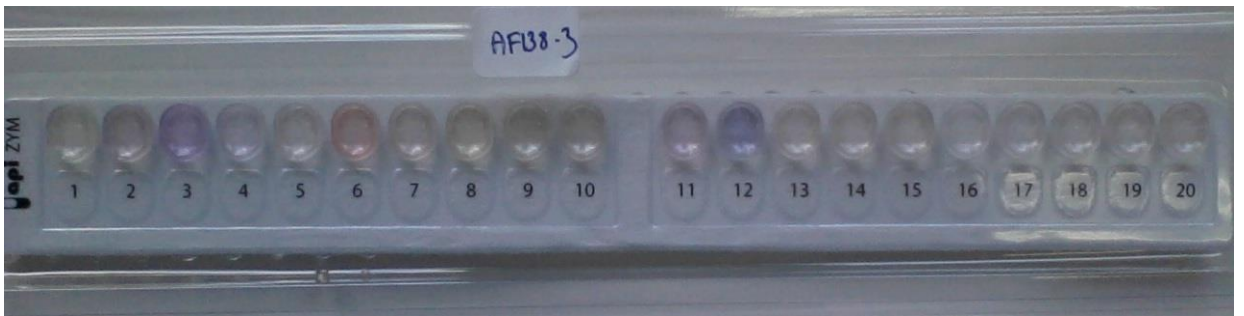
EK 7. MAYA SUŞLARINA AİT BAZI ENZİM PROFİLİ TEST SONUÇLARI



(a)



(b)

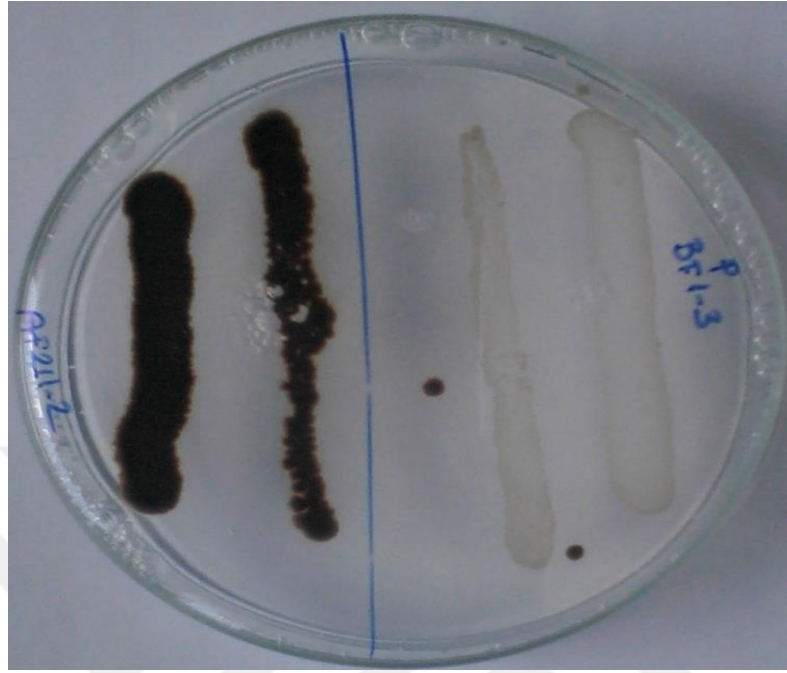


(c)

Şekil EK 7.1 API-ZYM ile belirlenen enzim profillerinde gözlenen renk reaksiyonları.

(a) *C. pelliculosa* (BF143-2) (b) *C. hellenica* (AF46-6) (c) *C. famata* (AF138-3)
suşuna ait API ZYM enzim kitinde gözlenen renk reaksiyonları.

EK 8. BAZI MAYA SUŞLARINA AİT BİGGY AGARDA GÖZLENEN H₂S ÜRETME ÖZELLİKLERİ



a

b



c

d

Şekil EK 7.2. Maya suşlarının H₂S üretme özelliklerine ilişkin bazı sonuçlar. a: Bir *K. apiculata* suşuna ait H₂S profili (Koyu kahverengi). b: Bir *C. pelliculosa* suşuna ait H₂S profili (Beyaz) c: Bir *P. anomala* suşuna ait H₂S profili (Krem). d: Bir *C. famata* suşuna ait H₂S profili (Açık kahverengi)